

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7038064号

(P7038064)

(45)発行日 令和4年3月17日(2022.3.17)

(24)登録日 令和4年3月9日(2022.3.9)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

Z

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 31 (全111頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-554534(P2018-554534)

(86)(22)出願日 平成29年4月18日(2017.4.18)

(65)公表番号 特表2019-521645(P2019-521645
A)

(43)公表日 令和1年8月8日(2019.8.8)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/028162

(87)国際公開番号 WO2017/184619

(87)国際公開日 平成29年10月26日(2017.10.26)

審査請求日 令和2年3月23日(2020.3.23)

(31)優先権主張番号 62/324,170

(32)優先日 平成28年4月18日(2016.4.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 510122326

セルデックス セラピューティクス イン
コーポレイテッド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2

4 9 4 - 2 7 2 5 , ニーダム , フォー

ス アベニュー 1 1 9

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒト C D 4 0 に結合するアゴニスト抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含むヒト C D 4 0 に結合するアゴニスト単離モノクローナル抗体であって、前記重鎖可変領域が、配列番号 1 9 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 2 1 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 2 3 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を含み、前記軽鎖可変領域が、配列番号 2 5 に示すアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 2 7 に示すアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 2 9 に示すアミノ酸配列を含む C D R 3 を含み、前記抗体は、

(a) F c 受容体の結合とは無関係に、

(b) C D 4 0 発現細胞の抗体依存性細胞傷害作用 (A D C C) を誘導することなく、

(c) C D 4 0 発現細胞の補体依存性細胞傷害作用 (C D C) を誘導することなく、かつ / または

(d) F c 受容体の結合とは無関係に、かつ C D 4 0 L と相乗作用を示すことが可能で、
のいずれかで、A P C を直接活性化し、かつ / または抗原に対する免疫反応を増大させる
抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗体であって、配列番号 1 7 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配

列を有する重鎖可変領域および配列番号 1 8 と少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、抗体。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗体であって、配列番号 1 7 と少なくとも 9 8 % 同一であるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号 1 8 と少なくとも 9 8 % 同一であるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、抗体。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の抗体であって、それぞれ、配列番号 1 7 に記載されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および配列番号 1 8 に記載されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、抗体。

【請求項 5】

(a) ヒト抗体である、および / または

(b) ヒト定常領域を含む、

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 6】

抗原結合フラグメント、F a b、F a b'、(F a b')₂、F v、または s c F v フラグメントである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 7】

以下の性質：

(a) 細胞アポトーシスを誘導すること、

(b) I L - 1 2 p 4 0 の発現の増大により測定される細胞の T 細胞刺激活性を促進すること、

(c) H L A - D R V 4 5 0、C D 5 4 P E、C D 8 6 A P C、および C D 8 3 B V 5 1 0、C D 1 9 V 5 0 0、C D 2 3 P e r C P - C y 5 . 5、C D 6 9 A P C、C D 3 8 P e r C P - C y 5 . 5 および C D 7 1 P E からなる群から選択される少なくとも 1 つの細胞表面マーカーの発現の増大により測定される B 細胞活性化を促進すること、

(d) 1 0 - 1 0 M もしくはそれ未満の平衡解離定数 K d でヒト C D 4 0 に結合すること、および / または

(e) カニクイザル C D 4 0 と交差反応すること、

の少なくとも 1 つを更に示す、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 8】

I g G 2 重鎖定常領域を含む、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 9】

抗原に連結された、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、分子結合体。

【請求項 1 0】

前記抗体と異なる結合特異性を有する第 2 の分子に連結された、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、二重特異性分子。

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体の軽鎖と重鎖の両方の可変領域をコードする、単離核酸。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載の単離核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の発現ベクターで形質転換された、細胞。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 9 に記載の分子結合体、または請求項 1 0 に記載の二重特異性分子と、担体と、を含む、組成物。

【請求項 1 5】

アジュバントならびに / あるいは 1 種またはそれより多くの他の抗体を更に含む、請求項 1 4 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

前記 1 種以上の他の抗体が、CTLA-4、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3、ガレクチン9、CEACAM-1、BTLA、CD69、ガレクチン1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、B7-H3、B7-H4、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1、TIM-4、B7-1、B7-2、CD28、4-1BB（CD137）、4-1BBL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、CD70、CD27、DR3またはCD28Hに結合する、請求項15に記載の組成物。

【請求項 17】

対象において抗原に対する免疫反応を誘導または促進するための、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体、請求項9に記載の分子結合体、または請求項10に記載の二重特異性分子を含む組成物、あるいは請求項14～16のいずれか1項に記載の組成物。

10

【請求項 18】

前記組成物が前記抗原と組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項17に記載の組成物。

【請求項 19】

前記抗原が、前記組成物から同時に、別々に、または順次投与されることを特徴とする、請求項18に記載の組成物。

【請求項 20】

対象においてCD40発現細胞の増殖を阻害するための、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体、請求項9に記載の分子結合体、または請求項10に記載の二重特異性分子を含む組成物、あるいは請求項14～16のいずれか1項に記載の組成物。

20

【請求項 21】

対象の疾患を治療するための、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体、請求項9に記載の分子結合体、または請求項10に記載の二重特異性分子を含む組成物、あるいは請求項14～16のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 22】

前記疾患が、慢性リンパ球性白血病、マントル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫および辺縁帯B細胞リンパ腫からなる群から選択される癌である、請求項21に記載の組成物。

30

【請求項 23】

前記抗体が、ヒトCD40に対するCD40Lの結合をブロックしない、請求項17～22のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 24】

前記組成物が、1またはそれより多くの治療剤と組み合わせて前記対象に投与されることを特徴とする、請求項17～23のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項 25】

前記治療剤が別の抗体である、請求項24に記載の組成物。

【請求項 26】

前記別の抗体が、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、および/または抗CTLA-4抗体である、請求項25に記載の組成物。

40

【請求項 27】

前記組成物と前記治療剤とが同時に投与されることを特徴とする、請求項25に記載の組成物。

【請求項 28】

前記組成物と前記治療剤とが順次投与されることを特徴とする、請求項25に記載の組成物。

【請求項 29】

対象において抗原に対する免疫反応を誘導または促進するために使用するための、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体を含む組成物。

50

【請求項 30】

癌の治療用の薬剤の製造における、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

【請求項 31】

癌の治療用の、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願情報)

本出願は、2016年4月18日出願の米国特許仮出願第62/324,170号に基づく優先権を主張するものである。上記の出願の内容を参照により本明細書に援用する。

10

【背景技術】

【0002】

T細胞と抗原提示細胞との相互作用には、免疫反応の発現を促すさまざまなアクセサリ分子が関与している。そのような分子の1つに、CD40Lに結合する腫瘍壊死因子受容体(TNF-R)スーパーファミリーのメンバーであるCD40がある(Ranheim EA, et al., Blood. 1995 June 15; 85(12): 3556-65)。CD40は、アミノ酸残基277個からなる43~48kDaの膜貫通糖タンパク質である(Braesch-Andersen et al., 1989)。CD40は抗原提示細胞(APC)によって発現され、T細胞上のその天然リガンド(CD40L)の結合により、樹状細胞およびB細胞などのAPCが活性化され(Khalil and Vonderhide (2007) Update Cancer Ther, 2(2): 61-65)、免疫反応が促進される。CD40は多くの腫瘍細胞でも発現され、こうした場面でのそのライゲーションは直接的細胞傷害作用を媒介し、例えば腫瘍細胞上のCD40との結合により、インビトロでアポトーシスが生じ、インビボでの腫瘍増殖が阻害される(Tai et al. (2004) Cancer Res, 64(8): 2846-52)。

20

CD40に対するモノクローナル抗体は、癌治療をはじめとするさまざまな潜在的治療目的を与えるものである。例えば、アゴニストCD40抗体は、T細胞媒介性免疫のマウスモデルにおいてCD4+リンパ球により与えられるT細胞ヘルプに代わる機能を有することが示されており、CD40アゴニストは、腫瘍を有する宿主において腫瘍関連抗原に対する効果的な免疫反応を誘発する(Bennett et al. (1998) Nature, 393(6684): 478-80)。更に、CD40抗体は、ワクチンにおける使用が有望視されている(Fransen et al. (2014) Vaccine 32: 1654-1660)。しかしながら、免疫系を強力に調節する薬剤には潜在的な副作用がともなう(Sandin et al. (2014) Cancer Immunol Res, 2: 80-90)。そのため、CD40抗体を治療上効果的なものとする特定の性質および機構の更なる理解、ならびに疾患を治療および/または予防するために使用することができる、CD40に対する改良された治療抗体が求められている。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

40

【0003】

【文献】Ranheim EA, et al., Blood. 1995 June 15; 85(12): 3556-65

Khalil and Vonderhide (2007) Update Cancer Ther, 2(2): 61-65

Tai et al. (2004) Cancer Res, 64(8): 2846-52
Bennett et al. (1998) Nature, 393(6684): 478-80

Fransen et al. (2014) Vaccine 32: 1654-1660

Sandin et al. (2014) Cancer Immunol Res, 2

50

: 80 - 90

【発明の概要】

【0004】

本発明は、有益かつ望ましい治療効果に結びつけることができる特定の機能性を有する単離された抗CD40抗体を提供する。詳細には、抗原（例えば細胞上で発現された抗原）に対する免疫反応を増大させることが可能なアゴニスト抗CD40モノクローナル抗体が作製および特性評価される。本明細書で使用するところの「抗体」なる用語は、完全長の抗体およびその抗原結合部分のことを言う。

【0005】

一実施形態では、抗CD40抗体は、例えばT細胞媒介性免疫反応、B細胞活性化、および/またはサイトカイン産生を促すことにより、抗原に対する免疫反応を促進する。抗体は、単独で、または併用療法（例えばワクチン療法および/または化学療法）として投与することができる。

10

【0006】

別の実施形態では、抗CD40抗体は、CD40発現細胞の抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）および/またはCD40発現細胞の補体依存性細胞傷害作用（CDC）を誘導することなく抗原に対する免疫反応を増大させることが可能である。

【0007】

別の実施形態では、抗体は、エフェクターレス定常領域を含む。一実施形態では、定常領域は、IgG2アイソタイプである（例えばヒトIgG2）。

20

【0008】

更なる別の実施形態では、抗CD40抗体は、以下の性質、すなわち、

- (a) Fc受容体の結合とは無関係に、ヒトCD40に対するCD40Lの結合をブロックしない、
- (b) Fc受容体の結合とは無関係に、ヒトCD40に対するCD40Lの結合をブロックする、
- (c) Fc受容体の結合とは無関係に、抗原提示細胞（APC）上で発現されたヒトCD40の活性化、
- (d) 腫瘍細胞のアポトーシスの誘導、
- (e) T細胞刺激活性、
- (f) 促進されたB細胞活性化、および/または
- (g) CD40Lと相乗作用を示す能力、の1つまたはそれより多くを示す。

30

【0009】

好ましくは、抗体はFc受容体の相互作用とは無関係に作用する。好ましくは、抗体は、IgG2アイソタイプの抗体である。

【0010】

一実施形態では、アゴニスト抗体は、Fc受容体の結合とは無関係に、免疫反応を増大させることができる。例えば、抗体は、FcRなどのFc受容体と架橋することなく、強力なアゴニスト特性を示すことができる。これらのアゴニスト特性としては、例えば、HLA-DR V450、CD54 PE、CD86 APC、CD83 BV510、CD19 V500、CD54 PE、HLA-DR V450、CD23 PerCP-Cy5.5、CD69 APC、CD86 APC、CD38および/またはCD71 PEからなる群から選択される細胞表面マーカーの発現の増大により測定されるT細胞活性の増大および/またはB細胞活性の増大が挙げられる。

40

【0011】

別の実施形態では、抗体は、CD40発現細胞上のCD40L（CD154）へのCD40の結合をブロックする。特定の実施形態では、抗体は、CD40発現細胞に対する可溶性CD40Lの結合を、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%阻害する。特定

50

の実施形態では、抗CD40抗体は、例えばFACS、バイオレイヤー干渉法(bio-layer interferometry)(BLI)、またはBiacoreによって測定されるCD40Lの結合を少なくとも約70%阻害する。別の実施形態では、抗CD40抗体は、例えばFACS、BLI、またはBiacoreによって測定されるCD40Lの結合を少なくとも約80%阻害する。

【0012】

別の実施形態では、抗体は、例えばCD95の発現の増大によって測定される細胞のアポトーシスを誘導する。抗体は、特定のFc受容体(例えば、FcRI(CD64)、FcRIIA(CD32)、FcRIIB1(CD32)、FcRIIB2(CD32)、FcRIIIA(CD16a)、FcRIIIB(CD16b)、FcRI、FcRII(CD23)、FcRI(CD89)、Fc γ R、およびFcRn)に対する特異性を有するFc領域を含む様に構築することもできる。

10

【0013】

別の実施形態では、抗体は、ヒトCD40に 10^{-10} Mもしくはそれ未満、好ましくは 10^{-11} Mもしくはそれ未満の平衡解離定数K_dで結合することができ、かつ/またはカニクイザルCD40と交差反応することができる。

【0014】

本発明の特定の抗CD40抗体としては、抗体3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、3B6-NS、および下記に述べる関連する実施形態が挙げられる。

20

【0015】

一実施形態では、抗体は、それらの保存的配列改変(例えば保存的アミノ酸置換)を含む、配列番号9、10、23、24、37、38、51、52、65、66、65、66、79、80、93、94、107、108からなる群から選択される重鎖可変領域のCDR3配列を含む。抗体は、それらの保存的配列改変を含む、配列番号15、16、29、30、43、44、57、58、71、72、85、86、99、100、113、114からなる群から選択される軽鎖可変領域のCDR3配列を更に含むことができる。別の実施形態では、重鎖CDR2および/またはCDR1配列は、それらの保存的配列改変を含む、配列番号7、8、21、22、35、36、49、50、63、64、77、78、91、92、105、106、および配列番号5、6、19、20、33、34、47、48、61、62、61、62、75、76、89、90、103、104からそれぞれ選択される。別の実施形態では、軽鎖CDR2および/またはCDR1配列は、それらの保存的配列改変を含む、配列番号13、14、27、28、41、42、55、56、69、70、84、85、97、98、111、112、および配列番号11、12、25、26、40、41、53、54、67、68、81、82、95、96、109、110からそれぞれ選択される。

30

【0016】

別の実施形態では、抗体は、それらの保存的配列改変を含む、配列番号3、17、31、45、59、73、87、101からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む。抗体は、それらの保存的配列改変を含む、配列番号4、18、32、46、60、74、88、102からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を更に含むことができる。

40

【0017】

別の実施形態では、抗体は、以下のアミノ酸配列(それらの保存的配列改変を含む)：

- (a) 配列番号3および/または4、
- (b) 配列番号17および/または18、
- (c) 配列番号31および/または32、
- (d) 配列番号45および/または46、
- (e) 配列番号59および/または60、
- (f) 配列番号73および/または74、

50

(g) 配列番号 87 および / または 88、または

(h) 配列番号 101 および / または 102 をそれぞれ有する重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む。

【0018】

上記の配列のいずれかと、少なくとも 80%、または少なくとも 85%、または少なくとも 90%、または少なくとも 95%、または少なくとも 96%、または少なくとも 97%、または少なくとも 98%、または少なくとも 99%、またはそれより大きな配列同一性を有する重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体も本発明に含まれる。上記に記載した値の間の範囲、例えば、上記の配列のいずれかと、少なくとも 80 ~ 85%、85 ~ 90%、90 ~ 95% または 95 ~ 100% の配列同一性を有する重鎖可変領域および軽鎖可変領域もまた本発明に包含される。

10

【0019】

更なる別の実施形態では、抗体は、ヒト CD40 に結合し、

(a) 配列番号 3 および 4、

(b) 配列番号 17 および 18、

(c) 配列番号 31 および 32、

(d) 配列番号 45 および 46、

(e) 配列番号 59 および 60、

(f) 配列番号 73 および 74、

(g) 配列番号 87 および 88、または

(h) 配列番号 101 および 102 に記載されるアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖可変領域および軽鎖可変領域からの CDR 配列を有する

(それぞれの場合で、1 つまたはそれより多くの CDR 内に 1 個の保守的配列改変、2 個の保守的配列改変、または 3 個以下、4 個以下、または 5 個以下の保守的配列改変を含む)。

20

【0020】

別の実施形態では、抗体は、ヒト CD40 に結合し、

(a) 配列番号 5、7、9 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 11、13、15 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

30

(b) 配列番号 19、21、23 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 25、27、29 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

(c) 配列番号 33、35、37 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 39、41、43 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

(d) 配列番号 47、49、51 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 53、55、57 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

(e) 配列番号 61、63、65 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 67、69、71 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

40

(f) 配列番号 75、77、79 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 81、83、85 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

(g) 配列番号 89、91、93 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 95、97、99 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、または

(h) 配列番号 103、105、107 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 109、111、113 をそれぞれ含む軽鎖 CDR

50

R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列を有する（それぞれの場合で、場合により、前記C D R のうちの1つまたはそれより多くに1個の保存的配列改変、2個の保存的配列改変、または3個以下、4個以下、または5個以下の保存的配列改変を含む）。

【0021】

更なる別の実施形態では、抗体は、ヒトC D 4 0 に結合し、

(a) 配列番号6、8、10をそれぞれ含む重鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、および/または配列番号12、14、16をそれぞれ含む軽鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、

(b) 配列番号20、22、24をそれぞれ含む重鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、および/または配列番号26、28、30をそれぞれ含む軽鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、

(c) 配列番号34、36、38をそれぞれ含む重鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、および/または配列番号40、42、44をそれぞれ含む軽鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、

(d) 配列番号48、50、52をそれぞれ含む重鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、および/または配列番号54、56、58をそれぞれ含む軽鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、

(e) 配列番号62、64、66をそれぞれ含む重鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、および/または配列番号68、70、72をそれぞれ含む軽鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、

(f) 配列番号76、78、80をそれぞれ含む重鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、および/または配列番号82、84、86をそれぞれ含む軽鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、

(g) 配列番号90、92、94をそれぞれ含む重鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、および/または配列番号96、98、100をそれぞれ含む軽鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、または

(h) 配列番号104、106、108をそれぞれ含む重鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列、および/または配列番号110、112、114をそれぞれ含む軽鎖C D R 1、C D R 2、およびC D R 3 配列を有する（それぞれの場合で、場合により、前記C D R のうちの1つまたはそれより多くに1個の保存的配列改変、2個の保存的配列改変、または3個以下、4個以下、または5個以下の保存的配列改変を含む）。

【0022】

別の態様では、本発明は、上記に述べた特定の抗体と、C D 4 0 に対する結合について競合する抗体を提供する。一実施形態では、抗体は、C D 4 0 に結合し、配列番号3および4、配列番号17および18、配列番号31および32、配列番号45および46、配列番号59および60、配列番号73および74、配列番号87および88、配列番号101および102にそれぞれ記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む抗体と、競合する。

【0023】

別の態様では、本発明は、上記に述べた特定の抗体と同じエピトープに、または上記に述べた特定の抗体により認識されるC D 4 0 上のエピトープに結合する抗体を提供する。一実施形態では、抗体は、配列番号3および4、配列番号17および18、配列番号31および32、配列番号45および46、配列番号59および60、配列番号73および74、配列番号87および88、配列番号101および102にそれぞれ記載されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む抗体により認識されるC D 4 0 上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、抗体3C3または3G5と同じエピトープに結合する。

【0024】

別の態様では、本発明は、ヒトC D 4 0 の細胞外ドメイン（ECD）（配列番号133）のアミノ酸残基1～5および33～36内の1つまたはそれより多くの残基に結合する抗

10

20

30

40

50

体を提供する。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトCD40のECD（配列番号133）のアミノ酸25、26、28および30からなる群から選択される1つまたはそれより多くのアミノ酸に更に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトCD40のECD（配列番号133）のアミノ酸5、33、34および36からなる群から選択される1つまたはそれより多くのアミノ酸に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトCD40のECD（配列番号133）のアミノ酸5、33および36に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトCD40のECD（配列番号133）のアミノ酸5、33、34および36に結合する。

【0025】

上記の態様のいずれにおいても、本発明は、ヒトCD40のECD（配列番号133）の5位のアラニンのスレオニンへの置換が、抗体の結合をヒトCD40のECD（配列番号133）への結合と比較して少なくとも30%低下させる抗体を提供する。いくつかの実施形態では、ヒトCD40のECDの5位のアラニンのスレオニンへの置換は、抗体の結合をヒトCD40のECD（配列番号133）への結合と比較して少なくとも50%低下させる。いくつかの実施形態では、ヒトCD40のECDの5位のアラニンのスレオニンへの置換は、抗体の結合をヒトCD40のECD（配列番号133）への結合と比較して少なくとも80%低下させる。

【0026】

上記の態様のいずれにおいても、本発明は、内因性のCD40LであってよいCD40Lと相乗作用を示す抗体を提供する。いくつかの実施形態では、相乗作用は、Ramos細胞とインキュベートされる場合のCD95の発現の誘導の増大である。いくつかの実施形態では、相乗作用は、ヒトB細胞とインキュベートされる場合のB細胞増殖の増大である。いくつかの実施形態では、相乗作用は、樹状細胞とインキュベートされる場合のIL12p40の発現の誘導の増大である。いくつかの実施形態では、相乗作用は、CD95の発現に関して測定される。

【0027】

別の態様では、本発明は、ヒトCD40のECD（配列番号133）のアミノ酸残基13～15および33～36内の1つまたはそれより多くの残基に結合する抗体を提供する。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトCD40のECD（配列番号133）のアミノ酸33、34および36からなる群から選択される1つまたはそれより多くのアミノ酸に結合する。

【0028】

本発明の抗体は、完全長、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、およびIgE抗体、またはこれらの配列変異体であってよい。また、抗体は、Fab、Fab'2、Fv、一本鎖Fv、単離した相補性決定領域（CDR）、または2つまたはそれより多くの単離されたCDRの組み合わせなどのフラグメントであってもよい。抗体は、これらに限定されるものではないが、完全なヒト抗体、ヒト化抗体、およびキメラ抗体を含む任意の既知の型または種の抗体であってよい。好ましくは、抗体は、IgG2抗体である。IgG2配列に、N末端リシンの欠失および/または当該技術分野では周知のさまざまな他の突然変異などの特定の改変を行うことができる点は認識されるであろう。したがって、IgG2抗体には、例えば、天然のヒトIgG2配列と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%、および好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有する定常ドメインを有する抗体が含まれる。

【0029】

本発明は、腫瘍抗原、自己抗原、または病原体の成分などの抗原（フラグメント、エピトープ、および抗原決定基を含む）に連結された本発明の抗体からなる分子結合体も提供する。例えば、抗原には、hCG、gp100またはPmel17、CEA、gp100、TRP-2、NY-BR-1、NY-CO-58、MN(gp250)、イディオタイプ、チロシナーゼ、テロメラゼ、SSX2、MUC-1、MAGE-A3、および高分

10

20

30

40

50

子量メラノーマ関連抗原 (H M W - M A A) M A R T 1、メラノ - A、N Y - E S O - 1、M A G E - 1、M A G E - 3、W T 1、H e r 2、メソセリン、または高分子量メラノーマ関連抗原 (H M W - M A A) などの腫瘍抗原が含まれ得る。

【 0 0 3 0 】

別の実施形態では、分子複合体は、細胞毒性剤、免疫抑制剤、または化学療法剤などの治療剤を更に含む。

【 0 0 3 1 】

別の態様では、本発明は、異なる結合特異性を有する第 2 の機能的部分に連結された本発明の抗体からなる二重特異性分子を提供する。例えば、一実施形態では、第 2 の分子は、T 細胞受容体 (例えば、C D 3、C D 4 0、または C T L A - 4)、N K 受容体 (例えば、C D 5 6)、B 細胞受容体 (例えば、C D 2 0)、または別の腫瘍壊死因子受容体 (例えば、C D 9 5) に結合することができる。

10

【 0 0 3 2 】

薬学的に許容される担体と配合された、本明細書に記載の抗体、分子結合体、または二重特異性分子を含む組成物も提供される。組成物は更に、アジュバント、免疫賦活剤 (例えば、C D 4 0 リガンド、F L T 3 リガンド、サイトカイン、コロニー刺激因子、抗 C T L A - 4 抗体 (これに限定されないが、イピリムマブを含む)、抗 P D - 1 抗体 (これに限定されないが、M P D L 3 2 8 0 A またはデュルバルマブを含む)、抗 4 1 B B 抗体、抗 O X - 4 0 抗体、L P S (内毒素)、s s R N A、d s R N A、カルメット・ゲラン桿菌 (B C G)、塩酸レバミソール、静脈内免疫グロブリンおよび T o l l 様受容体 (T L R) アゴニスト (例えば、P o l y I C などの T L R 3 アゴニスト、T L R 4 アゴニスト、T L R 5 アゴニスト、T L R 7 アゴニスト、T L R 8 アゴニスト、および T L R 9 アゴニスト))、免疫抑制剤、別の抗体、または抗原、または S T I N G アゴニストを更に含むことができる。

20

【 0 0 3 3 】

本発明の分子結合体または組成物中に (例えば、本発明の抗 C D 4 0 抗体と併用されるワクチンに) 含まれ得る腫瘍抗原には、腫瘍細胞上に存在し (または関連し)、正常細胞上には通常存在しない任意の抗原または抗原決定基、または正常 (非腫瘍) 細胞よりも大きな量で腫瘍細胞上に存在するかまたは関連している抗原または抗原決定基、または正常 (非腫瘍) 細胞上にみられるものと異なる形態で腫瘍細胞上に存在する抗原または抗原決定基が含まれる。かかる抗原には、腫瘍特異的抗原 (腫瘍特異的膜抗原を含む)、腫瘍関連抗原 (腫瘍関連膜抗原を含む)、腫瘍上の胚抗原、増殖因子受容体、増殖因子リガンド、および癌に関連する任意の他のタイプの抗原が含まれる。腫瘍抗原は、例えば、上皮癌抗原 (例えば、乳癌、胃腸管癌、肺癌)、前立腺特異的癌抗原 (P S A) または前立腺特異的膜抗原 (P S M A)、膀胱癌抗原、肺 (例えば、小細胞肺癌) 癌抗原、結腸癌抗原、卵巣癌抗原、脳腫瘍抗原、胃癌抗原、腎細胞癌抗原、膵臓癌抗原、肝臓癌抗原、食道癌抗原、頭頸部癌抗原、または結腸直腸癌抗原であってよい。例えば、抗原には、h C G、g p 1 0 0 または P m e 1 1 7、C E A、g p 1 0 0、T R P - 2、N Y - B R - 1、N Y - C O - 5 8、M N (g p 2 5 0)、イディオタイプ、チロシナーゼ、テロメラゼ、S S X 2、M U C - 1、M A G E - A 3、および高分子量メラノーマ関連抗原 (H M W - M A A) M A R T 1、メラノ - A、E G F R v I I I、N Y - E S O - 1、M A G E - 1、M A G E - 3、W T 1、H e r 2、またはメソセリンなどの腫瘍抗原が含まれ得る。本発明により (例えば本発明の抗 C D 4 0 抗体と併用されるワクチンに) 用いられる他の抗原としては、それらの例を本明細書に開示するウイルス、細菌、寄生虫および真菌などの感染症病原体由来の抗原が挙げられる。

30

40

【 0 0 3 4 】

本発明の抗体の重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域の全体または部分をコードする核酸分子、ならびにこれらの核酸を含む発現ベクター、およびかかる発現ベクターを有する宿主細胞も提供される。一実施形態では、核酸配列は、配列番号 8 7 ~ 1 1 2 からなる群、またはこれらの核酸配列と例えば少なくとも約 8 5 %、9 0 %、または 9 5 % の同一

50

性を有する核酸配列からそれぞれ選択される。

【 0 0 3 5 】

本発明は、本明細書に記載のアゴニスト抗体を用いて対象において抗原に対する免疫反応（例えば、T細胞媒介免疫反応、および/またはNK細胞媒介免疫反応、および/またはB細胞媒介免疫反応）を促進する方法も提供する。一実施形態では、抗体は、ヒトCD40（各種の免疫細胞型で発現する）に結合することにより、抗原提示細胞（APC）の細胞増殖および活性化を誘導し、B細胞、ならびにエフェクターT細胞およびメモリーT細胞を活性化し、これにより、例えば腫瘍細胞に対する免疫反応を促進する。したがって、一実施形態では、本方法は、本発明の抗体（例えば、完全長抗体またはその抗原結合部分）、組成物、または二重特異性分子を抗原に対する免疫反応を誘導または促進するうえで有効な量で投与することを含む。別の実施形態では、本方法は、抗体、組成物、または二重特異性分子と同時に、別々に、または順次に抗原を投与することを更に含む。

10

【 0 0 3 6 】

CD40発現細胞の増殖を阻害する（例えば癌の治療において）ための方法も提供される。例えば、本発明のアゴニスト抗体は、免疫エフェクター細胞を動員する細胞表面分子の発現を増大させることが示されており、これにより、細胞死（例えばアポトーシス）をもたらす。したがって、別の実施形態では、本方法は、CD40発現細胞の増殖を阻害するうえで有効な量の本発明の抗体（例えば、完全長抗体またはその抗原結合部分）、組成物または二重特異性分子を投与するかまたはこれらと細胞を接触させることを含む。

【 0 0 3 7 】

抗原に連結された細胞上の受容体に結合する分子（例えば上記に述べたCD40抗体）を投与することにより、抗原を、対象内の細胞、例えば抗原提示が可能な細胞（末梢血単核球（PBMC）など）、単球（THP-1など）、Bリンパ芽球細胞（C1R.A2、1518B-LCLなど）および単球由来DCにターゲティングさせるための方法が更に提供される。

20

【 0 0 3 8 】

本明細書に記載の方法は、さまざまな疾患、特に癌（例えば、白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、骨髄芽球、前骨髄球、骨髄単球性、単球性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性（顆粒性）白血病、慢性リンパ球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、多血症ベラリンパ腫、ホジキン病、非ホジキン病、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、固形腫瘍、肉腫および細胞癌、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸肉腫、結腸直腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、上咽頭癌、食道癌、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系（CNS）癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系癌、子宮内膜癌、食道癌、眼の癌、頭頸部癌、胃癌、上皮内新生物、腎臓癌、喉頭癌、肝臓癌、肺癌（小細胞、大細胞）、黒色腫、神経芽細胞腫、口腔癌（たとえば、唇、舌、口および咽頭）、卵巣癌、膵臓癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌および泌尿器系癌）の治療に有用である。特定の癌としては、慢性リンパ球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫および辺縁帯B細胞リンパ腫からなる群から選択されるCD40発現腫瘍が挙げられる。

30

40

【 0 0 3 9 】

別の実施形態では、本方法を使用して細菌、真菌、ウイルス、または寄生虫感染を治療ま

50

たは予防することができる。

【0040】

CD40発現細胞としては、これらに限定されるものではないが、樹状細胞(DC)、B細胞、マクロファージ、および単球などの抗原提示細胞(APC)を含む、CD40を発現するあらゆる細胞が挙げられる。CD40は、上皮細胞、内皮細胞、および血小板などの他の細胞型でも発現される。CD40の発現は、B細胞リンパ腫及び腎臓癌細胞などのさまざまな腫瘍細胞で示されている。特定の実施形態では、CD40発現細胞には、Jurkat細胞、Raji細胞、Ramos細胞、およびDaudi細胞などの細胞株が含まれる。別の実施形態では、CD40発現細胞は、腫瘍細胞または癌細胞である。別の実施形態では、CD40発現細胞には、B細胞、NK細胞、腫瘍または癌細胞に浸潤することが見出されているT細胞(腫瘍浸潤リンパ球とも呼ばれる)が含まれる。

10

【0041】

別の実施形態では、本発明は、対象において抗原(例えば腫瘍抗原)に対する免疫反応を誘導または促進するための薬剤の製造における、本明細書に記載の抗体、組成物、または二重特異性分子の使用を提供する。更なる実施形態では、本発明は、(1)抗原に対する免疫反応を増大させ、(2)CD40発現細胞の増殖を阻害し、かつ/または(3)抗原をAPCにターゲティングするための薬剤の製造における本明細書に記載の抗体または組成物の使用を提供する。

【0042】

本発明は、(1)生物学的試料を本明細書に記載の抗体と接触させ(この場合、抗体は検出可能な物質で標識される)、および(2)CD40に結合した抗体を検出することにより、生物学的試料中のCD40の有無を検出するための方法も提供する。

20

本発明の組成物(例えば抗体および/または二重特異性分子)と、場合により使用説明書とを含むキットも提供される。キットは、サイトカインまたは補体などの少なくとも1つの更なる試薬、または1種またはそれより多くの本発明の更なる抗体を更に含むことができる。

【0043】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲より明らかとなる。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

30

(項目1)

ヒトCD40に結合するアゴニスト単離モノクローナル抗体であって、

(a)Fc受容体の結合とは無関係に、

(b)CD40発現細胞の抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)を誘導することなく、

(c)CD40発現細胞の補体依存性細胞傷害作用(CDC)を誘導することなく、かつ/または

(d)Fc受容体の結合とは無関係に、かつCD40Lと相乗作用を示すことが可能で、のいずれかで、APCを直接活性化し、かつ/または抗原に対する免疫反応を増大させる、抗体。

(項目2)

40

以下の性質：

(a)細胞アポトーシスを誘導すること、

(b)IL-12p40の発現の増大により測定される細胞のT細胞刺激活性を促進すること、

(c)HLA-DR V450、CD54 PE、CD86 APC、およびCD83 BV510、CD19 V500、CD54 PE、HLA-DR V450、CD23 PerCP-Cy5.5、CD69 APC、CD86 APC、CD38 PerCP-Cy5.5およびCD71 PEからなる群から選択される少なくとも1つの細胞表面マーカーの発現の増大により測定されるB細胞活性化を促進すること、

(d)10⁻¹⁰Mもしくはそれ未満の平衡解離定数K_dでヒトCD40に結合するこ

50

と、

(e) カニクイザル C D 4 0 と交差反応すること、および / または

(f) ヒト C D 4 0 に結合して N F k B 駆動型レポーター細胞株を用いて測定される細胞活性化を生じること、

の少なくとも 1 つを更に示す、項目 1 に記載の抗体。

(項目 3)

I g G 2 重鎖定常領域を含む、項目 1 に記載の抗体。

(項目 4)

ヒト C D 4 0 に結合し、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単離抗体であって、前記重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、

(a) 配列番号 3 および 4、

(b) 配列番号 1 7 および 1 8、

(c) 配列番号 3 1 および 3 2、

(d) 配列番号 4 5 および 4 6、

(e) 配列番号 5 9 および 6 0、

(f) 配列番号 7 3 および 7 4、

(g) 配列番号 8 7 および 8 8、または

(h) 配列番号 1 0 1 および 1 0 2

と少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含む、抗体。

(項目 5)

前記重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、

(a) 配列番号 3 および 4、

(b) 配列番号 1 7 および 1 8、

(c) 配列番号 3 1 および 3 2、

(d) 配列番号 4 5 および 4 6、

(e) 配列番号 5 9 および 6 0、

(f) 配列番号 7 3 および 7 4、

(g) 配列番号 8 7 および 8 8、または

(h) 配列番号 1 0 1 および 1 0 2

と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列をそれぞれ含む、項目 4 に記載の抗体。

(項目 6)

ヒト C D 4 0 に結合し、

(a) 配列番号 3 および / または 4、

(b) 配列番号 1 7 および / または 1 8、

(c) 配列番号 3 1 および / または 3 2、

(d) 配列番号 4 5 および / または 4 6、

(e) 配列番号 5 9 および / または 6 0、

(f) 配列番号 7 3 および / または 7 4、

(g) 配列番号 8 7 および / または 8 8、または

(h) 配列番号 1 0 1 および / または 1 0 2

に記載されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む、単離抗体。

(項目 7)

ヒト C D 4 0 に結合し、

(a) 配列番号 3 および 4、

(b) 配列番号 1 7 および 1 8、

(c) 配列番号 3 1 および 3 2、

(d) 配列番号 4 5 および 4 6、

(e) 配列番号 5 9 および 6 0、

(f) 配列番号 7 3 および 7 4、

10

20

30

40

50

(g) 配列番号 87 および 88、または

(h) 配列番号 101 および 102

に記載されるアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖可変領域および軽鎖可変領域からの CDR 配列を含む、単離抗体。

(項目 8)

ヒト CD40 に結合し、配列番号 17 および 18 に記載されるアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、単離抗体。

(項目 9)

ヒト CD40 に結合し、配列番号 135 および 136 に記載されるアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖および軽鎖を含む、単離抗体。

(項目 10)

ヒト CD40 に結合し、

(a) 配列番号 5、7、9 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 11、13、15 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

(b) 配列番号 19、21、23 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 25、27、29 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

(c) 配列番号 33、35、37 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 39、41、43 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

(d) 配列番号 47、49、51 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 53、55、57 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

(e) 配列番号 61、63、65 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 67、69、71 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

(f) 配列番号 75、77、79 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 81、83、85 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、

(g) 配列番号 89、91、93 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 95、97、99 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、または

(h) 配列番号 103、105、107 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および / または配列番号 109、111、113 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列

を含む、単離抗体。

(項目 11)

ヒト CD40 に結合し、配列番号 19、21、23 をそれぞれ含む重鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列、および配列番号 25、27、29 をそれぞれ含む軽鎖 CDR1、CDR2、および CDR3 配列を含む、単離抗体。

(項目 12)

(a) 配列番号 3 および 4、

(b) 配列番号 17 および 18、

(c) 配列番号 31 および 32、

(d) 配列番号 45 および 46、

(e) 配列番号 59 および 60、

(f) 配列番号 73 および 74、

(g) 配列番号 87 および 88、または

(h) 配列番号 101 および 102

10

20

30

40

50

に記載されるアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体とヒトCD40上の同じエピトープに結合する、単離抗体。

(項目13)

- (a) 配列番号3および4、
- (b) 配列番号17および18、
- (c) 配列番号31および32、
- (d) 配列番号45および46、
- (e) 配列番号59および60、
- (f) 配列番号73および74、
- (g) 配列番号87および88、または
- (h) 配列番号101および102

に記載されるアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD40に対する結合について競合する、単離抗体。

(項目14)

抗体3C3または3G5と同じエピトープに結合する、アゴニスト単離モノクローナル抗体。

(項目15)

ヒトCD40の細胞外ドメイン(ECD)(配列番号133)のアミノ酸残基1~5および33~36内の1つまたはそれより多くの残基に結合する、アゴニスト単離モノクローナル抗体。

(項目16)

ヒトCD40のECD(配列番号133)のアミノ酸25、26、28および30からなる群から選択される1つまたはそれより多くのアミノ酸に更に結合する、項目15に記載の抗体。

(項目17)

ヒトCD40のECD(配列番号133)のアミノ酸5、33、34および36からなる群から選択される1つまたはそれより多くのアミノ酸に結合する、項目15または16に記載の抗体。

(項目18)

ヒトCD40のECD(配列番号133)のアミノ酸5、33および36に結合する、項目17に記載の抗体。

(項目19)

ヒトCD40のECD(配列番号133)のアミノ酸5、33、34および36に結合する、項目18に記載の抗体。

(項目20)

ヒトCD40のECD(配列番号133)の5位のアラニンのスレオニンへの置換が、抗体の結合をヒトCD40のECD(配列番号133)への結合と比較して少なくとも30%低下させる、項目15~19のいずれか1項に記載の抗体。

(項目21)

ヒトCD40のECD(配列番号133)の5位のアラニンのスレオニンへの置換が、抗体の結合をヒトCD40のECD(配列番号133)への結合と比較して少なくとも50%低下させる、項目20に記載の抗体。

(項目22)

ヒトCD40のECD(配列番号133)の5位のアラニンのスレオニンへの置換が、抗体の結合をヒトCD40のECD(配列番号133)への結合と比較して少なくとも80%低下させる、項目20に記載の抗体。

(項目23)

CD40Lと組み合わされる場合に相乗作用を示す、項目14~19のいずれか1項に記載の抗体。

(項目24)

10

20

30

40

50

前記相乗作用が、R a m o s 細胞とインキュベートされる場合の C D 9 5 の発現の誘導の増大である、項目 2 3 に記載の抗体。

(項目 2 5)

前記相乗作用が、ヒト B 細胞とインキュベートされる場合の B 細胞増殖の増大である、項目 2 3 に記載の抗体。

(項目 2 6)

前記相乗作用が、樹状細胞とインキュベートされる場合の I L 1 2 p 4 0 の発現の誘導の増大である、項目 2 3 に記載の抗体。

(項目 2 7)

前記相乗作用が、C D 9 5 の発現に関して測定される、項目 2 3 に記載の抗体。

10

(項目 2 8)

ヒト C D 4 0 の E C D (配列番号 1 3 3) のアミノ酸残基 1 3 ~ 1 5 および 3 3 ~ 3 6 内の 1 つまたはそれより多くの残基に結合する、アゴニスト単離モノクローナル抗体。

(項目 2 9)

ヒト C D 4 0 の E C D (配列番号 1 3 3) のアミノ酸 3 3 、 3 4 および 3 6 からなる群から選択される 1 つまたはそれより多くのアミノ酸に結合する、項目 2 8 に記載の抗体。

