



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 19 945 T2** 2007.01.18

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 322 383 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 19 945.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/30963**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 977 428.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/028481**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.10.2001**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **11.04.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.07.2003**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **24.05.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.01.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**237556 P      02.10.2000      US**

(73) Patentinhaber:

**Chiron Corp., Emeryville, Calif., US**

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,  
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**CHU, Keting, Emeryville, CA 94622-8097, US;  
MASUOKA, Lorianne, Emeryville, CA 94622-8097,  
US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR THERAPIE VON B-ZELLMALIGNITÄTEN UNTER VERWENDUNG VON ANTAGONISTISCHEN ANTI-CD40-Antikörpern**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung ist auf eine Verwendung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Krankheit, die maligne B-Zellen umfasst, gerichtet. Die Erfindung verwendet antagonistische Anti-CD40-Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0002]** B-Zellen spielen eine bedeutende Rolle während der normalen Immunantwort in vivo. Ein fremdes Antigen wird an Oberflächen-Immunglobuline von spezifischen B-Zellen binden, was eine Kette von Ereignissen, einschließlich Endozytose, Prozessierung, Präsentation prozessierter Peptide auf MHC-Klasse II-Molekülen und Hinaufregulation des B7-Antigens auf der B-Zell-Oberfläche auslöst. Eine spezifische T-Zelle bindet dann via T-Zell-Rezeptor(TCR)-Erkennung des auf dem MHC-Klasse II-Molekül präsentierten, prozessierten Antigens an die B-Zelle. Stimulation durch die TCR aktiviert die T-Zellen und leitet T-Zell-Cytokinproduktion ein. Ein zweites Signal, das zudem die T-Zelle aktiviert, ist eine Wechselwirkung zwischen den CD28-Antigen auf T-Zellen und dem B7-Antigen auf B-Zellen. Wenn die oben genannten Signale empfangen werden, wird der CD40-Ligand, der auf ruhenden humanen T-Zellen nicht exprimiert wird, auf der T-Zell-Oberfläche hinaufreguliert. Bindung des CD40-Liganden an das CD40-Antigen auf der B-Zell-Oberfläche stimuliert die B-Zelle, was die B-Zelle veranlasst, zu einer Plasmazelle, die hohe Konzentrationen von löslichem Immunglobulin sekretiert, zu reifen.

**[0003]** CD40 ist ein Zelloberflächen-Antigen, das auf der Oberfläche von sowohl normalen, als auch neoplastischen humanen B-Zellen, dendritischen Zellen, monozytären und Epithelzellen, manchen Epithelkarzinomen und auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) vorhanden ist. CD40-Expression auf APCs spielt eine bedeutende Co-stimulatorische Rolle bei der Aktivierung sowohl von T-Helfer- als auch cytotoxischen T-Lymphozyten. CD40-Rezeptoren werden auch auf Eosinophilen, synovialen Membranen bei rheumatoider Arthritis, aktivierten Thrombozyten, entzündeten Gefäßendothelzellen, Hautfibroblasten und anderen nicht-lymphoiden Zelltypen gefunden. Der CD40-Rezeptor wird auf aktivierten T-Zellen, aktivierten Thrombozyten und entzündeten glatten Gefäßmuskulzellen exprimiert. CD40 wird auch bei niedrigen Levels auf Gefäßendothelzellen exprimiert und wird in Gebieten lokaler Entzündung hinaufreguliert.

**[0004]** Humanes CD40 ist ein Peptid von 277 Aminosäuren, das ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 30.600 hat, mit einem sekretorischen Signalpeptid von 19 Aminosäuren, das vorwiegend hydrophobe Aminosäuren umfasst. Der CD40-Rezeptor existiert in einem hochmodifizierten Glykoprotein-Zustand auf der Zelloberfläche und wandert in Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgelen als ein näherungsweise 50 kDa-Polypeptid.

**[0005]** Das CD40-Antigen ist bekannt dafür, mit dem humanen Nervenwachstumsfaktor (NGF)-Rezeptor, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-Rezeptor und Fas verwandt zu sein, was darauf hindeutet, dass CD40 ein Rezeptor für einen Liganden mit bedeutenden Funktionen bei der B-Zell-Aktivierung ist. Während der B-Zell-Differenzierung wird das Molekül zuerst auf Prä-B-Zellen exprimiert und verschwindet dann von der Zelloberfläche, wenn die B-Zelle eine Plasmazelle wird. Das CD40-Zelloberflächen-Antigen spielt eine bedeutende Rolle bei B-Zell-Proliferation und -Differenzierung.

**[0006]** Die Bindung seines Liganden (bezeichnet als CD40L oder CD154) an den CD40-Rezeptor stimuliert B-Zell-Proliferation und -Differenzierung, Antikörper-Produktion, Isotyp-Umschaltung und B-Zell-Gedächtnisbildung. Die humanen und murinen CD40L (CD40-Rezeptor)-Gene wurden kloniert (Spriggs et al. (1992) J. Exp. Med. 176:1543; Armitage et al. (1992) Nature 357:80; und US-Patent Nr. 6 264 951). Die Bindung ("engagement") von CD40-Rezeptoren durch den CD40-Liganden auf APCs, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, hinaufreguliert, Zelloberflächen-Expression von MHC Klasse II und CD80/86, und induziert die Sekretion proinflammatorischer Cytokine, wie IL-8, IL-12 und TNF, von denen alle die Wirksamkeit ("potency") der Antigen-Präsentierung an T-Zellen erhöhen.

**[0007]** Alle B-Zellen exprimieren allgemeine Zelloberflächenmarker, einschließlich CD40. Transformierte Zellen von Patienten mit langsam und schnell wachsenden bzw. niedrig- und hochmalignen B-Zell-Lymphomen ("low- and high-grade B-cell lymphomas"), akuter lymphoblastischer B-Zell-Leukämie, multiplen Myelomen, chronischer lymphozytischer Leukämie und Hodgkin-Krankheit exprimieren CD40. CD40-Expression wird auch bei Zweidritteln der Fälle akuter myeloblastischer Leukämie und 50% der Aids-bezogenen Lymphome de-

tektiert. Weiterhin exprimieren maligne B-Zellen aus etlichen Tumoren der B-Zell-Linie einen hohen Grad von CD40 und scheinen für Überleben und Proliferation von CD40-Signalisierung abzuhängen.

**[0008]** Zusätzlich entstehen immunoblastische B-Zell-Lymphome häufig bei immungeschwächten Individuen, wie Alлотransplantat-Empfängern und anderen, die langzeitige immunsuppressive Therapie erhalten, AIDS-Patienten und Patienten mit primären Immundefizienz-Syndromen, wie X-chromosomalem lymphoproliferativen Syndrom ("X-linked lymphoproliferative syndrome") oder Wiscott-Aldrich-Syndrom (Thomas et al. (1991) Adv. Cancer Res. 57:329; Straus et al. (1993) Ann. Intern. Med. 118:45). Diese Tumore scheinen als ein Ergebnis beeinträchtigter T-Zell-Kontrolle latenter Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion zu entstehen. Ähnliche Lymphome humanen Ursprungs können in Mäusen mit schweren kombinierten Immundefizienz-Syndromen (SCID) durch Inokulation peripherer Blut-Lymphozyten (PBL) von gesunden, EBV-positiven Individuen induziert werden (Mosier et al. (1988) Nature 335:256; Rowe et al. (1991) J. Exp. Med. 173:147).

**[0009]** Die Pathogenese geringgradiger B-Linien-Malignitäten, einschließlich Nicht-Hodgkin-Lymphom ("non-Hodgkin's lymphoma") und chronischer lymphozytischer Leukämie, wird stark durch das Ungleichgewicht des Wachstums/Überlebens-Signals bei CD40 und ein verkrüppeltes Todessignal bei Fas beeinflusst. Untersuchungen von geringgradigem Nicht-Hodgkin-Lymphom deuten darauf hin, dass die Krankheit das Ergebnis einer Akkumulation von lymphomatösen Zellen aufgrund der Verringerung Fas-vermittelter Apoptose und einer Erhöhung des Überlebens-Signals durch CD40 ist. CD40 stellt ein Überlebens-Signal für Lymphomzellen von Nicht-Hodgkin-B-Lymphom-Patienten bereit und stimuliert ihr Wachstum in vitro (Romano et al. (2000) Leuk. Lymphoma 36:255–262; Furman et al. (2000) J. Immunol. 164:2200–2206; Kitada et al. (1999) Br. J. Haematol. 106:995–1004; Romano et al. (1998) Blood 92:990–995; Jacob et al. (1998) Leuk. Res. 22:379–382; Wang et al. (1997) Br. J. Haematol. 97:409–417; Planken et al. (1996) Leukemia 10:488–493; und Greiner et al. (1997) Am J. Pathol. 150:1583–1593).

**[0010]** Näherungsweise 85% der Nicht-Hodgkin-Lymphome, eine breitgefächerte Gruppe von Malignitäten, haben B-Zell-Ursprung. Die Nicht-Hodgkin-Lymphome stammen von Bestandteilen der Milz, des Thymus und der Lymphknoten. Im Working Formulation-Klassifizierungsschema wurden diese Lymphome aufgrund ihrer Naturgeschichte in langsamwachsende, intermediär wachsende und schnellwachsende bzw. niedrigmaligne, intermediär maligne und hochmaligne Kategorien ("low-, intermediate- and high-grade categories") unterteilt (siehe "The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project", Cancer 49 (1982): 2112–2135). Die langsam wachsenden oder günstigen Lymphome sind indolent, mit einem medianen Überleben von 5 bis 10 Jahren (Horning und Rosenberg (1984) N. Engl. J. Med. 311:1471–1475). Obwohl Chemotherapie bei der Mehrheit indolenter Lymphome Remissionen induzieren kann, sind Heilungen selten, und die meisten Patienten erleiden letzten Endes einen Rückfall, was weitere Therapie erfordert. Die intermediären und schnellwachsenden Lymphome sind aggressivere Tumore, aber sie haben eine größere Heilungschance mit Chemotherapie. Dennoch werden signifikante Anzahlen dieser Patienten einen Rückfall erleiden und weitere Behandlung erfordern, um Remissionen zu induzieren.

**[0011]** Weiterhin können Patienten, die Chemotherapie durchlaufen, Toxizitäts-Effekte erleben. Deshalb besteht ein Bedarf nach neuen Therapien zum Behandeln von Krankheiten maligner B-Zellen.

**[0012]** EP-A-0 945 465 offenbart monoklonale Antikörper gegen humanes CD40, wobei die Bindung des Antikörpers oder des Fragments davon an das CD40-Antigen das Wachstum oder die Differenzierung der B-Zellen verhindert.

## ZUSAMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0013]** Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung eines humanen Anti-CD40-Antikörpers oder eines Antigen-bindenden Fragments davon bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Krankheit, die maligne B-Zellen umfasst, bereit, wobei der monoklonale Anti-CD40-Antikörper oder das Fragment davon frei von signifikanter Agonisten-Aktivität ist, wenn der Antikörper oder das Fragment davon ein CD40-Antigen an einer normalen humanen B-Zelle bindet, und wobei der Anti-CD40-Antikörper oder das Fragment davon Antagonistenaktivität aufweist, wenn der Antikörper oder das Fragment davon ein CD40-Antigen an einer malignen humanen B-Zelle bindet, wobei der humane monoklonale Anti-CD40-Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

- a) dem monoklonalen Antikörper, der durch die Hybridomzelllinie 15B8 produziert wird;
- b) einem monoklonalen Antikörper, der eine Aminosäuresequenz umfasst, die aus der Gruppe, die aus SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 4 besteht, ausgewählt ist;
- c) einem monoklonalen Antikörper, der eine Aminosäuresequenz hat, die durch ein Nucleinsäuremolekül

codiert wird, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3 besteht; und

d) einem monoklonalen Antikörper, wobei der monoklonale Antikörper ein Fragment eines monoklonalen Antikörpers, der in a), b) oder c) angeführt ist, ist und das Fragment die Fähigkeit, spezifisch an humanes CD40 zu binden, beibehält, wobei die Behandlung eine positive therapeutische Antwort bei dem Patienten fördert.

**[0014]** In einigen Ausführungsformen weist der Anti-CD40-Antikörper oder das Fragment davon auch Antagonistenaktivität auf, wenn er (es) an CD40-Antigen auf normalen humanen B-Zellen gebunden ist. Die monoklonalen Antikörper haben starke Affinität zu CD40 und sind durch eine Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von wenigstens  $10^{-5}$  M, bevorzugt wenigstens etwa  $10^{-8}$  M bis etwa  $10^{-20}$  M, stärker bevorzugt wenigstens etwa  $5 \times 10^{-9}$  bis etwa  $10^{-16}$  M, charakterisiert.

**[0015]** Die vorliegende Erfindung kann zum Behandeln eines Patienten mit einer Krankheit, die maligne B-Zellen umfasst, einschließlich Lymphomen, wie Nicht-Hodgkin-Lymphomen (schnell wachsende Lymphome, intermediär wachsende Lymphome und langsam wachsende Lymphome), Hodgkin-Krankheit, akute lymphoblastische Leukämien, Myelome, chronische lymphozytische Leukämien und myeloblastische Leukämien, verwendet werden.

**[0016]** Eine therapeutisch wirksame Dosis einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die geeignete Anti-CD40-Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon umfasst, kann einem Patienten verabreicht werden. Eine therapeutisch wirksame Dosis des Anti-CD40-Antikörpers oder des Fragments davon ist im Bereich von etwa 0,01 mg/kg bis etwa 40 mg/kg, von etwa 0,01 mg/kg bis etwa 30 mg/kg, von etwa 0,1 mg/kg bis etwa 30 mg/kg, von etwa 1 mg/kg bis etwa 30 mg/kg, von etwa 3 mg/kg bis etwa 30 mg/kg, von etwa 3 mg/kg bis etwa 25 mg/kg, von etwa 3 mg/kg bis etwa 20 mg/kg, von etwa 5 mg/kg bis etwa 15 mg/kg oder von etwa 7 mg/kg bis etwa 12 mg/kg. Es wird anerkannt, dass die Behandlung Verabreichung einer einzelnen therapeutisch wirksamen Dosis oder Verabreichung mehrerer therapeutisch wirksamer Dosen des Anti-CD40-Antikörpers oder des Antigen-bindenden Fragments davon umfassen kann.

**[0017]** Die Erfindung stellt auch ein in vitro-Verfahren des Inhibierens der Proliferation maligner Zellen der B-Zell-Linie bereit, wobei das Verfahren In-Kontakt-Bringen der malignen Zellen mit einer wirksamen Menge eines humanen monoklonalen Anti-CD40-Antikörpers oder einem Antigen-bindenden Fragment davon umfasst, wobei der Antikörper oder das Fragment davon frei von signifikanter Agonistenaktivität ist, wenn der Antikörper oder das Fragment davon ein CD40-Antigen an einer normalen humanen B-Zelle bindet, wodurch, wenn der Antikörper oder das Fragment davon an CD40-Antigen an den malignen Zellen bindet, die Proliferation der malignen Zellen inhibiert wird, wobei der humane monoklonale Anti-CD40-Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

- a) dem monoklonalen Antikörper, der durch die Hybridomzelllinie 15B8 produziert wird;
- b) einem monoklonalen Antikörper, der eine Aminosäuresequenz umfasst, die aus der Gruppe, die aus SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 4 besteht, ausgewählt ist;
- c) einem monoklonalen Antikörper, der eine Aminosäuresequenz hat, die durch ein Nucleinsäuremolekül codiert wird, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3 ausgewählt ist; und
- d) einem monoklonalen Antikörper, wobei der monoklonale Antikörper ein Fragment eines monoklonalen Antikörpers, der in a), b) oder c) angeführt ist, ist und das Fragment die Fähigkeit, spezifisch an humanes CD40 zu binden, beibehält.

#### KURZBESCHREIBUNG DER FIGUREN

**[0018]** **Fig. 1** stellt repräsentative Ergebnisse der Wirkung der Agonist- (MS81) und Antagonist-(15B8)-anti-CD40-Antikörper bei einer Konzentration von 1, 2 oder 5 µg/ml auf die Proliferation von Nicht-Hodgkin-Lymphom (NHL)-Zellen in vitro in Abwesenheit von Interleukin-4 (IL-4) dar. Maligne B-Zellen wurden von Tumor-infiltrierten Lymphknoten eines NHL-Patienten erhalten. FACS-Analyse der NHL-Zellen bestätigte, dass diese Zellen CD40 exprimierten und den Antagonist-anti-CD40-Antikörper 15B8 banden. Siehe Beispiel 3 unten bezüglich Details.

**[0019]** **Fig. 2** stellt repräsentative Ergebnisse der Wirkung der Agonist- (MS81) und Antagonist- (15B8)-anti-CD40-Antikörper bei Konzentrationen von 1, 2 oder 5 µg/ml auf die Proliferation von Nicht-Hodgkin-Lymphom (NHL)-Zellen in vitro in Gegenwart von IL-4 (2 ng/ml) dar. Maligne B-Zellen wurden von einem Tumor-infiltrierten Lymphknoten eines NHL-Patienten erhalten. FACS-Analyse der NHL-Zellen bestätigte, dass diese

Zellen CD40 exprimierten und den Antagonist-anti-CD40-Antikörper banden. Siehe Beispiel 3 unten bezüglich Details.

