

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6586454号
(P6586454)

(45) 発行日 令和1年10月2日(2019.10.2)

(24) 登録日 令和1年9月13日(2019.9.13)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Z N A T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	Z M D
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C O 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

請求項の数 19 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-507983 (P2017-507983)	(73) 特許権者	306021192
(86) (22) 出願日	平成27年8月11日 (2015.8.11)		エフ・ホフマン-ラ・ロシュ・アクチュエン ゲゼルシャフト
(65) 公表番号	特表2017-529327 (P2017-529327A)		スイス、ツェハー-4070バーゼル、グ レンツァッハーシュトラ-セ124番
(43) 公表日	平成29年10月5日 (2017.10.5)	(74) 代理人	110002077
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/068404		園田・小林特許業務法人
(87) 国際公開番号	W02016/023875	(72) 発明者	コルセ, エミリー ラーナ
(87) 国際公開日	平成28年2月18日 (2016.2.18)		スイス国 ツェハー-8049 チュー リッヒ, リートホーフシュトラ-セ 9 0
審査請求日	平成29年4月11日 (2017.4.11)	(72) 発明者	フライターク, オリヴィエ
(31) 優先権主張番号	14181067.1		スイス国 ツェハー-5072 オエッ シュゲン, オーベラー ミューレライン 388
(32) 優先日	平成26年8月14日 (2014.8.14)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号	15159611.1		
(32) 優先日	平成27年3月18日 (2015.3.18)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 ヒトCD40を活性化する抗体とヒトPD-L1に対する抗体との併用療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

固形腫瘍の逐次併用又は同時併用治療のための、A) ヒトCD40に特異的に結合してヒトCD40を活性化する抗体又はその抗体の抗原結合部分を有効成分として含む第一の成分；及びB) PD-L1に結合してPD-L1を阻害するPD-L1抗体を有効成分として含む第二の成分を含む、薬学的製品であって、

A) における第一の成分が、

配列番号3のVL及び配列番号4のVHを含む抗CD40抗体；又は

抗体21.4.1 (ATCC寄託番号PTA-3605)の重鎖及び軽鎖可変ドメインアミノ配列を含む抗CD40抗体

を有効成分として含み、且つ

B) における第二の成分が、上記PD-L1抗体を有効成分として含む薬学的製品。

【請求項2】

ヒトCD40に特異的に結合してヒトCD40を活性化する抗体又はその抗体の抗原結合部分が、ヒトCD40に 4×10^{-10} M以下の K_D で結合するIgG2サブクラスの完全ヒト抗体である、請求項1に記載の薬学的製品。

【請求項3】

PD-L1抗体が、KD値 1.0×10^{-8} mol/l以下、又はKD値 1.0×10^{-9} mol/l以下の結合親和性でヒトPD-L1抗原に特異的に結合する、請求項1又

は 2 に記載の薬学的製品。

【請求項 4】

PD-L1 抗体が、KD 値 $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l} \sim 1.0 \times 10^{-13} \text{ mol/l}$ の間の結合親和性でヒト PD-L1 抗原に特異的に結合する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の薬学的製品。

【請求項 5】

A) 配列番号 3 の VL 及び配列番号 4 の VH を含む抗 CD40 抗体；又は抗体 21.4.1 (ATCC 寄託番号 PTA-3605) の重鎖及び軽鎖可変ドメインミノ配列を含む抗体を有効成分として含む第一の成分；及び

B) 有効成分として、

a) 配列番号 5 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 8 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

b) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 9 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

c) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 10 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

d) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 11 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

e) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 12 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

f) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 13 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

g) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 14 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

h) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 15 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

i) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 16 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

j) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 17 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

k) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 18 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

l) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 19 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

m) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 20 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

n) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 21 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

o) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 22 の軽鎖可変ドメイン VL、又は

p) 配列番号 7 の重鎖可変ドメイン VH 及び配列番号 23 の軽鎖可変ドメイン VL を含む抗体から選択される PD-L1 抗体を含む第二の成分を含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の薬学的製品。

【請求項 6】

A) 配列番号 3 の VL 及び配列番号 4 の VH を含む抗体を有効成分として含む第一の成分と、B) 配列番号 8 の VL 及び配列番号 5 の VH を含む抗体を有効成分として含む第二の成分とを含む、固形腫瘍の逐次併用又は同時併用治療のための、請求項 1 に記載の薬学的製品。

【請求項 7】

成分 A) 及び B) が別々に投与される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の薬学的

10

20

30

40

50

製品。

【請求項 8】

成分 A 及び / 又は B が静脈内 (i . v .) 又は皮下 (s . c .) に投与される、請求項 7 に記載の薬学的製品。

【請求項 9】

成分 A が 4 から 16 mg の間の固定用量で投与され、成分 B が 1200 mg の固定用量で投与される、請求項 8 に記載の薬学的製品。

【請求項 10】

成分 A 及び B の投与が 1 から 42 日、好ましくは 1 又は 7 又は 14 又は 21 又は 42 日離れている、請求項 9 に記載の薬学的製品。

10

【請求項 11】

成分 A が成分 B と共に 1 ~ 4 回投与され、次に疾患の進行まで成分 B のみで治療が継続される、請求項 10 に記載の薬学的製品。

【請求項 12】

固形腫瘍の逐次併用又は同時併用治療のための医薬の製造のための、ヒト CD40 に特異的に結合してヒト CD40 を活性化する請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合部分；及び請求項 1 に記載の PD-L1 抗体の使用。

【請求項 13】

第三の成分 (C) としてサイトカイン阻害剤をさらに含む、請求項 1 に記載の薬学的製品。

20

【請求項 14】

サイトカイン阻害剤が抗 TNF アルファ抗体である、請求項 13 に記載の薬学的製品。

【請求項 15】

固形腫瘍を治療するためのキットであって、請求項 1 から 11、13 及び 14 のいずれか一項に記載の薬学的製品と、該薬学的製品を使用する方法の説明書とを含む、キット。

【請求項 16】

固形腫瘍を有する患者を治療するための医薬であって、請求項 1 から 11、13 及び 14 のいずれか一項に記載の薬学的製品を含む、医薬。

【請求項 17】

固形腫瘍を有する患者を、ヒト CD40 に特異的に結合してヒト CD40 を活性化する請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合部分のいずれかと組み合わせて治療するための医薬であって、請求項 1 に記載の PD-L1 抗体を含む、医薬。

30

【請求項 18】

固形腫瘍を有する患者を、請求項 1 に記載の PD-L1 抗体と組み合わせて治療するための医薬であって、請求項 1 に記載のヒト CD40 に特異的に結合してそれを活性化する抗体又はその抗原結合部分のいずれかを含む、医薬。

【請求項 19】

固形腫瘍を有する患者を治療するための医薬であって、請求項 1 に記載のヒト CD40 に特異的に結合してそれを活性化する抗体又はその抗原結合部分のいずれかと、請求項 1 に記載の PD-L1 抗体が組み合わされる、医薬。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト CD40 に結合する特異的抗体とヒト PD-L1 に結合する特異的抗体の併用療法に関する。このような組み合わせは、がん治療の分野において特に有用である。

【背景技術】

【0002】

免疫調節抗体は、治療法を提供し、抗腫瘍免疫応答を直接的に増強するために使用するか、又は抗がんワクチンのアジュバントとして使用することもできる (Melero, I., et al

50

. Nat Rev Cancer 7, 2007, 95-106)。アゴニスト抗CD40抗体は、これらの試薬の最も有効なクラスの一つを構成する。CD40は、樹状細胞、B細胞、及びマクロファージ等の抗原提示細胞(APC)上で発現される腫瘍壊死因子スーパーファミリーの細胞表面メンバーである。抗CD40アゴニストによる前臨床試験は、抗原提示細胞(APC)上の架橋抗体によるCD40の誘発が、通常はCD40リガンドを介して提供されるCD4 T細胞ヘルプに代わることができ、CD8エフェクターT細胞の活性化及び増殖を促進することを示唆している(Li, F. et al, Science 333, 2011, 1030-1034)。さらに、CD40活性化マクロファージは、直接殺腫瘍機能も発揮し得る(Beatty, G. L., et al. Science 331, 2011, 1612-1616; Vonderheide, R. H., et al., Oncoimmunology 2, 2013, e23033)。CD40アゴニストは、国際公開第2003/040170号に記載されている。

10

【0003】

最近、T細胞の機能障害又はアネルギーが、抑制受容体、すなわちプログラム死1ポリペプチド(PD-1)発現の誘導及び維持と同時に起こることが発見された。結果として、治療標的のPD-1と、PD-1との相互作用によりシグナル伝達する他の分子、例えばプログラム死リガンド1(PD-L1)及びプログラム死リガンド2(PD-L2)は、非常に興味深い領域である。PD-L1シグナル伝達の阻害は、がん並びに急性及び慢性(例えば持続性)感染を含む感染の治療のためのT細胞免疫(例えば、腫瘍免疫)を向上させる手段として提示された。PD-L1に対する抗体は、例えば国際公開第2010/077634号に記載されている。

20

【0004】

T細胞に対する二つの異なるシグナルの共刺激又は提供は、抗原提示細胞(APC)による静止Tリンパ球のリンパ球活性化の広く受け入れられたモデルである。Lafferty et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53: 27-42 (1975)。共刺激シグナルの操作が、細胞に基づく免疫応答を増加又は終了させる手段を提供することが示されているため、共刺激の機序は治療的関心事である。しかしながら、CD40とPD-L1を同時標的とする最適な治療は、未だ商業化されておらず、未だ満たされていない大きな医学的必要性が存在している。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、増殖性疾患、特にがんの治療における使用のための、ヒトPD-L1に結合する抗体とヒトCD40に結合する抗体との併用療法を含む。

30

【0006】

本発明は、増殖性疾患、特にがんの逐次併用又は同時併用治療のための、A)ヒトCD40に特異的に結合してそれを活性化する抗体又はその抗体の抗原結合部分を有効成分として含む第一の成分；及びB)有効成分としてPD-L1抗体を含む第二の成分を含む薬学的製品をさらに含む。

【0007】

本発明は、がんなどの増殖性疾患、好ましくは固形腫瘍の逐次併用又は同時併用治療のための医薬の製造のための、ヒトCD40に特異的に結合してそれを活性化する抗体又はその抗原結合部分；及びPD-L1抗体の使用をさらに含む。

40

【0008】

本発明は、上記の薬学的製品を含むキットをさらに含む。

【0009】

本発明は、増殖性疾患、特にがんに罹患している患者を治療する方法であって、抗CD40抗体とPD-L1抗体の同時併用又は逐次併用投与を含む方法をさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】(a)ピヒクル及び単剤療法コントロールと比較した、同所性Pan02-H7-Fluc膵臓癌モデルにおけるmuFGK4.5(抗CD40)と抗-PD-L1と

50

の併用での腫瘍増殖阻害の分析、(b) a - C D 4 0 + a - P D L 1 併用群マウスの個々の腫瘍の増殖曲線。

【図2】個々のマウスは、治療22日目にmuFGK4.5と抗-PD-L1とを併用して治療された。

【図3】同所性Panc02-H7-Fluc膵臓癌モデルvsコントロール及び単独療法におけるmuFGK4.5と抗PD-L1抗体の併用(「Combo」)の免疫薬力学(PD)的分析。

【図4】ヒト抗CD40抗体と抗PD-L1抗体との併用治療を含む臨床試験のための投薬量及び投薬スケジュール。PD-L1抗体の用量は、1200mgに固定される。

【図5】第三の成分としての抗TNFアルファの添加が、抗CD40/抗PD-L併用治療により誘発されるマウスの体重減少を防ぐ。

【図6】第三の成分としての抗TNFアルファの添加が、抗CD40/抗PD-L併用治療の抗腫瘍活性を損なうことはない。

【0011】

配列表

配列番号1：ヒトCD40

配列番号2：ヒトPD-L1

配列番号3：本発明のCD40抗体の軽鎖可変ドメイン(VL)

配列番号4：本発明のCD40抗体の重鎖可変ドメイン(VH)