(項目 3 0)

ヒト抗体である、項目 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 3 1)

ヒト定常領域を含む、項目 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の抗体。

20

(項目 3 2)

抗原結合フラグメント、F a b 、 F a b ' 、 (F a b ') 2 、 F v 、または s c F v フラグメントである、項目 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 3 3)

抗原に連結された、項目 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、分子結合体。

(項目 3 4)

前記抗体と異なる結合特異性を有する第 2 の分子に連結された、項目 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の抗体を含む、二重特異性分子。

(項目 3 5)

項目 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の抗体の軽鎖、重鎖、または軽鎖と重鎖の両方の可変領域をコードする、単離核酸。

30

(項目 3 6)

項目 3 5 に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

(項目 3 7)

項目 3 6 に記載の発現ベクターで形質転換された、細胞。

(項目 3 8)

項目 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の抗体、分子結合体、または二重特異性分子と、担体と、を含む、組成物。

(項目 3 9)

アジュバントを更に含む、項目 3 8 に記載の組成物。

40

(項目 4 0)

1 種またはそれより多くの他の抗体を更に含む、項目 3 8 に記載の組成物。

(項目 4 1)

前記 1 種以上の他の抗体が、C T L A - 4 、 P D - 1 、 P D - L 1 、 L A G - 3 、 T I M - 3 、ガレクチン 9 、 C E A C A M - 1 、 B T L A 、 C D 6 9 、ガレクチン 1 、 T I G I T 、 C D 1 1 3 、 G P R 5 6 、 V I S T A 、 B 7 - H 3 、 B 7 - H 4 、 2 B 4 、 C D 4 8 、 G A R P 、 P D 1 H 、 L A I R 1 、 T I M - 1 、 T I M - 4 、 B 7 - 1 、 B 7 - 2 、 C D 2 8 、 4 - 1 B B (C D 1 3 7) 、 4 - 1 B B L 、 I C O S 、 I C O S - L 、 O X 4 0 、 O X 4 0 L 、 C D 7 0 、 C D 2 7 、 D R 3 または C D 2 8 H に結合する、項目 4 0 に記載の組成物。

50

(項目 4 2)

対象において抗原に対する免疫反応を誘導または促進するための方法であって、抗原に対する免疫反応を誘導または促進するうえで有効な量の、項目 1 ~ 3 4 および 3 8 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の前記抗体、分子結合体、組成物、または二重特異性分子を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 4 3)

前記抗原を投与する工程を更に含む、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記抗原が、前記抗体、組成物、または二重特異性分子から同時に、別々に、または順次投与される、項目 4 3 に記載の方法。

10

(項目 4 5)

C D 4 0 発現細胞の増殖を阻害する方法であって、C D 4 0 発現細胞の増殖を阻害するうえで有効な量の、項目 1 ~ 3 4 および 3 8 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の前記抗体、組成物、または二重特異性分子と前記細胞を接触させることを含む、方法。

(項目 4 6)

対象の疾患を治療するための方法であって、前記疾患を治療するうえで有効な量の、項目 1 ~ 3 4 および 3 8 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の前記抗体、組成物、または二重特異性分子を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 4 7)

前記疾患が、慢性リンパ球性白血病、マントル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、バーキットリンパ腫および辺縁帯 B 細胞リンパ腫からなる群から選択される癌である、項目 4 6 に記載の方法。

20

(項目 4 8)

前記抗体が、ヒト C D 4 0 に対する C D 4 0 L の結合をブロックしない、項目 4 2 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 4 9)

1 またはそれより多くの治療剤を前記対象に投与することを更に含む、項目 4 2 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 0)

前記治療剤が別の抗体である、項目 4 9 に記載の方法。

30

(項目 5 1)

前記抗体が、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、および / または抗 C T L A - 4 抗体である、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記第 1 の抗体と前記第 2 の抗体とが同時に投与される、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 3)

前記第 1 の抗体と前記第 2 の抗体とが順次投与される、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 4)

対象において抗原に対する免疫反応を誘導または促進するために使用するための、項目 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の抗体。

40

(項目 5 5)

癌の治療用の薬剤の製造における、項目 1 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

【図面の簡単な説明】**【 0 0 4 4 】**

【図 1】図 1 は、O c t e t (登録商標) Q K e 装置 (P a l l F o r t e B i o 社、カリフォルニア州、メンローパーク) を製造者のガイドラインにしたがって使用してバイオレイヤー干渉法 (B L I) により測定した、抗体 3 C 3、3 G 5、1 B 4、3 B 6、および 6 H 6 の平衡解離定数 (K D) および反応結合速度定数 (k o n) および解離速度定数 (k o f f) の値を示す。

【図 2】図 2 は、E L I S A で吸光度 (O D 4 5 0) を用い、組換え精製ヒト C D 4 0 を

50

コートしたマイクロタイタープレートへのヒトCD40抗体(3C3、3G5、1B4、3B6、および6H6を含む)の結合を抗体濃度の関数として示したグラフである。

【図3】図3は、ヒトCD40抗体濃度(3C3、3G5、1B4、3B6、および6H6)の関数として、フローサイトメトリーによる平均蛍光強度(MFI)として精製ヒトPBMC(左)およびカニクイザルPBMC(右)に対する結合を示したグラフである。

【図4A】図4Aおよび4Bは、ELISAによる、CD40タンパク質への可溶性CD40リガンド(sCD40L)の結合に対するヒトCD40抗体の影響を示したグラフである。

【図4B】図4Aおよび4Bは、ELISAによる、CD40タンパク質への可溶性CD40リガンド(sCD40L)の結合に対するヒトCD40抗体の影響を示したグラフである。

10

【図5】表面にヒトCD40を発現しているRaji細胞上のCD40に対するヒトCD40抗体(3C3、3G5、1B4、3B6、および6H6)の結合のフローサイトメトリーによる分析である。

【図6】図6は、表面にヒトCD40を発現しているRamos細胞上のCD40に対するヒトCD40抗体(3C3、3G5、1B4、3B6、および6H6)の結合のフローサイトメトリーによる分析である。

【図7】図7Aおよび7Bは、ヒトCD40抗体によるRamos細胞上のCD95の誘導を示すグラフである。

【図8A】図8Aおよび8Bは、示される以下のマーカー、すなわち、CD54、HLA-DR、CD86、CD83、および%CD83+細胞の発現レベルの変化に基づいた、ヒトCD40抗体(3C3および3G5)による樹状細胞(DC)の活性化を示すグラフである。

20

【図8B】図8Aおよび8Bは、示される以下のマーカー、すなわち、CD54、HLA-DR、CD86、CD83、および%CD83+細胞の発現レベルの変化に基づいた、ヒトCD40抗体(3C3および3G5)による樹状細胞(DC)の活性化を示すグラフである。

【図9】図9Aおよび9Bは、ヒトCD40抗体(3C3および3G5)によるIL-12p40の誘導を示すグラフである。

【図10A】図10Aおよび10Bは、示される以下のマーカー、すなわち、CD54、HLA-DR、CD23、%CD23+細胞、CD69、CD86、CD38、およびCD71の発現レベルの変化に基づいた、ヒトCD40抗体(3C3および3G5)によるB細胞の活性化を示すグラフである。

30

【図10B】図10Aおよび10Bは、示される以下のマーカー、すなわち、CD54、HLA-DR、CD23、%CD23+細胞、CD69、CD86、CD38、およびCD71の発現レベルの変化に基づいた、ヒトCD40抗体(3C3および3G5)によるB細胞の活性化を示すグラフである。

【図11A】図11Aおよび11Bは、CD40を発現しているルシフェラーゼレポーター細胞株を用いた、ヒトCD40抗体によるNFkB活性化を示すグラフである。

【図11B】図11Aおよび11Bは、CD40を発現しているルシフェラーゼレポーター細胞株を用いた、ヒトCD40抗体によるNFkB活性化を示すグラフである。

40

【図12】CD40ヒト抗体クローン3C3および3G5の腹腔内投与(0.3mg/投与)による処理後のSCIDマウス腫瘍モデル(Raji細胞)における腫瘍増殖および生存率の結果を示すグラフである。

【図13】CD40ヒト抗体クローン3C3および3G5の腹腔内投与(0.3mg/投与)による処理後のSCIDマウス腫瘍モデル(Ramos細胞)における腫瘍増殖および生存率の結果を示すグラフである。

【図14A】図14Aおよび14Bは、示されるCD40抗体またはアイソタイプコントロール(IgG2)とインキュベートした標識されたPBMCのT細胞増殖を示すグラフである。

50

【図 1 4 B】図 1 4 A および 1 4 B は、示される C D 4 0 抗体またはアイソタイプコントロール (I g G 2) とインキュベートした標識された P B M C の T 細胞増殖を示すグラフである。

【図 1 5】C D 4 0 抗体 3 C 3 および 3 G 5 を用いた、F c 受容体相互作用とは無関係な C D 4 0 への結合を示すグラフである。

【図 1 6】C D 4 0 抗体 3 C 3 および 3 G 5 を用いた N F k b 活性化を示すグラフである。

【図 1 7】C D 4 0 抗体 3 C 3 および 3 G 5 を用いた R a m o s 細胞上の C D 9 5 の誘導を示すグラフである。

【図 1 8】抗 C D 4 0 / 抗原融合 A P C ターゲティングワクチンコンストラクトの一例の概略図を示す。

10

【図 1 9】R a m o s 細胞上の C D 9 5 発現に対する C D 4 0 抗体 3 C 3 と可溶性 C D 4 0 L との相乗作用を示すグラフである。

【図 2 0】N 末端ヒト 系軽鎖および C 末端 F l a g タグを有する、アミノ酸残基 1 ~ 1 7 3 にわたった完全長細胞外ドメイン (E C D) をコードした可溶性 C D 4 0 の c D N A の概略図である。

【図 2 1】サル C D 4 0 E C D のアミノ酸配列 (上) およびマウス C D 4 0 E C D のアミノ酸配列 (下) とヒト C D 4 0 E C D のアミノ酸配列とのアラインメントを示す。生成するフラグメントが示されている。

【図 2 2】異なる点突然変異またはそれらの組み合わせを有するヒト C D 4 0 E C D フラグメント A (アミノ酸残基 1 ~ 5 、 上) またはヒト C D 4 0 E C D フラグメント D (アミノ酸残基 3 3 ~ 3 6 、 下) に対する C D 4 0 抗体 3 C 3 の結合を示すグラフである。

20

【図 2 3 A】図 2 3 A ~ 2 3 C は、示した時点において C D 4 0 抗体 3 C 3 または 3 G 5 で処理する前後にサルで測定されたアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T 、 2 3 A) 、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T 、 2 3 B) 、およびクレアチンキナーゼ (2 3 C) のレベルを示すグラフである。

【図 2 3 B】図 2 3 A ~ 2 3 C は、示した時点において C D 4 0 抗体 3 C 3 または 3 G 5 で処理する前後にサルで測定されたアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T 、 2 3 A) 、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T 、 2 3 B) 、およびクレアチンキナーゼ (2 3 C) のレベルを示すグラフである。

【図 2 3 C】図 2 3 A ~ 2 3 C は、示した時点において C D 4 0 抗体 3 C 3 または 3 G 5 で処理する前後にサルで測定されたアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (A S T 、 2 3 A) 、アラニンアミノトランスフェラーゼ (A L T 、 2 3 B) 、およびクレアチンキナーゼ (2 3 C) のレベルを示すグラフである。

30

【図 2 4】図 2 4 は、示した時点において C D 4 0 抗体 3 C 3 または 3 G 5 で処理したサルの血液で測定された I L - 1 2 (p g / m L) のレベルを示すグラフである。

【図 2 5 A】図 2 5 A ~ 2 5 C は、示される時点において C D 4 0 抗体 3 C 3 または 3 G 5 で処理する前後にサルで測定された白血球 (2 5 A) 、好中球 (2 5 B) 、およびリンパ球 (2 5 C) の量を示すグラフである。

【図 2 5 B】図 2 5 A ~ 2 5 C は、示される時点において C D 4 0 抗体 3 C 3 または 3 G 5 で処理する前後にサルで測定された白血球 (2 5 A) 、好中球 (2 5 B) 、およびリンパ球 (2 5 C) の量を示すグラフである。

40

【図 2 5 C】図 2 5 A ~ 2 5 C は、示される時点において C D 4 0 抗体 3 C 3 または 3 G 5 で処理する前後にサルで測定された白血球 (2 5 A) 、好中球 (2 5 B) 、およびリンパ球 (2 5 C) の量を示すグラフである。

【図 2 6】図 2 6 は、C D 4 0 抗体 3 C 3 または 3 G 5 で処理したサルにおける B 細胞の量の、時間 (日数) にともなうベースラインからの変化率 (%) を示すグラフである。

【図 2 7】図 2 7 は、2 m g (左) または 0 . 2 m g (右) の C D 4 0 抗体 3 C 3 (四角) 、 3 G 5 (菱形) 、または生理食塩水 (丸) で処理後のベースラインと比較しての B 細胞上での H L A - D R の発現を示すグラフである。

【図 2 8】図 2 8 は、細胞をいずれかの抗 C D 4 0 m A b 3 C 3 の存在下で培養した場

50

合のB細胞の増殖を示すグラフである。

【図29】図29および30は、B細胞における抗CD40mAb 3C3とCD40Lとの組み合わせの相乗作用を示すグラフである。

【図30】図29および30は、B細胞における抗CD40mAb 3C3とCD40Lとの組み合わせの相乗作用を示すグラフである。

【図31】図31は、抗CD40mAb 3C3とインキュベートした場合の全血中のサイトカイン応答を示した表である。

【発明を実施するための形態】

【0045】

本発明は、免疫機能のアップレギュレーション（例えばワクチン療法におけるT細胞媒介性免疫反応、癌治療におけるNK活性化など）、細胞増殖の阻害（例えば癌治療における）、および/またはAPCによる抗原のプロセッシングおよび提示の促進（例えばワクチン療法における）を含む有意な治療効果に相関する特定の機能性を示す抗CD40抗体を提供する。これらの機能特性としては、例えば、Fc受容体の結合とは無関係に、かつ/または抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）または補体依存性細胞傷害作用（CDC）を誘導することなく、抗原に対する免疫反応を増大させることが挙げられる。更なる機能特性としては、例えば（1）CD40発現細胞へのCD40L（CD154）の結合の少なくとも50%、少なくとも60%または少なくとも70%の阻害（例えば完全なまたは部分的なブロッキング）、（2）Fc受容体の結合とは無関係なヒトCD40に対するCD40Lの結合のブロッキング、（3）細胞アポトーシスの誘導（例えばCD95の発現の増大によって測定される）、（4）T細胞刺激活性の増大（例えばIL-12p40の発現の増大により測定される）、および/または（5）B細胞活性化の増大（例えばHLA-DR V450、CD54 PE、CD86 APC、およびCD83 BV510、CD19 V500、CD54 PE、HLA-DR V450、CD23 PerCP-Cy5.5、CD69 APC、CD86 APC、CD38 PerCP-Cy5.5およびCD71 PEからなる群から選択される少なくとも1種の細胞表面マーカーの発現の増大によって測定される）が挙げられる。

【0046】

本発明をより容易に理解できるようにするため、特定の用語をまず定義する。更なる定義が、「発明を実施するための形態」の全体を通じて記載される。

【0047】

「CD40」（「CD40分子」、「Bp50」、「CDW40」、「TNFRSF5」、「p50」、「B細胞表面抗原CD40」、「B細胞関連分子」、「CD40抗原」、「TNF受容体スーパーファミリーメンバー5」、「CD40II型アイソフォーム」、「CD40L受容体」、「神経増殖因子受容体関連Bリンパ球活性化分子」、または「腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー5」とも称される）なる用語は、リガンドであるCD40L（CD154とも称される）に結合するTNF受容体スーパーファミリーのメンバーである受容体のことを言う。CD40は、T細胞依存性のイムノグロブリンのクラススイッチおよびメモリーB細胞の発生を含む幅広い免疫および炎症反応を媒介する。「CD40」なる用語には、細胞が自然に発現するCD40の任意の変異体またはアイソフォームが含まれる（例えば、アクセッション番号P25942を有するGENBANK（登録商標）に寄託されたヒトCD40）。したがって、本発明の抗体は、ヒト以外の生物種からのCD40と交差反応することができる。あるいは、抗体はヒトCD40に対する特異性を有し、他の生物種との交差反応性を示さないものとすることもできる。CD40またはその任意の変異体およびアイソフォームは、これらを自然に発現する細胞もしくは組織から単離するか、または当該技術分野では周知の手法および/または本明細書に記載の手法を用いて組換えにより作製することができる。好ましくは、抗体は、正常なグリコシル化パターンを有するhCD40に対して標的化される。

【0048】

Genbank（登録商標）（アクセッション番号P25942）は、ヒトCD40のア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を以下のものとして報告している（配列番号１）。すなわち、
 M V R L P L Q C V L W G C L L T A V H P E P P T A C R E K Q Y L I N S Q C C
 S L C Q P G Q K L V S D C T E F T E T E C L P C G E S E F L D T W N R E T
 H C H Q H K Y C D P N L G L R V Q Q K G T S E T D T I C T C E E G W H C T
 S E A C E S C V L H R S C S P G F G V K Q I A T G V S D T I C E P C P V G F
 F S N V S S A F E K C H P W T S C E T K D L V V Q Q A G T N K T D V V C G
 P Q D R L R A L V V I P I I F G I L F A I L L V L V F I K K V A K K P T N
 K A P H P K Q E P Q E I N F P D D L P G S N T A A P V Q E T L H G C Q P V
 T Q E D G K E S R I S V Q E R Q

【 0 0 4 9 】

「CD40L」（「CD40リガンド」、「CD407L」、または「CD154」とも称される）なる用語は、CD40のリガンドのことを言う（例えば、Schoenbeck and Libby（2001）Cell Mol Life Sci, 58（1）：4-43を参照）。CD40Lは、主として活性化したT細胞で発現され、TNFスーパーファミリーの分子のメンバーである。CD40Lは、抗原提示細胞（APC）上のCD40に結合し、それにより標的細胞のタイプに応じて多くの作用がもたらされる（Parham, Peter（2004）. The Immune System（2nd ed.）. Garland Science. Pp. 169-173）。

Genbank（登録商標）（アクセッション番号NP_000065）は、ヒトCD40Lのアミノ酸配列を以下のものとして報告している（配列番号2）。すなわち、

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

【 0 0 5 0 】

本明細書で言うところの「抗体」なる用語には、全抗体およびその抗原結合フラグメント（すなわち、「抗原結合部分」）または1本鎖が含まれる。一つの好ましい実施形態では、「抗体」とは、ジスルフィド結合で相互連結された少なくとも2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖とからなる糖タンパク質、またはその抗原結合部位のことを言う。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではV_Hと略称する）と重鎖定常領域とからなる。重鎖定常領域は、CH1、CH2、およびCH3の3つのドメインで構成される。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではV_Lと略称する）と軽鎖定常領域とからなる。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLで構成される。V_HおよびV_L領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存された領域が間に介在する相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域に更に分けることができる。各V_HおよびV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端へとFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で配列された3つのCDRと4つのFRとから構成されている。重鎖および軽鎖の各可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含んでいる。抗体の定常領域は、免疫系のさまざまな細胞（例えばエフェクター細胞）および古典的補体系の第一成分（C1q）をはじめとする、宿主の組織または因子に対するイムノグロブリンの結合を媒介し得る。

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用するところの、抗体の「抗原結合部分」なる用語（または単純に「抗体部分」）とは、抗原（例えばヒトCD40）に特異的に結合する能力を保持した抗体の1またはそれより多くのフラグメントのことを言う。かかる「フラグメント」は、例えばアミノ酸約8個～約1500個の長さ、好適にはアミノ酸約8個～約745個の長さ、好適にはアミノ酸約8個～約300個、例えば約8個～約200個、またはアミノ酸約10個～約50個もしくは100個の長さである。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体のフラグメ

10

20

30

40

50

ントにより行われ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」なる用語に包含される結合フラグメントの例としては、(i) V_L 、 V_H 、 C_L および C_H1 ドメインからなる1価のフラグメントであるFabフラグメント、(ii) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された2個のFabフラグメントからなる2価のフラグメントである $F(ab')_2$ フラグメント、(iii) V_H および C_H1 ドメインからなるFdフラグメント、(iv) 抗体の一本のアームの V_L および V_H ドメインからなるFvフラグメント、(v) V_H ドメインからなるdAbフラグメント(Ward et al., (1989) Nature 341: 544 - 546)、および(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)または(vii) 合成リンカーによって任意に連結されてもよい2個またはそれより多くの単離CDRの組み合わせが挙げられる。更に、Fvフラグメントの2個のドメイン V_L と V_H は別々の遺伝子によってコードされているが、これらのドメインは、組換え法を用い、 V_L 領域と V_H 領域とが連結されて1価の分子を形成した1本のタンパク質鎖として生成されることを可能とする合成リンカーにより、連結することができる(一本鎖Fv(scFv)として知られる。例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423 - 426; およびHouston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883を参照)。このような一本鎖抗体は、抗体の「抗原結合部分」なる用語にも包含されるものとする。これらの抗体フラグメントは当業者には周知の従来の方法を用いて得られ、フラグメントは完全な抗体と同じ要領でスクリーニングされて使用に供される。抗原結合部分は、組換えDNA技術、または完全なイムノグロブリンの酵素的もしくは化学的切断によって作製することができる。

【0052】

「二重特異性」または「二官能性抗体」とは、2つの異なる重鎖/軽鎖のペアおよび2つの異なる結合部位を有する人工的なハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合または Fab' フラグメントの連結を含むさまざまな方法によって作製することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315 - 321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547 - 1553 (1992)を参照。

【0053】

本明細書で使用するところの「モノクローナル抗体」なる用語は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性およびアフィニティーを示す抗体のことを言う。したがって、「ヒトモノクローナル抗体」なる用語は、単一の結合特異性を示し、ヒト生殖細胞系のイムノグロブリン配列から得られる可変領域および場合により定常領域を有する抗体のことを言う。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞と融合されたヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、例えばトランスジェニックマウスなどのトランスジェニック非ヒト動物から得られたB細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

【0054】

本明細書で使用するところの「組換えヒト抗体」なる用語は、(a) ヒトイムノグロブリン遺伝子を遺伝子導入または染色体導入された動物(例えばマウス)、またはこれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体、(b) 抗体を発現するように形質転換された宿主細胞、例えばトランスフェクトーマから単離された抗体、(c) 組換え体、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体などの、組換え手段によって調製、発現、作出、または単離されたあらゆるヒト抗体、および(d) ヒトイムノグロブリン遺伝子配列の他のDNA配列に対するスプライシングをとる他の任意の手段によって調製、発現、作出、または単離された抗体が挙げられる。このような組換えヒト抗体は、生殖細胞系遺伝子によってコードされた特定のヒト生殖細胞系イムノグロブリン配列を用いた可変領域および定常領域を含むが、例えば抗体の成熟過程で生じるその後の遺伝子再構成および突然変異を含む。当該技術分野では周知であるように(例えば、Lonberg

(2005) Nature Biotech. 23(9):1117-1125を参照)、可変領域は、再構成されて外来抗原に対して特異的な抗体を生成する異なる遺伝子によってコードされた抗原結合ドメインを含む。可変領域は、再構成以外に、外来抗原に対する抗体のアフィニティーを高めるために複数の単一アミノ酸変化(体細胞突然変異または超突然変異と呼ばれる)によって更に改変することができる。定常領域は更に抗原に応じて変化する(すなわちアイソタイプスイッチ)。したがって、抗原に応じて軽鎖および重鎖イムノグロブリンのポリペプチドをコードした、再構成および体細胞突然変異した核酸分子は、元の核酸分子と配列同一性を有さないが、代わりに実質的に同一または同様のものとなる(すなわち、少なくとも80%の同一性を有する)。

【0055】

「ヒト抗体」なる用語には、ヒト生殖細胞系イムノグロブリン配列の可変領域および定常領域(存在する場合)を有する抗体が含まれる。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系イムノグロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基(例えば、ランダムに、またはインビトロで部位特異的突然変異誘発により、またはインビボで体細胞突然変異により導入された突然変異)を含み得る(Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859); Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93, およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546を参照)。しかしながら、「ヒト抗体」なる用語には、例えばマウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系から得たCDR配列をヒトのフレームワーク配列上にグラフトした抗体(すなわちヒト化抗体)は含まれない。

【0056】

本明細書で使用するところの「異種抗体」は、かかる抗体を産生するトランスジェニック非ヒト生物に関連して定義される。この用語は、トランスジェニック非ヒト動物からなるものではない生物に見られるものに対応したアミノ酸配列またはコーディング核酸配列を有する抗体であって、一般にトランスジェニック非ヒト動物の生物種以外の種に由来する抗体のことを言う。

【0057】

本明細書で使用するところの「単離抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体のことを言うものとする(例えば、ヒトCD40に特異的に結合する単離抗体は、ヒトCD40以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかしながら、ヒトCD40のエピトープに特異的に結合する単離抗体は、異なる種に由来する他のCD40タンパク質と交差反応性を有し得る。しかしながら、抗体は常にヒトCD40に結合することが好ましい。更に、単離抗体は、通常は、他の細胞物質および/または化学物質を実質的に含まない。本発明の一実施形態では、異なるCD40特異性を有する「単離」抗体の組み合わせが、明確に定義された組成物中で組み合わせられる。

【0058】

「エピトープ」または「抗原決定基」なる用語は、イムノグロブリンまたは抗体が特異的に結合する抗原上の部位のことを言う。エピトープは、連続的なアミノ酸またはタンパク質の3次フォールディングによって隣接した非連続的なアミノ酸から形成され得る。連続的なアミノ酸から形成されたエピトープが、変性溶媒に曝露される際に一般的に保持されるのに対して、3次フォールディングによって形成されたエピトープは一般的に変性溶媒で処理すると失われる。エピトープは通常、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のアミノ酸を固有の空間的コンフォメーションで含む。どのエピトープが特定の抗体によって結合されるかを決定するための方法(すなわちエピトープマッピング)は当該技術分野では周知のものであり、例えば免疫プロットティングおよび免疫沈降アッセイが挙げられ、CD40から得られた重なり合った、または連

10

20

30

40

50

続したペプチドを特定の抗CD40抗体との反応性について試験する。エピトープの空間的コンフォメーションを決定する方法としては当該技術分野では周知の手法が挙げられ、例えばX線結晶解析および2次元核磁気共鳴法が挙げられる（例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照）。

【0059】

したがって、CD40上の同じエピトープ、または本明細書に記載の特定の抗体によって認識されるエピトープの全体または一部を含むCD40上のエピトープ（例えば、同じまたは重複する領域、または領域間もしくは領域にまたがる領域）に結合する抗体もまた、本発明によって提供される。同じエピトープ、または特定の抗体によって認識されるエピトープの全体または一部を含むエピトープに結合する抗体は、常法を用いて同定することができる。かかる手法としては、例えば、エピトープの原子分解能を与える、抗原抗体複合体の結晶のX線解析などのエピトープマッピング法が挙げられる。他の方法としては、抗原フラグメントまたは抗原の突然変異体に対する抗体の結合を観察するものがあり、抗原配列内のアミノ酸残基の変化による結合の消失が、エピトープ要素の指標としばしばみなされる。更に、エピトープマッピング用の計算コンビナトリアル法を用いることもできる。これらの方法は、コンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリーから特定の短鎖ペプチドをアフィニティー単離する対象抗体の能力に基づいたものである。そのため、これらのペプチドは、ペプチドライブラリーをスクリーニングするために用いられる抗体に対応したエピトープを定義するための手掛かりとみなされる。エピトープマッピングでは、コンフォメーション的に不連続なエピトープをマッピングできることが示されている計算アルゴリズムも開発されている。

【0060】

本明細書に記載の抗体とヒトCD40との結合について競合する抗体も提供される。結合について競合する抗体は、常法を用いて同定することができる。かかる手法としては、例えば、ある抗体が標的抗原に対する別の抗体の結合を阻害する能力を示すイムノアッセイ、すなわち競合結合アッセイが挙げられる。競合結合は、試験されるイムノグロブリンが、例えばCD40などの共通の抗原に対する参照抗体の特異的結合を阻害するアッセイで測定される。多くの種類の競合結合アッセイが知られており、例えば、固相直接または間接ラジオイムノアッセイ（RIA）、固相直接または間接酵素イムノアッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)を参照）、固相直接ビオチン-アビジンEIA（Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)を参照）、固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ（Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)を参照）、I-125標識を用いた固相直接標識RIA（Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)を参照）、固相直接ビオチン-アビジンEIA（Cheung et al., Virology 176:546 (1990)を参照）、および直接標識RIA（Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)）が挙げられる。一般にこれらのアッセイは、標識されていない試験免疫グロブリンおよび標識された参照免疫グロブリンのいずれかを有する固体表面または細胞に結合した精製抗原の使用を伴う。競合阻害は、試験イムノグロブリンの存在下で固体表面または細胞に結合する標識の量を決定することにより測定される。通常、試験イムノグロブリンは過剰量で存在する。通常、競合抗体が過剰量で存在する場合、参照抗体の共通抗体との特異的結合を少なくとも50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%またはそれより大きく阻害する。

【0061】

10

20

30

40

50

本明細書で使用するところの「特異的結合」、「選択的結合」、「選択的に結合する」、および「特異的に結合する」なる用語は、所定の抗原上のエピトープに対する抗体の結合のことを言う。一般的に、抗体は、組換えヒトCD40を分析物とし、抗体をリガンドとして使用して、Octet（登録商標）QKe装置を使用したバイオレイヤー干渉法（bio-layer interferometry）（BLI）により、またはBIACORE 2000装置による表面プラズモン共鳴（SPR）技術により測定した場合におよそ 10^{-7} M未満、例えばおよそ 10^{-8} M、 10^{-9} M、または 10^{-10} M未満、または更にそれよりも低い平衡解離定数（ K_D ）で結合し、所定の抗原または密接に関連した抗原以外の非特異的抗原（例えばBSA、カゼイン）との結合におけるそのアフィニティーよりも少なくとも2倍高いアフィニティーで所定の抗原と結合する。本明細書では、

10

【0062】

また、本発明には、ヒトCD40に結合し、Fc受容体の結合とは無関係に免疫反応を増大させることが可能な抗体も含まれる。例えば、かかる抗体は、FcRなどのFc受容体と架橋することなく、強力なアゴニスト特性を示す。これらのアゴニスト特性としては、例えば細胞表面マーカーの発現の増大によって測定されるT細胞活性の増大および/またはB細胞活性化の増大が挙げられる。

【0063】

本明細書で使用するところの「 K_D 」なる用語は、特定の抗体抗原相互作用の解離平衡定数のことを言うものとする。一般的に、本発明のヒト抗体は、組換えヒトCD40を分析物とし、抗体をリガンドとして使用して、Octet（登録商標）QKe装置を使用したバイオレイヤー干渉法（bio-layer interferometry）（BLI）により、またはBIACORE 2000装置による表面プラズモン共鳴（SPR）技術により測定した場合におよそ 10^{-8} Mもしくはそれ未満、例えばおよそ 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、もしくは 10^{-12} M未満、または更にそれよりも低い平衡解離定数（ K_D ）でCD40と結合する。

20

【0064】

本明細書で使用するところの「kd」なる用語は、抗体/抗原複合体からの抗体の解離の解離速度定数（off rate constant）のことを言うものとする。

30

【0065】

本明細書で使用するところの「ka」なる用語は、抗体と抗原との会合の結合速度定数（on rate constant）のことを言うものとする。

【0066】

本明細書で使用するところの「EC50」なる用語は、インビボまたはインビトロのアッセイにおいて、最大応答の50%、すなわち最大応答とベースラインとの中間の応答を誘導する抗体またはその抗原結合部位の濃度のことを言う。

【0067】

本明細書で使用するところの「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域の遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えばIgMまたはIgG1）のことを言う。一実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗体は、IgG1アイソタイプのものである。別の実施形態では、本発明のヒトモノクローナル抗体は、IgG2アイソタイプのものである。

40

【0068】

「固定化されたCD40に結合する」なる用語は、例えば細胞の表面に発現されるかまたは固体支持体に付着されたCD40に結合する本発明のヒト抗体の能力のことを言う。

【0069】

本明細書で使用するところの「交差反応する」なる用語は、異なる種に由来するCD40に結合する本発明の抗体の能力のことを言う。例えば、ヒトCD40に結合する本発明の抗体は、別の種のCD40にも結合し得る。本明細書で使用するところの交差反応性は、結合アッセイ（例えばSPR、ELISAなど）における精製抗原との特異的反応性を検

50

出することにより、または生理学的にCD40を発現している細胞と結合させるかもしくは機能的に相互作用させることにより測定される。交差反応性を測定するための方法としては、例えば、Octet（登録商標）QKe装置を使用したバイオレイヤー干渉法（BLI）によるもの、またはBiacore（登録商標）2000SPR装置（Biacore AB社、スウェーデン、ウプサラ）を用いたBiacore（登録商標）表面プラズモン共鳴（SPR）分析によるもの、またはフローサイトメトリー法などの、本明細書に記載されるような標準的な結合アッセイが挙げられる。

【0070】

本明細書で使用するところの「アイソタイプスイッチ」とは、抗体のクラス、またはアイソタイプが1つのIgクラスから他のIgクラスの1つに変化する現象のことを言う。

10

【0071】

本明細書で使用するところの「非スイッチアイソタイプ」とは、アイソタイプスイッチが起きない場合に産生される重鎖のアイソタイプクラスのことを言う。非スイッチアイソタイプをコードするCH遺伝子は通常、機能的に再構成されたVDJ遺伝子のすぐ下流の最初のCH遺伝子である。アイソタイプスイッチは、古典的または非古典的アイソタイプスイッチに分類されている。古典的アイソタイプスイッチは、導入遺伝子の少なくとも1つのスイッチ配列領域が関与する組換え事象によって生じる。非古典的アイソタイプスイッチは、例えば、ヒト μ とヒト μ との間の相同組換えによって生じ得る（関連欠失）。特に、導入遺伝子間および/または染色体間組換えのような別の非古典的スイッチ機構が生じてアイソタイプスイッチを引き起こす場合もある。

20

【0072】

本明細書で使用するところの「スイッチ配列」なる用語は、スイッチ組換えの要因となるDNA配列のことを言う。「スイッチドナー」配列、一般的には μ スイッチ領域は、スイッチ組換えの際に欠失するコンストラクト領域の5'側（すなわち上流）にある。「スイッチアクセプター」領域は、欠失されるコンストラクト領域と置き換わる定常領域（例えば、 μ など）との間にある。組換えは常に特定の部位で生じるわけではないため、最終的な遺伝子配列は一般的にコンストラクトからは予測できない。

【0073】

本明細書で使用するところの「グリコシル化パターン」とは、タンパク質、より詳細にはイムノグロブリンタンパク質に共有結合される炭水化物単位のパターンとして定義される。異種抗体のグリコシル化パターンは、非ヒトトランスジェニック動物の種によって産生される抗体上に自然に生じるグリコシル化パターンと実質的に同様のものとして特徴付けることができるが、当業者には、異種抗体のグリコシル化パターンは、導入遺伝子のCH遺伝子が由来する種よりも上記のような非ヒトトランスジェニック動物の種におけるグリコシル化のパターンにより近いものとして認識されるであろう。

30

【0074】

対象に対して用いられる本明細書で使用するところの「自然に生じる」なる用語は、対象が自然に見出されることを言う。例えば、自然界の由来源から単離可能であり、実験室において人間により人為的に改変されていない、生物（ウイルスを含む）に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、自然に生じるものである。

40

【0075】

本明細書で使用するところの「再構成された」なる用語は、VセグメントがD-JまたはJセグメントに、それぞれ実質的に完全なVHまたはVLドメインをコードした配置で直接隣接して配置された重鎖または軽鎖イムノグロブリンの遺伝子座の構成のことを言う。再構成されたイムノグロブリン遺伝子座は、生殖細胞系のDNAとの比較によって同定することができ、再構成された遺伝子座は少なくとも1つの組換えられたヘプタマー/ノナマー相同エレメントを有する。

【0076】

Vセグメントに関連して本明細書で使用するところの「再構成されていない」または「生殖細胞系構成」なる用語は、VセグメントがDまたはJセグメントに直接隣接するように

50

組換えが行われていない構成のことを言う。

【 0 0 7 7 】

本明細書で使用するところの「核酸分子」なる用語は、DNA分子およびRNA分子を含むものとする。核酸分子は一本鎖または二本鎖であってよいが、好ましくは二本鎖DNAである。

【 0 0 7 8 】

CD40に結合する抗体または抗体部分（例えばV_H、V_L、CDR3）をコードする核酸に関連して本明細書で使用するところの「単離された核酸分子」なる用語は、そのような抗体または抗体部分をコードするヌクレオチド配列が、CD40以外の抗原に結合する抗体または抗体部分をコードした、ヒトゲノムDNAの核酸に自然に隣接し得る他のヌクレオチド配列を含まない核酸分子のことを言うものとする。

10

【 0 0 7 9 】

本発明にはまた、配列番号3～132に記載される配列の「保存的配列改変」、すなわち、これらのヌクレオチド配列によってコードされるかまたはこれらのアミノ酸配列を有する抗体の抗原との結合を阻害しないヌクレオチドおよびアミノ酸配列の改変も包含される。このような保存的配列改変には、保存的なヌクレオチドおよびアミノ酸の置換、ならびにヌクレオチドおよびアミノ酸の付加および欠失が含まれる。例えば、改変は、部位特異的突然変異導入法およびPCR介在性突然変異導入法などの当該技術分野では周知の常法により配列番号3～148に導入することができる。保存的アミノ酸置換には、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものが含まれる。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、分枝した側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。したがって、ヒト抗CD40抗体の予想される非不可欠アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基で好ましくは置換される。抗原との結合を阻害しないヌクレオチドおよびアミノ酸の保存的置換を同定するための方法は、当該技術分野では周知のものである（例えば、Brummell et al., Biochem. 32: 1180 - 1187 (1993); Kobayashi et al. Protein Eng. 12(10): 879 - 884 (1999); and Burks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412 - 417 (1997)を参照）。

20

30

【 0 0 8 0 】

保存的置換は、例えば下記表にしたがって行うことができる。例えば、2列目の同じブロックのアミノ酸、好ましくは3列目の同じ行のアミノ酸を互いに置換することができる。

40

50

【表 1 A】

脂防族	非極性	G A P
		I L V
	極性無電荷	C S T M
		N Q
	極性電荷	D E
		K R
芳香族		H F W Y

10

【 0 0 8 1 】

また、別の実施形態では、突然変異は、例えば飽和突然変異誘発などにより抗 C D 4 0 抗体の全体または一部に沿ってランダムに導入することもでき、得られた改変された抗 C D 4 0 抗体を結合活性についてスクリーニングすることができる。

【 0 0 8 2 】

核酸について、「実質的相同」なる用語は、2 個の核酸、またはその指定配列を最適にアラインして比較した場合に、適当なヌクレオチドの挿入または欠失を有し、ヌクレオチドの少なくとも約 8 0 %、通常少なくとも約 9 0 % ~ 9 5 %、より好ましくは少なくとも約 9 8 % ~ 9 9 . 5 % において同一であることを示す。あるいは、実質的相同は、セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下でその鎖の相補鎖とハイブリダイズする場合に存在する。

20

【 0 0 8 3 】

2 個の配列間の同一率 (%) は、2 個の配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、2 個の配列によって共有された同一位置の数の関数である (すなわち、相同率 (%) = 同一位置の数 / 位置の総数 × 1 0 0) 。 2 個の配列間の配列の比較および同一率 (%) の決定は、以下の非限定的な例に述べられるように数学的アルゴリズムを用いて実現することができる。

30

【 0 0 8 4 】

2 個のヌクレオチド配列間の同一率 (%) は、G C G ソフトウェアパッケージ ([http : / / www . gcg . com](http://www.gcg.com) より入手可能) の G A P プログラムを使用し、N W S g a p d n a . C M P マトリクスおよびギャップ重み = 4 0、5 0、6 0、7 0、または 8 0、および長さ重み = 1、2、3、4、5、または 6 を用いて求めることができる。2 個のヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一率 (%) は、A L I G N プログラム (v e r s i o n 2 . 0) に組み込まれた E . M e y e r s および W . M i l l e r のアルゴリズム (C A B I O S , 4 : 1 1 - 1 7 (1 9 8 9)) を使用し、P A M 1 2 0 重み残基表、ギャップ長ペナルティ = 1 2、ギャップペナルティ = 4 を用いて求めることもできる。更に、2 個のアミノ酸配列間の同一率 (%) は、G C G ソフトウェアパッケージ ([http : / / www . gcg . com](http://www.gcg.com) より入手可能) の G A P プログラムに組み込まれた N e e d l e m a n および W u n s c h のアルゴリズム (J . M o l . B i o l . (4 8) : 4 4 4 - 4 5 3 (1 9 7 0)) を使用し、B l o s s u m 6 2 マトリクスまたは P A M 2 5 0 マトリクスのいずれか、およびギャップ重み = 1 6、1 4、1 2、1 0、8、6 または 4、および長さ重み = 1、2、3、4、5 または 6 を用いて求めることができる。