**[0020]** [Fig. 3](#) stellt repräsentative Ergebnisse der Wirkung der Agonist- (MS81) und Antagonist- (15B8)-anti-CD40-Antikörper bei Konzentrationen von 1, 2 oder 5 µg/ml auf CD40L-stimulierte Proliferation von NHL-Zellen in vitro in Abwesenheit von IL-4 dar. Die NHL-Zellen wurden von einem Rituximab-empfindlichen NHL-Patienten erhalten. Siehe Beispiel 4 unten für Details.

**[0021]** [Fig. 4](#) stellt eine repräsentative Dosis-Wirkungs-Kurve ("dose response curve") für den Antagonist-anti-CD40-Antikörper 15B8 auf Proliferation von NHL-Zellen, stimuliert in vitro durch CD40L und IL-4 (2 ng/ml) dar. Die NHL-Zellen wurden von einem Rituximabempfindlichen NHL-Patienten erhalten. Siehe Beispiel 4 unten für Details.

**[0022]** [Fig. 5](#) stellt Dosis-Wirkungs-Kurven für den Antagonist-anti-CD40-Antikörper 15B8 auf Proliferation von gereinigten humanen peripheren Blut-B-Zellen, stimuliert in vitro, in einem CD40L-exprimierenden CHO-Zell-vermittelten humanen B-Zell-Proliferationsassay dar. Die B-Zellen wurden von 3 gesunden Individuen erhalten. Siehe Beispiel 6 unten für Details.

**[0023]** [Fig. 6](#) stellt die Wirkung auf die Zellzahl peripherer B-Zellen in männlichen Schimpansen nach Verabreichung von 15B8 in Dosen von 0,03 oder 3 mg/kg dar. Jeder Dosierungsgrad ("dosage level") wurde 3 Schimpansen intravenös verabreicht, und die durchschnittliche Zellzahl peripherer B-Zellen (pro µl) wurde bestimmt (rechte Y-Achse). Die mittlere Konzentration von 15B8 im Serum (ng/ml) ist auf der linken Y-Achse dargestellt. Die Zeit, gemessen in Tagen relativ zu der IV-Verabreichung, ist auf der X-Achse gezeigt. Nach Verabreichung von 15B8 bei 3 mg/kg nahmen 15B8-Serumkonzentrationen in einem dreiphasigen Muster mit einer kurzen Verteilungsphase, einer log-linearen Eliminierungsphase und einer nicht-linearen Eliminierungsphase ab. Die Halbwertszeit während der log-linearen Eliminierungsphase war näherungsweise 4 Tage. Periphere B-Zell-Zahlen nahmen sofort nach 15B8-Verabreichung ab und erholten sich innerhalb von 3–4 Wochen. Siehe Beispiel 9 unten für Details.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

**[0024]** Die vorliegende Erfindung kann zum Behandeln humaner Patienten mit Krankheiten, die von malignen B-Zellen herrühren, verwendet werden. Dies beinhaltet Behandlung mit einem Anti-CD40-Antikörper oder einem Antigen-bindenden Fragment davon, wobei die Verabreichung des Antikörpers oder des Antigen-bindenden Fragments davon eine positive therapeutische Antwort in dem Patienten fördert, der sich diesem Therapieverfahren unterzieht. Zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Verfahren geeignete Anti-CD40-Antikörper haben die folgenden Eigenschaften: 1) sie binden spezifisch ein auf der Oberfläche einer humanen Zelle exprimiertes humanes CD40-Antigen; 2) sie sind frei von signifikanter Agonistenaktivität, wenn sie an ein CD40-Antigen auf einer normalen humanen B-Zelle gebunden sind; und 3) sie weisen Antagonistenaktivität auf, wenn sie an ein CD40-Antigen auf einer malignen humanen B-Zelle gebunden sind. Auf diese Anti-CD40-Antikörper und Antigen-bindenden Fragmente davon wird hierin als Antagonist-anti-CD40-Antikörper Bezug genommen. Solche Antikörper schließen den vollständig humanen monoklonalen Antikörper 15B8, nachstehend beschrieben, und monoklonale Antikörper, die die Bindungseigenschaften des monoklonalen Antikörpers 15B8 haben, ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Wie im Nachstehenden detaillierter diskutiert, sind diese Antikörper spezifisch für CD40-Rezeptoren. Wenn diese Antikörper CD40 binden, das auf der Oberfläche normaler humaner B-Zellen gezeigt wird, sind die Antikörper frei von signifikanter Agonistenaktivität; in einigen Ausführungsformen resultiert ihre Bindung an CD40, das auf der Oberfläche normaler humaner B-Zellen gezeigt wird, in der Inhibierung der Proliferation und Differenzierung dieser normalen humanen B-Zellen. Daher schließen die zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Verfahren geeigneten Antagonist-anti-CD40-Antikörper jene monoklonalen Antikörper ein, die Antagonistenaktivität gegen normale humane B-Zellen aufweisen können, die das Zelloberflächen-Antigen CD40 exprimieren. Wenn Antagonist-anti-CD40-Antikörper CD40 binden, das auf der Oberfläche maligner humaner B-Zellen gezeigt wird, weisen die Antikörper Antagonistenaktivität, wie an anderer Stelle hierin definiert, auf.

**[0025]** "Behandlung" ist hierin definiert als die Applikation oder Verabreichung eines Antagonist-anti-CD40-Antikörpers oder eines Antigen-bindenden Fragments davon bei/an einem/n Patienten, oder Applikation oder Verabreichung eines Antagonist-anti-CD40-Antikörpers oder eines Fragments davon auf/an ein isoliertes Gewebe oder eine Zelllinie von einem Patienten, wobei der Patient eine Krankheit, ein Symptom einer Krankheit oder eine Prädisposition für eine Krankheit hat, wobei der Zweck ist, die Krankheit, die Symptome der Krankheit oder die Prädisposition für die Krankheit zu kurieren, heilen, lindern, erleichtern, ändern, behe-

ben, bessern, verbessern oder zu beeinflussen. Durch "Behandlung" ist auch die Applikation oder Verabreichung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die die Antagonist-anti-CD40-Antikörper oder Fragmente davon umfasst, bei/an einem/einen Patienten oder Anwendung oder Verabreichung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die die Anti-CD40-Antikörper oder Fragmente davon umfasst, auf/an ein isoliertes Gewebe oder eine Zelllinie von einem Patienten, der eine Krankheit, ein Symptom einer Krankheit oder eine Prädisposition für eine Krankheit hat, wobei der Zweck ist, die Krankheit, die Symptome der Krankheit oder die Prädisposition für die Krankheit zu kurieren, heilen, lindern, erleichtern, ändern, abzuheilen, bessern, verbessern oder beeinflussen, gemeint.

**[0026]** Mit "Anti-Tumor-Aktivität" ist eine Verringerung der Rate maligner B-Zell-Proliferation oder -Akkumulation, und daher eine Abnahme der Wachstumsrate eines existierenden Tumors oder eines Tumors, der während einer Therapie entsteht, und/oder Zerstörung existierender neoplastischer (Tumor-) Zellen oder neugebildeter neoplastischer Zellen, und daher eine Verringerung der insgesamten Größe eines Tumors während einer Therapie gemeint. Eine Therapie mit wenigstens einem Anti-CD40-Antikörper (oder Antigen-bindendem Fragment davon) verursacht eine physiologische Antwort, die im Hinblick auf die Behandlung von Krankheitszuständen, die maligne B-Zellen bei einem Menschen umfassen, heilsam ist.

**[0027]** Der monoklonale Antikörper 15B8 stellt einen geeigneten Antagonist-anti-CD40-Antikörper zur Verwendung in den Verfahren der vorliegenden Erfindung dar. Der 15B8-Antikörper ist ein vollständig humaner monoklonaler Anti-CD40-Antikörper des IgG<sub>2</sub>-Isotyps, hergestellt aus der Hybridomzelllinie 15B8. Die Zelllinie wurde unter Verwendung von Splenozyten von einer immunisierten xenotypischen Maus, enthaltend einen humanen Immunglobulin-Genort, geschaffen (Abgenix). Die Milzzellen wurden mit den SP2/0-Maus-Myelomzellen (Sierra BioSource) verschmolzen. Die resultierenden Hybridome wurden mehrere Male subkloniert, um die stabile monoklonale Zelllinie 15B8 zu schaffen.

**[0028]** Die 15B8-Zelllinie wurde daran angepasst, in Protein-freiem Medium zu wachsen und wurde verwendet, um eine Master-Zellbank zu schaffen. Die Master-Zellbank wurde auf Identität und hinzukommende und endogenen Kontaminanten untersucht. Die Master-Zellbank wurde verwendet, um das gewünschte humane IgG<sub>2</sub> herzustellen. Der betreffende 15B8-Antikörper wurde unter Verwendung von Chromatographie und Filtrationsverfahren gereinigt.

**[0029]** Der Anti-CD40-Antikörper 15B8 ist ein Polypeptid, zusammengesetzt aus 1284 Aminosäureresten mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 149.755 mit zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten in einer heterodimeren Anordnung. Aminosäure-Analyse enthüllt, dass der Antikörper aus äquimolaren Mengen leichter und schwerer Ketten zusammengesetzt ist. Die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen für die variable Region für die leichte Kette sind in SEQ ID NO: 1 bzw. SEQ ID NO: 2 angegeben. Die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen für die variable Region für die schwere Kette sind in SEQ ID NO: 3 bzw. SEQ ID NO: 4 angegeben. Der monoklonale 15B8-Antikörper bindet lösliches CD40 in Assays vom ELISA-Typ. 15B8 wirkt als ein agonistischer Anti-CD40-Antikörper in Cynomologus-, Pavian- und Rhesusaffen, wenn in vitro auf Wirkungen auf Proliferation von B-Zellen zahlreicher Primaten getestet. In Assays mit Menschen, Schimpansen und Marmosetten ist 15B8 ein Antagonist-anti-CD40-Antikörper. Die Bindungsaffinität von 15B8 zu humanem CD40 ist  $3,1 \times 10^{-9}$  M, wie durch den Biacore<sup>TM</sup>-Assay bestimmt.

**[0030]** Geeignete Antagonist-anti-CD40-Antikörper zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung weisen eine starke Einzel-Stellen-Bindungsaffinität ("single-site binding affinity") für das CD40-Zelloberflächen-Antigen auf. Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper weisen eine Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) für CD40 von wenigstens  $10^{-5}$  M, wenigstens  $3 \times 10^{-5}$  M, bevorzugt wenigstens  $10^{-6}$  M bis  $10^{-7}$  M, bevorzugter wenigstens  $10^{-8}$  M bis etwa  $10^{-20}$  M, noch bevorzugter wenigstens  $5 \times 10^{-9}$  M bis etwa  $10^{-18}$  M, am bevorzugtesten wenigstens etwa  $5 \times 10^{-9}$  M bis etwa  $10^{-19}$  M, wie  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M,  $10^{-15}$  M,  $5 \times 10^{-16}$  M oder  $10^{-16}$  M, wie unter Verwendung eines Standard-Assays, wie Biacore<sup>TM</sup>, gemessen, auf. Biacore-Analyse ist im Fachgebiet bekannt, und Details werden im "BIAapplications Handbook" bereitgestellt.

**[0031]** Mit "CD40-Antigen" ist ein glykosyliertes Transmembran-Peptid oder ein beliebiges Fragment davon gemeint (GenBank-Eingangs-Nr. X60592; US-Patente Nrn. 5 674 492 und 4 708 871; Stamenkovic et al. (1989) EMBO 8:1403; Clark (1990) Tissue Antigens 36:33; Barclay et al. (1997) The Leucocyte Antigen Facts Book (2. Aufl.; Academic Press, San Diego)). Der CD40-Rezeptor wird auf der Oberfläche einer Vielfalt von Zelltypen gezeigt, wie andernorts hierin beschrieben. Mit "gezeigt auf der Oberfläche" und "exprimiert auf der Oberfläche" ist gemeint, dass all das oder ein Anteil des CD40-Antigens zur Außenseite der Zelle exponiert ist. Das gezeigte oder exprimierte CD40-Antigen kann vollständig oder teilweise glykosyliert sein.

**[0032]** Mit "Agonistenaktivität" ist gemeint, dass die Substanz als ein Agonist funktioniert. Ein Agonist kombiniert bzw. verbindet sich mit einem Rezeptor auf einer Zelle und leitet eine Reaktion oder eine Aktivität ein, die ähnlich oder die gleiche ist, wie die, die durch den natürlichen Liganden des Rezeptors eingeleitet wird. Ein Agonist von CD40 induziert eine beliebige oder alle von, aber nicht darauf beschränkt, der folgenden Antworten: B-Zell-Proliferation und – Differenzierung, Antikörper-Produktion, interzelluläre Adhäsion, B-Zell-Gedächtnisbildung, Isotyp-Umschaltung, Hinaufregulation der Zelloberflächen-Expression von MHC Klasse II und CD80/86 und Sekretion proinflammatorischer Cytokine, wie IL-8, IL-12 und TNF. Mit "Antagonistenaktivität" ist gemeint, dass die Substanz als ein Antagonist funktioniert. Ein Antagonist von CD40 verhindert oder reduziert die Induktion von beliebigen der durch Bindung des CD40-Rezeptors an einen Agonisten-Liganden, insbesondere CD40L, induzierten Antworten. Der Antagonist kann die Induktion einer beliebigen oder mehrerer der Antworten auf Agonisten-Bindung um 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, bevorzugt 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, besonders bevorzugt 70%, 80%, 85%, und am bevorzugtesten 90%, 95%, 99% oder 100%, reduzieren. Verfahren zum Messen von B-Zell-Antworten sind Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und schließen B-Zell-Proliferationsassays, Banchereau-ähnliche B-Zell-Proliferationsassays, T-Zell-Helfer-Assays ("T cell helper assay") für Antikörperproduktion, Co-Stimulation von B-Zell-Proliferationsassays und Assays für Hinaufregulation von B-Zell-Aktivierungsmarkern ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Mehrere dieser Assays werden an anderer Stelle hierin detaillierter diskutiert.

**[0033]** Mit "signifikante" Agonistenaktivität ist eine Agonistenaktivität von wenigstens 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% oder 100% größer als die Agonistenaktivität, die durch eine neutrale Substanz oder negative Kontrolle, wie gemessen in einem Assay einer B-Zell-Antwort, induziert wird, gemeint. Eine Substanz "frei von signifikanter Agonistenaktivität" würde eine Agonistenaktivität von nicht mehr als etwa 25% größer als die Agonistenaktivität, die durch eine neutrale Substanz oder negative Kontrolle induziert wird, bevorzugt nicht mehr als etwa 25% größer, 15% größer, 10% größer, 5% größer, 1% größer, 0,5% größer oder sogar nicht mehr als 0,1% größer als die Agonistenaktivität, die durch eine neutrale Substanz oder eine Negativkontrolle, wie gemessen in einem Assay einer B-Zell-Antwort, induziert wird, aufweisen. Die in der vorliegenden Erfindung verwendbaren Antagonist-anti-CD40-Antikörper sind frei von signifikanter Agonistenaktivität, wie im oben Stehenden festgesetzt, wenn sie an ein CD40-Antigen auf einer normalen humanen B-Zelle gebunden sind. In einer Ausführungsform der Erfindung ist der Antagonist-anti-CD40-Antikörper frei von signifikanter Agonistenaktivität in einer B-Zell-Antwort. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist der Antagonist-anti-CD40-Antikörper frei von signifikanter Agonistenaktivität in Assays von mehr als einer B-Zell-Antwort (z.B. Proliferation und Differenzierung, oder Proliferation, Differenzierung und Antikörper-Produktion).

**[0034]** Wie hierin verwendet, umfasst "Anti-CD40-Antikörper" jeden beliebigen Antikörper, der spezifisch das CD40-B-Zell-Oberflächen-Antigen erkennt, einschließlich polyklonaler Antikörper, monoklonaler Antikörper, Einzelketten-Antikörper und Fragmenten davon, wie Fab, F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>v</sub>, und andere Fragmente, die die Antigen-bindende Funktion des Eltern-anti-CD40-Antikörpers behalten. Polyklonale Seren können durch konventionelle Verfahren hergestellt werden. Im Allgemeinen wird zuerst eine das CD40-Antigen enthaltende Lösung verwendet, um ein geeignetes Tier, bevorzugt eine Maus, eine Ratte, ein Kaninchen oder eine Ziege, zu immunisieren. Kaninchen oder Ziegen werden für die Herstellung polyklonaler Seren aufgrund des Volumens an erhältlichem Serum und der Verfügbarkeit markierter Anti-Kaninchen- und Anti-Ziege-Antikörper bevorzugt. Polyklonale Seren können in einem transgenen Tier hergestellt werden, bevorzugt einer Maus, die humane Immunglobulin-Genorte ("immunoglobulin loci") trägt. In einer bevorzugten Ausführungsform werden Sf9-Zellen, die CD40 exprimieren, als das Immunogen verwendet. Immunisierung kann auch durch Mischen oder Emulgieren der Antigen-enthaltenden Lösung in Salzlösung, bevorzugt in einem Adjuvans, wie Freund's vollständigem Adjuvans, und parenteralem Injizieren der Mischung oder Emulsion (üblicherweise subkutan oder intramuskulär) ausgeführt werden. Eine Dosis von 50–200 µg/Injektion ist typischerweise ausreichend. Die Immunisierung wird üblicherweise 2–6 Wochen später mit einer oder mehreren Injektionen des Proteins in Salzlösung, bevorzugt unter Verwendung von Freund's unvollständigem Adjuvans, verstärkt bzw. aufgefrischt ("boosted"). Man kann alternativ Antikörper durch in vitro-Immunisierung unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Verfahren generieren, die für die Zwecke dieser Erfindung als zu in vivo-Immunisierung gleichwertig betrachtet wird. Polyklonale Antiseren werden durch Blutung der immunisierten Tiere in einen Glas- oder Kunststoffbehälter, Inkubieren des Blutes bei 25°C für eine Stunde, gefolgt von Inkubieren bei 4°C für 2–18 Stunden, erhalten. Das Serum wird durch Zentrifugation (z.B. 1.000 × g für 10 Minuten) gewonnen. Von Kaninchen können etwa 20–50 ml pro Blutung erhalten werden.