配列番号5：重鎖可変ドメインVH変異体1、抗PD-L1 243.55

配列番号6：重鎖可変ドメインVH変異体2、抗PD-L1 243.55

配列番号7：重鎖可変ドメインVH変異体3、抗PD-L1 243.55

配列番号8：軽鎖可変ドメインVL変異体1、抗PD-L1 243.55

配列番号9：軽鎖可変ドメインVL変異体2、抗PD-L1 243.55

配列番号10：軽鎖可変ドメインVL変異体3、抗PD-L1 243.55

配列番号11：軽鎖可変ドメインVL変異体4、抗PD-L1 243.55

配列番号12：軽鎖可変ドメインVL変異体5、抗PD-L1 243.55

配列番号13：軽鎖可変ドメインVL変異体6、抗PD-L1 243.55

配列番号14：軽鎖可変ドメインVL変異体7、抗PD-L1 243.55

配列番号15：軽鎖可変ドメインVL変異体8、抗PD-L1 243.55

配列番号16：軽鎖可変ドメインVL変異体9、抗PD-L1 243.55

配列番号17：軽鎖可変ドメインVL変異体10、抗PD-L1 243.55

配列番号18：軽鎖可変ドメインVL変異体11、抗PD-L1 243.55

配列番号19：軽鎖可変ドメインVL変異体12、抗PD-L1 243.55

配列番号20：軽鎖可変ドメインVL変異体13、抗PD-L1 243.55

配列番号21：軽鎖可変ドメインVL変異体14、抗PD-L1 243.55

配列番号22：軽鎖可変ドメインVL変異体15、抗PD-L1 243.55

配列番号23：軽鎖可変ドメインVL変異体16、抗PD-L1 243.55

【発明を実施するための形態】

【0012】

PD-L1(プログラム死リガンド1)は、T細胞の活性化後にT細胞上に発現される阻害性受容体であるPD-1に結合する二つのリガンド(PD-L1及びPD-L2)のうちの一つであり、慢性感染症又はがんなどの慢性刺激の状態で持続される(例えばBlank C et al, Cancer Immunol Immunother, 2005, 54:307-14; and Keir ME et al, Annual Rev Immunol, 2008, 26:677-704を参照のこと)。腫瘍細胞上のPD-L1の異常発現は、腫瘍細胞の免疫原性をかなり低下させること(Dong H et al, Nat Med, 2002, 8:793-800)、また抗腫瘍免疫を妨げ、その結果免疫回避を招くこと(Blank C et al, Cancer Immunol Immunother, 2007, 56:739-45)が報告されている。モノクローナル抗体によるPD-L1又はPD-1の遮断は、いくつかのマウス腫瘍モデルにおいて強力ではしばしば迅速な抗腫瘍効果をもたらす(例えば、Iwai Y. et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2002; 99:1229

10

20

30

40

50

3-7; Strome SE et al, *Cancer Res* 2003; 63:6501-5参照)。これは、腫瘍特異的 T 細胞が不活性又は抑制状態の腫瘍微小環境に存在し得ること、また PD 1 / PD L 1 経路の阻害が腫瘍特異的 T 細胞応答を再活性化し得ることを示唆している。実験データに基づいて、PD - L 1 又は PD - 1 の遮断は、腫瘍抗原に対する進行中の免疫応答を増強することが期待される (Merelli B et al, *Crit Rev Oncol Hematol.*, 2014; 89:140-65)。PD - L 1 に対する抗体は、例えば国際公開第 2010 / 077634 号に記載されている。

【0013】

腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) スーパーファミリーのメンバーである CD 40 は、B リンパ球、樹状細胞 (DC)、及び単球を含む抗原提示細胞 (APC) 上でのその発現を介した抗腫瘍免疫応答の決定的な調節因子である (例えば、Grewal IS et al, *Ann Rev Immunol*, 1998;16:111-35; Van Kooten C et al, *J Leukoc. Biol.*, 2000;67:2-17; or O' Sullivan B et al, *Crit Rev Immunol.* 2003;23(12):83-107を参照)。CD 40 刺激 DC は、抗原プロセッシング及び提示経路を増加させ、リンパ節に移動してナイーブ T 細胞を活性化する。アゴニスト CD 40 抗体は、マウスモデルにおいて樹立されたリンパ腫を除去することができる細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 拡張をもたらす CD 4 + リンパ球の機能を代替することが示された (例えば、Sotomayor EM et al, *Nature Medicine*, 1999;5(7):780-7; Gladue RP et al, *Cancer Immunol Immunother*, 2011;60(7):1009-17参照)。CD 40 アゴニストは、宿主 APC を活性化することによって免疫刺激を誘発し、次いで腫瘍に対して向けられる T 細胞応答を駆動する (例えば、Vonderheide RH, *Clin Cancer Res*, 2007;13:1083-8参照)。

【0014】

したがって、CD 40 アゴニストと PD - L 1 阻害剤の併用は、CD 40 アゴニスト活性を介して二次リンパ器官における抗腫瘍 T 細胞のプライミング及び増殖を引き起こし得、同時に PD 1 / PD - L 1 媒介性の抗腫瘍 T 細胞免疫抑制を取り除き得る。しかし、免疫療法、より具体的には T 細胞媒介性免疫応答は、注入関連反応、サイトカイン放出 (CRS、「サイトカインストーム」又は「高サイトカイン血症」)、及び免疫関連毒性などの重篤な有害事象 (AE) も引き起こし得る。

【0015】

本発明によれば、CD 40 アゴニスト及び PD - L 1 阻害剤の逐次併用又は同時併用の適用は、腫瘍増殖の相加的な (すなわち相乗的) 阻害を超え、個々の腫瘍のインビボ寛解さえも引き起こすことが今や見出されている。好ましい実施態様では、二つの成分、すなわち CD 40 アゴニスト及び PD - L 1 阻害剤の投与は、逐次的である。

【0016】

したがって、一実施態様において、本発明は、CD 40 アゴニスト及び PD - L 1 阻害剤を含む相乗的併用を提供する。

【0017】

別の実施態様において、本発明は、前記 CD 40 アゴニスト及び前記 PD - L 1 阻害剤のヒトにおいて許容される (すなわち忍容される) 適用のための投薬量及び投薬レジメンを提供する。これらの投薬量及び投薬レジメンは、免疫関連毒性のリスクを低減または排除し、本併用治療の安全性プロファイル及び忍容性を改善する。

【0018】

ヒト CD 40 抗原は、腫瘍壊死因子受容体 (TNF - R) ファミリーに属する 50 kDa の細胞表面糖タンパク質である (Stamenkovic et al., *EMBO J.* 8:1403-10 (1989))。ヒト CD 40 抗原は、「腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 5」としても知られている。別の名称は、B 細胞表面抗原 40、Bp 50、CD 40 L 受容体、CDw 40、CDW 40、MGC 9013、p 50 又は TNFRSF 5 を含む。たとえば、ヒト CD 40 抗原は、UniProt Entry No. P25942 に登録されている。一実施態様において、ヒト CD 40 抗原は、配列番号 1 の配列を有する (表 1 参照)。

特異的に結合する抗体を指す。結合親和性は、例えば表面プラズモン共鳴法（スウェーデン、ウプサラのGE-HealthcareのBIAcore（登録商標））などの標準的な結合アッセイで決定される。したがって、本明細書で使用する「ヒトCD40に結合し、それを活性化する抗体」は、 $KD 1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ 以下（一実施態様では $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l} \sim 1.0 \times 10^{-13} \text{ mol/l}$ ）、一実施態様では $KD 1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ 以下（一実施態様では $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/l} \sim 1.0 \times 10^{-13} \text{ mol/l}$ ）の結合親和性で、ヒトCD40抗原に特異的に結合する抗体を指す。別の実施態様では、本発明による抗CD40抗体は、 $4 \times 10^{-10} \text{ M}$ 以下の K_D でヒトCD40に結合する。

【0021】

本発明の一実施態様では、ヒトCD40に結合する抗体は、アゴニスト（「CD40アゴニスト」）である。「アゴニスト」は細胞上の受容体と結合し、受容体の天然リガンドによって開始される反応又は活性と類似若しくは同一の反応又は活性を開始する。「CD40アゴニスト」は、次の応答のいずれか又はすべてを誘導する：B細胞の増殖及び/又は分化；ICAM-1、E-セレクトリン、VCAM等の分子を介する細胞間接着の亢進；IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNFなどの炎症誘発性サイトカインの分泌；TRAF（例えばTRAF2及び/又はTRAF3）、NIK（NF-kB誘発キナーゼ）などのMAPキナーゼ、I-カッパBキナーゼ（IKK/.beta.）、転写因子NF-kB、Ras、及びMEK/ERK経路、PI3K/AKT経路、P38MAPK経路等の経路によるCD40受容体を介するシグナル伝達；XIAP、mc1-1、bc1-x等の分子による抗アポトーシスシグナルの伝達；B及び/又はT細胞のメモリー生成；B細胞抗体産生；B細胞アイソタイプスイッチ、MHCクラスII及びCD80/86等の細胞表面発現の増加（但しこれらに限定されない）。

【0022】

アゴニスト活性は、B細胞応答のアッセイにおいて測定される、ネガティブコントロールにより誘導されるアゴニスト活性よりも少なくとも30%、1035%、40%、45%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は100%高いことが意図される。

【0023】

別の実施態様では、CD40アゴニストは、B細胞応答のアッセイで測定される、ネガティブコントロールにより誘導されるアゴニスト活性より少なくとも2倍又は少なくとも3倍大きいアゴニスト活性を有する。

【0024】

したがって、例えば目的のB細胞応答がB細胞増殖である場合、アゴニスト活性は、ネガティブコントロールにより誘導されるB細胞増殖のレベルよりも少なくとも2倍又は少なくとも3倍高いレベルのB細胞増殖の誘導であろう。

【0025】

本明細書で使用する「CD40アゴニスト」は、CD40/CD40L相互作用をアゴナイズする任意の部分を含む。典型的には、このような部分は、アゴニスト性CD40抗体又はアゴニスト性CD40Lポリペプチドであろう。このような抗体は、CD40/CD40L結合相互作用を特異的にアゴナイズする、例えばヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、scFv、及び抗体フラグメントを含む。一実施態様において、アゴニスト性CD40抗体は、キメラ、完全ヒト又はヒト化CD40抗体を含む。別の好ましい実施態様において、アゴニスト性CD40抗体は、キメラ、完全ヒト又はヒト化CD40抗体を含む。

【0026】

一実施態様において、前記CD40抗体は、IgG2サブクラスの完全ヒト抗体である。さらに別の実施態様では、前記抗体は、国際公開第2003/040170号に具体的に開示されている抗CD40抗体のいずれかである。さらに別の実施態様では、本発明のCD40アゴニストは、国際公開第2003/040170号にある3.1.1、7.1

10

20

30

40

50

. 2、10.8.3、15. 1.1、21.4.1、21.2.1、22.1.1、23.5.1、23.25.1、23.29.1、及び24.2.1と命名された抗体の群から選択される。これらの抗体を分泌するハイブリドーマは、ブダペスト条約に従って寄託されている。寄託番号は、国際公開第2003/040170号の段落[0250]で見つけることができる。別の実施態様では、本発明のCD40抗体は、抗体21.4.1(ATCC寄託番号PTA-3605)の重鎖及び軽鎖可変ドメインアミノ配列を含む。別の実施態様では、本発明のCD40抗体は、抗体21.4.1(ATCC寄託番号PTA-3605)の重鎖及び軽鎖アミノ配列からなる。

【0027】

一実施態様では、本発明によるヒト抗CD40抗体は、アミノ酸配列番号3の軽鎖可変ドメイン及びアミノ酸配列番号4の重鎖可変ドメインを含む(表3)。

10

表3：本発明のCD40アゴニストの軽(VL)及び重(VH)鎖可変ドメインのアミノ酸配列

VL (アミノ酸配列) 配列番号3	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAS QGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQ ANIFPLTFGGGTK VEIK
VH (アミノ酸配列) 配列番号4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YFTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWIN PDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSIST AYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGY CTNGVCSYFDYWGQGT LVTVSS

20

【0028】

本発明によれば、「PD-L1抗体」は、ヒトPD-L1に結合するか又は特異的に結合する抗体である。一実施態様において、ヒトPD-L1は、配列番号2の配列を有する。本明細書で使用する場合、「ヒトPD-L1に結合」又は「ヒトPD-L1に特異的に結合」又は「ヒトPD-L1に結合する」又は「抗PD-L1抗体」は、KD値 $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ 以下、一実施態様ではKD値 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ 以下の結合親和性でヒトPD-L1抗原に特異的に結合する抗体を指す。結合親和性は、例えば表面プラズモン共鳴法(スウェーデン、ウプサラのGE-HealthcareのBIAcore(登録商標))などの標準的な結合アッセイで決定される。したがって、本明細書で使用する「ヒトPD-L1に結合する抗体」は、KD値 $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l}$ 以下(一実施態様では $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/l} \sim 1.0 \times 10^{-13} \text{ mol/l}$)、一実施態様ではKD値 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/l}$ 以下(一実施態様では $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol/l} \sim 1.0 \times 10^{-13} \text{ mol/l}$)の結合親和性でヒトPD-L1抗原に特異的に結合する抗体を指す。

30

40

【0029】

一実施態様では、本明細書に記載の併用療法において使用されるヒトPD-L1に結合する抗体は、

243.55.S70、243.55.H1、243.55.H12、243.55.H37、243.55.H70、243.55.H89、243.55.S1、243.55.5、243.55.8、243.55.30、243.55.34、243.55.S37、243.55.49、243.55.51、243.55.62、及び243.