40

【 0 0 8 5 】

本発明の核酸およびタンパク質配列を更に「クエリー配列」として用いて公開データベースに対する検索を行って、例えば関連する配列を同定することができる。かかる検索は、

50

Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム(version 2.0)を使用して行うことができる。BLASTヌクレオチド検索をNBLASTプログラムを用い、スコア=100、ワード長さ=12として行うことで本発明の核酸分子に対して相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索をXBLASTプログラムを用い、スコア=50、ワード長さ=3として行うことで本発明のタンパク質分子に対して相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のギャップを含むアラインメントを得るには、Gapped BLASTを、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402の記載にしたがって用いることができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを用いる場合、各プログラム(例えばXBLASTおよびNBLAST)のデフォルトのパラメータを用いることができる。http://www.ncbi.nlm.nih.gov.を参照。

10

【0086】

核酸は、全細胞中、細胞ライセート中に、または部分精製された、もしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、他の細胞成分または他の夾雑物(例えば他の細胞核酸もしくはタンパク質など)から、アルカリ/SDS処理、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動、および当該技術分野では周知の他の方法を含む常法によって精製される場合に「単離される」または「実質的に純粋とされる」。F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照。

20

【0087】

cDNA、ゲノムDNA、またはそれらの混合物から得られる本発明の核酸組成物は、しばしば天然配列であるが(改変された制限部位などを除き)、常法にしたがって突然変異を導入することによって遺伝子配列を与えることができる。コーディング配列では、これらの突然変異によってアミノ酸配列に必要な影響を及ぼすことができる。詳細には、天然のV、D、J、定常領域、スイッチ配列および本明細書に記載される他のそのような配列と実質的に相同であるかまたはこれらに由来するDNA配列が想到される(「由来する」とは配列が別の配列と同一であるかまたは別の配列から改変されたものであることを示す)。

30

【0088】

ある核酸は、別の核酸配列と機能的に関係する状態に置かれる場合に「機能的に連結される」。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、あるコーディング配列と、その配列の転写に影響する場合に機能的に連結される。転写調節配列に関して、「機能的に連結された」とは、連結されたDNA配列が連続的であり、2個のタンパク質コーディング領域を連結することが必要である場合、連続的でかつリーディングフレーム内にあることを意味する。スイッチ配列では、「機能的に連結された」とは、配列同士がスイッチ組換えを起こすことが可能であることを示す。

【0089】

本明細書で使用するところの「ベクター」なる用語は、その核酸分子に連結された別の核酸分子を輸送することが可能な核酸分子のことを言うものとする。1つの種類のベクターとして、更なるDNAセグメントをライゲートすることができる環状二本鎖DNAループのことを指す「プラスミド」がある。別の種類のベクターとして、更なるDNAセグメントをウイルスゲノムにライゲートすることができるウイルスベクターがある。特定のベクターは、ベクターが導入された宿主細胞内で自律的に複製することが可能である(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム性の哺乳動物ベクターなど)。他のベクター(例えば非エピソーム性の哺乳動物ベクター)は、宿主細胞内に導入されると宿主細胞のゲノムに組み込まれることにより、宿主ゲノムとともに複製され得る。更に、特定のベクターはベクターが機能的に連結された遺伝子の発現を誘導することができる

40

50

。そのようなベクターは、本明細書では「組換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」）と称する。一般的に組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。プラスミドは最も一般的に使用されるベクターの形態であることから、本明細書では「プラスミド」と「ベクター」とを互換可能に使用する場合がある。しかしながら、本発明には、同等の機能を有するウイルスベクター（例えば複製不能レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスなど）などの他の形態の発現ベクターも含まれるものとする。

【0090】

本明細書で使用するところの「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）とは、組換え発現ベクターが導入された細胞のことを言うものとする。かかる用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫のことも指すことは理解されるべきである。特定の改変は突然変異または環境の影響により後続世代で生じ得ることから、そのような子孫は実際には親細胞と同一でない場合もあるが、本明細書で使用するところの「宿主細胞」なる用語の範囲内に含まれる。

10

【0091】

本明細書で使用するところの「抗原」なる用語は、タンパク質、ペプチド、またはハプテンなどの任意の天然または合成免疫原性物質のことを言う。本発明における使用に適した抗原（例えば本発明の抗CD40抗体と併用されるワクチンにおける）としては、例えば、それらに対する防御または治療的免疫反応が望ましい感染症抗原および腫瘍抗原、例えば腫瘍細胞もしくは病原性生物により発現される抗原、または感染症抗原などが挙げられる。例えば、適当な抗原としては、癌の予防または治療用の腫瘍関連抗原が挙げられる。腫瘍関連抗原の例としては、これらに限定されるものではないが、hCG、gp100またはPmel17、HER2/neu、WT1、メソテリン、CEA、gp100、MART1、TRP-2、メラニンA、NY-ESO-1、NY-BR-1、NY-CO-58、MN（gp250）、イディオタイプ、MAGE-1、MAGE-3、MAGE-A3、チロシナーゼ、テロメラゼ、SSX2およびMUC-1抗原、ならびに生殖細胞由来腫瘍抗原の配列の全体または一部を含む配列が挙げられる。腫瘍関連抗原には、例えばLea、Leb、LeX、LeY、H2、B1、B2抗原などの血液型抗原も含まれる。また、複数の抗原が、本発明の抗原抗体コンストラクトに含まれてもよい。例えば、MAGE抗原を、メラニンA、チロシナーゼ、およびgp100などの他の抗原、ならびにGM-CSFまたはIL-12などのアジュバントと組み合わせて、抗APC抗体に結合させることができる。

20

30

【0092】

他の適当な抗原としては、ウイルス性疾患の予防および治療用のウイルス抗原が挙げられる。ウイルス性抗原の例としては、これらに限定されるものではないが、HIV-1 gag、HIV-1 env、HIV-1 nef、HBV（表面またはコア抗原）、HPV、FAS、HSV-1、HSV-2、p17、ORF2およびORF3抗原が挙げられる。細菌抗原の例としては、これらに限定されるものではないが、トキソプラズマ原虫（*Toxoplasma gondii*）または梅毒トレポネーマ（*Treponema pallidum*）が挙げられる。本発明の抗体細菌抗原結合体は、炭疽、ボツリヌス症、破傷風、クラミジア、コレラ、ジフテリア、ライム病、梅毒、および結核などの各種の細菌性疾患の治療または予防に使用することができる。ウイルス、細菌、寄生虫、および真菌類などの感染症病原体に由来する他の適当な抗原も下記に開示される。

40

【0093】

上記の抗原の配列は当該技術分野では周知のものである。例えば、MAGE-3 cDNA配列の例は米国特許第6,235,525号（Ludwig Institute for Cancer Research）に記載されており、NY-ESO-1核酸配列およびタンパク質配列の例は米国特許第5,804,381号および米国特許第6,069,233号（Ludwig Institute for Cancer Research）に記載されており、メラニンA核酸配列およびタンパク質配列の例は米国特許第5,6

50

20, 886号および米国特許第5, 854, 203 (Ludwig Institute for Cancer Research) に記載されており、NY-BR-1 核酸配列およびタンパク質配列の例は米国特許第6, 774, 226号および米国特許第6, 911, 529号 (Ludwig Institute for Cancer Research) に記載されており、NY-CO-58 核酸配列およびタンパク質配列の例は国際公開第WO02090986号 (Ludwig Institute for Cancer Research) に記載されており、HER-2/neu タンパク質のアミノ酸配列の例はGENBANK (登録商標) アクセッション番号AAA58637として入手可能であり、ヒト癌胎児性抗原様1 (CEA-1) のヌクレオチド配列 (mRNA) はGENBANK (登録商標) アクセッション番号NM_020219として入手可能である。

10

【0094】

本発明の組成物および方法に使用することができるHPV抗原としては、例えば、HPV-16抗原、HPV-18抗原、HPV-31抗原、HPV-33抗原、および/またはHPV-35抗原が挙げられ、HPV-16抗原および/またはHPV-18抗原が適当である。HPV-16のゲノムについては、Virology, 145: 181-185 (1985) に記載されており、HPV-18をコードするDNA配列については米国特許第5, 840, 306号に記載されており、これらの開示内容をその全容にわたって参照により本明細書に援用する。HPV-16抗原 (例えば、HPV-16のE1および/またはE2タンパク質の血清反応領域) については米国特許第6, 531, 127号に記載されており、HPV-18抗原 (例えば、HPV-18のL1および/またはL2タンパク質の血清反応領域) については米国特許第5, 840, 306号に記載されており、これらの開示内容をその全容にわたって参照により本明細書に援用する。同様に、HBVの完全なゲノムは、その開示内容を本明細書に援用するところのGENBANK (登録商標) アクセッション番号NC_003977で入手可能である。HCVのゲノムについては、その開示内容を本明細書に援用するところの欧州特許出願第318 216号に記載されている。その開示内容を参照により本明細書に援用するところの国際特許出願第PCT/US90/01348号は、HCVゲノムのクローンの配列情報、HCVウイルスタンパク質のアミノ酸配列、ならびにHCVタンパク質およびこれに由来するペプチドを含むHCVワクチン用のかかる組成物の製造および使用方法について開示している。

20

【0095】

タンパク質の抗原ペプチド (すなわち、T細胞エピトープを含むもの) は、当該技術分野では周知の様々な方法で同定することができる。例えば、ウェブベースの予測アルゴリズム (BIMASおよびSYFPEITHI) を使用してタンパク質配列を分析することで、これまでにCTLにより定義されている10, 000種類の十分に特徴付けされたMHC結合ペプチドの内部データベースに一致する潜在的なMHCクラスIおよびII結合ペプチドを得ることによってT細胞エピトープを予想することができる。スコアが高かったペプチドをランク付けし、特定のMHC分子に対する高いアフィニティーに基づいて「興味深いペプチド」として選択することができる。

30

【0096】

T細胞エピトープを含む抗原ペプチドの別の同定方法は、組換えにより、合成により、または特定の限定的条件下では、タンパク質の化学的切断により、生成することができる所望の長さの重複しないペプチドまたは所望の長さの重複するペプチドにタンパク質を分割し、免疫原性、例えば、T細胞の応答の誘導 (すなわち、増殖またはリンホカイン分泌) について試験することによるものである。

40

【0097】

例えば、精密マッピング技術によってタンパク質の正確なT細胞エピトープを決定するには、T細胞の生物学的的手法により決定した場合にT細胞刺激活性を有し、したがって少なくとも1つのT細胞エピトープを含むペプチドを、ペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにアミノ酸残基を付加するかまたは欠失させることによって改変し、試験を行って改変ペプチドに対するT細胞反応性の変化を決定することができる。天然タン

50

パク質配列中の重複領域を共有する２つまたはそれより多くのペプチドが、Ｔ細胞の生物学的手法により決定した場合にヒトＴ細胞刺激活性を有することが見出された場合、かかるペプチドの全体または一部を含む更なるペプチドを生成し、これらの更なるペプチドを同様の手順によって試験することができる。この手法の後、ペプチドを選択し、組換えまたは合成により生成する。ペプチドは、ペプチドに対するＴ細胞応答の強度（例えば、刺激指数）を含む異なる因子に基づいて選択される。次いで、これらの選択されたペプチドの物理的および化学的性質（例えば、溶解性、安定性）を調べることでペプチドが治療組成物における使用に適しているかどうか、またはペプチドに改変が必要かどうかを判定することができる。

【００９８】

10

「抗原提示細胞」またはＡＰＣなる用語は、ＭＨＣと複合体化された外来抗原をその表面に提示する細胞である。Ｔ細胞は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）を用いてこの複合体を認識する。ＡＰＣの例としては、これらに限定されるものではないが、樹状細胞（ＤＣ）、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）、単球（ＴＨＰ－１など）、Ｂリンパ芽球細胞（Ｃ１Ｒ、Ａ２、１５１８、Ｂ－ＬＣＬなど）および単球由来樹状細胞（ＤＣ）が挙げられる。ＡＰＣの一部のものは、食作用または受容体介在性エンドサイトーシスにより抗原を取り込む。ＡＰＣ受容体の例としては、これらに限定されるものではないが、ヒト樹状細胞および上皮細胞２０５受容体（ＤＥＣ－２０５）などのＣ型レクチン、およびヒトマクロファージマンノース受容体が挙げられる。

【００９９】

20

「抗原提示」なる用語は、ＡＰＣが抗原を捕捉してＴ細胞による抗原の認識（例えばＭＨＣ－Ｉおよび／またはＭＨＣ－ＩＩ結合体の構成成分として）を可能とするプロセスのことを言う。

【０１００】

「ＭＨＣ分子」には、ＭＨＣクラスＩおよびＭＨＣクラスＩＩの２つの種類がある。ＭＨＣクラスＩ分子は特定のＣＤ８＋Ｔ細胞に抗原を提示し、ＭＨＣクラスＩＩ分子は特定のＣＤ４＋Ｔ細胞に抗原を提示する。外因的にＡＰＣに与えられた抗原は、主としてＭＨＣクラスＩＩと結合されるために処理される。これに対して、内因的にＡＰＣに与えられた抗原は、主としてＭＨＣクラスＩと結合されるために処理される。

【０１０１】

30

本明細書で使用するところの「免疫賦活剤」なる用語には、これらに限定されるものではないが、ＤＣおよびマクロファージなどのＡＰＣを刺激することが可能な化合物が含まれる。例えば、本発明における使用に適した免疫賦活剤はＡＰＣを刺激することが可能であるため、ＡＰＣの成熟プロセスが加速され、ＡＰＣの増殖が増大し、かつ／または共刺激分子（例えば、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＩＣＡＭ－１、ＭＨＣ分子およびＣＣＲ７）および炎症性サイトカイン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－６、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、およびＩＦＮ－）の動員または放出が増加する。適当な免疫賦活剤は、Ｔ細胞増殖も増大させることができる。かかる免疫賦活剤としては、これらに限定されるものではないが、ＣＤ２７リガンド；ＦＬＴ３リガンド；ＩＦＮ－、ＩＦＮ－、ＩＦＮ－およびＩＬ－２などのサイトカイン；Ｇ－ＣＳＦ（顆粒球コロニー刺激因子）およびＧＭ－ＣＳＦ（顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子）などのコロニー刺激因子；抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＰＤ１抗体、抗４１ＢＢ抗体、または抗ＯＸ－４０抗体；ＬＰＳ（エンドトキシン）；ｓｓＲＮＡ；ｄｓＲＮＡ；カルメット・ゲラン桿菌（ＢＣＧ）；塩酸レバミゾール；および静脈内イムノグロブリンが挙げられる。一実施形態では、免疫賦活剤は、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）アゴニストであってよい。例えば、免疫賦活剤は、二本鎖イノシン：シトシンポリヌクレオチド（例えばＨｅｍｉｓｐｈｅｒｘ、Ｂｉｐｈａｒｍａ社（ペンシルベニア州、米国）よりＡｍｐｌｉｇｅｎ（登録商標）として販売されるＰｏｌｙ　Ｉ：Ｃ、またはＯｎｃｏｖｉｒ社より販売されるＰｏｌｙ　ＩＣ：ＬＣ）またはＰｏｌｙ　Ａ：ＵなどのＴＬＲ３アゴニスト；モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）またはＲＣ－５２９（例えば、ＧＳＫ社（英国）より販売されるもの）などのＴＬＲ４アゴニスト；フラジェリン

40

50

などの TLR5 アゴニスト；イミダゾキノリン TLR7 または TLR8 アゴニストなどの TLR7 または TLR8 アゴニスト（例えば、イミキモド（例えば、Aldara（商標））またはレシキモドおよび関連イミダゾキノリン剤（例えば、3M Corporation 社より販売されるもの）など）；または、非メチル化 CpG モチーフを有するデオキシヌクレオチドなどの TLR9 アゴニスト（例えば、Coley Pharmaceutical 社より販売されるようないわゆる「CpGs」）であってよい。好ましい免疫賦活剤は、TLR3 アゴニスト、好ましくは Poly I:C である。かかる免疫賦活剤は、本発明の抗体およびコンストラクトと同時に、別々に、または順次、投与することができ、抗体およびコンストラクトと物理的に連結することもできる。

【0102】

本明細書で使用するところの「連結された」なる用語は、2 個またはそれより多くの分子の結合のことを言う。連結は、共有または非共有結合であってよい。連結は、遺伝子的なものであってもよい（すなわち組換えにより融合されたもの）。かかる連結は、化学的結合または組換えタンパク質産生などの当該技術分野で認識されている幅広い技術を用いて実現することができる。

【0103】

本明細書で使用するところの抗原の「交差提示」なる用語は、APC 上の MHC クラス I およびクラス II 分子を介した T 細胞に対する外因性タンパク質抗原の提示のことを言う。

【0104】

本明細書で使用するところの「T 細胞媒介応答」なる用語は、エフェクター T 細胞（例えば、CD8⁺ 細胞）およびヘルパー T 細胞（例えば、CD4⁺ 細胞）などの T 細胞によって媒介される任意の応答のことを言う。T 細胞媒介応答には、例えば、T 細胞の細胞傷害作用および増殖が含まれる。

【0105】

本明細書で使用するところの「細胞傷害性 T リンパ球（CTL）応答」なる用語は、細胞傷害性 T 細胞によって誘導される免疫応答のことを言う。CTL 応答は、主として CD8⁺ T 細胞によって媒介される。

【0106】

本明細書で使用するところの「阻害する」または「ブロックする」（例えば、細胞上の CD40 に対する CD40L の結合の阻害／ブロックングを指す）なる用語は、互換可能に用いられ、部分的および完全な阻害／ブロックングの両方を包含する。CD40L の阻害／ブロックングは、阻害またはブロックングされることなく CD40L の結合が生じる場合に生じる通常のレベルまたは活性の種類を好ましくは低減または変化させる。阻害またはブロックングはまた、抗 CD40 抗体と接触していない CD40L と比較した場合に抗 CD40 抗体と接触している CD40L の結合アフィニティーのあらゆる測定可能な減少も含むものとする（例えば、CD40L の結合を少なくとも約 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、or 100% 阻害する）。特定の実施形態では、抗 CD40 抗体は、例えば BLI または SPR（Biacore）アッセイによって測定される CD40L の結合を少なくとも約 70% 阻害する。別の実施形態では、抗 CD40 抗体は、CD40L の結合を少なくとも約 80% 阻害する。

【0107】

本明細書で使用するところの「増殖を阻害する」（例えば細胞について言う場合）なる用語は、細胞の増殖のあらゆる測定可能な減少を含むものとする（例えば細胞の増殖の少なくとも約 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、または 100% の阻害）。

【0108】

「免疫反応を誘導する」、「免疫反応を増大させる」、および「免疫反応を促進する」なる用語は、互換可能に用いられ、特定の抗原に対する免疫反応（すなわち受動免疫または

10

20

30

40

50

適応免疫)の刺激のことを言う。

【0109】

「CDC」または「ADCC」の誘導に関連して用いられる「誘導する」または「増大させる」なる用語は、特定の直接的細胞殺傷機構の刺激のことを言う。例えば、一実施形態では、抗体は、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度でCD40発現細胞のCDCを介して少なくとも約20、25、30、35、40、45、50、55、または60%の細胞溶解を誘導する。一つの好ましい実施形態では、抗体は、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度でCD40発現細胞のCDCを介して少なくとも約40%の細胞溶解を誘導する。別の実施形態では、抗体は、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度でCD40発現細胞のADCC（少なくとも特異的細胞溶解）を介して少なくとも約20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、または85%の細胞溶解を誘導する。一実施形態では、抗体は、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度でCD40発現細胞のADCCを介して少なくとも約40%の細胞溶解を誘導する。

10

【0110】

本明細書で使用するところの「治療する(treat)」、「治療する(treating)」および「治療(treatment)」なる用語は、本明細書に記載される治療的または予防的措置のことを指す。「治療」の方法は、かかる治療を要する対象、例えば特定の抗原に対する高い免疫反応を要する対象または最終的にそのような疾患を得る可能性のある対象への投与を行うことによって、疾患または再発疾患の1つまたはそれより多くの症状を予防、治癒、遅延、その重症度を軽減、もしくは改善するか、またはかかる治療が行われない場合に予想される生存期間を超えて対象の生存期間を延ばすものである。

20

【0111】

「有効量」または「有効投与量」なる用語は、所望の効果を得る、または少なくとも部分的に得るうえで十分な量として定義される。「治療上の有効量」なる用語は、すでに疾患を罹患している患者において疾患およびその合併症を治癒するか、または少なくとも部分的に阻止するうえで十分な量として定義される。このような使用において効果的な量は、治療される疾患の重症度および患者自身の免疫系の一般的状態に応じて決められる。

【0112】

本明細書で使用するところの「相乗的」なる用語は、2つの薬剤の投与が、2つの薬剤が併用される場合に、2つの成分の個々の効果を加え合わせることから予想される効果よりも高い、例えば、2つの成分の個々の効果を加え合わせることから予想される効果の2倍よりも高い、3倍よりも高い、5倍よりも高い、または10倍よりも高い効果を生じることを意味する。例えば、薬剤の相互効果は、ChouおよびTalalayのメジアン効果モデル(Chou, T. C. & Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22, 27-55. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors)に基づいた、市販のソフトウェアパッケージであるCalcuSynを用いて分析することができる。併用指数(C. I.) 1が相加的な薬剤の相互作用を示したのに対して、1よりも大きいC. I. は拮抗性を示し、1よりも低いスコアは相乗性を示した。C I値は以下のように定義される。すなわち、1.45~1.2は中度に拮抗的であり、1.2~1.1はわずかに拮抗的であり、1.1~0.9は相加的であり、0.9~0.85はわずかに相乗的であり、0.85~0.7は中度に相乗的であり、および0.7~0.3は相乗的である。

30

40

【0113】

「患者」なる用語には、予防的または治療的処置を受けるヒトおよびその他の哺乳動物の対象が含まれる。

【0114】

本明細書で使用するところの「対象」なる用語には、あらゆるヒトおよび非ヒト動物が含まれる。例えば、本発明の方法および組成物は、免疫疾患を有する対象を治療するために

50

使用することができる。「非ヒト動物」なる用語には、ヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの哺乳動物および非哺乳動物などのすべての脊椎動物が含まれる。

【0115】

本発明のさまざまな態様を以下のサブセクションにおいて更に詳細に説明する。

I. CD40に対する抗体の作製

本発明の抗CD40抗体は、Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975)に記載される標準的な体細胞ハイブリダイゼーション法のような、各種の公知の手法を用いて作製することができる。原則的には体細胞ハイブリダイゼーション法を使用すればよいが、例えば、Bリンパ球のウイルスによる、または発癌性形質転換、ヒト抗体遺伝子のライブラリーを使用したファージディスプレイ手法などの、モノクローナル抗体を作製するための他の手法も使用することができる。

10

【0116】

特定の(例示的な)実施形態では、マウス(例えばHarbour(登録商標)トランスジェニックマウスのH2L2系統)または他の適当な宿主動物を適当な抗原で免疫化することによって免疫化に用いられた抗原に特異的に結合する抗体を産生する、または産生することが可能なリンパ球を誘導する。また、インビトロでリンパ球を免疫してもよい。次いで、リンパ球をポリエチレングリコールなどの適当な融合剤を用いてミエロマ細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を作製することができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。ハイブリドーマ細胞が増殖している培地を、抗原に対する特異性を有するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。所望の特異性、アフィニティー、および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、限界希釈法によってクローンをサブクロニングし、常法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。この目的に適した培地としては、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地が挙げられる。更に、ハイブリドーマ細胞を、動物の体内で腹水腫瘍としてインビボ増殖させることができる。サブクロンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばProtein Aセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来のイムノグロブリン精製法により培地、腹水、または血清から分離することができる。

20

30

【0117】

別の実施形態では、マウスの免疫系の代わりにヒト免疫系の部分を保有する遺伝子導入または染色体導入マウスを使用してCD40に対する特異性を有する抗体を作製する。一実施形態では、本発明は、再構成されていないヒト重鎖(μ および)および 軽鎖イムノグロブリン配列をコードするヒトイムノグロブリン遺伝子のミニ遺伝子座と、内因性の μ および 遺伝子座を不活化する標的化突然変異を有する、本明細書で「HuMAbマウス」と称されるトランスジェニックマウスを用いる(Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859)。したがって、このマウスは、IgMまたは の発現の低下を示し、免疫化に応じて、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子がクラススイッチおよび体細胞突然変異を起こして高アフィニティーのヒトIgG モノクローナル抗体を生成する(Lonberg, N. et al. (1994) (前出); Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546)。HuMAbマウスの作製については、以下のセクションIIお

40

50

よび Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg et al., (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol. Vol.* 13: 65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851に詳細に記載されている。更に、いずれも Lonberg および Kay、ならびに GenPharm International 社に付与された米国特許第 5,545,806 号、同第 5,569,825 号、同第 5,625,126 号、同第 5,633,425 号、同第 5,789,650 号、同第 5,877,397 号、同第 5,661,016 号、同第 5,814,318 号、同第 5,874,299 号、および同第 5,770,429 号、Surani らに付与された米国特許第 5,545,807 号、1998 年 6 月 11 日公開の国際公開第 WO 98/24884 号、1994 年 11 月 10 日公開の国際公開第 WO 94/25585 号、1993 年 6 月 24 日公開の国際公開第 WO 93/1227 号、1992 年 12 月 23 日公開の国際公開第 WO 92/22645 号、1992 年 3 月 19 日公開の国際公開第 WO 92/03918 号を参照されたい。

【0118】

別の実施形態では、CD40 に結合するヒト CD40 は、例えば下記文献に記載される方法を用いて作製された抗体ファージライブラリーから単離することができる。すなわち、McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991), Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) および Hoet et al (2005) *Nature Biotechnology* 23, 344-348; Ladner らに付与された米国特許第 5,223,409 号、同第 5,403,484 号、および同第 5,571,698 号、Dower らに付与された米国特許第 5,427,908 号、および同第 5,580,717 号、McCafferty らに付与された米国特許第 5,969,108 号、および同第 6,172,197 号、ならびに Griffiths らに付与された米国特許第 5,885,793 号、同第 6,521,404 号、同第 6,544,731 号、同第 6,555,313 号、同第 6,582,915 号、および同第 6,593,081 号。更に、鎖シャッフリングによる高アフィニティー (nM の範囲) のヒト抗体の産生 (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992))、ならびに極めて大きなファージライブラリーを構築するための方策としてのコンビナトリアル感染およびインビボ組換え (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)) を用いることもできる。

【0119】

特定の実施形態では、ヒト CD40 に結合する抗体は、Hoet et al. (前出) により述べられるファージディスプレイ法を用いて作製される。この手法では、ヒトドナー

10

20

30

40

50

から単離されたイムノグロブリン配列の固有の組み合わせを有するとともに重鎖 C D R に合成による多様性を有するヒト F a b ライブラリーの作製を行う。次いでこのライブラリーをヒト C D 4 0 に結合する F a b についてスクリーニングする。

【 0 1 2 0 】

本発明の抗体を産生するハイブリドーマを作製するための好ましい動物系はマウス系である。免疫化のプロトコールおよび免疫化された脾細胞を単離および融合するための方法を含む、マウスにおけるハイブリドーマ作製は当該技術分野では周知のものである。

C D 4 0 に対するモノクローナル抗体を産生するトランスフェクトーマの作製

【 0 1 2 1 】

本発明の抗体は、当該技術分野では周知であるように、例えば組換え DNA 技術と遺伝子トランスフェクション法の組み合わせを用いて宿主細胞のトランスフェクトーマ中で産生させることもできる (M o r r i s o n , S . (1 9 8 5) S c i e n c e 2 2 9 : 1 2 0 2) 。

【 0 1 2 2 】

例えば一実施態様では、例えばヒト抗体遺伝子などの目的遺伝子を、国際公開第 W O 8 7 / 0 4 4 6 2 号、国際公開第 W O 8 9 / 0 1 0 3 6 号及び欧州特許出願公開第 E P 3 3 8 8 4 1 号に開示される G S 遺伝子発現系または当該技術分野では周知の他の発現系で用いられるもののような真核生物発現プラスミドなどの発現ベクターにライゲートすることができる。次いで、クローニングされた抗体遺伝子を有する精製プラスミドを、C H O 細胞、N S O 細胞などの真核生物宿主細胞、またはこれに代えて植物由来細胞、真菌もしくは酵母細胞のような他の真核細胞に導入することができる。これらの遺伝子を導入するために用いられる方法は、エレクトロポレーション、リポフェクション、リポフェクタミンまたは他の方法など、当該技術分野において記載されている方法とすることができる。これらの抗体遺伝子を宿主細胞に導入した後、抗体を発現する細胞を同定し、選択することができる。これらの細胞はトランスフェクトーマであり、この後、細胞の発現レベルを増幅させ、スケールアップして抗体を産生させることができる。この後、組換え抗体を、これらの培養上清および細胞から単離、精製することができる。

【 0 1 2 3 】

また、これらのクローニングされた抗体遺伝子は、大腸菌または完全な生物などの他の発現系で発現させるか、または合成的に発現させることもできる。

インタクトな抗体を発現させるための部分抗体配列の使用

【 0 1 2 4 】

抗体は主に、6 個の重鎖および軽鎖相補性決定領域 (C D R) 内に存在するアミノ酸残基を介して標的抗原と相互作用する。このため、C D R 内のアミノ酸配列は、C D R の外側の配列と比較して個々の抗体間でより多様である。C D R 配列はほとんどの抗体抗原相互作用を担っていることから、異なる性質を有する異なる抗体から得られたフレームワーク配列上にグラフトされた特異的な天然に存在する抗体から得た C D R 配列を含む発現ベクターを構築することにより、特異的な天然に存在する抗体の性質を模倣する組換え抗体を発現させることが可能である (例えば、R i e c h m a n n , L . e t a l . , 1 9 9 8 , N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 7 ; J o n e s , P . e t a l . , 1 9 8 6 , N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 ; および Q u e e n , C . e t a l . , 1 9 8 9 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 6 : 1 0 0 2 9 - 1 0 0 3 3 を参照)。かかるフレームワーク配列は、生殖細胞系抗体遺伝子配列を含む公開 D N A データベースから得ることができる。これらの生殖細胞系配列は、B 細胞の成熟過程における V (D) J 連結により形成される完全にアセンブリされた可変遺伝子を含んでいないため、成熟抗体遺伝子配列とは異なっている。生殖細胞系遺伝子配列は、高アフィニティーの二次レパートリー抗体の配列とも、個々の可変領域にわたって一様に異なっている。例えば、体細胞突然変異は、フレームワーク領域のアミノ末端部分では相対的に稀である。例えば、体細胞突然変異は、フレームワーク領域 1 のアミノ末端部分およびフレームワーク領域 4 のカルボキシ末端部分で相対的に稀である。更に、

10

20

30

40

50

多くの体細胞変異は抗体の結合性を大きく変化させない。このため、元の抗体と同様の結合性を有するインタクトな組換え抗体を再作製するには特定の抗体の全DNA配列を得る必要はない(1999年3月12日出願の国際出願第PCT/US99/05535号を参照)。一般的には、各CDR領域にわたった部分的な重鎖および軽鎖配列がこの目的に充分である。このような部分配列を用いることで、どの生殖細胞系の可変の連結される遺伝子セグメントが、組換え後の抗体可変遺伝子に寄与したかが決定される。次いで、生殖細胞系配列を使用して可変領域の欠損した部分を充填する。重鎖および軽鎖のリーダー配列はタンパク質の成熟過程で切断されるため、最終的な抗体の性質に寄与しない。欠損配列を付加するには、クローニングしたcDNA配列をライゲーションまたはPCR増幅により合成オリゴヌクレオチドと組み合わせることができる。また、全可変領域を短鎖の重複するオリゴヌクレオチド群として合成し、PCR増幅により組み合わせることで完全に合成された可変領域クローンを作製することもできる。このプロセスは、特定の制限部位を除去するかもしれない点、または特定のコドン最適化できる点などの一定の利点を有する。

【0125】

ハイブリドーマ由来の重鎖転写産物および軽鎖転写産物のヌクレオチド配列を用いて重複する合成オリゴヌクレオチド群を設計することで、天然配列と同一のアミノ酸コーディング能を有する合成V配列を作製する。これらの合成重鎖および鎖配列は、以下の3つの点で天然配列と異なり得る。すなわち、繰り返しヌクレオチド塩基の配列が介在しているためにオリゴヌクレオチド合成およびPCR増幅が容易である点、Kozak則にしたがって最適な翻訳開始部位が組み込まれている点(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870)、および翻訳開始部位の上流にHindIII部位が操作により組み込まれている点、である。

【0126】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方について、最適化されたコード鎖配列および対応する非コード鎖配列を、対応する非コードオリゴヌクレオチドのおよそ中間点で30~50ヌクレオチドに分解する。したがって、各鎖について、オリゴヌクレオチドを、150~400ヌクレオチドのセグメントにわたる重複二本鎖群にアセンブリすることができる。次いで、これらのプールを鋳型として用いて150~400ヌクレオチドのPCR増幅産物を生成する。一般的には、1つの可変領域オリゴヌクレオチド群を2つのプールに分解し、これらを別々に増幅して2つの重複するPCR産物を生成する。次いで、これらの重複産物をPCR増幅によって組み合わせることで完全な可変領域を形成する。また、PCR増幅に重鎖または軽鎖定常領域の重複フラグメント(軽鎖のBbsI部位または重鎖の場合のAgeI部位を含む)を含めることで、発現ベクターコンストラクトに容易にクローニングすることができるフラグメントを生成することが望ましい場合もある。

【0127】

次いで、これらの再構築した重鎖可変領域および軽鎖可変領域を、クローニングしたプロモーター配列、リーダー配列、翻訳開始配列、リーダー配列、定常領域、3'非翻訳配列、ポリアデニル化配列、および転写終結配列と組み合わせて発現ベクターコンストラクトを形成する。重鎖および軽鎖発現コンストラクトを、単一のベクターに組み込み、宿主細胞に同時トランスフェクトするか、連続的にトランスフェクトするか、または別々にトランスフェクトし、この宿主細胞を融合することで、両鎖を発現する宿主細胞を形成することができる。

【0128】

PCR増幅されたV重鎖およびV軽鎖のcDNA配列を用いて完全な重鎖および軽鎖ミニ遺伝子を構築することができるように、発現ベクターの構築に用いるプラスミドを構築した。これらのプラスミドを使用して、完全なヒトIgG₁またはIgG₄抗体を発現させることができる。本発明の完全なヒト抗体およびキメラ抗体には、IgG₂、IgG₃、IgE、IgA、IgM、およびIgD抗体も含まれる。同様のプラスミドを、他の重鎖アイソタイプの発現、または軽鎖を含む抗体の発現用に構築することができる。

【0129】

したがって、本発明の別の態様では、本発明の抗CD40抗体の構造的特徴を利用することで、例えば以下のような本発明の抗体の少なくとも1つの機能性を保持した構造的に関連した抗CD40抗体が作製される。すなわち、

- (a) Fc受容体の結合とは無関係に免疫反応を誘導または促進すること、
- (b) CD40発現細胞の抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)を誘導することなく抗原に対する免疫反応を誘導または促進すること、
- (c) CD40発現細胞の補体依存性細胞傷害作用(CDC)を誘導することなく抗原に対する免疫反応を誘導または促進すること、および/または
- (d) CD40Lと相乗作用を示すことができること。

10

【0130】

更なる特徴としては、例えば、

- (d) CD40Lの結合を阻害しない、またはブロックしないこと、
- (d) CD40Lの結合を阻害する、またはブロックすること、
- (f) Fc受容体の結合とは無関係にヒトCD40に対するCD40Lの結合を阻害する、またはブロックすること、
- (g) 腫瘍細胞の細胞アポトーシスを誘導または促進すること、
- (h) 細胞のT細胞刺激活性(例えばIL-12p40の発現の増大により測定される)を誘導または促進すること、および/または

- (i) B細胞活性化を誘導または促進すること(例えば、HLA-DR V450、CD54 PE、CD86 APC、およびCD83 BV510、CD19 V500、CD54 PE、HLA-DR V450、CD23 PerCP-Cy5.5、CD69 APC、CD86 APC、CD38 PerCP-Cy5.5およびCD71 PEからなる群から選択される少なくとも1つの細胞表面マーカーの発現の増大により測定される)。

20

【0131】

一実施形態では、本発明の抗体の1つまたはそれより多くのCDR領域を既知のフレームワーク領域およびCDRと組換えにより組み合わせることで本発明の更なる組換え操作された抗CD40抗体を作製することができる。重鎖可変フレームワーク領域および軽鎖可変フレームワーク領域は、同じまたは異なる抗体配列に由来するものとして行うことができる。これらの抗体配列は、天然に存在する抗体の配列であってもよく、または複数の抗体のコンセンサス配列であってもよい(Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971 (1993) およびCarterらによる国際公開第WO92/22653号を参照)。

30

【0132】

したがって、別の実施形態では、本発明は、抗CD40抗体を調製するための方法であって、(1)重鎖フレームワーク領域、および重鎖CDRであってその少なくとも1つが配列番号5、6、7、8、9、10、19、20、21、22、23、24、33、34、35、36、37、38、47、48、49、51、52、61、62、63、64、65、66、75、76、77、78、79、80、89、90、91、92、93、94、103、104、105、106、107、108に示されるCDRのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖CDRと、(2)軽鎖フレームワーク領域、および軽鎖CDRであってその少なくとも1つが配列番号11、12、13、14、15、16、25、26、27、28、29、30、39、40、41、42、43、44、53、54、55、56、57、58、67、68、69、70、71、72、81、82、83、84、85、86、95、96、97、98、99、100、109、110、111、112、113、114に示されるCDRのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDRと、を有する抗体であって、CD40に結合する能力を保持している抗体を調製することを含む、方法を提供する。CD40に結合する抗体の能力は、実施例に記載されるもののような標準的な結合アッセイ(例えば、ELISAまたはFLI

40

50

SA)を用いて測定することができる。

【0133】

抗体の重鎖および軽鎖のCDR3ドメインが、抗原に対する抗体の結合特異性/アフィニティーに特に重要な役割を担っていることは当該技術分野ではよく知られている(Hall et al., J. Immunol., 149:1605-1612 (1992); Polymenis et al., J. Immunol., 152:5318-5329 (1994); Jahn et al., Immunobiol., 193:400-419 (1995); Klimka et al., Brit. J. Cancer, 83:252-260 (2000); Beiboer et al., J. Mol. Biol., 296:833-849 (2000); Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:8910-8915 (1998); Barbas et al., J. Am. Chem. Soc., 116:2161-2162 (1994); Ditzel et al., J. Immunol., 157:739-749 (1996)を参照)。したがって、上記に記載されるようにして調製される本発明の組換え抗体は、好ましくは、抗体3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、および3B6-NSの重鎖および/または軽鎖のCDR3を有する。抗体は更に、抗体3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、および3B6-NSのCDR2を含んでもよい。抗体は更に、抗体3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、および3B6-NSのCDR1を含んでもよい。抗体は更に、CDRの任意の組み合わせを含んでもよい。

【0134】

したがって、別の実施形態では、本発明は更に、抗CD40抗体であって、(1)重鎖フレームワーク領域、重鎖CDR1領域、重鎖CDR2領域、および、3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、または3B6-NSのCDR3から選択される重鎖CDR3領域と、(2)軽鎖フレームワーク領域、軽鎖CDR1領域、軽鎖CDR2領域、および、3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、または3B6-NSのCDR3から選択される軽鎖CDR3領域と、を有し、CD40に結合する抗CD40抗体を更に提供する。抗体は、抗体3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、または3B6-NSの重鎖CDR2および/または軽鎖CDR2を更に含んでもよい。抗体は、抗体3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、または3B6-NSの重鎖CDR1および/または軽鎖CDR1を更に含んでもよい。

改変された配列を有する抗体の作製

【0135】

別の実施形態では、本発明の抗CD40抗体の可変領域配列、またはその部分を改変することにより、結合性(すなわち、未改変の抗体と同一のエピトープとの)を保持し、したがって機能的に同等である、構造的に関連した抗CD40抗体が作製される。抗原結合性を除去することなく変化させることができる残基を同定する方法は、当該技術分野では周知のものである(例えば、Marks et al. (Biotechnology (1992) 10(7):779-83 (monoclonal antibodies diversification by shuffling light chain variable regions, then heavy chain variable regions with fixed CDR3 sequence change), Jespers et al. (1994) Biotechnology 12(9):899-903 (selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen), Sharon et al. (1986) PNAS USA 83(8):2628-31 (site-directed mutagenesis of an invariant amino acid

residue at the variable-diversity segment junction of an antibody); Casson et al. (1995) J. Immunol. 155(12):5647-54 (evolution of loss and change of specificity resulting from random mutagenesis of an antibody heavy chain variable regionを参照)。

