

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7212138号
(P7212138)

(45)発行日 令和5年1月24日(2023.1.24)

(24)登録日 令和5年1月16日(2023.1.16)

(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 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	

請求項の数 11 (全54頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-504146(P2021-504146)	(73)特許権者	521030375
(86)(22)出願日	平成30年7月20日(2018.7.20)		ヨウキュア(ペイジン)バイオファーマ
(65)公表番号	特表2022-500004(P2022-500004		カンパニー リミテッド
	A)		中華人民共和国 1 0 0 1 7 6 ペイジン
(43)公表日	令和4年1月4日(2022.1.4)		ビーディーエー サウス ロンファ ロード
(86)国際出願番号	PCT/CN2018/096494		ナンバー2 ビルディング 5 ルーム 1
(87)国際公開番号	WO2020/014974		2 0 2
(87)国際公開日	令和2年1月23日(2020.1.23)	(74)代理人	110002860
審査請求日	令和3年7月20日(2021.7.20)		弁理士法人秀和特許事務所
		(72)発明者	ヤン, イー
			中華人民共和国 1 0 1 1 1 1 ペイジン
			ビーディーエー ナンバー88 ケチャン
			6 アベニュー ビルディング 3 ルーム
			7 0 8
		(72)発明者	ドン, チュニャン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗CD40抗体及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

相補性決定領域(CDR)1、2、及び3を含む重鎖可変領域(VH)と、

CDR1、2、及び3を含む軽鎖可変領域(VL)と

を含み、

(1) Kabatの付番によるとき、前記VHのCDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号1、2、3に示され、前記VLのCDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号4、5、6に示される、又は、Chothiaの付番によるとき、前記VHのCDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号19、20、3に示され、前記VLのCDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号4、21、6に示される；

(2) Kabatの付番によるとき、前記VHのCDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号7、8、9に示され、前記VLのCDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号10、11、12に示される、又は、Chothiaの付番によるとき、前記VHのCDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号22、23、9に示され、前記VLのCDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号10、11、12に示される；又は

(3) Kabatの付番によるとき、前記VHのCDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号13、14、15に示され、前記VLのCDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号16、17、18に示される、又は、Chothiaの付番によるとき、前記VHのCDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号24、25、15に

示され、前記 V L の C D R 1、2、3 アミノ酸配列が、それぞれ配列番号 1 6、1 7、1 8 に示される、

C D 4 0 (T N F 受容体スーパーファミリーメンバー 5) に結合する抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

K a b a t の付番によるとき、前記 V H が、配列番号 7、8、及び 9 にそれぞれ示されるアミノ酸配列の C D R 1、2、3 を含み、前記 V L が、配列番号 1 0、1 1、及び 1 2 にそれぞれ示されるアミノ酸配列の C D R 1、2、3 を含む、又は、C h o t h i a の付番によるとき、前記 V H が、配列番号 2 2、2 3、及び 9 にそれぞれ示されるアミノ酸配列の C D R 1、2、3 を含み、前記 V L が、配列番号 1 0、1 1、及び 1 2 にそれぞれ示されるアミノ酸配列の C D R 1、2、3 を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 3】

V H C D R 1、2、及び 3 を含む重鎖可変領域並びに V L C D R 1、2、及び 3 を含む軽鎖可変領域を含み、

(1) V H C D R 1、2、及び 3 は、配列番号 3 0、3 1、3 2、又は 5 2 における相補性決定領域と同一であり、並びに、V L C D R 1、2、及び 3 は、配列番号 3 3、3 4、3 5、3 6、又は 5 3 における相補性決定領域と同一である；

(2) V H C D R 1、2、及び 3 は、配列番号 3 7、3 8、3 9、4 0、又は 5 4 における相補性決定領域と同一であり、並びに、V L C D R 1、2、及び 3 は、配列番号 4 1、4 2、4 3、又は 5 5 における相補性決定領域と同一である；又は

(3) V H C D R 1、2、及び 3 は、配列番号 4 4、4 5、4 6、4 7、又は 5 6 における相補性決定領域と同一であり、並びに、V L C D R 1、2、及び 3 は、配列番号 4 8、4 9、5 0、5 1、又は 5 7 における相補性決定領域と同一である；

20

C D 4 0 に結合する抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4】

重鎖可変領域 (V H) と、軽鎖可変領域 (V L) とを含み、前記 V H の配列 及び前記 V L の配列 が、以下：

(1) 前記 V H の配列 が配列番号 3 0、3 1、3 2、又は 5 2 であり、前記 V L の配列 が配列番号 3 3、3 4、3 5、3 6、又は 5 3 である；

30

(2) 前記 V H の配列 が配列番号 3 7、3 8、3 9、4 0、又は 5 4 であり、前記 V L の配列 が配列番号 4 1、4 2、4 3、又は 5 5 である；

(3) 前記 V H の配列 が配列番号 4 4、4 5、4 6、4 7、又は 5 6 であり、前記 V L の配列 が配列番号 4 8、4 9、5 0、5 1、又は 5 7 である

のうちの 1 つである、C D 4 0 に結合する抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5】

(1) K a b a t の付番によるとき、配列番号 1、2、及び 3 にそれぞれ示されるアミノ酸配列、若しくは、C h o t h i a の付番によるとき、配列番号 1 9、2 0 及び 3 にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域 (C D R) 1、2、及び 3 を含む重鎖可変領域 (V H) であって、配列番号 3 3、3 4、3 5、3 6、又は 5 3 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L) と対になると C D 4 0 に結合する V H を含む免疫グロブリン重鎖又は該 V H を含むその断片；

40

(2) K a b a t の付番によるとき、配列番号 4、5、及び 6 にそれぞれ示されるアミノ酸配列、若しくは、C h o t h i a の付番によるとき、配列番号 4、2 1 及び 6 にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2、及び 3 を含む V L であって、配列番号 3 0、3 1、3 2、又は 5 2 に示されるアミノ酸配列を含む V H と対になると C D 4 0 に結合する V L を含む免疫グロブリン軽鎖又は該 V L を含むその断片；

(3) K a b a t の付番によるとき、配列番号 7、8、及び 9 にそれぞれ示されるアミノ酸配列、若しくは、C h o t h i a の付番によるとき、配列番号 2 2、2 3 及び 9 にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2、及び 3 を含む重鎖可変領域 (V H) で

50

あって、配列番号 4 1、4 2、4 3、又は 5 5 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L) と対になると C D 4 0 に結合する V H を含む免疫グロブリン重鎖又は該 V H を含むその断片；

(4) K a b a t の付番によるとき、配列番号 1 0、1 1、及び 1 2 にそれぞれ示されるアミノ酸配列、若しくは、C h o t h i a の付番によるとき、配列番号 1 0、1 1 及び 1 2 にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2、及び 3 を含む V L であって、配列番号 3 7、3 8、3 9、4 0、又は 5 4 に示されるアミノ酸配列を含む V H と対になると C D 4 0 に結合する V L を含む免疫グロブリン軽鎖又は該 V L を含むその断片；

(5) K a b a t の付番によるとき、配列番号 1 3、1 4、1 5 にそれぞれ示されるアミノ酸配列、若しくは、C h o t h i a の付番によるとき、配列番号 2 4、2 5 及び 1 5 にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2、及び 3 を含む重鎖可変領域 (V H) であって、配列番号 4 8、4 9、5 0、5 1、又は 5 7 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L) と対になると C D 4 0 に結合する V H を含む免疫グロブリン重鎖又は該 V H を含むその断片；又は

(6) K a b a t の付番によるとき、配列番号 1 6、1 7、及び 1 8 にそれぞれ示されるアミノ酸配列、若しくは、C h o t h i a の付番によるとき、配列番号 1 6、1 7 及び 1 8 にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2、及び 3 を含む V L であって、配列番号 4 4、4 5、4 6、4 7、又は 5 6 に示されるアミノ酸配列を含む V H と対になると C D 4 0 に結合する V L を含む免疫グロブリン軽鎖又は該 V L を含むその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸。

【請求項 6】

K a b a t の付番によるとき、配列番号 7、8、及び 9 にそれぞれ示されるアミノ酸配列、若しくは、C h o t h i a の付番によるとき、配列番号 2 2、2 3 及び 9 にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2、及び 3 を含む V H を含む免疫グロブリン重鎖又は該 V H を含むその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、並びに / 又は K a b a t の付番によるとき、配列番号 1 0、1 1、及び 1 2 にそれぞれ示されるアミノ酸配列、若しくは、C h o t h i a の付番によるとき、配列番号 1 0、1 1 及び 1 2 にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2、及び 3 を含む V L を含む免疫グロブリン軽鎖又は該 V L を含むその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 5 に記載の核酸。

【請求項 7】

請求項 5 又は 6 に記載の核酸のうちの 1 つ以上を含むベクター。

【請求項 8】

請求項 5 又は 6 に記載の核酸のうちの 1 つ以上を含む細胞。

【請求項 9】

癌治療剤に共有結合的に結合した請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む抗体 - 薬物コンジュゲート。

【請求項 1 0】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む癌の予防又は治療用医薬組成物であって、前記癌は、黒色腫、膀胱癌、中皮腫、血液学的悪性腫瘍、非ホジキンリンパ腫、リンパ腫、又は慢性リンパ球性白血病から選択される、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示は、抗 C D 4 0 (T N F 受容体スーパーファミリーメンバー 5) 抗体及びその使用に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

癌は、現在のところヒト死亡率が最も高い疾患の一つである。世界保健機関 (W o r l d H e a l t h O r g a n i z a t i o n) の統計データによれば、2012年、全世界の癌発生及び死亡症例数は、それぞれ1400万例及び820万例に達した。中国では、新たに診断された癌症例は307万例であり、死亡者数は220万例である。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 3 】

近年の抗癌抗体の臨床的及び商業的成功により、抗体ベースの治療薬に多大な関心が寄せられている。癌の治療に様々な抗体ベースの治療薬で使用するための抗癌抗体の開発が必要とされている。

10

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 4 】

本開示は、抗CD40抗体、その抗原結合断片、及びその使用に関する。

【 0 0 0 5 】

一態様において、本開示は、相補性決定領域 (C D R) 1、2、及び3を含む重鎖可変領域 (V H) であって、VH CDR1領域が選択のVH CDR1アミノ酸配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含み、VH CDR2領域が選択のVH CDR2アミノ酸配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含み、及びVH CDR3領域が選択のVH CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含むVHと；CDR1、2、及び3を含む軽鎖可変領域 (V L) であって、VL CDR1領域が選択のVL CDR1アミノ酸配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含み、VL CDR2領域が選択のVL CDR2アミノ酸配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含み、及びVL CDR3領域が選択のVL CDR3アミノ酸配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含むVLとを含み、選択のVH CDR1、2、及び3アミノ酸配列及び選択のVL CDR1、2、及び3アミノ酸配列が、以下：

20

(1) 選択のVH CDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号1、2、3に示され、選択のVL CDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号4、5、6に示される；

(2) 選択のVH CDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号7、8、9に示され、選択のVL CDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号10、11、12に示される；

30

(3) 選択のVH CDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号13、14、15に示され、選択のVL CDR1、2、3アミノ酸配列が、それぞれ配列番号16、17、18に示される

のうちの1つである、CD40 (T N F 受容体スーパーファミリーメンバー5) に結合する抗体又はその抗原結合断片に関する。

【 0 0 0 6 】

一部の実施形態において、VHは、配列番号1、2、3にそれぞれ示されるアミノ酸配列のCDR1、2、3を含み、VLは、配列番号4、5、6にそれぞれ示されるアミノ酸配列のCDR1、2、3を含む。

40

【 0 0 0 7 】

一部の実施形態において、VHは、配列番号7、8、9にそれぞれ示されるアミノ酸配列のCDR1、2、3を含み、VLは、配列番号10、11、12にそれぞれ示されるアミノ酸配列のCDR1、2、3を含む。

【 0 0 0 8 】

一部の実施形態において、VHは、配列番号13、14、15にそれぞれ示されるアミノ酸配列のCDR1、2、3を含み、VLは、配列番号16、17、18にそれぞれ示されるアミノ酸配列のCDR1、2、3を含む。

【 0 0 0 9 】

50

一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片はヒトCD40に特異的に結合する。
一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片はヒト化抗体又はその抗原結合断片である。
一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片は単鎖可変断片(s c F V)である。

【0010】

別の態様において、本開示は、

(1) 配列番号1、2、及び3にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域(CDR)1、2、及び3を含む重鎖可変領域(VH)であって、配列番号33、34、35、36、又は53に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)と対になるとCD40に結合するVHを含む免疫グロブリン重鎖又はその断片；

(2) 配列番号4、5、及び6にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、及び3を含むVLであって、配列番号30、31、32、又は52に示されるアミノ酸配列を含むVHと対になるとCD40に結合するVLを含む免疫グロブリン軽鎖又はその断片；

(3) 配列番号7、8、及び9にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、及び3を含む重鎖可変領域(VH)であって、配列番号41、42、43、又は55に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)と対になるとCD40に結合するVHを含む免疫グロブリン重鎖又はその断片；

(4) 配列番号10、11、及び12にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、及び3を含むVLであって、配列番号37、38、39、40、又は54に示されるアミノ酸配列を含むVHと対になるとCD40に結合するVLを含む免疫グロブリン軽鎖又はその断片；

(5) 配列番号13、14、15にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、及び3を含む重鎖可変領域(VH)であって、配列番号48、49、50、51、又は57に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)と対になるとCD40に結合するVHを含む免疫グロブリン重鎖又はその断片；

(6) 配列番号16、17、及び18にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、及び3を含むVLであって、配列番号44、45、46、47、又は56に示されるアミノ酸配列を含むVHと対になるとCD40に結合するVLを含む免疫グロブリン軽鎖又はその断片

を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸に関する。

【0011】

一部の実施形態において、核酸は、配列番号1、2、3にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、及び3を含むVHを含む免疫グロブリン重鎖又はその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0012】

一部の実施形態において、核酸は、配列番号4、5、6にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、及び3を含むVLを含む免疫グロブリン軽鎖又はその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0013】

一部の実施形態において、核酸は、配列番号7、8、9にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、及び3を含むVHを含む免疫グロブリン重鎖又はその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0014】

一部の実施形態において、核酸は、配列番号10、11、12にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、及び3を含むVLを含む免疫グロブリン軽鎖又はその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0015】

一部の実施形態において、核酸は、配列番号13、14、15にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、及び3を含むVHを含む免疫グロブリン重鎖又はその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態において、核酸は、配列番号 1 6、1 7、1 8 にそれぞれ示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、2、及び 3 を含む V L を含む免疫グロブリン軽鎖又はその断片を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態において、V H は、V L と対になるとヒト C D 4 0 に特異的に結合し、又は V L は、V H と対になるとヒト C D 4 0 に特異的に結合する。

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態において、免疫グロブリン重鎖又はその断片はヒト化免疫グロブリン重鎖又はその断片であり、免疫グロブリン軽鎖又はその断片はヒト化免疫グロブリン軽鎖又はその断片である。

10

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態において、核酸は単鎖可変断片 (s c F v) をコードする。一部の実施形態において、核酸は c D N A である。

【 0 0 2 0 】

一態様において、本開示は、本明細書に記載されるとおりの核酸のうちの 1 つ以上を含むベクターに関する。一部の実施形態において、ベクターは、C D 4 0 に一緒になって結合する V L 領域及び V H 領域をコードする。

【 0 0 2 1 】

一態様において、本開示は、各ベクターが本明細書に記載されるとおりの核酸のうちの 1 つを含む一対のベクターを提供し、ここで一緒になって一対のベクターは、C D 4 0 に一緒になって結合する V L 領域及び V H 領域をコードする。

20

【 0 0 2 2 】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載されるとおりのベクター、又は本明細書に記載されるとおりの一対のベクターを含む細胞に関する。一部の実施形態において、細胞は C H O 細胞である。

【 0 0 2 3 】

一態様において、本開示はまた、本明細書に記載されるとおりの核酸のうちの 1 つ以上を含む細胞も提供する。

【 0 0 2 4 】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載されるとおりの核酸のうちの 2 つを含む細胞を提供する。一部の実施形態において、2 つの核酸は一緒になって、C D 4 0 に一緒になって結合する V L 領域及び V H 領域をコードする。

30

【 0 0 2 5 】

別の態様において、本開示は、抗体又はその抗原結合断片の作製方法に関する。本方法は、

(a) 細胞が抗体又は抗原結合断片を産生するのに十分な条件下で本明細書に記載されるとおりの細胞を培養するステップ；及び

(b) 細胞によって産生された抗体又は抗原結合断片を収集するステップを含む。

40

【 0 0 2 6 】

一態様において、本開示は、選択の V H 配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H) と、選択の V L 配列と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L) とを含み、選択の V H 配列及び選択の V L 配列が、以下：

(1) 選択の V H 配列が配列番号 3 0、3 1、3 2、又は 5 2 であり、選択の V L 配列が配列番号 3 3、3 4、3 5、3 6、又は 5 3 である；

(2) 選択の V H 配列が配列番号 3 7、3 8、3 9、4 0、又は 5 4 であり、選択の V L 配列が配列番号 4 1、4 2、4 3、又は 5 5 である；

(3) 選択の V H 配列が配列番号 4 4、4 5、4 6、4 7、又は 5 6 であり、選択の V L 配列が配列番号 4 8、4 9、5 0、5 1、又は 5 7 である

50

のうちの1つである、CD40に結合する抗体又はその抗原結合断片に関する。

【0027】

一部の実施形態において、VHは配列番号40の配列を含み、VLは配列番号42の配列を含む。

【0028】

一部の実施形態において、VHは配列番号39の配列を含み、VLは配列番号43の配列を含む。

【0029】

一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片はヒトCD40に特異的に結合する。

【0030】

一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片はヒト抗体又はその抗原結合断片である。一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片は単鎖可変断片(s c F V)である。

【0031】

一態様において、本開示は、治療剤に共有結合的に結合した本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合断片を含む抗体-薬物コンジュゲートに関する。一部の実施形態において、治療剤は細胞傷害剤又は細胞増殖抑制剤である。

【0032】

別の態様において、本開示は、癌を有する対象を治療する方法に関する。本方法は、本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合断片、又は本明細書に記載されるとおりの抗体-薬物コンジュゲートを含む組成物の治療有効量を対象に投与するステップを含む。

【0033】

一部の実施形態において、対象は固形腫瘍(例えば、進行固形腫瘍)を有する。一部の実施形態において、癌は切除不能黒色腫又は転移性黒色腫である。一部の実施形態において、癌は、非小細胞肺癌(NSCLC)、頭頸部扁平上皮癌(SCCHN)、頭頸部癌、腎細胞癌(RCC)、黒色腫、膀胱癌、胃癌、尿路上皮癌、メルケル細胞癌、トリプルネガティブ乳癌(TNBC)、又は結腸直腸癌である。

【0034】

一部の実施形態において、癌は、黒色腫、脾癌、中皮腫、又は血液学的悪性腫瘍(例えば、非ホジキンリンパ腫、リンパ腫、又は慢性リンパ球性白血病)である。

【0035】

一態様において、本開示は、腫瘍成長速度を低下させる方法に関する。本方法は、本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合断片、又は本明細書に記載されるとおりの抗体-薬物コンジュゲートを含む組成物の有効量を腫瘍細胞に接触させるステップを含む。

【0036】

別の態様において、本開示は、腫瘍細胞を死滅させる方法に関する。本方法は、本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合断片、又は本明細書に記載されるとおりの抗体-薬物コンジュゲートを含む組成物の有効量を腫瘍細胞に接触させるステップを含む。

【0037】

一態様において、本開示は、本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合断片と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0038】

別の態様において、本開示はまた、本明細書に記載されるとおりの抗体薬物コンジュゲートと、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物も提供する。

【0039】

本明細書で使用されるとき、用語「癌」は、自律的増殖能を有する細胞を指す。かかる細胞の例としては、急速に増殖する細胞成長によって特徴付けられる異常な状態又は条件を有する細胞が挙げられる。この用語には、病理組織型又は侵襲性のステージに関わらず

10

20

30

40

50

、癌性成長、例えば、腫瘍；発癌過程、転移性組織、及び悪性形質転換細胞、組織、又は器官が含まれることが意図される。また、呼吸器系、心血管系、腎臓系、生殖器系、血液系、神経系、肝臓系、胃腸系、及び内分泌系などの様々な器官系の悪性腫瘍；並びに多くの結腸癌、腎細胞癌、前立腺癌及び／又は精巣腫瘍、非肺小細胞癌、及び小腸癌などの悪性腫瘍を含む腺癌も含まれる。「自然発生する」癌には、対象に癌細胞を移植することによって実験的に誘発されたのでない任意の癌が含まれ、例えば、自発的に発生する癌、患者が1つ又は複数の発癌物質に曝露することによって引き起こされる癌、トランスジェニック癌遺伝子の挿入又は腫瘍抑制遺伝子のノックアウトによって生じる癌、及び感染、例えばウイルス感染によって引き起こされる癌が挙げられる。用語「癌腫」は当該技術分野で認められており、上皮又は内分泌組織の悪性腫瘍を指す。この用語にはまた癌肉腫も含まれ、これは、癌腫性及び肉腫性組織で構成される悪性腫瘍を含む。「腺癌」は、腺組織に由来する癌腫、又は腫瘍細胞が認識可能な腺状構造を形成する癌腫を指す。用語「肉腫」は当該技術分野で認められており、間葉性由来の悪性腫瘍を指す。用語「造血新生物障害」は、造血起源の過形成性／新生物性細胞に関わる疾患を含む。造血新生物障害は、骨髄、リンパ球又は赤血球系統、又はその前駆細胞から生じ得る。

10

【0040】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、又は6つ）の相補性決定領域（CDR）（例えば、免疫グロブリン軽鎖からの3つのCDRのいずれか又は免疫グロブリン重鎖からの3つのCDRのいずれか）を含み、且つエピトープへの特異的結合能を有する任意の抗原結合分子を指す。抗体の非限定的な例としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、単鎖抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、及びヒト化抗体が挙げられる。一部の実施形態において、抗体は、ヒト抗体のFc領域を含むことができる。用語の抗体にはまた、誘導体、例えば、抗体断片で形成される二重特異性抗体、単鎖抗体、ダイアボディ、線状抗体、及び多重特異性抗体も含まれる。

20

【0041】

本明細書で使用されるとき、用語「抗原結合断片」は完全長抗体の一部分を指し、ここで抗体のこの一部分は、抗原への特異的結合能を有する。一部の実施形態において、抗原結合断片は少なくとも1つの可変ドメイン（例えば、重鎖の可変ドメイン又は軽鎖の可変ドメイン）を含む。抗体断片の非限定的な例としては、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片が挙げられる。