50

55.84

からなる群より選択される。

【0030】

これらの抗体は、国際公開第2010/77634号に記載されており（配列は国際公開第2010/77634号の図11に示されている）、以下の重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）配列を含むことを特徴とする（表4）。

表4：選択されたPD-L1抗体のVH及びVLの組み合わせ

抗PD-L1抗体	重鎖可変ドメインVH のアミノ酸配列、配列 番号	軽鎖可変ドメインVL のアミノ酸配列、配列 番号
243.55.S70	5	8
243.55.H1	6	9
243.55.H12	6	10
243.55.H37	6	11
243.55.H70	6	12
243.55.H89	6	13
243.55.S1	6	14
243.55.5	6	15
243.55.8	6	16
243.55.30	6	17
243.55.34	6	18
243.55.S37	6	19
243.55.49	6	20
243.55.51	6	21
243.55.62	6	22
243.55.84	7	23

10

20

30

表5：表4の配列番号の配列

8	<p> Asp Ile Gln Met Thr G ln Ser Pro Ser Ser Le u Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile T hr Cys Arg Ala Ser Gl n Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln G ln Lys Pro Gly Lys Al a Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe L eu Tyr Ser Gly Val Pr o Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr A sp Phe Thr Leu Thr Il e Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr T yr Tyr Cys Gln Gln Ty r Leu Tyr His Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly T hr Lys Val Glu Ile Ly s Arg </p>	<p>10</p> <p>20</p>
9	<p> Asp Ile Gln Met Thr G ln Ser Pro Ser Ser Le u Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile T hr Cys Arg Ala Ser Gl n Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln G ln Lys Pro Gly Lys Al a Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe L eu Tyr Ser Gly Val Pr o Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr A sp Phe Thr Leu Thr Il e Ser Ser Leu Gln Pro </p>	<p>30</p> <p>40</p>

	<p> l n S e r P r o S e r S e r L e u S e r A l a S e r V a l G l y A s p A r g V a l T h r I l e T h r C y s A r g A l a S e r G l n A s p V a l S e r T h r A l a V a l A l a T r p T y r G l n G l n L y s P r o G l y L y s A l a P r o L y s L e u L e u I l e T y r S e r A l a S e r P h e L e u T y r S e r G l y V a l P r o S e r A r g P h e S e r G l y S e r G l y S e r G l y T h r A s p P h e T h r L e u T h r I l e S e r S e r L e u G l n P r o G l u A s p P h e A l a T h r T y r T y r C y s G l n G l n G l y T y r G l y V a l P r o A r g T h r P h e G l y G l n G l y T h r L y s V a l G l u I l e L y s A r g </p>	<p>10</p> <p>20</p>
14	<p> A s p I l e G l n M e t T h r G l n S e r P r o S e r S e r L e u S e r A l a S e r V a l G l y A s p A r g V a l T h r I l e T h r C y s A r g A l a S e r G l n A s p V a l S e r T h r A l a V a l A l a T r p T y r G l n G l n L y s P r o G l y L y s A l a P r o L y s L e u L e u I l e T y r S e r A l a S e r P h e L e u T y r S e r G l y V a l P r o S e r A r g P h e S e r G l y S e r G l y S e r G l y T h r A s p P h e T h r L e u T h r I l e S e r S e r L e u G l n P r o G l u A s p P h e A l a T h r T </p>	<p>30</p> <p>40</p>

	<p>Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg</p>	10
17	<p>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Phe Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg</p>	20 30 40
18	<p>Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu</p>	

	<p>r Leu Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly T hr Lys Val Glu Ile Ly s Arg</p>	
20	<p>Asp Ile Gln Met Thr G ln Ser Pro Ser Ser Le u Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile T hr Cys Arg Ala Ser Gl n Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln G ln Lys Pro Gly Lys Al a Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe L eu Tyr Ser Gly Val Pr o Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr A sp Phe Thr Leu Thr Il e Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr T yr Tyr Cys Gln Gln Se r Trp Tyr His Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly T hr Lys Val Glu Ile Ly s Arg</p>	<p>10 20 30</p>
21	<p>Asp Ile Gln Met Thr G ln Ser Pro Ser Ser Le u Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile T hr Cys Arg Ala Ser Gl n Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln G ln Lys Pro Gly Lys Al a Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe L</p>	<p>40</p>

	<p>eu Tyr Ser Gly Val Pr o Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr A sp Phe Thr Leu Thr Il e Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr T yr Tyr Cys Gln Gln Ty r Phe Tyr Ile Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly T hr Lys Val Glu Ile Ly s Arg</p>	10
22	<p>Asp Ile Gln Met Thr G ln Ser Pro Ser Ser Le u Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile T hr Cys Arg Ala Ser Gl n Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln G ln Lys Pro Gly Lys Al a Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe L eu Tyr Ser Gly Val Pr o Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr A sp Phe Thr Leu Thr Il e Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr T yr Tyr Cys Gln Gln Ty r Trp Tyr Thr Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly T hr Lys Val Glu Ile Ly s Arg</p>	20
23	<p>Asp Ile Gln Met Thr G ln Ser Pro Ser Ser Le u Ser Ala Ser Val Gly</p>	30
		40

又は

m) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号20の軽鎖可変ドメインVL、

又は

n) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号21の軽鎖可変ドメインVL、

又は

o) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号22の軽鎖可変ドメインVL、

又は

p) 配列番号7の重鎖可変ドメインVH及び配列番号23の軽鎖可変ドメインVL

【0032】

したがって、一実施態様では、本発明は、増殖性疾患、特にがんの逐次併用又は同時併用治療のための、A) ヒトCD40に特異的に結合してそれを活性化する抗体又はその抗原結合部分を有効成分として含む第一の成分と、B) 有効成分としてPD-L1抗体を含む第二成分とを含む薬学的製品を提供する。

10

【0033】

この実施態様の範囲内で、A) に含まれる抗体は、ヒトCD40に 4×10^{-10} M以下の K_D で結合するIgG2サブクラスの完全ヒト抗体；又は

配列番号3のVL及び配列番号4のVHを含む抗体；又は

抗体21.4.1(ATCC寄託番号PTA-3605)の重鎖及び軽鎖可変ドメインアミノ配列を含む抗体；又は

抗体21.4.1(ATCC寄託番号PTA-3605)の重鎖及び軽鎖アミノ配列を含む抗体であり；また

20

B) に含まれる抗体は、前述のa) からp) に記載のPD-L1抗体のいずれかである。

【0034】

さらに別の実施態様では、本発明は、A) 4×10^{-10} M以下の K_D でヒトCD40に結合するIgG2サブクラスの完全ヒト抗体を有効成分として含む第一の成分と、B) 有効成分として以下：

a) 配列番号5の重鎖可変ドメインVH及び配列番号8の軽鎖可変ドメインVL、又は

b) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号9の軽鎖可変ドメインVL、又は

30

c) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号10の軽鎖可変ドメインVL、又は

d) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号11の軽鎖可変ドメインVL、又は

e) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号12の軽鎖可変ドメインVL、又は

f) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号13の軽鎖可変ドメインVL、又は

g) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号14の軽鎖可変ドメインVL、又は

40

h) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号15の軽鎖可変ドメインVL、又は

i) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号16の軽鎖可変ドメインVL、又は

j) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号17の軽鎖可変ドメインVL、又は

k) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号18の軽鎖可変ドメインVL、又は

l) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号19の軽鎖可変ドメインVL、又は

50

- m) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号20の軽鎖可変ドメインVL、又は
- n) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号21の軽鎖可変ドメインVL、又は
- o) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号22の軽鎖可変ドメインVL、又は
- p) 配列番号7の重鎖可変ドメインVH及び配列番号23の軽鎖可変ドメインVLを含む抗体から選択されるPD-L1抗体を含む第二の成分とを含む、増殖性疾患、特にがんの逐次併用又は同時併用治療のための薬学的製品を提供する。

【0035】

さらに別の実施態様では、本発明は、A)配列番号3のVL及び配列番号4のVHを含む抗体を有効成分として含む第一の成分と、B)有効成分として、以下：

- a) 配列番号5の重鎖可変ドメインVH及び配列番号8の軽鎖可変ドメインVL、又は
- b) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号9の軽鎖可変ドメインVL、又は
- c) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号10の軽鎖可変ドメインVL、又は
- d) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号11の軽鎖可変ドメインVL、又は
- e) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号12の軽鎖可変ドメインVL、又は
- f) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号13の軽鎖可変ドメインVL、又は
- g) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号14の軽鎖可変ドメインVL、又は
- h) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号15の軽鎖可変ドメインVL、又は
- i) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号16の軽鎖可変ドメインVL、又は
- j) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号17の軽鎖可変ドメインVL、又は
- k) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号18の軽鎖可変ドメインVL、又は
- l) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号19の軽鎖可変ドメインVL、又は
- m) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号20の軽鎖可変ドメインVL、又は
- n) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号21の軽鎖可変ドメインVL、又は
- o) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号22の軽鎖可変ドメインVL、又は
- p) 配列番号7の重鎖可変ドメインVH及び配列番号23の軽鎖可変ドメインVLを含む抗体から選択されるPD-L1抗体を含む第二の成分とを含む、増殖性疾患、特にがんの逐次併用又は同時併用治療のための薬学的製品を提供する。

【0036】

さらに別の実施態様では、本発明は、A)抗体21.4.1(ATCC寄託番号PTA-3605)の重鎖及び軽鎖可変ドメインアミノ配列を含む抗体を有効成分として含む第一の成分と、B)有効成分として、以下：

- a) 配列番号5の重鎖可変ドメインVH及び配列番号8の軽鎖可変ドメインVL、又

は

- b) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 9 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - c) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 10 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - d) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 11 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - e) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 12 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - f) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 13 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - g) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 14 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - h) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 15 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - i) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 16 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - j) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 17 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - k) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 18 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - l) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 19 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - m) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 20 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - n) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 21 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - o) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 22 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
 - p) 配列番号 7 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 23 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
- を含む抗体から選択される P D - L 1 抗体を含む第二の成分とを含む、増殖性疾患、特にがんの逐次併用又は同時併用治療のための薬学的製品を提供する。

【 0 0 3 7 】

さらに別の実施態様では、本発明は、A) 抗体 2 1 . 4 . 1 (A T C C 寄託番号 P T A - 3 6 0 5) の重鎖及び軽鎖アミノ配列を含む抗体を有効成分として含む第一の成分と、B) 有効成分として、以下：

- a) 配列番号 5 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 8 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
- b) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 9 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
- c) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 10 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
- d) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 11 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
- e) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 12 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
- f) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 13 の軽鎖可変ドメイン V L、又は
- g) 配列番号 6 の重鎖可変ドメイン V H 及び配列番号 14 の軽鎖可変ドメイン V L、又は