**[0035]** Mit "monoklonaler Antikörper" ist ein Antikörper gemeint, der aus einer Population substanziell homogener Antikörper erhalten wurde, d.h., die einzelnen Antikörper, die die Population umfassten, sind, abgesehen von möglichen natürlicherweise auftretenden Mutationen, die in geringen Mengen vorhanden sein können,



identisch. Monoklonale Antikörper sind hochspezifisch, wobei sie gegen einen einzelnen antigenen Bereich ("antigenic site"), d.h., das CD40-B-Zell-Oberflächen-Antigen in der vorliegenden Erfindung, gerichtet sind. Darüber hinaus, im Gegensatz zu konventionellen (polyklonalen) Antikörper-Zubereitungen, die typischerweise unterschiedliche Antikörper, die gegen unterschiedliche Determinanten (Epitope) gerichtet sind, einschließen, ist jeder monoklonale Antikörper gegen eine einzelne Determinante auf dem Antigen gerichtet. Das Beiwort "monoklonal" kennzeichnet den Charakter des Antikörpers als erhalten von einer substanziiell homogenen Population von Antikörpern und soll nicht so ausgelegt werden, als erforderte es Herstellung des Antikörpers durch ein beliebiges bestimmtes Verfahren. Z.B. können die in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung zu verwendenden monoklonalen Antikörper durch das zuerst durch Kohler et al. (1975) Nature 256:495, beschriebene Hybridom-Verfahren hergestellt werden oder können durch rekombinante DNA-Verfahren (siehe, z.B., US-Patent Nr. 4 816 567) hergestellt werden. Die "monoklonalen Antikörper" können auch aus Phagen-Antikörper-Bibliotheken unter Verwendung der in, z.B., Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; und US-Patent Nr. 5 514 548, beschriebenen Techniken isoliert werden.

**[0036]** Monoklonale Antikörper können unter Verwendung des Verfahrens von Kohler et al. (1975) Nature 256:495-496, oder einer Modifikation davon, hergestellt werden. Typischerweise wird eine Maus mit einer ein Antigen enthaltenden Lösung immunisiert. Die Immunisierung kann durch Mischen oder Emulgieren der Antigen-enthaltenden Lösung in Salzlösung, bevorzugt in einem Adjuvans, wie Freund's vollständigem Adjuvans, und parenteralem Injizieren der Mischung oder Emulsion durchgeführt werden. Alle im Fachgebiet bekannten Immunisierungsverfahren können verwendet werden, um die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper zu erhalten. Nach der Immunisierung des Tieres werden die Milz (und optional mehrere große Lymphknoten) entfernt und in Einzelzellen dissoziiert. Die Milzzellen können durch Aufbringen einer Zellsuspension auf eine Platte oder Kavität, die mit dem interessierenden Antigen beschichtet ist, gescreent werden. Die B-Zellen, die für das Antigen spezifisches Membrangebundenes Immunglobulin exprimieren, binden an die Platte und werden nicht fortgespült. Die resultierenden B-Zellen oder alle dissoziierten Milzzellen werden dann veranlasst, mit Myelomzellen zu verschmelzen, um Hybridome zu bilden, und werden dann in einem Selektivmedium kultiviert. Die resultierenden Zellen werden durch serielle Verdünnung ausplattiert und werden auf die Produktion von Antikörpern, die das interessierende Antigen spezifisch binden (und die nicht an unverwandte Antigene binden) getestet. Die ausgewählten monoklonale Antikörper (mAb)-sekretierenden Hybridome werden dann entweder in vitro (z.B. in Zellkulturflaschen oder Hohlfaserreaktoren) oder in vivo (als Aszites in Mäusen) kultiviert.

**[0037]** Zu der Verwendung von Hybridomen kann Antikörper in einer Zelllinie, wie einer CHO-Zelllinie, wie in US-Patent Nrn. 5 545 403, 5 545 405 und 5 998 144 offenbart, produziert werden. Kurz gesagt wird die Zelllinie mit Vektoren transfiziert, die in der Lage sind, eine leichte bzw. eine schwere Kette zu exprimieren. Durch Transfizieren der beiden Proteine auf getrennte Vektoren können chimäre Antikörper produziert werden. Ein weiterer Vorteil ist die korrekte Glykosylierung des Antikörpers.

**[0038]** Monoklonale Antikörper gegen CD40 sind im Fachgebiet bekannt. Siehe, z.B., die dem B-Zell-Antigen gewidmeten Abschnitte in McMichael, Hrsg. (1987; 1989) Leukocyte Typing III und IV (Oxford University Press, New York); US-Patent Nrn. 5 674 492, 5 874 082, 5 677 165, 6 056 959, WO 00/63395; Gordon et al. (1988) J. Immunol. 140:1425; Valle et al. (1989) Eur. J. Immunol. 19:1463; Clark et al. (1986) PNAS 83:4494; Paulie et al. (1989) J. Immunol. 142:590; Gordon et al. (1987) Eur. J. Immunol. 17:1535; Jabara et al. (1990) J. Exp. Med. 172:1861; Zang et al. (1991) J. Immunol. 146:1836; Gascan et al. (1991) J. Immunol. 147:8; Banchereau et al. (1991) Clin. Immunol. Spectrum 3:8; und Banchereau et al. (1991) Science 251:70.

**[0039]** Zusätzlich umfasst der Begriff "Anti-CD40-Antikörper", wie hierin verwendet, chimäre Anti-CD40-Antikörper. Mit "chimäre" Antikörper sind Antikörper gemeint, die bevorzugt unter Verwendung rekombinanter Desoxyribonucleinsäure-Techniken abgeleitet sind und die sowohl humane (einschließlich immunologisch "verwandter" Arten, z.B. Schimpansen) und nicht-humane Bestandteile umfassen. Deshalb ist die konstante Region des chimären Antikörpers am bevorzugtesten substanziiell identisch zu der konstanten Region eines natürlichen humanen Antikörpers; die variable Region des chimären Antikörpers ist am bevorzugtesten abgeleitet von einer nicht-humanen Quelle und hat die gewünschte antigene Spezifität zu dem CD40-Zell-Oberflächen-Antigen. Die nicht-humane Quelle kann eine beliebige Wirbeltier-Quelle sein, die verwendet werden kann, um Antikörper gegen ein humanes CD40-Zell-Oberflächen-Antigen oder Material, das ein humanes CD40-Zell-Oberflächenantigen umfasst, zu generieren. Solche nicht-humanen Quellen schließen Nager (z.B. Kaninchen, Ratte, Maus etc.; siehe, z.B., US-Patent Nr. 4 816 567) und nicht-humane Primaten (z.B. Altwelt-Affe, Menschenaffe ("ape") etc.; siehe, z.B., US-Patent Nrn. 5 750 105 und 5 756 096) ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Wie hierin verwendet, meint der Ausdruck "immunologisch aktiv" einen chimären Antikörper, der humanes CD40 bindet, wenn in Bezug auf chimäre Anti-CD40-Antikörper verwendet.



**[0040]** Humanisierte Anti-CD40-Antikörper werden auch durch den Begriff Anti-CD40-Antikörper, wie hierin verwendet, umfasst. Mit "humanisiert" sind Formen von Anti-CD40-Antikörpern gemeint, die Minimalsequenzen enthalten, die von nicht-humanen Immunglobulin-Sequenzen abgeleitet sind. Humanisierte Antikörper sind zum größten Teil humane Immunglobuline (Empfänger-Antikörper), in denen Reste aus einer hypervariablen Region (auch bekannt als Komplementarität-bestimmende Region ("complementarity determining region") oder CDR) des Empfängers ersetzt sind durch Reste aus einer hypervariablen Region einer nicht-humanen Art (Spender-Antikörper), wie Maus, Ratte, Kaninchen oder nicht-humane Primaten, die die gewünschte Spezifität, Affinität und Kapazität haben. Die Humanisierung kann grundsätzlich nach dem Verfahren von Winter und Mitarbeitern (Jones et al. (1986) Nature 321:522–525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323–327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534–1536) durch Substituieren von Nager- oder Mutanten-Nager-CDRs oder CDR-Sequenzen durch die entsprechenden bzw. korrespondierenden Sequenzen eines humanen Antikörpers durchgeführt werden. Siehe auch US-Patent Nrn. 5 225 539, 5 585 089, 5 693 761, 5 693 762, 5 859 205. In manchen Fällen werden Reste innerhalb der Gerüstregion einer oder mehrerer variabler Regionen des humanen Immunglobulins durch entsprechende nicht-humane Reste ersetzt (siehe, z.B., US-Patent Nrn. 5 585 089, 5 693 761, 5 693 762 und 6 180 370). Weiterhin können humanisierte Antikörper Reste umfassen, die nicht im Empfänger-Antikörper oder im Spender-Antikörper gefunden werden. Diese Modifikationen werden gemacht, um die Antikörper-Leistung (z.B., um gewünschte Affinität zu erhalten) weiter zu verfeinern. Im Allgemeinen wird der humanisierte Antikörper substanziell bzw. im Wesentlichen alles von wenigstens einer, und typischerweise zwei variablen Domänen umfassen, in denen alle oder im Wesentlichen alle der hypervariablen Regionen jenen eines nicht-humanen Immunglobulins entsprechen und alle oder im Wesentlichen alle der Gerüstregionen jene einer humanen Immunglobulin-Sequenz sind. Der humanisierte Antikörper wird wahlweise auch wenigstens einen Anteil einer konstanten Region eines Immunglobulins (Fc), typischerweise die eines humanen Immunglobulins, umfassen. Für weitere Details siehe Jones et al. (1986) Nature 331:522–525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323–329; und Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593–596. Dementsprechend können solche "humanisierten" Antikörper Antikörper einschließen, worin im Wesentlichen weniger als eine intakte humane variable Domäne durch die entsprechende Sequenz aus einer nicht-humanen Art ersetzt wurde. In der Praxis sind humanisierte Antikörper typischerweise humane Antikörper, in denen einige CDR-Reste und möglicherweise einige Gerüstregion-Reste durch Reste aus analogen Orten in Nager-Antikörpern ersetzt sind. Siehe, z.B., US-Patent Nrn. 5 225 539, 5 585 089, 5 693 761, 5 693 762, 5 859 205. Siehe auch US-Patent Nr. 6 180 370 und internationale Veröffentlichung Nr. WO 01/27160, wo humanisierte Antikörper und Techniken zum Produzieren humanisierter Antikörper, die verbesserte Affinität für ein vorherbestimmtes Antigen haben, offenbart werden.

**[0041]** Durch den Begriff Anti-CD40-Antikörper sind auch Xenogene bzw. artfremde oder modifizierte Anti-CD40-Antikörper, die in einem nicht-humanen Säuger-Wirt, insbesondere einer transgenen Maus, hergestellt werden, die durch inaktivierte endogene Immunglobulin (Ig)-Loci charakterisiert sind, umfasst. In solchen transgenen Tieren werden kompetente endogene Gene für die Expression von leichten und schweren Untereinheiten des Wirt-Immunglobulins nicht-funktionell gemacht und durch die analogen humanen Immunglobulin-Loci ersetzt. Diese transgenen Tiere produzieren humane Antikörper in der substantiellen Abwesenheit leichter oder schwerer Wirt-Immunglobulin-Untereinheiten. Siehe, z.B., US-Patent Nrn. 5 877 397 und 5 939 598.

**[0042]** Fragmente der Anti-CD40-Antikörper sind für die Verwendung in den erfindungsgemäßen Verfahren geeignet, solange sie die gewünschte Affinität des Volllängen-Antikörpers beibehalten. Somit wird ein Fragment eines Anti-CD40-Antikörpers die Fähigkeit, an das CD40-B-Zell-Oberflächen-Antigen zu binden, beibehalten. Solche Fragmente sind charakterisiert durch Eigenschaften, die zu denen des entsprechenden Volllängen-Antagonist-anti-CD40-Antikörpers ähnlich sind, d.h., die Fragmente werden 1) spezifisch ein auf der Oberfläche einer humanen Zelle exprimiertes humanes CD40-Antigen binden; 2) sind frei von signifikanter Agonistenaktivität, wenn sie an ein CD40-Antigen auf einer normalen humanen B-Zelle gebunden sind; und 3) weisen Antagonistenaktivität auf, wenn sie an ein CD40-Antigen auf einer malignen humanen B-Zelle gebunden sind. Wo der Volllängen-Antagonist-anti-CD40-Antikörper Antagonistenaktivität aufweist, wenn er an das CD40-Antigen auf der Oberfläche einer normalen humanen B-Zelle gebunden ist, wird das Fragment auch solche Antagonistenaktivität aufweisen. Auf solche Fragmente wird hierin als "Antigen-bindende" Fragmente Bezug genommen.

**[0043]** Geeignete Antigen-bindende Fragmente eines Antikörpers umfassen einen Anteil eines Volllängen-Antikörpers, im Allgemeinen die Antigen-bindende oder variable Region davon. Beispiele von Antikörper-Fragmenten schließen Fab-, F(ab')<sub>2</sub>- und Fv-Fragmente und Einzelketten-Antikörpermoleküle ein, ohne darauf beschränkt zu sein. Mit "Einzelketten-Fv"- oder "sFv"-Antikörper-Fragmente sind Fragmente gemeint, die die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen eines Antikörpers umfassen, wobei diese Domänen in einer einzelnen Polypep-

tid-Kette vorhanden sind. Siehe, z.B., US-Patent Nrn. 4 946 778, 5 260 203, 5 455 030, 5 856 456. Im Allgemeinen umfasst das Fv-Polypeptid weiterhin einen Polypeptid-Linker zwischen den  $V_H$ - und  $V_L$ -Domänen, der das sFv in die Lage versetzt, die gewünschte Struktur für die Antigen-Bindung zu bilden. Für einen Überblick über sFv siehe Pluckthun (1994) in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Bd. 113, Hrsg. Rosenberg und Moore (Springer-Verlag, New York), S. 269–315.

**[0044]** Antikörper oder Antikörper-Fragmente können aus Antikörper-Phagen-Bibliotheken, die unter Verwendung der in, z.B., McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552–554 (1990), und US-Patent Nr. 5 514 548 beschriebenen Techniken generiert wurden, isoliert werden. Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624–628 und Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581–597, beschreiben die Isolierung von murinen bzw. humanen Antikörpern unter Verwendung von Phagen-Bibliotheken. Nachfolgende Publikationen beschreiben die Herstellung von humanen Antikörpern hoher Affinität (nM-Bereich) durch chain shuffling (Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10:779–783), wie auch kombinatorische Infektion ("combinatorial infection") und in vivo-Rekombination als eine Strategie zum Konstruieren sehr großer Phagen-Bibliotheken (Waterhouse et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:2265–2266). Daher wären diese Techniken gangbare Alternativen zu traditionellen Hybridom-Techniken für monoklonale Antikörper zur Isolation monoklonaler Antikörper.

**[0045]** Für die Herstellung von Antikörper-Fragmenten wurden verschiedene Techniken entwickelt. Traditionellerweise wurden diese Fragmente über proteolytische Verdauung von intakten Antikörpern abgeleitet (siehe, z.B., Morimoto et al. (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107–117 (1992) und Brennan et al. (1985) *Science* 229:81). Jedoch können diese Fragmente nun direkt durch rekombinante Wirtszellen produziert werden. Z.B. können Antikörper-Fragmente aus den im Obenstehenden diskutierten Antikörper-Phagen-Bibliotheken isoliert werden. Alternativ können Fab'-SH-Fragmente direkt aus *E. coli* gewonnen und chemisch gekoppelt werden, um  $F(ab')_2$ -Fragmente zu bilden (Carter et al. (1992) *Bio/Technology* 10:163–167). Gemäß einem anderen Ansatz können  $F(ab')_2$ -Fragmente direkt aus rekombinanten Wirtszellkulturen isoliert werden. Andere Techniken zur Produktion von Antikörper-Fragmenten werden dem fachkundigen Praktiker offensichtlich sein.