30

【0042】

本明細書で使用されるとき、用語「ヒト抗体」は、ヒトに存在する内因性核酸（例えば、再配列されたヒト免疫グロブリン重鎖又は軽鎖遺伝子座）によってコードされる抗体を指す。一部の実施形態において、ヒト抗体はヒトから採取されるか、又はヒト細胞培養物（例えば、ヒトハイブリドーマ細胞）中で産生される。一部の実施形態において、ヒト抗体は非ヒト細胞（例えば、マウス又はハムスター細胞株）で産生される。一部の実施形態において、ヒト抗体は細菌又は酵母細胞で産生される。一部の実施形態において、ヒト抗体は、再配列されていない又は再配列されたヒト免疫グロブリン遺伝子座（例えば、重鎖又は軽鎖ヒト免疫グロブリン遺伝子座）を含むトランスジェニック非ヒト動物（例えば、ウシ）で産生される。

40

【0043】

本明細書で使用されるとき、用語「キメラ抗体」は、少なくとも2つの異なる抗体（例えば、ヒト及びマウス抗体など、2つの異なる哺乳類種由来の抗体）に存在する配列を含む抗体を指す。キメラ抗体の非限定的な例は、非ヒト（例えば、マウス）抗体の可変ドメイン配列（例えば、軽鎖及び／又は重鎖可変ドメイン配列の全て又は一部）と、ヒト抗体の定常ドメインとを含む抗体である。キメラ抗体の更なる例は本明細書に記載され、当該技術分野において公知である。

【0044】

本明細書で使用されるとき、用語「ヒト化抗体」は、非ヒト（例えば、マウス）免疫グ

50

ロブリンに由来する最小限の配列を含み、且つヒト免疫グロブリンに由来する配列を含む非ヒト抗体を指す。非限定的な例において、ヒト化抗体は、受容抗体の超可変（例えば、CDR）領域残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有する非ヒト抗体（例えば、供与抗体）、例えば、マウス、ラット、又はウサギ抗体由来の超可変（例えば、CDR）領域残基に置き換えられているヒト抗体（受容抗体）である。一部の実施形態では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が、対応する非ヒト（例えば、マウス）免疫グロブリン残基によって置き換えられる。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、受容抗体に見られない又は供与抗体に見られない残基を含み得る。こうした修飾は、抗体性能を更に精緻化するために行われ得る。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、超可変ループ（CDR）の全て又は実質的に全てが非ヒト（例えば、マウス）免疫グロブリンのものに
10
対応し、且つフレームワーク領域の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリンのものである少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのFcの少なくとも一部分も含み得る。ヒト化抗体は、当該技術分野において公知の分子生物学方法を用いて作製することができる。ヒト化抗体の作成方法の非限定的な例は、本明細書に記載される。

【0045】

本明細書で使用されるとき、用語「単鎖抗体」は、抗原への特異的結合能を有する少なくとも2つの免疫グロブリン可変ドメイン（例えば、哺乳類免疫グロブリン重鎖又は軽鎖の可変ドメイン）を含む単一のポリペプチドを指す。単鎖抗体の非限定的な例は、本明細書に記載される。
20

【0046】

本明細書で使用されるとき、用語「多量体抗体」は、4つ以上の（例えば、6、8、又は10個の）免疫グロブリン可変ドメインを含む抗体を指す。一部の実施形態において、多量体抗体は、1つの標的分子（例えば、CD40）を哺乳類細胞（例えば、ヒトT細胞）の表面上にある少なくとも1つの第2の標的分子（例えば、CTLA-4）に架橋することが可能である。

【0047】

本明細書で使用されるとき、用語「対象」及び「患者」は、本明細書全体を通じて同義的に使用され、本発明の方法による治療が提供される動物、ヒト又は非ヒトを言い表す。
30
本発明によれば、獣医学的及び非獣医学的適用が企図される。ヒト患者は、成人しているヒト又は若年のヒト（例えば、18歳未満のヒト）であり得る。ヒトに加えて、患者には、限定はされないが、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、フェレット、ネコ、イヌ、及び霊長類が含まれる。例えば、非ヒト霊長類（例えば、サル、チンパンジー、ゴリラなど）、げっ歯類（例えば、ラット、マウス、スナネズミ、ハムスター、フェレット、ウサギ）、ウサギ類、ブタ類（例えば、ブタ、ミニブタ）、ウマ類、イヌ類、ネコ類、ウシ類、及び他の家庭内、畜産、及び動物園動物が挙げられる。

【0048】

本明細書で使用されるとき、抗体に言及する場合に、語句「特異的に結合している」及び「～に特異的に結合する」は、その相互作用が標的分子上の特定の構造（即ち、抗原決定基又はエピトープ）の存在に依存するため、他の分子と比べてその標的分子（例えば、CD40）と好んで相互作用する抗体を意味する；換言すれば、この試薬は、全般的にあらゆる分子というよりむしろ、特異的な構造を含む分子を認識してそれに結合するものである。標的分子に特異的に結合する抗体は、標的特異抗体と称されてもよい。例えば、CD40分子に特異的に結合する抗体は、CD40特異抗体又は抗CD40抗体と称されてもよい。
40

【0049】

本明細書で使用されるとき、用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、少なくとも2アミノ酸の任意の長さのアミノ酸のポリマーを指して同義的に使用される。
50

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用される時、用語「ポリヌクレオチド」、「核酸分子」、及び「核酸配列」は、本明細書では、少なくとも2ヌクレオチドの任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指して同義的に使用され、限定なしに、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、及びその修飾体が挙げられる。

【 0 0 5 1 】

特に定義しない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般的に理解するのと同じ意味を有する。本発明における使用のため、方法及び材料が本明細書に記載される；その他の、当該技術分野において公知の好適な方法及び材料もまた用いることができる。材料、方法、及び例は例示に過ぎず、限定することを意図するものではない。本明細書において言及される全ての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリ、及び他の参考文献は、全体として参照により援用される。矛盾が生じる場合、定義を含め、本明細書が優先するものとする。

10

【 0 0 5 2 】

本発明の他の特徴及び利点が以下の詳細な説明及び図から、並びに特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 3 】

【 図 1 】 抗hCD40抗体の例示的作製プロトコルの第1部を示すフローチャートである。

【 図 2 】 抗hCD40抗体の例示的作製プロトコルの第2部を示すフローチャートである。

20

【 図 3 】 抗hCD40抗体がhCD40とhCD40リガンドとの間の結合を遮断することを示す一組のフローサイトメトリーグラフである。

【 図 4 】 サルCD40 (rmCD40)、マウスCD40 (mCD40)、及びヒト-マウスキメラCD40 (chiCD40)との抗hCD40抗体の交差反応性を分析したフローサイトメトリー結果を示す一組のグラフである。NCは陰性対照を意味する。

【 図 5 】 キメラ抗hCD40抗体6A7-mHvKv-IgG4及びヒトCD40を使用した表面プラズマ共鳴 (SPR)の結果を示すグラフである。

【 図 6 】 ヒト化抗hCD40抗体6A7-H1K1-IgG4及びヒトCD40を使用した表面プラズマ共鳴 (SPR)の結果を示すグラフである。

【 図 7 】 マウス抗hCD40抗体で治療したMC-38腫瘍細胞を有するヒト化CD40マウス (B-hCD40)の時間の経過に伴う体重を示すグラフである。PSは生理食塩水 (対照)を意味する。

30

【 図 8 】 マウス抗hCD40抗体で治療したMC-38腫瘍細胞を有するヒト化CD40マウス (B-hCD40)の時間の経過に伴う体重変化率を示すグラフである。PSは生理食塩水 (対照)を意味する。

【 図 9 】 マウス抗hCD40抗体で治療したMC-38腫瘍細胞を有するヒト化CD40マウス (B-hCD40)における時間の経過に伴う腫瘍サイズを示すグラフである。PSは生理食塩水 (対照)を意味する。

【 図 10 】 キメラ抗hCD40抗体で治療したMC-38腫瘍細胞を有するヒト化CD40マウス (B-hCD40)の時間の経過に伴う体重を示すグラフである。PSは生理食塩水 (対照)を意味する。

40

【 図 11 】 キメラ抗hCD40抗体で治療したMC-38腫瘍細胞を有するヒト化CD40マウス (B-hCD40)の時間の経過に伴う体重変化率を示すグラフである。PSは生理食塩水 (対照)を意味する。

【 図 12 】 キメラ抗hCD40抗体で治療したMC-38腫瘍細胞を有するヒト化CD40マウス (B-hCD40)における時間の経過に伴う腫瘍サイズを示すグラフである。PSは生理食塩水 (対照)を意味する。

【 図 13 】 ヒト化抗hCD40抗体で治療したMC-38腫瘍細胞を有するヒト化CD40マウス (B-hCD40)の時間の経過に伴う体重を示すグラフである。PSは生理食塩水 (対照)を意味する。

50

【図14】ヒト化抗hCD40抗体で治療したMC-38腫瘍細胞を有するヒト化CD40マウス(B-hCD40)の時間の経過に伴う体重変化率を示すグラフである。PSは生理食塩水(対照)を意味する。

【図15】ヒト化抗hCD40抗体で治療したMC-38腫瘍細胞を有するヒト化CD40マウス(B-hCD40)における時間の経過に伴う腫瘍サイズを示すグラフである。PSは生理食塩水(対照)を意味する。

【図16】Kabatatの付番により定義されるとおりのマウス抗hCD40抗体(03-7F10、06-6A7、及び07-4H6)のCDR配列及びそのヒト化抗hCD40抗体のCDR配列を一覧にする。

【図17】Chothiaの付番により定義されるとおりのマウス抗hCD40抗体(03-7F10、06-6A7、及び07-4H6)のCDR配列及びそのヒト化抗hCD40抗体のCDR配列を一覧にする。

10

【図18】ヒトCD40(hCD40)、マウスCD40(mCD40)、サルCD40(rmCD40)、及びキメラCD40(chiCD40)のアミノ酸配列を一覧にする。

【図19】7F10をベースとするヒト化抗hCD40抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を一覧にする。

【図20】6A7をベースとするヒト化抗hCD40抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を一覧にする。

【図21】4H6をベースとするヒト化抗hCD40抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を一覧にする。

20

【図22】マウス抗hCD40抗体03-7F10、06-6A7、及び07-4H6の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を一覧にする。

【発明を実施するための形態】

【0054】

本開示は、CD40(TNF受容体スーパーファミリーメンバー5)に結合する抗体、その抗原結合断片の例を提供する。

【0055】

CD40及び癌

免疫系は、体内の正常細胞と、生体が「外来性」と見る細胞との間を区別することができ、これにより免疫系は、正常細胞をそのままにしておきつつ外来細胞を攻撃することが可能になる。この機構には時に、免疫チェックポイントと呼ばれるタンパク質が関わる。免疫チェックポイントは、シグナルを強めることも(共刺激分子)、シグナルを弱めることもある免疫系内の分子である。

30

【0056】

チェックポイント阻害因子は、免疫系が正常組織を攻撃するのを防ぎ、それにより自己免疫疾患を防ぐことができる。多くの腫瘍細胞もまた、チェックポイント阻害因子を発現する。これらの腫瘍細胞は、特に腫瘍抗原に特異的なT細胞における特定の免疫チェックポイント経路を利用することにより免疫監視機構を逃れる(Creelan, Benjamin C. 「肺癌における免疫チェックポイント阻害薬の最新情報(Update on immune checkpoint inhibitors in lung cancer)」. Cancer Control 21.1(2014): 80-89)。多くの免疫チェックポイントはリガンド-受容体相互作用によって惹起されるため、リガンド及び/又はその受容体に対する抗体によって容易に遮断することができる。

40

【0057】

CD40(腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー5又はTNFRSF5としても知られる)は、樹状細胞(DC)、マクロファージ、B細胞、及び単球などの抗原提示細胞(APC)並びに多くの非免疫細胞及び多種多様な腫瘍に発現する腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバーである。活性化Tヘルパー細胞上のその三量体リガンドCD154(CD40リガンド又はCD40Lとしても知られる)と相互作用するとAPCが活性化され、適応免疫の誘導につながる。

50

【 0 0 5 8 】

生理学的には、APC上のCD40を介したシグナル伝達はT細胞ヘルプの主要な構成要素と考えられ、ヘルパーT細胞がAPCにライセンスを与える能力の大部分を媒介する。例えば、DC上のCD40のライゲーションは、共刺激及びMHC分子の表面発現の増加、炎症誘発性サイトカインの産生、及びT細胞惹起の亢進を誘導する。静止B細胞上のCD40ライゲーションは、抗原提示機能及び増殖を増加させる。

【 0 0 5 9 】

前臨床モデルでは、ラット抗マウスCD40 mAbがCD40+ B細胞リンパ腫の治療において顕著な治療活性を示し(80~100%のマウスが治癒し、再チャレンジに対してCD8 T細胞依存的な免疫がある)、様々なCD40陰性腫瘍においてもまた有効である。これらのmAbは、終末期に近い疾患のマウスからバルク腫瘍を取り除くことができる。CD40 mAbは臨床試験で研究されており、黒色腫、膵癌、中皮腫、血液学的悪性腫瘍、特に、非ホジキンリンパ腫、リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、及び進行固形腫瘍の治療に用いられている。

10

【 0 0 6 0 】

治療用抗CD40抗体は、強力なアゴニスト作用からアンタゴニスト作用にまで及ぶ多様な活性を示す。現在のところ、この異質混在性に関する満足な説明はない。アゴニストCD40 mAbについて引き合いに出される主な機構上の理論的根拠は、患者において臨床的に有意な抗腫瘍T細胞応答を誘導するため宿主APCを活性化させるというものである。これには、腫瘍退縮のT細胞非依存的だがマクロファージ依存的な惹起が含まれる。CD40活性化マクロファージは殺腫瘍性になることができ、最小限膵癌においては腫瘍間質の枯渇も促進し得るため、インビボで腫瘍の崩壊が誘導される。重要なことに、こうした機構に腫瘍によるCD40の発現は必要なく、これは臨床試験の多くで幅広い腫瘍を有する患者を組み入れることの正当な理由となっている。これらの戦略がDC、マクロファージ、又は両方を活性化することを目指す限りにおいて、目標は必ずしもCD40 mAbがその結合する細胞を例えば補体媒介性細胞傷害(CMC)又は抗体依存性細胞傷害(antibody dependent cellular cytotoxicity)(ADCC)によって死滅させることではない。従って、意図的に、強力なアゴニスト抗体はCMC又はADCCを媒介しない。

20

【 0 0 6 1 】

対照的に、他のヒトCD40 mAbは、ほぼ全てのB細胞悪性腫瘍、一部の黒色腫、及びある種の癌腫など、CD40+腫瘍に対するCMC及びADCCを媒介することができる。最後に、腫瘍細胞上のCD40のライゲーションがアポトーシスを増進させること、及びそれがいかなる免疫エフェクター経路も関与することなく達成され得ることのエビデンスが幾つかある。これは、CD40+ B細胞悪性腫瘍並びにCD40+癌腫及び黒色腫などのある種の固形腫瘍について示されている。

30

【 0 0 6 2 】

CD40及びその機能の詳細な説明については、例えば、Vonderheide et al., 「アゴニストCD40抗体及び癌療法(Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy)」.(2013):1035-1043; Beatty, et al. 「CD40アゴニストは腫瘍間質を変化させ、マウス及びヒトの膵癌に対して有効性を示す(CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans)」. Science 331.6024(2011):1612-1616; Vonderheide, et al. 「新規CD40アゴニストモノクローナル抗体、CP-870,893で治療した癌患者における臨床活性及び免疫調節(Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel

40

CD40 agonist monoclonal antibody)」. Journ

50

al of Clinical Oncology 25.7(2007):876-883(これらの各々は、全体として参照により援用される)を参照することができる。

【0063】

本開示は、幾つかの抗CD40抗体、その抗原結合断片、並びにこれらの抗CD40抗体及び抗原結合断片を使用して腫瘍成長を阻害し、癌を治療する方法を提供する。

【0064】

抗体及び抗原結合断片

本開示は、抗CD40抗体及びその抗原結合断片を提供する。一般に、抗体(免疫グロブリンとも称される)は、2つのクラスのポリペプチド鎖、軽鎖と重鎖とで構成される。本開示の非限定的な抗体は、2つの重鎖と2つの軽鎖とを含むインタクトな4本免疫グロブリン鎖抗体であってもよい。抗体の重鎖は、IgM、IgG、IgE、IgA、若しくはIgDを含む任意のアイソタイプ、又はIgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE1、IgE2等を含むサブアイソタイプであってもよい。軽鎖は、軽鎖又は軽鎖であってもよい。抗体は、軽鎖の2つの同一のコピー及び重鎖の2つの同一のコピーを含んでもよい。重鎖は、各々が1つの可変ドメイン(又は可変領域、V_H)と複数の定常ドメイン(又は定常領域)とを含むものであり、その定常ドメイン内でジスルフィド結合によって互いに結合して抗体の「ステム」を形成する。軽鎖は、各々が1つの可変ドメイン(又は可変領域、V_L)と1つの定常ドメイン(又は定常領域)とを含むものであり、各々がジスルフィド結合によって1つの重鎖に結合する。各軽鎖の可変領域は、それが結合する重鎖の可変領域と整列する。軽鎖及び重鎖のいずれの可変領域も、保存性がより高いフレームワーク領域(FR)の間に挟まれた3つの超可変領域を含む。

【0065】

これらの超可変領域は、相補性決定領域(CDR)として知られ、抗体の主要な(principle)抗原結合表面を含むループを形成する。4つのフレームワーク領域は主にシートのコンホメーションをとり、CDRが、それらのシート構造をつなぐ、及び場合によってはその一部を形成するループを形成する。各鎖のCDRはフレームワーク領域によってごく近接して保持され、他の鎖のCDRと共に抗原結合領域の形成に寄与する。

【0066】

抗体のアミノ酸配列を分析することによる抗体のCDR領域の同定方法は周知であり、CDRの幾つもの定義が一般に用いられている。Kabatsの定義は配列の可変性に基づき、Chothiaの定義は構造上のループ領域の位置に基づく。これらの方法及び定義は、例えば、Martin,「抗体可変ドメインのタンパク質配列及び構造分析(Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains)」, Antibody engineering, Springer Berlin Heidelberg, 2001. 422-439; Abhinandan, et al.「抗体可変ドメインのKabats及び構造的に正しい付番の分析及び改良(Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains)」, Molecular immunology 45.14(2008):3832-3839; Wu, T.T. and Kabat, E.A.(1970) J. Exp. Med. 132:211-250; Martin et al., Methods Enzymol. 203:121-53(1991); Morea et al., Biophys

Chem. 68(1-3):9-16(Oct. 1997); Morea et al., J Mol Biol. 275(2):269-94(Jan. 1998); Chothia et al., Nature 342(6252):877-83(Dec. 1989); Ponomarenko and Bourne, BMC Structural Biology 7:64(2007)(これらの各々は、本明細書において全体として参照により援用される)に記載されている。本開示に具体的に指示されない限り、本開示

10

20

30

40

50

では既定として K a b a t の付番を用いる。

【 0 0 6 7 】

C D R は抗原のエピトープの認識に重要である。本明細書で使用されるとき、「エピトープ」は、抗体の抗原結合ドメインによって特異的に結合される能力を有する標的分子中の最も小さい部分である。エピトープの最小限の大きさは約 3、4、5、6、又は 7 アミノ酸であり得るが、エピトープは抗原の二次及び三次構造に基づく抗原の三次元配置に依存し得るため、これらのアミノ酸が連続的な線状配列の抗原一次構造である必要はない。

【 0 0 6 8 】

一部の実施形態において、抗体は、インタクトな免疫グロブリン分子（例えば、I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3、I g M、I g D、I g E、I g A）である。I g G サブクラス（I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4）は高度に保存されており、その定常領域、特にそのヒンジ及び上側の C H 2 ドメインが異なる。I g G サブクラスの配列及び差異は当該技術分野において公知であり、例えば、V i d a r s s o n , e t a l , 「I g G サブクラス及びアロタイプ：構造からエフェクター機能まで（I g G subclasses and allotypes : from structure to effector functions）」. *Frontiers in immunology* 5 (2014) ; I r a n i , e t a l . 「ヒト I g G サブクラスの分子特性及び感染性疾患に対する治療用モノクローナル抗体の設計におけるその意味（Molecular properties of human I g G subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases）」. *Molecular immunology* 67.2 (2015) : 171 - 182 ; S h a k i b , F a r o u k , e d . ヒト I g G サブクラス：構造、機能及び調節の分子解析（The human I g G subclasses : molecular analysis of structure, function and regulation）. Elsevier , 2016（これらの各々は、本明細書において全体として参照により援用される）に記載されている。

【 0 0 6 9 】

抗体はまた、任意の種（例えば、ヒト、げっ歯類、マウス、ラクダ科動物）に由来する免疫グロブリン分子であってもよい。本明細書に開示される抗体としてはまた、限定はされないが、ポリクローナル、モノクローナル、単一特異性、多特異性抗体、及び別のポリペプチドに融合した免疫グロブリン結合ドメインを含むキメラ抗体も挙げられる。用語「抗原結合ドメイン」又は「抗原結合断片」は、インタクトな抗体の特異的結合活性を保持している抗体の一部分、即ち、インタクトな抗体の標的分子上のエピトープへの特異的結合能を有する抗体の任意の一部分である。これには、例えば、F a b、F a b'、F (a b') 2、及びこれらの断片の変異体が含まれる。従って、一部の実施形態において、抗体又はその抗原結合断片は、例えば、s c F v、F v、F d、d A b、二重特異性抗体、二重特異性 s c F v、ダイアボディ、線状抗体、単鎖抗体分子、抗体断片で形成される多重特異性抗体、及び抗体結合ドメインであるか、又はそれと相同である結合ドメインを含む任意のポリペプチドであってもよい。抗原結合ドメインの非限定的な例としては、例えば、インタクトな抗体の重鎖及び/又は軽鎖 C D R、インタクトな抗体の重鎖及び/又は軽鎖可変領域、インタクトな抗体の完全長重鎖又は軽鎖、又はインタクトな抗体の重鎖又は軽鎖のいずれかの個々の C D R が挙げられる。

【 0 0 7 0 】

一部の実施形態において、抗原結合断片は、キメラ抗原受容体（C A R）の一部を形成することができる。一部の実施形態において、キメラ抗原受容体は、本明細書に記載されるとおりの単鎖可変断片（s c F v）が C D 3 - 膜貫通ドメイン及びエンドドメインに融合した融合体である。一部の実施形態において、キメラ抗原受容体はまた、様々な共刺激タンパク質受容体（例えば、C D 2 8、4 1 B B、I C O S）由来の細胞内シグナル伝達ドメインも含む。一部の実施形態において、キメラ抗原受容体は、効力を増加させるた