- h) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号15の軽鎖可変ドメインVL、又は
- i) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号16の軽鎖可変ドメインVL、又は
- j) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号17の軽鎖可変ドメインVL、又は
- k) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号18の軽鎖可変ドメインVL、又は
- l) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号19の軽鎖可変ドメインVL、又は
- m) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号20の軽鎖可変ドメインVL、又は
- n) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号21の軽鎖可変ドメインVL、又は
- o) 配列番号6の重鎖可変ドメインVH及び配列番号22の軽鎖可変ドメインVL、又は
- p) 配列番号7の重鎖可変ドメインVH及び配列番号23の軽鎖可変ドメインVLを含む抗体から選択されるPD-L1抗体を含む第二の成分とを含む、増殖性疾患、特にがんの逐次併用又は同時併用治療のための薬学的製品を提供する。

10

【0038】

20

さらに別の実施態様では、本発明は、A)配列番号3のVL及び配列番号4のVHを含む抗体を有効成分として含む第一の成分と、B)有効成分として、配列番号8のVL及び配列番号5のVHを含む抗体を含む第二の成分とを含む、増殖性疾患、特にがんの逐次併用又は同時併用治療のための薬学的製品を提供する。

【0039】

さらに別の実施態様では、本発明は、A)抗体21.4.1(ATCC寄託番号PTA-3605)の重鎖及び軽鎖可変ドメインアミノ配列を含む抗体を有効成分として含む第一の成分と、B)有効成分として、抗体243.55.S70の重鎖及び軽鎖可変ドメインアミノ配列を含む抗体を含む第二の成分とを含む、増殖性疾患、特にがんの逐次併用又は同時併用治療のための薬学的製品を提供する。

30

【0040】

さらに別の実施態様では、本発明は、A)抗体21.4.1(ATCC寄託番号PTA-3605)の重鎖及び軽鎖アミノ配列を含む抗体を有効成分として含む第一の成分と、B)有効成分として、抗体243.55.S70の重鎖及び軽鎖アミノ配列を含む抗体を含む第二の成分とを含む、増殖性疾患、特にがんの逐次併用又は同時併用治療のための薬学的製品を提供する。

【0041】

一実施態様では、成分A)及びB)は、好ましくは1又は2又は3又は4又は5又は6又は7日間の時間差で別々に投与される。別の実施態様において、成分A)及びB)の投与の差は、1日から21日の間、好ましくは1日から14日の間、又は1日から10日の間、又は1日から7日の間のいずれの時間差であってもよい。

40

【0042】

別の実施態様では、本発明は、がん、好ましくは固形腫瘍などの増殖性疾患の逐次併用又は同時併用治療のための医薬の製造のための、ヒトCD40に特異的に結合してそれを活性化する抗体又はその抗原結合部分及びPD-L1抗体の使用を提供する。

【0043】

本発明は、患者に対して治療的有効量の本発明による抗体を投与することを特徴とする、治療を必要とする患者の治療のための方法をさらに含む。本発明は、記載の治療法のための、本発明による抗体の使用を含む。

【0044】

50

したがって、本発明の一実施態様は、本明細書に記載の抗PD-L1抗体との併用でのがんの治療における使用のための、本明細書に記載のCD40抗体又はその抗原結合部分である。本明細書で使用される用語「がん」は、例えば、肺がん、非小細胞肺（NSCL）がん、細気管支肺胞上皮細胞肺がん、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭頸部がん、皮膚黒色腫又は眼球内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃がん(stomach cancer)、胃がん(gastric cancer)、結腸がん、乳がん、子宮がん、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、ホジキン病、食道がん、小腸がん、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、軟組織の肉腫、尿道がん、陰茎がん、前立腺がん、膀胱がん、腎臓又は尿管のがん、腎細胞癌、腎盂癌、中皮腫、肝細胞がん、胆道がん、中枢神経系(CNS)の腫瘍、脊椎腫瘍、脳幹神経膠腫、多形神経膠芽腫、星状細胞腫、シ
10
ユワン腫、上衣腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫、リンパ腫、リンパ性白血病(任意の、上記がんの難治性型、又は上記がんの一又は複数の組み合わせを含む)であり得る。好ましい一実施態様では、そのようながんは、乳がん、結腸直腸がん、メラノーマ、頭頸部がん、肺がん又は前立腺がんである。別の実施態様では、そのようながんは、乳がん、肺がん、結腸がん、卵巣がん、メラノーマがん、膀胱がん、腎がん、腎臓がん、肝臓がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、食道がん、中皮腫又は前立腺がんから選択される固形腫瘍である。別の実施態様において、そのようながんは、白血病(例えばAML、CLL)、リンパ腫、骨髄腫等の血液腫瘍である。さらに別の実施態様において、がんは、乳がん、肺がん、結腸がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん又は前
20
立腺がんである。

【0045】

一実施態様では、本併用療法は、転移の予防又は治療における使用のためのものである。

【0046】

一実施態様では、本併用療法は、腫瘍免疫などの免疫関連疾患の治療又は進行遅延における使用のためのものである。

【0047】

一実施態様では、本併用療法は、T細胞活性などの免疫応答又は機能の刺激における使用のためのものである。

【0048】

用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合することができるヒトCD40又はPD-L1のタンパク質決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、特定の三次元構造特性及び特定の電荷特性を通常有する。立体構造エピトープと非立体構造エピトープは、変性溶媒の存在下で後者でなく前者への結合が失われるという点で区別される。

【0049】

本明細書で使用される場合、「可変ドメイン」(軽鎖可変ドメイン(VL)、重鎖可変ドメイン(VH))は、抗原への抗体の結合に直接関与する軽鎖ドメイン及び重鎖ドメインの対の各々を意味する。可変軽鎖ドメイン及び可変重鎖ドメインは、同じ一般構造を有し、各ドメインは、三つの「超可変領域」(又は相補性決定領域、CDR)によって接続された、配列が広く保存されている四つのフレームワーク(FR)領域を含む。フレームワーク領域は、ベータ-シートコンフォメーションを採り、CDRは、ベータ-シート構造を接続するループを形成し得る。各鎖におけるCDRは、フレームワーク領域によりその三次元構造に保持され、もう一方の鎖に由来するCDRと共に抗原結合部位を形成する。抗体の重鎖及び軽鎖のCDR3領域は、本発明による抗体の結合特異性/親和性において特に重要な役割を果たし、それ故、本発明のさらなる目的を提供する。

【0050】

本明細書において使用される場合、「抗体の抗原結合部分」という用語は、抗原結合に関与する、抗体のアミノ酸残基を指す。抗体の抗原結合部分は、「相補性決定領域」すなわち「CDR」のアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」すなわち「FR」領域は、本
40
50

明細書で定義している超可変可変領域残基以外の可変ドメイン領域である。したがって、抗体の軽鎖及び重鎖の可変ドメインは、N末端からC末端に向かって、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4を含む。特に、重鎖のCDR3は、抗原結合に最も寄与する領域であり、抗体の特性を定義する。CDR及びFR領域は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)の標準的な定義及び/又は「超可変可変ループ」からの残基に従って決定される。

【0051】

本発明の一実施態様では、ヒトCD40に特異的に結合してそれを活性化する抗体の「抗原結合部分」は、抗体21.4.1(ATCC寄託番号PTA-3605)の重鎖及び軽鎖可変ドメインのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む。

10

【0052】

本明細書で使用する場合、用語「核酸」又は「核酸分子」は、DNA分子及びRNA分子を含むことが意図される。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0053】

本願内で使用される場合、用語「アミノ酸」は、アラニン(3文字コード: ala、1文字コード: A)、アルギニン(arg、R)、アスパラギン(asn、N)、アスパラギン酸(asp、D)、システイン(cys、C)、グルタミン(gln、Q)、グルタミン酸(glu、E)、グリシン(gly、G)、ヒスチジン(his、H)、イソロイシン(ile、I)、ロイシン(leu、L)、リジン(lys、K)、メチオニン(met、M)、フェニルアラニン(phe、F)、プロリン(pro、P)、セリン(ser、S)、スレオニン(thr、T)、トリプトファン(trp、W)、チロシン(tyr、Y)、及びバリン(val、V)を含む天然に存在するカルボキシアルファ-アミノ酸の群を意味する。

20

【0054】

抗体の「Fc部分」は、抗体の抗原への結合には直接関与しないが、様々なエフェクター機能を発揮する。「抗体のFc部分」は、当業者に周知であり、抗体のパパイン切断に基づいて定められる用語である。抗体又は免疫グロブリンは、その重鎖定常領域のアミノ酸配列に応じて、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMのクラスに分類され、これらのうちいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4、IgA1及びIgA2にさらに分類されることがある。重鎖定常領域に応じて、免疫グロブリンの異なるクラスは、それぞれa、 、 、及びμと呼ばれる。抗体のFc部分は、補体活性化、C1q結合、及びFc受容体結合に基づいて、ADCC(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性)及びCDC(補体依存性細胞傷害性)に直接関与する。補体活性化(CDC)は、ほとんどのIgG抗体サブクラスのFc部分への補体因子C1qの結合により開始される。補体系に対する抗体の影響は特定の条件に依存するが、C1qへの結合は、Fc部分に規定された結合部位により引き起こされる。そのような結合部位は当該技術分野で既知であり、例えばBoackle, R.J., et al., Nature 282 (1979) 742-743, Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560, Brunhouse, R.及びCebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917, Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344, Thommesen, J.E., et al., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004, Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184, Hezareh, M., et al., J. Virology 75 (2001) 12161-12168, Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324, EP 0 307 434により記載されている。そのような結合部位は、例えばL234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331、及びP329(Kabat, E. A.のEUIンデックスに従い番号付け、下記参照)である。通常、サブクラスIgG1、IgG2、及びIgG3の抗体は、補体活性化並びにC1q及びC3結合を示すが、一方IgG4は補体系を活性化せず、C1q及びC3に結合しない。

30

40

【0055】

50

一実施態様において、本発明による抗体はヒト起源由来のFc部分、好ましくはヒト定常領域の他のすべての部分を含む。本明細書で使用される場合、用語「ヒト起源由来のFc部分」は、サブクラスIgG1又はIgG2又はIgG3又はIgG4のヒト抗体のFc部分、好ましくはヒトIgG1又はIgG2サブクラスのFc部分、(L234A+L235Aに変異を有する一実施態様において)ヒトIgG1又はIgG2サブクラスの変異Fc部分、ヒトIgG4サブクラスのFc部分、又はS228Pに変異を有する一実施態様において、ヒトIgG4サブクラスの変異Fc部分のいずれかであるFc部分を指す。別の実施態様では、前記抗体は、低下した又は最小のエフェクター機能を有する。一実施態様では、最小のエフェクター機能は、エフェクターなし(effectorless)Fc突然変異に起因し得る。一実施態様では、エフェクターなしFc突然変異は、L234A/L235A又はL234A/L235A/P329G又はN297A又はD265A/N297Aである。一実施態様では、エフェクターなしFc突然変異は、各抗体に対して、L234A/L235A、L234A/L235A/P329G、N297A、及びD265A/N297Aを含む群から互いに独立して選択され得る。

【0056】

一実施態様では、本発明による抗体は、モノクローナル抗体である。別の実施態様では、本発明の抗体は、ヒトIgGクラスの(すなわちIgG1又はIgG2又はIgG3又はIgG4サブクラスの)抗体である。さらに別の実施態様では、一方の抗体が好ましくはIgG2サブクラスであり、他方はIgG1又はIgG4サブクラスのものである。

【0057】

一実施態様において、本明細書に記載の抗体は、定常鎖がヒト起源であることを特徴とする。そのような定常鎖は、当該技術分野でよく知られており、例えばKabata, E. A.により記載されている(例えばJohnson, G.及びWu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218参照)。

【0058】

本明細書に記載の抗体は、好ましくは組み換え手段により生成される。そのような方法は当該技術分野において広く知られており、原核細胞及び真核細胞におけるタンパク質の発現、それに続く抗体ポリペプチドの単離、及び通常は薬学的に許容される純度への精製を含む。タンパク質発現について、軽鎖及び重鎖又はその断片をコードする核酸は、標準的な方法により発現ベクターに挿入される。発現は、適切な原核宿主細胞又は真核宿主細胞、例えばCHO細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、HEK293細胞、COS細胞、酵母、又は大腸菌細胞において実施され、抗体は、その細胞から(上清から又は細胞溶解後に)回収される。

【0059】

抗体の組み換え生成は、当該技術分野で周知であり、例えば総説Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880に記載がある。