**[0046]** In der vorliegenden Erfindung verwendbare Antagonist-anti-CD40-Antikörper schließen den hierin offenbarten monoklonalen 15B8-Antikörper, wie auch Antikörper, die sich von diesem Antikörper unterscheiden, aber die CDRs beibehalten; und Antikörper mit einer oder mehreren Aminosäure-Addition(en), -Deletion(en) oder -Substitution(en) ein, wobei die Antagonistenaktivität durch Inhibierung maligner B-Zell-Proliferation und/oder -Differenzierung gemessen wird. Die Erfindung umfasst auch entimmunisierte ("de-immunized") Antagonist-anti-CD40-Antikörper, die hergestellt werden können, wie, z.B., in den internationalen Publikationen Nrn. WO 98/52976 und WO 0034317 beschrieben. Auf diese Weise werden Reste innerhalb des erfindungsgemäßen Antagonist-anti-CD40-Antikörpers modifiziert, um die Antikörper nicht- oder weniger immunogen bei Menschen zu machen, während sie ihre Antagonistenaktivität gegen maligne humane B-Zellen beibehalten, wobei eine solche Aktivität durch an anderer Stelle hierin vermerkte Assays gemessen wird. In den Umfang der Ansprüche sind auch Fusionsproteine eingeschlossen, die einen erfindungsgemäßen Antagonist-anti-CD40-Antikörper oder ein Fragment davon umfassen, wobei die Fusionsproteine, ausgehend von entsprechenden Polynucleotid-Vektoren, synthetisiert oder exprimiert werden können, wie es im Fachgebiet bekannt ist. Solche Fusionsproteine werden im Hinblick auf Konjugation von Antikörpern, wie unten vermerkt, beschrieben.

**[0047]** Ein Antikörper, wie vorher definiert und wie hergestellt durch ein beliebiges der im obenstehenden beschriebenen Verfahren, oder ein beliebiges anderes hierin nicht offenbartes Verfahren, wird in den Umfang der Erfindung fallen, wenn er wenigstens eine der folgenden biologischen Aktivitäten besitzt: Inhibierung der Immunglobulin-Sekretion durch normale humane periphere B-Zellen, die durch T-Zellen stimuliert werden; Inhibierung der Proliferation normaler humaner peripherer B-Zellen, die durch Jurkat T-Zellen stimuliert werden; Inhibierung der Proliferation normaler humaner peripherer B-Zellen, die durch CD40L-exprimierende Zellen stimuliert werden; und Inhibierung der Proliferation humaner maligner B-Zellen, wie unten erwähnt. Diese Assays können wie in den Beispielen hierin beschrieben ausgeführt werden. Siehe auch die Assays, die beschrieben werden in Schultze et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8200–8204; Denton et al. (1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6–15; Evans et al. (2000) *J. Immunol.* 164:688–697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17–22; Lederman et al. (1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3:77–86; Coligan et al. (1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) *Immunology* 79:439–444; und US-Patent Nrn. 5 674 492 und 5 847 082.

**[0048]** Jeder beliebige der vorher beschriebenen Antagonist-anti-CD40-Antikörper oder Antikörper-Fragmente davon können konjugiert werden. Verfahren zum Herstellen konjugierter Antikörper sind im Fachgebiet bekannt. Daher kann der Anti-CD40-Antikörper unter Verwendung einer indirekten Markierung oder eines indi-

rekten Markierungs-Ansatzes markiert werden. Mit "indirekte Markierung" oder "indirekter Markierungs-Ansatz" ist gemeint, dass ein Chelat-bildendes Reagenz kovalent an einen Antikörper gebunden ist und wenigstens ein radioaktives Nuclid in das Chelat-bildende Reagenz eingeführt wird. Siehe, z.B., die Chelatbildenden Reagenzien und radioaktiven Nuclide, die beschrieben sind in Srivagtava und Mease (1991) Nucl. Med. Bio. 18:589–603, hierin durch Literaturverweis eingeschlossen. Alternativ kann der Anti-CD40-Antikörper unter Verwendung "direkter Markierung" oder eines "direkten Markierungs-Ansatzes" markiert werden, wobei ein radioaktives Nuclid kovalent direkt an einen Antikörper gebunden wird (typischerweise über einen Aminosäurerest). Bevorzugte radioaktive Nuclide werden in Srivagtava und Mease (1991), supra, bereitgestellt. Der indirekte Markierungs-Ansatz wird besonders bevorzugt. Siehe auch, z.B., internationale Publikation Nrn. WO 00/52031 und WO 00/52473, wo ein Linker verwendet wird, um eine radioaktive Markierung an Antikörper anzuheften; und die markierten Formen von Anti-CD40-Antikörpern, die im US-Patent Nr. 6 015 542 beschrieben werden.

**[0049]** Weiterhin kann ein Antikörper (oder ein Fragment davon) an eine therapeutische Komponente, wie ein Cytotoxin, ein therapeutisches Agens oder ein radioaktives Metallion, konjugiert werden. Ein Cytotoxin oder cytotoxisches Agens schließt jedes beliebige Agens ein, das für Zellen schädlich ist. Beispiele schließen Taxol, Cytochalasin B, Gramicidin D, Ethidiumbromid, Emetin, Mitomycin, Etoposid, Tenoposid, Vincristin, Vinblastin, Colchicin, Doxorubicin, Daunorubicin, Dihydroxyanthracindion, Mitoxantron, Mithramycin, Actinomycin D, 1-Dehydrotestosteron, Glucocorticoide, Procain, Tetracain, Lidocain, Propanolol und Puromycin und Analoga oder Homologe davon ein. Therapeutische Agentien schließen Antimetabolite (z.B. Methotrexat, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Cytarabin, 5-Fluoruracildecabazin), Alkylierungsmittel (z.B. Mechlorethamin, Thiokpa ("Thioepa"), Chlorambucil, Melphalan, Carmustin (BSNU) und Lomustin (CCNU), Cyclophosphamid, Busalfan, Dibrommannitol, Streptozotocin, Mitomycin C und cis-Dichlordiamin-Platin (II) (DDP) (Cisplatin), Anthracycline (z.B. Daunorubicin (früher Daunomycin) und Doxorubicin), Antibiotika (z.B. Dactinomycin (früher Actinomycin), Bleomycin, Mithramycin und Anthramycin (AMC)), und antimitotische Agentien (z.B. Vincristin und Vinblastin) ein, ohne darauf beschränkt zu sein. Die erfindungsgemäßen Konjugate können zum Modifizieren einer gegebenen biologischen Antwort verwendet werden, die Arzneimittel-Komponente ("drug moiety") soll nicht so ausgelegt werden, als wäre sie beschränkt auf klassische chemische therapeutische Agentien bzw. Wirkstoffe. Die Arzneimittel-Komponente kann z.B. ein Protein oder Polypeptid sein, das eine gewünschte biologische Aktivität besitzt. Solche Proteine können, z.B., ein Toxin, wie Abrin, Ricin A, Pseudomonas-Exotoxin oder Diphtherietoxin; ein Protein, wie Tumornekrosefaktor, Interferon-alpha, Interferon-beta, Nervenwachstumsfaktor, Blutplättchen-Wachstumsfaktor ("platelet derived growth factor"), Gewebe-Plasminogen-Aktivator; oder biologische Antwort-Modifikatoren ("biological response modifiers"), wie z.B. Lymphokine, Interleukin-1 ("IL-1"), Interleukin-2 ("IL-2"), Interleukin-6 ("IL-6"), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor ("GM-CSF"), Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor ("G-CSF"), oder andere Wachstumsfaktoren, einschließen.

**[0050]** Techniken zum Konjugieren solcher therapeutischer Komponenten mit Antikörpern sind gut bekannt. Siehe, z.B., Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy" in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Hrsg. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), S. 243–256; Hrsg. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery" in Controlled Drug Delivery, Hrsg. Robinson et al. (2. Aufl.; Marcel Dekker, Inc.), S. 623–653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review" in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Hrsg. Pinchera et al., S. 475–506 (Editrice Kurtis, Milano, Italien, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy" in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Hrsg. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), S. 303–316; und Thorpe et al. (1982) Immunol. Rev. 62:119–158.

**[0051]** Alternativ kann ein Antikörper mit einem zweiten Antikörper konjugiert werden, um ein Antikörper-Heterokonjugat zu bilden, wie durch Segal beschrieben in US-Patent Nr. 4 676 980. Zusätzlich können Linker zwischen den Markierungen und den erfindungsgemäßen Antikörpern verwendet werden (siehe US-Patent Nr. 4 831 175). Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon können direkt mit radioaktivem Iod, Indium, Yttrium oder anderen radioaktiven Partikeln, die im Fachgebiet bekannt sind (US-Patent Nr. 5 595 721) markiert werden. Die Behandlung kann aus einer Kombination der Behandlung mit konjugierten und nicht-konjugierten Antikörpern, die gleichzeitig oder nacheinander verabreicht werden, bestehen (WO 00/52031 und WO 00/52473).

**[0052]** Die Erfindung ist gerichtet auf die Verwendung eines Antagonist-anti-CD40-Antikörpers bei der Herstellung eines Medikaments, um Patienten zu behandeln, die eine Krankheit, die maligne B-Zellen umfasst, haben. Mit "maligne" B-Zelle ist eine beliebige neoplastische B-Zelle gemeint, einschließlich, aber nicht beschränkt auf, B-Zellen, die von Lymphomen stammen, einschließlich langsam wachsenden, intermediär wach-

senden und schnell wachsenden B-Zell-Lymphomen, immunoblastischen Lymphomen, Nicht-Hodgkin-Lymphomen, Hodgkin-Krankheit-, Epstein-Barr-Virus (EBV)-induzierten Lymphomen und AIDS-bezogenen Lymphomen, wie auch akute lymphoblastische B-Zell-Leukämien, Myelome, chronische lymphozytische Leukämien, akute myeloblastische Leukämien, und dergleichen.

**[0053]** Die Erfindung kann Verwendung finden in Bezug auf die Behandlung von Nicht-Hodgkin-Lymphomen, die bezogen sind auf abnormale, unkontrollierbare B-Zell-Proliferation oder -Akkumulation. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wird auf solche Lymphome gemäß dem Working Formulation-Klassifikationsschema Bezug genommen, d.h., solche B-Zell-Lymphome werden als langsam wachsend ("low grade"), intermediär wachsend ("intermediate grade") und schnell wachsend ("high grade") kategorisiert (siehe "The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project", Cancer 49 (1982): 2112–2135). Daher schließen langsam wachsende B-Zell-Lymphome kleinzellige lymphozytische ("small lymphocytic"), follikuläre kleinzellig-gekerbte ("follicular small-cleaved cell"), und follikulär gemischt kleinzellig-gekerbte und großzellige ("mixed small-cleaved and large cell") Lymphome ein; intermediär wachsende Lymphome schließen follikuläre großzellige ("follicular large cell"), diffuse kleinzellige gekerbte ("diffuse small cleaved cell"), diffuse gemischt kleinzellige und großzellige ("diffuse mixed small and large cell") und diffuse großzellige ("diffuse large cell") Lymphome ein; und schnell wachsende Lymphome schließen großzellige immunoblastische ("large cell immunoblastic"), lymphoblastische ("lymphoblastic") und kleinzellige nicht-gekerbte ("small non-cleaved cell") Lymphome des Burkitt- und Nicht-Burkitt-Typs ein.

**[0054]** Es wird anerkannt, dass die Erfindung nützlich in Bezug auf die therapeutische Behandlung von B-Zell-Lymphomen, die gemäß den Revised European and American Lymphoma Classification (REAL)-System klassifiziert werden, sein kann. Solche B-Zell-Lymphome schließen, ohne darauf beschränkt zu sein, Lymphome ein, die als Vorläufer-B-Zell-Neoplasmen, wie B-lymphoblastische(s) Leukämie/Lymphom; periphere B-Zell-Neoplasmen, einschließlich chronisch lymphozytische B-Zell-Leukämie/kleinzellige lymphozytische B-Zell-Lymphome, lymphoplasmacytoide Lymphome/Immunocytome, Mantelzell-Lymphome (MCL), Follikelzentrum-Lymphome (follikuläre) (einschließlich diffuser kleinzelliger, diffuser gemischt klein- und großzelliger und diffuser großzelliger Lymphome), Marginalzonen-B-Zell-Lymphom (einschließlich extranodaler, nodaler und Milz-Typen), Haarzell-Leukämie, Plasmocytom/Myelom, diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom des Subtyps primär mediastinal (thymisch), Burkitt-Lymphom und Burkitt-ähnliches, schnellwachsendes B-Zell-Lymphom; akute Leukämien; akute lymphozytische Leukämien; myeloblastische Leukämien, akute myelozytische Leukämien; promyelozytische Leukämie; myelomonozytische Leukämie; monozytische Leukämie; Erythroleukämie; granulozytische Leukämie (chronische myelozytische Leukämie), chronische lymphozytische Leukämie; Polycythemia vera; multiples Myelom; Waldenström-Makroglobulinämie; Schwere-Ketten-Krankheit ("heavy chain disease" klassifiziert werden; und nicht klassifizierbare langsam wachsende oder schnellwachsende B-Zell-Lymphome.

**[0055]** Es wird anerkannt, dass die Erfindung nützlich sein kann in Bezug auf Verhütung weiterer Tumor-Auswüchse, die während Therapie entstehen. Die Erfindung kann besonders nützlich sein in Bezug auf die Behandlung von Personen, die langsam wachsende B-Zell-Lymphome haben, besonders jene Personen, die anschließend an Standard-Chemotherapie Rückfälle ("relapses") haben. Langsam wachsende B-Zell-Lymphome sind indolenter als die intermediär und schnell wachsenden B-Zell-Lymphome und sind charakterisiert durch einen rezidivierenden/remittierenden Verlauf ("relapsing/remitting course"). Daher wird die Behandlung dieser Lymphome verbessert, da Rückfall-Episoden in Anzahl und Schwere verringert werden.

**[0056]** Die hierin beschriebenen Antagonist-anti-CD40-Antikörper können auch Verwendung finden in der Behandlung von entzündlichen Krankheiten und Defizienzen oder Störungen des Immunsystems, einschließlich, aber ohne darauf beschränkt zu sein, systemischem Lupus erythematosus, Psoriasis, Sklerodermie, CREST-Syndrom, entzündlicher Myositis, Sjogren-Syndrom, Mischkollagenose ("mixed connective tissue disease"), rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose, entzündlicher Darmerkrankung, akutem Atemnot-Syndrom ("acute respiratory distress syndrome"), Lungenentzündung, idiopathischer Lungenfibrose, Osteoporose, Hypersensitivität des verzögerten Typs ("delayed type hypersensitivity"), Asthma, primärer biliärer Leberzirrhose und idiopathischer thrombozytopenischer Purpura.

**[0057]** In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung wird wenigstens ein Antagonistanti-CD40-Antikörper (oder ein Antigen-bindendes Fragment davon), wie hierin andernorts definiert, verwendet, was eine positive therapeutische Antwort im Hinblick auf eine maligne humane B-Zelle fördert. Mit "positive therapeutische Antwort" ist eine Verbesserung der Krankheit in Verbindung mit der Anti-Tumor-Aktivität dieser Antikörper oder dieser Fragmente davon und/oder eine Verbesserung der mit der Krankheit verknüpften Symptome gemeint. D.h., eine anti-proliferative Wirkung, die Verhütung weiterer Tumor-Auswüchse und/oder eine Verringerung

von B-Symptomen können beobachtet werden. Daher kann z.B. eine Verbesserung in der Krankheit charakterisiert werden als eine vollständige Antwort ("complete response"). Mit "vollständige Antwort" ist ein Fehlen von klinisch detektierbarer bzw. feststellbarer Krankheit mit Normalisierung von beliebigen vorher abnormalen Röntgenstudien, Knochenmark und Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit ("cerebrospinal fluid") (CSF) gemeint. Solch eine Antwort muss für wenigstens einen Monat anschließend an Behandlung gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren bestehen. Alternativ kann eine Verbesserung der Krankheit als eine kategorisiert werden, die eine teilweise Antwort ist. Mit "teilweise Antwort" ist eine wenigstens etwa 50%ige Verringerung der ganzen messbaren Tumorbelastrung (d.h., die Anzahl von Tumorzellen, die in der Person vorhanden ist) in der Abwesenheit neuer Läsionen und bestehend für wenigstens einen Monat gemeint. Solch eine Antwort ist nur auf messbare Tumore anwendbar. Zusätzlich zu diesen positiven therapeutischen Antworten kann die Person, die sich einer Therapie mit dem Antagonist-anti-CD40-Antikörper oder dem Antigen-bindenden Fragment davon unterzieht, die günstige Wirkung einer Verbesserung der mit der Krankheit verbundenen Symptome erfahren. Daher kann die Person eine Verringerung der sogenannten B-Symptome, d.h., nächtliches Schwitzen ("night sweats"), Fieber, Gewichtsverlust und/oder Urticaria, erfahren.

**[0058]** Mit "therapeutisch wirksame Dosis oder Menge" ist eine Menge von Antagonist-anti-CD40-Antikörper oder von Antigen-bindendem Fragment davon gemeint, die, wenn sie verabreicht wird, etwa eine positive therapeutische Antwort im Hinblick auf die Behandlung eines Patienten mit einer Krankheit, die maligne B-Zellen umfasst, bringt. Verabreichung der pharmazeutischen Zusammensetzung, die die therapeutisch wirksame Dosis oder Menge umfasst, kann unter Verwendung eines beliebigen verträglichen Verabreichungsverfahrens, das im Fachgebiet bekannt ist, erreicht werden. Bevorzugt wird die pharmazeutische Zusammensetzung, die den Antagonist-anti-CD40-Antikörper oder das Antigen-bindende Fragment davon umfasst, intravenös, bevorzugt durch Infusion, über eine Dauer von etwa 1 bis etwa 10 Stunden, bevorzugter über etwa 1 bis etwa 8 Stunden, bevorzugter sogar über etwa 2 bis etwa 7 Stunden, noch bevorzugter über etwa 4 bis etwa 6 Stunden, abhängig von dem Anti-CD40-Antikörper, der verabreicht wird, verabreicht. Die anfängliche Infusion mit der pharmazeutischen Zusammensetzung kann über eine Dauer von etwa 4 bis etwa 6 Stunden gegeben werden, wobei nachfolgende Infusionen schneller zugeführt werden. Nachfolgende Infusionen können über eine Dauer von etwa 1 bis etwa 6 Stunden, bevorzugt etwa 1 bis etwa 4 Stunden, bevorzugter etwa 1 bis etwa 3 Stunden, noch bevorzugter etwa 1 bis etwa 2 Stunden, verabreicht werden.