10

20

30

40

50

め複数のシグナル伝達ドメインを含む（例えば、CD3z - CD28 - 41BB又はCD3z - CD28 - OX40）。従って、一態様において、本開示は、本明細書に記載されるとおりのキメラ抗原受容体を発現する細胞（例えば、T細胞）を更に提供する。

【0071】

一部の実施形態において、scFVは、1つの重鎖可変ドメインと、1つの軽鎖可変ドメインとを有する。一部の実施形態において、scFVは、2つの重鎖可変ドメインと、2つの軽鎖可変ドメインとを有する。

【0072】

抗CD40抗体及び抗原結合断片

本開示は、CD40に特異的に結合する抗体及びその抗原結合断片を提供する。本明細書に記載される抗体及び抗原結合断片は、CD40への結合能を有する。本抗体はアゴニスト又はアンタゴニストであり得る。一部の実施形態において、本抗体は、CD40シグナル伝達経路を増進させて、ひいては免疫応答を増加させることができる。一部の実施形態において、本抗体はCMC又はADCCを惹起することができる。

10

【0073】

本開示は、例えば、マウス抗CD40抗体03 - 7F10（「7F10」）、06 - 6A7（「6A7」）、及び07 - 4H6（「4H6」）、そのキメラ抗体、及びそのヒト化抗体（例えば、表1に示されるとおりの抗体の一部）を提供する。

【0074】

7F10、及び7F10由来抗体（例えば、ヒト化抗体）のCDR配列は、Kabatの付番により定義されるとき、重鎖可変ドメインのCDR、配列番号1～3、及び軽鎖可変ドメインのCDR、配列番号4～6を含む。CDRはまた、Chothia方式によって定義されてもよい。Chothiaの付番に基づけば、重鎖可変ドメインのCDR配列は配列番号19、20、3に示され、軽鎖可変ドメインのCDR配列は配列番号4、21、6に示される。

20

【0075】

同様に、6A7、及び6A7由来抗体のCDR配列は、Kabatの付番により定義されるとき、重鎖可変ドメインのCDR、配列番号7～9、及び軽鎖可変ドメインのCDR、配列番号10～12を含む。Chothiaの付番に基づけば、重鎖可変ドメインのCDR配列は配列番号22、23、9に示され、軽鎖可変ドメインのCDRは配列番号10～12に示される。

30

【0076】

4H6、及び4H6由来抗体のCDR配列は、Kabatの付番により定義されるとき、重鎖可変ドメインのCDR、配列番号13、14、15、及び軽鎖可変ドメインのCDR、配列番号16、17、18を含む。Chothiaの付番に基づけば、重鎖可変ドメインのCDR配列は配列番号24、25、15に示され、軽鎖可変ドメインのCDRは配列番号16、17、18に示される。

【0077】

ヒト化抗体の重鎖可変領域及び軽鎖（light）可変領域のアミノ酸配列もまた提供される。マウス抗体をヒト化する方法は種々存在するため（例えば、種々のアミノ酸置換で配列を修飾することができる）、抗体の重鎖及び軽鎖には2種類以上のバージョンのヒト化配列があり得る。ヒト化7F10抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号30～32に示される。ヒト化7F10抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号33～36に示される。これらの重鎖可変領域配列（配列番号30～32）のいずれかが、これらの軽鎖可変領域配列（配列番号33～36）のいずれかと対になることができる。

40

【0078】

同様に、ヒト化6A7抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号37～40に示される。ヒト化6A7抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号41～43に示される。これらの重鎖可変領域配列（配列番号37～40）のいずれかが、これらの軽鎖可変領域配列（配列番号41～43）のいずれかと対になることができる。

50

【 0 0 7 9 】

ヒト化 4 H 6 抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 4 ~ 4 7 に示される。ヒト化 4 H 6 抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 4 8 ~ 5 1 に示される。これらの重鎖可変領域配列（配列番号 4 4 ~ 4 7）のいずれかが、これらの軽鎖可変領域配列（配列番号 4 8 ~ 5 1）のいずれかと対になることができる。

【 0 0 8 0 】

7 F 1 0、6 A 7、及び 4 H 6 をベースとする一部のキメラ抗体及びヒト化抗体を表 1 及び表 4 に示す。

【 0 0 8 1 】

【表 1 - 1】

10

表 1

タイプ	抗体名	VH 配列番号	VL 配列番号	定常領域
6A7 ベースの キメラ抗体	6A7-mHvKv-IgG1	54	55	ヒト IgG1
	6A7-mHvKv-IgG2	54	55	ヒト IgG2
	6A7-mHvKv-IgG4	54	55	ヒト IgG4
	6A7-mHvKv-IgG1- N297A	54	55	N297A 突然変異を有するヒト IgG1
	6A7-mHvKv-IgG1- LALA	54	55	LALA 突然変異を有するヒト IgG1
6A7 ベースの ヒト化抗体	6A7-H1K1-IgG4	37	41	ヒト IgG4
	6A7-H2K1-IgG4	38	41	ヒト IgG4
	6A7-H3K1-IgG4	39	41	ヒト IgG4
	6A7-H4K1-IgG4	40	41	ヒト IgG4
	6A7-H1K2-IgG4	37	42	ヒト IgG4
	6A7-H2K2-IgG4	38	42	ヒト IgG4
	6A7-H3K2-IgG4	39	42	ヒト IgG4
	6A7-H4K2-IgG2	40	42	ヒト IgG2
	6A7-H4K2-IgG4	40	42	ヒト IgG4
	6A7-H1K3-IgG4	37	43	ヒト IgG4
	6A7-H2K3-IgG4	38	43	ヒト IgG4
	6A7-H3K3-IgG2	39	43	ヒト IgG2
	6A7-H3K3-IgG4	39	43	ヒト IgG4
	6A7-H4K3-IgG4	40	43	ヒト IgG4
4H6 ベースの キメラ抗体	4H6-mHvKv-IgG1	56	57	ヒト IgG1
4H6 ベースの ヒト化抗体	4H6-H1K1-IgG4	44	48	ヒト IgG4
	4H6-H2K1-IgG4	45	48	ヒト IgG4
	4H6-H3K1-IgG4	46	48	ヒト IgG4
	4H6-H4K1-IgG4	47	48	ヒト IgG4
	4H6-H1K2-IgG4	44	49	ヒト IgG4
	4H6-H2K2-IgG4	45	49	ヒト IgG4
	4H6-H3K2-IgG4	46	49	ヒト IgG4
	4H6-H4K2-IgG4	47	49	ヒト IgG4
	4H6-H1K3-IgG4	44	50	ヒト IgG4
	4H6-H2K3-IgG4	45	50	ヒト IgG4
	4H6-H3K3-IgG4	46	50	ヒト IgG4

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

【 表 1 - 2 】

	4H6-H4K3-IgG4	47	50	ヒト IgG4	
	4H6-H1K4-IgG4	44	51	ヒト IgG4	
	4H6-H2K4-IgG4	45	51	ヒト IgG4	
	4H6-H3K4-IgG4	46	51	ヒト IgG4	
	4H6-H4K4-IgG4	47	51	ヒト IgG4	
7F10 ベースの キメラ抗体	7F10-mHvKv- IgG1- N297A	52	53	N297A 突然変異を有するヒト IgG1	10
ベ 7F10ースの ヒト化抗体	7F10-H1K1-IgG4	30	33	ヒト IgG4	
	7F10-H1K2-IgG4	30	34	ヒト IgG4	
	7F10-H1K3-IgG4	30	35	ヒト IgG4	
	7F10-H1K4-IgG4	30	36	ヒト IgG4	
	7F10-H2K1-IgG4	31	33	ヒト IgG4	
	7F10-H2K2-IgG4	31	34	ヒト IgG4	
	7F10-H2K3-IgG4	31	35	ヒト IgG4	
	7F10-H2K4-IgG4	31	36	ヒト IgG4	
	7F10-H3K1-IgG4	32	33	ヒト IgG4	20
	7F10-H3K2-IgG4	32	34	ヒト IgG4	
	7F10-H3K3-IgG4	32	35	ヒト IgG4	
	7F10-H3K4-IgG4	32	36	ヒト IgG4	

【 0 0 8 3 】

ヒト化率とは、国際免疫遺伝学情報システム (International Immunogenetics Information System: IMGT) データベースにあるヒト抗体配列と比較したときの重鎖又は軽鎖可変領域配列の同一率を意味する。トップヒットとは、重鎖又は軽鎖可変領域配列が他の種と比べて特定の種に一層近いことを意味する。例えば、ヒトとのトップヒットとは、配列が他の種と比べてヒトに一層近いことを意味する。ヒト及びカニクイザル (*Macaca fascicularis*) とのトップヒットとは、配列がヒト配列及びカニクイザル (*Macaca fascicularis*) 配列に対して同じ同一率であり、他の種の配列と比較したときこれらの同一率が最も高いことを意味する。一部の実施形態において、ヒト化率は、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、又は95%より高い。ヒト化率の決定方法及びトップヒットの決定方法に関する詳細な説明は当該技術分野において公知であり、例えば、Jones, et al. 「抗体非専売名のINN及びアウト (The INNs and outs of antibody nonproprietary names)」。MABs. Vol. 8. No. 1. Taylor & Francis, 2016 (これは全体として参照により本明細書に援用される) に記載されている。高いヒト化率には様々な利点があることが多く、例えば、ヒトにおける安全性がより高いとともに有効性がより高く、ヒト対象に忍容される可能性がより高く、及び/又は副作用を生じる可能性がより低い。

【 0 0 8 4 】

更には、一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合断片はまた、配列番号1~3、配列番号7~9、配列番号13~15、配列番号19、20、3、配列番号22、23、9、及び配列番号24、25、15の群から選択される1、2、又は3つの重鎖可変領域CDR；及び/又は配列番号4~6、配列番号10~12、配列番号16~18、及び配列番号4、21、6の群から選択される1、2、又は3つの軽鎖

10

20

30

40

50

可変領域 C D R を含んでもよい。

【 0 0 8 5 】

一部の実施形態において、抗体は、相補性決定領域 (C D R) 1、2、3 を含む重鎖可変領域 (V H) であって、C D R 1 領域が選択の V H C D R 1 アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、又は 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなり、C D R 2 領域が選択の V H C D R 2 アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、又は 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなり、及び C D R 3 領域が選択の V H C D R 3 アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、又は 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる V H と、C D R 1、2、3 を含む軽鎖可変領域 (V L) であって、C D R 1 領域が選択の V L C D R 1 アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、又は 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなり、C D R 2 領域が選択の V L C D R 2 アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、又は 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなり、及び C D R 3 領域が選択の V L C D R 3 アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、又は 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる V L とを有し得る。選択の V H C D R 1、2、3 アミノ酸配列及び選択の V L C D R 1、2、3 アミノ酸配列は図 1 6 (K a b a t C D R) 及び図 1 7 (C h o t h i a C D R) に示す。

10

【 0 0 8 6 】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片は、0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 1 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 2 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 3 の C D R のうちの 1、2、又は 3 つを含む重鎖可変ドメインを含み得る。

20

【 0 0 8 7 】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片は、0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 7 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 8 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 9 の C D R のうちの 1、2、又は 3 つを含む重鎖可変ドメインを含み得る。

【 0 0 8 8 】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片は、0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 1 3 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 1 4 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 1 5 の C D R のうちの 1、2、又は 3 つを含む重鎖可変ドメインを含み得る。

30

【 0 0 8 9 】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片は、0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 1 9 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 2 0 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 3 の C D R のうちの 1、2、又は 3 つを含む重鎖可変ドメインを含み得る。

40

【 0 0 9 0 】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片は、0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 2 2 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 2 3 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 9 の C D R のうちの 1、2、又は 3 つを含む重鎖可変ドメインを含み得る。

【 0 0 9 1 】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片は、0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 2 4 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸

50

挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 25 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 15 の C D R のうちの 1、2、又は 3 つを含む重鎖可変ドメインを含み得る。

【 0 0 9 2 】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片は、0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 4 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 5 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 6 の C D R のうちの 1、2、又は 3 つを含む軽鎖可変ドメインを含み得る。

【 0 0 9 3 】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片は、0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 10 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 11 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 12 の C D R のうちの 1、2、又は 3 つを含む軽鎖可変ドメインを含み得る。

【 0 0 9 4 】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片は、0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 16 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 17 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 18 の C D R のうちの 1、2、又は 3 つを含む軽鎖可変ドメインを含み得る。

【 0 0 9 5 】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片は、0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 4 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 21 ; 0、1 又は 2 個のアミノ酸挿入、欠失、又は置換を有する配列番号 6 の C D R のうちの 1、2、又は 3 つを含む軽鎖可変ドメインを含み得る。

【 0 0 9 6 】

挿入、欠失、及び置換は C D R 配列の範囲内であってもよく、又は C D R 配列の終端側末端の一方又は両方であってもよい。

【 0 0 9 7 】

本開示はまた、C D 4 0 に結合する抗体又はその抗原結合断片も提供する。抗体又はその抗原結合断片は、選択の V H 配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、又は 95 % 同一のアミノ酸配列を含む又はそれからなる重鎖可変領域 (V H) と、選択の V L 配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、又は 95 % 同一のアミノ酸配列を含む又はそれからなる軽鎖可変領域 (V L) とを含む。一部の実施形態において、選択の V H 配列は配列番号 30、31、32、又は 52 であり、選択の V L 配列は配列番号 33、34、35、36、又は 53 である。一部の実施形態において、選択の V H 配列は配列番号 37、38、39、40、又は 54 であり、選択の V L 配列は配列番号 41、42、43、又は 55 である。一部の実施形態において、選択の V H 配列は配列番号 44、45、46、47、又は 56 であり、選択の V L 配列は配列番号 48、49、50、51、又は 57 である。

【 0 0 9 8 】

2 つのアミノ酸配列、又は 2 つの核酸配列の同一率を決定するには、それらの配列が最適比較を目的としてアラインメントされる (例えば、最適アラインメントのため第 1 及び第 2 のアミノ酸又は核酸配列の一方又は両方にギャップを導入することができ、比較目的で非相同配列を無視することができる)。比較目的でアラインメントされる参照配列の長さは参照配列の長さの少なくとも 80 % であり、一部の実施形態では少なくとも 90 %、95 %、又は 100 % である。次に対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置のアミノ酸残基又はヌクレオチドが比較される。第 1 の配列中のある位置が第 2 の配列中に対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドによって占められているとき、それらの分子

10

20

30

40

50

は当該位置において同一である。2つの配列間の同一率は、2つの配列の最適アラインメントのため導入する必要のあるギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮に入れた、配列によって共有される同一位置の数の関数である。本開示の目的上、配列の比較及び2つの配列間の同一率の決定は、B l o s s u m 62スコアリング行列を用いて、ギャップペナルティ12、ギャップ伸長ペナルティ4、及びフレームシフトギャップペナルティ5として達成することができる。

【0099】

本開示はまた、免疫グロブリン重鎖又は免疫グロブリン軽鎖を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸も提供する。免疫グロブリン重鎖又は免疫グロブリン軽鎖は、図16又は図17に示されるとおりのCDRを含むか、又は図19~図22に示されるとおりの配列を有する。このポリペプチドが対応するポリペプチド（例えば、対応する重鎖可変領域又は対応する軽鎖可変領域）と対になると、対になったポリペプチドはCD40（例えば、ヒトCD40）に結合する。

10

【0100】

抗CD40抗体及び抗原結合断片はまた、抗体又は抗体断片の抗体変異体（誘導体及びコンジュゲートを含む）及び多重特異性（例えば、二重特異性）抗体又は抗体断片であってもよい。本明細書に提供される更なる抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性（多量体、例えば二重特異性）ヒト抗体、キメラ抗体（例えば、ヒト-マウスキメラ）、単鎖抗体、細胞内で作られる抗体（即ち、イントラボディ）、及びこれらの抗原結合断片である。抗体又はその抗原結合断片は、任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）、又はサブクラスであってもよい。一部の実施形態において、抗体又はその抗原結合断片はIgG抗体又はその抗原結合断片である。

20

【0101】

抗体の断片は、それが完全長抗体の所望の親和性及び特異性を保持している限り、提供される方法における使用に好適である。従って、CD40に結合する抗体の断片は、CD40に結合する能力を保持していることになる。Fv断片は、完全な抗原認識及び結合部位を含む抗体断片である。この領域は、例えばscFvにおける共有結合的性質であってもよい緊密な会合状態にある1つの重鎖及び1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置にあることで、各可変ドメインの3つのCDRが相互作用してVH-VL二量体の表面上に抗原結合部位を定義する。まとめると、6つのCDR又はその一部が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）であっても、抗原を認識してそれと結合する能力を有することができるが、但し、通常は結合部位全体と比べると親和性は低い。

30

【0102】

単鎖Fv又は(scFv)抗体断片は抗体のVH及びVLドメイン（又は領域）を含み、ここでこれらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。概して、scFvポリペプチドはVH及びVLドメイン間にポリペプチドリinkerを更に含み、それによりscFvは抗原結合に望ましい構造を形成することが可能になる。

【0103】

Fab断片は、軽鎖の可変及び定常ドメインと重鎖の可変ドメイン及び第1定常ドメイン(CH1)とを含む。F(ab')₂抗体断片は、概してそのカルボキシ末端の近傍でそれらの間のヒンジステインによって共有結合的に連結された一对のFab断片を含む。抗体断片の他の化学的カップリングもまた当該技術分野において公知である。

40

【0104】

ダイアボディは、2つの抗原結合部位を有する小型抗体断片であり、この断片は、同じポリペプチド鎖中のVLにつながったVH（VH及びVL）を含む。同じ鎖上のこれらの2つのドメイン間で対を成すことができないほど短いリンカーを使用することにより、これらのドメインは強制的に別の鎖の相補的ドメインと対になり、2つの抗原結合部位を作り出す。

50

【0105】

線状抗体は、相補的な軽鎖ポリペプチドと一緒にあって一对の抗原結合領域を形成する一对のタンデムFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)を含む。線状抗体は二重特異性又は単一特異性であってもよい。

【0106】

本開示の抗体及び抗体断片は、所望のエフェクター機能又は血清半減期がもたらされるようにFc領域で修飾することができる。

【0107】

抗体の多量体化は、抗体の自然の凝集によるか、又は当該技術分野において公知の化学的若しくは組換え連結技法によって達成し得る。例えば、一部の精製抗体製剤(例えば、精製IgG₁分子)は、抗体ホモ二量体及び他の高次抗体多量体を含有するタンパク質凝集体を自発的に形成する。

【0108】

或いは、抗体ホモ二量体は、当該技術分野において公知の化学的連結技法によって形成されてもよい。例えば、限定はされないが、SMCC(4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸スクシンイミジル)及びSATA(S-アセチルチオ酢酸N-スクシンイミジル)を含めたヘテロ二官能性架橋剤を使用して抗体多量体を形成することができる。抗体ホモ二量体の形成についての例示的プロトコルは、Ghetie et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 7509-7514, 1997)に記載されている。抗体ホモ二量体は、ペプシンによる消化によってFab'₂ホモ二量体に変換することができる。抗体ホモ二量体を形成する別の方法は、Zhao et al. (J. Immunol. 25: 396-404, 2002)に記載される自己親和性(autophilic)T15ペプチドを用いるものである。

【0109】

一部の実施形態において、多重特異性抗体は二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の割合が最大となるように一对の抗体分子の間の接合部分をエンジニアリングすることにより作製されてもよい。例えば、接合部分は、抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含み得る。この方法では、第1の抗体分子の接合部分にある1つ以上の小さいアミノ酸側鎖が、より大きい側鎖(例えば、チロシン又はトリプトファン)に置き換えられる。第2の抗体分子の接合部分には、より大きいアミノ酸側鎖をより小さいもの(例えば、アラニン又はスレオニン)に置き換えることにより、より大きい1つ又は複数の側鎖と同一又は同様のサイズの代償的な「空洞」が作り出される。これは、ホモ二量体などの他の望ましくない最終産物と比べてヘテロ二量体の収率を増加させる機構を提供する。この方法については、例えば、国際公開第96/27011号パンフレット(これはその全体が参照により援用される)に記載されている。

【0110】

二重特異性抗体には、架橋された抗体又は「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲート中の抗体のうち一方がアビジンに、他方がビオチンにカップリングすることができる。ヘテロコンジュゲート抗体はまた、任意の好都合な架橋結合方法を用いて作製することもできる。好適な架橋剤及び架橋結合技法は当該技術分野において周知であり、米国特許第4,676,980号明細書(これは全体として参照により本明細書に援用される)に開示されている。

【0111】

抗体断片からの二重特異性抗体の作成方法もまた、当該技術分野において公知である。例えば、二重特異性抗体は、化学的連結を用いて調製することができる。Brennan et al. (Science 229: 81, 1985)は、インタクトな抗体をタンパク質分解によって切断してF(ab')₂断片を作成する手順を記載している。このような断片は、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されると、隣接ジチオールが安定化し、分子間ジスルフィド形成が防止される。作成されたFab'断片は、次

10

20

30

40

50

にチオニトロ安息香酸 (TNB) 誘導体に変換される。次に Fab' TNB 誘導体のうちの1つがメルカプトエチルアミンによる還元によって Fab' チオールに再び変換され、等モル量の別の Fab' TNB 誘導体と混合することにより二重特異性抗体が形成される。

【0112】

本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片はいずれも、安定化分子 (例えば、対象体内又は溶液中での抗体又はその抗原結合断片の半減期を増加させる分子) にコンジュゲートし得る。安定化分子の非限定的な例としては、ポリマー (例えば、ポリエチレングリコール) 又はタンパク質 (例えば、ヒト血清アルブミンなどの血清アルブミン) が挙げられる。安定化分子をコンジュゲートすると、インビトロ (例えば、組織培養下、又は医薬組成物としての保存時) 又はインビボ (例えば、ヒト体内) での抗体又は抗原結合断片の半減期が増加し、又は生物学的活性が延長し得る。

10

【0113】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片は治療剤にコンジュゲートすることができる。抗体又はその抗原結合断片を含む抗体 - 薬物コンジュゲートは、治療剤に共有結合的又は非共有結合的に結合させることができる。一部の実施形態において、治療剤は細胞傷害剤又は細胞増殖抑制剤 (例えば、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、テニポシド (tenoposide)、ピンクリスチン、ピンラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシン (dihydroxy anthracin)、DM-1及びDM-4などのメイタンシノイド類、ジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、エピルピシン、及びシクロホスファミド及び類似体) である。