【0136】

したがって、本発明の一態様では、上記に述べた操作された抗体のCDR1、2、および/または3領域は、本明細書に開示される抗体3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、または3B6-NSのものと正確に同じアミノ酸配列を有することができる。しかしながら、本発明の他の態様では、抗体は、3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、または3B6-NSの正確なCDR配列からの誘導体でありながら、CD40と効果的に結合する能力を依然、保持する誘導体を含む。そのような配列の改変には、1個または複数のアミノ酸の付加、欠失、または置換（例えば、上記に述べた保存的な配列の改変）が含まれる。配列の改変は、抗体3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、または3B6-NSの特定のCDR1、CDR2、およびCDR3配列について上記に述べたコンセンサス配列に基づいたものであってもよい。

10

【0137】

したがって、別の実施形態では、操作された抗体は、例えば、抗体3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、1B5-NK、または3B6-NSの1つまたはそれより多くのCDRと90%、95%、98%、または99.5%の同一性を有する1つまたはそれより多くのCDRで構成され得る。上記に記載の値の間の範囲、すなわち、上記の配列の1つまたはそれより多くと90~95%、95~98%、または98~100%の同一性を有するCDRも本発明に包含されるものとする。

20

【0138】

別の実施形態では、CDRの1つまたはそれより多くの残基を変えて結合性を改変することでより好ましい結合速度、より好ましい解離速度、またはその両方を実現して、理想的な結合定数を実現することができる。この手法を用いて、例えば、1010M-1またはそれより大きな超高結合アフィニティーを有する抗体を得ることができる。当該技術分野では周知であり、本明細書に記載のアフィニティー成熟技術を用いてCDR領域を変化させた後、得られた結合分子を所望の結合の変化についてスクリーニングすることができる。したがって、CDRを変化させる際に、結合アフィニティーの変化および免疫原性を監視してスコア評価することにより、結合性と低免疫原性とが最良に組み合わせられるように最適化された抗体を得ることができる。

30

【0139】

CDR内の改変に加えて、またはその代わりに、これらの改変が抗体の結合アフィニティーを消失させない限り、抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域のフレームワーク領域FR1、FR2、FR3、およびFR4の1つまたはそれより多くに改変を行うことも可能である。例えば、本発明の抗体の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域のフレームワーク領域内の1つまたはそれより多くの非生殖細胞系アミノ酸残基を、生殖細胞系アミノ酸残基（すなわち、抗体が有意な配列同一性を有するヒト生殖細胞系配列内の重鎖または軽鎖可変領域に対応するアミノ酸残基）と置換する。例えば、抗体鎖をその抗体鎖が有意な配列同一性を共有する生殖細胞系抗体鎖とアラインすることができ、抗体のフレームワーク配列と生殖細胞系鎖のフレームワークとの間で一致していないアミノ酸残基を生殖細胞系配列からの対応する残基と置換することができる。抗体の可変フレームワーク領域とこれに相当するヒト生殖細胞系配列の可変フレームワーク領域との間でアミノ酸が異なる場合、そのアミノ酸が以下のカテゴリーの1つに含まれると妥当に予想される場合に、通常は抗体のフレームワークのアミノ酸を相当するヒト生殖細胞系配列のアミノ酸と置換する。すなわち、

40

50

- (1) 抗原に直接非共有結合するアミノ酸残基、
- (2) C D R 領域に隣接したアミノ酸残基、
- (3) 他の形で C D R 領域と相互作用するアミノ酸残基 (例えば、コンピュータモデリングによって決定した場合に C D R 領域の約 3 ~ 6 以内)、または
- (4) V L - V H 界面に関与するアミノ酸残基。

【 0 1 4 0 】

「抗原に直接非共有結合する」残基には、例えば、水素結合、ファンデルワールス力、および疎水性相互作用などの確立された化学力によって抗原上のアミノ酸と高い確率で直接相互作用するフレームワーク領域内の位置のアミノ酸が含まれる。したがって、一実施形態では、本発明の抗体のフレームワーク領域内のアミノ酸残基を、抗原に直接非共有結合する対応する生殖細胞系アミノ酸残基と置換する。

10

【 0 1 4 1 】

「C D R 領域に隣接した」残基には、例えば、K a b a t によって定義された C D R または C h o t h i a によって定義された C D R に直接隣接する位置などの、抗体の一次配列中の 1 つまたはそれより多くの C D R に直接隣接した位置のアミノ酸残基が含まれる (例えば、C h o t h i a a n d L e s k J . M o l . B i o l . 1 9 6 : 9 0 1 (1 9 8 7) を参照) 。したがって、一実施形態では、本発明の抗体のフレームワーク領域内のアミノ酸残基を、C D R 領域に隣接した対応する生殖細胞系アミノ酸残基により置換する。

【 0 1 4 2 】

「他の形で C D R 領域と相互作用する」残基には、二次構造分析によって C D R 領域に影響を及ぼすのに十分な空間的配向にあると決定された残基が含まれる。かかるアミノ酸は、一般に、C D R 内の特定の原子の約 3 オングストローム単位 () 内に側鎖原子を有し、上記に挙げた化学力などの確立された化学力によって C D R の原子と相互作用することができる原子を含まなければならない。したがって、一実施形態では、本発明の抗体のフレームワーク領域内のアミノ酸残基を、他の形で C D R 領域と相互作用する、対応する生殖細胞系アミノ酸残基により置換する。

20

【 0 1 4 3 】

フレームワーク中のいくつかの位置のアミノ酸は、多くの抗体の C D R のコンフォメーション (例えば、C D R と相互作用することができる) を決定するうえで重要であることが知られている (C h o t h i a a n d L e s k , 前出 C h o t h i a e t a l . , 前出および T r a m o n t a n o e t a l . , J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 1 7 5 (1 9 9 0) , 当該文献をいずれも参照により本明細書に援用する) 。これらの著者によって、いくつかの既知の抗体の構造の分析により、C D R のコンフォメーションにとって重要な保存されたフレームワーク残基が同定されている。分析された抗体は、C D R のコンフォメーションに基づいて限られた数の構造的または「カノニカル (c a n o n i c a l) 」クラスに当てはまった。カノニカルクラスのメンバー内で保存されたフレームワーク残基を、「カノニカル」残基という。カノニカル残基には、軽鎖の残基 2、25、29、30、33、48、64、71、90、94、および 95、ならびに重鎖の残基 24、26、29、34、54、55、71、および 94 が含まれる。更なる残基 (例えば、C D R 構造決定残基) を、M a r t i n a n d T h o r t o n (1 9 9 6) J . M o l . B i o l . 2 6 3 : 8 0 0 に記載の方法にしたがって同定することができる。特に、軽鎖の 2 位、48 位、64 位、および 71 位ならびに重鎖の 26 ~ 30 位、71 位、および 94 位のアミノ酸 (K a b a t にしたがって番号付けしたもの) は、多くの抗体の C D R と相互作用することができることが知られている。軽鎖の 35 位と重鎖の 93 位および 103 位のアミノ酸も C D R と相互作用する可能性が高い。C D R のコンフォメーションに影響を及ぼし得る更なる残基を、F o o t e a n d W i n t e r (1 9 9 2) J . M o l . B i o l . 2 2 4 : 4 8 7 に記載の方法にしたがって同定することができる。かかる残基は「バーニア」残基と称され、C D R の基礎を与える (すなわち、C D R の「プラットフォーム」を形成する) フレームワーク領域中の残基であ

30

40

50

る。

【0144】

「VL-VH界面に関与する」残基,または「パッキング残基」には、例えば、Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985) またはChothia et al, 前出によって定義されたVLとVHとの間の界面の残基が含まれる。

【0145】

特定のアミノ酸が1つまたはそれより多くの上記のカテゴリーに当てはまるかどうかを幾分、不明確である場合がある。そのような場合、一方が特定の置換を有し、他方は有さない代替的な変異抗体を作製する。このようにして作製された代替的な変異抗体を、本明細書に記載されるアッセイのいずれかで所望の活性について試験し、好ましい抗体を選択することができる。

10

【0146】

フレームワーク領域内の置換の更なる候補として、ある抗体についてその位置では珍しい、すなわち「稀な」アミノ酸である。これらのアミノ酸を、ヒト生殖細胞系配列の相当する位置またはより一般的な抗体の相当する位置からのアミノ酸と置換することができる。例えば、抗体のフレームワーク領域内のアミノ酸がその位置で稀であり、生殖細胞系配列内の対応するアミノ酸が免疫グロブリン配列内のその位置において普通である場合、または、抗体内のアミノ酸がその位置で稀であり、生殖細胞系配列内の対応するアミノ酸も他の配列と比較してやはり稀である場合に置換を行うことが望ましい場合がある。稀なアミノ酸を、たまたま抗体で一般的である生殖細胞系配列からのアミノ酸と置換することにより、その抗体の免疫原性を低くすることができると考えられる。置換は、例えば対をなさないシステイン残基、または想定されるN結合型グリコシル化部位の場合にも望ましい場合がある。

20

【0147】

本明細書で使用するところの「稀な」なる用語は、代表的な配列試料中の配列の約20%未満、好ましくは約10%未満、より好ましくは約5%未満、更により好ましくは約3%未満、更により好ましくは約2%未満、更により好ましくは約1%未満においてその位置に存在するアミノ酸を示し、本明細書で使用するところの「普通な」なる用語は、代表的な試料中の配列の約25%超、通常は約50%超に存在するアミノ酸を示す。例えば、すべての軽鎖および重鎖可変領域の配列は、互いに特に相同であり、特定の重要な位置に同じアミノ酸を有する配列の「サブグループ」にそれぞれ分類される(Kabat et al, 前出)。ある抗体配列内のアミノ酸が配列間で「稀」であるかまたは「普通」であるかを決定する際、その抗体配列と同じサブグループの配列のみを考慮することがしばしば好ましい。

30

【0148】

一般に、抗体のフレームワーク領域は、それらが由来するヒト生殖細胞系配列のフレームワーク領域と通常は実質的に同一であり、より通常には同一である。いうまでもなく、フレームワーク領域内のアミノ酸の多くは、抗体の特異性またはアフィニティーに直接的にはほとんどまたはまったく寄与しない。したがって、フレームワーク残基の多くの個々の保守的置換は、得られる免疫グロブリンの特異性または親和性を大きく変化させることなく許容され得る。したがって、一実施形態では、抗体の可変フレームワーク領域は、ヒト生殖細胞系可変フレームワーク領域配列またはかかる配列のコンセンサス配列と少なくとも85%の配列同一性を共有する。別の実施形態では、抗体の可変フレームワーク領域は、ヒト生殖細胞系可変フレームワーク領域配列またはかかる配列のコンセンサス配列と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を共有する。

40

【0149】

抗体は、CD40に単純に結合する以外に、例えば以下のような本発明の抗体の他の機能性の保持について選択することができる。すなわち、

50

- (a) F c 受容体の結合とは無関係に免疫反応を誘導または促進すること、
- (b) C D 4 0 発現細胞の抗体依存性細胞傷害作用 (A D C C) を誘導することなく抗原に対する免疫反応を誘導または促進すること、
- (c) C D 4 0 発現細胞の補体依存性細胞傷害作用 (C D C) を誘導することなく抗原に対する免疫反応を誘導または促進すること、および / または
- (d) C D 4 0 L と相乗作用を示す能力。

【 0 1 5 0 】

更なる特徴としては、例えば、

- (e) F c 受容体の結合とは無関係にヒト C D 4 0 に対する C D 4 0 L の結合を阻害しない、
- (f) F c 受容体の結合とは無関係にヒト C D 4 0 に対する C D 4 0 L の結合を阻害する、
- (g) F c 受容体の結合とは無関係な A P C 上で発現されたヒト C D 4 0 の活性化、
- (h) 腫瘍細胞のアポトーシスの誘導、
- (i) T 細胞刺激活性、および / または
- (j) 促進された B 細胞活性化が挙げられる。

C D 4 0 に対するモノクローナル抗体の特徴付け

【 0 1 5 1 】

本発明のモノクローナル抗体は、さまざまな公知の技術を使用して C D 4 0 との結合性について特徴付けることができる。一般的に、抗体は最初に E L I S A によって特徴付けられる。簡単に言うと、精製した C D 4 0 を含む P B S でマイクロタイタープレートにコーティングした後、P B S で希釈したウシ血清アルブミン (B S A) などの無関係のタンパク質でブロッキングすることができる。C D 4 0 で免疫化したマウス由来の血漿の希釈物を各ウェルに添加し、3 7 °C で 1 ~ 2 時間インキュベートする。プレートを P B S / T w e e n 2 0 で洗浄してから、アルカリホスファターゼと結合させたヤギ抗ヒト I g G F c 特異的ポリクローナル試薬と 3 7 °C で 1 時間インキュベートする。洗浄後、プレートを A B T S 基質で発色させ、O D 4 0 5 で分析する。最も高い力価を生じるマウスを融合に使用することが好ましい。

【 0 1 5 2 】

上記に述べたような E L I S A アッセイを用いて抗体について、ひいては、C D 4 0 免疫原と正の反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングすることができる。次いで、好ましくは高いアフィニティーで C D 4 0 に結合するハイブリドーマをサブクローニングし、さらに特徴付けることができる。次いで、親細胞の反応性を保持する各ハイブリドーマから 1 個のクローン (E L I S A により) を、細胞バンクの作製および抗体精製のために選択することができる。

【 0 1 5 3 】

抗 C D 4 0 抗体を精製するには、選択したハイブリドーマを、回転ビン、2 L のスピナーフラスコ、または他の培養システムで増殖させることができる。上清を濾過し、濃縮した後、プロテイン A - S e p h a r o s e (P h a r m a c i a 社、ニュージャージー州ピスカタウェイ) を使用してアフィニティークロマトグラフィーを行ってタンパク質を精製することができる。P B S との緩衝液交換後、吸光係数 1 . 4 3 を用い、O D 2 8 0 で、または好ましくは比濁分析によって濃度を決定することができる。I g G は、ゲル電気泳動および抗原特異的方法によって確認することができる。

【 0 1 5 4 】

選択された抗 C D 4 0 モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかどうかを決定するために、各抗体を、市販の試薬 (P i e r c e 社、イリノイ州ロックフォード) を使用してビオチン化することができる。ビオチン化した M A b の結合を、ストレプトアビジン標識プローブで検出することができる。精製抗体のアイソタイプを決定するには、当該技術分野で認識されている方法を用いてアイソタイプ E L I S A を行うことができる。例えば、マイクロタイタープレートの各ウェルを、1 0 μ g / m l の抗 I g G で 4 °C で一晩コーティングすることができる。5 % B S A によるブロッキング後、プレートを 1 0 μ g /

10

20

30

40

50

m l のモノクローナル抗体または精製アイソタイプのコントロールと周囲温度で 2 時間反応させる。次いで、各ウェルを I g G l または他のアイソタイプ特異的結合体化プローブのいずれかと反応させることができる。上記に述べたようにプレートを発色させ、分析する。

【 0 1 5 5 】

C D 4 0 を発現する生細胞に対するモノクローナル抗体の結合を試験するには、フローサイトメトリーを使用することができる。簡単に言うと、膜結合 C D 4 0 を発現する細胞株および/またはヒト P B M C (標準的な培養条件下で増殖させたもの) を、 0 . 1 % B S A を含む P B S 中で異なる濃度のモノクローナル抗体と 4 で 1 時間混合する。洗浄後、細胞を、一次抗体染色と同じ条件下でフルオレセイン標識した抗 I g G 抗体と反応させる。各試料を光および側方散乱性を利用した F A C S c a n 装置により分析することで単一の細胞にゲーティングすることができ、標識抗体の結合性が測定される。蛍光顕微鏡法を用いた別のアッセイを、フローサイトメトリーアッセイ (に加えてまたはその代わりに) 使用することができる。細胞を上記に述べたのとまったく同様にして染色し、蛍光顕微鏡法により調べることができる。この方法は、個々の細胞を視覚化することが可能であるが、抗原の密度に依存して感度が低下し得る。

【 0 1 5 6 】

抗 C D 4 0 I g G を、ウェスタンブロッティングにより C D 4 0 抗原との反応性について更に試験することができる。簡単に言うと、C D 4 0 を発現する細胞からの細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけることができる。電気泳動後、分離した抗原をニトロセルロース膜に転写し、2 0 % マウス血清でブロッキングし、試験しようとするモノクローナル抗体でプロ - ビングする。抗 I g G アルカリホスファターゼを使用して I g G 結合を検出し、B C I P / N B T 基質タブレット (S i g m a C h e m . C o . 社、ミズーリ州セントルイス) により発色させることができる。

【 0 1 5 7 】

さまざまな抗 C D 4 0 抗体の結合アフィニティー、交差反応性、および結合反応速度の分析方法としては、例えば、実施例に述べられるような B i a c o r e (商標) 2 0 0 0 S P R 装置 (B i a c o r e A B 社、スウェーデン、ウプサラ) を用いた B i a c o r e (商標) 表面プラズモン共鳴 (S P R) 分析、または O c t e t (登録商標) Q K e 装置を用いたバイオレイヤー干渉法 (B L I) などの当該技術分野では周知の標準的なアッセイが含まれる。

抗 C D 4 0 抗体 3 C 3 、 3 G 5 、 1 B 4 、 3 B 6 、 6 H 6 、 2 E 1 . 2 、 1 B 5 - N K 、 および 3 B 6 - N S と同じエピトープに結合するアゴニスト抗 C D 4 0 抗体 (特定のエピトープマッピング法により決定される) も本明細書において提供される。例えば、実施例 1 7 に述べられるように、本発明の抗体 (例えば抗体 3 C 3) は、ヒト C D 4 0 の細胞外ドメイン (E C D) (配列番号 1 3 3) のアミノ酸残基 1 ~ 5 および 3 3 ~ 3 6 内の 1 つまたはそれより多くの残基、例えばヒト C D 4 0 の E C D (配列番号 1 3 3) のアミノ酸 5 、 3 3 、 3 4 、 および/または 3 6 に結合する。抗体 3 C 3 は、ヒト C D 4 0 の E C D (配列番号 1 3 3) の 1 つまたはそれより多くのアミノ酸 2 6 、 3 8 、 および/または 3 0 、 例えばヒト C D 4 0 の E C D (配列番号 1 3 3) のアミノ酸 5 、 3 3 、 3 4 および 3 6 、 またはヒト C D 4 0 の E C D (配列番号 1 3 3) のアミノ酸残 5 、 3 3 および 3 6 に更に結合することも示されている。

【 0 1 5 8 】

本発明の他の抗体 (例えば抗体 3 G 5) は、ヒト C D 4 0 の E C D (配列番号 1 3 3) のアミノ酸残基 1 3 ~ 1 5 および 3 3 ~ 3 6 内の 1 つまたはそれより多くの残基、例えばヒト C D 4 0 の E C D (配列番号 1 3 3) のアミノ酸 3 3 、 3 4 、 および 3 6 に結合する。

【 0 1 5 9 】

本明細書に記載のヒト C D 4 0 上のエピトープ (例えば例示される抗体と同じエピトープ) に結合する抗体は、治療的に有用な性質を示す。例えば、実施例 1 6 および 2 0 に示さ

10

20

30

40

50

れるように、抗体 3 C 3 は、例えば、R a m o s 細胞とインキュベートした場合の C D 9 5 の発現の誘導の増大、ヒト B 細胞とインキュベートした場合の B 細胞増殖の増大、および / または樹状細胞とインキュベートした場合の I L 1 2 p 4 0 の発現の誘導の増大によって測定される可溶性 C D 4 0 リガンド (s C D 4 0 L) と相乗的アゴニスト作用を示す。
【 0 1 6 0 】

したがって、3 C 3 と同じエピトープに結合する抗体は、ヒト C D 4 0 のリガンド結合部位に結合するものを含む他の治療剤と相乗作用を示す能力を有する。代表的な相乗作用としては、例えば、免疫機能のアップレギュレーション (例えばワクチン療法における T 細胞媒介性免疫反応、癌治療における N K 活性化など)、細胞増殖の阻害 (例えば癌治療における)、および / または A P C による抗原のプロセッシングおよび提示の促進 (例えばワクチン療法における) が挙げられる。

10

【 0 1 6 1 】

本明細書に記載されるように、本明細書に記載の抗体と「C D 4 0 上の同じエピトープ」に結合する抗体を決定するための手法としては、例えば、エピトープの原子分解能を与える、抗原：抗体複合体の結晶の X 線分析などのエピトープマッピング法が挙げられる。他の方法としては、抗原フラグメントまたは抗原の突然変異体に対する抗体の結合を観察するものがあり、抗原配列内のアミノ酸残基の変化による結合の消失が、エピトープ要素の指標としばしばみなされる。更に、エピトープマッピング用の計算コンビナトリアル法を用いることもできる。方法は、コンビナトリアルファージディスプレイライブラリーから特異的な短鎖ペプチド (天然の 3 次元形態、または変性した形態の) をアフィニティー単離する、対象とする抗体の能力に基づいたものとすることもできる。そのため、これらのペプチドは、ペプチドライブラリーをスクリーニングするために用いられる抗体に対応したエピトープを定義するための手掛かりとみなされる。エピトープマッピングでは、コンフォメーション的に不連続なエピトープをマッピングできることが示されている計算アルゴリズムも開発されている。

20

I I . 分子結合体 / 免疫毒素

【 0 1 6 2 】

本発明は、A P C 上の受容体に結合する抗体、例えば C D 4 0 に結合する抗体に連結された腫瘍抗原またはウイルス抗原などの抗原を含む、さまざまな治療的分子結合体 (例えばワクチン結合体) を提供する。これにより、C D 4 0 を発現する細胞 (例えば、樹状細胞、B 細胞、およびマクロファージ) などの A P C にこの抗原をターゲティングして、抗原に対するプロセッシング、提示、および最終的には免疫応答を促進することができる。かかる結合体の概略図を図 1 8 に示す。図 1 8 では、例えば抗原は、実質的に完全な抗 C D 4 0 抗体の各重鎖の C H 3 ドメインに遺伝子的に融合されている。しかしながら、以下でさらに検討されるように、これに代えて、抗原をかかると抗体またはそのフラグメントの他の部分に連結してもよく、化学結合などの他の形の結合を利用することもできる点は認識されよう。

30

【 0 1 6 3 】

本発明での使用に適した抗原としては、例えば、それらに対する予防的または治療的免疫反応が望ましい感染症抗原および腫瘍抗原、例えば、腫瘍細胞または病原性生物によって発現される抗原もしくは感染症抗原が含まれる。例えば、適当な抗原としては、癌の予防または治療のための腫瘍関連抗原が挙げられる。腫瘍関連抗原の例としては、これらに限定されるものではないが、h C G、g p 1 0 0 または P m e 1 1 7、H E R 2 / n e u、W T 1、メソテリン、C E A、g p 1 0 0、M A R T 1、T R P - 2、メラニン A、N Y - E S O - 1、N Y - B R - 1、N Y - C O - 5 8、M N (g p 2 5 0)、イディオタイプ、M A G E - 1、M A G E - 3、M A G E - A 3、チロシナーゼ、テロメラナーゼ、S S X 2 および M U C - 1 抗原、ならびに生殖細胞由来腫瘍抗原の配列の全体または一部を含む配列が挙げられる。腫瘍関連抗原には、例えば L e ^a、L e ^b、L e X、L e Y、H 2、B 1、B 2 抗原などの血液型抗原も含まれる。また、複数の抗原が、本発明の抗原抗体コンストラクトに含まれてもよい。例えば、M A G E 抗原を、メラニン A、チロシナー

40

50

ぜ、および gp100 などの他の抗原、ならびに GM-CSF または IL-12 などのアジュバントと組み合わせて、抗 APC 抗体に結合させることができる。

【0164】

他の適当な抗原としては、ウイルス性疾患の予防および治療用のウイルス抗原が挙げられる。ウイルス性抗原の例としては、これらに限定されるものではないが、HIV-1 gag、HIV-1 env、HIV-1 nef、HBV（表面またはコア抗原）、HPV、FAS、HSV-1、HSV-2、p17、ORF2 および ORF3 抗原が挙げられる。細菌抗原の例としては、これらに限定されるものではないが、トキソプラズマ原虫（*Toxoplasma gondii*）または梅毒トレポネーマ（*Treponema pallidum*）が挙げられる。本発明の抗体細菌抗原結合体は、炭疽、ボツリヌス症、破傷風、クラミジア、コレラ、ジフテリア、ライム病、梅毒、および結核などの各種の細菌性疾患の治療または予防に使用することができる。

10

【0165】

上記の抗原の配列は当該技術分野では周知のものである。例えば、MAGE-3 cDNA 配列の例は米国特許第 6,235,525 号（Ludwig Institute for Cancer Research）に記載されており、NY-ESO-1 核酸配列およびタンパク質配列の例は米国特許第 5,804,381 号および米国特許第 6,069,233 号（Ludwig Institute for Cancer Research）に記載されており、メラニン-A 核酸配列およびタンパク質配列の例は米国特許第 5,620,886 号および米国特許第 5,854,203（Ludwig Institute for Cancer Research）に記載されており、NY-BR-1 核酸配列およびタンパク質配列の例は米国特許第 6,774,226 号および米国特許第 6,911,529 号（Ludwig Institute for Cancer Research）に記載されており、NY-CO-58 核酸配列およびタンパク質配列の例は国際公開第 WO02090986 号（Ludwig Institute for Cancer Research）に記載されており、HER-2/neu タンパク質のアミノ酸配列の例は GENBANK（登録商標）アクセッション番号 AAA58637 として入手可能であり、ヒト癌胎児性抗原様 1（CEA-1）のヌクレオチド配列（mRNA）は GENBANK（登録商標）アクセッション番号 NM_020219 として入手可能である。

20

【0166】

一実施形態では、抗原は、例えば、HPV-16 抗原、HPV-18 抗原、HPV-31 抗原、HPV-33 抗原、および/または HPV-35 抗原などの HPV 抗原である。HPV-16 のゲノムについては、Virology, 145: 181-185 (1985) に記載されており、HPV-18 をコードする DNA 配列については米国特許第 5,840,306 号に記載されており、これらの開示内容をその全容にわたって参照により本明細書に援用する。HPV-16 抗原（例えば、HPV-16 の E1 および/または E2 タンパク質の血清反応領域）については米国特許第 6,531,127 号に記載されており、HPV-18 抗原（例えば、HPV-18 の L1 および/または L2 タンパク質の血清反応領域）については米国特許第 5,840,306 号に記載されており、これらの開示内容をその全容にわたって参照により本明細書に援用する。同様に、HBV の完全なゲノムは、その開示内容を本明細書に援用するところの GENBANK（登録商標）アクセッション番号 NC_003977 で入手可能である。HCV のゲノムについては、その開示内容を本明細書に援用するところの欧州特許出願第 318 216 号に記載されている。その開示内容を参照により本明細書に援用するところの国際特許出願第 PCT/US90/01348 号は、HCV ゲノムのクローンの配列情報、HCV ウイルスタンパク質のアミノ酸配列、ならびに HCV タンパク質およびこれに由来するペプチドを含む HCV ワクチン用のかかる組成物の製造および使用方法について開示している。

30

40

【0167】

タンパク質の抗原ペプチド（すなわち、T 細胞エピトープを含むもの）は、当該技術分野では周知の様々な方法で同定することができる。例えば、ウェブベースの予測アルゴリズム

50

ム (B I M A S および S Y F P E I T H I) を使用してタンパク質配列を分析することで、これまでに C T L により定義されている 10,000 種類の十分に特徴付けされた M H C 結合ペプチドの内部データベースに一致する潜在的な M H C クラス I および I I 結合ペプチドを得ることによって T 細胞エピトープを予想することができる。スコアが高かったペプチドをランク付けし、特定の M H C 分子に対する高いアフィニティーに基づいて「興味深いペプチド」として選択することができる。

【0168】

T 細胞エピトープを含む抗原ペプチドの別の同定方法は、組換えにより、合成により、または特定の限定的条件下では、タンパク質の化学的切断により、生成することができる所望の長さの重複しないペプチドまたは所望の長さの重複するペプチドにタンパク質を分割し、免疫原性、例えば、T 細胞の応答の誘導（すなわち、増殖またはリンホカイン分泌）について試験することを含む。

10

【0169】

例えば、精密マッピング技術によってタンパク質の正確な T 細胞エピトープを決定するには、T 細胞の生物学的手法により決定した場合に T 細胞刺激活性を有し、したがって少なくとも 1 つの T 細胞エピトープを含むペプチドを、ペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかにアミノ酸残基を付加するかまたは欠失させることによって改変し、試験を行って改変ペプチドに対する T 細胞反応性の変化を決定することができる。天然タンパク質配列中の重複領域を共有する 2 つまたはそれより多くのペプチドが、T 細胞の生物学的手法により決定した場合にヒト T 細胞刺激活性を有することが見出された場合、かかるペプチドの全体または一部を含む更なるペプチドを生成し、これらの更なるペプチドを同様の手順によって試験することができる。この手法の後、ペプチドを選択し、組換えまたは合成により生成する。ペプチドは、ペプチドに対する T 細胞応答の強度（例えば、刺激指数）を含む異なる因子に基づいて選択される。次いで、これらの選択されたペプチドの物理的および化学的性質（例えば、溶解性、安定性）を調べることでペプチドが治療組成物における使用に適しているかどうか、またはペプチドに改変が必要かどうかを判定することができる。

20

【0170】

更に、ワクチン結合体は、やはり抗原に対する免疫反応を促進する 1 種またはそれより多くの免疫賦活剤を含むことができる。本発明の抗体抗原ワクチン結合体は、遺伝子的にまたは化学的に作製することができる。いずれの場合も、結合体の抗体部分は、全抗体または F a b フラグメントもしくは一本鎖 F v のような抗体の部分で構成することができる。更に、複数の抗原および / または免疫賦活剤が結合体に含まれてもよい。

30

【0171】

化学的に構築された抗体抗原結合体は、各種の周知の容易に入手可能な架橋剤を使用して作製することができる。これらの架橋剤は、抗樹状細胞抗体および選択された抗原上の異なる反応性アミノ酸または炭水化物側鎖と共有結合を形成する (N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオナート (S P D P) 、 N - スクシンイミジル - S - アセチル - チオアセタート (S A T A) 、 スルホスクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシラート (スルホ - S M C C) 、 5 , 5 ' - ジチオビス (2 - ニトロ安息香酸) (D T N B) などのホモ官能性またはヘテロ官能性化合物であってよい。プロテイン A 、 カルボジイミド、および o - フェニレンジマレイミド (o P D M) などの他のカップリング剤および架橋剤を使用して共有結合を生成することもできる (例えば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160 : 1686 ; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 8648 を参照) 。他の方法としては、Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78 , 118 - 132) 、 Brennan et al. (Science (1985) 229 : 81 - 83) 、 および Glennie et al. (J. Immunol. (1987) 139 : 2367 - 2375) に記載されるものが挙げられる。好ましい結合化

40

50

剤は、いずれも Pierce Chemical Co 社（イリノイ州ロックフォード）より販売される S A T A および スルホ - S M C C である。免疫賦活薬を、上記に述べたのと同じ連結方法を用いて本発明の分子結合体に化学的に連結することもできる。

【 0 1 7 2 】

別の実施形態では、本発明の抗体は、細胞毒素、薬物、または放射性同位体などの治療部分に連結される。細胞毒素と結合される場合、これらの抗体結合体は「免疫毒素」と呼ばれる。細胞毒素または細胞毒性剤には、細胞に有害な（例えば、殺滅する）任意の薬剤が含まれる。例として、タキソール、サイトカラシン B、グラミシジン D、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1 - デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにその類似体またはホモログが含まれる。治療薬としては、これらに限定されるものではないが、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラビン、5 - フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（B S N U）およびロムスチン（C C N U）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C、および c i s - ジクロロジアミン白金（I I）（D D P）シスプラチン）、アントラサイクリン類（例えば、ダウノルピシン（以前のダウノマイシン）およびドキソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（A M C）など）、ならびに有糸分裂阻害剤（例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン）が挙げられる。本発明の抗体を、例えば放射性ヨウ素などの放射性同位体と結合させることで自己免疫疾患または炎症性疾患などの樹状細胞関連疾患、または移植片対宿主疾患を治療するための細胞傷害性放射性医薬品を生成することができる。

【 0 1 7 3 】

本発明の抗体結合体を使用して特定の生物学的反応を改変することができるが、薬剤部分は古典的な化学治療薬に限定されるものと解釈されるべきではない。例えば、薬剤部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドとすることができる。かかるタンパク質としては、例えば、アブリン、リシン A、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素などの酵素活性毒素または活性を有するそのフラグメント；腫瘍壊死因子またはインターフェロン - などのタンパク質；または、例えば、リンホカイン、インターロイキン - 1（I L - 1）、インターロイキン - 2（I L - 2）、インターロイキン - 6（I L - 6）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）、顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）、または他の増殖因子などの生物反応調節物質を挙げることができる。

【 0 1 7 4 】

かかる治療部分を抗体と結合する技術は周知のものである（例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243 - 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623 - 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical

cal Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475 - 506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303 - 16 (Academic Press 1985), および Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody - Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119 - 58 (1982)を参照)。

10

III. 組成物

【0175】

別の実施形態では、本発明は、組成物、例えば、担体（例えば、薬学的に許容される担体）とともに製剤化した本発明のモノクローナル抗体の1つまたは組み合わせを含む組成物を提供する。本発明の抗体を含む二重特異的分子を含む組成物も提供される。一実施形態では、組成物は、複数の（例えば、2種またはそれより多くの）本発明の単離抗体の組み合わせを含む。好ましくは、組成物の抗体のそれぞれは、CD40の予め選択された異なるエピトープに結合する。

【0176】

本発明の薬学的組成物を、併用療法として（すなわち、他の薬剤と組み合わせて）投与することもできる。例えば、併用療法は、本発明の組成物を、抗炎症剤、DMARD（疾患修飾性抗リウマチ薬）、免疫抑制剤、および化学療法剤などの少なくとも1つまたはそれより多くの更なる治療薬とともに含むことができる。本発明の医薬組成物は、放射線治療と組み合わせて投与することもできる。他の抗体との同時投与も本発明に包含される。

20

【0177】

本明細書で使用するところの「担体」および「薬学的に許容される担体」なる用語としては、生理学的適合性を有する任意およびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられる。担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄、または上皮投与（例えば、注射または注入による）に適したものであることが好ましい。投与経路に応じて、活性化化合物（すなわち、抗体、二重特異性分子、および多重特異性分子）を、材料中にコーティングして、化合物を不活化し得る酸および他の自然条件の作用から化合物を保護することができる。

30

【0178】

本発明の抗体およびコンストラクトとともに使用することができるアジュバントの例としては、フロイント不完全アジュバントおよび完全アジュバント（Difco Laboratories社、ミシガン州、デトロイト）；Merckアジュバント65（Merck and Company, Inc.社、ニュージャージー州、ラーウェイ）；AS-2（SmithKline Beecham社、ペンシルベニア州、フェラデルフィア）；アルミニウム塩（水酸化アルミニウムゲル（ミョウバン）またはリン酸アルミニウムなど）；カルシウム、鉄、または亜鉛の塩；アシル化チロシンの不溶性懸濁液；アシル化糖；カチオンまたはアニオン性誘導体化多糖類；ポリホスファゼン；生分解性マイクロスフィア；GM-CSF、インターロイキン-2、-7、-12、および他の同様の因子などのサイトカイン類；3D-MPL；CpGオリゴヌクレオチド；およびモノホスホリル脂質A（例えば、3-デ-0-アシル化モノホスホリル脂質A）が挙げられる。

40

【0179】

MPLアジュバントは、Corixa Corporation社（ワシントン州、シアトル、例えば米国特許第4,436,727号、同第4,877,611号、同第4,866,034号、および同第4,912,094号を参照）より販売されている。CpG含有オリゴヌクレオチド（CpGジヌクレオチドがメチル化されていない）が周知であり、例えば、国際公開第WO96/02555号、同第WO99/33488号、および米

50

国特許第6,008,200号および同第5,856,462号に記載されている。免疫賦活剤のDNA配列も、例えば、Sato et al., Science 273:352, 1996に記載されている。

【0180】

更なる別のアジュバントには、例えば、サポニン(Quil Aまたはその誘導体(QS 21およびQS7(Aquila Biopharmaceuticals Inc.社、マサチューセッツ州、フラミンガム)が含まれる); エスチン; ジギトニン; またはカスミソウもしくはキノアのサポニンなど); モンタニドISA 720(Seppic社、フランス); SAF(Chiron社、米国、カリフォルニア州); ISCOMS(CSL社)、MF-59(Chiron社); SBASシリーズのアジュバント(例えば、SBAS-2またはSBAS-4、SmithKline Beecham社、ベルギー、リクセンサルより販売されるもの); Detox(Enhanceyn(商標))(Corixa社、モンタナ州、ハミルトン); RC-529(Corixa社、モンタナ州、ハミルトン)、および他のアミノアルキルグルコサミニド4-リン酸(AGP); 国際公開第WO99/52549A1号に記載のものなどのポリオキシエチレンエーテルアジュバント; 合成イミダゾキノリン(イミキモド[S-26308、R-837](Harrison, et al., Vaccine 19: 1820-1826, 2001)); およびレシキモド[S-28463、R-848](Vasilakos, et al., Cellular immunology 204: 64-74, 2000); ツカレソールなどの抗原提示細胞およびT細胞の表面上で構成的に発現されるカルボニルおよびアミンのシッフ塩基(Rhodes, J. et al., Nature 377: 71-75, 1995); タンパク質またはペプチドとしてのサイトカイン、ケモカイン、および共刺激分子(例えば、炎症促進性サイトカイン(インターフェロン、GM-CSF、IL-1、IL-1、TGF-、およびTGF- など)、Th1インデューサー(インターフェロン、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、およびIL-21など)、Th2インデューサー(IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、およびIL-13など)、ならびに他のケモカインおよび共刺激遺伝子(MCP-1、MIP-1、MIP-1、RANTES、TCA-3、CD80、CD86、およびCD70など)が含まれる); 免疫賦活剤ターゲティングリガンド(CTLA-4およびL-セレクトリンなど)、アポトーシス刺激タンパク質およびペプチド(Fasなど); 合成脂質ベースのアジュバント(バックスフェクチン(Reyes et al., Vaccine 19: 3778-3786, 2001)、スクアレン、 α -トコフェロール、ポリソルベート80、DOPC、およびコレステロールなど); 内毒素、[LPS](Beutler, B., Current Opinion in Microbiology 3: 23-30, 2000); Toll受容体を誘導してTh1誘導性サイトカインを産生させるリガンド(合成微生物リポタンパク質、微生物タンパク質p19、ペプチドグリカン、テイコ酸、および脂質Aなど); およびCT(コレラ毒素のサブユニットAおよびB)およびLT(大腸菌由来の熱不安定性エンテロトキシンのサブユニットAおよびB)、熱ショックタンパク質ファミリー(HSP)、およびLLO(リステリオリシンO; 国際公開第WO01/72329号)が挙げられる。これらおよびさまざまな更なるToll様受容体(TLR)アゴニストが、例えば、Kanzler et al., Nature Medicine, May 2007, Vol 13, No 5に記載されている。本発明の抗CD40抗体と併用される好ましい免疫賦活剤は、Poly I:CなどのTLR3アゴニストである。

【0181】

「薬学的に許容される塩」は、親化合物の所望の生物学的活性を保持し、かついかなる望ましくない毒物学的作用ももたらさない塩のことを言う(例えば、Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照)。かかる塩の例としては、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、および亜リン酸などの非毒性

10

20

30

40

50

無機酸、ならびに、脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などの非毒性有機酸から誘導される酸付加塩が挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、およびカルシウムなどのアルカリ土類金属、ならびにN, N' - ジベンジルエチレンジアミン、N - メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、およびプロカインなどの非毒性有機アミンから誘導される塩基付加塩が含まれる。

【0182】

本発明の組成物は、当該技術分野では周知のさまざまな方法によって投与することができる。当業者には認識されるように、投与経路および/または形態は、所望の結果に応じて変わる。活性化合物は、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系をはじめとする徐放製剤などの、化合物を急速な放出から保護する担体を用いて製剤化することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような、生分解性生体適合性ポリマーを使用することができる。かかる製剤を調製する方法は特許が取得されているか、または一般的に当業者には周知のものである。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0183】

特定の投与経路によって本発明の化合物を投与するため、その不活化を防止するための物質で化合物をコーティングするか、かかる物質と化合物を同時投与する必要がある場合がある。例えば、化合物を、リポソームなどの適当な担体または希釈剤中で対象に投与することができる。薬学的に許容される希釈剤としては、生理食塩水および水性緩衝液が挙げられる。リポソームとしては、水中油中水型CGFエマルジョンおよび従来のリポソームが挙げられる(Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27)。

【0184】

担体には、滅菌注射液または注射懸濁液の即時調製のための滅菌水溶液または分散液および滅菌粉末が含まれる。薬学的に活性な物質用のかかる媒質および剤の使用は当該技術分野では周知のものである。いずれかの従来の媒質または剤が活性化合物と不適合性である場合以外は、本発明の医薬組成物中でのその使用が考えられる。補助的な活性化合物を組成物に添加することもできる。

【0185】

治療組成物は、通常、製造および保存条件下で無菌かつ安定でなければならない。組成物を、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬剤濃度に適した他の規則的構造として配合することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)およびそれらの適当な混合物を含む溶媒または分散媒とすることができる。例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合の必要な粒径の維持、および界面活性剤の使用によって適切な流動性を維持することができる。多くの場合、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に加えることが好ましい。例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンなどの吸収を遅延させる剤を組成物に加えることによって注射用組成物の吸収を遅延させることができる。