【0060】

抗体は、細胞全体に、細胞溶解物に、又は部分的に精製された形態若しくは実質的に純粋な形態で存在しうる。精製は、他の細胞成分又は他の夾雑物、例えば他の細胞核酸又はタンパク質を、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、アガロースゲル電気泳動、及び当該技術分野で周知のその他の技術を含む標準的な技術により除去するために実施される。Ausubel, F., et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)参照。

【0061】

NS0細胞における発現は、例えばBarnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270に記載されている。一過性発現は、例えばDurocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9に記

10

20

30

40

50

載されている。可変ドメインのクローニングは、Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87に記載されている。好ましい一過性発現系 (HEK 293) は、Schlaeger, E.-J. 及び Christensen, K., Cytotechnology 30 (1999) 71-83、並びに Schlaeger, E.-J., J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199に記載されている。

【0062】

本発明の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、発現ベクターコンストラクトが形成されるように、プロモーター配列、翻訳開始配列、定常領域配列、3'非翻訳領域配列、ポリアデニル化配列及び転写終結配列と組み合わせたものである。重鎖発現コンストラクト及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、宿主細胞にコトランスフェクション、連続トランスフェクション又は別々のトランスフェクションを行い、次いでその宿主細胞を融合させて、両方の鎖を発現する単一の宿主細胞を形成することができる。

10

【0063】

原核生物に適切な制御配列は、例えばプロモーター、任意選択的にオペレーター配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、及びポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。

【0064】

核酸は、別の核酸配列と機能的関係に置かれる場合、その核酸は「作動可能に連結」されている。例えば、プレ配列又は分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関するプレタンパク質として発現されるならば、ポリペプチドのDNAに作動可能に連結されており；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作動可能に連結されており；又はリボソーム結合部位は、翻訳を容易にするように配置されているならば、コード配列に作動可能に連結されている。通常、「作動可能に連結」とは、連結されるDNA配列が連続しており、分泌リーダーの場合には、連続していても、かつリーディングフレームにあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは必ずしも連続している必要はない。連結は、簡便な制限部位におけるライゲーションによって達成される。そのような部位が存在しない場合は、慣行に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーが使用される。

20

30

【0065】

モノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーといった一般的な免疫グロブリン精製手順により、培地から適切に分離される。モノクローナル抗体をコードするDNA及びRNAは、一般的な手順を使用し、容易に単離及び配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、そのようなDNA及びRNAの供給源としての機能を果たし得る。単離したら、DNAを発現ベクター内に挿入し、次いでこれらの発現ベクターを、そうしなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞、例えばHEK293細胞、CHO細胞又は骨髓腫細胞内にトランスフェクトし、宿主細胞において組換えモノクローナル抗体の合成を得る。

40

【0066】

本明細書で使用される場合、「細胞」、「細胞株」、及び「細胞培養物」という表現は互換的に用いられ、すべてのそのような名称は子孫を含む。したがって、「形質転換体」及び「形質転換細胞」という語は、初代の対象細胞と、導入回数に関係なく、これに由来する培養物とを含む。また、すべての子孫が、計画的な又は意図しない突然変異の影響で、DNA量において正確に同一であるわけではない。元々の形質転換細胞においてスクリーニングしたものと同一機能又は生物活性を有する変異体子孫が含まれる。

【0067】

本発明に従って使用される特異的抗体を製造する方法は、国際公開第2003/040170号(抗CD40抗体について)及び国際公開第2010/77634号(PD-L

50

1抗体について)においても開示されている。

【0068】

別の態様において、本発明は、組成物、例えば薬学的に許容される担体と共に製剤化された、本発明のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合部分のうちの一つ又はそれらの組み合わせを含有する薬学的組成物を提供する。

【0069】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合する、あらゆるすべての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤、並びに吸収/再吸収遅延剤等を含む。好ましくは、担体は、注射又は注入に適している。

【0070】

本発明の組成物は、当該技術分野において知られている多様な方法により投与され得る。当業者により認識されているように、投与経路及び/又は投与様式は、所望の結果に応じて変化するものである。

【0071】

薬学的に許容される担体は、滅菌水溶液又は分散液、及び滅菌注射溶液若しくは分散液の調製用の滅菌粉末を含む。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体及び薬剤の使用は、当該技術分野で知られている。水の他に、担体は、例えば等張緩衝生理食塩水とすることができる。

【0072】

選択された投与経路に関わらず、適切な水和形態で使用され得る本発明の化合物及び/又は本発明の薬学的組成物は、当業者に知られている一般的な方法により薬学的に許容される剤形に製剤化される。

【0073】

本発明に従って使用される特異的抗体の薬学的組成物は、当業者に既知の標準的な調製物であってよく、例えば国際公開第2003/040170号(抗CD40抗体について)及び国際公開第2010/77634号(PD-L1抗体について)において開示されている。

【0074】

本発明の薬学的組成物中の有効成分の実際の用量レベルは、患者に対して毒性でなく(有効量)、特定の患者、組成物、及び投与様式に関して所望の治療的応答を達成するために効果的な有効成分の量を得るために、多様であってよい。選択された用量レベルは、使用される本発明の特定の組成物又はそのエステル、塩若しくはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用される特定の化合物の排泄速度、使用される特定の組成物と併用で用いられる他の薬物、化合物、及び/又は物質、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全身健康状態、及び既往歴、並びに医学の技術分野において周知である同様の要因を含む多様な薬物動態因子に依存するであろう。

【0075】

用語「治療方法」又はこれと同義の用語は、例えばがんに適用される場合、患者におけるがん細胞の数を減少若しくは消滅させるように、又はがんの症状を緩和するように設計された手順又は一連の行為を指す。がん又は他の増殖性疾患の「治療方法」は、がん細胞若しくは他の疾患が実際に取り除かれること、細胞の数若しくは疾患が実際に低減されること、又はがん若しくは他の疾患の症状が実際に緩和されることを必ずしも意味しない。がんを治療する方法はしばしば、成功の可能性が低くても実施されるが、患者の病歴及び推定余命を考慮すると、それでも全体的に有利な作用過程を誘導するとみなされている。

【0076】

用語「との併用で投与される」又は「共投与」、「共投与すること」、「併用療法」又は「併用治療」は、例えば複数の別々の処方/適用としての(又は単一の処方/適用としての)、本明細書に記載の抗CD40抗体及び抗PD-L1抗体の投与を指す。共投与は、同時であっても又は任意の順序で逐次的であってもよいが、両方(又はすべて)の活性剤がそれらの生物活性を同時に発揮する期間があることが好ましい。一実施態様では、本

10

20

30

40

50

明細書で使用される成分 A 及び B のいずれも、静脈内経路 (i . v .) を使用して、例えば連続注入で、又は皮下経路 (s . c .) を介して投与することができる。一実施態様において、成分 A 及び B は、 i . v . 経路 / 調製物により別々に共投与される。別の実施態様において、成分 A 及び B は、 s . c . 経路 / 調製物により別々に共投与される。さらに別の実施態様において、成分 A 及び B は、一つは s . c . 経路 / 調製物により、又他方は、 i . v . 経路 / 調製物により別々に共投与される。

【 0 0 7 7 】

それぞれの化合物の量又は併用量が研究者、獣医、医師又は他の臨床家が求める組織、系、動物又はヒトの生物学的又は医学的奏功を引き出す量である「治療的有效量」(又は単に「有効量」)で抗体が患者に投与されることは、自明である。

10

【 0 0 7 8 】

共投与における各成分の投薬量及び共投与のタイミングは、治療される患者のタイプ(人種、性別、年齢、体重等)及び状態、並びに治療される疾患又は状態の重篤度に依存するであろう。特に、免疫系の活性化に基づく治療は一般に、時にはサイトカイン放出症候群 (C R S) 又は抗薬物抗体 (A D A) 応答と呼ばれる、圧倒的な免疫応答のリスクを負う可能性がある。 C D 4 0 アゴニストを伴う、治療的で臨床的に適切な治療レジメン、すなわち許容可能で有効な用量及び投薬スケジュールを見出すことが、現在満たされていない医学的必要性となる。

【 0 0 7 9 】

したがって、一実施態様において、成分 (A 及び B) は逐次的に共投与され、各単一成分の用量は 2 回の別々の投与 (i . v . 又は s . c .) で同じ日に投与されるか、又は成分の一方が 1 日目に投与され、第二の成分が 2 日目から 4 2 日目の間、又は 2 日目から 2 1 日目の間、又は 2 日目から 1 4 日目の間、又は 2 日目から 7 日目の間の任意の日に共投与される。別の実施態様において、第二の成分は、第一の成分の投与後 2 日目又は 7 日目又は 1 4 日目又は 2 1 日に共投与される。別の実施態様において、第二の成分は、第一の成分の投与後 2 日目又は 2 1 日に共投与される。

20

【 0 0 8 0 】

別の実施態様において、第一の投与成分は、成分 A、すなわち本明細書に記載の抗 C D 4 0 抗体である。この実施態様の範囲内で、成分 A は、 4 m g から 1 6 m g の間、好ましくは 4 m g 又は 8 m g 又は 1 6 m g の固定用量で投与される。

30

【 0 0 8 1 】

別の実施態様では、成分 A を 1 日目に 1 6 m g の用量で 1 回投与し、続いて成分 B を 4 2 日目に投与し、さらに成分 B を 3 週間毎又は 1 4 若しくは 7 日毎に維持投与する。

【 0 0 8 2 】

別の実施態様では、成分 A を 1 日目に 1 6 m g の用量で 1 回投与し、続いて成分 B を 2 1 日目に初回投与し、さらに成分 B を 3 週間毎又は 1 4 若しくは 7 日毎に維持投与する。

【 0 0 8 3 】

別の実施態様では、成分 A を 1 日目に 4 m g の用量で 1 回投与し、続いて成分 B を 2 1 日目に初回投与し、さらに成分 B を 3 週間毎又は 1 4 若しくは 7 日毎に維持投与する。

【 0 0 8 4 】

別の実施態様では、成分 A を 1 日目に 4 m g の用量で 1 回投与し、続いて成分 B を 1 4 日目に初回投与し、さらに成分 B を 3 週間毎又は 1 4 若しくは 7 日毎に維持投与する。

40

【 0 0 8 5 】

別の実施態様では、成分 A を 1 日目に 4 m g の用量で 1 回投与し、続いて成分 B を 7 日目に初回投与し、さらに成分 B を 3 週間毎又は 1 4 若しくは 7 日毎に維持投与する。

【 0 0 8 6 】

別の実施態様では、成分 A を 1 日目に 1 6 m g の用量で 1 回投与し、続いて成分 B を 1 4 日目に初回投与し、さらに成分 B を 3 週間毎又は 1 4 若しくは 7 日毎に維持投与する。

【 0 0 8 7 】

別の実施態様では、成分 A を 1 日目に 1 6 m g の用量で 1 回投与し、続いて成分 B を 7

50

日目に初回投与し、さらに成分 B を 3 週間毎又は 1 4 若しくは 7 日毎に維持投与する。

【 0 0 8 8 】

別の実施態様では、成分 B を 1 日目に投与し、続いて 2 日目に成分 A を 4 m g から 1 6 m g の間の固定用量で単回投与し、さらに続いて成分 B を 3 週間毎又は 1 4 若しくは 7 日毎に維持投与する。この実施態様の範囲内で、成分 A の固定用量は、4 m g、8 m g、1 4 m g、1 5 m g 又は 1 6 m g から好ましくは選択される。

【 0 0 8 9 】

さらに別の実施態様において、成分 B は、治療の 1 日目に投与され、その後 3 週間 (2 1 日) 毎にさらに投与され、また成分 A は、治療の 2 日目に投与され、その後それぞれ 6 週間 (4 2 日) 以内の間隔で 3 回追加投与される。この実施態様の範囲内で、成分 A は、4 m g から 1 6 m g の間、好ましくは 4 m g、8 m g、1 4 m g、1 5 m g 又は 1 6 m g の固定用量で投与される。