**[0059]** Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung ist formuliert, um mit ihrem beabsichtigten Verabreichungsweg kompatibel zu sein. Beispiele von Verabreichungswegen schließen parenterale, z.B. intravenöse, intradermale, subkutane, orale (z.B. Inhalation), transdermale (topisch), transmucosale und rektale Verabreichung ein. Lösungen oder Suspensionen, die für parenterale, intradermale oder subkutane Applikation verwendet werden, können die folgenden Komponenten einschließen: ein steriles Verdünnungsmittel, wie Wasser zur Injektion, Salzlösung, fette Öle, Polyethylenglykole, Glycerin, Propylenglykol oder andere synthetische Lösungsmittel; antibakterielle Agentien bzw. Wirkstoffe, wie Benzylalkohol oder Methylparabene; Antioxidantien, wie Ascorbinsäure oder Natriumbisulfit, Chelat-bildende Reagentien, wie Ethylendiamintetraessigsäure; Puffer, wie Acetate, Citrate oder Phosphate, und Agentien zum Einstellen der Tonizität, wie Natriumchlorid oder Dextrose. Der pH kann mit Säuren oder Laugen, wie Salzsäure oder Natriumhydroxid, eingestellt werden. Die parenterale Zubereitung kann in Ampullen, Einwegspritzen, Mehrfachdosis-Gefäße, die aus Glas oder Kunststoff hergestellt sind, eingeschlossen sein.

**[0060]** Die Anti-CD40-Antikörper werden typischerweise durch Standardtechniken in einem pharmazeutisch verträglichen Puffer, z.B. steriler Salzlösung, steril gepuffertem Wasser, Propylenglykol, Kombinationen der Vorstehenden etc., bereitgestellt. Verfahren zum Herstellen parenteral verabreichbarer Agentien werden beschrieben in Remington's Pharmaceutical Sciences (18. Aufl.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990). Siehe auch, z.B., WO 98/56418, die pharmazeutische Formulierungen stabilisierter Antikörper, die zur Verwendung in den Verfahren der vorliegenden Erfindung geeignet sind, beschreibt.

**[0061]** Die Menge von wenigstens einem Anti-CD40-Antikörper oder eines Fragments davon, die zu verabreichen ist, wird leicht von jemandem mit gewöhnlichen Fähigkeiten im Fachgebiet ohne unzumutbares Experimentieren bestimmt. Faktoren, die die Verabreichungsweise und die jeweilige Menge von wenigstens einem Antagonist-anti-CD40-Antikörper (oder Fragment davon) beeinflussen, schließen das bestimmte Lymphom, das einer Therapie unterzogen wird, die Schwere der Krankheit, die Geschichte der Krankheit und das Alter, Größe, Gewicht, Gesundheit und körperlichen Zustand des Individuums, das einer Therapie unterzogen wird, ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Gleichermaßen wird die Menge an Antagonist-anti-CD40-Antikörper oder an Fragment davon, die zu verabreichen ist, abhängig sein von der Verabreichungsweise und ob sich die Person einer einzelnen Dosis oder mehrfacher Dosen dieses Anti-Tumor-Agens unterziehen wird. Im Allgemeinen wird mit steigendem Gewicht des Patienten, der sich der Therapie unterzieht, eine höhere Dosierung

von Anti-CD40-Antikörper oder von Fragment davon bevorzugt. Die Dosis von Anti-CD40-Antikörper oder des Fragments davon, die zu verabreichen ist, ist im Bereich von etwa 0,003 mg/kg bis etwa 50 mg/kg, bevorzugt im Bereich von 0,01 mg/kg bis etwa 40 mg/kg. Deshalb kann die Dosis z.B. 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg oder 50 mg/kg sein.

**[0062]** In einer anderen Ausführungsform können mehrfache Dosen von Antagonist-anti-CD40-Antikörper oder von Fragment davon verabreicht werden. Deshalb können 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 oder mehr therapeutisch wirksame Dosen einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die einen Antagonist-anti-CD40-Antikörper oder ein Fragment davon umfasst, verabreicht werden. Die Häufigkeit und Dauer der Verabreichung mehrfacher Dosen der pharmazeutischen Zusammensetzungen, die Anti-CD40-Antikörper oder ein Fragment davon umfassen, können leicht durch einen Fachmann ohne unzumutbares Experimentieren bestimmt werden. Darüber hinaus kann die Behandlung einer Person mit einer therapeutisch wirksamen Menge eines Antikörpers eine einzelne Behandlung einschließen oder, bevorzugt, eine Reihe von Behandlungen einschließen. In einem bevorzugten Beispiel wird eine Person mit Antagonist-anti-CD40-Antikörper oder einem Antigen-bindenden Fragment davon im Bereich von etwa 0,1 bis 20 mg/kg Körpergewicht, einmal pro Woche zwischen etwa 1 bis 10 Wochen, bevorzugt zwischen etwa 2 bis 8 Wochen, bevorzugter zwischen etwa 3 bis 7 Wochen, und noch bevorzugter für etwa 4, 5 oder 6 Wochen, behandelt. Die Behandlung kann jährlich erfolgen, um einem Rückfall vorzubeugen oder bei Indikation eines Rückfalls. Es wird auch geschätzt werden, dass die wirksame Dosierung von Antikörper oder Antigen-bindendem Fragment davon, die zur Behandlung verwendet wird, über den Verlauf einer besonderen Behandlung steigen oder sinken kann. Änderungen der Dosierung können sich ergeben und werden ersichtlich werden aus den Resultaten diagnostischer Assays, wie hierin beschrieben. Daher schließt in einer Ausführungsform das Dosierungs-Regime eine erste Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Dosis von wenigstens einem Anti-CD40-Antikörper oder einem Fragment davon an den Tagen 1, 7, 14 und 21 einer Behandlungsperiode ein. In einer weiteren Ausführungsform schließt das Dosierungs-Regime eine erste Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Dosis von wenigstens einem Anti-CD40-Antikörper oder eines Fragments davon an den Tagen 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 einer Woche in einer Behandlungsperiode ein. Weitere Ausführungsformen schließen ein Dosierungs-Regime, das eine erste Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Dosis von wenigstens einem Anti-CD40-Antikörper oder eines Fragments davon an den Tagen 1, 3, 5 und 7 einer Woche in einer Behandlungsperiode hat; ein Dosierungs-Regime, das eine erste Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Dosis von wenigstens einem Anti-CD40-Antikörper oder eines Fragments davon an Tagen 1 und 3 einer Woche in einer Behandlungsperiode einschließt; und ein bevorzugtes Dosierungs-Regime, das eine erste Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Dosis von wenigstens einem Anti-CD40-Antikörper oder eines Fragments davon an Tag 1 einer Woche in einer Behandlungsperiode einschließt, ein. Die Behandlungsperiode kann 1 Woche, 2 Wochen, 3 Wochen, einen Monat, 3 Monate, 6 Monate oder ein Jahr umfassen. Behandlungsperioden können aufeinanderfolgend oder voneinander durch einen Tag, eine Woche, 2 Wochen, einen Monat, 3 Monate, 6 Monate oder ein Jahr getrennt sein.

**[0063]** Die Antagonist-anti-CD40-Antikörper, anwesend in den pharmazeutischen Zusammensetzungen, beschrieben hierin zur erfindungsgemäßen Verwendung, können nativ oder erhalten durch rekombinante Techniken sein und können von einer beliebigen Quelle, einschließlich Säugetierquellen, wie z.B. Maus, Ratte, Kaninchen, Primat, Schwein und Mensch, sein. Vorzugsweise werden solche Polypeptide von einer menschlichen Quelle abgeleitet, und besonders bevorzugt sind sie rekombinante, humane Proteine aus Hybridomzelllinien.

**[0064]** Die erfindungsgemäß verwendbaren pharmazeutischen Zusammensetzungen können biologisch aktive Varianten der erfindungsgemäßen Antagonist-anti-CD40-Antikörper umfassen. Solche Varianten sollten die gewünschte biologische Aktivität des nativen Polypeptids beibehalten, so dass die pharmazeutische Zusammensetzung, die die Polypeptid-Variante ("variant polypeptide") enthält, die gleiche therapeutische Wirkung hat wie die pharmazeutische Zusammensetzung, die das native Polypeptid umfasst, wenn es einer Person verabreicht wird. D.h., dass die Anti-CD40-Antikörper-Variante ("variant anti-CD40 antibody") als ein therapeutisch wirksamer Bestandteil in der pharmazeutischen Zusammensetzung in einer Weise dienen wird, die ähnlich zu der ist, die für den nativen Antagonisten-Antikörper, z.B. 15B8, wie durch die Hybridomzelllinie 15B8 exprimiert, beobachtet wird. Im Fachgebiet sind Verfahren verfügbar, um zu bestimmen, ob eine Anti-CD40-Antikörper-Variante, die gewünschte biologische Aktivität beibehält und daher als ein therapeutisch wirksamer Bestandteil in der pharmazeutischen Zusammensetzung dient. Biologische Aktivität von Antikörper-Varianten kann unter Verwendung von Assays, die spezifisch zu messende Aktivität des nativen Antagonisten-Antikörpers entworfen sind, einschließlich Assays, die in der vorliegenden Erfindung beschrieben werden, gemessen werden.

**[0065]** Geeignete biologisch aktive Varianten von nativen oder natürlicherweise auftretenden Antagonist-anti-CD40-Antikörpern können Fragmente, Analoga und Derivate dieses Polypeptids sein. Mit "Fragment" ist ein Polypeptid, bestehend aus nur einem Teil der intakten Polypeptid-Sequenz und -Struktur, wie andernorts hierin vermerkt, gemeint. Mit "Analogon" ist ein Analogon von entweder dem nativen Polypeptid oder von einem Fragment des nativen Polypeptids gemeint, wobei das Analogon eine native Polypeptid-Sequenz und -Struktur, die eine oder mehrere Aminosäure-Substitutionen, -Insertionen oder -Deletionen hat, umfasst. Mit "Derivat" ist jede beliebige geeignete Modifikation des nativen interessierenden Polypeptids, eines Fragments des nativen Polypeptids oder ihrer jeweiligen Analoga, wie Glykosylierung, Phosphorylierung, Polymer-Konjugation (wie mit Polyethylenglykol), oder andere Addition fremder Komponenten ("moieties") gemeint, solange die gewünschte biologische Aktivität des nativen Polypeptids beibehalten wird. Verfahren zum Herstellen von Polypeptid-Fragmenten, -Analoga und -Derivaten sind im Fachgebiet allgemein verfügbar.

**[0066]** Z.B. können Aminosäuresequenz-Varianten eines Antagonist-anti-CD40-Antikörpers durch Mutationen in der klonierten DNA-Sequenz, die für den interessierenden Antikörper codiert, hergestellt werden. Verfahren für Mutagenese und Nucleotidsequenz-Änderungen sind im Fachgebiet gut bekannt. Siehe z.B. Walker und Gaastra, Hrsg. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488–492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367–382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York); US-Patent Nr. 4 873 192; und die darin zitierten Literaturverweise. Anleitung zu geeigneten Aminosäure-Substitutionen, die biologische Aktivität des interessierenden Polypeptids nicht beeinflussen, können im Modell von Dayhoff et al. (1978) in *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), gefunden werden. Konservative Substitutionen, wie Austausch einer Aminosäure durch eine andere, die ähnliche Eigenschaften hat, können bevorzugt sein. Beispiele konservativer Substitutionen schließen Gly $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Arg, Asn $\leftrightarrow$ Gln und Phe $\leftrightarrow$ Trp $\leftrightarrow$ Tyr ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

**[0067]** Beim Konstruieren von Varianten des interessierenden Antagonist-anti-CD40-Antikörper-Polypeptids werden Modifikationen so gemacht, dass Varianten weiterhin die gewünschte Aktivität besitzen, d.h., ähnliche Bindungsaffinität und die folgenden Charakteristiken haben: 1) fähig sind zum spezifischen Binden an ein humanes CD40-Antigen, das auf der Oberfläche einer humanen Zelle exprimiert wird; 2) frei sind von signifikanter Agonistenaktivität, wenn sie an ein CD40-Antigen auf einer normalen humanen B-Zelle gebunden werden; und 3) Antagonistenaktivität aufweisen, wenn sie an ein CD40-Antigen auf einer malignen humanen B-Zelle gebunden werden. Offensichtlich dürfen beliebige in der für die Polypeptid-Variante codierenden DNA gemachte Mutationen die Sequenz nicht aus dem Leserahmen verschieben und werden bevorzugt keine komplementären Regionen schaffen, die eine sekundäre mRNA-Struktur erzeugen könnten. Siehe EP-Patentanmeldung Veröffentlichungs-Nr. 75 444.

**[0068]** Biologisch aktive Varianten von Anti-CD40-Antikörpern werden im Allgemeinen wenigstens 70%, bevorzugt wenigstens 80%, bevorzugter etwa 90–95% oder mehr, und am bevorzugtesten etwa 98% oder mehr Aminosäuresequenz-Identität zur Aminosäuresequenz des Referenz-Polypeptidmoleküls, das als die Basis für den Vergleich dient, haben. Eine biologisch aktive Variante eines Referenz-Antagonist-anti-CD40-Antikörpers, die die hierin beschriebene Spezifität und Bindungseigenschaften hat, kann sich von dem Referenz-Polypeptid von nur 1–15 Aminosäuren, nur 1–10, wie 6–10, nur 5, nur 4, 3, 2, oder sogar nur einen Aminosäurerest, unterscheiden. Mit "Sequenzidentität" ist gemeint, dass die gleichen Aminosäurereste innerhalb der Polypeptid-Variante und dem Polypeptidmolekül, das als eine Referenz dient, gefunden werden, wenn ein spezifizierter, benachbarter Abschnitt ("specified, contiguous segment") der Aminosäuresequenz der Variante vergleichend angeordnet ("aligned") und verglichen wird mit der Aminosäuresequenz des Referenzmoleküls. Der Prozentsatz der Sequenzidentität zwischen zwei Aminosäuresequenzen wird durch Bestimmen der Anzahl von Positionen, an denen die identischen Aminosäurereste in beiden Sequenzen auftreten, um die Anzahl übereinstimmender Positionen zu ergeben, Teilen der Anzahl übereinstimmender Positionen durch die Gesamtzahl von Positionen in dem Abschnitt, der einem Vergleich mit dem Referenzmolekül unterzogen wird, und Multiplizieren des Ergebnisses mit 100, um den Prozentsatz von Sequenzidentität zu ergeben, bestimmt.

**[0069]** Zum Zweck von optimalem Alignment der zwei Sequenzen kann der benachbarte Abschnitt der Aminosäuresequenz der Varianten zusätzliche Aminosäurereste oder deletierte Aminosäurereste mit Bezug auf die Aminosäuresequenz des Referenzmoleküls haben. Der benachbarte Abschnitt, der zum Vergleich mit der Referenz-Aminosäuresequenz verwendet wird, wird wenigstens zwanzig (20) benachbarte Aminosäurereste ("contiguous amino acid residues") und vielleicht 30, 40, 50, 100 oder mehr Reste umfassen. Berichtigungen für erhöhte Sequenzidentität, die mit dem Einschluss von Lücken in die Aminosäuresequenz der Variante verknüpft sind, können durch Festsetzen von Strafen für Lücken ("gap penalties") durchgeführt werden.



**[0070]** Daher kann die Bestimmung des Prozentsatzes der Identität zwischen zwei beliebigen Sequenzen unter Verwendung eines mathematischen Algorithmus bewerkstelligt werden. Ein bevorzugtes, nicht-beschränkendes Beispiel eines mathematischen Algorithmus, der zum Vergleich von Sequenzen verwendet wird, ist der Algorithmus von Myers und Miller (1988) CA-BIOS 4:11–17. Solch ein Algorithmus wird in dem ALIGN-Programm (Version 2.0) verwendet, das Teil des GCG sequence alignment-Software-Pakets ist. Eine PAM120 weight residue table, eine Strafe für Lückenlänge ("gap length penalty") von 12 und eine Strafe für Lücke von 4 kann mit dem ALIGN-Programm verwendet werden, wenn Aminosäuresequenzen verglichen werden. Ein weiteres bevorzugtes, nicht-beschränkendes Beispiel eines mathematischen Algorithmus zur Verwendung beim Vergleichen von zwei Sequenzen ist der Algorithmus von Karlin und Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, modifiziert wie in Karlin und Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873–5877. Solch ein Algorithmus ist aufgenommen in die NBLAST- und XBLAST-Programme von Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403. BLAST-Nucleotidsuchen können mit dem NBLAST-Programm, Score = 100, Wortlänge ("word-length") = 12, durchgeführt werden, um Nucleotidsequenzen zu erhalten, die homolog zu einer Nucleotidsequenz sind, die für das interessierende Polypeptid codiert. BLAST-Proteinsuchen können mit dem XBLAST-Programm, Score = 50, Wortlänge = 3, durchgeführt werden, um Aminosäuresequenzen zu erhalten, die homolog zu dem interessierenden Polypeptid sind. Um mit Lücken versehene Alignments ("gapped alignments") für Vergleichszwecke zu erhalten, kann Gapped BLAST verwendet werden, wie in Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389, beschrieben. Alternativ kann PSI-Blast verwendet werden, um eine iterierte Suche durchzuführen, die entfernte Verwandtschaften zwischen Molekülen detektiert. Siehe Altschul et al. (1997), supra. Beim Verwenden von BLAST-, Gapped BLAST- und PSI-Blast-Programmen können die Standardparameter der jeweiligen Programme (z.B. XBLAST und NBLAST) verwendet werden. Siehe <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Siehe auch das ALIGN-Programm (Dayhoff (1978) in Atlas of Protein Sequence and Structure 5:Suppl. 3 (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.)) und Programme im Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (erhältlich von Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), z.B. das GAP-Programm, wo Standardparameter der Programme verwendet werden.