【0186】

必要な量の活性化合物を適切な溶媒中に、必要に応じて上記に列挙した成分の1つまたは組み合わせとともに加えた後、滅菌精密濾過を行うことによって滅菌注射液を調製することができる。一般的に、分散液は、塩基性分散媒および上記に列挙したものからの必要な他の成分を含む滅菌ビヒクルに活性化合物を添加することによって調製される。滅菌注射液の調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥およびフリーズドライ(凍

10

20

30

40

50

結乾燥)であり、予め滅菌濾過したその溶液から有効成分および任意の更なる所望の成分の粉末が得られる。

【0187】

投薬レジメンは、最適な所望の反応(例えば、治療反応)が得られるように調整される。例えば、単回ボースを投与するか、複数の分割された用量を一定期間にわたって投与するか、または治療状況の必要性により示されるように用量を比例して減らすかまたは増やすことができる。例えば、本発明の抗体は、週1回または2回、皮下または筋肉内注射により投与するか、または月1回または2回、皮下または筋肉内注射により投与することができる。

【0188】

投与の容易さおよび用量の均一性から、非経口組成物は単位剤形として配合することが特に有利である。本明細書で使用するところの単位剤形とは、治療される対象の単位用量として適当な物理的に個別の単位のことを言い、各単位は、所望の治療効果が得られるように計算された所定量の活性化合物を必要な医薬担体とともに含む。本発明の単位剤形の仕様は、(a)活性化合物の固有の特性および得ようとする特定の治療効果、ならびに(b)個人の感受性を治療するためのかかる活性化合物の調合技術に特有の制限によって規定され、これらに直接依存する。

【0189】

薬学的に許容される抗酸化剤の例としては、(1)アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、および亜硫酸ナトリウムなどの水溶性酸化防止剤、(2)パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、および α -トコフェロールなどの脂溶性酸化防止剤、ならびに(3)クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、およびリン酸などの金属キレート剤が挙げられる。

【0190】

治療組成物では、本発明の製剤には、経口、鼻腔内、局所(口内および舌下が含まれる)、直腸、腔内および/または非経口投与に適した製剤が含まれる。かかる製剤は単位剤形として便宜よく提供することができ、薬学分野では周知の任意の方法によって調製することができる。担体材料と組み合わせて単回剤形を与えることができる有効成分の量は、治療される対象、および特定の投与様式に応じて異なる。担体材料と組み合わせることで単回剤形を与えることができる有効成分の量は、一般的に治療効果を与える組成物の量である。一般的に、100%のうち、この量は、約0.001%~約90%の有効成分、好ましくは約0.005%~約70%、最も好ましくは約0.01%~約30%の範囲である。

【0191】

腔内投与に適した本発明の製剤には、当該技術分野で適切であることが知られている担体を含むペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム、またはスプレー製剤も含まれる。本発明の組成物の局所または経皮投与用の剤形としては、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ、および吸入剤が含まれる。活性化合物を、薬学的に許容される担体、および必要とされ得る任意の防腐剤、緩衝液、または噴射剤と滅菌条件下で混合することができる。

【0192】

本明細書で使用するところの「非経口投与」および「非経口で投与する」なる語句は、腸内および局所投与以外の投与様式(通常、注射による)を意味し、これらに限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨内への注射および注入が含まれる。

【0193】

本発明の医薬組成物に使用することができる適当な水性および非水性の担体の例としては、水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、およびポリエチレングリコールなど)、およびそれらの適当な混合物、オリーブ油などの植物油、ならび

10

20

30

40

50

にオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが含まれる。例えばレシチンなどのコーティング物質の使用、分散液の場合には必要な粒径の維持、および界面活性剤の使用によって適当な流動性を維持することができる。

【0194】

これらの組成物は、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などの補助剤を含むこともできる。微生物の存在を、滅菌法（前出）ならびに各種抗細菌および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、およびフェノールソルビン酸など）を添加することによって確実に防止することができる。糖および塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に含有させることが望ましい場合もある。更に、注射可能な医薬剤形の吸収を、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる薬剤を添加することによって遅延させることができる。

10

【0195】

本発明の化合物を医薬品としてヒトおよび動物に投与する場合、本発明の化合物は、単独で投与するか、例えば、0.001～90%（より好ましくは、0.005～70%（0.01～30%など））の有効成分を薬学的に許容される担体と組み合わせて含む医薬組成物として投与することができる。

【0196】

選択される投与経路とは無関係に、適当な水和形態で使用する事ができる本発明の化合物および/または本発明の医薬組成物は、当業者には周知の従来の方法によって薬学的に許容される剤形として製剤化される。

20

【0197】

本発明の医薬組成物中の有効成分の実際の用量を変えることで、患者に毒性を示すことなく、特定の患者に望ましい治療反応、組成物、および投与様式を実現するうえで有効な有効成分の量を得ることができる。選択される用量は、使用される本発明の特定の組成物、そのエステル、またはアミドの活性、投与経路、投与期間、使用される特定の化合物の排泄率、治療期間、使用される特定の組成物と併用される他の薬剤、化合物、および/または材料、治療を受ける患者の年齢、性別、体重、状態、一般的健康状態、および病歴、ならびに医療分野では周知の同様の要因を含む、各種の薬物動態学的要因に依存する。当該技術分野における通常の技術を有する医師または獣医師であれば、必要な医薬組成物の有効量を容易に決定し、処方することができる。例えば、医師または獣医師は、医薬組成物中に使用される本発明の化合物の用量を、所望の治療効果を得るために必要な量より低い量で開始し、所望の効果が得られるまで用量を段階的に増加させることができる。一般的に、本発明の組成物の適当な日用量は、治療効果を得るのに有効な最も低い用量である化合物の量である。かかる有効用量は、一般的に上記に述べた要因によって決まる。投与は静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下であることが好ましく、標的部に近接して投与されることが好ましい。必要な場合、治療組成物の有効な日用量を、必要に応じて単位剤形で1日を通じて適当な間隔で別々に投与される2回、3回、4回、5回、6回、またはそれよりも多い分割用量として投与することができる。本発明の化合物は単独で投与することが可能であるが、化合物は医薬製剤（組成物）として投与されることが好ましい。

30

【0198】

治療組成物は、当該技術分野では周知の医療器具により投与することができる。例えば、好ましい一実施形態では、本発明の治療組成物を、例えば米国特許第5,399,163号、同第5,383,851号、同第5,312,335号、同第5,064,413号、同第4,941,880号、同第4,790,824号、または同第4,596,556号に開示される器具などの無針皮下注射器具を使用して投与することができる。本発明で有用な周知のインプラントおよびモジュールの例としては、米国特許第4,487,603号（制御された速度で薬剤を吐出するための埋め込み式微小注入ポンプを開示）；米国特許第4,486,194号（皮膚を通じて薬物を投与するための治療器具を開示）；米国特許第4,447,233号（正確な注入速度で薬物を送達するための薬物注入ポンプを開示）；米国特許第4,447,224号（連続的な薬物送達のための可変流量埋め

40

50

込み式注入装置を開示)；米国特許第4,439,196号(多室隔室を有する浸透圧薬剤送達システムを開示)；および米国特許第4,475,196号(浸透圧薬剤送達システムを開示)が挙げられる。多くの他のこうしたインプラント、送達システム、およびモジュールが当業者に知られている。

【0199】

特定の実施形態では、本発明の抗体を、インビボで適切に分配されるように製剤化することができる。例えば、血液脳関門(BBB)は多くの高親水性化合物を排除する。本発明の治療化合物をBBBを通過させるために(必要な場合)、治療化合物を例えばリポソームとして製剤化することができる。リポソームの製造方法については、例えば、米国特許第4,522,811号；同第5,374,548号；および同第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または器官に選択的に輸送されることでターゲティングされた薬物送達を促進する1つまたは複数の部分を有することができる(例えば、V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照)。例示的なターゲティング部分には、葉酸塩またはビオチン(例えば、Lowらに付与された米国特許第5,416,016号を参照)；マンノシド(Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038)；抗体(P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140；M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180)；界面活性剤プロテインA受容体(Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134)が挙げられ、これらのうちの異なる種が、本発明の製剤および本発明の分子の成分を構成し得る；p120 (Schrier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090)；K. Keinänen；M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123；J.J. Killian；I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273も参照されたい)。本発明の一実施形態では、本発明の治療化合物はリポソームとして製剤化され、より好ましい実施形態ではリポソームはターゲティング部分を含む。最も好ましい実施形態では、リポソーム中の治療化合物は、腫瘍または感染の近くの部位にボーラス注射により送達される。組成物は、容易に注射器で利用できる程度の流動性を有する必要がある。組成物は、製造および保存条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。

【0200】

化合物が癌を阻害する能力を、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系で評価することができる。また、組成物のこのような性質を、当業者には周知のアッセイにより化合物の阻害能力(in vitroでのかかる阻害)を調べることによって評価することができる。治療有効量の治療化合物は、対象における腫瘍サイズを減少させることができるか、または他の形で症状を改善することができる。当業者であれば、対象のサイズ、対象の症状の重症度、および選択される特定の組成物または投与経路などの要因に基づいてかかる量を決定することが可能である。

【0201】

組成物は無菌でなければならず、また、組成物を注射器で送達することができる程度の流動性を有さなければならない。担体は、水以外に、等張緩衝生理食塩水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、およびそれらの適当な混合物とすることができる。例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合の必要な粒径の維持、および界面活性剤の使用によって適切な流動性を維持することができる。多くの場合、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に加えることが好ましい。例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチンなどの吸収を遅延させる剤を組成物に加えることによって注射用組成物の長期的吸収をもたらすことがで

10

20

30

40

50

きる。

【0202】

上記に述べたように活性化化合物が適当に保護される場合、化合物を例えば不活性希釈剤または同化可能な食用担体とともに経口投与することができる。

IV. 本発明の使用および方法

【0203】

本発明の抗体、分子結合体、二重特異性分子、および組成物は、さまざまな疾患および状態を治療および/または予防（例えば、それらに対する免疫化を行う）するために使用することができる。

【0204】

原発性疾患の適応症の1つは癌である。癌の種類としては、これらに限定されるものではないが、白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、骨髄芽球、前骨髄球、骨髄単球性、単球性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性（顆粒性）白血病、慢性リンパ球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫および辺縁帯B細胞リンパ腫、多血症ペラリンパ腫、ホジキン病、非ホジキン病、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、固形腫瘍、肉腫および細胞癌、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸肉腫、結腸直腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、子宮癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起細胞腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、上咽頭癌、食道癌、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳および中枢神経系（CNS）癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系癌、子宮内膜癌、食道癌、眼の癌、頭頸部癌、胃癌、上皮内新生物、腎臓癌、喉頭癌、肝臓癌、肺癌（小細胞、大細胞）、黒色腫、神経芽細胞腫、口腔癌（たとえば、唇、舌、口および咽頭）、卵巣癌、膵臓癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、肉腫、皮膚癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮癌および泌尿器系癌が挙げられる。特定の癌としては、慢性リンパ球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、パーキットリンパ腫および辺縁帯B細胞リンパ腫からなる群から選択されるCD40発現腫瘍が挙げられる。

【0205】

本発明の抗体および結合体は、細菌、真菌、ウイルス、および寄生虫による感染症を治療するために使用することもできる。

【0206】

治療に使用される場合、本発明の抗体は、単独で、または免疫賦活剤、ワクチン、化学療法、または放射線治療などの他の療法とともに対象に直接（すなわちインビボで）投与することができる。いずれの場合も、抗体、結合体、二重特異性分子、組成物、および免疫賦活剤、ならびに他の療法は、それらの所望の治療効果を示すうえで有効な量で投与される。「有効量」なる用語は、所望の生物学的効果を実現するうえで必要または十分な量のことを言う。例えば、有効量は、腫瘍、癌、または細菌、ウイルス、もしくは真菌の感染を排除するのに必要な量とすることができる。任意の特定の用途における有効量は、治療される疾患もしくは状態、投与される特定の抗体、対象のサイズ、または疾患もしくは状態の重症度などの要因に応じて変わり得る。当業者であれば、不要な実験を必要とすることなく、特定の分子の有効量を経験的に決定することができる。

【0207】

好ましい投与経路としては、例えば、注射（例えば、皮下、静脈内、非経口、腹腔内、髄腔内）が挙げられる。注射は、ボーラス注射または連続注入であってよい。他の投与経路としては経口投与が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 2 0 8 】

別の実施形態では、抗体をワクチン抗原と組み合わせて投与することによって腫瘍抗原（これにより、腫瘍に対する免疫反応を促進する）または感染症病原体由来の抗原（これにより、感染症病原体に対する免疫反応を促進する）などのワクチン抗原に対する免疫反応を促進する。ワクチン抗原は、腫瘍に対する、またはウイルス、細菌、寄生虫、もしくは真菌などの感染症病原体に対する免疫反応を誘導することが可能なあらゆる抗原または抗原性組成物とすることができる。ワクチン抗原は、患者の腫瘍のシーケンシングから誘導されるもののようなネオアンチゲンとすることもできる。このような1乃至複数の抗原は、例えばペプチド/タンパク質、多糖類および/または脂質であってもよく、またはインピボで発現させることができるペプチドまたはタンパク質抗原をコードする核酸（例えばDNA）として投与することもできる。このような1乃至複数の抗原は、本明細書において上記に開示した各種腫瘍抗原のような、腫瘍由来のものであってもよい。また、このような1乃至複数の抗原は、本明細書において上記に開示した各種病原体抗原のような、ウイルス、細菌、寄生虫、および/または真菌などの病原体由来のものであってもよい。適当な病原体抗原の更なる例としては、これらに限定されるものではないが、以下のものが挙げられる。すなわち、

ウイルス性の抗原または抗原決定基は、例えば、サイトメガロウイルス（特にgBなどのヒトサイトメガロウイルス、またはそれらの誘導体）；エプスタイン・バー・ウイルス（gp350など）；フラビウイルス（例えば、黄熱病ウイルス、デングウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス）；B型肝炎ウイルス（例えば、欧州特許出願公開第EP-A-414 374号、同第EP-A-0304 578号、および同第EP-A-198474に記載されるPreS1、PreS2およびS抗原などのB型肝炎表面抗原）、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、およびE型肝炎ウイルスなどの肝炎ウイルス；HIV-1（例えば、tat、nef、gp120またはgp160など）；gDもしくはその誘導体、またはHSV1もしくはHSV2由来のICP27などの最初期タンパク質などのヒトヘルペスウイルス；ヒトパピローマウイルス（例えば、HPV6、11、16、18）；インフルエンザウイルス（鶏卵またはMDCK細胞、またはVero細胞若しくは全流感ピロソームで増殖させた、全生ウイルスまたは不活化ウイルス、スプリットインフルエンザウイルス（Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920に記載のもの）、またはNP、NA、HA、またはMタンパク質などのそれらの精製もしくは組換えタンパク質）；麻疹ウイルス；耳下腺炎ウイルス；パラインフルエンザウイルス；狂犬病ウイルス；呼吸器多核体ウイルス（例えばFおよびGタンパク質）；ロタウイルス（生弱毒化ウイルス）；天然痘ウイルス；带状疱疹ウイルス（例えばgpI、IIおよびIE63）；ならびに子宮頸癌の原因となるHPVウイルス（例えば、初期タンパク質E6またはE7をProteinDキャリアと融合させた、HPV16由来のProteinD-E6またはE7融合タンパク質、またはこれらの組み合わせ；またはE6もしくはE7とL2との組み合わせ（例えば国際公開第WO96/26277号を参照）に由来するもの）とすることができる。

【 0 2 0 9 】

細菌性の抗原または抗原決定基は、例えば、炭疽菌（例えば、ボツリヌス毒素）を含むバシラス属菌；百日咳菌（例えば、ペルタクチン、百日咳毒素、繊維状ヘマグルチニン、アデニル酸シクラーゼ、フィムブリエ）を含むボルデテラ属菌；B.ブルグドルフェリ（例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB）、B.ガリニ（例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB）、B.アフゼリ（例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB）、B.アンデルソニー（例えば、OspA、OspC、DbpA、DbpB）、B.ヘルムシーを含むボレリア属菌；C.ジェジュニ（例えばトキシン、アドヘシン、およびインペイシン）およびC.コリを含むカンピロバクタ属菌；C.トラコマチス（例えば、MOMP、ヘパリン結合タンパク質）、肺炎クラミジア（例えば、MOMP、ヘパリン結合タンパク質）、オウム病クラミジアを含むクラミジア属菌；破傷風菌（例えば、破傷風毒素）、ボツリヌス菌（例えば、ボツリヌス毒素）、C.ディフィシル（例えば

10

20

30

40

50

、A型またはB型クロストリジウム毒素)を含むクロストリジウム属菌;ジフテリア菌(例えば、ジフテリア毒素)を含むコリネバクテリウム菌種;E.エクイおよびヒト顆粒球エーリキア症の病原体を含むエーリキア属菌;R.リケッチを含むリケッチア属菌;E.フェカリス、E.フェシウムを含むエンテロコッカス属菌;腸管毒素原生大腸菌(例えば、定着因子、易熱性毒素またはその誘導体、または耐熱性毒素)、腸管出血性大腸菌、腸管病原性大腸菌(例えば、志賀毒素様毒素)を含むエシェリキア属菌;インフルエンザB型(例えば、PRP)、型別不能インフルエンザ、例えばOMP26、高分子量アドヘシンP5、P6 Protein Dおよびリボタンパク質D、ならびにフィンブリリンおよびフィンブリリン由来ペプチド(例えば、米国特許第5,843,464号を参照)を含むヘモフィルス属菌;ピロリ菌(例えば、ウレアーゼ、カタラーゼ、空胞化毒素)を含むヘリコバクターゾク菌;緑膿菌を含むシュードモナス属菌;L.ニューモフィラを含むレジオネラ属菌;L.インターロガンスを含むレプトスピラ属;L.モノサイトゲネスを含むリステリア属菌;カタール球菌としても知られるM.カタラーリス(例えば、高分子量および低分子量のアドヘシンおよびインベysin)を含むモラクセラ属菌;モラクセラ・カタラーリス(その外膜小胞、およびOMP106(例えば国際公開第W097/41731号を参照));ヒト型結核菌(例えば、ESAT6、抗原85A、抗原85B、または抗原85C)、ウシ型結核菌、らい菌、トリ型結核菌、副結核菌、スメグマ菌を含むマイコバクテリウム属菌;淋菌および髄膜炎菌(例えば莢膜多糖類およびそのコンジュゲート、トランスフェリン結合タンパク質、ラクトフェリン結合タンパク質、PilC、アドヘシン)を含むナイセリア属菌;B群髄膜炎(その外膜小胞、およびNspA(例えば国際公開第W096/29412号を参照));腸チフス菌、パラチフス菌、豚コレラ菌、腸炎菌を含むサルモネラ属菌;ソネイ菌、志賀赤痢菌、フレキシネル赤痢菌を含む赤痢菌属;黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌を含むブドウ球菌属;肺炎連鎖球菌(たとえば、莢膜多糖およびそのコンジュゲート、PsaA、PspA、ストレプトリシン、コリン結合タンパク質)およびタンパク質抗原ニューモリシン(Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342)、ならびにそれらの変異無毒化誘導体(例えば、国際公開第W090/06951号、同第W099/03884号を参照)を含むレンサ球菌属;梅毒トレポネーマ(たとえば、外膜タンパク質)、T.デンティコラ、T.ヒオディセンテリアを含むトレポネーマ属菌;コレラ菌(例えば、コレラ毒素)を含むビブリオ属菌;ならびにエンテロコリチカ菌(例えば、Yopタンパク質)、ペスト菌、偽結核菌を含むエルシニア属菌に由来するものとすることができる。

【0210】

寄生虫/真菌性の抗原または抗原決定基は、例えば、B.ミクロティを含むバベシア属菌;C.アルピカンスを含むカンジダ属菌;C.ネオフォルマンسを含むクリプトコッカス属菌;赤痢アメーバを含むエントアメーバ属;ランブル鞭毛虫を含むジアルジア属;森林型熱帯リーシュマニアを含むリーシュマニア属;熱帯熱マラリア原虫(MSP1、AMA1、MSP3、EBA、GLURP、RAP1、RAP2、セクエストリン、PfEMP1、Pf332、LSA1、LSA3、STARP、SALSA、PfEXP1、Pfss25、Pfss28、PFS27/25、Pfss16、Pfss48/45、Pfss230およびプラスモジウム属種のそれらの類似体);P.カリニを含むニューモステイス属;マンソン住血吸虫を含む住血吸虫属;腔トリコモナスを含むトリコモナス属;T.ゴンジ(例えば、SAG2、SAG3、Tg34)を含むトキソプラズマ属;T.クルージを含むトリパノソーマ属に由来するものとすることができる。

【0211】

本発明のこの態様によれば、抗原および抗原決定基は、多くの異なる形態で 사용할ことができる点は認識されよう。例えば、抗原または抗原決定基は、単離されたタンパク質またはペプチドとして(例えばいわゆる「サブユニットワクチン」として)、または例えば細胞関連またはウイルス関連抗原または抗原決定基として(例えば生きた、または殺した

10

20

30

40

50

病原体株として)存在してよい。生きた病原体は、既知の方法で弱毒化されることが好ましい。また、抗原または抗原決定基は、抗原または抗原決定基をコードしたポリヌクレオチドの使用により対象の体内でインサイチュで生成させることもできる(いわゆる「DNAワクチン接種」)が、この手法で使用するポリヌクレオチドはDNAに限定されず、上記に述べたようなRNAおよび改変ポリヌクレオチドも含み得る点は認識されよう。

【0212】

治療に使用される場合、本発明の分子結合体(すなわちワクチン結合体)は、単独で、または免疫賦活剤とともに、対象に直接(すなわちインビボで)投与することができる。一態様では、免疫賦活剤は結合体に連結される。また、結合体は、最初に結合体を樹状細胞などのAPCと接触させ(例えば培養またはインキュベートすることにより)、次いでこの細胞を対象に投与する(すなわち、エクスピボで)ことにより対象に間接的に投与することもできる。このように、投与に先立って結合体がAPCによりプロセッシングされて提示されるように、結合体をAPCと接触させ、APCに送達することは、抗原または細胞「ローディング」とも呼ばれる。抗原をAPCにローディングするための手法は当該技術分野では周知のものであり、例えば、Gunzer and Grabbe, Crit Rev Immunol 21 (1-3): 133-45 (2001) およびSteinman, Exp Hematol 24(8): 859-62 (1996)に記載のものが挙げられる。

10

【0213】

いずれの場合も、ワクチン結合体および免疫賦活剤をそれらの所望の治療効果を奏する有効量で投与する。

20

【0214】

本発明の抗体、分子結合体、二重特異性分子、および組成物は、アジュバントおよびタンパク質の治療剤と同時に投与することもできる。本明細書で使用するところの「同時投与」なる用語は、投与レジメンの一環としての投与を含む、本発明の抗体および結合体と、アジュバントおよび他の剤との同時、別々、または順次の投与のいずれかまたはすべてを含む。抗体は、一般的に、担体のみに、またはかかる剤と組み合わせて配合される。かかる担体の例としては、溶液、溶媒、分散媒、遅延剤、エマルジョン、などが挙げられる。薬学的に活性な物質用のかかる媒質の使用は、当該技術分野では周知のものである。かかる分子とともに使用するのに適した他のあらゆる従来の担体は、本発明の範囲に含まれる。

30

【0215】

抗体、結合体、二重特異性分子、および組成物との同時投与に適した剤としては、他の抗体、細胞毒素、および/または薬剤、ならびにアジュバント、免疫賦活剤および/または免疫抑制剤が挙げられる。一実施形態では、剤は、化学療法剤である。抗体、二重特異性分子、および組成物は、放射線と組み合わせて投与することもできる。

【0216】

腫瘍の治療において本発明の抗体および結合体との同時投与に適した化学療法剤としては、例えば、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにその類似体またはホモログが挙げられる。更なる剤としては、例えば、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNu)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびcis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン類(例えば、ダウノルビシン(以前のダウノマイシン)およびドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前のアク

40

50

チノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン(AMC)など)、ならびに有糸分裂阻害剤(例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン)およびテモゾロミドが挙げられる。

【0217】

免疫細胞(例えば、制御性T細胞、NK細胞、マクロファージ、骨髄由来サプレッサー細胞、未成熟または抑制性樹状細胞など)または腫瘍の局所微小環境中の腫瘍または宿主細胞が産生する抑制因子(例えばTGF、インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO))によって免疫抑制活性を消失または阻害する剤を、本発明の抗体および結合体とともに投与することもできる。かかる剤としては、抗体、および1-メチルトリプトファンまたは誘導体などのIDO阻害剤などの小分子が挙げられる。

10

【0218】

免疫反応を誘導または促進するために本発明の抗体、結合体、および二重特異性分子と同時に投与するのに適した剤としては、例えば、その非限定的な例を上記に開示したアジュバントおよび/または免疫賦活剤が挙げられる。好ましい免疫賦活剤の1つとして、Poly I:CのようなTLR3アゴニストがある。

V. 併用療法

【0219】

本明細書に記載の抗CD40抗体は、例えば癌を治療するための併用療法で使用することもできる。そこで、本明細書では、抗CD40抗体を、例えば、免疫反応を刺激することにより対象における免疫反応を更に促進、刺激、または増加させるうえで有効な小分子薬剤、抗体およびその抗原結合部分、および/またはタンパク質リガンドなどの1種またはそれより多くの更なる剤と同時に投与する併用療法の方法を提供する。更に、本明細書の実施例で示されるように、アゴニスト抗CD40抗体および可溶性CD40リガンドの投与は、例えば腫瘍細胞におけるCD95の発現の増大により示されるように、T細胞受容体により媒介されるシグナルを誘導するうえで相乗作用を示した。

20

【0220】

例えば、抗CD40抗体(例えば本明細書に記載のもの)を、(i)刺激(例えば共刺激)分子のアゴニスト、および/または(ii)T細胞などの免疫細胞上の阻害シグナルまたは分子(例えば受容体またはリガンド)のアンタゴニストと併用することができ、いずれの場合も、抗原特異的T細胞応答などの免疫反応が増幅される。特定の態様では、癌免疫療法剤は、(i)刺激(共刺激を含む)分子(例えば受容体またはリガンド)のアゴニスト、または(ii)例えばNK細胞などの自然免疫に関与する細胞上の阻害(共阻害を含む)分子(例えば受容体またはリガンド)のアンタゴニストであり、かかる癌免疫療法剤が自然免疫を促進するものである。かかる癌免疫療法剤はしばしば、免疫チェックポイント制御物質、例えば免疫チェックポイント阻害剤または免疫チェックポイント刺激剤と称される。

30

【0221】

一実施形態では、抗CD40抗体は、免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)のメンバーである刺激分子または阻害分子を標的とする剤とともに投与される。例えば、抗CD40抗体(例えば本明細書に記載のもの)を、IgSFファミリーのメンバーを標的とする剤とともに対象に投与することで免疫反応を増大させることができる。例えば、抗CD40抗体を、B7-1、B7-2、B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2(ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)、およびB7-H6を含む膜結合リガンドのB7ファミリーのメンバーを標的とする(すなわち、これと特異的に結合する)剤、またはB7ファミリーのメンバーに特異的に結合する共刺激もしくは共阻害受容体とともに投与することができる。

40

【0222】

抗CD40抗体は、CD40およびCD40L(例えば、ヒトCD40およびヒトCD40L)、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRA

50

ILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDA1、EDA2、TNFR1、リンフォトキシン / TNF、TNFR2、TNF、LT R、リンフォトキシン 1 2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY、およびNGFRなどのTNFおよびTNFRファミリーの分子（リガンドまたは受容体）のメンバーを標的とする剤とともに投与することもできる（例えば、Tansey（2009）Drug Discovery Today 00：1を参照）。

【0223】

T細胞応答は、例えば3C3および3G5などの本明細書に記載の抗CD40抗体と、上記に述べた、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、およびLAG-3などのT細胞活性化を阻害するタンパク質（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）、ならびに以下のタンパク質、すなわち、TIM-3、ガレクチン9、CEACAM-1、BTLA、CD69、ガレクチン1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、B7-H3、B7-H4、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1、およびTIM-4のいずれかのアンタゴニスト（阻害剤またはブロック剤）の1つまたはそれより多く、および/またはB7-1、B7-2、CD28、4-1BB（CD137）、4-1BBL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、CD70、CD27、CD40、DR3、およびCD28HなどのT細胞活性化を刺激するタンパク質のアゴニストの1つまたはそれより多くとの組み合わせによって刺激することができる。

【0224】

上記のタンパク質の1つを調節し、癌を治療するために、例えば本明細書に記載のものなどのアゴニスト抗CD40抗体と併用することができる例示的な剤としては、ヤーボイ（登録商標）（イピリマブ）またはトレメリマブ（CTLA-4に対する）、ガリキシマブ（B7.1に対する）、BMS-936558/ニボルマブ（PD-1に対する）、MK-3475/ペムブロリズマブ（PD-1に対する）、AMP224（B7DCに対する）、BMS-936559（B7-H1に対する）、MPDL3280A/アテゾリズマブ（B7-H1に対する）、MED1-570（ICOSに対する）、AMG557（B7H2に対する）、MGA271（B7H3に対する）、IMP321（LAG-3に対する）、BMS-663513（CD137に対する）、PF-05082566（CD137に対する）、CDX-1127（CD27に対する）、抗OX40（Providence Health Services社）、huMAbOX40L（OX40Lに対する）、アタセプト（TACIに対する）、CP-870893（CD40に対する）、ルカツムマブ（CD40に対する）、デカツズマブ（CD40に対する）、ムロモナブ-CD3（CD3に対する）、イピリマブ（CTLA-4に対する）が挙げられる。

【0225】

癌の治療用にアゴニスト抗CD40抗体と併用することができる他の分子としては、NK細胞上の抑制性受容体のアンタゴニスト、またはNK細胞上の活性化受容体のアゴニストが挙げられる。例えば、抗CD40アゴニスト抗体は、KIR（例えば、リリルマブ）のアンタゴニストと併用することができる。

【0226】

T細胞活性化は可溶性サイトカインによっても制御されるため、抗CD40抗体を、例えば癌を有する対象に、T細胞活性化を阻害するサイトカインのアンタゴニストまたはT細胞活性化を刺激するサイトカインのアゴニストとともに投与することができる。

【0227】

別の実施形態では、抗CD40抗体を、（i）T細胞活性化を阻害するIgSFファミリーまたはB7ファミリーまたはTNFファミリーのタンパク質のアンタゴニスト（または

10

20

30

40

50

阻害剤もしくはブロッキング剤)、またはT細胞活性化を阻害するサイトカイン(例えば、IL-6、IL-10、TGF- β 、VEGFなどの「免疫抑制性サイトカイン」)のアンタゴニスト、および/または(ii)T細胞活性化を刺激する、IGSFファミリーまたはB7ファミリーまたはTNFファミリーの刺激受容体の、またはサイトカインのアゴニストと併用することで、免疫反応を刺激する(例えば、癌などの増殖性疾患を治療する)ことができる。

【0228】

併用療法用の他の剤としては、これらに限定されるものではないが、RG7155(国際公開第WO11/70024号、同第WO11/107553号、同第WO11/131407号、同第WO13/87699号、同第WO13/119716号、同第WO13/132044)またはFPA-008(国際公開第WO11/140249号、同第WO13169264号、同第WO14/036357号)を含む、CSF-1Rアンタゴニスト抗体などのCSF-1Rアンタゴニストを含む、マクロファージまたは単球を阻害または枯渇させる剤が挙げられる。

10

【0229】

抗CD40抗体は、TGF- β シグナル伝達を阻害する剤とともに投与することもできる。

【0230】

抗CD40抗体と併用することができる更なる剤としては、例えば樹状細胞ワクチン、GM-CSF分泌細胞ワクチン、CpGオリゴヌクレオチド、およびイミキモドなどの腫瘍抗原提示を促進する剤、または腫瘍細胞の免疫原性を高める療法(例えばアントラサイクリン)が挙げられる。

20

【0231】

抗CD40抗体と併用することができる他の療法として、Treg細胞を枯渇またはブロックする療法(例えばCD25に特異的に結合する剤など)が挙げられる。

【0232】

抗CD40抗体と併用することができる別の療法として、インドールアミンジオキシゲナーゼ(IDO)、ジオキシゲナーゼ、アルギナーゼ、または一酸化窒素合成酵素などの代謝酵素を阻害する療法がある。

【0233】

抗CD40抗体と併用することができる別のクラスの剤として、アデノシンの生成を阻害するかまたはアデノシンA2A受容体を阻害する剤が挙げられる。

30

【0234】

癌を治療するために抗CD40抗体と併用することができる他の療法としては、T細胞のアナジーまたは疲弊を逆転/防止する療法、ならびに腫瘍部位における自然免疫活性化および/または炎症を誘発する療法が挙げられる。

【0235】

抗CD40抗体は、複数の癌免疫療法剤と併用が可能であり、以下の療法の1つまたはそれより多くのような免疫経路の複数の要素を標的とするコンビナトリアルなアプローチと組み合わせることができる。すなわち、腫瘍抗原提示を促進する療法(例えば、樹状細胞ワクチン、GM-CSF分泌細胞ワクチン、CpGオリゴヌクレオチド、およびイミキモドなど);例えば、CTLA-4および/またはPD1/PD-L1/PD-L2経路を阻害することにより、および/またはTregもしくは他の免疫抑制細胞を枯渇もしくはブロックすることにより負の免疫制御を阻害する療法;例えば、CD-137、OX-40、および/またはGITR経路を刺激するかかつ/またはT細胞エフェクター機能を刺激するアゴニストを用いて、正の免疫制御を刺激する療法;抗腫瘍T細胞の頻度を全身的に増大させる療法;例えば、CD25のアンタゴニスト(例えばガクリズマブ)を用いるかまたはエクスピボの抗CD25ピーズ枯渇により、腫瘍内のTregなどのTregを枯渇または阻害する療法;腫瘍内の抑制性骨髄細胞の機能に影響を与える療法;腫瘍細胞の免疫原性を高める療法(例えば、アントラサイクリン);例えばキメラ抗原受容体により改変された細胞などの遺伝子改変細胞を含む、養子T細胞またはNK細胞移植(CAR

40

50

【 0 2 3 6 】

10

20

30

40

50

0317368号に記載のものが挙げられる。国際公開第WO2013/173223号に開示される抗PD-1抗体のいずれを使用することもできる。これらの抗体の1つと同じPD-1上のエピトープへの結合について競合するか、かつ/またはそのようなエピトープに結合する抗PD-1抗体も併用療法で使用することができる。PD-1受容体を標的とする別の手法は、AMP-224と呼ばれる、IgG1のFc部分に融合させたPD-L2(B7-DC)の細胞外ドメインからなる組換えタンパク質である。

【0241】

本明細書では、過剰増殖性疾患(例えば癌)を治療するための方法であって、アゴニスト抗CD40抗体およびアンタゴニストPD-L1抗体を対象に投与することを含む方法が提供される。一実施形態では、対象はヒトである。別の実施形態では、抗PD-L1抗体は、ヒト配列モノクローナル抗体であり、抗CD40抗体は、例えば本明細書に記載の3C3および3G5のCDRまたは可変領域を含む抗体などのヒト配列モノクローナル抗体、または本明細書に記載の別のアゴニスト抗CD40抗体である。

10

【0242】

一実施形態では、抗PD-L1抗体は、BMS-936559(国際公開第WO2007/005874号および米国特許第7,943,743号において12A4と称されるもの)、または国際公開WO07/005874号および米国特許第7,943,743号に記載の3G10、12A4、10A5、5F8、10H10、1B12、7H1、11E6、12B7および13G4のCDRまたは可変領域を含む抗体である。特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、MED14736(抗B7-H1としても知られる)、MPDL3280A(RG7446としても知られる)、MSB0010718C(国際公開第WO2013/79174号)、またはrHiGM12B7である。国際公開第WO2013/173223号、同第WO2011/066389号、同第WO2012/145493号、米国特許第7,635,757号、同第8,217,149号、および米国特許出願公開第2009/145493号に開示される抗PD-L1抗体のいずれを使用することもできる。これらの抗体のいずれかと同じエピトープについて競合するか、かつ/または同じエピトープに結合する抗PD-L1抗体も併用療法で使用することができる。

20

【0243】

本明細書では、過剰増殖性疾患(例えば癌)を治療するための方法であって、本明細書に記載の抗CD40抗体およびCTLA-4アンタゴニスト抗体を対象に投与することを含む方法が提供される。一実施形態では、対象はヒトである。別の実施形態では、抗CTLA-4抗体は、ヤーボイ(登録商標)(イピリムマブまたは抗体10D1、国際公開第WO01/14424号に記載)、トレメリムマブ(以前のチシリムマブ、CP-675,206)、以下の文献、すなわち、国際公開第WO98/42752号、国際公開第WO00/37504号、米国特許第6,207,156号; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17): 10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Abstract No. 2505(抗体CP-675206); およびMokyr et al. (1998) Cancer Res. 58: 5301-5304のいずれかに記載のモノクローナル抗体または抗CTLA-4抗体の群から選択される抗体である。国際公開第WO2013/173223号に開示される抗CTLA-4抗体のいずれを使用することもできる。

30

40

【0244】

本明細書では、過剰増殖性疾患(例えば癌)を治療するための方法であって、抗CD40抗体および抗LAG3抗体を対象に投与することを含む方法が提供される。一実施形態では、対象はヒトである。別の実施形態では、抗PD-L1抗体は、ヒト配列モノクローナル抗体であり、抗CD40抗体は、例えば本明細書に記載の3C3または3G5のCDRまたは可変領域を含む抗体などのヒト配列モノクローナル抗体、または本明細書に記載の別のアゴニスト抗CD40抗体である。抗LAG3抗体の例としては、米国特許出願公開

50

第US2011/0150892号、国際公開第WO10/19570号、および国際公開第WO2014/008218号に記載の抗体25F7、26H10、25E3、8B7、11F2または17E5のCDRまたは可変領域を含む抗体が挙げられる。一実施形態では、抗LAG3抗体は、BMS-986016である。使用可能な他の当該技術分野で認識されている抗LAG3抗体としては、米国特許出願公開第US2011/0007023号、国際公開第WO08/132601号、および国際公開第WO09/44273号に記載のIMP731およびIMP-321が挙げられる。これらの抗体のいずれかと同じエピトープについて競合するか、かつ/または同じエピトープに結合する抗LAG3抗体も併用療法で使用する事ができる。

【0245】

本明細書に記載される抗CD40抗体、およびLAG-3および/またはCTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1などの1種またはそれより多くの第2の標的抗原に対するアンタゴニスト（例えば、アンタゴニスト抗体）の投与により、患者の癌細胞に対する免疫反応を促進することができる。本開示の抗体を使用して増殖を阻害することができる癌には、免疫療法に通常反応を示す癌、および免疫療法に通常は反応を示さない癌が含まれる。本開示の併用療法により治療される癌の代表的な例としては、本明細書に記載の癌が挙げられる。

【0246】

特定の実施形態では、本明細書で検討される治療抗体の組み合わせを、薬学的に許容される担体に含まれた単一の組成物として同時に、またはそれぞれの抗体が薬学的に許容される担体に含まれた別々の組成物として同時に、投与することができる。別の実施形態では、治療抗体の組み合わせを、順次投与することができる。例えば、抗CTLA-4抗体と抗CD40抗体とを順次投与することができ、例えば、抗CTLA-4抗体を最初に投与し、抗CD40抗体を次に投与する、または抗CD40抗体を最初に投与し、抗CTLA-4抗体を次に投与することができる。これに加えるかまたはこれに代えて、抗PD-1抗体と抗CD40抗体を順次投与する、例えば、抗PD-1抗体を最初に投与し、抗CD40抗体を次に投与する、または抗CD40抗体を最初に投与し、抗PD-1抗体を次に投与することができる。これに加えるかまたはこれに代えて、抗PD-L1抗体と抗CD40抗体を順次投与する、例えば、抗PD-L1抗体を最初に投与し、抗CD40抗体を次に投与する、または抗CD40抗体を最初に投与し、抗PD-L1抗体を次に投与することができる。これに加えるかまたはこれに代えて、抗LAG-3抗体と抗CD40抗体を順次投与する、例えば、抗LAG-3抗体を最初に投与し、抗CD40抗体を次に投与する、または抗CD40抗体を最初に投与し、抗LAG-3抗体を次に投与することができる。