10

【 0 0 9 0 】

さらに別の実施態様において、成分 B は、治療の 1 日目に投与され、その後 3 週間 (2 1 日) 毎にさらに投与され、また成分 A は、治療の 2 日目に投与され、その後それぞれ 3 週間 (2 1 日) 以内の間隔で 3 回追加投与される。この実施態様の範囲内で、成分 A は、4 m g から 1 6 m g の間、好ましくは 4 m g、8 m g、1 4 m g、1 5 m g 又は 1 6 m g の固定用量で投与される。

【 0 0 9 1 】

投与 / 投薬スキームに関する上記すべての実施態様内では、成分 B (すなわち抗 P D - L 1 抗体) は 1 2 0 0 m g の固定用量で投与される。成分 B を用いる治療又は「維持投与」は、疾患の進行まで継続される。

20

【 0 0 9 2 】

さらに別の実施態様では、本発明は、抗 C D 4 0 抗体及び抗 P D - L 1 抗体を伴う併用療法のための、図 4 に示す任意の投与スケジュールを提供する。

【 0 0 9 3 】

したがって、一実施態様では、本発明は、成分 A) 及び B) が別々に投与される、本明細書において先に定義した成分 A 及び B を含む薬学的製品を提供する。

【 0 0 9 4 】

別の実施態様において、本発明は、成分 A 及び / 又は B が静脈内 (i . v) 又は皮下 (s . c) に投与される前記薬学的製品を提供する。

30

【 0 0 9 5 】

さらに別の実施態様において、本発明は、成分 A が 4 から 1 6 m g の間の固定用量で投与され、成分 B が 1 2 0 0 m g の固定用量で投与される前記薬学的製品を提供する。

【 0 0 9 6 】

さらに別の実施態様では、本発明は、成分 A 及び B の投与が 1 から 4 2 日、好ましくは 1 又は 7 又は 1 4 又は 2 1 又は 4 2 日離れている、前記薬学的製品を提供する。

【 0 0 9 7 】

さらに別の実施態様において、本発明は、成分 A が成分 B と共に 1 ~ 4 回投与され、次に疾患の進行まで成分 B のみで治療が継続される、前記薬学的製品を提供する。

40

【 0 0 9 8 】

別より具体的な実施態様において、本発明は、成分 A が配列番号 3 の V L 及び配列番号 4 の V H を含む抗体を有効成分として含む成分で、かつ成分 B が配列番号 8 の V L 及び配列番号 5 の V H を含む抗体を有効成分として含む成分である、上記投与スケジュールを提供する。

【 0 0 9 9 】

別の実施態様では、本発明は、がん、好ましくは固形腫瘍などの増殖性疾患の逐次併用又は同時併用治療のための医薬の製造のための、ヒト C D 4 0 に特異的に結合してそれを活性化する抗体又はその抗原結合部分及び P D - L 1 抗体の使用を提供する。

【 0 1 0 0 】

50

抗PD-L1抗体と併用の抗CD40抗体に加えて、化学療法剤又は放射線療法などの追加的な治療選択肢も想定することができる。

【0101】

一実施態様では、そのような追加の化学療法剤は、本明細書に記載の抗CD40抗体及び本明細書に記載の抗PD-L1抗体と共に投与することができ、限定されないが、メクロレタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン及びクロラムブシルなどのナイトロジェンマスタードを含むアルキル化剤を含む抗新生物剤；カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、セムスチン（メチル-CCNU）等のニトロソ尿素）；テモダール（Temodal）（TM）（テモゾロミド（temozolamide））、トリエチレンメラミン（TEM）、トリエチレン、チオホスホラミド（チオテパ）、ヘキサメチルメラミン（HMM、アルテレタミン）等のエチレンイミン/メチルメラミン；ブスルファンなどのアルキルスルホネート；ダカルバジン（DTIC）などのトリアジン；葉酸アナログ、例えばメトトレキサート及びトリメトレキサート、ピリミジンアナログ、例えば5-フルオロウラシル（5FU）、フルオロデオキシウリジン、ゲムシタピン、シトシンアラビノシド（AraC、シタラビン）、5-アザシチジン、2,2'-ジフルオロデオキシシチジン、プリンアナログ、例えば6-メルカプトプリン（6-mercaptopurine）、6-チオグアニン（thioguanine）、アザチオプリン、T-デオキシコホルマイシン（ペントスタチン）、エリトロヒドロキシニルアデニン（EHNA）、リン酸フルダラビン、及び2-クロロデオキシアデノシン（クラドリピン、2-CdA）を含む代謝拮抗薬；抗有糸分裂薬、例えばパクリタキセル、ビンブラスチン（VLB）、ピンクリスチン、及びビノレルピンを含むピンカアルカロイド、タキソテール、エストラムスチン、及びリン酸エストラムスチンを含む天然物；ピポドフィロトキシン、例えばエトポシド及びテニポシド；抗生物質、例えばアクチノマイシンD、ダウノマイシン（ルビドマイシン）、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、イダルビシン、プレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、マイトマイシンC、及びアクチノマイシン；酵素、例えばL-アスパラギナーゼ；生体応答修飾物質、例えばインターフェロン-アルファ、IL-2、G-CSF、及びGM-CSF；白金配位錯体、例えばオキサリプラチン、シスプラチン、及びカルボプラチン、アントラセンジオン、例えばミトキサントロン、置換尿素、例えばヒドロキシウレア、N-メチルヒドラジン（MIH）及びプロカルバジンを含むメチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、例えばミトタン（o, p-DDD）及びアミノグルテチミドを含む様々な薬剤；副腎皮質ステロイドアンタゴニスト、例えばプレドニゾンとその等価物、デキサメタゾン及びアミノグルテチミドを含むホルモン及びアンタゴニスト；ジェムザール（TM）（ゲムシタピン）、プロゲステロン、例えばカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、メドロキシプロゲステロンアセテート及び酢酸メゲストロール；エストロゲン、例えばジエチルスチルベストロール及びエチニルエストラジオール等価物；抗エストロゲン、例えばタモキシフェン；テストステロンプロピオナート及びフルオキシメステロン/等価物を含むアンドロゲン；抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ゴナドトロピン放出ホルモンアナログ及びロイプロリド；並びに非ステロイド性抗アンドロゲン、例えばフルタミドを含む。ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、脱メチル化剤（例えばビダーザ）及び転写抑制解除（ATRA）療法を含むがこれらに限定されないエピジェネティックなメカニズムを標的とする療法も、抗原結合タンパク質と組み合わせることができる。一実施態様では、化学療法剤は、タキサン（例えばパクリタキセル（タキソール））、ドセタキセル（タキソテール）、修飾されたパクリタキセル（例えばアブラキサン及びオパキシオ）、ドキシソルピシン、スニチニブ（スーテント）、ソラフェニブ（ネクサパール）、及び他の多種キナーゼ阻害剤、オキサリプラチン、シスプラチン及びカルボプラチン、エトポシド、ゲムシタピン、並びにビンブラスチンからなる群より選択される。一実施態様では、化学療法剤は、タキサン（例えばタキソール（パクリタキセル）、ドセタキセル（タキソテール）、修飾されたパクリタキセル（例えばアブラキサン及びオパキシオ））からなる群より選択される。一実施態様では、追加的

10

20

30

40

50

ラチンから選択される。一実施態様では、化学療法剤は、5 - フルオロウラシル、ロイコボリン、及びイリノテカン (F O L F I R I) である。一実施態様では、化学療法剤は、5 - フルオロウラシル及びオキサリプラチン (F O L F O X) である。

【 0 1 0 2 】

追加的薬学療法剤との併用療法の特定の例は、例えば、乳がんの治療のためのタキサン (例えばドセタキセル又はパクリタキセル) 又は修飾されたパクリタキセル (例えばアブラキサン又はオパキシオ)、ドキソルピシン)、カペシタピン及び / 又はベバシズマブ (アバスチン) を用いる療法 ; 卵巣がんのためのカルボプラチン、オキサリプラチン、シスプラチン、パクリタキセル、ドキソルピシン (又は修飾されたドキソルピシン (C a e l y x 又はドキシル)) , 又はトポテカン (ハイカムチン) を用いる療法 ; 腎臓がんの治療のための多種キナーゼ阻害剤、M K I、(スーテント、ネクサバル又は 7 0 6)、及び / 又はドキソルピシンを用いる療法 ; 扁平上皮癌の治療のためのオキサリプラチン、シスプラチン、及び / 又は放射線を用いる療法 ; 肺がんの治療のためのタキソール及び / 又はカルボプラチンを用いる療法を含む。

10

【 0 1 0 3 】

本発明は、有効量の本発明の抗 C D 4 0 抗体及び / 又は P D - L 1 抗体を薬学的に許容される担体と共に含む医薬の製造方法をさらに提供する。

【 0 1 0 4 】

本発明は、がん、好ましくは固形腫瘍などの増殖性疾患の逐次併用又は同時併用治療のための、A) ヒト C D 4 0 に特異的に結合してそれを活性化する抗体又はその抗原結合部分と B) P D - L 1 抗体とを含む薬学的製品を、当業者、例えば医師、腫瘍専門医又は他の医療従事者のための前記薬学的製品を医薬としてどのように使用するかの説明書とともに含むキットをさらに提供する。

20

【 0 1 0 5 】

さらに別の実施態様では、本発明による薬学的製品、すなわち本明細書に開示の成分 A 及び B を含む製品は、抗サイトカイン (サイトカイン阻害剤)、例えば抗 I L 6 (a - I L 6) 及び / 又は抗 T N F アルファ (a - T N F a、抗 T N F a) である第三の成分 (C) と共に投与することができる。前記サイトカイン阻害剤の追加は、上に開示の成分 A 及び B での治療の有効性を維持しながら、忍容性を改善することが分かった (実施例 2 参照)。

30

【 0 1 0 6 】

したがって、別の実施態様では、増殖性疾患、特にがんの逐次併用又は同時併用治療のための、A) ヒト C D 4 0 に特異的に結合してそれを活性化する抗体又はその抗原結合部分を有効成分として含む第一の成分と、B) 有効成分として P D - L 1 抗体を含む第二成分と、C) 有効成分としてサイトカイン阻害剤を含む第三の成分とを含む薬学的製品が提供される。

【 0 1 0 7 】

この実施態様の範囲内で、前記サイトカイン阻害剤は、T N F a を阻害する分子である。複数の T N F a 阻害剤、小分子、及び抗体が、ヒトにおける治療のために承認されている。したがって、適用可能な薬学的調製物、投与経路、及び用量に関する情報は、当業者に周知である。本発明による特定の態様において、T N F a 阻害剤は、抗体、好ましくは T N 3 - 1 9 . 1 2 と称される抗体のヒトアナログである。本発明に従って用いられ得る他の T N F アルファ阻害剤は、レミケード (登録商標) (インフリキシマブ)、エンブレル (登録商標) (エタネルセプト)、ヒュミラ (登録商標) (アダリムマブ)、シムジア (登録商標) (セルトリズマブペゴル)、及びシンボニー (ゴリムマブ) を含む。また、この実施態様の範囲内で、成分 C は、成分 A 及び B と同時に又は別々に投与することができる。本明細書に開示されている、成分 A 及び B の投与のための任意の投薬レジメンは、三重併用にも適用可能である。成分 C は、好ましくは成分 A 及び / 又は B と同時に、同じか又は異なる薬学的調製物に投与される。本明細書に開示の、成分 C と併せた成分 A 及び B のための任意の投薬レジメンは、本発明による別の実施態様を形成する。この実

40

50

施態様の範囲内で、成分Cは、成分A又はBも投与される場合、常に投与される。

【0108】

別の実施態様において、成分Cの投与は、成分A及びBの投与前に開始される。好ましくは、成分Cの投与を治療の1日目に開始し、成分A及びBについて上に定義した投与レジメンに従って、成分A及びBは、2日目から与えられる。

【0109】

別の実施態様において、成分Cは、好ましくは治療の1、2、3、及び4日目に投与され；成分Aは2日目に投与され；かつ成分Bは2日目に投与され、その後成分Bを単独で又は成分Cとの併用で毎週投与する。

【0110】

さらに別の実施態様において、成分Cは、好ましくは治療の1、2、3、及び4日目に投与され；成分Aは2日目に投与され；かつ成分Bは9日目に投与され、その後成分Bを単独で又は成分Cとの併用で毎週投与する。