**[0071]** Wenn man Prozentsätze von Aminosäuresequenz-Identität berücksichtigt, können manche Aminosäurerest-Positionen als ein Ergebnis konservativer Aminosäure-Substitutionen, die Eigenschaften der Proteinfunktion nicht beeinflussen, differieren. In diesen Fällen können Prozent Sequenzidentität aufwärts angepasst werden, um der Ähnlichkeit bei konservativ substituierten Aminosäuren Rechnung zu tragen. Solche Anpassungen sind im Fachgebiet gut bekannt. Siehe z.B. Myers und Miller (1988) Computer Applic. Biol. Sci. 4:11–17.

**[0072]** Die präzise chemische Struktur eines Polypeptids, fähig, CD40 spezifisch zu binden und Antagonistenaktivität beizubehalten, besonders, wenn es an CD40-Antigen auf malignen B-Zellen gebunden ist, hängt von einer Anzahl von Faktoren ab. Da ionisierbare Amino- und Carboxylgruppen in dem Molekül vorhanden sind, kann ein bestimmtes Polypeptid als ein saures oder basisches Salz oder in neutraler Form erhalten werden. Alle solchen Zubereitungen, die ihre biologische Aktivität beibehalten, wenn sie in geeignete Umweltbedingungen gebracht werden, sind in die Definition von Antagonist-anti-CD40-Antikörpern, wie hierin verwendet, eingeschlossen. Weiterhin kann die primäre Aminosäuresequenz des Polypeptids durch Derivatisierung unter Verwendung von Zucker-Komponenten (Glykosylierung) oder durch andere zusätzliche Moleküle, wie Lipide, Phosphat, Acetylgruppen und dergleichen, gesteigert werden. Sie kann auch durch Konjugation mit Sacchariden gesteigert werden. Gewisse Aspekte solcher Steigerung werden durch posttranslationale Prozessierungssysteme des produzierenden Wirts bewerkstelligt; andere solche Modifikationen können in vitro eingeführt werden. Auf jeden Fall sind solche Modifikationen in die Definition eines Anti-CD40-Antikörpers, wie hierin verwendet, eingeschlossen, solange die Antagonisten-Eigenschaften des Anti-CD40-Antikörpers nicht zerstört werden. Es wird erwartet, dass solche Modifikationen die Aktivität quantitativ oder qualitativ, entweder durch Verstärken oder Verringern der Aktivität des Polypeptids, in den verschiedenen Assays beeinflussen können. Weiterhin können einzelne bzw. individuelle Aminosäurereste in der Kette durch Oxidation, Reduktion oder andere Derivatisierung modifiziert werden, und das Polypeptid kann gespalten werden, um Fragmente zu erhalten, die Aktivität beibehalten. Solche Änderungen, die Antagonistenaktivität nicht zerstören, entfernen die Polypeptid-Sequenz nicht aus der Definition interessierender Anti-CD40-Antikörper, wie hierin verwendet.

**[0073]** Das Fachgebiet stellt erhebliche Anleitung hinsichtlich der Herstellung und Verwendung von Polypeptid-Varianten bereit. Beim Herstellen der Anti-CD40-Antikörper-Varianten kann ein Fachmann auf dem Gebiet leicht bestimmen, welche Modifikationen an dem/der nativen/nativer Protein, Nucleotid- oder Aminosäuresequenz in einer Variante resultieren werden, die geeignet ist zur Verwendung als ein therapeutisch wirksamer Bestandteil einer erfindungsgemäß verwendeten pharmazeutischen Zusammensetzung.

**[0074]** Eine beliebige pharmazeutische Zusammensetzung, die den Antagonist-anti-CD40-Antikörper als den

therapeutisch wirksamen Bestandteil umfasst, kann erfindungsgemäß verwendet werden. Deshalb können flüssige, lyophilisierte oder sprühgetrocknete Zusammensetzungen, die Antagonist-anti-CD40-Antikörper oder Varianten davon umfassen, die im Fachgebiet bekannt sind, hergestellt werden als eine wässrige oder nicht-wässrige Lösung oder Suspension zur nachfolgenden Verabreichung an eine Person in Übereinstimmung mit den erfindungsgemäßen Verfahren. Jede dieser Zusammensetzungen wird Anti-CD40-Antikörper oder Varianten davon als einen therapeutisch oder prophylaktisch wirksamen Bestandteil enthalten. Mit "therapeutisch oder prophylaktisch wirksamer Bestandteil" ist gemeint, dass der Anti-CD40-Antikörper oder die Variante davon spezifisch in die Zusammensetzung aufgenommen wird, um eine gewünschte therapeutische oder prophylaktische Antwort im Hinblick auf Behandlung, Verhütung oder Diagnose einer Krankheit oder eines Zustandes in einer Person hervorzubringen, wenn die pharmazeutische Zusammensetzung dieser Person verabreicht wird. Vorzugsweise umfassen die pharmazeutischen Zusammensetzungen geeignete Stabilisierungsmittel, Füllmittel ("bulking agents") oder beides, um Probleme zu minimieren, die mit Verlust von Protein-stabilität und biologischer Aktivität während Herstellung und Lagerung verknüpft sind.

**[0075]** Hilfsstoffe ("Formulants") können zu pharmazeutischen Zusammensetzungen, die einen erfindungsgemäßen Anti-CD40-Antikörper umfassen, zugesetzt werden. Diese Hilfsstoffe können Öle, Polymere, Vitamine, Kohlenhydrate, Aminosäuren, Salze, Puffer, Albumin, oberflächenaktive Substanzen oder Füllmittel umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt. Bevorzugt schließen Kohlenhydrate Zucker oder Zuckeralkohole, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide, oder wasserlösliche Glucane ein. Die Saccharide oder Glucane können Fructose, Glucose, Mannose, Sorbose, Xylose, Maltose, Saccharose, Dextran, Pullulan, Dextrin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrin, lösliche Stärke, Hydroxyethylstärke und Carboxymethylcellulose oder Mischungen davon einschließen. "Zuckeralkohol" ist definiert als ein  $C_4$ - bis  $C_8$ -Kohlenwasserstoff, der eine Hydroxylgruppe hat, und Galactitol, Inositol, Mannitol, Xylitol, Sorbitol, Glycerin und Arabitol einschließt. Diese Zucker oder Zuckeralkohole können einzeln oder in Kombination verwendet werden. Die Zucker- oder Zuckeralkohol-Konzentration ist zwischen 1,0% und 7% G/V, bevorzugter zwischen 2,0% und 6,0% G/V. Bevorzugte Aminosäuren schließen linksdrehende (L)-Formen von Carnitin, Arginin und Betain ein; jedoch können auch andere Aminosäuren zugesetzt werden. Bevorzugte Polymere schließen Polyvinylpyrrolidon (PVP) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 2000 und 3000 oder Polyethylenglykol (PEG) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen 3000 und 5000 ein. Oberflächenaktive Substanzen, die zu der Formulierung zugesetzt werden können, sind in EP Nr. 270 799 und 268 110 gezeigt.

**[0076]** Zusätzlich können Antikörper durch kovalente Konjugation mit einem Polymer chemisch modifiziert werden, um ihre Zirkulations-Halbwertszeit zu erhöhen, z.B. Bevorzugte Polymere und Verfahren, um sie an Peptide anzuhängen, sind gezeigt in US-Patenten Nm. 4 766 106, 4 179 337, 4 495 285 und 4 609 546, die hierdurch alle durch Literaturverweis in ihren Gesamtheiten eingeschlossen sind. Bevorzugte Polymere sind polyoxyethylierte Polyole und Polyethylenglykol (PEG). PEG ist in Wasser bei Raumtemperatur löslich und hat die allgemeine Formel:  $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ , worin R Wasserstoff sein kann, oder eine Schutzgruppe, wie eine Alkyl- oder Alkanolgruppe. Bevorzugt hat die Schutzgruppe zwischen 1 und 8 Kohlenstoffe, bevorzugter ist sie Methyl. Das Symbol n ist eine positive ganze Zahl, bevorzugt zwischen 1 und 1000, bevorzugter zwischen 2 und 500. Das PEG hat ein bevorzugtes durchschnittliches Molekulargewicht zwischen 1.000 und 40.000, bevorzugter zwischen 2.000 und 20.000, am bevorzugtesten zwischen 3.000 und 12.000. Bevorzugt hat PEG wenigstens eine Hydroxygruppe, bevorzugter ist es eine endständige Hydroxygruppe. Es ist diese Hydroxygruppe, die bevorzugt aktiviert wird, um mit einer freien Aminogruppe auf dem Inhibitor zu reagieren. Jedoch wird es verstanden werden, dass der Typ und die Menge der reaktiven Gruppen variiert werden können, um einen erfindungsgemäßen kovalent konjugierten PEG/Antikörper zu erreichen.

**[0077]** Wasserlösliche polyoxyethylierte Polyole sind auch in der vorliegenden Erfindung verwendbar. Sie schließen polyoxyethyliertes Sorbitol, polyoxyethylierte Glucose, polyoxyethyliertes Glycerin (POG) und dergleichen ein. POG wird bevorzugt. Ein Grund ist, weil das Glycerin-Grundgerüst von polyoxyethyliertem Glycerin das gleiche Grundgerüst ist, das natürlicherweise in, z.B., Tieren und Menschen in Mono-, Di-, Triglyceriden auftritt. Deshalb würde diese Verzweigung nicht notwendigerweise als ein fremdes Agens im Körper angesehen werden. Das POG hat ein bevorzugtes Molekulargewicht im gleichen Bereich wie PEG. Die Struktur für POG ist gezeigt in Knauf et al. (1988) J. Bio. Chem. 263:15064–15070, und eine Diskussion von POG/IL-2-Konjugaten wird gefunden in US-Patent Nr. 4 766 106.

**[0078]** Ein weiteres Wirkstoffabgabesystem ("drug delivery system") zum Erhöhen zirkulatorischer Halbwertszeit ist das Liposom. Verfahren zum Herstellen von Liposom-Abgabesystemen ("liposome delivery systems") werden diskutiert in Gabizon et al. (1982) Cancer Research 42:4734; Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649:129; und Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9:467. Andere Wirkstoffabgabesysteme sind auf dem Gebiet bekannt und werden beschrieben in z.B. Poznansky et al. (1980) Drug Delivery Systems (R.L. Juliapo,

Hrsg., Oxford, N.Y.) S. 253–315; Poznansky (1984) Pharm Revs 36:277.

**[0079]** Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von Antagonist-anti-CD40-Antikörpern für diagnostisches Monitoring von Proteinspiegeln in Gewebe als Teil einer klinischen Testprozedur, z.B. um die Wirksamkeit eines gegebenen Behandlungsregimes zu bestimmen. Die Bestimmung kann durch Kuppelung des Antikörpers an eine detektierbare Substanz erleichtert werden. Beispiele detektierbarer Substanzen schließen verschiedene Enzyme, prothetische Gruppen, fluoreszierende Materialien, lumineszierende Materialien, biolumineszierende Materialien und radioaktive Materialien ein. Beispiele geeigneter Enzyme schließen Meerrettich-Peroxidase, alkalische Phosphatase,  $\beta$ -Galactosidase oder Acetylcholinesterase ein; Beispiele geeigneter Komplexe prothetischer Gruppen schließen Streptavidin/Biotin und Avidin/Biotin ein; Beispiele geeigneter fluoreszierender Materialien schließen Umbelliferon, Fluorescein, Fluoresceinisothiocyanat, Rhodamin, Dichlortriazinylaminfluorescein, Dansylchlorid oder Phycoerythrin ein; ein Beispiel eines lumineszierenden Materials schließt Luminol ein; Beispiele biolumineszierender Materialien schließen Luciferase, Luciferin und Aequorin ein; und Beispiele von geeignetem radioaktivem Material schließen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  oder  $^3\text{H}$  ein.

**[0080]** Die Antagonist-anti-CD40-Antikörper können in Kombination mit bekannten Chemotherapeutika und Cytokinen zur Behandlung von Krankheitszuständen, die maligne B-Zellen umfassen, verwendet werden. Z.B. können die erfindungsgemäßen Anti-CD40-Antikörper in Kombination mit Cytokinen, wie Interleukin-2, verwendet werden. In einer anderen Ausführungsform können die erfindungsgemäßen Anti-CD40-Antikörper in Kombination mit Rituximab (IDEC-C2B8; Rituxan<sup>®</sup>; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, Kalifornien) verwendet werden. Rituximab ist ein chimärer monoklonaler Anti-CD20-Antikörper, enthaltend humanes IgG 1 und kappa-konstante Regionen mit murinen variablen Regionen, isoliert aus einem murinen monoklonalen Anti-CD20-Antikörper, IDEC-2B8 (Reff et al. (1994) Blood 83:435–445).

**[0081]** Die hierin beschriebenen Anti-CD40-Antikörper können weiterhin verwendet werden, um Reagentien, z.B. markierte oder markierbare Antikörper, die z.B. verwendet werden können, um Zellen zu identifizieren, die CD40 exprimieren, bereitzustellen. Dies kann sehr nützlich beim Bestimmen des Zelltyps einer unbekannten Probe sein. Panels bzw. Felder monoklonaler Antikörper können verwendet werden, um Gewebe nach Art und/oder nach Organtyp zu identifizieren. In einer ähnlichen Weise können diese Anti-CD40-Antikörper verwendet werden, um Gewebekulturzellen auf Kontamination zu durchsuchen (d.h., durchsuchen auf die Gegenwart einer Mischung von CD40-exprimierenden und nicht-CD40-exprimierenden Zellen in einer Kultur).

**[0082]** Die folgenden Beispiele werden als Erläuterung und nicht als Beschränkung angeboten.

#### EXPERIMENTELLES

**[0083]** Der in den untenstehenden Beispielen verwendete Antagonist-anti-CD40-Antikörper ist 15B8. 15B8 ist ein humaner IgG2-Subtyp von monoklonalem Anti-Human-CD40-Antikörper, generiert durch Immunisierung transgener Mäuse, die den humanen Locus der schweren Kette von IgG2 ("human IgG<sub>2</sub> heavy chain locus") und den humanen Locus der leichten K-Kette ("human K light chain locus") tragen (Xenomouse, Abgenix). Wie durch FACS-Analyse gezeigt, bindet 15B8 spezifisch an humanes CD40 und kreuzreagiert mit CD40, das auf den peripheren Blut-B-Zellen aus Affen (Cynomologus, Rhesus und Pavian) und Schimpansen exprimiert wird. 15B8 kreuzreagiert nicht mit CD40 von Nicht-Primaten-Tierarten, noch bindet es an andere Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie, wie durch ELISA und FACS-Analyse gezeigt. Die Bindungsaffinität von 15B8 zu humanem CD40 ist  $3,1 \times 10^{-9}$  M, wie durch BIAcore Assay bestimmt.

#### Beispiel 1: Wirkung von 15B8 auf die CD40/CD40L-Wechselwirkung in vitro

**[0084]** Ein kompetitiver Bindungsassay wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob direkte Konkurrenz bzw. Kompetition ("direct competition") um CD40-Bindung ein Mechanismus der Antagonistenaktivität von 15B8 ist.

**[0085]** Eine Linie von chinesischer Hamster-Ovar (CHO)-Zellen, die das für CD40L codierende Gen enthalten und CD40L auf der Zelloberfläche exprimieren, wurde generiert. Die CD40L-exprimierenden CHO-Zellen wurden mit gereinigtem CD40 vor und nach Inkubation von CD40 mit 15B8 inkubiert. Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertes Anti-huIgG wurde zu den Zellen zugesetzt. FACS-Analyse wurde durchgeführt, um über CD40 an die CHO-Zellen gebundenen 15B8 zu detektieren. Die Bindung von 15B8 an CD40 inhibierte die nachfolgende Bindung von CD40L an CD40. Wenn jedoch CD40L und CD40 zusammen vor der Zugabe von 15B8 inkubiert wurden, war 15B8 nachfolgend fähig, CD40 zu binden. Indem es nicht durch einen beliebigen Wirkungsmechanismus gebunden wird, legt dies nahe, dass 15B8 nicht direkt mit CD40L um Bindungsstellen auf CD40 konkurriert, und dass die Bindung von 15B8 an CD40 möglicherweise konformationelle Änderungen

im CD40-Molekül verursachte, die die Bindung von CD40L an CD40 verhinderten. Die mutmaßliche bzw. putative strukturelle Änderung des CD40-Moleküls, die durch 15B8-Bindung induziert wird, könnte auch ein negatives Signal an die Zelle abgeben, das den Antagonisten-Effekt verursacht.