【0247】

更に、併用療法の複数の用量が順次投与される場合、順次投与の順序を、それぞれの投与の時点で逆とするかまたは同じに保つことができ、順次投与を同時投与と組み合わせるか、またはこれらの任意の組み合わせとすることができる。例えば、抗CTLA-4抗体と抗CD40抗体との組み合わせの第1の投与を同時とし、第2の投与を順次として最初に抗CTLA-4抗体、次に抗CD40抗体を投与し、第3の投与を順次として最初に抗CD40抗体、次に抗CTLA-4抗体を投与する、といった具合で行うことができる。これに加えるかまたはこれに代えて、抗PD-1抗体と抗CD40抗体との組み合わせの第1の投与を同時とし、第2の投与を順次として最初に抗PD-1抗体、次に抗CD40抗体を投与し、第3の投与を順次として最初に抗CD40抗体、次に抗PD-1抗体を投与する、といった具合で行うことができる。これに加えるかまたはこれに代えて、抗PD-L1抗体と抗CD40抗体との組み合わせの第1の投与を同時とし、第2の投与を順次として最初に抗PD-L1抗体、次に抗CD40抗体を投与し、第3の投与を順次として最初に抗CD40抗体、次に抗PD-L1抗体を投与する、といった具合で行うことができる。これに加えるかまたはこれに代えて、抗LAG-3抗体と抗CD40抗体との組み合わせの第1の投与を同時とし、第2の投与を順次として最初に抗LAG-3抗体、次に抗

10

20

30

40

50

C D 4 0 抗体を投与し、第 3 の投与を順次として最初に抗 C D 4 0 抗体、次に抗 L A G - 3 抗体を投与する、といった具合で行うことができる。別の代表的な投与スキームでは、第 1 の投与を順次として最初に抗 C D 4 0 抗体を、次に抗 C T L A - 4 抗体（および / または抗 P D - 1 抗体および / または抗 P D - L 1 抗体および / または抗 L A G - 3 抗体）を投与し、その後の投与を同時とすることができる。

【 0 2 4 8 】

一実施形態では、例えば癌または感染症などの、免疫系の刺激による恩恵を受けることができる疾患を有する対象を、抗 C D 4 0 抗体および癌免疫療法剤を対象に投与することにより治療し、この場合、癌免疫療法剤は、アゴニスト C D 1 3 7 抗体などの C D 1 3 7 (4 - 1 B B) アゴニストである。適当な C D 1 3 7 抗体としては、例えば、ウレルマブまたは P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 (国際公開第 W O 1 2 / 3 2 4 3 3 号) が挙げられる。

10

【 0 2 4 9 】

一実施形態では、例えば癌または感染症などの、免疫系の刺激による恩恵を受けることができる疾患を有する対象を、抗 C D 4 0 抗体および癌免疫療法剤を対象に投与することにより治療し、この場合、癌免疫療法剤は、アゴニスト O X 4 0 抗体などの O X 4 0 アゴニストである。適当な O X 4 0 抗体としては、例えば、M E D I - 6 3 8 3、M E D I - 6 4 6 9 または M O X R 0 9 1 6 (R G 7 8 8 8 ; 国際公開第 W O 0 6 / 0 2 9 8 7 9 号) が挙げられる。

【 0 2 5 0 】

一実施形態では、例えば癌または感染症などの、免疫系の刺激による恩恵を受けることができる疾患を有する対象を、抗 C D 4 0 抗体および癌免疫療法剤を対象に投与することにより治療し、この場合、癌免疫療法剤は、別のアゴニスト C D 4 0 抗体などの第 2 の C D 4 0 アゴニストである。

20

【 0 2 5 1 】

一実施形態では、例えば癌または感染症などの、免疫系の刺激による恩恵を受けることができる疾患を有する対象を、抗 C D 4 0 抗体および癌免疫療法剤を対象に投与することにより治療し、この場合、癌免疫療法剤は、アゴニスト C D 2 7 抗体などの C D 2 7 アゴニストである。適当な C D 2 7 抗体としては、例えば、バルリルマブ (C D X - 1 1 2 7) が挙げられる。

【 0 2 5 2 】

一実施形態では、例えば癌または感染症などの、免疫系の刺激による恩恵を受けることができる疾患を有する対象を、抗 C D 4 0 抗体および癌免疫療法剤を対象に投与することにより治療し、この場合、癌免疫療法剤は、M G A 2 7 1 (B 7 H 3 に対する) (国際公開第 W O 1 1 / 1 0 9 4 0 0 号) である。

30

【 0 2 5 3 】

一実施形態では、例えば癌または感染症などの、免疫系の刺激による恩恵を受けることができる疾患を有する対象を、抗 C D 4 0 抗体および癌免疫療法剤を対象に投与することにより治療し、この場合、癌免疫療法剤は、リリルマブなどの K I R アンタゴニストである。

【 0 2 5 4 】

一実施形態では、例えば癌または感染症などの、免疫系の刺激による恩恵を受けることができる疾患を有する対象を、抗 C D 4 0 抗体および癌免疫療法剤を対象に投与することにより治療し、この場合、癌免疫療法剤は、I D O アンタゴニストである。適当な I D O アンタゴニストとしては、例えば、I N C B - 0 2 4 3 6 0 (国際公開第 W O 2 0 0 6 / 1 2 2 1 5 0 号、同第 W O 0 7 / 7 5 5 9 8 号、同第 W O 0 8 / 3 6 6 5 3 号、同第 W O 0 8 / 3 6 6 4 2 号)、インドキシモド、N L G - 9 1 9 (国際公開第 W O 0 9 / 7 3 6 2 0 号、同第 W O 0 9 / 1 1 5 6 6 5 2 号、同第 W O 1 1 / 5 6 6 5 2 号、同第 W O 1 2 / 1 4 2 2 3 7 号) または F 0 0 1 2 8 7 が挙げられる。

40

【 0 2 5 5 】

一実施形態では、例えば癌または感染症などの、免疫系の刺激による恩恵を受けることができる疾患を有する対象を、抗 C D 4 0 抗体および癌免疫療法剤を対象に投与することにより

50

より治療し、この場合、癌免疫療法剤は、例えば T L R 2 / 4 アゴニスト（例えば、カルメット・ゲラン桿菌（B C G））、T L R 7 アゴニスト（例えば、ヒルトノールまたはイミキモド）、T L R 7 / 8 アゴニスト（例えば、レシキモド）、または T L R 9 アゴニスト（例えば、C p G 7 9 0 9）などの T o l l 様受容体アゴニストである。

【0256】

一実施形態では、例えば癌または感染症などの、免疫系の刺激による恩恵を受けることができる疾患を有する対象を、抗 C D 4 0 抗体および癌免疫療法剤を対象に投与することにより治療し、この場合、癌免疫療法剤は、例えば、G C 1 0 0 8、L Y 2 1 5 7 2 9 9、T E W 7 1 9 7、または I M C - T R 1 などの T G F - 阻害剤である。

【0257】

一態様では、抗 C D 4 0 抗体は、第 2 の剤（癌免疫療法剤）の投与の前に順次投与される。一態様では、抗 C D 4 0 抗体は、第 2 の剤（癌免疫療法剤）と同時投与される。更なる一態様では、抗 C D 4 0 抗体は、第 2 の剤の投与後に順次投与される。2 つの剤の投与は、例えば、3 0 分、6 0 分、9 0 分、1 2 0 分、3 時間、6 時間、1 2 時間、2 4 時間、3 6 時間、4 8 時間、3 日、5 日、7 日または 1 もしくはそれより多くの週間間隔をあけた時点で開始することができ、または第 2 の剤の投与を、例えば、第 1 の剤が投与されてから 3 0 分、6 0 分、9 0 分、1 2 0 分、3 時間、6 時間、1 2 時間、2 4 時間、3 6 時間、4 8 時間、3 日、5 日、7 日後、または 1 もしくはそれより多くの週間後に開始することができる。

【0258】

特定の態様では、抗 C D 4 0 抗体と第 2 の剤（例えば、癌免疫療法剤）とは、患者に同時に投与され、例えば、同時に点滴される（例えば、3 0 分間または 6 0 分間にわたって）。また、抗 C D 4 0 抗体は第 2 の剤（例えば、癌免疫療法剤）と共配合することができる。

【0259】

場合により、抗 C D 4 0 を唯一の癌免疫療法剤として投与するか、または抗 C D 4 0 抗体と 1 種またはそれより多くの更なる免疫療法抗体（例えば、抗 C T L A - 4 抗体および / または抗 P D - 1 抗体および / または抗 P D - L 1 抗体および / または抗 L A G - 3 抗体）との組み合わせを、癌細胞、精製腫瘍抗原（組換えタンパク質、ペプチド、および / または炭水化物分子を含む）、細胞、および免疫刺激サイトカインをコードした遺伝子をトランスフェクトした細胞（H e e t a l . (2 0 0 4) J . I m m u n o l . 1 7 3 : 4 9 1 9 - 2 8）などの免疫原性剤と更に組み合わせることができる。使用することが可能な腫瘍ワクチンの非限定的な例としては、g p 1 0 0、M A G E 抗原、T r p - 2、M A R T 1 および / またはチロシナーゼのペプチドなどメラノーマ抗原のペプチド、またはサイトカイン G M - C S F を発現するようにトランスフェクトした腫瘍細胞が挙げられる（下記で更に検討する）。抗 C D 4 0 抗体および 1 種またはそれより多くの更なる抗体（例えば、抗 C T L A - 4 抗体および / または抗 P D - 1 抗体および / または抗 P D - L 1 抗体および / または抗 L A G - 3 抗体）を、標準的な癌治療と更に併用することもできる。例えば、抗 C D 4 0 抗体および 1 種またはそれより多くの更なる抗体（例えば、抗 C T L A - 4 抗体および / または抗 P D - 1 抗体および / または抗 P D - L 1 抗体および / または抗 L A G - 3 抗体）は、化学療法レジメンと効果的に併用することができる。これらの場合では、本開示の組み合わせとともに投与される他の化学療法剤の用量を低減させることが可能である（M o k y r e t a l . (1 9 9 8) C a n c e r R e s e a r c h 5 8 : 5 3 0 1 - 5 3 0 4）。かかる組み合わせの 1 つの例として、メラノーマを治療するための抗 C D 4 0 アゴニスト抗体（例えば、抗 C T L A - 4 抗体および / または抗 P D - 1 抗体および / または抗 P D - L 1 抗体および / または抗 L A G - 3 抗体などの更なる抗体の併用をともなうかまたはともなわない）とダカルバジンとの組み合わせがある。別の例として、メラノーマを治療するための抗 C D 4 0 アゴニスト抗体（例えば、抗 C T L A - 4 抗体および / または抗 P D - 1 抗体および / または抗 P D - L 1 抗体および / または抗 L A G - 3 抗体の併用をともなうかまたはともなわない）とインターロイキン - 2（I L - 2）との組み合わせがある。抗 C D 4 0 抗体および抗 C T L A -

10

20

30

40

50

4 抗体および／または抗 P D - 1 抗体および／または抗 P D - L 1 抗体および／または抗 L A G - 3 抗体と化学療法との併用の背後にある科学的根拠は、多くの化学療法化合物の細胞毒性作用の結果としての細胞死によって、抗原提示経路における腫瘍抗原の量の増大がもたらされるはずであるということである。抗 C D 4 0 抗体（抗 C T L A - 4 抗体および／または抗 P D - 1 抗体および／または抗 P D - L 1 抗体および／または抗 L A G - 3 抗体の併用をとまうかまたはともなわない）との相乗作用をもたらし得る他の併用療法としては、放射線、外科手術、またはホルモン枯渇がある。これらのプロトコールのそれぞれが宿主体内の腫瘍抗原の供給源を生じる。血管新生阻害剤を、抗 C D 4 0 抗体および抗 C T L A - 4 抗体および／または抗 P D - 1 抗体および／または抗 P D - L 1 抗体および／または抗 L A G - 3 抗体と組み合わせることもできる。血管新生の阻害は腫瘍細胞の死をもたらし、これが宿主の抗原提示経路に腫瘍抗原の供給源となり得る。

10

【 0 2 6 0 】

唯一の免疫療法剤としての抗 C D 4 0 アゴニスト抗体、または C D 4 0 アゴニストと C T L A - 4 および／または P D - 1 および／または P D - L 1 および／または L A G - 3 ブロッキング抗体との組み合わせを、F c または F c 受容体発現エフェクター細胞を腫瘍細胞にターゲティングする二重特異性抗体と併用することもできる（例えば、米国特許第 5 , 9 2 2 , 8 4 5 号および同第 5 , 8 3 7 , 2 4 3 号を参照）。二重特異性抗体を使用することで 2 つの別々の抗原を標的とすることができる。これらの応答の T 細胞アームは、抗 C D 4 0 抗体と抗 C T L A - 4 抗体および／または抗 P D - 1 抗体および／または抗 P D - L 1 抗体および／または抗 L A G - 3 抗体との組み合わせの使用により強化される。

20

【 0 2 6 1 】

別の例では、唯一の免疫療法剤としての抗 C D 4 0 アゴニスト抗体、または抗 C D 4 0 抗体と更なる免疫賦活剤、例えば、抗 C T L A - 4 抗体および／または抗 P D - 1 抗体および／または抗 P D - L 1 抗体および／または L A G - 3 剤（例えば、抗体）との組み合わせを、リツキサン（登録商標）（リツキシマブ）、ハーセプチン（登録商標）（トラスツズマブ）、ペキサール（登録商標）（トシツモマブ）、ゼヴァリン（登録商標）（イブリツモマブ）、キャンパス（登録商標）（アレムツズマブ）、リムフォシド（登録商標）（エブラツズマブ）、アバスチン（登録商標）（ベバシズマブ）、およびタルセバ（登録商標）（エルロチニブ）などの抗新生物抗体と併用することができる。例として、また、理論に縛られることを望まずに言えば、抗癌抗体または毒素と結合させた抗癌抗体による治療は、癌細胞死（例えば、腫瘍細胞の）をもたらす、これにより、免疫賦活剤、例えば、C D 4 0、C T L A - 4、P D - 1、P D - L 1 または L A G - 3 剤（例えば、抗体）により媒介される免疫反応を増強するものと考えられる。例示的な一態様では、過剰増殖性疾患（例えば、癌腫瘍）の治療は、同時または順次またはこれらの任意の組み合わせで投与される、抗癌剤（例えば、抗体）と、抗 C D 4 0 および場合により更なる免疫賦活剤、例えば、抗 C T L A - 4 および／または抗 P D - 1 および／または抗 P D - L 1 および／または抗 L A G - 3 剤（例えば、抗体）との組み合わせを含んでよく、これにより、宿主による抗腫瘍免疫反応を増強することができる。

30

【 0 2 6 2 】

腫瘍はさまざまな機構により宿主免疫監視を免れる。これらの機構の多くは、腫瘍により発現される免疫抑制性のタンパク質の不活性化により克服できると考えられる。これらのタンパク質としては、特に T G F - （K e h r l e t a l . （1986）J . E x p . M e d . 163 : 1037 - 1050）、I L - 10（H o w a r d & O ' G a r r a （1992）I m m u n o l o g y T o d a y 13 : 198 - 200）、および F a s リガンド（H a h n e e t a l . （1996）S c i e n c e 274 : 1363 - 1365）が挙げられる。これらのタンパク質のそれぞれに対する抗体を、更なる免疫賦活剤、例えば、抗 C T L A - 4 および／または抗 P D - 1 および／または抗 P D - L 1 および／または抗 L A G - 3 剤（例えば抗体）の併用をとまうかまたはともなわない抗 C D 4 0 抗体と更に併用することで、免疫抑制因子の作用

40

50

を中和し、宿主による抗腫瘍免疫反応を支援することができる。

【0263】

宿主免疫反応を活性化するために使用することが可能な他の剤（例えば、抗体）を、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3抗体などの更なる免疫賦活剤の併用をともなうかまたはともなわない抗CD40抗体と更に併用することができる。これらの剤としては、DCの機能および抗原提示を活性化する樹状細胞の表面上の分子が挙げられる。抗CD40抗体（Ridge et al., 前出）を、抗CD40抗体および場合により更なる免疫賦活剤、例えば、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3剤（例えば、抗体）と併用することができる。T細胞共刺激分子に対する他の活性化抗体（Weinberg et al., 前出, Melero et al., 前出, Huttloff et al., 前出）も、T細胞活性化レベルを高めることができる。

10

【0264】

上記に述べたように、造血細胞由来の各種の腫瘍を治療するために骨髄移植が現在用いられている。抗CD40免疫療法を単独で、または抗CTLA-4抗体および/または抗PD-1抗体および/または抗PD-L1抗体および/または抗LAG-3抗体と併用して用いることで、ドナーから移植された腫瘍特異的T細胞の効果を高めることができる。

【0265】

いくつかの実験的治療プロトコールでは、抗原特異的T細胞をエキスビボで活性化および増殖させ、これらの細胞をレシピントに養子移植することで腫瘍に対する抗原特異的T細胞を刺激することを行っている（Greenberg & Riddell, 前出）。これらの方法を用いて、CMVなどの感染因子に対するT細胞応答を活性化することもできる。エキスビボ活性化を、更なる免疫賦活療法、例えば、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3抗体の併用をともなうかまたはともなわない抗CD40の存在下で行うことにより、養子移植されたT細胞の発生頻度および活性が高められるものと予想される。

20

【0266】

本明細書では、免疫賦活剤による過剰増殖性疾患（例えば、癌）の治療にともなう有害事象を改変する方法であって、抗CD40抗体を、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3剤（例えば、抗体）の併用をともなうかまたはともなわずに対象に投与することを含む方法が提供される。例えば、本明細書に記載の方法は、非吸収性ステロイドを患者に投与することにより、免疫賦活性治療抗体により誘発される大腸炎または下痢の発症を低減する方法を提供する。本明細書で使用するところの「非吸収性ステロイド」とは、高い初回通過代謝を示すために、肝臓での代謝後のステロイドの生物学的利用率が低くなる（すなわち、約20%未満）糖質コルチコイドのことである。本明細書に記載される一実施形態では、非吸収性ステロイドはブデソニドである。ブデソニドは、経口投与後に主として肝臓により大半が代謝される局所作用性糖質コルチコステロイドである。ENTOCORT EC（登録商標）（アストラゼネカ社）は、回腸および結腸全体にわたった薬物送達を最適化するために開発された、ブデソニドのpHおよび時間依存性経口製剤である。ENTOCORT EC（登録商標）は、回腸および/または上行結腸が関与する軽度～中度のクローン病の治療に米国内で承認されている。クローン病治療におけるENTOCORT EC（登録商標）の通常の経口用量は6～9mg/日である。ENTOCORT EC（登録商標）は、吸収される前に腸内に放出され、腸粘膜に維持される。ENTOCORT EC（登録商標）は、腸粘膜標的組織を通過した後、肝臓のチトクロムP450系によってわずかな糖質コルチコイド活性を有する代謝産物に大半が代謝される。したがって、生物学的利用率は低い（約10%）。ブデソニドの低い生物学的利用率は、初回通過代謝がそれほど高くない他の糖質コルチコイドと比較して高い治療可能比をもたらす。ブデソニドがもたらす有害作用は、全身作用性の糖質コステロイドと比較して低い視床下部-下垂体抑制など、より少ない。しかしながら、ENTOCORT EC（登録商標）の慢性投与は、副腎皮質亢進およ

30

40

50

び副腎抑制などの全身性の糖質コルチコイド作用をもたらし得る。P D R 5 8 t h e d . 2 0 0 4 ; 6 0 8 - 6 1 0 を参照。

【 0 2 6 7 】

更なる態様において、非吸収性ステロイドと併用される、免疫賦活性治療抗体である抗 C D 4 0、および場合により、抗 C T L A - 4 および / または抗 P D - 1 および / または抗 P D - L 1 および / または抗 L A G - 3 抗体の併用をとともなうかまたはともなわない抗 C D 4 0 抗体は、更にサリチル酸塩と併用することができる。サリチル酸塩としては、例えば、スルファサラジン（アザルフィジン（登録商標） P h a r m a c i a & U p J o h n 社）、オルサラジン（ジペンタム（登録商標） P h a r m a c i a & U p J o h n 社）、バルサラジド（コラザル（登録商標） S a l i x P h a r m a c e u t i c a l s , I n c 社）、およびメサラミン（アサコール（登録商標） P r o c t e r & G a m b l e P h a r m a c e u t i c a l s 社、ペンタサ（登録商標） S h i r e U s 社、カナサ（登録商標） A x c a n S c a n d i p h a r m , I n c 社、ロワザ（登録商標） S o l v a y 社）などの 5 - A S A 剤が挙げられる。

【 0 2 6 8 】

本明細書に記載の方法によれば、サリチル酸塩は、免疫賦活抗体により誘発される大腸炎の発症を低下させる目的で、抗 C T L A - 4 および / または抗 P D - 1 および / または抗 P D - L 1 および / または抗 L A G - 3 抗体の併用をとともなうかまたはともなわない抗 C D 4 0、および非吸収性ステロイドと組み合わせて投与される。したがって、例えば、本明細書に記載の免疫賦活抗体により誘発される大腸炎の発症を低減するための方法は、サリチル酸塩と非吸収性ステロイドとを同時、または順次（例えば、サリチル酸塩を非吸収性ステロイドの 6 時間後に投与する）、またはこれらの任意の組み合わせで投与することを含む。更に、サリチル酸塩と非吸収性ステロイドとは、同じ経路（例えば、両方を経口投与する）、または異なる経路（例えば、サリチレートを経口投与し、非吸収性ステロイドを直腸投与する）で投与することができ、これらの経路は、抗 C D 4 0 および抗 C T L A - 4 および / または抗 P D - 1 および / または抗 P D - L 1 および / または抗 L A G - 3 抗体の投与に用いられる経路と異なってもよい。

【 0 2 6 9 】

本明細書に記載の抗 C D 4 0 抗体および併用抗体療法は、治療される適応症（例えば、癌）に対する特定の有用性について選択される他の周知の療法と併用することもできる。本明細書に記載の抗 C D 4 0 抗体の組み合わせは、既知の薬学的に許容される剤と順次使用することができる。

【 0 2 7 0 】

例えば、本明細書に記載の抗 C D 4 0 抗体および併用抗体療法は、放射線、化学療法（例えば、カンプトテシン（C P T - 1 1）、5 - フルオロウラシル（5 - F U）、シスプラチン、ドキソルビシン、イリノテカン、パクリタキセル、ゲムシタピン、シスプラチン、パクリタキセル、カルボプラチン - パクリタキセル（タキソール）、ドキソルビシン、5 - f u またはカンプトテシン + a p o 2 1 / T R A I L（6 X c o m b o）を使用する）、1 またはそれより多くのプロテアソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブまたは M G 1 3 2）、1 またはそれより多くの B c l - 2 阻害剤（例えば、B H 3 I - 2 '（b c l - x 1 阻害剤）、インドールアミンジオキシゲナーゼ - 1 阻害剤（例えば、I N C B 2 4 3 6 0、インドキシモド、N L G - 9 1 9、または F 0 0 1 2 8 7）、A T - 1 0 1（R -（-）- ゴシポール誘導体）、A B T - 2 6 3（小分子）、G X - 1 5 - 0 7 0（オバトクラックス）、または M C L - 1（骨髄性白血病細胞分化タンパク質 - 1）アンタゴニスト）、i A P（アポトースタンパク質の阻害因子）アンタゴニスト（例えば、s m a c 7、s m a c 4、小分子 s m a c 模倣体、合成 s m a c ペプチド（F u l d a e t a l . , N a t M e d 2 0 0 2 ; 8 : 8 0 8 - 1 5 を参照）、I S I S 2 3 7 2 2（L Y 2 1 8 1 3 0 8）、または A E G - 3 5 1 5 6（G E M - 6 4 0）、H D A C（ヒストンデアセチラーゼ）阻害剤、抗 C D 2 0 抗体（例えば、リツキシマブ）、血管新生阻害剤（例えば、ベバシズマブ）、V E G F および V E G F R を標的とする抗血管新生剤（例えば、ア

バスチン)、合成トリテルペノイド(HHyer et al., Cancer Research 2005; 65: 4799-808を参照)、c-FLIP(細胞FLICE抑制性タンパク質)モジュレーター(例えば、PPAR(ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体)の天然および合成リガンド、5809354または5569100)、キナーゼ阻害剤(例えば、ソラフェニブ)、トラスツズマブ、セツキシマブ、テムシロリムス、ラパマイシンおよびテムシロリムスなどのmTOR阻害剤、ボルテゾミブ、JAK2阻害剤、HSP90阻害剤、PI3K-AKT阻害剤、レナリドマイド、GSK3阻害剤、IAP阻害剤および/または遺伝毒性薬物などの更なる治療と併用(例えば、同時または別々に)することができる。

【0271】

本明細書に記載の抗CD40抗体および併用抗体療法は、1種またはそれより多くの抗増殖性細胞毒性剤と更に併用することができる。抗増殖性細胞毒性剤として使用することができる化合物のクラスには、これらに限定されるものではないが、以下のものが含まれる。すなわち、

【0272】

アルキル化剤(窒素マスタード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホネート、ニトロソウレアおよびトリアゼンを含むが、これらに限定されない):ウラシルマスタード、クロルメチン、シクロホスファミド(シトキサン(登録商標))、フォスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ピボプロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン、およびテモゾロミド。

【0273】

代謝拮抗剤(葉酸アンタゴニスト、ピリミジン類似体、プリン類似体およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤を含むが、これらに限定されない):メトトレキサート、5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、フルダラビンホスフェート、ペントスタチンおよびゲムシタビン。

【0274】

アゴニスト抗CD40抗体と併用するのに適した抗増殖剤としては、これらに限定されるものではないが、タキサン類、パクリタキセル(パクリタキセルは、タキソール(登録商標)として市販されている)、ドセタキセル、ディスコデルモライド(DDM)、ジクチオスタチン(DCT)、ペロルシドA、エポチロン類、エポチロンA、エポチロンB、エポチロンC、エポチロンD、エポチロンE、エポチロンF、フラノエポチロンD、デスオキシエポチロンB1、[17]-デヒドロデスオキシエポチロンB、[18]デヒドロデスオキシエポチロンB、C12,13-シクロプロピル-エポチロンA、C6~C8架橋エポチロンA、trans-9,10-デヒドロエポチロンD、cis-9,10-デヒドロエポチロンD、16-デスメチルエポチロンB、エポチロンB10、ディスコデルモライド、パツピロン(EPO-906)、KOS-862、KOS-1584、ZK-EPO、ABJ-789、XAA296A(ディスコデルモライド)、TZT-1027(ソブリドチン)、ILX-651(タシドチン塩酸塩)、ハリコンドリンB、エリ布林メシル酸塩(E-7389)、ヘミアステリン(HTI-286)、E-7974、クリプトフィシン、LY-355703、メイタンシノイドイムノコンジュゲート(DM-1)、MKC-1、ABT-751、T1-38067、T-900607、SB-715992(イスピネシブ)、SB-743921、MK-0731、STA-5312、エリテロピン、17-アセトキシ-2-エトキシ-6-オキソ-B-homo-estra-1,3,5(10)-トリエン-3-オール、シクロストレプトチン、イソラウリマリド、ラウリマリド、4-epi-7-デヒドロキシ-14,16-ジデメチル-(+)-ディスコデルモライドおよびクリプトチロン1、ならびに当該技術分野では周知の他の微小管安定化剤が挙げられる。

【0275】

異常増殖性細胞を、本明細書に記載の抗CD40抗体による治療とともに、または治療に

10

20

30

40

50

先立って休止状態とすることが望ましい場合、ホルモンおよびステロイド（合成アナログを含む）、例えば 17 α -エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、プレドニゾン、フルオキシメステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、テストラクトン、メゲストロールアセテート、メチルプレドニゾン、メチル-テストステロン、プレドニゾン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、メドロキシプロゲステロンアセテート、リユープロリド、フルタミド、トレミフェン、ゾラデックス（登録商標）を患者に投与することもできる。

【0276】

本明細書に記載の方法または組成物を用いる際、抗模倣薬などの、臨床の現場において腫瘍の増殖または転移の調節に使用される他の薬剤を必要に応じて投与することもできる。

【0277】

化学療法剤の安全かつ効果的な投与のための方法は、当業者には周知のものである。更に、それらの投与は標準的な文献に記載されている。例えば、多くの化学療法剤の投与について、Physicians' Desk Reference (PDR) の例えば 1996 年版 (Medical Economics Company, Montvale, N. J. 07645-1742, USA) に記載されており、その開示を参照により本明細書に援用する。

【0278】

化学療法剤および/または放射線治療は、当該技術分野では周知の治療プロトコールにしたがって投与することができる。化学療法剤および/または放射線治療の投与は、治療される疾患ならびにその疾患に対する化学療法剤および/または放射線治療の既知の効果に応じて変更することができる点は当業者には明らかであろう。また、熟練した臨床医の知識に基づいて、投与された治療剤の患者に対する観察された効果を考慮し、また投与された治療薬に対する観察された疾患の反応を考慮して、治療プロトコール(例えば、投与量および投与の時間)を変更することができる。

VI. 転帰

【0279】

本明細書の実施例に示されるように、抗 CD40 抗体と 1 またはそれより多くの更なる治療剤（例えば、可溶性 CD40 リガンド、または抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA-4 抗体および/または抗 LAG-3 抗体などの別の抗体）との同時投与は、抗体単独、または抗体療法をともなわない 1 種またはそれより多くの更なる治療剤による治療と比較して高い効果を与えるものである。好ましくは、抗 CD40 抗体と 1 またはそれより多くの更なる治療剤との併用は治療上の相乗作用を示す。

【0280】

「治療上の相乗作用」とは、複数の治療剤の組み合わせによる患者の治療が、その最適用量で使用される組み合わせのそれぞれの個々の成分によって得られる転帰に対して治療的に優れた転帰をもたらす現象のことを言う (T. H. Corbett et al., 1982, Cancer Treatment Reports, 66, 1187)。これに関連して、治療上の優れた転帰とは、患者が、a) 組み合わせの個々の成分が組み合わせにおけるのと同じ用量で単独治療としてそれぞれ投与される場合に等しいかまたはそれよりも高い治療効果を得る一方でより少ない有害事象を示すか、または b) 各成分が個々の成分として投与される場合と同じ用量で組み合わせで投与される場合に組み合わせのそれぞれの個々の成分による治療よりも高い治療効果を得る一方で用量制限の毒性を示さない転帰である。異種移植片モデルにおいては、成分のそれぞれがその個々の最大の許容用量を概ね上回らない用量で存在する、その最大の許容用量で使用されるある組み合わせは、例えば、その組み合わせの投与によって、成分が単独で投与される場合に最も効果的な成分による腫瘍増殖の減少の値よりも大きい腫瘍増殖の減少が実現される場合に治療上の相乗作用を示す。

【0281】

したがって、かかる組み合わせの各成分は、組み合わせとして、抗CD40抗体による単独治療または抗体療法をとともなわない更なる治療剤による治療と比較して腫瘍増殖を抑制するうえで相加的または超相加的作用を有する。「相加的」とは、それぞれの個別の成分による単独治療によって得られる最良の別々の結果よりもその程度において（例えば、腫瘍分裂指数または腫瘍増殖の低下度、または腫瘍縮小度または無症状もしくは症状緩和期間の頻度および/または長さ）より大きい結果を意味し、「超相加的」とは、かかる別々の結果の総和よりもその程度において上回る結果を示すために用いられる。一実施形態では、相加的作用は、腫瘍増殖の鈍化または停止として測定される。相加的作用は、例えば、腫瘍のサイズの減少、腫瘍分裂指数の低下、時間の経過にともなう転移性病変の数の減少、全体の応答速度の増大、またはメジアンもしくは全生存率の増大として測定することもできる。別の実施形態では、相加的作用は、Ramos細胞とインキュベートした場合のCD95の誘導の増大、ヒトB細胞とインキュベートした場合のB細胞増殖の増大、および/または樹状細胞とインキュベートした場合のIL12p40の発現の誘導の増大として測定される。

10

【0282】

治療処置の有効性を定量化することができる尺度の非限定的な例の1つとして、下式にしたがって求められるlog10細胞死滅率を計算することがある。すなわち、

$$\log 10 \text{ 細胞死滅率} = TC(\text{日}) / 3.32 \times Td$$

式中、TCは、処置群(T)の腫瘍およびコントロール群(C)の腫瘍が所定の値（例えば、1gまたは10mL）に達した平均時間（日数）としての細胞増殖の遅延を表し、Tdは、コントロール動物において腫瘍の体積が2倍になるのに必要な時間（日数）を表す。この尺度を適用する場合、ある産物は、log10細胞死滅率が0.7より大きいまたは0.7に等しい場合に活性であるとみなされ、また、ある産物はlog10細胞死滅率が2.8より大きい場合に極めて活性が高いとみなされる。この尺度を用いると、成分のそれぞれが概ねその最大の許容用量以下の用量で存在する、それ自体の最大の許容用量で使用されるある組み合わせは、log10細胞死滅率が、最も効果的な成分が単独で投与される場合のそのlog10細胞死滅率の値よりも大きい場合に治療上の相乗作用を示す。例示的な場合では、組み合わせのlog10細胞死滅率は、その組み合わせの最も効果的な成分のlog10細胞死滅率の値を、少なくとも0.1log細胞死滅率、少なくとも0.5log細胞死滅率、または少なくとも1.0log細胞死滅率だけ上回る。

20

30

【0283】

本発明を以下の実施例により更に説明するが、実施例は更なる限定として解釈されるべきではない。本出願の全体にわたって引用される配列表、図面、およびすべての参考文献、特許、および公開された特許出願を、参照により本明細書に明示的に援用するものである。

【実施例】

【0284】

実施例1

CD40特異的ヒトモノクローナル抗体の作製

Harbour（登録商標）トランスジェニックマウスのH2L2系統を可溶性ヒト抗CD40抗原で免疫化することにより、ヒト抗CD40抗体を作製した。Harbour（登録商標）トランスジェニックマウスは、内因性のマウス重鎖（HC）および軽鎖（鎖）のDNA配列をノックアウトし、ヒト可変（V）領域およびラット定常（C）領域の配列をマウスゲノムに安定的に組み込んだものである。

40

【0285】

抗原および免疫化：抗原は、CD40の細胞外ドメインを抗体Fcドメインと融合させた可溶性融合タンパク質（R&D Systems社）、または組換えヒトCD40-m s G2aキメラタンパク質（自社で作製）とした。抗原を、最初の免疫化用に完全フロイント（Sigma社）アジュバントと混合した。この後、抗原を不完全フロイントアジュバントと混合した。更なるマウスを、MPL+TDMアジュバントシステム（Sigma社）に加えた可溶性CD40タンパク質で免疫した。PBSに加えた5~25μgの可溶性

50

組換えCD40抗原、またはPBSに加えた、ヒトCD40を表面発現するようにトランスフェクトした 5×10^6 個のNSO細胞を、アジュバントと1:1で混合した。マウスの腹腔内に200 μ Lの調製した抗原を14日ごとに注射した。抗CD40力価を示した動物に、融合の3~4日前に5~10 μ gの可溶性組換えCD40抗原を静脈内投与した。マウス脾臓を採取し、単離した脾臓細胞をハイブリドーマの調製に使用した。

【0286】

ハイブリドーマの調製：P3x63Ag8.653マウスミエローマ細胞株(ATCC CRL 1580)を融合に使用した。10%FBSを含んだRPMI 1640(Invitrogen)を用いてミエローマ細胞を培養した。10%以下のハイブリドーマ増強サプリメント(Sigma社)、10%FBS(Sigma社)、L-グルタミン(Gibco社)、0.1%ゲンタマイシン(Gibco社)、2-メルカプトエタノール(Gibco社)を、HAT(Sigma社、 1.0×10^{-4} M ヒポキサンチン、 4.0×10^{-7} M アミノプテリン、 1.6×10^{-5} M チミジンを含む培地)とともに含む、更なる培地サプリメントをハイブリドーマ増殖培地に加えた。

【0287】

脾臓細胞をP3x63Ag8.653ミエローマ細胞と6:1の非で混合し、遠心分離によってペレット化した。融合を促進するため、ポリエチレングリコールを静かに混合しながら滴下した。ハイブリドーマを、視認されるコロニーが確立されるまで1~2週間増殖させた。上清を採取し、ヒト可溶性CD40融合タンパク質およびラットFcに特異的な検出を用いたELISAにより、ラットIgGについての最初のスクリーニングに使用した。次いで、IgG陽性上清を、フローサイトメトリーによりCD40特異性についてアッセイした。ハイブリドーマを、カニクイザルCD40との交差反応性についてもスクリーニングしたところ、いずれも結合について陽性であった。

【0288】

ハイブリドーマ細胞を増殖させ、RNA単離およびシーケンシング用に細胞ペレットを凍結した。ヒトmAbのVHおよびVLコード領域を、対応するハイブリドーマからのRNAを用いて同定した。RNAをcDNAに逆転写し、Vコード領域をPCRにより増幅し、PCR産物をシーケンシングし、ヒトIgG2ベクターに挿入して一過性に発現させ、ProteinAカラムクロマトグラフィーにより精製したところ、多くの特に興味深い抗体が単離され、これらを、3C3、3G5、1B4、3B6、6H6、6H6、2E1.2、1B5-NK(この場合、重鎖のFR3のN75K改変後のもの)、および3B6-NS(抗体3B6の軽鎖のFR3をN63S改変してN結合グリコシル化部位を除去した後のもの)と指定した。

【0289】

表1、2、および3に、ヒトmAbのVHおよびVL領域の生殖細胞系の情報およびアミノ酸配列をまとめる(アミノ酸配列の場合、相補性決定領域(CDR)を下線で示す)。対応する核酸配列を、これらの実施例の最後で、「配列表の概要」とタイトルした配列表に示す。

【0290】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1 - 生殖細胞系のデータ

mAb	VH/VL	生殖細胞系		
		V	D	J
3G5	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*01 F (D3-10)	IGHJ4*02 F (JH4b)
	L	IGKV3-15*01 F (L2)		IGKJ5*01 F (JK5)
3C3	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*02 F (D4-b)	IGHJ4*02 F (JH4b)
	L	IGKV1-27*01 F (A20)		IGKJ3*01 F (JK3)
3B6	H	IGHV3-23*01 F (VH3-23)	IGHD2-15*01 F (D2-15)	IGHJ6*02 F (JH6b)
	L	IGKV2-28*01 F (A19)		IGKJ1*01 F (JK1)
6H6	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*01 F (D3-10)	IGHJ4*02 F (JH4b)
	L	IGKV3-15*01 F (L2)		IGKJ4*01 F (JK4)
1B4	H	IGHV3-23*01 F (VH3-23)	IGHD1-26*01 F (D2-15)	IGHJ6*02 F (JH6b)
	L	IGKV2-28*01 F (A19)		IGKJ1*01 F (JK1)
1B5- NK	H	IGHV3-33*03 F (VH3-33)	IGHD6-19*01 F (D2-15)	IGHJ2*01 F (JH2)

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

	L	IGKV1-27*01 F (A20)		IGKJ2*01 F (JK2)
2	H	IGHV3-33*01 F (VH3-33)	IGHD3-10*01 F (D3-10)	IGHJ4*02 F (JH4B)
E1.2	L2	IGKV3-15*01 F (L2)		IGKJ4*01 F (JK4)
3B6	H	IGHV3-23*01 F (VH3-23)	IGHD2-15*01 F (D2-15)	IGHJ6*02 F (JH6b)
NS	L2	IGKV2-28*01 F (A19)		IGKJ1*01 F (JK1)

10

【表 2 - 1】

表 2 - CDR の配列

mAb	VH/ VL	Kabat CDR (Chothia)					
		CDR1	配列 番号	CDR2	配列 番号	CDR3	配列 番号
3G5	H	SNGIH (GFTFSSN)	5、 6	VIWSDGSNKFYAD SVKG (WSDGSN)	7、 8	ASGSGSYYNFFDY (ASGSGSYYNFFDY)	9、 10
	L	RASQSVRSNLA (RASQSVRSNLA)	11、 12	GASTRAT (GASTRAT)	13、 14	QQHNKWIT (QQHNKWIT)	15、 16
3C3	H	RYGMY (GFIFSR)	19、 20	VIWYDGSYKYA DSVKG (WYDGSY)	21、 22	ESPWYYFDY (ESPWYYFDY)	23、 24
	L	RASQGISNYLA (RASQGISNYLA)	25、 26	AATLQS (AATLQS)	27、 28	QKYKSAPFT (QKYKSAPFT)	29、 30
3B6	H	SYAMS (GFTFSSY)	33、 34	GITGTGGSTYYAD SVKG (TGTGGS)	35、 36	RAGGSFYYYGMD V (RAGGSFYYYGMDV)	37、 38
	L	RSSQSLHSTGY NYLD (RSSQSLHSTG YNYLD)	39、 40	LGSNRAS (LGSNRAS)	41、 42	MQALQTPWT (MQALQTPWT)	43、 44