【0111】

さらに別の実施態様において、成分Cは、好ましくは治療の1、2、3、及び4日目に投与され；成分Aは2日目に投与され；かつ成分Bは16日目に投与され、その後成分Bを単独で又は成分Cとの併用で毎週投与する。

【0112】

以下の実施例は、本発明の理解を助けるために提示されるが、本発明の真の範囲は添付の特許請求の範囲に記載されている。本発明の精神から逸脱することなく、記載された手順で改変がなされ得る。

【実施例】

【0113】

実施例1

本実施例は、同所性Panc02-Fluc膵臓同系がんモデルにおける抗PD-L1と併用での抗マウスCD40の治療効果を実証する。本試験において、腫瘍増殖は、生物発光イメージングで週に2回評価される。

実験スケジュール：

10

20

試験日	実験手順
0	P a n c 0 2 - F l u c 採取、注射液調製
0	P a n c 0 2 臍内注射
2	2 日目撮像
7	1 回目の抗体調製
7	1 回目の抗体注射
7	7 日目撮像
8	2 4 時間放血
9	9 日目撮像
10	I m m u n o - P D の 1 0 日目スカウト画像撮影
11	1 1 日目撮像
14	第 2 の抗体を調製
14	第 2 の抗体を注射
15	1 5 日目撮像
18	1 8 日目撮像
21	第 3 の抗体を調製
21	第 3 の抗体を注射
22	2 2 日目撮像
25	2 5 日目撮像
25 ~	組織学的検査
25 ~	モニタリング / 剖検

10

20

試験群

群	動物の数	P a n c 0 2 - F l u c 注射 0. 2 x 1 0 ⁵	化合物	用量 (μg)	投与経路	治療回数
1	15	y e s	ビヒクル	-		3
2	15	y e s	抗マウスCD 40+ 抗PDL1	10mg /kg + 10 mg/kg	抗体静注	1 + PD-L1のみ2
3	15	y e s	抗PDL1	10mg /kg	抗体静注	3
4	15	y e s	抗マウスCD 40	10mg /kg	抗体静注	1

30

40

各群の動物は、終了基準が満たされたら殺処分される。ビヒクル群の2匹のスカウト動物を使用して、治療開始時の腫瘍負荷を評価する。

50

【0114】

物質及び方法

細胞培養及び適用

PANC-02-Fluc細胞クローン(ヒト膵臓癌細胞)は、もともとATCC(アメリカンタイプカルチャーコレクション)から入手され、増殖後Roche-Glycart社内の細胞バンクに寄託された。Panc-02-Fluc細胞を、10%FCS(Sigma)及び1%Glutamax+500ug/mlハイグロマイシンを含有するRPMI培地で培養した。該細胞は、5%CO₂の水飽和雰囲気下37℃で培養した。麻酔したC57BL/6マウスの腹部の左脇腹に小切開を行った。腹腔壁を開き、膵臓を鉗子で慎重に分離した。細胞懸濁液10マイクロリットル(RPMI培地中0.2×10⁶細胞)を膵臓の尾部に注射した。5/0吸収性(resorbable)縫合糸を用いて腹腔壁及び皮膚創傷を閉じた。

10

【0115】

動物

実験開始時に週齢8~9のBlack 6メスマウス60匹(ドイツのCharles Riversより購入)を、専用のガイドライン(GV-Solas; Felasa; TierschG)に従って特定病原体不含条件下、毎日12時間/12時間の明暗サイクルで保持した。実験研究プロトコルが審査され、地方自治体により承認された(P2011-128)。動物は、到着後1週間、新しい環境への馴致及び観察のために保持された。継続的な健康モニタリングが定期的実施された。

20

【0116】

治療

試験0日目、RPMI中2×10⁵のPanc02-Fluc細胞をマウスの膵臓内に注射した(継代18は生存率95.9%)。7日目、マウスに静脈内注射した:ビヒクル(15匹)、10mg/kgのa-CD40(15匹)、10mg/kgのa-PD-L1、10mg/kgのa-CD40+10mg/kgのa-PD-L1。このスケジュールは、a-PD-L1及びビヒクルについて週1回、3週間であった。A-CD40は、7日目に1回のみ投与された。

【0117】

試験化合物(抗体)

30

化合物の詳細

化合物	ロットナンバー	製剤緩衝液	濃度 (mg/mL)
muIgG1CD40 FGK4.5 B6 (Box AD, 4)	sf W (3a)	20mM ヒスチジン、 140mM NaCl、 0.01%Tween- 20、pH6.0	2.1
muIgG1 GNE aPD-L1 DAPG (Box X, 13)	sf W (2a)	20mM ヒスチジン、14 0 mM NaCl、pH 6.0	2.29

40

抗体は4で保存した。

50

【0118】

全マウスに200 μ Lの適切な溶液をi.v.注射した。ピヒクル群のマウスにヒスチジン緩衝液を、治療群に抗体を注射した。適当量の抗体を得るために、抗体溶液を必要に応じてヒスチジン緩衝液で希釈した。マウスの最大治療回数は3回であった。

【0119】

抗体調製：

10 mg/kgは、200 μ g/マウスに等しい。

以下は、マウスあたりのコンストラクトに必要な量を計算したものである。

抗体	バッチ	濃度 (mg/ mL)	タンパク 質の量 (μ L)	ヒスチジン 緩衝液の量 (μ L)	総量 (μ L)
muIgG1 CD40 FGK4.5 B6 (Box A D, 4)	sf W (3a)	2.1	95.2	104.8	200
muIgG1 GNE aPD-L1 DAPG (Box X, 13)	sf W (2a)	2.29	87.3	112.7	200

【0120】

研究

モニタリング

動物は、臨床症状及び副作用の検出のために毎日制御された。動物の終了基準は、臨床病状、歩行障害、毛並の悪さであった。

【0121】

腫瘍マーカー分析のための血清抽出

腫瘍細胞注射の3日前、1回目の抗体治療の24時間後、及び殺処分の日に、全治療動物から血清試料を採取した。試料は-20で保存した。

【0122】

剖検

マウスは、終了基準に従って殺処分にした。後の組織病理学的分析(PFA、凍結)のために、全動物から脾臓及び肝臓腫瘍を採取した(PFA、凍結)。

【0123】

試料処理

脾臓腫瘍を切除し、直ちにホルマリン溶液に固定し、続いてパラフィン包埋(ドイツ、Leica Automatic Tissue Processor TP1020)およびマイクロトーム(micotome)(ドイツ、Leica RM2235 Rotary Microtome)4 μ m切片作製のために処理した。標準的なプロトコールを用いてヘマトキシリン染色及びエオシン染色を実施した。ラット抗マウスCD68(スイス、AbD Serotec)を用い、製造業者の指示に従って、マウス免疫細胞を検出した。

【0124】

生化学分析

ラット IgG-ELISA及びmEGFR IgG ELISA

1回目の抗体治療の24時間後(試験8日目)にマウスから採血し、血清のヒトIgG濃度を分析した。プロトコールに従って、CD20に対するモノクローナル抗体のためのELISA for Quantification(ドイツ、Roche Pharma Penzberg; TR-TNA5)を用いて血清中の治療抗体濃度を試験した。試薬のmAb<hfcy>IgG-Bi(M-R10Z8E9; Ch.02 GG)、mAb<CD20>rH-IgG(RO5072759)、mAb<hfcy>IgG-Dig(XOSU-Sux)(M-R10Z8E9; Ch.03)は、Roche PenzbergのJ. Schleypenの好意により提供された。血清試料は、段階希釈(1:2000; 1:20000; 1:200000)で分析した。吸収は、405nmの測定波長及び492nmの基準波長を使用して測定した(Molecular Devices、VersaMax可変波長マイクロプレートリーダー)。

10

【0125】

結果

同系同所性Panc02モデルにおいて、muFGK4.5と抗PD-L1抗体の併用は、ビヒクル及び抗PD-L1と比較して著しい腫瘍増殖阻害を示した。さらに、muFGK4.5と抗PD-L1抗体は組み合わせさせて、インビボでエフェクターT-細胞の増殖を相乗的に増強し、このモデルにおいて9匹中4匹のマウスの腫瘍の完全な消失につながった(図1及び2)。

【0126】

免疫薬力学(PD)分析は、muFGK4.5がマウスの脾臓及び血液ならびにリンパ節において活性化T細胞(CD4及びCD8)の数を約2倍増加させることを実証した。興味深いことに、muFGK4.5と抗PD-L1抗体との併用はさらに、治療開始の9日後にマウス脾臓における活性化T細胞の数を約6から7倍に増強した(図3)。

20

【0127】

実施例2

本実施例は、二の異なる抗サイトカインであるa-IL6及びa-TNFaを単独で又は共にa-PDL-1及びa-CD40と組み合わせた有効性を実証する。これらの抗体を用いてa-CD40注射後のサイトカイン放出を中和することからも、この情報は有用である。

【0128】

物質及び方法

30

細胞培養及び適用

PANC-02-Fluc細胞クローン(ヒト膵臓癌細胞)は、もともとATCC(アメリカンタイプカルチャーコレクション)から入手され、増殖後に自社の細胞バンクに寄託された。Panc-02-Fluc細胞を、10%FCS(Sigma)+1%glutamax+500uµg/mlハイグロマイシンを含有するRPMI培地で培養した。該細胞は、5%CO₂の水飽和雰囲気下37℃で培養した。

【0129】

麻酔したC57BL/6マウスの腹部の左脇腹に小切開を行った。腹腔壁を開き、膵臓を鉗子で慎重に分離した。細胞懸濁液10マイクロリットル(RPMI培地中0.2×10⁶細胞)を膵臓の尾部に注射した。5/0分解性縫合糸を用いて腹腔壁及び皮膚創傷を閉じた。

40

【0130】

動物

実験開始時に週齢8~9のC57BL/6メスマウス60匹(ドイツのCharles Riverより購入)を、専用のガイドライン(GV-Solas; Felasa; TierschG)に従って特定病原体不含条件下、毎日12時間/12時間の明暗サイクルで保持した。実験研究プロトコールが審査され、地方自治体により承認された(P2011-128)。動物は、到着後1週間、新しい環境への馴致及び観察のために保持された。その後、識別のため背中右側にトランスポンダをそれらの皮下に埋め込み、回復のためさらに1週間保持した。継続的な健康モニタリングが定期的実施された。

50

【0131】

治療

試験0日目、RPMI中 2×10^5 のPancO2-Fluc細胞をマウスの膵臓内に注射した(継代16は生存率90.5%)。

【0132】

6日目、7日目、8日目、及び9日目に、群あたり12匹のマウスに異なる化合物を腹腔内注射した。7日目、14日目、及び21日目に、群あたり10匹のマウスに異なる化合物をi.p.注射した(試験群参照)。

【0133】

試験化合物(抗体)

化合物の詳細

化合物	濃度 (mg/mL)	製剤緩衝液
muIgG1 CD40 FG K4.5 B6 (成分A)	3.62	20mM ヒスチジン、 140mM NaCl、 0.01% Tween 20、 pH6.0
PD-L1 6E11 muIgG1 (成分B)	27.1	20mM ヒスチジンアセ テート、240mM スク ロース、0.02% Twe en 20、pH5.5
PD-L1 6E11 muI gG1 (成分B)	14.9	20mM ヒスチジンアセ テート、240mM スク ロース、0.02% Twe en 20、pH5.5
MP5-20F3 (a-IL6) (成分C)	5.08	PBS、pH7
TN3-19.12 (a-TN Fa) (成分C)	4.62	PBS、pH7

200 μ Lの適切な溶液を全マウスに注射した。抗体はすべてi.p.注射された。ピヒクル群のマウスにヒスチジン緩衝液を、治療群に抗体を注射した。200 μ Lにつき適当量の抗体を得るために、抗体溶液を必要に応じてヒスチジン緩衝液で希釈した。マウスの最大治療回数は4回であった。

【0134】

研究

10

20

30

40

50

モニタリング

動物は、臨床症状、及び副作用の検出のために毎日制御された。動物の終了基準は、臨床病状、歩行障害、毛並の悪さであった。

【0135】

化合物分析のための血清抽出

血清試料を、治療動物の半数から2回目、5回目、及び6回目の抗体治療の1時間後に採取し、残りの半分からは2回目、5回目、及び6回目の抗体治療の24時間後に採取した。動物はすべて、殺処分当日に放血させた。試料は-20℃で保存した。