20

【0114】

抗体特性

本明細書に記載される抗体又はその抗原結合断片は、CD40とCD40リガンド (例えば、CD154) との間の結合を遮断することができる。

【0115】

本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合断片は、CD40アゴニスト又はアンタゴニストであってもよい。一部の実施形態において、CD40に結合することにより、抗体はCD40シグナル伝達経路を阻害することができる。一部の実施形態において、抗体は免疫応答を上方制御し、又は免疫応答を下方制御することができる。

30

【0116】

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合断片は、免疫細胞 (例えば、T細胞、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、マクロファージ、抗原提示細胞) の免疫応答、活性又は数を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、又は20倍増加させることができる。一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合断片は、免疫細胞 (例えば、T細胞、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、マクロファージ、抗原提示細胞) の活性又は数を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍、又は20倍減少させることができる。

40

【0117】

一部の実施態様では、抗体 (又はその抗原結合断片) はCD40 (例えば、ヒトCD40、サルCD40 (例えば、アカゲザル、カニクイザル (Macaca fascicularis))、マウスCD40、及び/又はキメラCD40) に 0.1 s^{-1} 未満、 0.01 s^{-1} 未満、 0.001 s^{-1} 未満、 0.0001 s^{-1} 未満、又は 0.00001 s^{-1} 未満の解離速度 (koff) で特異的に結合する。一部の実施形態において、解離速度 (koff) は、 0.01 s^{-1} 超、 0.001 s^{-1} 超、 0.0001 s^{-1} 超、 0

50

. 0 0 0 0 1 s⁻¹ 超、又は 0 . 0 0 0 0 0 1 s⁻¹ 超である。

【 0 1 1 8 】

一部の実施形態において、動的会合速度 (k o n) は、 $1 \times 10^2 / M s$ 超、 $1 \times 10^3 / M s$ 超、 $1 \times 10^4 / M s$ 超、 $1 \times 10^5 / M s$ 超、又は $1 \times 10^6 / M s$ 超である。一部の実施形態において、動的会合速度 (k o n) は、 $1 \times 10^5 / M s$ 未満、 $1 \times 10^6 / M s$ 未満、又は $1 \times 10^7 / M s$ 未満である。

【 0 1 1 9 】

親和性は、動的速度定数の商 ($K D = k o f f / k o n$) から推定することができる。一部の実施形態において、 $K D$ は、 $1 \times 10^{-6} M$ 未満、 $1 \times 10^{-7} M$ 未満、 $1 \times 10^{-8} M$ 未満、 $1 \times 10^{-9} M$ 未満、又は $1 \times 10^{-10} M$ 未満である。一部の実施形態において、 $K D$ は、 $50 nM$ 、 $30 nM$ 、 $20 nM$ 、 $15 nM$ 、 $10 nM$ 、 $9 nM$ 、 $8 nM$ 、 $7 nM$ 、 $6 nM$ 、 $5 nM$ 、 $4 nM$ 、 $3 nM$ 、 $2 nM$ 、又は $1 nM$ 未満である。一部の実施形態において、 $K D$ は、 $1 \times 10^{-7} M$ 超、 $1 \times 10^{-8} M$ 超、 $1 \times 10^{-9} M$ 超、 $1 \times 10^{-10} M$ 超、 $1 \times 10^{-11} M$ 超、又は $1 \times 10^{-12} M$ 超である。一部の実施形態において、抗体はヒト CD 40 に約 $6 nM$ 以下の $K D$ で結合する。

10

【 0 1 2 0 】

抗原に対する抗体の親和性を測定する一般的な技法としては、例えば、ELISA、RIA、及び表面プラズモン共鳴 (SPR) が挙げられる。一部の実施形態において、抗体は、ヒト CD 40 (配列番号 26)、サル CD 40 (例えば、アカゲザル CD 40、配列番号 28)、キメラ CD 40 (配列番号 29)、及び / 又はマウス CD 40 (配列番号 27) に結合する。一部の実施形態において、抗体は、ヒト CD 40 (配列番号 26)、サル CD 40 (例えば、アカゲザル CD 40、配列番号 28 ; カニクイザル CD 40)、キメラ CD 40 (配列番号 29)、及び / 又はマウス CD 40 (配列番号 27) に結合しない。

20

【 0 1 2 1 】

一部の実施形態において、熱安定性が決定される。本明細書に記載されるとおりの抗体又は抗原結合断片は、 T_m が 60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、又は 95 より高くてもよい。一部の実施形態において、 T_m は、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、又は 95 より低い。

30

【 0 1 2 2 】

一部の実施形態において、抗体は腫瘍成長阻害率 (TGI %) が 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、110 %、120 %、130 %、140 %、150 %、160 %、170 %、180 %、190 %、又は 200 % より高い。一部の実施形態において、抗体は腫瘍成長阻害率が 60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、110 %、120 %、130 %、140 %、150 %、160 %、170 %、180 %、190 %、又は 200 % より低い。TGI % は、例えば、治療開始から 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は 30 日後、又は治療開始から 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は 12 ヶ月後に決定することができる。本明細書で使用されるとき、腫瘍成長阻害率 (TGI %) は以下の式を用いて計算される：

40

$$TGI (\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$$

T_i は、 i 日目における治療群の平均腫瘍容積である。 T_0 は、0 日目における治療群の平均腫瘍容積である。 V_i は、 i 日目における対照群の平均腫瘍容積である。 V_0 は、0 日目における対照群の平均腫瘍容積である。

【 0 1 2 3 】

50

一部の実施形態において、本明細書に記載されるとおりの抗体又はその抗原結合断片は CD 4 0 アンタゴニストである。一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片は、CD 4 0 を発現する標的細胞の CD 4 0 シグナル伝達を低下させる。

【 0 1 2 4 】

一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片は、APC（例えば、DC細胞）機能を亢進させることができ、例えば、共刺激及びMHC分子の表面発現を誘導し、炎症誘発性サイトカインの産生を誘導し、及び/又はT細胞惹起機能を亢進させることができる。

【 0 1 2 5 】

一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片は、CD 4 0 を発現する腫瘍細胞に結合することができる。一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片は、補体媒介性細胞傷害（CMC）及び/又は抗体依存性細胞傷害（antibody dependent cellular cytotoxicity）（ADCC）を誘導し、腫瘍細胞を死滅させることができる。

10

【 0 1 2 6 】

一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片は機能性Fc領域を有する。一部の実施形態において、機能性Fc領域のエフェクター機能は抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）である。一部の実施形態において、機能性Fc領域のエフェクター機能は食作用である。一部の実施形態において、機能性Fc領域のエフェクター機能はADCC及び食作用である。

【 0 1 2 7 】

一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片は補体媒介性細胞傷害（CMC）を誘導することができる。

20

【 0 1 2 8 】

一部の実施形態において、Fc領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、又はヒトIgG4である。

【 0 1 2 9 】

一部の実施形態において、抗体又は抗原結合断片は機能性Fc領域を有しない。例えば、抗体又は抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片である。一部の実施形態において、Fc領域はLALA突然変異（EU付番でL234A及びL235A突然変異）、又はLALA-PG突然変異（EU付番でL234A、L235A、P329G突然変異）を有する。

30

【 0 1 3 0 】

抗CD 4 0 抗体の作製方法

ヒトCD 4 0 の単離された断片を免疫原として使用して、標準的なポリクローナル及びモノクローナル抗体調製技法を用いて抗体を作成することができる。ポリクローナル抗体は、動物において抗原ペプチド又はタンパク質を複数回注射（例えば、皮下又は腹腔内注射）することにより産生され得る。一部の実施形態において、抗原ペプチド又はタンパク質は少なくとも1つのアジュバントと共に注射される。一部の実施形態において、抗原ペプチド又はタンパク質は、免疫しようとする種において免疫原性の薬剤にコンジュゲートすることができる。動物には抗原ペプチド又はタンパク質を2回以上（例えば、2回、3回、又は4回）注射することができる。

40

【 0 1 3 1 】

免疫原としては、完全長ポリペプチド又はタンパク質が使用されてもよく、或いは、その抗原ペプチド断片が使用されてもよい。タンパク質の抗原ペプチドは、CD 4 0 のアミノ酸配列の少なくとも8（例えば、少なくとも10、15、20、又は30）アミノ酸残基を含み、ペプチドに対して産生される抗体がタンパク質と特異的免疫複合体を形成するようにタンパク質のエピトープを包含する。上記に記載したとおり、ヒトCD 4 0 の完全長配列は当該技術分野において公知である（配列番号26）。

【 0 1 3 2 】

好適な対象（例えば、少なくとも1つのヒト免疫グロブリン遺伝子座を発現するヒト又

50

はトランスジェニック動物)を免疫することによる抗体の調製には、典型的には免疫原が使用される。適切な免疫原性製剤は、例えば、組換え発現させた又は化学合成したポリペプチド(例えば、ヒトCD40の断片)を含有し得る。この製剤は、フロイント完全又は不完全アジュバントなどのアジュバント、又は同様の免疫賦活剤を更に含むことができる。

【0133】

ポリクローナル抗体は、上記に記載したとおり、好適な対象を免疫原としてのCD40ポリペプチド、又はその抗原ペプチド(例えば、CD40の一部)で免疫することにより調製し得る。固定化したCD40ポリペプチド又はペプチドを用いる酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によるなど、標準的な技法により、免疫した対象の時間の経過に伴う抗体力価をモニタすることができる。必要であれば、抗体分子を哺乳類から(例えば、血液から)単離し、プロテインA又はプロテインGクロマトグラフィーによってIgG画分を入手するなど、周知の技法によって更に精製することができる。免疫化後の適切な時点で、例えば、特異抗体価が最も高くなったとき、対象から抗体産生細胞を入手して、当初はKohler et al. (Nature 256:495-497, 1975)によって記載されたハイブリドーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法(Kozbor et al., Immunol. Today 4:72, 1983)、EBV-ハイブリドーマ技法(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985)、又はトリオーマ技法など、標準的な技法によるモノクローナル抗体の調製に使用することができる。ハイブリドーマの作製技術は周知である(概して、Current Protocols in Immunology, 1994, Coligan et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NYを参照のこと)。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、目的のポリペプチド又はエピトープに結合する抗体に関してハイブリドーマ培養上清を例えば標準的なELISAアッセイを用いてスクリーニングすることにより検出される。

【0134】

本明細書に記載されるヒト、ヒト化、又はキメラ抗体、又はその抗原結合断片をコードするDNAに適切なヌクレオチド変化を導入することによるか、又はペプチド合成により、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片の変異体が調製されてもよい。かかる変異体は、例えば、抗体又は抗原結合ドメインの抗原結合部位を構成するアミノ酸配列内の残基の欠失、挿入、又は置換を含む。かかる変異体の集団では、一部の抗体又は抗原結合断片が、標的タンパク質、例えばCD40に対する親和性の増加を示すことになる。欠失、挿入、及び/又は組み合わせの任意の組み合わせを作製して、標的に対する結合親和性が増加した抗体又はその抗原結合断片に至らせることができる。抗体又は抗原結合断片に導入されるアミノ酸変化はまた、グリコシル化部位の数を変化させる(例えば、増加又は減少させる)、グリコシル化部位のタイプを変化させる(例えば、細胞に存在する酵素が異なる糖を結び付けるようにアミノ酸配列を変化させる)、又は新規グリコシル化部位を導入するなど、抗体又は抗原結合断片に新規翻訳後修飾も改変及び導入することができる。

【0135】

本明細書に開示される抗体は、哺乳類を含めた任意の動物種に由来することができる。天然抗体の非限定的な例には、ヒト、霊長類、例えば、サル及び類人猿、雌ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ラクダ科動物(例えば、ラクダ及びラマ)、ニワトリ、ヤギ、及びヒト抗体を産生するように遺伝子操作されたトランスジェニックげっ歯類を含むげっ歯類(例えば、ラット、マウス、ハムスター及びウサギ)に由来する抗体が含まれる。

【0136】

ヒト及びヒト化抗体には、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する(又はそれに由来するものと同じアミノ酸配列を有する)可変領域及び定常領域を有する抗体が含まれる。ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでランダム又は部位特異的突然変異誘発によって導入された突然変異、又はインビボでの体細胞突然変異)を例えばCDRに含み得る。

【0137】

ヒト化抗体は、典型的には、非ヒトCDRがグラフトされたヒトフレームワーク(FR)を有する。従って、ヒト化抗体は、ヒト以外の供給源からそれに導入された1つ以上のアミノ酸配列を有する。このような非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合に「移入」残基と称され、これは典型的には「移入」可変ドメインから取られている。ヒト化は本質的には、例えば、げっ歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに置換することによって実施し得る。これらの方法は、例えば、Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988) (これらの各々は、参照により全体として本明細書に援用される)に記載される。従って、「ヒト化」抗体は、実質的にインタクトに満たないヒトVドメインが非ヒト種からの対応する配列によって置換されているキメラ抗体である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、一部のCDR残基及び一部のFR残基がヒト抗体における類似部位の残基によって置換されているマウス抗体である。

10

【0138】

ヒト化抗体の作製に使用するヒトVH及びVLドメインの選択は、免疫原性を低下させるために極めて重要である。いわゆる「最良適合」法によれば、マウス抗体のVドメインの配列が既知のヒトドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングされる。次にマウスの配列に最も近いヒト配列が、ヒト化抗体用のヒトFRとして受け入れられる(Sims et al., J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987))。

20

【0139】

抗体が抗原に対する高い特異性及び親和性並びに他の有利な生物学的特性を保持しながらヒト化されることが更に重要である。この目標を実現するため、親配列及び様々な概念上のヒト化産物を親配列及びヒト化配列の三次元モデルを用いて分析するプロセスによってヒト化抗体を調製することができる。三次元免疫グロブリンモデルは一般に入手可能であり、当業者は精通している。コンピュータプログラムが利用可能であり、これは、選択された候補免疫グロブリン配列の確率の高い三次元コンホメーション構造を図解及び表示する。これらの表示を調べることにより、候補免疫グロブリン配列が機能する上でのその残基の可能性のある役割の分析、即ち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、1つ又は複数の標的抗原に対する親和性の増加など、所望の抗体特性が実現するようにFR残基を選択し、受容配列及び移入配列から組み合わせることができる。

30

【0140】

通常、ヒト、ヒト化、又はキメラ抗CD40抗体のアミノ酸配列変異体は、元の抗体の軽鎖又は重鎖に存在する配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一率を有するアミノ酸配列を含むことになる。

【0141】

元の配列を基準とした同一性又は相同性とは、通常は、それらの配列をアラインメントし、及び必要であればギャップを導入して最大限の配列同一率を実現した後に、及びいかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮することなく、ヒト、ヒト化、又はキメラ抗CD40抗体又は断片内に存在する配列と同一である候補配列内に存在するアミノ酸残基の割合である。

40

【0142】

抗CD40抗体又は抗原結合断片に対する更なる修飾を作ることができる。例えば、1つ又は複数のシステイン残基をFc領域に導入し、それによりこの領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にすることができる。このように作成されたホモ二量体抗体は、インビトロ及び/又はインビボ半減期がいくらか増加していてもよい。インビトロ及び/又はインビボ半減期が増加したホモ二量体抗体はまた、例えば、Wolff et al. (Cancer Res. 53: 2560-2565, 1993)に記載されるとおり

50

、ヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することもできる。或いは、二重Fc領域を有する抗体をエンジニアリングすることができる（例えば、Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230, 1989を参照のこと）。

【0143】

一部の実施形態において、抗CD40抗体又はその抗原結合断片に共有結合修飾を作ることができる。こうした共有結合修飾は、化学的若しくは酵素的合成によるか、又は酵素的若しくは化学的切断によって作ることができる。抗体又は断片の標的化したアミノ酸残基と、選択の側鎖又はN末端若しくはC末端残基に反応能を有する有機誘導体化剤とを反応させることにより、抗体又は抗体断片の他の種類の共有結合修飾が分子に導入される。

10

【0144】

一部の実施形態において、Fc領域に（直接又は間接的に）結び付いたフコースを欠いている炭水化物構造を有する抗体変異体が提供される。例えば、かかる抗体中のフコースの量は、1%～80%、1%～65%、5%～65%又は20%～40%であってもよい。フコースの量は、例えば国際公開第2008/077546号パンフレットに記載されるとおり、MALDI-TOF質量分析法によって測定したときのAsn297に結び付いた全ての糖鎖構造（例えば複合体、ハイブリッド及び高マンノース構造）の合計に対するAsn297の糖鎖内の平均フコース量を計算することにより決定される。Asn297は、Fc領域の約297位（Fc領域残基のEu付番；又はKabab付番における314位）に位置するアスパラギン残基を指す；しかしながら、Asn297はまた、抗体のマイナーな配列変異に起因して、297位の約±3アミノ酸上流又は下流、即ち294位～300位の間にも位置し得る。かかるフコシル化変異体は、ADCC機能が向上したものであり得る。一部の実施形態において、グリカン不均一性を低減するため、抗体のFc領域は、297位のアスパラギンがアラニンに置き換わる（N297A）ように更にエンジニアリングすることができる。

20

【0145】

一部の実施形態では、Fabアーム交換を回避することにより作製効率を促進するため、IgG4の228位（EU付番）のセリンがプロリンに置き換わる（S228P）ように抗体のFc領域を更にエンジニアリングした。S228突然変異に関する詳細な説明は、例えば、Silva et al., 「新規定量的イムノアッセイと生理学的マトリックス調製との組み合わせを用いて実証されるとおり、S228P突然変異はインビボ及びインビトロIgG4 Fabアーム交換を防止する（The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation）」、*Journal of Biological Chemistry* 290.9(2015):5462-5469（これはその全体が参照により援用される）に記載されている。

30

【0146】

組換えベクター

本開示はまた、本明細書に開示される単離ポリヌクレオチド（例えば、本明細書に開示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）を含む組換えベクター（例えば、発現ベクター）、組換えベクターが導入される宿主細胞（即ち、宿主細胞がポリヌクレオチド及び/又はポリヌクレオチドを含むベクターを含有することになる）、及び組換え技術による組換え抗体ポリペプチド又はその断片の作製も提供する。

40

【0147】

本明細書で使用されるとき、「ベクター」は、宿主細胞へのベクターの導入時に1つ以上の目的のポリヌクレオチドを宿主細胞に送達する能力を有する任意の構築物である。「発現ベクター」は、発現ベクターが導入されている宿主細胞において1つ以上の目的のポリヌクレオチドをコードされたポリペプチドとして送達し及び発現させる能力を有する。

50

従って、発現ベクター中では、目的のポリヌクレオチドは、その発現ベクターを導入された宿主細胞中で目的のポリヌクレオチドが翻訳されることになるように、ベクターの範囲内又は宿主細胞のゲノム内のいずれかにおいて目的のポリヌクレオチドの組込み部位で、又はその近傍で、又はそれに隣接してプロモーター、エンハンサー、及び/又はポリAテールなどの調節エレメントと作動可能に連結されているという点で、ベクターにおいて発現のための位置にある。

【0148】

ベクターは、当該技術分野において公知の方法、例えば、電気穿孔、化学的トランスフェクション（例えば、DEAE-デキストラン）、形質転換、トランスフェクション、及び感染及び/又は形質導入（例えば、組換えウイルスによる）によって宿主細胞に導入することができる。従って、ベクターの非限定的な例には、ウイルスベクター（これは組換えウイルスの作成に使用することができる）、ネイキッドDNA又はRNA、プラスミド、コスミド、ファージベクター、及びカチオン性縮合剤に関連するDNA又はRNA発現ベクターが含まれる。

10

【0149】

一部の実施態様では、本明細書に開示されるポリヌクレオチド（例えば、本明細書に開示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）は、ウイルス発現システム（例えば、ワクシニア又は他のポックスウイルス、レトロウイルス、又はアデノウイルス）を使用して導入され、これは、非病原性（欠損）の複製コンピテントウイルスの使用を伴い得るか、又は複製欠損ウイルスを使用し得る。後者の場合、概してウイルスの伝播は、補完的なウイルスパッケージング細胞においてのみ起こることになる。好適なシステムは、例えば、Fisher-Hoch et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:317-321; Flexner et al., 1989, Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103; Flexner et al., 1990, Vaccine, 8:17-21; 米国特許第4,603,112号明細書、同第4,769,330号明細書、及び同第5,017,487号明細書；国際公開第89/01973号パンフレット；米国特許第4,777,127号明細書；英国特許第2,200,651号明細書；欧州特許第0,345,242号明細書；国際公開第91/02805号パンフレット；Berkner-Biotechniques, 6:616-627, 1988；Rosenfeld et al., 1991, Science, 252:431-434；Kolls et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:215-219；Kass-Eisler et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11498-11502；Guzman et al., 1993, Circulation, 88:2838-2848；及びGuzman et al., 1993, Cir. Res., 73:1202-1207に開示されている。DNAをかかると発現システムに取り入れるる技法は当業者に周知である。DNAはまた、例えば、Ulmer et al., 1993, Science, 259:1745-1749、及びCohen, 1993, Science, 259:1691-1692に記載されるとおり、「ネイキッド」であってもよい。ネイキッドDNAの取込みは、細胞内へと効率的に輸送される生分解性ビーズにDNAをコーティングすることにより増加し得る。

20

30

40

【0150】

発現のため、本明細書に開示される抗体コード又はポリペプチドコードポリヌクレオチドを含むDNAインサートは、いくつか例を挙げれば、ファージPLプロモーター、大腸菌（E. coli）lac、trp及びtacプロモーター、SV40初期及び後期プロモーター並びにレトロウイルスLTRのプロモーターなど、適切なプロモーター（例えば、異種プロモーター）に作動可能に連結することができる。他の好適なプロモーターが当業者に公知である。発現構築物は、転写開始、終結部位、及び転写領域における翻訳のためのリボソーム結合部位を更に含むことができる。構築物によって発現される成熟転写物のコード部分は、翻訳されるポリペプチドの始まりに翻訳開始コドン及びその終わりに

50

適切な位置にある終止コドン (U A A、U G A、又はU A G) を含み得る。

【 0 1 5 1 】

指示されるとおり、発現ベクターは少なくとも1つの選択可能なマーカーを含み得る。かかるマーカーには、真核細胞培養用のジヒドロ葉酸レダクターゼ又はネオマイシン耐性並びに大腸菌 (E . c o l i) 及び他の細菌における培養用にテトラサイクリン又はアンピシリン耐性遺伝子が含まれる。適切な宿主の代表的な例としては、限定はされないが、大腸菌 (E . c o l i)、ストレプトミセス属 (S t r e p t o m y c e s)、及びネズミチフス菌 (S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m) 細胞などの細菌細胞；酵母細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエ S 2 及びスポドプテラ S f 9 細胞などの昆虫細胞；C H O、C O S、B o w e s 黒色腫、及び H K 2 9 3 細胞などの動物細胞；及び植物細胞が挙げられる。本明細書に記載される宿主細胞に適切な培養培地及び条件は当該技術分野において公知である。