#### Beispiel 2: Pharmakologische Wirkung von 15B8 in Lymphomzellen aus NHL-Patienten

**[0086]** Um die potentielle Wirksamkeit von 15B8 in einem präklinischen in vitro-Modell des Nicht-Hodgkin-Lymphoms (NHL) zu zeigen, wurde 15B8 unter Verwendung maligner B-Zellen (NHL-Zellen), erhalten von NHL-Patienten, die entweder Rituximab-behandelt oder naiv waren, getestet. Rituximab (IDEC-C2B8; Rituxan®; IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, Californien) ist ein monoklonaler Anti-CD20-Antikörper zur Behandlung von rückfälliger oder refraktärer, langsam wachsender oder follikulärer NHL.

**[0087]** Da primäre Lymphomzellen in normalem Kulturmedium nicht proliferieren und nach wenigen Tagen in Kultur Apoptose durchlaufen, wurden Tumorzellen mit bestrahlten CD40-Ligand (CD40L)-transfizierten Feeder-Zellen (Arpin et al. (1995) Science 268:720–722) in der Gegenwart oder Abwesenheit des B-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-4 (IL-4) co-kultiviert. Antikörper (Agonist-anti-CD40 MS81, Antagonist-anti-CD40 15B8 oder Isotyp-Kontrolle humanes IgG2 (hulgG2)) der angegebenen Konzentration (von 0,01 µg/ml bis 10 µg/ml) wurden dann zu der Kultur zugesetzt. Anschließend an Inkubation bei 37°C für 48 Stunden wurde kultivierten Zellen ein Impuls mit <sup>3</sup>H-Thymidin für 18 Stunden gegeben. Die Zellen wurden dann geerntet und auf die Menge von <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau untersucht (Schultze et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8200–8204). Alle Probenbedingungen waren in dreifacher Wiederholung.

**[0088]** In diesen NHL-Zell-Primärkulturassays stimulierte 15B8 alleine oder in Kombination mit IL-4 NHL-Zellen nicht dazu, in vitro zu proliferieren. Im Gegensatz dazu induzierte ein Agonist-anti-CD40 MS81 NHL-Zellproliferation unter den gleichen Bedingungen. 15B8 zeigte statistisch signifikante Inhibierung von NHL-Zellproliferation, die durch CD40L ( $P = 0,05$ ) und durch CD40L plus IL-4 ( $P < 0,05$ ) in vitro stimuliert wurde. Bei 1–10 µg/ml bzw. 0,1–10 µg/ml Konzentrationsbereich zeigte 15B8 eine statistisch signifikante Dosis-bezogene Inhibierung von NHL-Zellproliferation, die durch CD40L oder durch CD40L plus IL-4 ( $P < 0,005$ ) stimuliert wurde (Daten nicht gezeigt).

**[0089]** Es gibt zwei Typen präklinischer Modelle, die gegenwärtig zur Bewertung Human-Antigen-spezifischer monoklonaler Antikörper (Mabs) in therapeutischer Entwicklung für Lymphome verwendet werden. Ein Modell ist das Xenograft- bzw. Xenotransplantat-Maus-in vivo-Modell, bei dem die EBV-transformierten Lymphom-Zelllinien, wie Daudi (Burkitt-Lymphom)- oder Raji (Burkitt-Lymphom)-Zellen in SCID/Nude-Mäuse xenotransplantiert ("xenografted") werden. Die Mängel dieser Modelle sind, dass die Ergebnisse nur Wirkungen auf die besondere unsterbliche Zelllinie, die von einer EBV-transformierten Zelle abgeleitet ist, widerspiegeln. Es ist bekannt, dass Burkitt-Lymphom-Zellen lymphoblastoide Zellen sind (Ambinder et al. (1999) Cancer Treat. Res. 99:27–45; Quintanilla-Martinez et al. (1998) Leuk. Lymphoma 30:111–121; Klein (1996) Acta Microbiol. Immunol. Hung. 43:97–105), wohingegen angenommen wird, dass die Lymphom-Zellen aus NHL-Patienten auf der reifen B-Zell-Stufe sind (Ghia et al. (2000) Adv. Cancer Res. 79:157–173). EBV-Transformation von B-Zellen resultiert in Änderungen vieler Bestandteile im CD40-Signalstoffwechselweg (Uchida et al. (1999) Science 286:300–303; Farrell et al. (1997) Biomed. Pharmacother. 51:258–267). Im Gegensatz zu CD40-Signalisierung in NHL-Zellen und normalen B-Zellen führt CD40-Signalisierung zu Anhalten des Wachstums ("growth arrest") in EBV-transformierten Burkitt-Lymphom-Zelllinien (Fukuda et al. (2000) Viral Immunol. 13:215–229; Baker et al. (1998) Blood 92:2830–2843). Deshalb werden die Ergebnisse des Testens eines Antagonisten-anti-CD40 MAb (15B8) in den Xenotransplantat-Modellen nicht fähig sein, die Antwort auf den Antikörper (15B8) durch NHL-Patienten vorherzusagen.

**[0090]** Das andere Modell ist der in vitro-Wachstumshemmungs-Assay ("in vitro growth inhibition assay") von Lymphomzellen aus NHL-Patienten, der oben verwendet wurde. Der Vorteil ist, dass die Ergebnisse die Sensitivität der Lymphomzellen aus NHL-Patienten gegenüber dem getesteten Agens bzw. Wirkstoff (15B8) vorhersagen. Dennoch werden die Ergebnisse aus in vitro-Untersuchung unter definierten Bedingungen erhalten. Eine vorher veröffentlichte Untersuchung berichtete, dass ein Ratte-anti-Maus-CD40, der darin versagte, ADCC und CDC in vitro zu induzieren, gute Wirksamkeit in zwei syngenischen Maus-B-Lymphom-Modellen (BCL1 und A31) zeigte (Tutt et al. (1998) J. Immunol. 161:3176–3185). Die Anti-Tumor-Wirkung des Anti-Maus CD40 trat zeitlich langsamer auf als ein getesteter Anti-Id. Eine der Hypothesen war, dass der Anti-Maus-CD40 durch Blockieren kritischer Wachstumssignale, die abhängig von der Expression von Oberflächen-CD40 sind, nicht die Signalisierung, wie Anti-Id, in den getesteten Maus-Modellen, steuerte. Wenn getestet, band 15B8 nicht an die Fcγ-Rezeptoren und versagte dabei, ADCC und CDC in vitro zu induzieren (Daten nicht gezeigt), da er vom humanen IgG2-Subtyp ist. 15B8 hat zum Ratte-anti-Maus-CD40 ähnliche Eigenschaften. Diese Da-

ten unterstützen die Hypothese, dass 15B8 für NHL-Patienten, insbesondere Rituxan®-resistente Patienten, günstig sein wird.

#### Beispiel 3: Wirkung von 15B8 auf Proliferation maligner B-Zellen in vitro

**[0091]** Um zu testen, ob 15B8 das Wachstumssignal wie CD40L in vitro bereitstellt, wurden B-Zellen aus Tumor-infiltrierten Lymphknoten (NHL-Zellen) erhalten aus einem Antikörper-naiven, einem Rituximab-empfindlichen und einem Rituximab-resistenten NHL-Patienten. Die NHL-Zellen wurden unter vier unterschiedlichen Kulturbedingungen untersucht: kein zugesetzter Antikörper (Medium); Zusatz von humanem Isotyp-Antikörper IgG2 (Kontrolle; bezeichnet als hulgG2); Zusatz von Anti-CD40-Antikörper MS81 (agonistischer Antikörper), und Zusatz von 15B8. Alle Antikörper wurden bei 1, 2 und 5 µg/ml in der Anwesenheit oder der Abwesenheit von IL-4 getestet. Die NHL-Zellen aus zwei Patienten wurden, wie oben beschrieben, unter den gleichen vier Bedingungen in der Gegenwart von IL-4 (2 ng/ml) kultiviert. B-Zell-Proliferation wurde gemessen durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau, wie oben beschrieben.

**[0092]** Anti-CD40-Antikörper 15B8, bei Konzentrationen von 1, 2 und 5 µg/ml, stimulierte NHL-Zellen nicht, in entweder der Abwesenheit oder der Anwesenheit von IL-4 zu proliferieren. Im Gegensatz dazu stimulierte ein agonistischer Anti-CD40-Antikörper (MS81), getestet bei der gleichen Konzentration, NHL-Zellproliferation sowohl in der Gegenwart als auch der Abwesenheit von IL-4 in allen Patienten-Proben. Repräsentative Ergebnisse von einem Patienten sind in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt. Ergebnisse der NHL-Zellen aus den zwei Patienten in der Gegenwart von IL-4 und drei Patienten in der Abwesenheit von IL-4 waren vergleichbar. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass 15B8 kein Agonist-anti-CD40-Antikörper ist und Proliferation von NHL-Zellen aus Rituximab-empfindlichen, naiven oder Rituximab-resistenten NHL-Patienten in vitro nicht stimuliert.

**[0093]** FACS-Analyse der NHL-Zellen wurde entweder mit einem direkt markierten 15B8-FITC oder 15B8 plus Anti-hulgG2-FITC durchgeführt, um zu bestätigen, dass CD40 auf der Oberfläche der getesteten NHL-Zellen exprimiert wird und dass 15B8 an die NHL-Zellen bindet. Die NHL-Zellen aus 2 Rituximab-empfindlichen und 4 Rituximab-resistenten Patienten (6 Patienten insgesamt) wurden getestet. NHL-Zellen aus allen Patienten exprimierten CD40 und banden 15B8. Die 15B8-Bindungs-positive Zellpopulation in einem beliebigen gegebenen Patienten war etwa 66% bis 91%.

#### Beispiel 4: 15B8 inhibiert CD40L-stimulierte Proliferation von NHL-Zellen in vitro

**[0094]** Um die Fähigkeit von 15B8, das durch CD40L in vitro bereitgestellte Wachstumssignal zu blockieren, wurden NHL-Zellen aus Patienten, wie oben beschrieben, in Suspension über CD40L-exprimierenden Feeder-Zellen unter vier unterschiedlichen Bedingungen kultiviert: kein zugesetzter Antikörper (Medium); Zusatz von humanem Isotyp-Antikörper IgG2 (Kontrolle); Zusatz von Anti-CD40-Antikörper MS81 (agonistischer Antikörper); und Zusatz von 15B8. Alle Antikörper wurden zu Konzentrationen von 1, 2 und 5 µg/ml in der Gegenwart oder der Abwesenheit von IL-4 zugesetzt. Die NHL-Zellen aus 1 Antikörper-naiven, 2 Rituximab-empfindlichen und 5 Rituximab-resistenten Patienten (8 Patienten insgesamt) wurden unter den gleichen vier Bedingungen, wie oben beschrieben, in der Gegenwart von IL-4 (2 ng/ml) kultiviert. NHL-Zellen aus 3 Rituximab-empfindlichen und 4 Rituximab-resistenten Patienten (7 Patienten insgesamt) wurden unter ähnlichen Bedingungen in der Abwesenheit von IL-4 kultiviert. Die NHL-Zellproliferation wurde durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau gemessen.

**[0095]** Tabelle 1 zeigt die Hemmwirkung von 15B8 auf die Proliferation von NHL-Zellen aus 2 Rituximab-empfindlichen (Daten von einem Patienten reproduzierbar in zwei separaten Experimenten) und 4 Rituximab-resistenten Patienten (6 Patienten insgesamt), stimuliert durch CD40L alleine in vitro. Repräsentative Ergebnisse von den Zellen von einem Patienten (A) werden in [Fig. 3](#) gezeigt. 15B8 inhibierte die Proliferation um etwa 12–68%, im Vergleich zu der Kontrolle in den 6 Patienten. Der Grad der Inhibierung durch 15B8 variierte, abhängig von Patienten-Proben und dem Dosis-Level von 15B8. Statistische Analyse der Daten aus 6 der 7 getesteten Patienten-Proben zeigte, dass die Inhibierung von CD40L-stimulierter NHL-Zellproliferation durch 15B8 bei 1 µg/ml signifikant ist ( $p = 0,05$ ). Es gibt eine statistisch signifikante Dosis-Antwort ( $p < 0,005$ ), da die Hemmwirkung mit steigender 15B8-Dosis steigt.

Tabelle 1: Wirkung von 15B8 MAb auf CD40L-Stimulation von Proliferation von NHL-Patientenzellen in der Abwesenheit von IL-4.<sup>1</sup>

Patienten ID	Patienten-Typ <sup>2</sup>	Behandlungsdosis (µg/ml)	15B8 % Inhibierung <sup>3</sup>
A	CR	1	56,61
		2	58,99
		5	63,16
A	CR	1	61,69
		2	60,41
		5	64,75
		10	60,29
B	CR	1	Keine
		2	Keine
		5	Keine
		10	12,11
D	NR	1	52,22
		2	61,63
		5	68,04
		10	68,17
E	NR	1	13,07
		2	22,34
		5	31,04
		10	31,87
F	NR	1	24,51
		2	27,43
		5	38,71
		10	47,35
G	NR	1	11,12
		2	22,41
		5	30,61
		10	43,15

1. NHL-Zellen aus Patienten wurden kultiviert mit murinen L-Zellen, die humanes CD40L in Gegenwart von Medium, Agonist-anti-CD40 (MS81), Antagonist-anti-CD40 (15B8) oder hulgG2-Isotyp-Kontrolle in vitro exprimieren. Die Proliferation der NHL-Zellen wurde gemessen durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau (Daten aus einem Rituximabempfindlichen Patienten sind nicht in der Tabelle, weil die cpm von CD40L < 2000 sind).

2. Patienten-Antwort auf Anti-CD20-Mab-Therapie; CR, vollständig Antwortender ("complete responder"); NR, Nicht-Antwortender ("non-responder").

3. 15B8 % Inhibierung =  $100 - (15B8 \text{ cpm} / \text{hulgG2 cpm} \times 100)$ ; stellt den Mittelwert von 3 Bestimmungen dar.

**[0096]** Tabelle 2 (unten) zeigt die Hemmwirkung von 15B8 auf Proliferation von NHL-Zellen aus 1 Antikörper-naivem, 2 Rituximab-empfindlichen (Daten aus beiden Patienten-Proben wurden zweimal reproduzierbar wiederholt) und 5 Rituximab-resistenten Patienten (8 Patienten insgesamt), stimuliert durch sowohl CD40L als auch IL-4 in vitro. 15B8 inhibierte beim 1 µg/ml-Level die CD40L- und IL-4-vermittelte Proliferation der NHL-Zellen signifikant ( $p < 0,05$ ). Der Grad der Inhibierung reichte von 18–69% bei hoher Dosis (5 oder 10 µg/ml) in Proben aus allen 8 Patienten in vitro. Es gab eine statistisch signifikante Dosis-Antwort dieser Hemmwirkung durch 15B8 ( $p < 0,005$ ) bei einem 15B8-Konzentrationsbereich von 0,01–10 µg/ml. [Fig. 4](#) zeigt eine repräsentative Dosis-Wirkungs-Kurve bzw. Dosis-Antwort-Kurve ("dose response curve"). Diese in vitro-Ergebnisse deuten darauf hin, dass Behandlung mit 15B8 das CD40-vermittelte Wachstumssignal für NHL-Zellen in Patienten blockieren kann.

Tabelle 2: Wirkung von 15B8 Mab auf CD40L-Stimulation von NHL-Patientenzellen in Gegenwart von IL-4.<sup>1</sup>

Patienten ID	Patienten-Typ <sup>2</sup>	Behandlungsdosis (µg/ml)	15B8 % Inhibierung <sup>3</sup>
A	CR	1	34,39
		2	30,54
		5	36,42
A	CR	0,01	0,44
		0,04	23,32
		0,2	29,54
		1	35,38
		5	46,12
		10	48,63
C	CR	1	34,91
		2	40,89
		5	56,34
		10	69,21
C	CR	1	keine
		2	16,79
		5	21,64
		10	12,63
D	NR	1	1,95
		2	6,43
		5	20,95
		10	26,31
E	NR	1	1,91
		2	2,74
		5	28,36
		10	28,26
E	NR	1	keine
		2	11,76
		5	27,54
		10	34,07
G	NR	1	39,38
		2	32,74
		5	36,48
		10	37,78
H	NR	1	keine
		2	keine
		5	7,81
		10	18,47
I	Naiv	0,01	keine
		0,04	13,16
		0,2	15,64
		1	16,20
		5	21,53
		10	24,51

1. NHL-Zellen aus Patienten wurden kultiviert mit murinen L-Zellen, die humanes CD40L in Gegenwart von IL-4 (humanes Interleukin-4) bei 2 ng/ml unter in Tabelle 1 beschriebenen Bedingungen exprimierten.

2. Patienten-Antwort auf Anti-CD20 Mab-Therapie; CR, vollständig Antwortender; NR, Nicht-Antwortender; na-



iv, unbehandelt.

3. % Inhibierung im Vergleich zu hulG2. 15B8 % Inhibierung =  $100 - (15B8 \text{ cpm}/\text{hulG2 cpm} \times 100)$ .