【0136】

剖検

マウスは、終了基準に従って殺処分にした。その後の組織病理学的分析のために、群あたり4匹のマウスから脾臓、肝臓、及び膵臓腫瘍を採取した(4%ホルムアルデヒド、急速冷凍)。

【0137】

試料処理

膵臓腫瘍、肝臓、及び脾臓を切除し、直ちに10%ホルマリン溶液に固定し、続いてパラフィン包埋(ドイツ、Leica Automatic Tissue Processor TP1020)及びマイクロトーム(ドイツ、Leica RM2235 Rotary Microtome)4µm切片作製のために処理した。標準的なプロトコールを用いてヘマトキシリン染色及びエオシン染色を実施した。ラット抗マウスCD68(スイス、AbD Serotec)を用い、製造業者の指示に従って、マウス免疫細胞を検出した。

【0138】

生化学分析

mCD40 IgG-ELISA及びmPD-L1 IgG ELISA

プロトコール(スイス、Roche-Glycart)に従って、抗CD40の定量のためのCD40/Fc Chimera(R&D、1215-CD-050)ELISAを用いて血清中の抗CD40濃度を調べた。試薬:捕捉タンパク質;6xHisタグBiotin(Abcam、ab27025)及びCD40/Fc Chimera(R&D、1215-CD-050)、検出抗体:抗マウスIgG(HRP)(Abcam、ab98808)を使用した。血清試料は、段階希釈(1:300、1:1500、1:7500)で分析した。吸収は、405nmの測定波長及び490nmの基準波長を使用して測定した(Molecular Devices、VersaMax可変波長マイクロプレートリーダー)。

【0139】

プロトコール(スイス、Roche-Glycart)に従って、抗PD-L1の定量のためのマウスPD-L1(R&D、1019-B7-100)ELISAを用いて血清中の抗PD-L1濃度を調べた。試薬:捕捉タンパク質;IgG-Fc Biotin(Abcam、ab98561)及びマウスB7-H1/PD-L1(R&D、1019-B7-100)、検出抗体:抗マウスIgG(HRP)(Abcam、ab98808)を使用した。血清試料は、段階希釈(1:2500、1:12500、1:62500)で分析した。吸収は、405nmの測定波長及び490nmの基準波長を使用して測定した(Molecular Devices、VersaMax可変波長マイクロプレートリーダー)。

【0140】

サイトカイン分析

サイトカインは、Luminexアッセイ(Bio-Plex Proマウスサイトカイン(cyokine)23プレックスアッセイ)により、製造者の指示に従って測定された。

【0141】

結果

第三の成分としての抗サイトカインの付加は、CD40アゴニストとPD-L1阻害剤(それぞれ成分A及びB)のダブルット単独と比較して体重減少が少ないことによって示される改善された忍容性をもたらす。特に、第三の成分(成分C)としての抗TNFアル

10

20

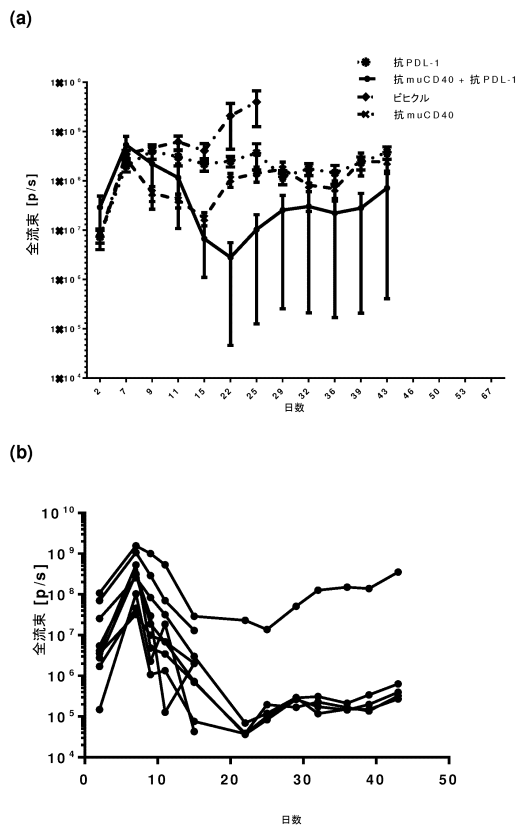
30

40

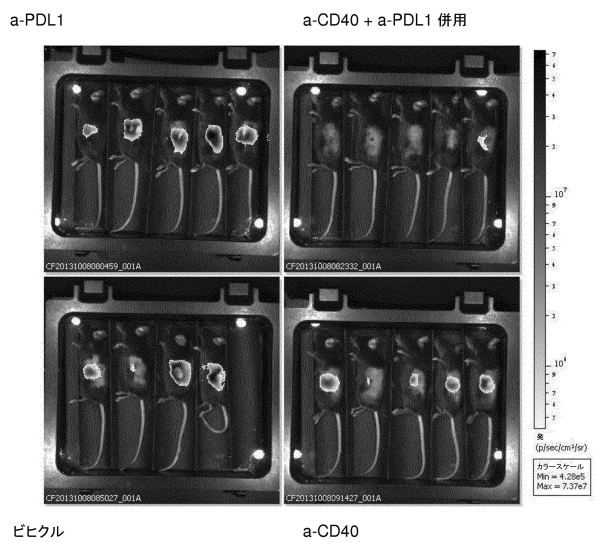
50

ファの付加は、例えば治療中の体重減少のモニタリングによって示される、改善された忍容性をもたらす（図5参照）。同時に、CD40/PD-L1併用の活性は、第三の成分の抗サイトカインと共に注射する場合に保持される（図6参照）。

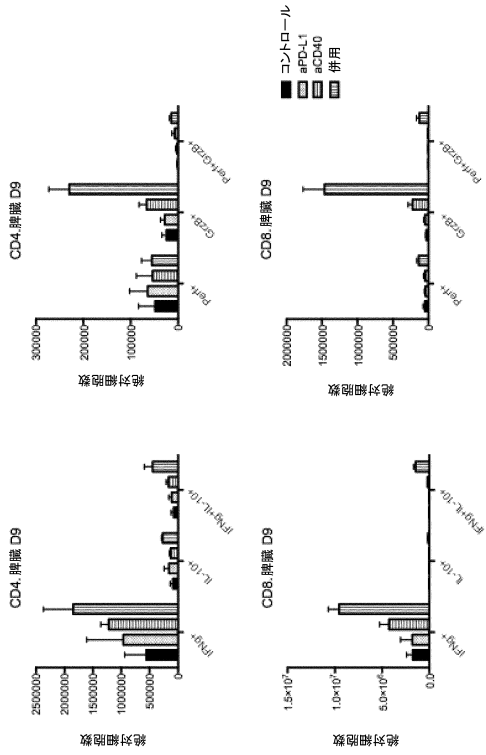
【図1】



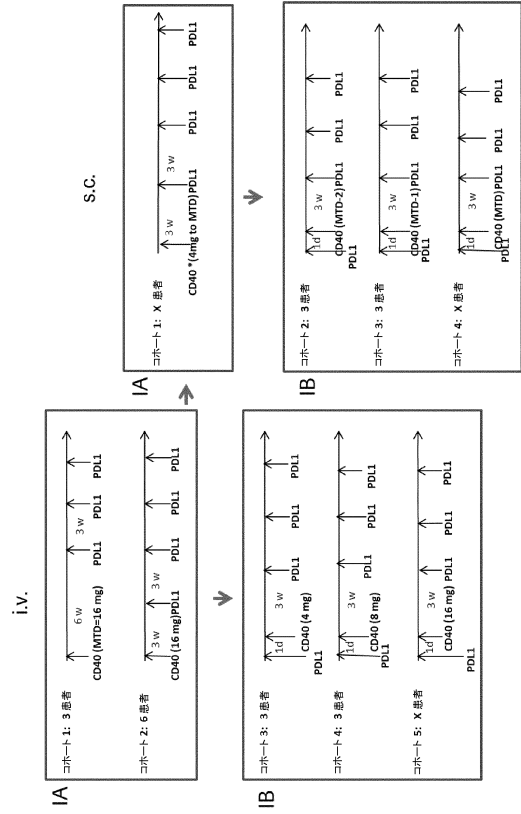
【図2】



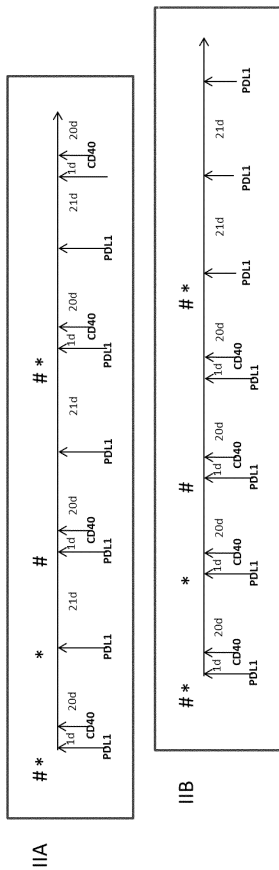
【 図 3 】



【 図 4 - 1 】



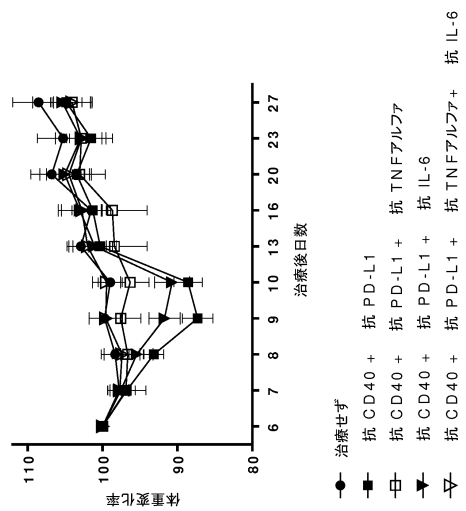
【 図 4 - 2 】



= 病期分類のための撮像

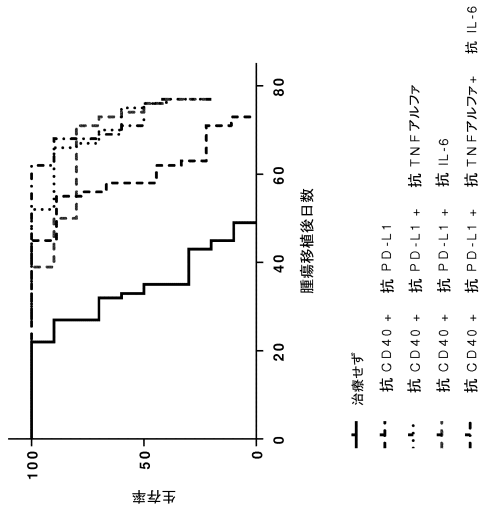
* = 生検

【 図 5 】



抗 IL-6

【図6】



【配列表】

0006586454000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 C 0 7 K 16/18 (2006.01) C 0 7 K 16/28
 C 0 7 K 16/18
- (72)発明者 ゲルデス, クリスティアン
 スイス国 ツェーハー - 8 7 0 3 エルレンバハ/ツェットハー, ザントフェルゼンシュトラ
 セ 4
- (72)発明者 ル クレック, マリン
 スイス国 ツェーハー - 8 0 0 3 チューリッヒ, ロータッハシュトラセ 1 4
- (72)発明者 レヴィツキー, ハイアム
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 1 7, オーウィングス ミルズ, ウォーターズブアウ
 ト コート 1 2 6 2 4
- (72)発明者 オット, マーリオン
 スイス国 ツェーハー - 4 0 5 2 バーゼル, アドラーシュトラセ 2 3
- (72)発明者 シュテルン, マルティン
 スイス国 ツェーハー - 8 1 0 2 オーベレンクシュトリンゲン, レーブベルグシュトラセ
 6 0
- (72)発明者 ウェイ, シュイ
 スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラセ 1 8

審査官 六笠 紀子

- (56)参考文献 特表2005-508176(JP,A)
 特表2012-511329(JP,A)
 特開2012-021001(JP,A)
 Cancer Immunol.Res., 2015年,3(3),p.236-244

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
 W P I
 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)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)