10

【 0 1 5 2 】

細菌での使用のための非限定的なベクターとしては、Q i a g e n から入手可能な p Q E 7 0、p Q E 6 0 及び p Q E - 9；S t r a t a g e n e から入手可能な p B S ベクター、P h a g e s c r i p t ベクター、B l u e s c r i p t ベクター、p N H 8 A、p N H 1 6 a、p N H 1 8 A、p N H 4 6 A；及び P h a r m a c i a から入手可能な p t r c 9 9 a、p K K 2 2 3 - 3、p K K 2 3 3 - 3、p D R 5 4 0、p R I T 5 が挙げられる。非限定的な真核生物ベクターとしては、S t r a t a g e n e から入手可能な p W L N E O、p S V 2 C A T、p O G 4 4、p X T 1 及び p S G；及び P h a r m a c i a から入手可能な p S V K 3、p B P V、p M S G 及び p S V L が挙げられる。他の好適なベクターは、当業者には容易に明らかであろう。

20

【 0 1 5 3 】

使用に好適な非限定的な細菌プロモーターとしては、大腸菌 (E . c o l i) l a c I 及び l a c Z プロモーター、T 3 及び T 7 プロモーター、g p t プロモーター、P R 及び P L プロモーター並びに t r p プロモーターが挙げられる。好適な真核生物プロモーターとしては、C M V 前初期プロモーター、H S V チミジンキナーゼプロモーター、初期及び後期 S V 4 0 プロモーター、ラウス肉腫ウイルス (R S V) のものなど、レトロウイルス L T R のプロモーター、及びマウスメタロチオネイン - I プロモーターなど、メタロチオネインプロモーターが挙げられる。

30

【 0 1 5 4 】

酵母サッカロミセス・セレビスエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) においては、因子、アルコールオキシダーゼ、及び P G H など、構成的又は誘導性プロモーターを含む幾つものベクターが使用されてもよい。レビューについては、A u s u b e l e t a l . (1 9 8 9) C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , J o h n W i l e y & S o n s , N e w Y o r k , N . Y , a n d G r a n t e t a l . , M e t h o d s E n z y m o l . , 1 5 3 : 5 1 6 - 5 4 4 (1 9 9 7) を参照のこと。

【 0 1 5 5 】

宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストラン媒介性トランスフェクション、カチオン性脂質媒介性トランスフェクション、電気穿孔、形質導入、感染又は他の方法によって達成することができる。かかる方法は、D a v i s e t a l . , B a s i c M e t h o d s I n M o l e c u l a r B i o l o g y (1 9 8 6) (これは全体として参照により本明細書に援用される) など、多くの標準的な実験マニュアルに記載されている。

40

【 0 1 5 6 】

高等真核生物による本開示の抗体をコードする D N A の転写は、ベクターにエンハンサー配列を挿入することにより増加し得る。エンハンサーは、通常は約 1 0 ~ 3 0 0 b p の、所与の宿主細胞型におけるプロモーターの転写活性を増加させるように働く D N A のシス作用エレメントである。エンハンサーの例としては、塩基対 1 0 0 ~ 2 7 0 において複

50

製起点の後期側に位置するSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側にあるポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。

【0157】

翻訳されたタンパク質を小胞体の管腔内、細胞膜周辺腔内又は細胞外環境内へと分泌させるため、発現させるポリペプチドに適切な分泌シグナルを取り入れてもよい。こうしたシグナルはポリペプチドにとって内因性であってもよく、又はそれは異種シグナルであってもよい。

【0158】

ポリペプチド（例えば、抗体）は、融合タンパク質（例えば、GST融合体）又はヒスチジンタグ付加など、修飾された形態で発現させることができ、分泌シグナルのみならず、更なる異種機能性領域もまた含み得る。例えば、ポリペプチドのN末端に、更なるアミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域を付加してもよく、それにより宿主細胞内での、精製中の、又は続くハンドリング及び保存中の安定性及び持続性が向上し得る。また、ポリペプチドにペプチド部分を付加して精製を促進することができる。かかる領域は、ポリペプチドの最終調製前に取り除くことができる。ポリペプチドにペプチド部分を付加して、とりわけ、分泌又は排出を生じさせ、安定性を向上させ、及び精製を促進することは、当該技術分野では熟知されているルーチンの技法である。

【0159】

治療方法

本開示の抗体又はその抗原結合断片は、様々な治療目的に使用することができる。

【0160】

一態様において、本開示は、対象における癌の治療方法、対象における時間の経過に伴う腫瘍容積の増加速度を低減する方法、転移の発生リスクを低減する方法、又は対象における更なる転移の発生リスクを低減する方法を提供する。一部の実施形態において、治療は、癌の進行を食い止め、減速させ、遅らせ、又は阻害することができる。一部の実施形態において、治療の結果、対象における癌の1つ以上の症状の数、重症度、及び/又は持続期間を低減することができる。

【0161】

一態様において、本開示は、本明細書に開示される抗体又はその抗原結合断片の治療有効量を、それを必要としている対象（例えば、癌を有する、又は有すると同定若しくは診断された対象）（例えば、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌）、カルチノイド癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、神経膠腫、頭頸部癌、肝癌、肺癌、小細胞肺癌、リンパ腫、黒色腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、腎癌、結腸直腸癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、膀胱癌、尿道癌、又は血液学的悪性腫瘍）に投与することを含む方法を特徴とする。一部の実施形態において、癌は、切除不能黒色腫又は転移性黒色腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌（SCLC）、膀胱癌、又は転移性ホルモン不応性前立腺癌である。一部の実施形態において、対象は固形腫瘍を有する。一部の実施形態において、癌は、頭頸部扁平上皮癌（SCCHN）、腎細胞癌（RCC）、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）、又は結腸直腸癌である。一部の実施形態において、対象はホジキンリンパ腫を有する。一部の実施形態において、対象は、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）、胃癌、尿路上皮癌、メルケル細胞癌、又は頭頸部癌を有する。一部の実施形態において、癌は、黒色腫、膵癌、中皮腫、血液学的悪性腫瘍、特に、非ホジキンリンパ腫、リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、又は進行固形腫瘍である。

【0162】

一部の実施形態において、本明細書に開示される組成物及び方法は、癌のリスクがある患者の治療に使用することができる。癌を有する患者は、当該技術分野において公知の様々な方法で同定することができる。

【0163】

一態様において、本開示は、例えば、APC細胞の機能特性に影響を及ぼすことにより

(例えば、CD40とCD40Lとの間の相互作用を遮断することにより)、異常な又は望ましくない免疫応答、例えば自己免疫障害に関連する障害を治療し、予防し、又はその発症リスクを低減する方法を提供する。これらの自己免疫障害としては、限定はされないが、円形脱毛症、ループス、強直性脊椎炎、メニエール病、抗リン脂質症候群、混合結合組織病、自己免疫性アジソン病、多発性硬化症、自己免疫性溶血性貧血、重症筋無力症、自己免疫性肝炎、尋常性天疱瘡、ベーチェット病、悪性貧血、水疱性類天疱瘡、結節性多発性関節炎 (polyarthritis nodosa)、心筋症、多発性軟骨炎、セリアックスブルー皮膚炎、多腺性症候群、慢性疲労症候群 (CFIDS)、リウマチ性多発筋痛症、慢性炎症性脱髄性多発筋炎・皮膚筋炎、慢性炎症性多発ニューロパチー、原発性無ガンマグロブリン血症、チャージ・シュトラウス症候群、原発性胆汁性肝硬変、癩痕性類天疱瘡、乾癬、クレスト症候群、レイノー現象、寒冷凝集素症、ライター症候群、クローン病、リウマチ熱、円板状ループス、関節リウマチ、クリオグロブリン血症 サルコイドーシス、線維筋痛症、強皮症、グレーブス病、シェーグレン症候群、ギラン・バレー、スティフマン症候群、橋本甲状腺炎、高安動脈炎、特発性肺線維症、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、潰瘍性大腸炎、IgA腎症、ぶどう膜炎、糖尿病 (例えば、I型)、脈管炎、扁平苔癬、及び白斑が挙げられる。抗CD40抗体又はその抗原結合断片はまた、対象に投与することにより、細胞、組織又は臓器移植、例えば、腎臓、肝臓、及び心臓移植に関連する異常な又は望ましくない免疫応答に関連する障害、例えば移植片対宿主病 (GVHD) を治療し、予防し、又はその発症リスクを低減することができ、又は同種移植片拒絶を予防することができる。一部の実施形態において、対象は、クローン病、潰瘍性大腸炎又は1型糖尿病を有する。

10

20

【0164】

本明細書で使用されるとき、「有効量」とは、疾患、例えば自己免疫疾患又は癌の進行を食い止め、減速させ、遅らせ、又は阻害することを含めた有益な又は所望の結果を生じさせるのに十分な量又は投薬量を意味する。有効量は、例えば、抗体、抗原結合断片、抗体コードポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター、及び/又はその組成物が投与される対象の年齢及び体重、症状の重症度及び投与経路に応じて異なることになり、従って投与は個別に決定されてもよい。

【0165】

有効量は、1回以上の投与で投与することができる。例として、抗体又は抗原結合断片の有効量は、患者における自己免疫疾患又は癌の進行を改善し、止め、安定化させ、逆転させ、阻害し、減速及び/又は遅延させるのに十分な量であるか、又はインビトロで細胞 (例えば、生検細胞、本明細書に記載される癌細胞のいずれか、又は細胞株 (例えば、癌細胞株)) の増殖を改善し、止め、安定化させ、逆転させ、減速及び/又は遅延させるのに十分な量である。当該技術分野において理解されるとおり、抗体又は抗原結合断片の有効量は、とりわけ、患者病歴並びに使用される抗体のタイプ (及び/又は投薬量) などの他の要因に応じて異なり得る。

30

【0166】

本明細書に開示される抗体、抗体コードポリヌクレオチド、及び/又は組成物の有効量及び投与スケジュールは実験的に決定されてもよく、かかる決定を行うことは、当該技術分野における技能の範囲内である。当業者は、投与しなければならない投薬量が、例えば、本明細書に開示される抗体、抗体コードポリヌクレオチド、及び/又は組成物の投与を受けることになる哺乳類、投与経路、使用される本明細書に開示される抗体、抗体コードポリヌクレオチド、抗原結合断片、及び/又は組成物の詳細なタイプ並びに哺乳類に投与されている他の薬物に応じて異なり得ることを理解しているであろう。抗体又は抗原結合断片に適切な用量の選択における手引きについては、抗体及び抗原結合断片の治療使用に関連する文献、例えば、Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., 1985, ch. 22 and pp. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diag

40

50

nosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York, 1977, pp. 365 - 389を参照することができる。

【0167】

有効量の抗体の典型的な1日投薬量は、 $0.01\text{ mg/kg} \sim 100\text{ mg/kg}$ である。一部の実施形態において、投薬量は、 100 mg/kg 、 10 mg/kg 、 9 mg/kg 、 8 mg/kg 、 7 mg/kg 、 6 mg/kg 、 5 mg/kg 、 4 mg/kg 、 3 mg/kg 、 2 mg/kg 、 1 mg/kg 、 0.5 mg/kg 、又は 0.1 mg/kg より低くてもよい。一部の実施形態において、投薬量は、 10 mg/kg 、 9 mg/kg 、 8 mg/kg 、 7 mg/kg 、 6 mg/kg 、 5 mg/kg 、 4 mg/kg 、 3 mg/kg 、 2 mg/kg 、 1 mg/kg 、 0.5 mg/kg 、 0.1 mg/kg 、 0.05 mg/kg 、又は 0.01 mg/kg より高くてもよい。一部の実施形態において、投薬量は、約 10 mg/kg 、 9 mg/kg 、 8 mg/kg 、 7 mg/kg 、 6 mg/kg 、 5 mg/kg 、 4 mg/kg 、 3 mg/kg 、 2 mg/kg 、 1 mg/kg 、 0.9 mg/kg 、 0.8 mg/kg 、 0.7 mg/kg 、 0.6 mg/kg 、 0.5 mg/kg 、 0.4 mg/kg 、 0.3 mg/kg 、 0.2 mg/kg 、又は 0.1 mg/kg である。

10

【0168】

本明細書に記載される方法のいずれにおいても、少なくとも1つの抗体、その抗原結合断片、又は医薬組成物（例えば、本明細書に記載される抗体、抗原結合断片、又は医薬組成物のいずれか）、及び任意選択で、少なくとも1つの追加的な治療剤は、対象に少なくとも週1回（例えば、週1回、週2回、週3回、週4回、1日1回、1日2回、又は1日3回）投与することができる。一部の実施形態において、少なくとも2つの異なる抗体及び/又は抗原結合断片が同じ組成物（例えば、液体組成物）で投与される。一部の実施形態において、少なくとも1つの抗体又は抗原結合断片と少なくとも1つの追加的な治療剤とが同じ組成物（例えば、液体組成物）で投与される。一部の実施形態において、少なくとも1つの抗体又は抗原結合断片と少なくとも1つの追加的な治療剤とは2つの異なる組成物（例えば、少なくとも1つの抗体又は抗原結合断片を含有する液体組成物と少なくとも1つの追加的な治療剤を含有する固体経口組成物）で投与される。一部の実施形態において、少なくとも1つの追加的な治療剤は、丸薬、錠剤、又はカプセルとして投与される。一部の実施形態において、少なくとも1つの追加的な治療剤は、徐放性経口製剤で投与される。

20

30

【0169】

一部の実施形態において、1つ以上の追加的な治療剤は、少なくとも1つの抗体、抗原結合抗体断片、又は医薬組成物（例えば、本明細書に記載される抗体、抗原結合抗体断片、又は医薬組成物のいずれか）の投与前、又は投与後に対象に投与することができる。一部の実施形態において、1つ以上の追加的な治療剤と、少なくとも1つの抗体、抗原結合抗体断片、又は医薬組成物（例えば、本明細書に記載される抗体、抗原結合抗体断片、又は医薬組成物のいずれか）とは、対象において1つ以上の追加的な治療剤と少なくとも1つの抗体又は抗原結合断片（例えば、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片のいずれか）との生物活性期間に重複があるように対象に投与される。

40

【0170】

一部の実施形態において、対象は、少なくとも1つの抗体、抗原結合抗体断片、又は医薬組成物（例えば、本明細書に記載される抗体、抗原結合抗体断片、又は医薬組成物のいずれか）を長期間にわたり（例えば、少なくとも1週間、2週間、3週間、1ヵ月、2ヵ月、3ヵ月、4ヵ月、5ヵ月、6ヵ月、7ヵ月、8ヵ月、9ヵ月、10ヵ月、11ヵ月、12ヵ月、1年、2年、3年、4年、又は5年の期間にわたり）投与されてもよい。当業者である医療専門家は、本明細書に記載される方法のいずれかを診断に用いて、又は治療の有効性（例えば、癌の少なくとも1つの症状の観察）に従い、治療期間の長さを決定し得る。本明細書に記載されるとおり、当業者である医療専門家はまた、対象に投与される抗体又は抗原結合抗体断片（及び/又は1つ以上の追加的な治療剤）のアイデンティティ

50

及び数を変更する（例えば、増加又は低下させる）こともでき、また、少なくとも1つの抗体又は抗原結合抗体断片（及び/又は1つ以上の追加的な治療剤）の対象への投与について、治療の有効性の評価に基づき（例えば、本明細書に記載される及び当該技術分野において公知の方法のいずれかを用いて）投薬量又は頻度を調整する（例えば、増加又は低下させる）こともできる。

【0171】

一部の実施形態において、対象に1つ以上の追加的な治療剤を投与することができる。追加的な治療剤は、B-Rafの阻害薬、EGFR阻害薬、MEKの阻害薬、ERKの阻害薬、K-Rasの阻害薬、c-Metの阻害薬、未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）の阻害薬、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3K）の阻害薬、Aktの阻害薬、mTORの阻害薬、二重PI3K/mTOR阻害薬、ブルトンチロシンキナーゼ（BTK）の阻害薬、及びイソクエン酸デヒドロゲナーゼ1（IDH1）及び/又はイソクエン酸デヒドロゲナーゼ2（IDH2）の阻害薬からなる群から選択される1つ以上の阻害薬を含むことができる。一部の実施形態において、追加的な治療剤は、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ-1（IDO1）の阻害薬（例えば、エパカドスタット）である。

10

【0172】

一部の実施形態において、追加的な治療剤は、HER3の阻害薬、LSD1の阻害薬、MDM2の阻害薬、BCL2の阻害薬、CHK1の阻害薬、活性化ヘッジホッグシグナル伝達経路の阻害薬、及びエストロゲン受容体を選択的に分解する薬剤からなる群から選択される1つ以上の阻害薬を含むことができる。

20

【0173】

一部の実施形態において、追加的な治療剤は、トラベクテジン、nab-パクリタキセル、トレバナニブ、パゾパニブ、セジラニブ、パルボシクリブ、エベロリムス、フルオロピリミジン、IFL、レゴラフェニブ、レオリジン（Reolysin）、アリムタ（Arimta）、ジカディア（Zykadia）、スーテント（Sutent）、テムシロリムス、アキシチニブ、エベロリムス、ソラフェニブ、ヴォトリエント（Votrient）、パゾパニブ、IMA-901、AGS-003、カボザンチニブ、ピンフルニン、Hsp90阻害薬、Ad-GM-CSF、テモゾロミド（Temozolomide）、IL-2、IFN α 、ピンブラスチン、サロミド（Thalomid）、ダカルバジン、シクロホスファミド、レナリドマイド、アザシチジン、レナリドマイド、ボルテゾミブ（bortezomib）、アムルピシン（amrubicine）、カルフィルゾミブ、プラトトレキサート、及びエンザスタウリンからなる群から選択される1つ以上の治療剤を含むことができる。

30

【0174】

一部の実施形態において、追加的な治療剤は、アジュバント、TLRアゴニスト、腫瘍壊死因子（TNF）、IL-1、HMGB1、IL-10アンタゴニスト、IL-4アンタゴニスト、IL-13アンタゴニスト、IL-17アンタゴニスト、HVEMアンタゴニスト、ICOSアゴニスト、治療ターゲティングCX3CL1、治療ターゲティングCXCL9、治療ターゲティングCXCL10、治療ターゲティングCCL5、LFA-1アゴニスト、ICAM1アゴニスト、及びセレクチンアゴニストからなる群から選択される1つ以上の治療剤を含むことができる。

40

【0175】

一部の実施形態において、カルボプラチン、nab-パクリタキセル、パクリタキセル、シスプラチン、ペメトレキセド、ゲムシタピン、FOLFOX、又はFOLFIRIが対象に投与される。

【0176】

一部の実施形態において、追加的な治療剤は、抗OX40抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗CTLA-4抗体、又は抗GITR抗体である。

50

【0177】

医薬組成物及び投与経路

また、本明細書には、本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片のうち少なくとも1つ（例えば、1、2、3、又は4つ）を含む医薬組成物も提供される。本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片のいずれかの2つ以上（例えば、2、3、又は4つ）が任意の組み合わせで医薬組成物中に存在することができる。本医薬組成物は、当該技術分野において公知の任意の方法で製剤化され得る。

【0178】

本医薬組成物は、その意図される投与経路（例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、皮下、又は腹腔内）と適合性があるように製剤化される。本組成物は、滅菌希釈剤（例えば、滅菌水又は生理食塩水）、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒、抗細菌剤又は抗真菌剤、例えば、ベンジルアルコール又はメチルパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど、抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなど、キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸など、緩衝液、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩など、及び等張剤、例えば、糖類（例えば、デキストロース）、多価アルコール類（例えば、マンニトール又はソルビトール）、又は塩（例えば、塩化ナトリウム）など、又はこれらの任意の組み合わせを含むことができる。リポソーム懸濁液もまた、薬学的に許容可能な担体として使用することができる（例えば、米国特許第4,522,811号明細書を参照のこと）。本組成物の調製物は、製剤化し、アンプル、使い捨てシリンジ、又は頻回投与バイアルに封入することができる。必要に応じて（例えば注射用製剤の場合のように）、例えば、レシチンなどのコーティング、又は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。抗体又はその抗原結合断片の吸収は、吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチン）を含めることにより延長させることができる。或いは、制御放出は、インプラント及びマイクロカプセル化デリバリーシステムによって実現することができる。これらは、生分解性生体適合性ポリマー（例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル類、及びポリ乳酸；Alza Corporation及びNova Pharmaceutical, Inc.）を含み得る。

【0179】

本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片のいずれかの1つ以上を含む組成物は、非経口（例えば、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、皮下、又は腹腔内）投与用に投薬量単位形態（即ち、投与の容易さ及び投薬量の均一性のため所定分量の活性化化合物を含有する物理的に個別の単位）で製剤化することができる。

【0180】

組成物の毒性及び治療有効性は、細胞培養物又は実験動物（例えば、サル）において標準的な薬学的手順により決定することができる。例えば、LD50（集団の50%に致死的な用量）及びED50（集団の50%に治療上有効な用量）：LD50：ED50の比である治療指数を決定することができる。高い治療指数を呈する薬剤が好ましい。薬剤が望ましくない副作用を呈する場合、潜在的損傷を最小限に抑える（即ち、望ましくない副作用を低減する）ように注意しなければならない。毒性及び治療有効性は、他の標準的な薬学的手順により決定することができる。

【0181】

対象（例えば、ヒト）に用いるいずれか所与の薬剤の適切な投薬量の製剤化においては、細胞培養アッセイ及び動物試験から得られるデータを用いることができる。1つ以上（例えば、1、2、3、又は4つ）の抗体又はその抗原結合断片（例えば、本明細書に記載される抗体又は抗体断片のいずれか）の治療有効量とは、対象（例えば、癌を有すると同定されたヒト対象）、又は疾患を発症するリスクがあると同定された対象（例えば、過去に癌を発症したことがあるが、現在は治癒している対象）において対象の疾患を治療する（例えば、癌細胞を死滅させる）、対象（例えば、ヒト）における疾患の1つ以上の症状