20

30

40

50

【表 2 - 2】

6H6	H	SYGMH (GFTLSSY)	47、 48	VIWDDGSNKYYA DSVKG (WDDGSN)	49、 50	AGGSGRYNYFDY (AGGSGRYNYFDY)	51、 52
	L	RASQSVRSNLA (RASQSVRSNLA)	53、 54	GASTRAT (GASTRAT)	55、 56	QQHNNWLT (QQHNNWLT)	57、 58
1B4	H	SYAMT (GFTFSSY)	61、 62	GITGSGANTFYTD SVKG (TGSGAN)	63、 64	RNGGSYYYYYGM DV (RNGGSYYYYYGM DV)	65、 66
	L	RSSQSLHSSGY NYLD (RSSQSLHSSG YNYLD)	67、 68	LGSNRAS (LGSNRAS)	69、 70	MQALQIPWT (MQALQIPWT)	71、 72
1B5- NK	H	SFGMH (GFTFSSF)	103、 104	LIWFDGSSKYYA DSVKG (WFDGSS)	105、 106	GFAAVAGWYFDF (GFAAVAGWYFD F)	107、 108
	L	RASQGVRYL A (RASQGVRYL A)	109、 110	AATLQS (AATLQS)	111、 112	QKYFSAPYT (QKYFSAPYT)	113、 114
2E1. 2	H	SYGMH (GFTFSSY)	89、 90	VIWDDGSNKYY ADSVKG (WDDGSN)	91、 92	AGSSGRYNYFD Y (AGSSGRYNYFD Y)	93、 94
	L	RASQSVRSNLA (RASQSVRSNL A)	95、 96	GASTRAT (GASTRAT)	97、 98	QQYNKWLI (QQYNKWLI)	99、 100
3B6- NS	H	SYAMS (GFTFSSY)	75、 76	GITGTGGSTYYAD SVKG (TGTGGS)	77、 78	RAGGSFYYYYGMD V (RAGGSFYYYYGM DV)	79、 80
	L	RSSQSLHSTGY NYLD (RSSQSLHSTG YNYLD)	81、 82	LGSNRAS (LGSNRAS)	83、 84	MQALQTPWT (MQALQTPWT)	85、 86

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

表3 -完全長の可変領域配列

mAb	VH/VL	配列 番号	配列
3G5	H	3	QVQLVESGGGVVQP GKSLRLSCAASGFTFSS <u>NGIH</u> WVRQAPGKGL EWVAV <u>VIWSDGSNKFYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAR <u>ASGSGSYNFFDY</u> WGQGTLTVSS
	L	4	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVRSNL</u> AWYQQKPGQAPR LLIY <u>GASTRAT</u> GIPARFSGSGSGTEFTLTINSLQSEDFAVYYC <u>QOH</u> <u>NKWITFGQGR</u> LEIK
3C3	H	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAGSGFIFS <u>RYGMY</u> WVRQAPGKGL LEWVAV <u>VIWYDGSYKYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE EDTAVYYCARESPWYYFDYWGQGTLTVSS
	L	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC <u>RASQGISNYL</u> AWYQQKPGKVPK LLIY <u>AASTLQSG</u> VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKY <u>KSAPFTFGPGTKVDIK</u>
3B6	H	31	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS <u>SYAMS</u> WVRQAPGKGL EWVS <u>GITGTGGSTYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYVQMNSLRAE DTAVYYCAK <u>RAGGSFY</u> YGGMDYWGQGTTTVSS
	L	32	DIVMTQSPPLSLPVTGPGEPAISCR <u>SSQSLHSTG</u> NYLDWYLQKPG QSPQLLIY <u>LGSNRAS</u> GVPDFRNGSGSGTDFTLKISRVEAEDFQVYY <u>CMQALQTPWTF</u> GHGKVEIK
6H6	H	45	QVQLVESGGGVVQPGRSLRFSCAASGFTLSS <u>SYGMH</u> WVRQAPGKGL LEWVAV <u>VIWDDGSNKYYADSVKGR</u> FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE EDTAVYYCAR <u>AGGSGRYNYFDY</u> WGQGTLTVSS
	L	46	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <u>RASQSVRSNL</u> AWYQQKPGQAPR LLIY <u>GASTRAT</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISLQSEDFAVYYC <u>QOHN</u> <u>NWLTFGGG</u> TKVEIK

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

1B4	H	59	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYAMT WVRQVPGKGL EWVSGITGSGANTFYTD SVKGR FTISRDN SN SLYLQMNSLRAD DTAVYYCAK RNGGSYYYYYGMDV WGQGTITVTVSS
	L	60	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA ISCRSSOSLLHSSGYN YLDWYLQKPG QSPQLLIY LGSNRAS GVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CMQALOIPWTF GQGTKVEIK
1B5- NK	H	101	QVQLVESGGGVVQPG SRSLRL SCAASGFTFS SFGMH WVRQAPGKGL LEWV TLIWFDGSSKYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVYYCVR GFAAVAGWYFDFW GRGTLTVTVSS
	L	102	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGV RKYLA WYQQKPGKVP KLLIY AAS TLQSGVPSRFS SGSGTDFTL TISSLQPEDVATYYC QK YFSAPYTF GQGTKLEIK
2E1. 2	H	87	QVQLVESGGGVVQPG SRSLRL SCAASGFTFS SYGMH WVRQAPGKGL LEWVA VIWDDGSNKYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYL QMNSLRA EDTAVYYCAR GSSGRYYNYFDY WGQGTITVTVSS
	L	88	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASQSV RSNLA WYQQKPGQAPR LLIY GASTRAT GIPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYHC QOYN KWLIF GGG GTKVEIK
3B6- NS	H	73	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMS WVRQAPGKGL EWVSGITG TGGSTYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYV QMNSLRAE DTAVYYCAK RAGGSFY YYYGMDVWGQGTITVTVSS
	L	74	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPA ISCRSSOSLLHSTGYN YLDWYLQKPG QSPQLLIY LGSNRAS GVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFGVYY CMQALQTPWTF FGHG GTKVEIK

10

20

抗体 3 C 3 の重鎖および軽鎖の完全なアミノ酸配列は以下のとおりである。

軽鎖配列（リーダー配列は除去してある）（配列番号 1 3 6）

【化 1】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAAS**TLQSGVPSRFS**
GSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYKSAPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVCLLN**NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST**
LTL**SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**

30

重鎖配列（リーダー配列は除去してある）（配列番号 1 3 5）

【化 2】

QVQLVESGGGVVQPG**SRSLRL**SCAGSGFIFSR**YGM**YWVRQAPGKGL**EWVAVI**WYDGSYKY**Y**
ADSVKGRFTISRDN**SKNTLYL**QMNSLRAEDTAVYYCARESPWY**YFDYWGQGT**LT**TVSSAST**
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV**DHKPSNTKVDKTVERKCCVECP**PCAPP
VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD**WLN**GKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK**TPP**
MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV**FSCSV**MHEALHNHYTQKSLSLSPG

40

それぞれの場合で、可変配列はイタリック体で示し、定常ドメインは太字で示している。

定常ドメイン配列は、C末端のリシンを除去した Ig G 2 配列である。

同じ定常ドメイン配列を、上記に示したそれぞれの可変配列とともに他の抗体で使用した。

【0 2 9 1】

実施例 2

バイオレイヤー干渉法（BLI）によるヒト mAb のアフィニティー及び速度定数の測定

50

異なるヒト抗CD40抗体の結合アフィニティーおよび結合速度を、Octet（登録商標）QKe装置（Pall ForteBio社、カリフォルニア州、メンローパーク）を製造者のガイドラインにしたがって使用してバイオレイヤー干渉法（BLI）により調べた。

【0292】

実施例1で得られた精製抗体を、Anti-Human Fc Capture（AHC）バイオセンサー（ForteBio社、製品番号18-5060）上に捕捉した。各抗体は、希釈バッファー（10mM PO4 + 150mM NaCl + 1mg/mL BSA + 0.5% Tween 20、pH 7.2）で0.5μg/mLに調製し、新たに水を加えたばかりのAHCバイオセンサーに、25、1000rpmのプレート振盪速度で35～50秒間ロードし、0.2nmのターゲット応答を得た。反応速度パラメータに対する被検質の質量輸送の影響を制限するために低濃度のリガンドを捕捉させた。1つのアッセイにつき、8個のバイオセンサーに同じ抗体をロードした。

10

【0293】

抗体をロードしたバイオセンサーの6個を、被検質として可溶性ヒトCD40-MsIgG2a（Celldex社、SDS-PAGEで60kD）に曝露することにより、結合を測定した。アフィニティー測定値は、被検質を、25および1000rpmのプレート振盪速度にて希釈バッファーで3.13～0.098nMの範囲に2倍連続希釈することにより求めた。抗体をロードしたバイオセンサーを各被検質ウェル内で1200秒間、結合させた後、各バイオセンサーを希釈バッファーウェルに2.5時間（9000秒）移して解離測定を行った。

20

【0294】

それぞれの場合で、捕捉された抗体を有する残りの2個のバイオセンサーを、結合および解離段階で希釈バッファーウェルに入れておくことで対応するコントロールとした。バックグラウンドを差し引いて、バイオセンサーのドリフトおよびバイオセンサーからの抗体の解離を説明するためにコントロールバイオセンサーのデータを用いた。

【0295】

ForteBio社のデータ解析ソフトウェアのバージョン8.2.0.7（Pall ForteBio社、カリフォルニア州、メンローパーク）をそれぞれの場合で使用して、捕捉抗体に対する希釈バッファー中の一連の濃度の被検質の結合から反応速度パラメータを導出した。結合および解離曲線を、データ解析ソフトウェアを製造者のガイドラインにしたがって使用して1:1の結合モデルに当てはめた。

30

【0296】

このようにして求めたアフィニティーおよび反応速度パラメータ（バックグラウンドを引いたもの）を図1に示す。なお、図中、 k_{on} = 結合速度定数、 k_{dis} = 解離速度定数、 $K_D = k_{dis} / k_{on}$ の比によって求められる解離平衡結合定数である。

【0297】

実施例3

CD40に対するヒトmAbの結合特性を測定するためのアッセイ

マイクロタイタープレートに、PBSに加えた組換えヒトCD40-Fcをコーティングし、その後、PBSに加えた5%ウシ血清アルブミンでブロッキングした。実施例1で得られた、ProteinAで精製した各ヒトmAbおよびアイソタイプコントロールを異なる濃度で加え、37℃でインキュベートした。各プレートをPBS/Tweenで洗浄してから、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させたヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂ 特異的ポリクローナル試薬と37℃でインキュベートした。洗浄の後、各プレートをHRP基質で発色させ、マイクロタイタープレートリーダーを用いてOD450～650で分析した。代表的な結合曲線を図2に示す。

40

【0298】

カニクイザルが抗CD40mAbについて試験を行ううえで関連のあるモデルであることを確立するため、精製したカニクイザルPBMCまたはヒトPBMCを異なる濃度の抗ヒ

50

トCD40mAbと、プレートシェーカー上で室温で20分間インキュベートした。次いで、細胞を、0/1%BSAおよび0.05%NaN₃を含んだPBS(PBA)で2回洗浄した。ヤギ抗ヒトIgG Fc-PE抗体をプレートシェーカー上で室温で20分間加えた。この後、アロフィコシアニン(APC)結合CD20抗体で染色してB細胞を同定した。細胞をフローサイトメトリーにより分析し、結合曲線を図3に示した。図はカニクイザルとヒトでCD40に対する同様の結合を示している。

【0299】

実施例4

ELISAによるsCD40Lの結合のブロッキング

可溶性CD40リガンド(sCD40L)のCD40タンパク質への結合に対する、実施例1で得られたヒトmAbの影響をELISAにより測定した。マイクロタイタープレートをR&D Systems社より販売される2μg/mlの可溶性組換えヒトCD40/Fcキメラでコーティングした後、5%PBAでブロッキングした。抗CD40抗体([最終]=100μg/mL)プレートに加え、次いで、ImmuneX社より販売される可溶性ヒト組換えCD40L/ビオチン([最終]=50μg/mL)を加えた。CD40に捕捉されたrCD40Lを、ストレプトアビジン-HRPおよび基質としてSuper Blue TMBを用いて検出した。結果を図4AおよびBに、示されるようなコントロールとともに示す。

【0300】

実施例5

CD40細胞への結合

ヒトCD40をその表面上に発現している細胞上のCD40に結合する抗CD40ヒトmAbの能力を、以下のようにしてフローサイトメトリーにより調べた。

【0301】

実施例1で得られた抗体を、ヒトCD40をその表面上に発現しているヒト細胞株に対する結合について試験した。ProteinAで精製したヒトmAbである3C3、3G5、1B4、3B6、および6H6を、ヒトCD40を発現しているRaji細胞及びRamos細胞とプレートシェーカー上で室温でインキュベートした。20分後、細胞を、0/1%BSAおよび0.05%NaN₃を含んだPBS(PBA)で洗浄し、結合した抗体を、細胞をPE標識ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的プローブとインキュベートすることにより検出した。余分なプローブをPBAで細胞から洗い流し、細胞にともなう蛍光を、FACSCanto II(登録商標)装置(BD Biosciences社、米国、ニュージャージー州)を製造者の指示にしたがって使用して測定した。

【0302】

図5(Raji細胞に対する結合)および図6(Ramos細胞に対する結合)に示されるように、ヒトmAbは、抗体濃度の関数として、ヒトCD40を発現する細胞に高いレベルの結合を示した。

【0303】

実施例6

Ramos細胞上でのCD95の誘導

Ramos細胞を、2μg/mLの実施例1で得られたヒト抗CD40mAbと、37、6%CO₂で一晩インキュベートした。翌日、細胞をPBAで1回洗い、PE結合抗CD95抗体(Becton Dickinson社)により、振盪しながら、室温で20分間染色した。余分な標識抗体を洗い流し、各試料を、FACSCanto II(登録商標)装置(BD Biosciences社、米国、ニュージャージー州)で読み取った。図7Aおよび7B(図中、示されるように、影付きで示したプロットは非処理/コントロール細胞を示し、実線は抗体で処理した細胞を示す)に示されるように、3C3および1B5-NK抗体ではCD95の増大を示し、他の抗体3G5、1B4、3B6、6H6、2E1.2、および3B6-NSは、表面に発現されるCD95の発現の強い増大を誘導することができた。

10

20

30

40

50

【0304】

実施例 7

樹状細胞の活性化

樹状細胞を、以下のようにしてヒト単球から誘導した。

P B M C を $T 175 \text{ cm}^2$ のフラスコに加え、単球を約 2 時間、 37°C 、 $6\% \text{ CO}_2$ で接着させた。細胞を取り出し、単球を $10\% \text{ FBS}$ 、 10 ng/mL IL-4 (R & D Systems 社) および 100 ng/mL GM-CSF (R & D Systems 社) を含む R P M I 中で 7 日間培養した。細胞を収穫し、 $\text{CD}11c$ の発現により樹状細胞であることを確認した (図示せず)。

【0305】

次いで、細胞を g/mL の実施例 1 で得られた $3C3$ および $3G5$ ヒト抗 $\text{CD}40$ 抗体、および適当なコントロールの存在下で、 37°C 、 $6\% \text{ CO}_2$ にてインキュベートした。72 時間後に細胞を収穫し、上清を回収して保存し、サイトカイン分析を行った。細胞を、振盪下、室温で 20 分間、以下の標識した抗体、すなわち、 HLA-DR V450 、 $\text{CD}54 \text{ PE}$ 、 $\text{CD}86 \text{ APC}$ 、および $\text{CD}83 \text{ BV510}$ (いずれも BD 社より販売されるもの) で染色した。この後、細胞を 2 回洗浄し、F A C S C a n t o I I (登録商標) 装置 (BD Biosciences 社、米国、ニュージャージー州) で分析した。図 8 A は、示される抗体またはコントロールとインキュベートした際のこれらのマーカーのそれぞれについて発現レベルを示している。

【0306】

$\text{IL-12 p}40$ の誘導を、これらの 72 時間培養物から得られた上清で E L I S A (R & D Systems 社) によって評価した。図 9 A は、示されるように、コントロールと比較しての $3C3$ および $3G5$ 抗 $\text{CD}40$ 抗体による $\text{IL-12 p}40$ 産生の増大を示している。

【0307】

更なる実験において、細胞を、 10 、 1 および $0.1 \mu\text{g/mL}$ の実施例 1 で得られた $3C3$ および $3G5$ ヒト抗 $\text{CD}40$ 抗体の存在下で、 37°C 、 $6\% \text{ CO}_2$ にてインキュベートした。48 時間後に細胞を収穫し、上清を回収して保存し、サイトカイン分析を行った。細胞を、振盪下、室温で 20 分間、 $\text{CD}54$ で標識した抗体 (BD 社) で染色した。この後、細胞を 2 回洗浄し、F A C S C a n t o I I (登録商標) 装置 (BD Biosciences 社、米国、ニュージャージー州) で分析した。図 8 B は、示される抗体またはコントロールとインキュベートした際の $\text{CD}54$ の発現レベルを示している。

【0308】

$\text{IL-12 p}40$ の誘導を、これらの 48 時間培養物から得られた上清で E L I S A (R & D Systems 社) によって評価した。図 9 B は、示されるように、コントロールと比較しての $3C3$ および $3G5$ 抗 $\text{CD}40$ 抗体による $\text{IL-12 p}40$ 産生の増大を示している。

【0309】

実施例 8

B 細胞の活性化

全血を $10 \mu\text{g/mL}$ の実施例 1 で得られた $3C3$ および $3G5$ 抗 $\text{CD}40$ 抗体と、 37°C 、 $6\% \text{ CO}_2$ で一晩インキュベートした。翌日、以下の標識抗体、すなわち、 $\text{CD}54 \text{ PE}$ 、 HLA-DR V450 、 $\text{CD}23 \text{ PerCP-Cy5.5}$ 、 $\text{CD}69 \text{ APC}$ 、 $\text{CD}86 \text{ APC}$ 、 $\text{CD}38 \text{ PerCP-Cy5.5}$ および $\text{CD}71 \text{ PE}$ を用いて B 細胞および活性化マーカーを染色した。細胞を振盪下、室温で 20 分間、染色し、F A C S C a n t o I I (登録商標) 装置 (BD Biosciences 社、米国、ニュージャージー州) で読み取った。図 10 A は、示されるように、これらのマーカーのそれぞれについてコントロールと比較しての発現レベルの変化を示す。

【0310】

更なる実験において、全血を 10 、 1 、および $0.1 \mu\text{g/mL}$ の実施例 1 で得られた 3

10

20

30

40

50

C 3 および 3 G 5 抗 C D 4 0 抗体と、3 7 、6 % C O₂ で一晩インキュベートした。翌日、以下の標識抗体、すなわち、C D 1 9 V 5 0 0、H L A - D R V 4 5 0、C D 8 6 A P C (いずれも B D 社より販売されるもの) を用いて B 細胞および活性化マーカーを染色した。細胞を振盪下、室温で 2 0 分間、染色し、F A C S C a n t o I I (登録商標) 装置 (B D B i o s c i e n c e s 社、米国、ニュージャージー州) で読み取った。図 1 0 B は、示されるように、これらのマーカーのそれぞれについてコントロールと比較しての発現レベルの変化を示す。

【0311】

実施例 9 N F の活性化

C D 4 0 を発現するルシフェラーゼレポーター細胞株を、異なる濃度の実施例 1 で得られたヒト抗 C D 4 0 抗体と 3 7 、6 % C O₂ で 6 時間インキュベートした。ルシフェラーゼの発現を、製造者のガイドラインにしたがって P r o m e g a 社によるルシフェラーゼアッセイシステムで検出した。図 1 1 A および 1 1 B は、抗体濃度の関数として 3 C 3、3 G 5、1 B 4、3 B 6、6 H 6、2 E 1 . 2、1 B 5 - N K、および 3 B 6 - N S 抗体により誘導された高いレベルの N F k B 活性化を示す。

【0312】

実施例 1 0

R a j i 異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍殺滅

C B . 1 7 S C I D マウス (T a c o n i c B i o s c i e n c e s , I n c 社より購入したもの) を病原体のないマウス施設で飼育した。リンパ腫 R a j i 細胞 (1 x 1 0⁶ 個) を、1 群 5 匹とした S C I D マウスに皮下注射した。1、5、1 1 日目にこれらのマウスを、C D 4 0 ヒト m A b クローン 3 C 3 および 3 G 5 を投与 1 回当たり 0 . 3 m g 腹腔内投与して処理した。腫瘍の増殖をノギスを用いて週 2 回測定した。腫瘍増殖および生存率分析の結果を図 1 2 に示すが、これらの結果より、腫瘍チャレンジを行ったマウスでは、抗 C D 4 0 抗体による処理により腫瘍の増殖が阻害され、生理食塩水で処理したコントロールと比較して生存期間が有意に延びたことが理解できる。

【0313】

実施例 1 1

R a m o s 異種移植片 S C I D マウスモデルにおける腫瘍殺滅

C B . 1 7 S C I D マウス (T a c o n i c B i o s c i e n c e s , I n c 社より購入したもの) を病原体のないマウス施設で飼育した。ヒトリンパ腫 R a m o s 細胞 (1 x 1 0⁶ 個) を、1 群 5 匹とした S C I D マウスに 0 日目に皮下注射した。1、5、1 1 日目にこれらのマウスを、抗 C D 4 0 ヒト m A b 3 C 3 および 3 G 5 を投与 1 回当たり 0 . 3 m g 腹腔内投与して処理した。腫瘍の増殖をノギスを用いて週 2 回測定した。

【0314】

図 1 3 に示される結果は、抗 C D 4 0 m A b が、生理食塩水で処理したコントロールと比較して腫瘍体積の成長を有意に阻害し、腫瘍チャレンジを行ったマウスで 1 0 0 % (3 G 5) または 8 0 % (3 C 3) の生存率が得られたことを示している。

【0315】

実施例 1 2

T 細胞の増殖

バフィーコート製剤から単離したヒト末梢血単核球 (P B M C) を 0 . 5 μ M のカルボキシフルオロセインスクシンイミジルエステル (C F S E) で、5 分間、回転させながら室温で標識した。C F S E 標識した P B M C (1 . 5 x 1 0⁶ 個) を、0 . 2 μ g / m L の抗 C D 3 抗体 (O K T 3) をドライコートした各ウェルに分注した。

C D 4 0 抗体 (3 G 5、3 C 3、1 4 1 2) またはアイソタイプコントロール (I g G 2) を各ウェルに可溶形態で 1 0 μ g / m L の最終濃度で分注した。各プレートを、3 7 (5 % C O₂) でインキュベートし、6 日目に細胞を収穫し、抗 C D 3 A P C またはアイソタイプコントロールで染色し、フローサイトメトリーにより分析した。代表的なプロットを図 1 4 A に示すが、この図より、C D 3 + ゲートにおける C F S E 染色の強度の低下

10

20

30

40

50

によって示されるように、各抗体がT細胞の増殖を有意に促進したことが理解できる。繰り返し実験の結果を図14Bに示すが、図は、アイソタイプコントロールと比較しての抗CD40抗体による分裂細胞の増加を示している。

【0316】

実施例13

Fc受容体相互作用とは無関係なCD40への結合

マイクロタイタープレートに、PBSに加えた組換えヒトCD40-Fcをコーティングし、その後、PBSに加えた5%ウシ血清アルブミンでブロッキングした。Protein Aで精製したヒトmAb（記載される全IgGおよびF(ab')₂フラグメント）を異なる濃度に加え、37℃でインキュベートした。各プレートをPBS/Tweenで洗浄してから、西洋ワサビペルオキシダーゼと結合させたヤギ抗ヒトIgG-F(ab')₂特異的ポリクローナル試薬と37℃でインキュベートした。洗浄の後、各プレートをHRP基質で発色させ、マイクロタイタープレートリーダーを用いてOD450~650で分析した。結果を図15に示す。各抗体のIgG2およびF(ab')₂部分は、CD40-Fcとの結合について同様の濃度依存性を示している。

10

【0317】

実施例14

Fc受容体相互作用とは無関係なCD40の活性化

上記実施例9で得られた、CD40を発現するルシフェラーゼレポーター細胞株を、異なる濃度のヒト抗CD40抗体（記載されるような全IgGおよびF(ab')₂フラグメント）と37℃、6%CO₂で6時間インキュベートした。ルシフェラーゼの発現を、製造者のガイドラインにしたがってPromega社のルシフェラーゼアッセイシステムで検出した。結果を図16に示す。これらの結果は、Fcドメインを有する完全な抗体およびFcドメインを有さない対応するF(ab')₂部分がいずれもレポーター細胞株においてNFκBを活性化できることから、3C3および3G5によるレポーター細胞株のCD40媒介活性化にとってFc受容体への結合が必要ではないことを示している。

20

【0318】

実施例15

Fc受容体相互作用とは無関係なCD95の誘導

Ramos細胞を、異なる濃度のヒト抗CD40mAb（記載されるような全IgGおよびF(ab')₂フラグメント）と、37℃、6%CO₂で一晩インキュベートした。翌日、細胞をPBAで1回洗い、PE結合抗CD95抗体（Becton Dickinson社）により、振盪しながら、室温で20分間染色した。余分な標識抗体を洗い流し、各試料を、FACSCanto II（登録商標）装置（BD Biosciences社、米国、ニュージャージー州）で読み取った。結果を図17に示す。これらのデータは、3G5がCD40+ヒトリンパ芽球株Ramos上にCD95の発現を誘導するうえでFc受容体相互作用が必要でないことを示している。

30

【0319】

実施例16

sCD40Lとの相乗作用

Ramos細胞を、抗体3C3と、0.1mg/mlの可溶性CD40リガンドの存在下または非存在下で一晩インキュベートした。この後、細胞を抗CD95-PE抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析した。結果を図19に示すが、この結果は、抗CD40抗体3C3がsCD40Lと相乗的に作用することを示すものである。したがって、抗体3C3（および3C3と同じエピトープに結合する抗CD40抗体）は、可溶性CD40リガンド（sCD40L）と相乗的なアゴニスト作用を示し、したがって、ヒトCD40のリガンド結合部位に結合するものを含む他の治療薬と相乗作用を示すことができる。代表的な相乗作用としては、例えば、免疫機能のアップレギュレーション（例えばワクチン療法におけるT細胞媒介性免疫反応、癌治療におけるNK活性化など）、細胞増殖の阻害（例えば癌治療における）、および/またはAPCによる抗原のプロセッシングおよび提示

40

50

の促進（例えばワクチン療法における）が挙げられる。

【0320】

実施例17

抗CD40ヒト抗体3C3および3G5およびsCD40のエピトープマッピング

可溶性CD40（sCD40）の短縮型および変異型フラグメントの作製

アミノ酸残基1～173（配列番号133）にわたる完全長の細胞外ドメイン（ECD）をコードした可溶性CD40（sCD40）のcDNA、ならびにアミノ酸1～94、36～130、および84～173をコードした3つのより小さなフラグメントをGenScriptにより合成し、N末端ヒト軽鎖およびC末端Flagタグとともに哺乳動物発現ベクターにインフレーションで挿入した。得られた-sCD40L-Flag融合タンパク質を一過性トランスフェクションによりExpiCHO-S細胞（SAFC社）で発現させた。CD40抗体3C3はヒトおよびサルを認識するが、マウスCD40は認識しないため、一連の変異sCD40aa1～94 cDNAを、図20および21のアラインメントに示されるようなヒト配列とマウス配列との相違に基づいて設計した。これらの変異体を合成し、GenScriptによりクローニングした。これらの短縮型または変異型フラグメントのすべてを、上記に述べたように同じベクターにクローニングし、同じ細胞株によって発現させた。

【0321】

ELISAによる結合の測定

一連のsCD40フラグメントに対する3C3の結合をELISAにより試験した。1 μg/mlの精製-sCD40-Flag融合タンパク質またはsCD40融合タンパク質を含んだCHO細胞上清を、PBSに加えた5 μg/mlのマウス抗Flag抗体（Sigma社）で予めコーティングしたマイクロタイタープレートに捕捉させ、PBSに加えた5%ウシ血清アルブミンでブロッキングした。CD40抗体とのインキュベーション後に、各マイクロタイタープレートをPBS/Tweenで洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したヤギ抗ヒトIgG Fcポリクローナル試薬とインキュベートした。洗浄の後、各プレートをHRP基質で発色させ、マイクロタイタープレートリーダーを用いてOD450～650で分析した。鎖の結合を測定するためのヤギ抗ヒトIgG Fab2-HRPを用いたELISAを平行して行って、異なるトランスフェクションからのsCD40融合タンパク質の発現を評価した。

【0322】

約1 μg/mlの完全長sCD40および3つの短縮型フラグメントを用いたELISA分析により、アミノ酸残基1～94をコードしたフラグメントは3C3及び完全なECDに結合したが、アミノ酸残基36～130または84～173をコードしたフラグメントはまったく結合しなかった（表4を参照）ことから、sCD40のN末端側残基1～94は、3C3の結合に必要なかつ充分であることが示された。

【0323】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4

平均のOD

フラグメントのアミノ酸残基	3C3	αFab2HRP
1-173	1.264	1.264
1-94	1.803	1.720
36-130	0.024	1.695
84-173	0.024	1.669
アミノ酸 1 ～ 94 の変異フラグメント		
A (1-5)	0.189	1.718
B (13-15)	2.032	1.730
C (25, 26, 28, 30)	1.487	1.685
D (33-36)	0.092	1.631

これらの結果に基づくと、3C3の重要な認識部位はアミノ酸1～35内に存在する。
 3C3の結合部位のコンフォメーションを組織するための重要な領域およびアミノ酸残基
 を更に同定するため、約2μg/mlの13種類の突然変異sCD40（アミノ酸残基1
 ～94）フラグメント（4種類の領域多重突然変異および9種類の単一突然変異）をEL
 ISAにより試験した（別々の実験の結果を示す表5および6、ならびに図22を参照）。
 【0324】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5

平均のOD

フラグメントのアミノ酸残基	3C3	α Fab2HRP
1-94	2.157	1.473
アミノ酸 1 ～ 9 4 の変異フラグメント		
A (1-5)	0.167	1.489
D (33-36)	0.124	1.429
点突然変異		
E1G	1.965	1.487
P2Q	2.077	1.490
P3S	2.011	1.489
T4V	2.152	1.519
A5T	1.126	1.517
E33A	1.620	1.521
F34L	1.883	1.500
T35E	2.072	1.487
E36K	1.369	1.433
PBA	0.031	0.011

【 0 3 2 5 】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 6

OD

フラグメントのアミノ酸残基	3C3	3G5	α Fab2HRP
完全長 1 ~ 173	2.364	2.214	1.525
1-94	2.151	2.170	1.755
36-130	0.029	0.048	1.716
84-173	0.024	0.038	1.599
アミノ酸 1 ~ 94 の変異フラグメント			
A (1-5)	0.250	2.139	1.699
B (13-15)	2.375	1.876	1.710
C (25, 26, 28, 30)	2.016	2.161	1.604
D (33-36)	0.233	0.042	1.548
点突然変異			
E1G	2.011	2.083	1.720
P2Q	2.197	2.158	1.754
P3S	2.012	2.188	1.712
T4V	2.213	2.210	1.664
A5T	1.511	2.201	1.698
E33A	1.695	0.074	1.709
F34L	1.845	1.192	1.686
T35E	2.102	2.128	1.682
E36K	1.689	1.930	1.674
<0.25			
0.25<x<1.2			
1.2<x<1.9			

【0326】

残基 1 ~ 5 の多重突然変異は 3 C 3 をほとんど完全に阻害した。残基 1 ~ 4 の点突然変異は 3 C 3 に対する結合を低下させなかった。残基 5 の点突然変異は結合を著しく低下させたが、多重突然変異タンパク質ほどではなかった。

【0327】

残基 13 ~ 15 の多重突然変異は 3 C 3 の結合を低下させなかった。残基 25、26、28 および 30 の多重突然変異は 3 C 3 の若干の低下を引き起こした。点突然変異はこれらの領域では試験しなかった。

【0328】

残基 33 ~ 36 の多重突然変異は 3 C 3 の結合をほとんど完全に阻害した。残基 35 の点

突然変異は結合に影響しなかった。33、34および36の点突然変異は3C3の結合を低下させたが、多重突然変異タンパク質ほどではなかった。別のCD40抗体として3G5を、すべてのフラグメントおよび突然変異体について試験したところ、3C3とは異なることが示された(表6)。残基1~5の多重突然変異は結合を低下させなかったが残基33~36の突然変異は結合を消失させた。3C3と異なり、残基33の点突然変異は結合を完全に消失させ、34の突然変異は結合を著しく低下させた。

【0329】

実施例18

生物学的および毒性プロファイル

非GLPのパイロット実験をナイーブなカニクイザルで行った。この実験は、3C3の生物学的および毒性プロファイルについての予備データを得るために設計した。別の抗CD40抗体(3G5)も評価した。被検物質は、1日目に伏在静脈に静脈内注射することにより投与し(0.2mg/kgまたは溶媒)、29日目に再び投与した(2mg/kgまたは溶媒)。1日目および29日目にキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)も動物に皮下注射した(1mg)。潜在的な被検物質に関連した作用の評価は、臨床徴候、体温、臨床病理学パラメータ(血液学的所見、凝集、臨床化学的所見、および尿検査)、抗薬剤抗体、サイトカイン、T細胞依存性抗体反応分析(TDAR)、フローサイトメトリー、および毒物動態学パラメータに基づいて行った。体重を被検物質の投与に先立って1回記録し、その後、週1回記録した。これは、剖検を行わない生存試験として設計した。

【0330】

この実験の3C3または3G5の投与は、カニクイザルで、いずれの毒性パラメータもコントロールレベルの有意に外側となることなく、高い忍容性を示した。注目すべき点として、3C3を投与したサルでは、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ASAT)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、およびクレアニンキナーゼの上昇はわずかであった(図23A~23C)。いずれの抗CD40抗体を投与した動物においても、薬理的低下がIL-12(図24)、白血球(図25A)、好中球(図25B)、およびリンパ球(図25C)が認められ、B細胞の一過性の減少が最も顕著であった(図26および27)。結論として、この条件下では3C3および3G5が示した毒性のエビデンスは最小限であった。

【0331】

実施例19

Fc相互作用とは無関係なB細胞の増殖

【0332】

ヒトB細胞を、CD19ビーズを用いた磁気選択により末梢血単核球から単離した。細胞を、5分間回転させながら、室温で0.5μMのカルボキシフルオロセインスクシンイミジルエステル(CFSE)で標識した。標識した細胞を、抗CD40mAbとして3C3、またはアイソタイプコントロール(全IgGおよびF(ab')₂フラグメントの両方)の存在下で6日間、培養した。この後、細胞を収穫し、フローサイトメトリーにより増殖について分析した。結果を図28に示すが、この結果は、Fcドメインを有する完全な抗体およびFcドメインを有さないその対応するF(ab')₂部分がいずれもB細胞の増殖を誘導できることから、3C3によるCD40媒介増殖にFc受容体への結合は必要ではないことを示している。

【0333】

実施例20

ヒトB細胞におけるCD40Lとの相乗作用

ヒトB細胞を単離し、実施例19と同様にして標識した。抗CD40mAbとして3C3、またはアイソタイプコントロール0.1μg/mLを、0.1μg/mLの可溶性CD40L(Immunex社)の存在下または非存在下で細胞と6日間、インキュベートした。図29は、3C3単独またはアイソタイプコントロール抗体をCD40Lと組み合わせた場合のいずれにおいても有意な増殖は認められないが、培養中でCD40Lを3C3

と組み合わせた場合に増殖が誘導されることを示している。

【 0 3 3 4 】

樹状細胞を調製し、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ の可溶性CD40Lを加えるかまたは加えずに、実施例7と同様にして $0.5 \mu\text{g/mL}$ の3C3と培養した。IL-12p40の産生をELISA (R&D Systems社)により測定した。図30は、3C3単独またはアイソタイプとCD40Lの組み合わせによる低い産生レベルと比較して、3C3とCD40Lとの組み合わせはより高いレベルのIL-12p40を誘導したことを示している。

【 0 3 3 5 】

実施例21

全血中のサイトカイン応答

10

全血を $10 \mu\text{g/mL}$ のアイソタイプコントロールまたは3C3、またはポジティブコントロールとしてLPSと一晩インキュベートした。翌日、血漿を回収し、サイトカインをELISA (R&D Systems社)により測定した。結果を図31に示すが、この結果は、炎症性サイトカインの有意な産生が見られなかったことを示している。

均等物

当業者であれば、通常の実験以上のことを行うことなく、本明細書に記載される発明の特定の実施形態の多くの均等物が認識されるか、または確認できるであろう。かかる均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されるものとする。

配列表

20

30

40

50

【表 7 - 1】

配列 番号	説明
1	<p>ヒト CD40 (GenBank アクセション番号: P25942)</p> <p>MVRLPLQCVL WGCLLTAVHP EPPTACREKQ YLINSQCCSL CQPGQKLVSD CTEFTETECL PCGESEFLDT WNRETHCHQH KYCDPNLGLR VQKGTSETD TICTCEEGWH CTSEACESCV LHRSCSPGFG VKQIATGVSD TICEPCPVGF FSNVSSAFEK CHPWTSCETK DLVVQQAGTN KTDVVCGPQD RLRALVVIPI IFGILFAILL VLVFIKKVAK KPTNKAPHPK QEPQEINFPD DLPGSNTAAP VQETLHGCQP VTQEDGKESR ISVQERQ</p>
2	<p>ヒト CD40L (GenBank アクセション番号: NP_000065)</p> <p>MIETYNQTSP RSAATGLPIS MKIFMYLLTV FLITQMIGSA LFAVYLHRRL DKIEDERNLH EDFVFMKTIQ RCNTGERSLS LLNCEEIKSQ FEGFVKDIML NKEETKKENS FEMQKGDQNP QIAAHVISEA SSKTTSVLQW AEKGYITMSN NLVTLENGKQ LTVKRQGLYY IYAQVTFCNS REASSQAPFI ASLCLKSPGR FERILLRAAN THSSAKPCGQ QSIHLGGVFE LQPGASVFN VTDPSQVSHG TGFTSFGLLK</p>
3	<p>3G5 – VH</p> <p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSNGIHWVRQAPGKGLEWVAVI WSDGSKNFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASG SGSYYNFFDYWGQGLTVTVSS</p>
4	<p>3G5 – VL</p> <p>EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTINSLSQSEDFAVYYCQQHKNKWITFGQGRLEI K</p>
5	<p>3G5 – VH CDR1 (KABAT)</p> <p>SNGIH</p>
6	<p>3G5 – VH CDR1 (CHOTHIA)</p> <p>GFTFSSN</p>
7	<p>3G5 – VH CDR2 (KABAT)</p> <p>VIWSDGSKNFYADSVKG</p>
8	<p>3G5 – VH CDR2 (CHOTHIA)</p> <p>WSDGSN</p>
9	<p>3G5 – VH CDR3 (KABAT)</p> <p>ASGSGSYYNFFDY</p>
10	<p>3G5 – VH CDR3 (CHOTHIA)</p> <p>ASGSGSYYNFFDY</p>
11	<p>3G5 – VL CDR1 (KABAT)</p> <p>RASQSVRSNLA</p>
12	<p>3G5 – VL CDR1 (CHOTHIA)</p> <p>RASQSVRSNLA</p>
13	<p>3G5 – VL CDR2 (KABAT)</p> <p>GASTRAT</p>
14	<p>3G5 – VL CDR2 (CHOTHIA)</p>

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

配列 番号	説明
	GASTRAT
15	3G5 – VL CDR3 (KABAT) QQHKNWIT
16	3G5 – VL CDR3 (CHOTHIA) QQHKNWIT
17	3C3 – VH QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAGSGFIFSRMYWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGSYKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARES PWYYFDYWGQGT LTVSS
18	3C3 - VL DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAAS TLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYKSAPFTFGPGTKVD IK
19	3C3 – VH CDR1 (KABAT) RYGMY
20	3C3 – VH CDR1 (CHOTHIA) GFIFSR
21	3C3 – VH CDR2 (KABAT) VIWYDGSYKYYADSVKG
22	3C3 – VH CDR2 (CHOTHIA) WYDGSY
23	3C3 – VH CDR3 (KABAT) ESPWYYFDY
24	3C3 – VH CDR3 (CHOTHIA) ESPWYYFDY
25	3C3 – VL CDR1 (KABAT) RASQGISNYLA
26	3C3 – VL CDR1 (CHOTHIA) RASQGISNYLA
27	3C3 – VL CDR2 (KABAT) AASTLQS
28	3C3 – VL CDR2 (CHOTHIA) AASTLQS
29	3C3 – VL CDR3 (KABAT) QKYKSAPFT
30	3C3 – VL CDR3 (CHOTHIA) QKYKSAPFT
31	3B6 – VH EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGI TGTGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCAKRAG GSFYYYGMDVWGQGT TTVTVSS
32	3B6 – VL DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHSTGYNLYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGV PDRFNGSGSGTDFTLKISRVEAEDFQVYYCMQALQTPWTFG HGTVKEIK
33	3B6 – VH CDR1 (KABAT)