10

20

30

40

50

の重症度、頻度、及び/又は持続期間を低下させる量ということになる。本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片のいずれかの有効性及び用量は、医療専門家又は獣医学専門家が当該技術分野において公知の方法を用いて、並びに対象（例えば、ヒト）における疾患の1つ以上の症状の観察により決定することができる。対象を有効に治療するために必要な投薬量及びタイミングには、特定の要因が影響を与え得る（例えば、疾患又は障害の重症度、治療歴、対象の全般的な健康及び/又は年齢、及び他の疾患の有無）。

【0182】

例示的用量は、対象の体重1キログラム当たりの本明細書に記載される抗体又は抗原結合断片のいずれかのミリグラム又はマイクログラム量を含む（例えば、約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約500 mg/kg ; 約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約500 mg/kg ; 約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約50 mg/kg ; 約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約5 mg/kg ; 約10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約0.5 mg/kg ; 又は約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）。これらの用量は広い範囲を網羅するが、当業者は、抗体及びその抗原結合断片を含めた治療剤がその効力の点で異なり、有効量は当該技術分野において公知の方法により決定し得ることを理解するであろう。典型的には、初めは比較的低い用量が投与され、担当の医療専門家又は獣医学専門家（治療適用の場合）又は研究者（未だ開発段階で作業中のとき）が続いて適切な反応が得られるまで用量を徐々に増加させることができる。加えて、任意の特定の対象についての具体的な用量レベルは、用いられる具体的な化合物の活性、対象の年齢、体重、全般的な健康、性別、及び食事、投与時間、投与経路、排泄速度、及び抗体又は抗体断片のインビボ半減期を含めた種々の要因に依存するであろうことが理解される。

【0183】

本医薬組成物は、容器、パック、又はディスペンサーに投与説明書と共に封入することができる。本開示はまた、本明細書に記載されるとおりの様々な使用のための抗体又はその抗原結合断片の製造方法も提供する。

【実施例】

【0184】

本発明は以下の実施例に更に記載され、実施例は特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではない。

【0185】

実施例1 . マウス抗hCD40抗体の作成

ヒトCD40（hCD40；配列番号26）に対するマウス抗体を作成するため、6~8週齢雌BALB/cマウスをヒトCD40で免疫した。以下に記載し、図1及び図2に図示するとおりの方法により、抗hCD40抗体を採取した。

【0186】

マウスの免疫化

6~8週齢雌BALB/cマウスを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のHisタグ付加ヒトCD40タンパク質によって20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で免疫した。Hisタグ付加ヒトCD40タンパク質はアジュバントで乳化させて、マウスの背中中の4つの位置に注射した。1回目の皮下（s.c.）注射については、抗原希釈液を等容積の完全フロイントアジュバント（CFA）で乳化させた。続く皮下注射では、タンパク質を等容積の不完全フロイントアジュバント（IFA）で乳化させた。3回目の注射又はブースター免疫の3日後、血液（血清）を採取し、抗体力価に関してELISAを用いて分析した。

【0187】

別の実験では、ヒトCD40をコードする発現プラスミドをマウスに注射することによって6~8週齢雌BALB/cマウスを免疫した。抗原をコードするプラスミドは、遺伝子銃を使用することによりマウスの前脛骨筋（筋肉内注射；i.m.注射）に1000 $\mu\text{g}/\text{ul}$ の濃度で各マウスにつき60 μg を注射した。少なくとも4回の注射を実施し、2つの注射間は少なくとも14日空けた。最終回の免疫化から7日後に血液（血清）を採取し、血清の抗体力価をELISAによって試験した。

【0188】

10

20

30

40

50

前回の免疫化から少なくとも14日後に、免疫化を亢進させるための手順もまた（プラスミドの注射によるか、又はタンパク質の注射によるかのいずれかで）実施した。表面上にCD40抗原を発現するCHO細胞をマウスの尾静脈に静脈内注射した。次に注射の4日後に脾臓を採取した。

【0189】

SP2/0細胞と脾臓細胞との融合

脾臓組織を粉砕した。初めにCD3 マイクロビーズ及び抗マウスIgMマイクロビーズによって脾臓細胞を選択し、次にSP2/0細胞と融合した。次にこの細胞をヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン（HAT）培地が入った96ウェルプレートにプレティングした。

【0190】

ハイブリドーマの一次スクリーニング

標準的手順に従い蛍光活性化細胞選別（FACS）を用いて96ウェルプレート内のハイブリドーマ上清の一次スクリーニングを実施した。96ウェルプレートにチャイニースハムスター卵巣（CHO）細胞を加え（ 2×10^4 細胞/ウェル）、その後スクリーニングした。50 μ lの上清を使用した。実験に使用した抗体は、

（1）フルオレセイン（FITC）コンジュゲートAffiniPure F(ab)₂断片ヤギ抗マウスIgG、Fc断片特異的、及び

（2）Alexa Fluor（登録商標）647コンジュゲートAffiniPure F(ab)₂断片ヤギ抗ヒトIgG、Fc断片特異的であった。

【0191】

サブクローニング

ClonePix 2を使用してサブクローニングを実施した。手短に言えば、一次スクリーニングで同定された陽性ウェルを半流動培地に移し、IgG陽性クローンを同定して試験した。FITC抗マウスIgG Fc抗体を使用した。

【0192】

腹水抗体

1×10^6 個の陽性ハイブリドーマ細胞をB-NDG（商標）マウス（Beijing Biocytogen、中国北京市；カタログ番号B-CM-002）に腹腔内注射した。マウスの腹腔内でハイブリドーマ細胞を成長させることにより、モノクローナル抗体を産生した。ハイブリドーマ細胞が増大し、マウスの腹部に腹水が生じた。この水には、回収して後に使用し得る高濃度の抗体が含まれた。

【0193】

抗体の精製

GEAKTAタンパク質クロマトグラフィー（GE Healthcare、Chicago、米国イリノイ州）を使用して腹水中の抗体を精製した。上記に記載される方法によって作製したマウス抗体の中には、03-7F10（「7F10」）、06-6A7（「6A7」）、07-4H6（「4H6」）、03-9D7（「9D7」）、03-2A7（「2A7」）、及び03-9E11（「9E11」）があった。

【0194】

抗体のVH、VL及びCDR領域を決定した。7F10の重鎖CDR1、CDR2、CDR3、並びに軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列は、配列番号1~6（Kabattの付番）又は配列番号19、20、3、4、21、6（Chothiaの付番）に示す。

【0195】

6A7の重鎖CDR1、CDR2、CDR3、並びに軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3アミノ酸配列は、配列番号7~12（Kabattの付番）又は配列番号22、23、9、10、11、12（Chothiaの付番）に示す。

【0196】

10

20

30

40

50

4 H 6 の重鎖 C D R 1、C D R 2、C D R 3、並びに軽鎖 C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 アミノ酸配列は、配列番号 1 3 ~ 1 8 (K a b a t の付番) 又は配列番号 2 4、2 5、1 5、1 6、1 7、1 8 (C h o t h i a の付番) に示す。

【 0 1 9 7 】

実施例 2 . マウス抗体のヒト化

ヒト化の出発点は、マウス抗体 (例えば、7 F 1 0、6 A 7、及び 4 H 6) であった。これらのマウス抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を決定した。

【 0 1 9 8 】

7 F 1 0 について、異なる修飾又は置換を含む 3 つのヒト化重鎖可変領域変異体 (配列番号 3 0 ~ 3 2) 及び 4 つのヒト化軽鎖可変領域変異体 (配列番号 3 3 ~ 3 6) を構築した。

10

【 0 1 9 9 】

6 A 7 について、異なる修飾又は置換を含む 4 つのヒト化重鎖可変領域変異体 (配列番号 3 7 ~ 4 0) 及び 3 つのヒト化軽鎖可変領域変異体 (配列番号 4 1 ~ 4 3) を構築した。

【 0 2 0 0 】

4 H 6 について、異なる修飾又は置換を含む 4 つのヒト化重鎖可変領域変異体 (配列番号 4 4 ~ 4 7) 及び 4 つのヒト化軽鎖可変領域変異体 (配列番号 4 8 ~ 5 1) を構築した。

【 0 2 0 1 】

これらのヒト化重鎖可変領域変異体は、同じマウス抗体をベースとする軽鎖可変領域変異体のいずれかと組み合わせることができる。例えば、6 A 7 - H 4 (配列番号 4 0) は、同じマウス抗体 6 A 7 をベースとする任意のヒト化軽鎖可変領域変異体 (例えば、6 A 7 - K 2 (配列番号 4 2)) と組み合わせることができ、その抗体には、それに従った抗体名が付与される (例えば、6 A 7 - H 4 K 2) 。

20

【 0 2 0 2 】

実施例 3 . マウス抗 h C D 4 0 抗体のインビトロ試験：ヒト C D 4 0 (h C D 4 0) とヒト C D 4 0 リガンド (h C D 4 0 L) との結合を遮断する

抗 h C D 4 0 抗体が h C D 4 0 とそのリガンド h C D 4 0 L との間の結合を遮断できるかどうかを決定するため、遮断アッセイを実施した。

【 0 2 0 3 】

マウス腹水から抗 h C D 4 0 抗体を採取し、クロマトグラフィーによって精製した。ヒト C D 4 0 を一過性にトランスフェクトした 2 5 μ l C H O 細胞をプレートの各ウェルに加えた。精製抗体は、5 0、5、0 . 5、0 . 0 5、及び 0 . 0 0 5 μ g / m l の終濃度に用量調整した。用量調整後の抗体を 4 で各ウェルに 2 5 μ l / ウェルで加え、3 0 分間インキュベートした。

30

【 0 2 0 4 】

h C D 4 0 リガンド - h F c を H 2 9 3 T 細胞によって発現させた。各ウェルに 5 0 μ l の h C D 4 0 L - h F c を加えた (1 : 5 0 0) 。細胞を h C D 4 0 L - h F c 及び抗体と共に 4 で 1 5 分間インキュベートした。

【 0 2 0 5 】

リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 2 回洗浄した後、各ウェルに 1 : 5 0 0 希釈の 5 0 μ l の P E 標識抗マウス I g G F c 抗体 (抗 m I g G F c - P E) 及び 1 : 1 0 0 希釈の F I T C 標識抗ヒト I g G F c 抗体 (抗 h I g G F c - F I T C) を加え、4 で 3 0 分間インキュベートし、続いて P B S 洗浄した。フローサイトメトリーにより F I T C 及び P E のシグナルを決定した。

40

【 0 2 0 6 】

図 3 に示されるとおり、マウス抗 h C D 4 0 抗体 0 3 - 7 F 1 0、0 6 - 6 A 7、及び 0 7 - 4 H 6 の濃度が増加すると、h C D 4 0 L に結合する細胞のシグナルは低下し (y 軸)、一方でマウス抗 h C D 4 0 抗体に結合する細胞のシグナルは増加したことから、ヒト C D 4 0 とヒト C D 4 0 L との間の結合が抗 h C D 4 0 抗体によって遮断されたことが示唆される。

50

【0207】

実施例4．サル、マウス、及びヒト - マウスキメラCD40に対する抗hCD40抗体の交差反応性

いずれの実験においても、CHO細胞にマウスCD40 (mCD40、配列番号27)、サル(アカゲザル(rhesus macaque))CD40 (rmCD40、配列番号28)、又はキメラ(マウス及びヒト)CD40 (chiCD40、配列番号29)をトランスフェクトした。

【0208】

各ウェルに25 μ l CHO細胞を加えた。各ウェルに25 μ lの精製抗hCD40抗体(1 μ g/ml)(7F10、6A7、又は4H6)を加え、4 で30分間インキュベートした。

10

【0209】

PBSで2回洗浄(1200 rpm、5分)した後、各ウェルに50 μ lのFITC標識抗マウスIgG Fc抗体(抗mIgG Fc-FITC)を1:100希釈で加え、続いて4 で30分間インキュベートし、次にPBS洗浄(1200 rpm、5分)した。フローサイトメトリーによりFITCのシグナルを検出した。

【0210】

図4に示されるとおり、7F10、6A7、及び4H6はマウスCD40と交差反応しなかったが、rmCD40及びキメラCD40とは強い交差反応性があった。図4では、NCは陰性対照を意味する。

20

【0211】

実施例5．抗hCD40抗体の結合親和性

予め固定化されたプロテインAセンサーチップを備えたBiacore(Biacore、INC、Piscataway N.J.)T200バイオセンサーを使用した表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて抗hCD40抗体の結合親和性を測定した。

【0212】

CHO-S細胞をトランスフェクトすることにより抗hCD40抗体を採取し、次に精製した。抗体(1 μ g/ml)をBiacore T200バイオセンサーに10 μ L/分で約24~33秒間注入して所望のタンパク質密度(約44~57反応単位(RU))を得た。次に、800、200、50、12.5、3.125、0.78125 nMの濃度のヒスチジンタグ付加ヒトCD40タンパク質(hCD40-His)を30 μ L/分で300秒間注入した。解離を300秒間モニタした。各調整濃度の最後の注入後に、グリシン(pH2.0、30 μ L/分で12秒間)でチップを再生した。6A7-mHvKv-IgG4の結果を図5に示す。

30

【0213】

Biacore T200評価ソフトウェア3.0を用いてデータを1:1ラングミュア結合モデルに大域的に当てはめることにより、動的会合速度(k_{on})及び解離速度(k_{off})を同時に求めた(Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B., 1994. Methods Enzymology 6.99-110)。動的速度定数の商から親和性を推定した($KD = k_{off} / k_{on}$)。

40

【0214】

当業者であれば理解するであろうとおり、試験した各抗体について、パラメータ(例えば、抗体濃度)を適宜調整しつつ同じ方法を実施した。例えば、6A7-H1K1-IgG4の結果を示すグラフを図6に示す。試験した抗体の結果を以下の表にまとめる。比較のため、ダセツズマブの結果も含める。

【0215】

【表 2 - 1】

表 2

抗 hCD40 抗体	会合速度 kon (1/Ms)	解離速度 koff (1/s)	親和性 KD(M)
ダセツズマブ	4.17E+05	8.33E-03	2.00E-08
6A7-mHvKv-IgG4	9.94E+04	2.59E-04	2.60E-09
6A7-H1K1-IgG4	2.04E+04	5.71E-03	2.80E-07
6A7-H2K1-IgG4	2.37E+04	7.08E-03	2.98E-07
6A7-H3K1-IgG4	2.76E+04	5.74E-04	2.08E-08
6A7-H4K1-IgG4	2.39E+04	5.72E-04	2.39E-08
6A7-H1K2-IgG4	2.06E+04	3.86E-03	1.87E-07
6A7-H2K2-IgG4	2.63E+04	4.96E-03	1.89E-07
6A7-H3K2-IgG4	6.46E+04	3.71E-04	5.74E-09
6A7-H4K2-IgG4	1.05E+05	3.22E-04	3.06E-09
6A7-H1K3-IgG4	2.87E+04	3.90E-03	1.36E-07
6A7-H2K3-IgG4	4.53E+04	5.05E-03	1.11E-07
6A7-H3K3-IgG4	1.23E+05	3.56E-04	2.90E-09
6A7-H4K3-IgG4	1.07E+05	3.73E-04	3.49E-09
4H6-mHvKv-IgG1	5.612E+5	2.050E-02	3.652E-8
4H6-H1K1-IgG4	2.167E+04	1.673E-01	7.723E-06
4H6-H2K1-IgG4	5.074E+05	2.269E-01	4.472E-07
4H6-H3K1-IgG4	8.270E+04	3.420E-02	4.130E-07
4H6-H4K1-IgG4	1.850E+05	2.690E-02	1.450E-07
4H6-H1K2-IgG4	3.856E+05	6.319E-02	1.639E-07
4H6-H2K2-IgG4	4.138E+05	5.700E-02	1.378E-07
4H6-H3K2-IgG4	4.014E+05	2.152E-02	5.361E-08
4H6-H4K2-IgG4	3.918E+05	1.907E-02	4.866E-08
4H6-H1K3-IgG4	2.420E+05	5.540E-02	2.290E-07

10

20

30

40

【 0 2 1 6 】

50

【表 2 - 2】

4H6-H2K3-IgG4	2.600E+05	6.590E-02	2.530E-07	
4H6-H3K3-IgG4	3.120E+05	2.860E-02	9.160E-08	
4H6-H4K3-IgG4	3.266E+05	2.574E-02	7.881E-08	
4H6-H1K4-IgG4	1.490E+05	6.950E-02	4.650E-07	
4H6-H2K4-IgG4	1.960E+05	7.420E-02	3.780E-07	10
4H6-H3K4-IgG4	2.980E+05	2.820E-02	9.480E-08	
4H6-H4K4-IgG4	3.125E+05	2.778E-02	8.891E-08	
7F10-mHvKv-IgG1-N297A	1.504E+05	2.924E-02	1.944E-07	
7F10-H1K1-IgG4	1.769E+05	5.144E-02	2.908E-07	
7F10-H1K2-IgG4	8.277E+04	4.915E-02	5.938E-07	20
7F10-H1K3-IgG4	7.312E+04	3.913E-02	5.351E-07	
7F10-H1K4-IgG4	1.153E+05	3.208E-02	2.782E-07	
7F10-H2K1-IgG4	1.205E+05	6.505E-02	5.397E-07	
7F10-H2K2-IgG4	1.056E+05	5.337E-02	5.053E-07	
7F10-H2K3-IgG4	1.720E+05	3.126E-02	1.817E-07	
7F10-H2K4-IgG4	1.880E+05	3.801E-02	2.021E-07	30
7F10-H3K1-IgG4	1.320E+05	5.679E-02	4.302E-07	
7F10-H3K2-IgG4	1.266E+05	4.817E-02	3.805E-07	
7F10-H3K3-IgG4	1.320E+05	3.137E-02	2.376E-07	
7F10-H3K4-IgG4	1.487E+05	2.737E-02	1.841E-07	

【0217】

試験したこれらの抗体のうち、6A7-mHvKv-IgG4、4H6-mHvKv-IgG1、及び7F10-mHvKv-IgG1-N297Aはキメラ抗hCD40抗体である。キメラ抗体は、対応するマウス抗hCD40抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインをヒト抗体の定常ドメイン（例えば、CL、CH1、CH2、及びCH3ドメインを含む）と共に有する。用語mHvKvは、マウス重鎖可変領域及びマウス軽鎖可変領域を指示している。

【0218】

試験した抗体にはまた、ヒト化抗体も含まれる。これらの試験したヒト化抗体は、ヒトIgG4抗体定常ドメイン（例えば、CL、CH1、CH2、及びCH3ドメインを含む）を有する。重鎖のヒト化可変ドメインは、H1、H2、H3等と番号が付与される；及

10

20

30

40

50

び軽鎖のヒト化可変ドメインは、K1、K2、K3等と番号が付与される。ヒト化可変ドメインの配列は図19～図21にまとめる。例えば、7F10-H1K1-IgG4はマウス抗体7F10をベースとし、ヒト化重鎖可変ドメインH1（配列番号30）及びヒト化軽鎖可変ドメインK1（配列番号33）を有する。同様に、6A7-H3K2-IgG4はマウス抗体6A7をベースとし、ヒト化重鎖可変ドメインH3（配列番号39）及びヒト化6A7軽鎖可変ドメインK2（配列番号42）を有する。

【0219】

キメラ抗CD40抗体及びヒト化抗CD40抗体の抗体名及び配列を表1にまとめる。試験した抗体の少数がFc領域にN297A突然変異（EU付番）を有する。N297A突然変異は、N297におけるグリコシル化の欠損、ひいてはエフェクター機能の欠如につながり得る。

10

【0220】

実施例6．mfCD40との抗hCD40抗体の結合親和性

予め固定化されたプロテインAセンサーチップを備えたBiacore（Biacore、INC、Piscataway N.J.）T200バイオセンサーを使用した表面プラズモン共鳴（SPR）を用いてmfCD40（カニクイザル（Macaca fascicularis））との抗hCD40抗体の結合親和性を測定した。

【0221】

抗hCD40抗体を精製した。抗体（0.5µg/mL）をBiacore T200バイオセンサーに10µL/分で約18～26秒間注入して所望のタンパク質密度（約44～58反応単位（RU））を得た。次に、200、50、12.5、3.125nMの濃度のヒスチジンタグ付加mfCD40タンパク質（mfCD40-His）（Acrobiosystems、カタログ番号：CD0-C52H6）を30µL/分で180秒間注入した。解離を300～600秒間モニタした。各調整濃度の最後の注入後に、グリシン（pH2.0、30µL/分で12秒間）でチップを再生した。

20

【0222】

Biacore T200評価ソフトウェア3.0を用いてデータを1:1ラングミュア結合モデルに大域的に当てはめることにより、動的会合速度（kon）及び解離速度（koff）を同時に求めた。動的速度定数の商から親和性を推定した（ $KD = koff / kon$ ）。

30

【0223】

試験した抗体の結果を以下の表にまとめる。

【0224】

【表3】

表3

抗hCD40抗体	会合速度 kon (1/Ms)	解離速度 koff (1/s)	mfCD40との 親和性 KD (M)
4H6-H3K2-IgG4	5.700E+05	1.918E-02	3.365E-08
4H6-H4K2-IgG4	5.683E+05	1.688E-02	2.970E-08
6A7-H3K3-IgG4	2.308E+05	2.010E-04	8.705E-10
6A7-H4K2-IgG4	1.988E+05	7.874E-04	3.960E-09

40

【0225】

実施例7．抗hCD40抗体の熱安定性

Protein Thermal Shift（商標）Dyeキット（Thermo

50

Fisher Scientific)及びQuantStudio(商標)5リアルタイムPCRシステム(Thermo Fisher Scientific)を使用してThermoFluorアッセイを実施した。このアッセイは、タンパク質アンフォールドとして露出した疎水性パッチに結合する蛍光色素を用いて熱安定性を測定するものであった。

【0226】

この実験は製造者のプロトコルに従い実施した。ステップ1では、試料を1.6 /秒で25 に加熱した。ステップ2では、試料を0.05 /秒で99 に加熱した。

【0227】

以下の表に、試験したヒト化抗hCD40抗体のT_mをまとめる。比較のため、ダセツズマブ(daceruzumab)の結果も含めた。

【0228】

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4

抗体	可変ドメイン	タイプ (定常ドメイン)	熱安定性 (T _m °C)
4H6-H3K2-IgG4	4H6 H3K2	ヒト IgG4	75.03
4H6-H4K2-IgG4	4H6 H4K2	ヒト IgG4	77.92
4H6-H3K3-IgG4	4H6 H3K3	ヒト IgG4	75.21
4H6-H3K4-IgG4	4H6 H3K4	ヒト IgG4	74.62
4H6-H4K3-IgG4	4H6 H4K3	ヒト IgG4	76.91
4H6-H4K4-IgG4	4H6 H4K4	ヒト IgG4	74.47
4H6-mHvKv-IgG1	4H6 mHvKv	ヒト IgG1	76.25
4H6-mHvKv-IgG4	4H6 mHvKv	ヒト IgG4	75.73
4H6-mHvKv-IgG1-N297A	4H6 mHvKv	N297A 突然変異を有する ヒト IgG1	75.88
4H6-H3K2-IgG2	4H6 H3K2	ヒト IgG2	75.22
4H6-H4K2-IgG2	4H6 H4K2	ヒト IgG2	76.55
6A7-H3K2-IgG4	6A7 H3K2	ヒト IgG4	77.77
6A7-H3K3-IgG4	6A7 H3K3	ヒト IgG4	78.58
6A7-H4K2-IgG4	6A7 H4K2	ヒト IgG4	76.66
6A7-H4K3-IgG4	6A7 H4K3	ヒト IgG4	78.88
6A7-mHvKv-IgG1	6A7 mHvKv	ヒト IgG1	76.95
6A7-mHvKv-IgG2	6A7 mHvKv	ヒト IgG2	77.25
6A7-mHvKv-IgG4	6A7 mHvKv	ヒト IgG4	76.73
6A7-mHvKv-IgG1-LALA	6A7 mHvKv	LALA 突然変異(EU 付番で L234A 及び L235A 突然変異) を有するヒト IgG1	76.95
6A7-H3K3-IgG2	6A7 H3K3	ヒト IgG2	79.07
A7-H4K2-IgG2	6A7 H4K2	ヒト IgG2	78.48
7F10-H1K1-IgG4	7F10 H1K1	ヒト IgG4	74.36
7F10-H1K2-IgG4	7F10 H1K2	ヒト IgG4	76.28
7F10-H1K3-IgG4	7F10 H1K3	ヒト IgG4	75.10
7F10-H1K4-IgG4	7F10 H1K4	ヒト IgG4	74.73
7F10-H2K1-IgG4	7F10 H2K1	ヒト IgG4	73.99
7F10-H2K2-IgG4	7F10 H2K2	ヒト IgG4	75.54
7F10-H2K3-IgG4	7F10 H2K3	ヒト IgG4	74.36
7F10-H2K4-IgG4	7F10 H2K4	ヒト IgG4	74.13
7F10-H3K1-IgG4	7F10 H3K1	ヒト IgG4	73.62

【 0 2 2 9 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

7F10-H3K2-IgG4	7F10 H3K2	ヒト IgG4	74.95
7F10-H3K3-IgG4	7F10 H3K3	ヒト IgG4	74.65
7F10-H3K4-IgG4	7F10 H3K4	ヒト IgG4	73.99
7F10-mHvKv-IgG1	7F10 mHvKv	ヒト IgG1	75.54
7F10-mHvKv-IgG1-N297A	7F10 mHvKv	N297A 突然変異を有する ヒト IgG1	76.21
7F10-mHvKv-IgG2	7F10 mHvKv	ヒト IgG2	75.84
7F10-mHvKv-IgG4	7F10 mHvKv	ヒト IgG4	75.02
ダセツズマブ	NA	ヒト IgG1	77.46

10

【 0 2 3 0 】

実施例 8 . マウス及びキメラ抗 h C D 4 0 抗体のインビボ試験

抗 h C D 4 0 抗体をインビボで試験し、ヒトにおけるこれらの抗体の効果を予測するため、ヒト化 C D 4 0 マウスモデルを作成した。このヒト化 C D 4 0 マウスモデルはキメラ C D 4 0 タンパク質（配列番号 2 9）を発現するようにエンジニアリングしたもので、マウス C D 4 0 タンパク質の細胞外領域の一部を対応するヒト C D 4 0 細胞外領域に置き換えた。マウス C D 4 0（配列番号 2 7）のアミノ酸残基 2 0 ~ 1 9 2 をヒト C D 4 0（配列番号 2 6）のアミノ酸残基 2 0 ~ 1 9 2 によって置き換えた。ヒト化マウスモデル（B - h C D 4 0 マウス）は、ヒトとマウス C D 4 0 を発現する普通のマウスとの間の臨床転帰の違いを大幅に減らすことにより、臨床セッティングで新規の治療処置を試験する新規ツールを提供する。ヒト化 C D 4 0 マウスモデルに関する詳細な説明は、P C T / C N 2 0 1 8 / 0 9 1 8 4 5 号明細書（全体として参照により本明細書に援用される）を参照することができる。

20

【 0 2 3 1 】

抗 h C D 4 0 抗体がインビボで腫瘍成長に及ぼすその効果に関して結腸癌モデルで試験した。M C - 3 8 癌腫瘍細胞（結腸腺癌細胞）を B - h C D 4 0 マウスに皮下注射した。マウスの腫瘍が 1 0 0 ~ 1 5 0 m m ³ の容積に達したところで、マウスを腫瘍の容積に基づき異なる群に無作為に分けた（各群 5 匹のマウス）。

30

【 0 2 3 2 】

次にマウスに生理食塩水（P S）及び抗 h C D 4 0 抗体を腹腔内投与によって注射した。抗体は各週の 1 日目及び 4 日目に 3 週間にわたって与えた（合計 6 回の注射）。

【 0 2 3 3 】

注射量はマウスの体重に基づき 3 m g / k g で計算した。腫瘍の長軸及び短軸の長さを測定し、腫瘍の容積を $0.5 \times (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2$ として計算した。マウスの体重はまた、注射前、マウスを異なる群に分けたとき（初回抗体注射の前）、抗体注射期間中週 2 回、及び安楽死前にも測定した。

40

【 0 2 3 4 】

以下の式： $T G I (\%) = [1 - (T i - T 0) / (V i - V 0)] \times 1 0 0$ を用いて腫瘍成長阻害率（T G I %）を計算した。T i は、i 日目における治療群の平均腫瘍容積である。T 0 は、0 日目における治療群の平均腫瘍容積である。V i は、i 日目における対照群の平均腫瘍容積である。V 0 は、0 日目における対照群の平均腫瘍容積である。

【 0 2 3 5 】

統計的分析には t 検定を実施した。6 0 % より高い T G I % は、腫瘍成長の有意な抑制を示している。P < 0 . 0 5 が、有意差を示す閾値である。

【 0 2 3 6 】

50

マウス抗hCD40抗体のインビボ結果

7群(G1~G7)の各々において、B-hCD40マウスに、対照としての生理食塩水(PS)(G1)、マウス抗hCD40抗体03-9D7(G2; 3mg/kg)、マウス抗hCD40抗体03-2A7(G3; 3mg/kg)、マウス抗hCD40抗体03-9E11(G4; 3mg/kg)、マウス抗hCD40抗体06-6A7(G5; 3mg/kg)、マウス抗hCD40抗体07-4H6(G6; 3mg/kg)、又はマウス抗hCD40抗体03-7F10(G7; 3mg/kg)を注射した。

【0237】

全治療期間を通じてマウスの体重をモニタした(図7、及び図8)。これらの群間に大きい体重差は認められなかった。これらの結果から、03-7F10、06-6A7、及び07-4H6がマウスに良好に忍容され、毒性はないことが示された。

10

【0238】

03-7F10、06-6A7、及び07-4H6で治療した群の腫瘍サイズは、対照群(図9)及び他の抗体治療群と比較して増加の程度が低かった。

【0239】

以下の表に示されるとおり、25日目(群分け後25日)におけるTGI%もまた計算した。

【0240】

【表5】

表5

20

		腫瘍容積 (mm ³)				生存	TGI _{TV} %	P 値	
		0日目	11日目	21日目	25日目			体重	腫瘍容積
対照	G1	121±7	457±35	1391±	2352311±531	4/5	n.a.	n.a.	n.a.
治療	G2 03-9D7	124±9	407±79	1174±300	1979±488	5/5	15.29%	0.456	0.660
	G3 03-2A7	121±8	327±34	1087±125	1696±129	5/5	28.13%	0.256	0.248
	G4 03-9E11	121±10	347±64	880±98	1254±169	5/5	48.28%	0.129	0.074
	G5 06-6A7	120±8	238±26	293±43	434±59	5/5	85.65%	0.419	0.005
	G6 07-4H6	119±8	274±25	440±120	647±172	5/5	75.90%	0.118	0.013
	G7 03-7F10	123±10	286±43	476±108	809±227	5/5	68.67%	0.495	0.131

30

40

【0241】

キメラ抗hCD40抗体のインビボ結果

キメラ抗hCD40抗体6A7-mHvKv-IgG1(G2)、6A7-mHvKv-IgG2(G3)、6A7-mHvKv-IgG4(G4)、6A7-mHvKv-IgG1-N297A(G5)及び6A7-mHvKv-IgG1-LALA(G6)をB-hCD40マウス(ヒト化CD40マウス)に腹腔内投与によって投与した。対照として生理食塩水を注射した(群1、G1)。比較のため、ダセツズマブ(ヒト化抗CD40モノクローナル抗体、これは血液学的悪性腫瘍の治療用に設計されている)もまた含めた(G7)。

【0242】

50

抗体の注射量はマウスの体重に基づき 3 mg / kg で計算した。抗体は、各週の 1 日目及び 4 日目に与えた（合計 6 回の注射）。

【 0 2 4 3 】

全治療期間を通じてマウスの体重をモニタした。異なる群のマウスの体重が全て増加した（図 1 0、及び図 1 1）。異なる群間での明らかな体重差は認められなかった。これらの結果から、抗 h C D 4 0 抗体がマウスに良好に忍容され、毒性はないことが示された。

【 0 2 4 4 】

腫瘍サイズは、特定のキメラ抗体で治療した群において対照群と比較して有意差を示した（図 1 2）。

【 0 2 4 5 】

各治療群の 2 1 日目（群分け後 2 1 日）における T G I % は、以下の表に示すとおり計算された。

【 0 2 4 6 】

【表 6】

表 6

		腫瘍容積(mm ³)				生存	TGI _{TV} %	P 値	
		0 日目	7 日目	14 日目	21 日目			体重	腫瘍容積
対照	G1	153±18	567±98	1465±275	2995±714	5/5	n.a.	n.a.	
	G2	153±19	585±120	1646±377	3214±732	5/5	-7.70%	0.371	0.836
	G3	153±22	341±18	672±114	1072±238	5/5	67.67%	0.042	0.034
治療	G4	151±32	583±109	1343±484	1875±164	4/5	39.32%	0.415	0.215
	G5	152±33	568±61	1686±308	3466±719	5/5	-16.59%	0.772	0.655
	G6	151±26	562±50	1385±104	2670±242	5/5	11.37%	0.390	0.678
	G7	154±22	371±62	1180±164	2606±395	5/5	13.73%	0.585	0.646

【 0 2 4 7 】

これらの結果から、キメラ抗体 6 A 7 - m H v K v - I g G 2 が腫瘍成長を有意に阻害することが示された。これらの抗体の中では、6 A 7 - m H v K v - I g G 4 (G 4) 及び 6 A 7 - m H v K v - I g G 1 - L A L A (G 6) もまた腫瘍阻害効果を有する。

【 0 2 4 8 】

実施例 9 . ヒト化抗 h C D 4 0 抗体のインビボ試験

C D 4 0 ヒト化マウス (B - h C D 4 0) においてヒト化抗 h C D 4 0 抗体を試験して、インビボでの腫瘍成長に及ぼすその効果を実証した。

【 0 2 4 9 】

M C - 3 8 癌腫瘍細胞 (結腸腺癌細胞) を B - h C D 4 0 マウスに皮下注射した。マウスの腫瘍が 1 5 0 ± 5 0 m m ³ の容積に達したところで、マウスを腫瘍の容積に基づき異なる群に無作為に分けた (各群 5 匹のマウス) 。

【 0 2 5 0 】

次にマウスに、対照としての生理食塩水 (G 1)、ヒト化抗 C D 4 0 抗体 6 A 7 - H 3 K 3 - I g G 2 (G 2)、ヒト化抗 C D 4 0 抗体 6 A 7 - H 4 K 2 - I g G 2 (G 3)、ヒト化抗 C D 4 0 抗体 6 A 7 - H 3 K 3 - I g G 4 (G 4)、又はヒト化抗 C D 4 0 抗体 6 A 7 - H 4 K 2 - I g G 4 (G 5) を注射した。

【 0 2 5 1 】

10

20

30

40

50

抗体は各週の2日目及び5日目に腹腔内注射によって3 mg / kg で3週間にわたって与えた(合計6回の注射)。

【0252】

全治療期間を通じてマウスの体重をモニタした。異なる群のマウスの体重が全て増加した(図13、及び図14)。これらの結果から、抗hCD40抗体がマウスに良好に忍容され、毒性はないことが示された。

【0253】

腫瘍サイズは、抗hCD40抗体で治療した群において有意差を示した(図15)。特に、G3の腫瘍サイズはG1よりも小さい(P=0.15)。

【0254】

各治療群の21日目(群分け後21日)におけるTGI%はまた、以下の表に示すとおり計算された。

【0255】

【表7】

表7

		腫瘍容積(mm ³)				生存	TGI _{TV} %	P 値		
		0日目	7日目	14日目	21日目			体重	腫瘍容積	
対照	G1	137±4	424±45	916±127	1453±310	4/5	n.a.	n.a.	n.a.	
	G2	137±7	376±22	602±118	871±276	5/5	44.26%	0.105	0.203	
	G3	137±7	414±26	484±65	544±67	5/5	69.10%	0.002	0.015	
	治療	G4	137±5	523±28	1303±158	1925±198	5/5	-35.88%	0.177	0.223
		G5	137±5	420±32	1081±99	1778±121	5/5	-24.72%	0.720	0.321

【0256】

上記の結果は、一部のヒト化抗hCD40抗体が腫瘍成長を阻害し得ることを示している。それらの中でも、6A7-H4K2-IgG2(G3)は腫瘍成長阻害率(TGI%)が最も高かった。

【0257】

他の実施形態

本発明はその詳細な説明と併せて説明されているが、前述の説明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定するものではなく、例示することが意図されると理解されるべきである。他の態様、利点、及び変形例が、以下の特許請求の範囲内にある。

10

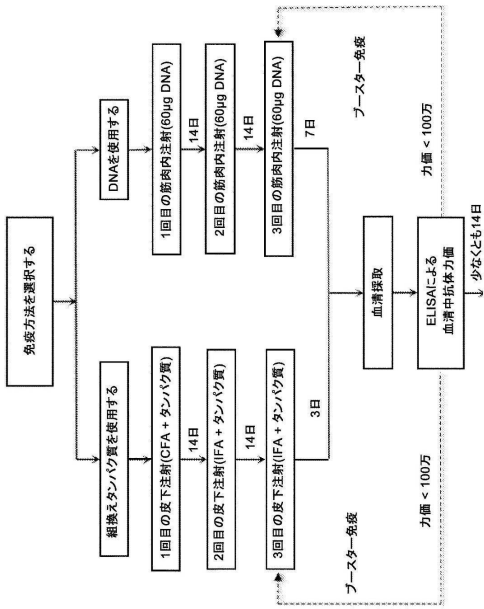
20

30

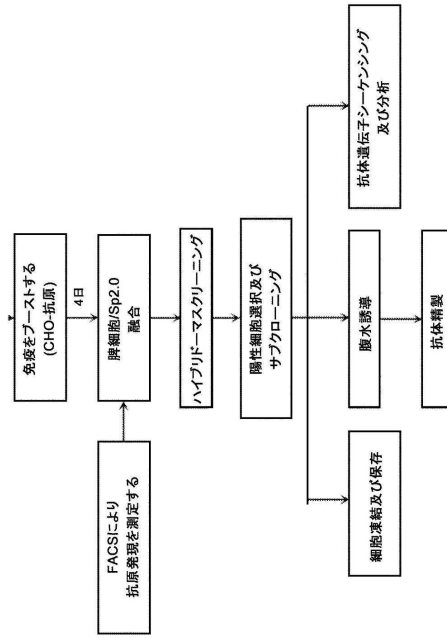
40

50

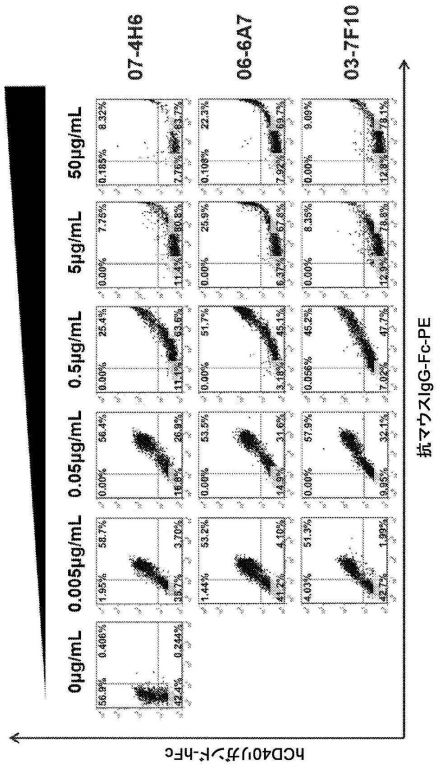
【図 1】



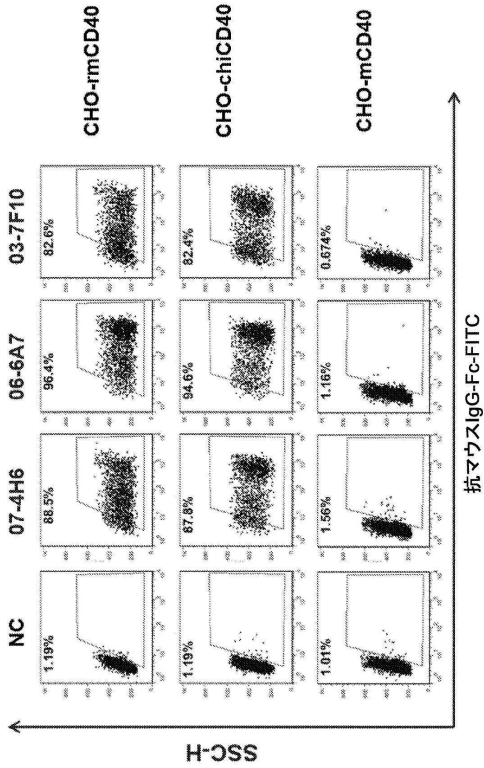
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

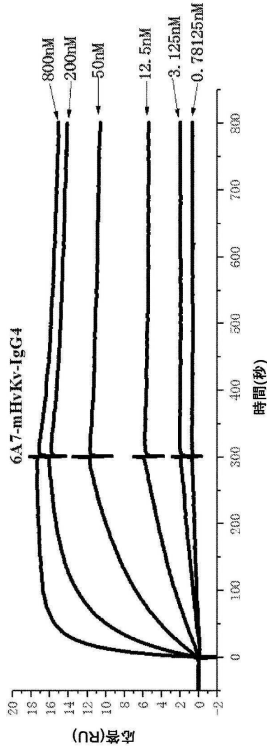
20

30

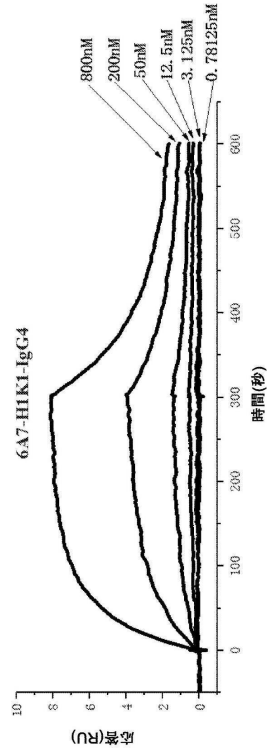
40

50

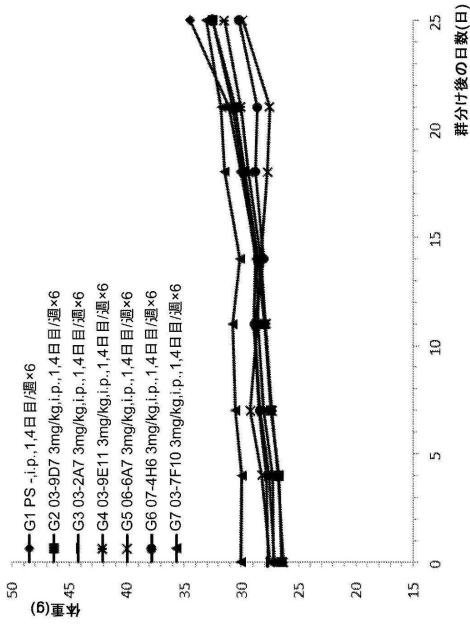
【 図 5 】



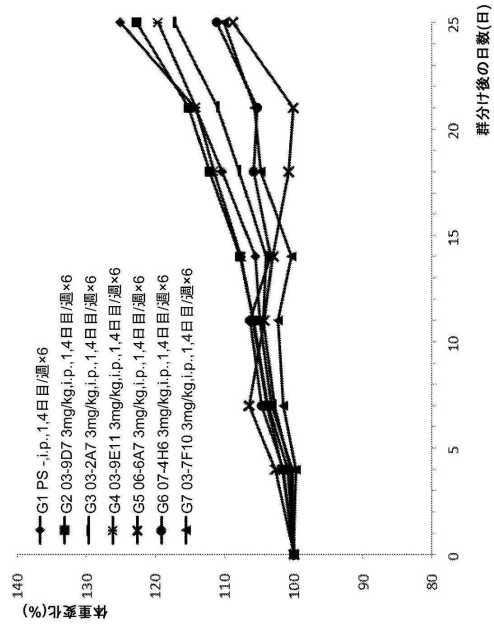
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