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

配列 番号	説明
	SYAMS
34	3B6 – VH CDR1 (CHOTHIA) GFTFSSY
35	3B6 – VH CDR2 (KABAT) GITGTGGSTYYADSVKG
36	3B6 – VH CDR2 (CHOTHIA) TGTGGS
37	3B6 – VH CDR3 (KABAT) RAGGSFYYYYGMDV
38	3B6 – VH CDR3 (CHOTHIA) RAGGSFYYYYGMDV
39	3B6 – VL CDR1 (KABAT) RSSQSLLHSTGYNLYD
40	3B6 – VL CDR1 (CHOTHIA) RSSQSLLHSTGYNLYD
41	3B6 – VL CDR2 (KABAT) LGSNRAS
42	3B6 – VL CDR2 (CHOTHIA) LGSNRAS
43	3B6 – VL CDR3 (KABAT) MQALQTPWT
44	3B6 – VL CDR3 (CHOTHIA) MQALQTPWT
45	6H6 - VH QVQLVESGGGVVQPGRSLRFSCAASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWDDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARA GGSGRYNYFDYWGQGLVTVSS
46	6H6 - VL EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLA WYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGGTDFLTISLQSEDFAVYYCQQHNNWLTFGGGTKVE IK
47	6H6 – VH CDR1 (KABAT) SYGMH
48	6H6 – VH CDR1 (CHOTHIA) GFTLSSY
49	6H6 – VH CDR2 (KABAT) VIWDDGSNKYYADSVKG
50	6H6 – VH CDR2 (CHOTHIA) WDDGSN
51	6H6 – VH CDR3 (KABAT) AGGSGRYNYFDY
52	6H6 – VH CDR3 (CHOTHIA) AGGSGRYNYFDY
53	6H6 – VL CDR1 (KABAT) RASQSVRSNLA
54	6H6 – VL CDR1 (CHOTHIA)

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

配列 番号	説明
	RASQSVRSNLA
55	6H6 – VL CDR2 (KABAT) GASTRAT
56	6H6 – VL CDR2 (CHOTHIA) GASTRAT
57	6H6 – VL CDR3 (KABAT) QQHNNWLT
58	6H6 – VL CDR3 (CHOTHIA) QQHNNWLT
59	1B4 - VH EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMTWVRQVPKGLEWVSGI TGSGANTFYTDSVKGRFTISRDNNSLYLQMNSLRADDTAVYYCAKRNG GSYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
60	1B4 - VL DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHSSGYNLYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQIPWTFG QGTVKVEIK
61	1B4 – VH CDR1 (KABAT) SYAMT
62	1B4 – VH CDR1 (CHOTHIA) GFTFSSY
63	1B4 – VH CDR2 (KABAT) GITGSGANTFYTDSVKG
64	1B4 – VH CDR2 (CHOTHIA) TGSGAN
65	1B4 – VH CDR3 (KABAT) RNGGSYYYYYGMDV
66	1B4 – VH CDR3 (CHOTHIA) RNGGSYYYYYGMDV
67	1B4 – VL CDR1 (KABAT) RSSQSLHSSGYNLYD
68	1B4 – VL CDR1 (CHOTHIA) RSSQSLHSSGYNLYD
69	1B4 – VL CDR2 (KABAT) LGSNRAS
70	1B4 – VL CDR2 (CHOTHIA) LGSNRAS
71	1B4 – VL CDR3 (KABAT) MQALQIPWT
72	1B4 – VL CDR3 (CHOTHIA) MQALQIPWT
73	3B6-NS – VH EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPKGLEWVSGI TGTGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCAKRAG GSFYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
74	3B6-NS – VL

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

配列 番号	説明
	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSTGYNLYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDFVYYCMQALQTPWTFG HGTKVEIK
75	3B6-NS – VH CDR1 (KABAT) SYAMS
76	3B6-NS – VH CDR1 (CHOTHIA) GFTFSSY
77	3B6-NS – VH CDR2 (KABAT) GITGTGGSTYYADSVKG
78	3B6-NS – VH CDR2 (CHOTHIA) TGTGGS
79	3B6-NS – VH CDR3 (KABAT) RAGGSFYYYYGMDV
80	3B6-NS – VH CDR3 (CHOTHIA) RAGGSFYYYYGMDV
81	3B6-NS – VL CDR1 (KABAT) RSSQSLLHSTGYNLYD
82	3B6-NS – VL CDR1 (CHOTHIA) RSSQSLLHSTGYNLYD
83	3B6-NS – VL CDR2 (KABAT) LGSNRAS
84	3B6-NS – VL CDR2 (CHOTHIA) LGSNRAS
85	3B6-NS – VL CDR3 (KABAT) MQALQTPWT
86	3B6-NS – VL CDR3 (CHOTHIA) MQALQTPWT
87	2E1.2 - VH QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWDDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARA GSSGRYYNYFDYWGQGLTVTVSS
88	2E1.2 – VL2 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVRSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPDRFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYHCQQYNKWLIFGGGTKVEI K
89	2E1.2 - VH CDR1 (KABAT) SYGMH
90	2E1.2 - VH CDR1 (CHOTHIA) GFTFSSY
91	2E1.2 - VH CDR2 (KABAT) VIWDDGSNKYYADSVKG
92	2E1.2 - VH CDR2 (CHOTHIA) WDDGSN
93	2E1.2 - VH CDR3 (KABAT)

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

配列 番号	説明
	AGSSGRYYNYFDY
94	2E1.2 - VH CDR3 (CHOTHIA) AGSSGRYYNYFDY
95	2E1.2 - VL2 CDR1 (KABAT) RASQSVRSNLA
96	2E1.2 - VL2 CDR1 (CHOTHIA) RASQSVRSNLA
97	2E1.2 - VL2 CDR2 (KABAT) GASTRAT
98	2E1.2 - VL2 CDR2 (CHOTHIA) GASTRAT
99	2E1.2 - VL2 CDR3 (KABAT) QQYNKWL
100	2E1.2 - VL2 CDR3 (CHOTHIA) QQYNKWL
101	1B5-NK - VH QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSFSGMHWVRQAPGKGLEWVTL IWFDGSSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGFA AVAGWYFDWGRGTLTVSS
102	1B5-NK - VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGV RKYLAWYQQKPGKVPKLLIYAA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYFSAPYTFGQGTKL EIK
103	1B5-NK - VH CDR1 (KABAT) SFGMH
104	1B5-NK - VH CDR1 (CHOTHIA) GFTFSF
105	1B5-NK - VH CDR2 (KABAT) LIWFDGSSKYYADSVKG
106	1B5-NK - VH CDR2 (CHOTHIA) WFDGSS
107	1B5-NK - VH CDR3 (KABAT) GFAAVAGWYFDF
108	1B5-NK - VH CDR3 (CHOTHIA) GFAAVAGWYFDF
109	1B5-NK - VL CDR1 (KABAT) RASQGV RKYLA
110	1B5-NK - VL CDR1 (CHOTHIA) RASQGV RKYLA
111	1B5-NK - VL CDR2 (KABAT) AASTLQS
112	1B5-NK - VL CDR2 (CHOTHIA) AASTLQS
113	1B5-NK - VL CDR3 (KABAT) QKYFSAPYT

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

40

【表 7 - 8】

40

【表 7 - 9】

配列番号	説明
	gctggggtccgccaggctccagggaaggggctggagtggggtctcaggtataactgggtactggtagcacatactacgcagactccgtgaagggccgggtccacatctccagagacaattccaagaacacgctgtatgtgcaaataacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcaaaagggctgggtgggagcttctactactactacgggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcacccgtctctca
130	3B6-NS VL (リーダー配列を下線で示す) <u>atgagagcttcctgctcagctcctggggcctcctaactctgggctcctggatccagtgaggatattgtgatgactcagtc</u> tccactctccctgccgtcacccctggagagccggcctccatctctcaggtctagtacagagcctcctgcatagtactgatacaactatttgattgtgtacctgcagaagccagggcagctccacagctcctgtatctatttgggttctaatacggggcctccggggctcctgcagagttcagtggtgagtcaggcacagattttacactgaaaatcagcagagtgaggagctgaggattttggggtttattactgcatgcaagctctacaaactccgtggacgttcggccacgggaccaaggtggaatacaaa
131	1B5-NK VH (リーダー配列を下線で示す) <u>atggagtttggggctgagcctgggttttctcctgtgctctttaaaggatgtccagtgctcaggtgcagctgggtgagtcctgg</u> gggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctttggcatgcaactgggtccgccaggctccagggaaggggctggagtggtgacacttatatggtttgatggaagttcaatactactgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaactccaagaacacgctgtatctgcaaataacagcctgagagccgaggacacggctgtatattactgtgtgagaggttttgcagcagtggtctgggtggtacttcgattctcggggcgtggcacctgggtcactgtctctca
132	1B5-NK VL (リーダー配列を下線で示す) <u>Atgagacatgagggctccctgctcagctcctgggacictctgctctggctccagataccagatgtgacatccagatga</u> cccagttctcatctcctctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcggggcgagtcagggcgttagaaa gtatttagcctggtatcagcagaaccagggaaggttctaagctcctgatctatgtctgcatccatttgcatacagggtg tcccatctcggttcagtggtgagtcgtgggacagatttctctccatcagcagcctgcagcctgaagatgttgcaactattactgtcaaaaagtatttcagtgccccgtacacttttggccaggggacaaaactggagatcaaaa
133	ヒト CD40 細胞外ドメイン EPPTACREKQY LINSQCSSLCPGQKL VSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWN RETHCHQH K YCDPNLGLRVQ QKGTSETDTICTCEE GWHCTSEACESCVLHR SCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQ QAGTNKTDVVCGPQDRLR
134	イムノグロブリン重鎖定常 (IgH2) (Uniprot P01859) ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ER KCCVECP PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGN VFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
135	3C3 重鎖 (可変領域をイタリック体で、定常ドメインを太字で示す) <i>QVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAGSGFIFSR</i> YGMVWRQAPGKGLEWVAVIWY DGSYKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARESPWYFFDYW GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNV DHKPSN TKVDKTV ERKKCCVECP PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVOFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VV

40

【表 7 - 10】

配列 番号	説明
	<p>HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDSGFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
136	<p>3C3 重鎖（可変領域をイタリック体で、定常ドメインを太字で示す）</p> <p><i>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQG</i>ISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQS <i>GVPSRFS</i>SGSGTDFLTISSLPEDVATYYCQKYKSAPFTFGPGTKVDIKRTVA APSVFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC</p>
137	<p>3C3 重鎖（リーダー配列を下線で、可変領域をイタリック体で、定常領域を太字で示す）</p> <p><u>MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAGSGFIFSRYG</u> <u>MYWVRQAPGKGLEWVA</u>VIWYDGSYKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR <u>AEDTAVYYCARESPWYYFDYWGQ</u>GLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPMLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG</p>
138	<p>3C3 重鎖（リーダー配列を下線で、可変領域をイタリック体で、定常領域を太字で示す）</p> <p><u>MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ</u>GISNYLAWY <u>QQKPGKVPKLLIYAAS</u>TLQSGVPSRFSSGSGTDFLTISSLPEDVATYYCQKYK <u>SAPFTFGPGTKVDIK</u>RTVAAPSVFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

10

20

30

40

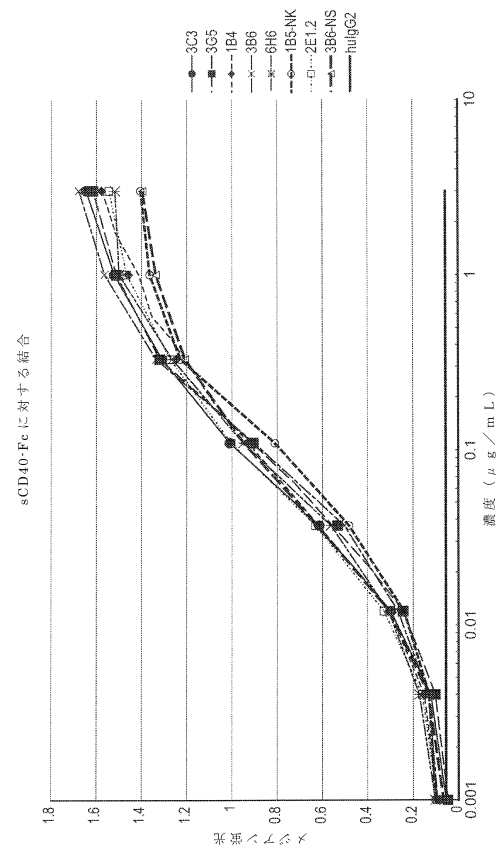
50

【図面】

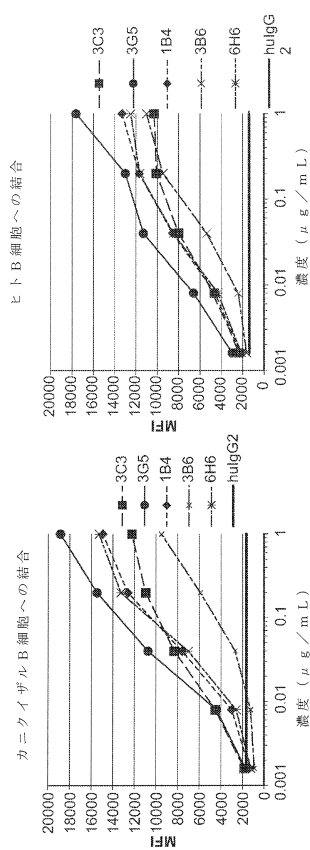
【図 1】

クローン	KD (pM)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
3C3	10.7	8.13E+05	8.67E-06
3G5	3.3	9.05E+05	2.97E-06
1B4	10.5	8.32E+05	8.76E-06
3B6	7.9	7.82E+05	6.14E-06
6H6	2.8	9.05E+05	2.49E-06

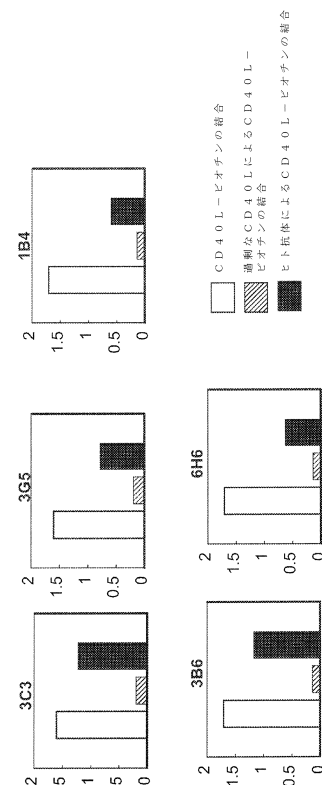
【図 2】



【図 3】



【図 4 A】



10

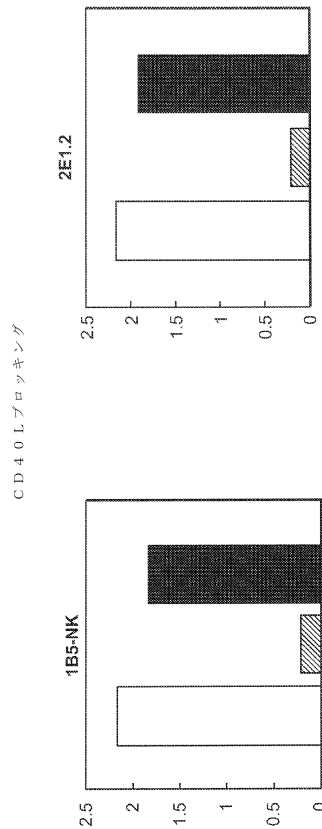
20

30

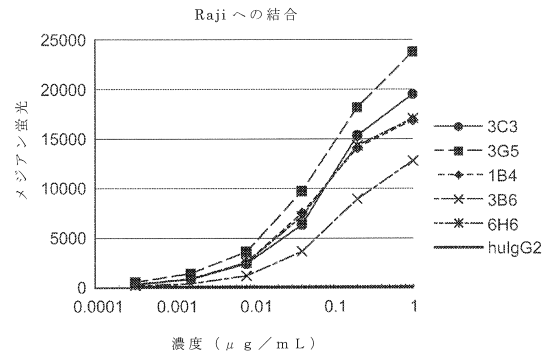
40

50

【図 4 B】



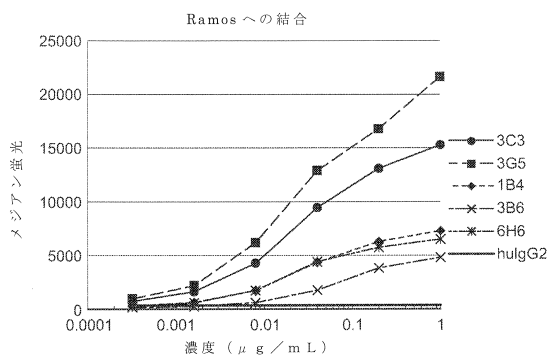
【図 5】



10

20

【図 6】



【図 7】

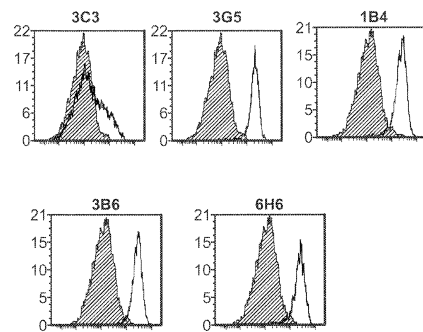
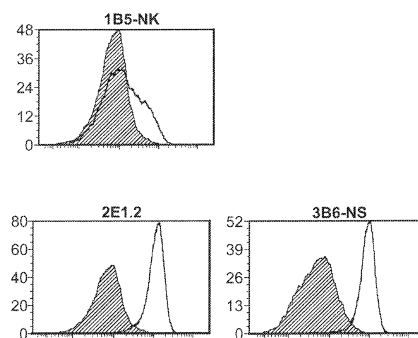


図 7 A

図 7 B

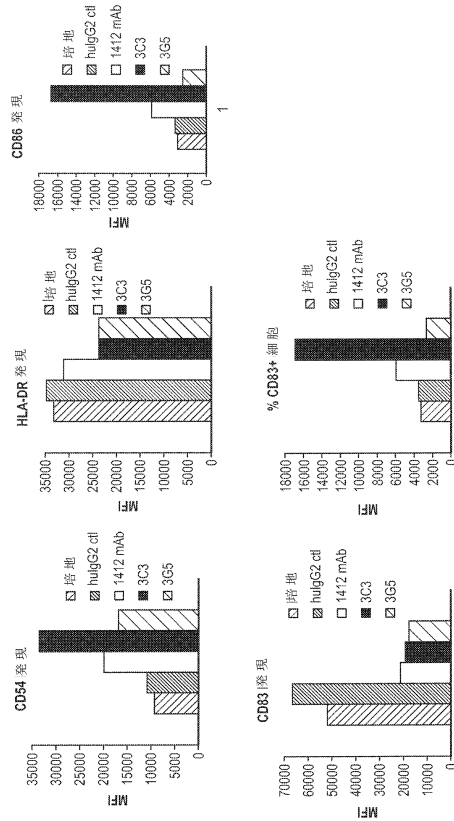


30

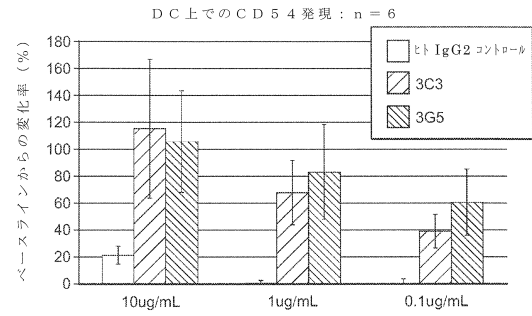
40

50

【図 8 A】



【図 8 B】



10

20

【図 9】

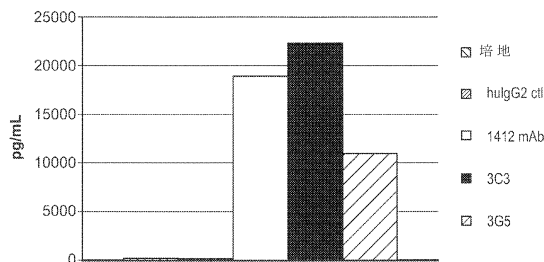


図 9 A

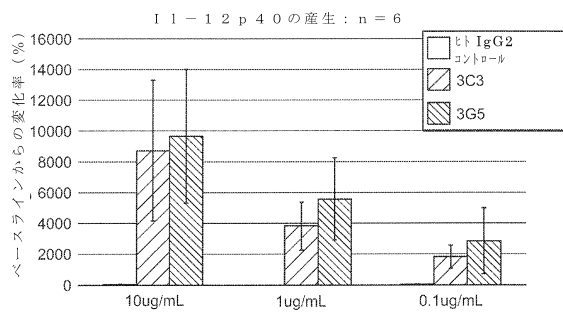
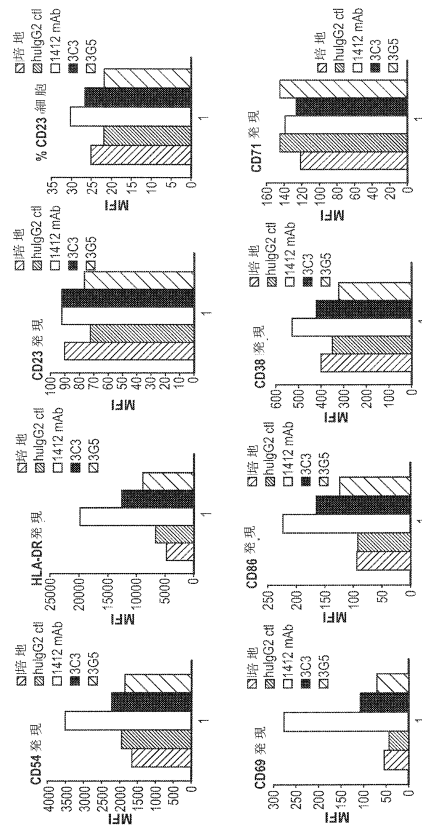


図 9 B

【図 10 A】

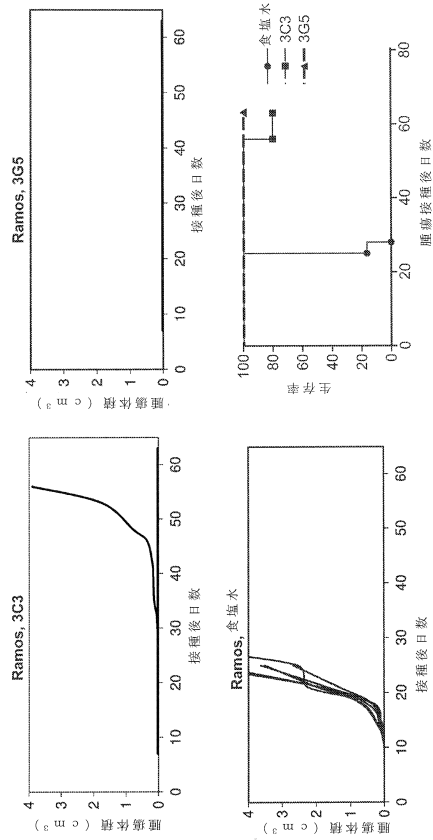


30

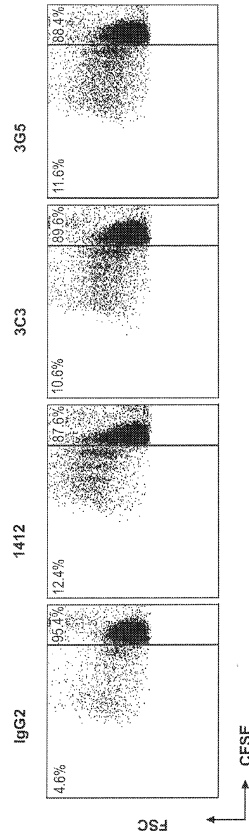
40

50

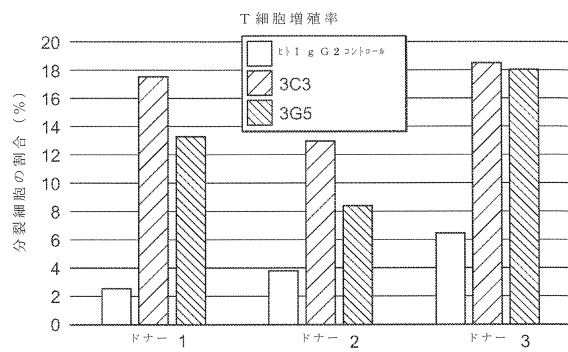
【図 1 3】



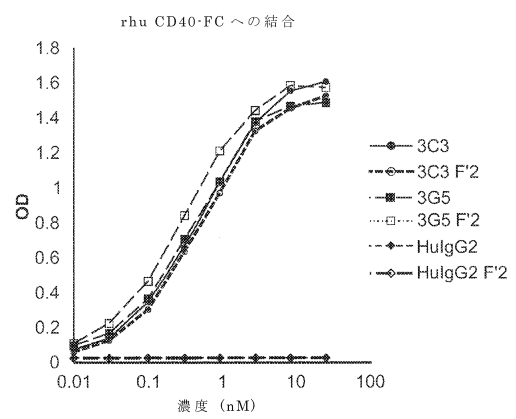
【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



【図 1 5】



10

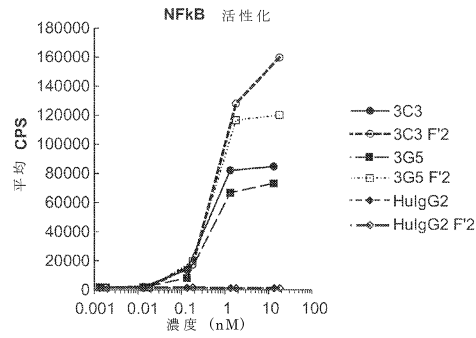
20

30

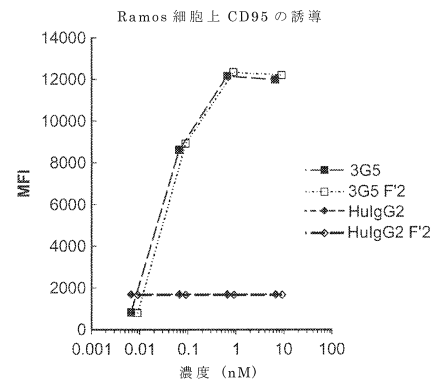
40

50

【図 16】

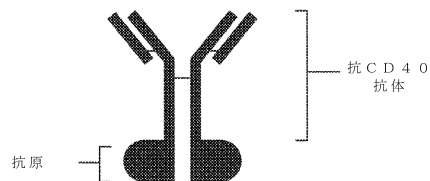


【図 17】

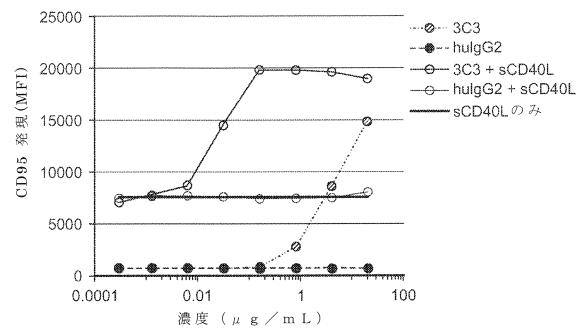


10

【図 18】



【図 19】



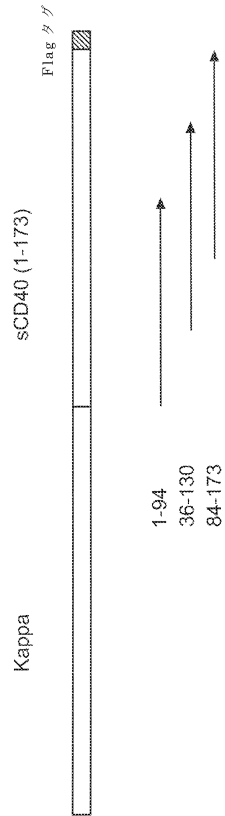
20

30

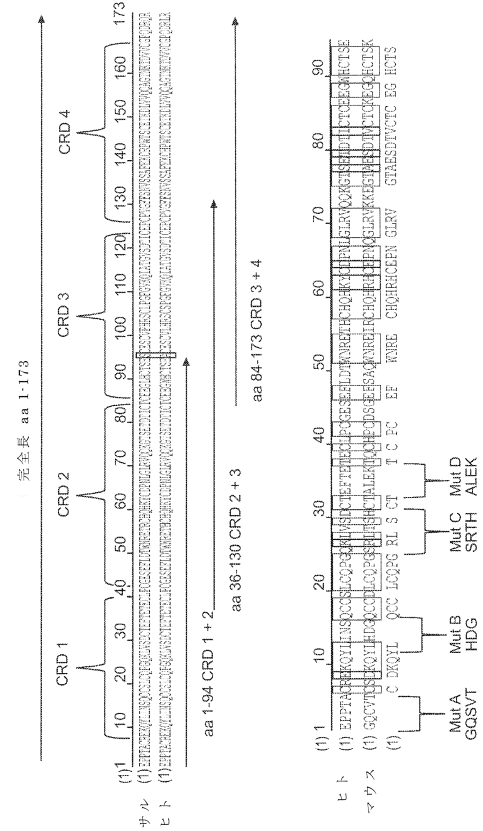
40

50

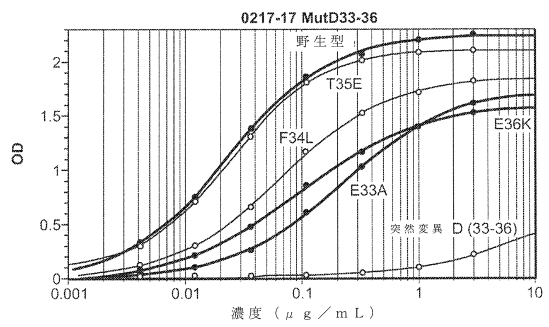
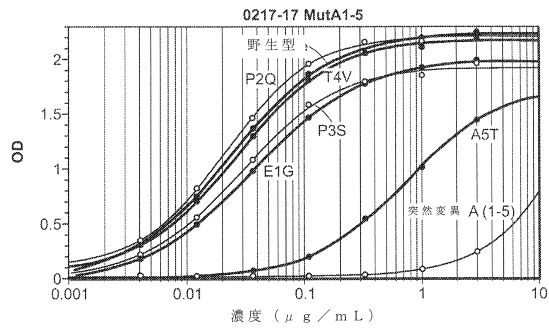
【図 20】



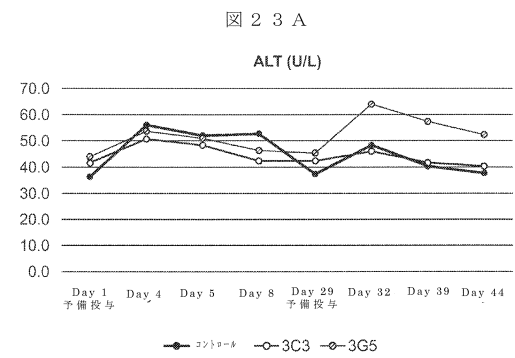
【図 21】



【図 22】



【図 23 A】



10

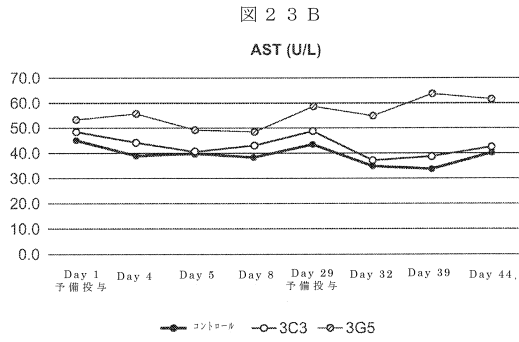
20

30

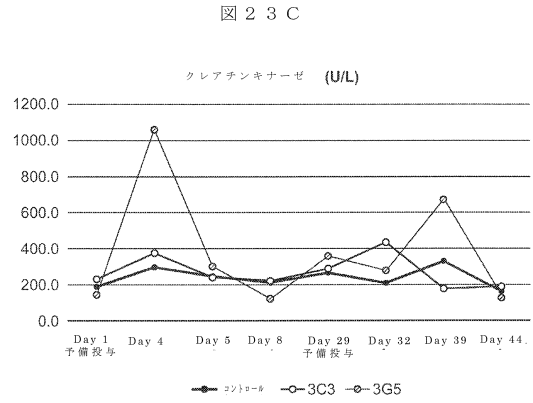
40

50

【図 2 3 B】

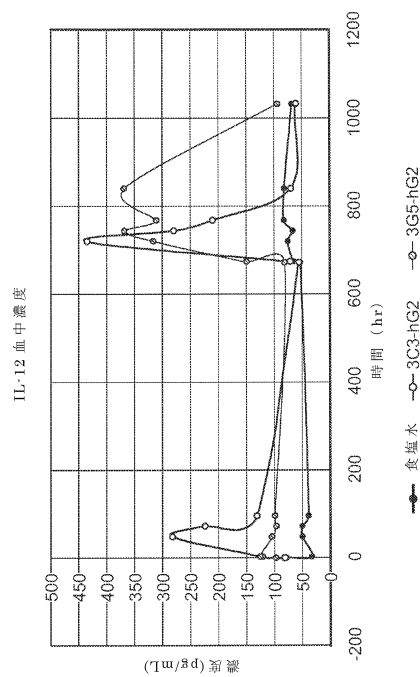


【図 2 3 C】

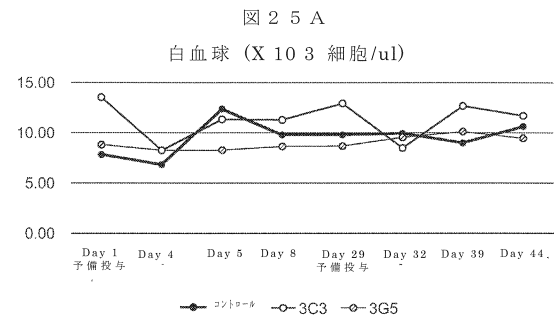


10

【図 2 4】



【図 2 5 A】



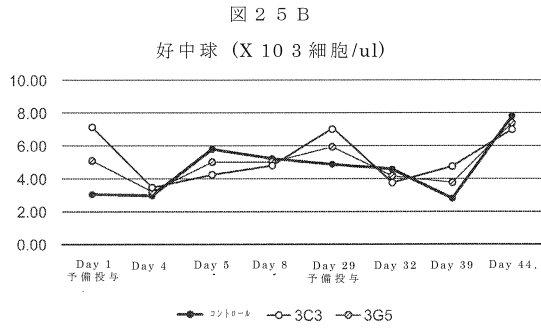
20

30

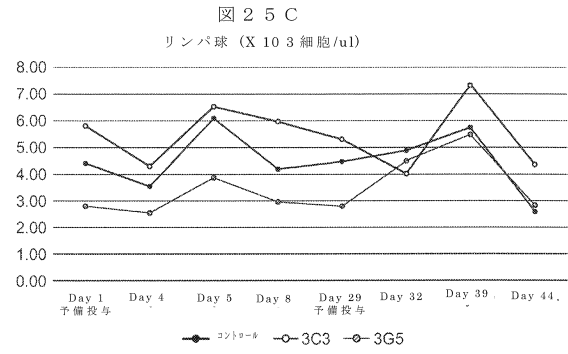
40

50

【図 2 5 B】

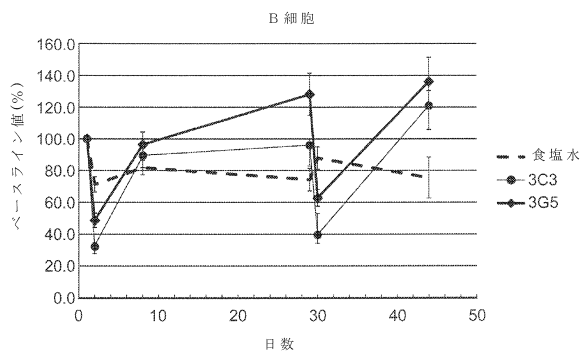


【図 2 5 C】

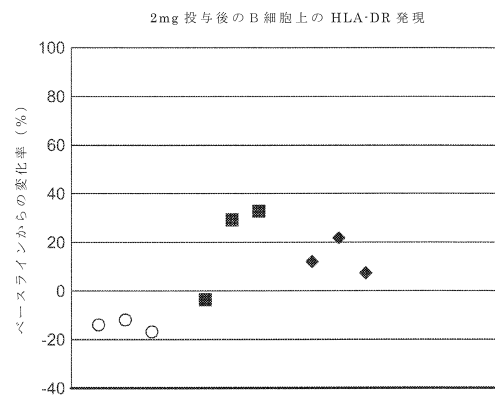


10

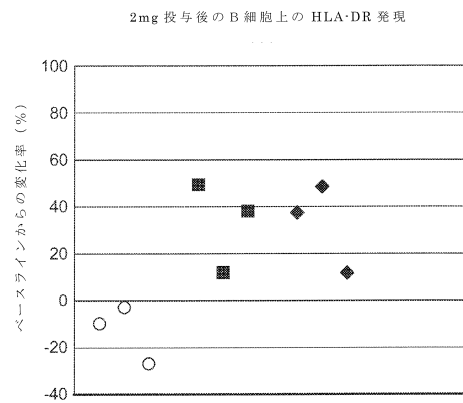
【図 2 6】



【図 2 7】



20

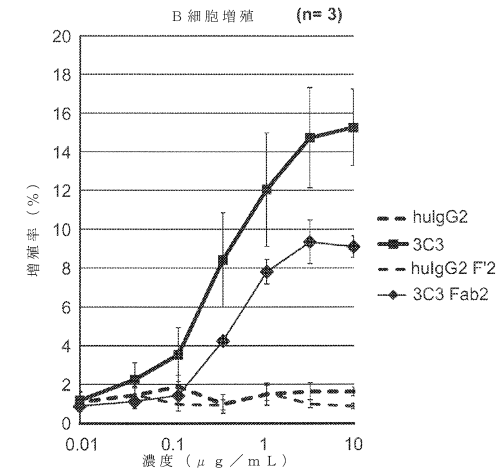


30

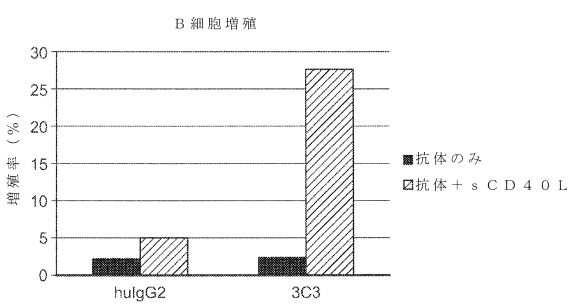
40

50

【図 28】

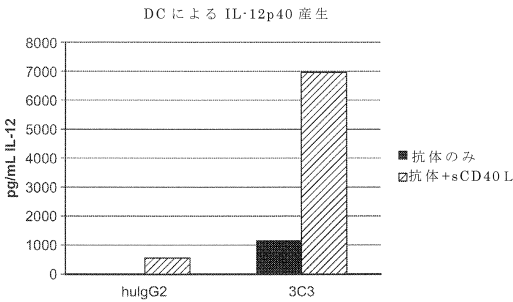


【図 29】



10

【図 30】



【図 31】

全血中の分析におけるサイトカイン応答

	IL-1β				
	ドナー 1	ドナー 2	ドナー 3	ドナー 4	ドナー 5
ヒト IgG2 コントロール	0.2	1.4	1.6	13	4.5
LPS	682	697	885	882	858
3C3	0.1	1.3	1	11.3	5.6
	IL-6				
	ドナー 1	ドナー 2	ドナー 3	ドナー 4	ドナー 5
ヒト IgG2 コントロール	2.1	1	12.3	1.3	2.9
LPS	12.5	12.6	11.6	11.7	16
3C3	1.9	0.9	11	1.2	2.5
	TNFα				
	ドナー 1	ドナー 2	ドナー 3	ドナー 4	ドナー 5
ヒト IgG2 コントロール	0.6	0.7	1.4	1	1.3
LPS	45.2	43.9	48.7	45.6	27.5
3C3	0.7	1.2	1.5	1.1	1.6
	IFNγ				
	ドナー 1	ドナー 2	ドナー 3	ドナー 4	ドナー 5
ヒト IgG2 コントロール	BD	BD	BD	BD	0.5
LPS	BD	BD	BD	49.8	BD
3C3	BD	BD	BD	BD	1.3

20

30

【配列表】

0007038064000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

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 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
		C 1 2 P	21/08	

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ケラー, ティボアー

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 8 9 4 7 - 1 6 1 3 , パイパーズビル, カフェルティ ロード 1 9 8

(72)発明者 ゴールドスタイン, ジョエル

アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8 5 2 5 , ホープウェル, ランバートビル ホープウェルロード 7 7

(72)発明者 ビテール, ローラ エー.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 8 9 0 2 , ドイルスタウン, ビタースウィート レーン 5 5 7 4

(72)発明者 ヘ, リジェン

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 8 1 0 4 , アレントアウン, リッジビュー ドライブ 1 6 7 5

(72)発明者 オニール, トム

アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 8 8 2 , ワシントン, ファウンドリー レーン 2

(72)発明者 クロッカー, アンドレア

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 8 9 3 8 , ニュー ホープ, ウィンディ ブッシュ ロード 2 9 8

(72)発明者 スンダラパンディヤン, カルナ

アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8 8 2 4 , ケンドール パーク, ビレッジ ロード 3 8

(72)発明者 トーマス, ローレンス ジェイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 3 7 5 , イーストン, フォックス リッジ ロード 1

(72)発明者 ウィドガー, ジェニファー

アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 8 8 6 5 , アルファ, シュリー アベニュー 4 9 8

審査官 山内 達人

(56)参考文献 再公表特許第2 0 0 2 / 0 8 8 1 8 6 (J P , A 1)

Clin Cancer Res , 2013年, 19(5), p. 1035-1043

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

C 1 2 P

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)