10

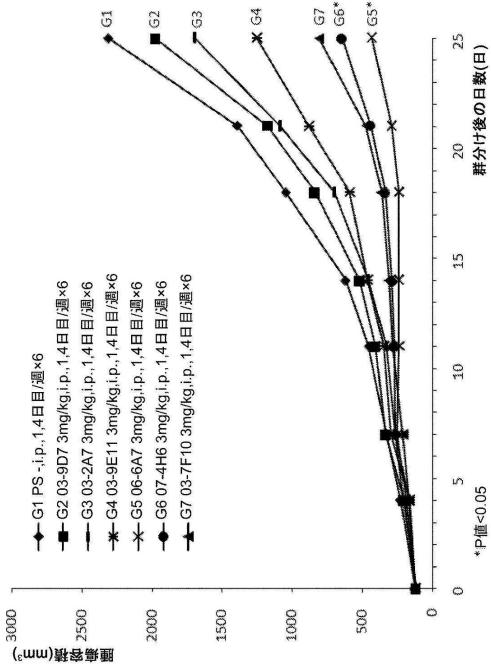
20

30

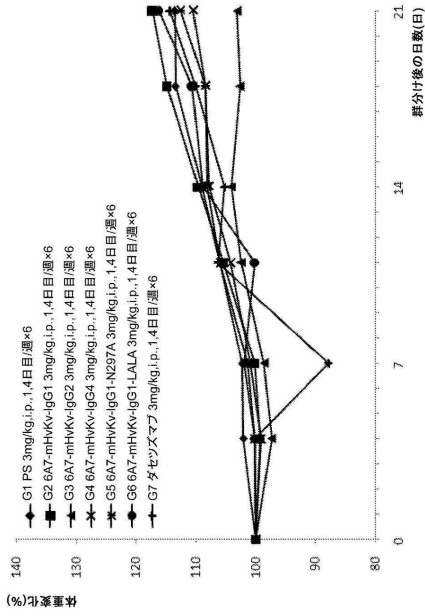
40

50

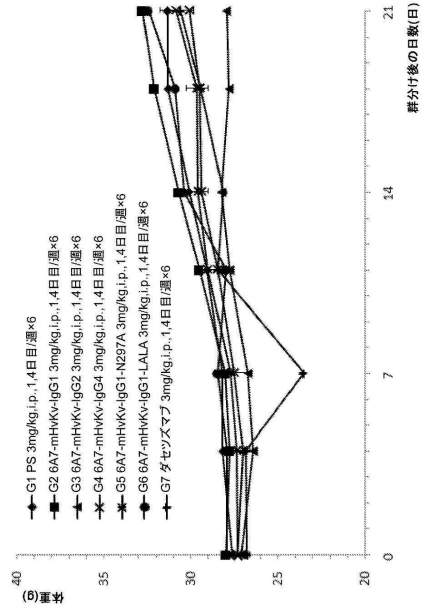
【図 9】



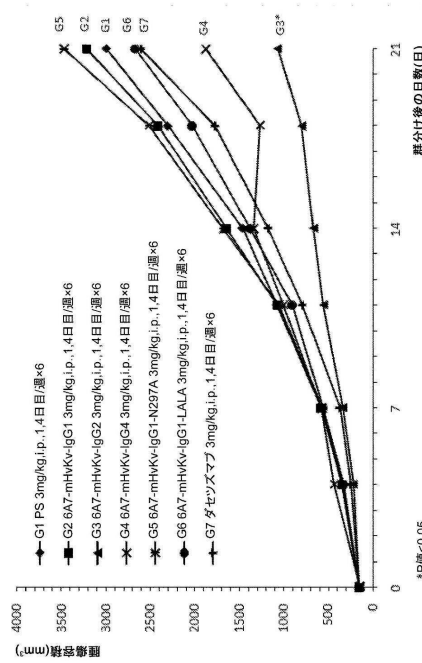
【図 11】



【図 10】



【図 12】



10

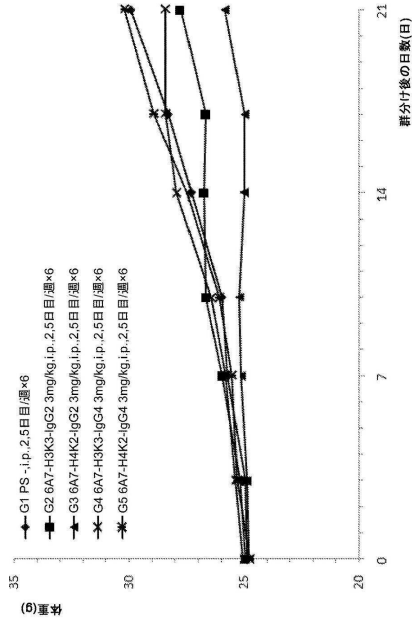
20

30

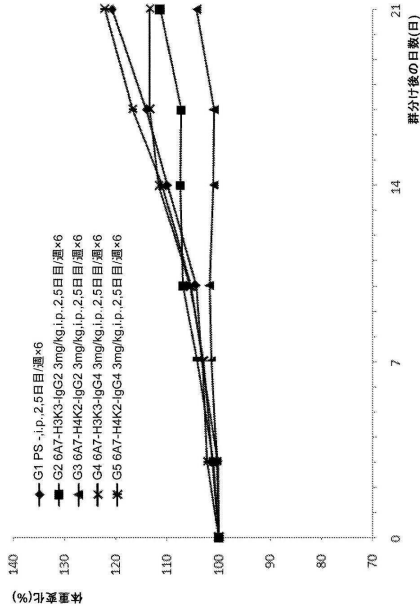
40

50

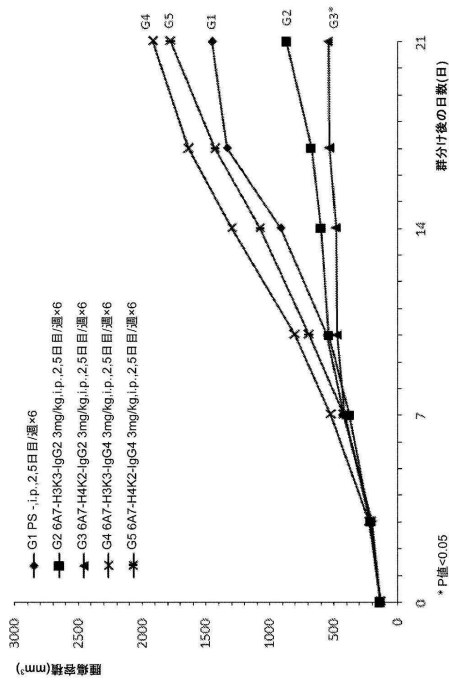
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

Kabat CDR

Ab	VH CDR1 配列番号	VH CDR2 配列番号	VH CDR3 配列番号	VL CDR1 配列番号	VL CDR2 配列番号	VL CDR3 配列番号	配列番号
03-7F10X1は L1c	DYWM Y	VISVGGDSTFYPD TVRG	PAPSAHSY LDY	RASODIENVLN 3	YYTSRLHS 4	QQGKTLF FT	6
03-7F10 L1c	SYWY	GINPRNGGTNFN EKEFS	HGNVY	RSSQSLHSNG NTYLH	QVSNRFS 10	SQTHVP WT	12
06-6A7X1は L1c	SGYW N	FISVSGSTYTPSL KS	FRRYDDGVD Y	RASHEISGYLS 15	AASTIAS 16	LOVSSYP WT	18

10

20

30

40

50

【 17 】

Chothia CDR

Ab	VH CDR1	配列番号	VH CDR2	配列番号	VH CDR3	配列番号	VL CDR1	配列番号	VL CDR2	配列番号	VL CDR3	配列番号
03-7F1Dとは L-H 03-7F1D	GFTSD YVWY	19	SYGDS	20	PAPSAHSY LDY	3	RASDLSNVLN	4	YTSRLHS	21	QQGKLP FT	6
06-6A7Xとは L-H 06-6A7	GTFISY YIV	22	NPRNG	23	HGNVY	9	RSSQSLHSNG NTYLH	10	QVSNRHS	11	SQTHVP WT	12
07-4H6Xとは L-H 07-4H6	GDSVS GWN	24	SYGS	25	FRYDDGVD Y	15	RASHEISGYLS	16	AASTIAS	17	LOVSSYP WT	18

【 18 】

抗体名	アミノ酸配列	配列番号
E-CD40 (hCD40) NP_001241.1	MYRFLPQCVLWGCLLTAVPPEPTACRREKQYLINSQCISLQPGQKLVSDICTETETETPCGSEFL DWMRRTCHQKXCDPMLGRLVQKQSTETDICTEGWICHTSACEVYHRSVCSFGVQVQIAT GVSDTICPCPVPFFNSAFKHPWTSCTIDVYQQAQTKIKDVGCGQDRALVWVPIIFGI LFAILLVETVIRKVKRRTKAPHPKQPELNFDFDLPDLSGTAAPVQETHLGGQVPTQDGGRESIS VQERQ	26
マウスCD40 (mCD40) NP_031974.1.2	MYSLPRLCALWGCLLTAVHGGVTSKGLVHGGQCDLQPGSRLSCTALERTQCPGCSSEFS AAMRRLTGRHGRGEPGQAVKAGGRASDITVCTEGQHCISLQCEACQKTIKLPFCFQEMMNI GVSDTICPCPVPFFNSAFKHPWTSCTIDVYQQAQTKIKDVGCGQDRALVWVPIIFGI LITLGVETVIRKVKRRTKAPHPKQPELNFDFDLPDLSGTAAPVQETHLGGQVPTQDGGRESRI SYQERQVTDLSIALRSLV	27
サルCD40 (rCD40) NP_001242791.1	MYRFLPQCVLWGCLLTAVPPEPTACRREKQYLINSQCISLQPGQKLVSDICTETETETPCGSEFL DWMRRTCHQKXCDPMLGRLVQKQSTETDICTEGWICHTSACEVYHRSVCSFGVQVQIAT GVSDTICPCPVPFFNSAFKHPWTSCTIDVYQQAQTKIKDVGCGQDRALVWVPIIFGI LITLGVETVIRKVKRRTKAPHPKQPELNFDFDLPDLSGTAAPVQETHLGGQVPTQDGGRESRI SYQERQVTDLSIALRSLV	28
キヌCD40 (h1CD40) (h1CD40)	MYSLPRLCALWGCLLTAVHGGVTSKGLVHGGQCDLQPGSRLSCTALERTQCPGCSSEFL DWMRRTCHQKXCDPMLGRLVQKQSTETDICTEGWICHTSACEVYHRSVCSFGVQVQIAT GVSDTICPCPVPFFNSAFKHPWTSCTIDVYQQAQTKIKDVGCGQDRALVWVPIIFGI LITLGVETVIRKVKRRTKAPHPKQPELNFDFDLPDLSGTAAPVQETHLGGQVPTQDGGRESRI SYQERQVTDLSIALRSLV	29

【 19 】

ヒト抗体可変ドメイン	説明	アミノ酸配列	配列番号
7F10-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(H1)	HuVH1. ヒト化率84.7%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレットではない	EYQIVRSQGGVYVFGGSIKLSAQRGCTFSDYVWVWVQALRQK RLEWVAIYVSGGDSFEMVLDYVDFGFTLSRDKAKKSLYLRQNSL RSEDYAVYCARHGRGNYVHGQGTIVLYSS	30
7F10-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(H2)	HuVH2. ヒト化率82.7%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレットではない	EYQIVRSQGGVYVFGGSIKLSAQRGCTFSDYVWVWVQALRQK RLEWVAIYVSGGDSFEMVLDYVDFGFTLSRDKAKKSLYLRQNSL RSEDYAVYCARHGRGNYVHGQGTIVLYSS	31
7F10-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(H3)	HuVH3. ヒト化率78.6%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレットではない	EYKLVRSQGGVYVFGGSIKLSAQRGCTFSDYVWVWVQALRQK RLEWVAIYVSGGDSFEMVLDYVDFGFTLSRDKAKKSLYLRQNSL RSEDYAVYCARHGRGNYVHGQGTIVLYSS	32
7F10-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(K1)	HuV1. ヒト化率85.3%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレット	DIQMTQSFSSLSASVGDVNVITICRASQLSLNVLNMQQRFGGA VLLIIVYTSRLHSGLPFRFSGSGSDYVFTLISLQEPDIATY YQQGKTLPELFAAGTKLEIK	33
7F10-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(K2)	HuV2. ヒト化率84.2%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレットではない	DIQMTQSFSSLSASVGDVNVITICRASQLSLNVLNMQQRFGGA VLLIIVYTSRLHSGLPFRFSGSGSDYVFTLISLQEPDIATY YQQGKTLPELFAAGTKLEIK	34
7F10-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(K3)	HuV3. ヒト化率82.1%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレットではない	DIQMTQSFSSLSASVGDVNVITICRASQLSLNVLNMQQRFGGA VLLIIVYTSRLHSGLPFRFSGSGSDYVFTLISLQEPDIATY YQQGKTLPELFAAGTKLEIK	35
7F10-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(K4)	HuV4. ヒト化率80%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレットではない	DIQMTQSFSSLSASVGDVNVITICRASQLSLNVLNMQQRFGGA VLLIIVYTSRLHSGLPFRFSGSGSDYVFTLISLQEPDIATY YQQGKTLPELFAAGTKLEIK	36

【 20 】

ヒト抗体可変ドメイン	説明	アミノ酸配列	配列番号
6A7-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(H1)	HuVH1. ヒト化率84.7%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレット	QVQLVQSGAEVYRFRGSRVYVSRASGDTFTISYIYVWVQKQFGQ GLEWIGGIFNRRIGMIFNRRKFRKRLITVDVTSISTAYMELSR RSEDYAVYCARHGRGNYVHGQGTIVLYSS	37
6A7-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(H2)	HuVH2. ヒト化率82.7%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレット	QVQLVQSGAEVYRFRGSRVYVSRASGDTFTISYIYVWVQKQFGQ GLEWIGGIFNRRIGMIFNRRKFRKRLITVDVTSISTAYMELSR RSEDYAVYCARHGRGNYVHGQGTIVLYSS	38
6A7-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(H3)	HuVH3. ヒト化率81.6%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレット	QVQLVQSGAEVYRFRGSRVYVSRASGDTFTISYIYVWVQKQFGQ GLEWIGGIFNRRIGMIFNRRKFRKRLITVDVTSISTAYMELSR RSEDYAVYCARHGRGNYVHGQGTIVLYSS	39
6A7-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(H4)	HuVH4. ヒト化率79.6%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレット	QVQLVQSGAEVYRFRGSRVYVSRASGDTFTISYIYVWVQKQFGQ GLEWIGGIFNRRIGMIFNRRKFRKRLITVDVTSISTAYMELSR RSEDYAVYCARHGRGNYVHGQGTIVLYSS	40
6A7-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(K1)	HuV1. ヒト化率91%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレット	DVMTQSELSLFLVLLGQPAISICRSGSLLHSNGITYLHWQ EFGQSNHLIYQVSNRFGVYVDFRFGSGSDYVFTLISLQEPDIATY DYGVYCSQTHVPMVTFGGTKLEIK	41
6A7-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(K2)	HuV2. ヒト化率88%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレットではない	DVMTQSELSLFLVLLGQPAISICRSGSLLHSNGITYLHWQ EFGQSNHLIYQVSNRFGVYVDFRFGSGSDYVFTLISLQEPDIATY DYGVYCSQTHVPMVTFGGTKLEIK	42
6A7-β-スの ヒト化重鎖可変ドメイン(K3)	HuV3. ヒト化率87%。 ヒト及びカニクイザル(Macaca fascicularis)との トップレットではない	DVMTQSELSLFLVLLGQPAISICRSGSLLHSNGITYLHWQ EFGQSNHLIYQVSNRFGVYVDFRFGSGSDYVFTLISLQEPDIATY DYGVYCSQTHVPMVTFGGTKLEIK	43

【 2 1 】

ヒト抗体構築ドメイン	説明	アミノ酸配列	配列番号
4H6ベースの ヒトヒジカニクイザル(Macaca fascicularis)との トプドット	HVHV1, ヒト比率88.9% トプドット	QVQLQSGGSLVTKGQTLSTCTISGSGVSGYVAVWIRKHPG KRLDRECFISYGGSTYPRFISRWYQPIRATPKQDFSLKLS VTAADTAVYFCARFRPRVDGVDYRGGQGLITVSS	44
4H6ベースの ヒトヒジカニクイザル(Macaca fascicularis)との トプドット	HVHV2, ヒト比率87.9% トプドット	EVQLQSGGFLYKESQTLSTCTVSDVSSGYNWIRKHPG KRLWIGFISGGSTYTPSLKSRITLIRDTSKKQDFSLKLS VTAADTAVYFCARFRNIDVDYRGGQGLITVSS	45
4H6ベースの ヒトヒジカニクイザル(Macaca fascicularis)との トプドット	HVHV3, ヒト比率83.9% トプドット	EVQLQSGGFLYKESQTLSTCTVSDVSSGYNWIRKHPG KRLWIGFISGGSTYTPSLKSRITLIRDTSKKQDFSLKLS VTAADTAVYFCARFRNIDVDYRGGQGLITVSS	46
4H6ベースの ヒトヒジカニクイザル(Macaca fascicularis)との トプドット	HVHV4, ヒト比率82.8% トプドット	EVQLQSGGFLYKESQTLSTCTVSDVSSGYNWIRKHPG KRLWIGFISGGSTYTPSLKSRITLIRDTSKKQDFSLKLS VTAADTAVYFCARFRNIDVDYRGGQGLITVSS	47
4H6ベースの ヒトヒジカニクイザル(Macaca fascicularis)との トプドット	HVHV5, ヒト比率82.7% トプドット	EVQLQSGGFLYKESQTLSTCTVSDVSSGYNWIRKHPG KRLWIGFISGGSTYTPSLKSRITLIRDTSKKQDFSLKLS VTAADTAVYFCARFRNIDVDYRGGQGLITVSS	48
4H6ベースの ヒトヒジカニクイザル(Macaca fascicularis)との トプドット	HVHV1, ヒト比率87.4% トプドット	DIQMTQSPFAMGASVGRVLTICRASHIEISGLSWLQKRRFG TIKRLINAASTLASGVPFRFSRSRSTETLTLSLQPEDFA VYICLQISSYFMT FGGGKLEIK	49
4H6ベースの ヒトヒジカニクイザル(Macaca fascicularis)との トプドット	HVHV2, ヒト比率84.2% トプドット	DIQMTQSPFAMGASVGRVLTICRASHIEISGLSWLQKRRFG TIKRLINAASTLASGVPFRFSRSRSTETLTLSLQPEDFA VYICLQISSYFMT FGGGKLEIK	50
4H6ベースの ヒトヒジカニクイザル(Macaca fascicularis)との トプドット	HVHV3, ヒト比率83.2% トプドット	DIQMTQSPFAMGASVGRVLTICRASHIEISGLSWLQKRRFG TIKRLINAASTLASGVPFRFSRSRSTETLTLSLQPEDFA VYICLQISSYFMT FGGGKLEIK	51
4H6ベースの ヒトヒジカニクイザル(Macaca fascicularis)との トプドット	HVHV4, ヒト比率82.1% トプドット	DIQMTQSPFAMGASVGRVLTICRASHIEISGLSWLQKRRFG TIKRLINAASTLASGVPFRFSRSRSTETLTLSLQPEDFA VYICLQISSYFMT FGGGKLEIK	51

【 配列表 】

000721213800001.app

【 2 2 】

05-7F10 (7F10) 重鎖可変領域 (配列番号52)	EYKLVSGGIAVQEGGSLKSGASSTFTSDYMWVWVWVQPKERLEWAVISYGGSTFYPDTVGRGRTTISRDMANVALLQNSRUKSEDTAVYCAR PAPSASXYLDVWQGTLLTSS	10
05-7F10 (7F10) 軽鎖可変領域 (配列番号53)	DIQMTQSPFAMGASVGRVLTICRASHIEISGLSWLQKRRFG TIKRLINAASTLASGVPFRFSRSRSTETLTLSLQPEDFA VYICLQISSYFMT FGGGKLEIK	20
06-6A7 (6A7) 重鎖可変領域 (配列番号54)	QVQLQPGAEIVKFGASVYKLSCKASSTFTLSYIYVWVQRPGQGLEWIGGINFRNGTINNEKFSKRTLTVDKSSSTAYMGLSITSEBNAVYCTR HNGVYVWQGTLLTSS	10
06-6A7 (6A7) 軽鎖可変領域 (配列番号55)	DYWTQTLPLFLVSLDQASLCSKSSQLLHSGNTYLHWYVQRFGQSPHLLIYQVSNRFSVQVDFRFGSGSGTDFPTTKISVEMEDLGVYFGSGQTH VWTFEGGKLEIK	20
07-4H6 (4H6) 重鎖可変領域 (配列番号56)	EYKLVSGGFLYKESQTLSTCTVSDVSSGYNWIRKHPG KRLWIGFISGGSTYTPSLKSRITLIRDTSKKQDFSLKLS VTAADTAVYFCARFRNIDVDYRGGQGLITVSS	10
07-4H6 (4H6) 軽鎖可変領域 (配列番号57)	DIQMTQSPFAMGASVGRVLTICRASHIEISGLSWLQKRRFG TIKRLINAASTLASGVPFRFSRSRSTETLTLSLQPEDFA VYICLQISSYFMT FGGGKLEIK	20

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K 19/00 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)

F I

C 0 7 K 19/00
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 47/68

中華人民共和国 1 0 1 1 1 1 ベイジン ビーディーイー ナンバー 8 8 ケチャン 6 アベニュー
 ビルディング 3 ルーム 7 0 8

(72)発明者

ヤン, ファン

中華人民共和国 1 0 1 1 1 1 ベイジン ビーディーイー ナンバー 8 8 ケチャン 6 アベニュー
 ビルディング 3 ルーム 7 0 8

(72)発明者

ル, チェンユアン

中華人民共和国 1 0 1 1 1 1 ベイジン ビーディーイー ナンバー 8 8 ケチャン 6 アベニュー
 ビルディング 3 ルーム 7 0 8

(72)発明者

シェン, ユエレイ

中華人民共和国 1 0 1 1 1 1 ベイジン ベイジン ビーディーイー ナンバー 8 8 ケチャン 6
 ストリート ビルディング 3 ルーム 6 1 2 0 1 - 1 2 1 0

(72)発明者

ニ, ジアン

中華人民共和国 1 0 1 1 1 1 ベイジン ベイジン ビーディーイー ナンバー 8 8 ケチャン 6
 ストリート ビルディング 3 ルーム 6 1 2 0 1 - 1 2 1 0

(72)発明者

グオ, ヤンアン

中華人民共和国 1 0 1 1 1 1 ベイジン ベイジン ビーディーイー ナンバー 8 8 ケチャン 6
 ストリート ビルディング 3 ルーム 6 1 2 0 1 - 1 2 1 0

(72)発明者

チェン, ユンユン

中華人民共和国 1 0 1 1 1 1 ベイジン ベイジン ビーディーイー ナンバー 8 8 ケチャン 6
 ストリート ビルディング 3 ルーム 6 1 2 0 1 - 1 2 1 0

(72)発明者

シェ, ジンシュ

中華人民共和国 1 0 1 1 1 1 ベイジン ベイジン ビーディーイー ナンバー 8 8 ケチャン 6
 ストリート ビルディング 3 ルーム 6 1 2 0 1 - 1 2 1 0

審査官 山内 達人

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 2 0 0 7 4 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N
 C 0 7 K
 C 1 2 P
 A 6 1 K
 A 6 1 P
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)