Beispiel 5: 15B8 aktiviert humane periphere Blut-B-Zellen nicht und verursacht keine PBMC-Proliferation in vitro in Menschen, Schimpanse und Marmosette

**[0097]** Um zu bestimmen, ob es ein Agonist- oder Antagonist-anti-CD40 ist, wurde 15B8 in mehreren im Untenstehenden beschriebenen in vitro-Assays unter Verwendung von Zellen aus Menschen und fünf unterschiedlichen Primatenarten, einschließlich Schimpanse (chimp), Marmosette, Cynomologus-Affe, Rhesus-Affe und Pavian, getestet.

Tabelle 3: Stimulation von PBMC/B-Zell-Proliferation in Mensch Schimpanse und Marmosette durch 15B8-Antikörper.<sup>1</sup>

Art	Zellquelle	Anzahl Proben	Dosis (µg/ml)	hulG2-Basis	CD40L, X-fache Erhöhung <sup>3</sup>	15B8, X-fache Erhöhung <sup>2</sup>
Mensch	B	2	5	1	70,58/36,33	1,77/4,37
		2	1	1	70,58/36,33	3,1/5,4
		2	0,2	1	70,58/36,33	1,16/4,63
Mensch	PBMC	5	5	1	9,36-91,60	0,49-2,28
		15	1	1	9,36-91,60	0,35-2,38
		12	0,2	1	9,36-91,60	0,41-3,74
Marmosetten-Affe	PBMC	3	5	1	29,24-90,3	2,05-7,2
		5	1	1	7,99-90,3	1,35-5,79
Schimpanse	PBMC	1	5	1	10,15	2,46
		5	1	1	5,12-9,2	0,66-5,2

1. B-Zellen/PBMCs wurden in vitro in Gegenwart von CD40L, 15B8 oder hulG2-Isotyp-Kontrolle kultiviert.

2. Ergebnisse der Zellproliferation werden berichtet als das Verhältnis von <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau für 15B8 zu hulG2-Kontrolle. Daten aus einigen Proben wurden nicht in die Tabelle eingeschlossen wegen der durch CD40L (Positiv-Kontrolle) induzierten CPM < 2000.

3. Die X-fache Erhöhung ("fold increase") für CD40L, die in der Tabelle gezeigt wird, ist das Verhältnis der CD40L-cpm zu der cpm von hulG2 bei 5 µg/ml.

**[0098]** Bei B-Zell-Aktivierung wird eine Anzahl von Zelloberflächenproteinen hinaufreguliert (Denton et al. (1998) Pediatr. Transplant. 2:6–15; Evans et al. (2000) J. Immunol. 164:688–697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49:17–22; Lederman et al. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77–86). Um zu bestätigen, dass 15B8 humane B-Zellen nicht aktiviert und kein Agonisten-Signal induziert, wenn es an CD40 gebunden wird, wurde seine Fähigkeit, B-Zell-Aktivierungsmarker hinaufzuregulieren, durch FACS-Analyse unter Verwendung gereinigter humaner PBMC getestet. Es gab keine Hinaufregulierung in der Expression von Aktivierungsmarkern, wie CD25, CD69, CD86, HLA-DR und ICAM-1 (CD54) in 15B8-behandelten humanen B-Zellen (Tabelle 4). Der Spiegel bzw. Level dieser Marker war ähnlich, wenn die Zellen entweder mit 15B8 oder hulG2-Kontrolle behandelt wurden (Tabelle 4). Im Gegensatz dazu war CD69 in PBMC-Proben aus 3 getesteten gesunden Freiwilligen konsistent durch CD40L hinaufreguliert.

Tabelle 4: Wirkung von 15B8 auf Hinaufregulation von B-Zell-Aktivierungs-Markern in vitro durch FACS.

Art	Zellquelle	Inkubationszeit	Anzahl von Personen bzw. Subjekten	CD54	CD69	HLA-DR	CD25	CD80	CD86
Mensch	CD20 aus PBMC	4h -24h	3	-	-	-	-	N/A	-
Schimpanse	CD20 aus PBMC	4h -24h	3	N/A	-	N/A	N/A	N/A	N/A

1. "-" bedeutet keine Hinaufregulation.

2. "N/A" bedeutet nicht gemessen oder nicht erfolgreich.

**[0099]** Zusätzliche Folgen von B-Zell-Aktivierung sind Hinaufregulation von Oberflächen-FasL und Apoptose (Revy et al. (1998) Eur. J. Immunol. 28:3648–3654; Carey et al. (2000) Immunol. Rev. 176:105–115; Ju et al. (1999) Int. Rev. Immunol. 18:485–513; Baumgarth (2000) Immunol. Rev. 176:171–180). Um zu bestätigen, dass 15B8 kein agonistischer Anti-CD40-Antikörper ist, wurde seine Fähigkeit, FasL-Expression und Apoptose von humanen B-Zellen zu induzieren, auch getestet. Annexin V-Färbung auf der Zelloberfläche kann als ein früher Apoptose-Marker verwendet werden (Ju et al. (1999) Int. Rev. Immunol. 18:485–513). Humane B-Zellen wurden aus peripherem Blut gereinigt und mit 15B8 inkubiert. FACS-Analyse wurde verwendet, um Zellen mit positiver Färbung von Annexin V und Anti-FasL zu detektieren. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Oberflächenfärbung durch die zwei Reagentien zwischen Zellen, die mit 15B8 oder dem Isotyp-Kontroll (hulG2)-Antikörper inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass 15B8 keine Apoptose humaner B-Zellen in vitro induziert. Diese Daten stellen einen weiteren Beweis bereit, dass 15B8 kein Agonist-anti-CD40-Antikörper für humane B-Zellen ist.

**[0100]** 15B8 kreuzreagiert mit CD40, das auf der Oberfläche von CD20-positiven PBMCs von Primaten exprimiert wird. Um zu testen, ob 15B8 CD40 auf B-Zellen aus anderen Primatenarten, wie Schimpansen und Marmosetten, aktivieren kann, wurden dieselben Proliferations-Assays unter Verwendung frisch isolierter Schimpansen- und Marmosette-PBMC aus 15 Schimpansen und 5 Marmosetten ausgeführt. Ähnlich zu den Ergebnissen mit der humanen PBMC, stimulierte 15B8 die Proliferation in vitro von PBMCs aus 6 Schimpansen und 5 Marmosetten bei 1 und 5 µg/ml Konzentration nicht (Tabelle 3 oben). 15B8 regulierte auch die Expression von Aktivierungsmarker, CD69, in den drei getesteten Schimpansen-PBMC-Proben nicht hinauf (Tabelle 4). 15B8 zeigte keinerlei Wirkung auf FasL-Expression und Apoptose in Schimpansen-PBMCs, ähnlich zu humanen PBMC-Kontrollen nach 24 und 48 Stunden stimulation in vitro in allen Proben aus 6 getesteten Schimpansen (Daten nicht gezeigt).

**[0101]** Querverknüpfung von 15B8 durch einen auf eine Kunststoffoberfläche fixierten sekundären Antikörper erhöhte seine Potenz nicht, B-Zell-Proliferation zu stimulieren (Daten nicht gezeigt). Wenn unter Verwendung von PBMCs aus Menschen und Schimpansen in diesem Querverknüpfungs-Assay getestet wurde, stimulierte 15B8 Proliferation der Zellen nicht. Diese Beobachtung weist auf ein verringertes Risiko von 15B8 hin, anregend (d.h., agonistisch oder mit Agonistenaktivität) für B-Zell-Proliferation im Falle von Induktion von Anti-15B8 (HAHA) oder von Fc-Bindung oder andere Fc-Rezeptor-exprimierende Zellen zu sein, wenn in vivo verabreicht.

**[0102]** Zusammenfassend initiiert 15B8 kein Aktivierungssignal in humanen B-Zellen/PBMCs oder in Schimpanse/Marmosette-PBMCs in vitro. Deshalb ist 15B8 kein Agonist-anti-CD40-Antikörper in Mensch, Schimpansen und Marmosetten.

Beispiel 6: 15B8 ist ein Antagonist-anti-CD40-Antikörper in Menschen, Schimpansen und Marmosetten in vitro

**[0103]** Um zu bestimmen, ob 15B8 ein Antagonist-anti-CD40 ist, wurde seine Fähigkeit, CD40-CD40L-Wechselwirkung zu inhibieren, in einem CD40L-vermittelten Human-B-Zell-Proliferationsassay (Kwekkeboom et al. (1993) Immunology 79:439–444) getestet. Eine transfizierte CHO-Zelllinie, humanen CD40L exprimierend, wurde verwendet, um die Proliferation gereinigter humaner peripherer Blut-B-Zellen oder PBMCs zu stimulieren. Humane B-Zellen aus 10 gesunden Freiwilligen und humane PBMCs aus drei gesunden Freiwilligen wurden getestet. In allen getesteten Proben unterdrückte 15B8 Proliferation, vermittelt durch CD40L-exprimierende CHO-Zellen, um 42–88% bei einem Konzentrationsbereich von 0,2–5 µg/ml (Tabelle 5). [Fig. 5](#) zeigt eine repräsentative Dosis-Wirkungs-Kurve unter Verwendung von Zellen aus 3 Individuen. Die wirkungsfreie Dosis ("no-effect dose") von 15B8 ist 0,008 µg/ml und er erreicht Sättigungsdosis bei 0,2 µg/ml ([Fig. 5](#)). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass 15B8, als ein Antagonist-anti-CD40-Antikörper, die Wachstumssignale in humanen B-Zellen und PBMCs, die durch Zelloberflächen-exprimiertes CD40L bereitgestellt werden, inhibieren kann.

Tabelle 5: Inhibierung von CD40L-induzierter Proliferation von PBMCB-Zellen mit 15B8-Antikörper.<sup>1</sup>

Art	Zellquelle	Anzahl Proben	Dosis (µg/ml)	CD40L (Basis)	HuIgG2, % Inhibierung	15B8, % Inhibierung <sup>2</sup>
Mensch	B	7	5	100	(-27) - 14%	45 - 85%
		9	1	100	(-93) - 11%	42 - 87%
		6	0,2	100	(-20) - (-6)%	44 - 82%
Mensch	PBMC	1	5	100	13%	45%
		2	1	100	3 - 32%	76 - 88%
Marmosetten-Affe	PBMC	3	1	100	1 - 35%	68 - 84%
Schimpanse	PBMC	3	1	100	(-3) - 21%	55 - 73%

1. B-Zellen/PBMCs wurden in vitro mit CD40L-exprimierenden CHO-Zellen in Gegenwart von 15B8 oder hulgG2-Kontrolle kultiviert.

CD40L-transfizierte CHO-Zellen wurden vor den Experimenten mit Formaldehyd fixiert.

Die Proliferation von Zellen wurde durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau gemessen.

2. "15B8 % Inhibierung" =  $100 - (15B8 \text{ cpm}/CD40L \text{ cpm} \times 100)$ .

Daten aus einigen Proben sind nicht in der Tabelle, weil Proliferation, induziert durch CD40L (Positiv-Kontrolle) < 5-fach ist.

**[0104]** Zusätzliche Assays wurden unter Verwendung frisch isolierter PBMCs aus 9 Schimpansen und 3 Marmosetten ausgeführt. Wie mit den humanen PBMCs, war 15B8 fähig, die Proliferation von Schimpansen- und Marmosetten-PBMCs, stimuliert durch CD40L-exprimierende CHO-Zellen, bei 1 µg/ml Konzentrationslevel (Tabelle 5 oben) zu inhibieren. Die Inhibierung durch 15B8 war näherungsweise 55–73% und 68–84% in PBMC-Proben aus 3 Schimpansen bzw. 3 Marmosetten (Tabelle 5 oben).

**[0105]** Aktivierter B-Zellen durchlaufen eine Anzahl biologischer Antworten, wie Proliferation und Antikörper-Produktion. Die Aktivierung von B-Zellen durch T-Zell-abhängige Antigene bezieht CD4<sup>+</sup>T-Helfer (Th)-Zellen ein. Dieser T-Zell-Helfer-Prozess wird vermittelt durch eine konzertierte Anstrengung der Wechselwirkung von CD40 auf die B-Zellen mit dem CD40L auf die Oberfläche der Th-Zellen zusammen mit den Wechselwirkungen von anderen co-stimulatorischen Faktoren und Cytokinen (Denton et al. (1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6–15; Evans et al. (2000) *J. Immunol.* 164:688–697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17–22; Lederman et al. (1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3:77–86; Mackey et al. (1998) *J. Leukoc. Biol.* 63:418–428). Um zu testen, ob 15B8 T-Helferzell-vermittelte B-Zell-Antikörper-Produktion blockieren kann, wurden gereinigte humane periphere Blut-B-Zellen in der Gegenwart von gereinigten, bestrahlten T-Zellen, aktiviert mit Anti-CD3-Antikörper, kultiviert. Ein ELISA-Assay wurde verwendet, um den Level von IgM-Produktion zu messen. 15B8 reduzierte IgM-Produktion um etwa 30% in diesem Assay (Daten nicht gezeigt). Deshalb kann 15B8 T-Zell-vermittelte B-Zell-Immunglobulin-Produktion verringern.

**[0106]** Zusammenfassend inhibiert 15B8 CD40L-induzierte B-Zell-/PBMC-Proliferation in Mensch, Schimpanse und Marmosette, und inhibiert T-Zell-induzierte Antikörper-Produktion durch gereinigte humane B-Zellen in vitro. Diese Daten zeigen, dass 15B8 ein Antagonist-anti-CD40-Antikörper in humanen B-Zellen und PBMCs aus Schimpansen und Marmosetten in vitro ist.

Beispiel 7: 15B8 ist ein Agonist-anti-Affe (Cynomologus, Rhesus und Pavian) CD40-Antikörper in vitro

**[0107]** FACS-Analyse zeigt, dass 15B8 an CD40, exprimiert auf der Oberfläche von B-Zellen aus peripherem Blut von Affen (Rhesus, Cynomologus und Pavian), bindet. Die Wirkung von 15B8 auf frisch isolierte Cynomologus-Affe-PBMC wurde im gleichen Proliferationsassay, der oben für Mensch und Schimpansen beschrieben wurde, getestet (Coligan et al. (1998) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) *Immunology* 79:439–444). Im Gegensatz zu humanen PBMC wurde gefunden, dass 15B8 Cynomologus-Affe-PBMC stimuliert, in vitro zu proliferieren, wie gemessen durch <sup>3</sup>H-Methylthymidin-Einbau (Tabelle 6 unten). Bei 1 µg/ml-Level stimulierte 15B8 die Proliferation der PBMCs um das 6fache bis 129,7-Fache, im Vergleich zu der hulgG2-Kontrolle in den 22 Proben aus 17 getesteten Affen (5 Proben von Affen wurden zweimal getestet) (Tabelle 6 unten). Bei einem 5µg/ml-Level ist die durch 15B8 stimulierte Proliferation 14-fach bis 24-fach in vier Proben aus 2 Affen und etwa 1,25fach oder 1,85-fach in zwei Proben aus 2 Affen (Tabelle 6). Dies deutet darauf hin, dass 15B8 beim Konzentrations-Level von 5 µg/ml am Limit der Übersättigungs-Dosis für seine Proliferations-Stimulationswirkung auf PBMCs aus Cynomologus-Affe sein kann. Weitere FACS-Analyse von B-Zellen auf Aktivierungsstatus durch Oberflächenmarker wies darauf hin, dass 15B8 CD69-, CD86- und

HLA-DR-Hinaufregulation auf Affen-B-Zellen induziert (Tabelle 7). Diese Daten deuten darauf hin, dass 15B8 ein Agonist-Antikörper zu CD40, exprimiert auf peripheren Blut-B-Zellen aus Cynomologus-Affen, in vitro ist.

**[0108]** Um zu bestätigen, dass diese agonistische Wirkung von 15B8 nicht Cynomologus-Affen-spezifisch ist, wurden die gleichen Assays unter Verwendung von PBMCs aus Rhesus-Affen und Pavianen durchgeführt. Es wurden ähnliche Ergebnisse, zu denen, die von Cynomologus-Affen erhalten wurden, beobachtet, wie in Tabelle 6 gezeigt. 15B8-stimulierte Proliferation von PBMCs aus Rhesus-Affen und Pavianen in vitro (Tabelle 6). Die Agonistenaktivität von 15B8 wird unter Verwendung der PBMCs aus 5 Rhesus-Affen und 3 Pavianen gezeigt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Proliferation von PBMCs aus Mensch Cynomologus- und Rhesus-Affen und Pavianen, stimuliert durch 15B8.<sup>1</sup>

Art	Zellquelle	Anzahl Proben	Dosis (µg/ml)	hulG2-Basis	CD40L, X-fache Erhöhung <sup>3</sup>	15B8, X-fache Erhöhung <sup>2</sup>
Mensch	PBMC	5	5	1	9,36 - 91,60	0,49 - 2,28
		15	1	1	9,36 - 91,60	0,35 - 2,38
		12	0,2	1	9,36 - 91,60	0,41 - 3,74
Rhesus-Affe	PBMC	5	1	1	12,71 - 89,67	27,34 - 50,9
Cynomologus-Affe	PBMC	6	5	1	14,57 - 124,01	1,25 - 24,53
		22	1	1	5,15 - 167,73	6,13 - 129,74
		3	0,2	1	77,01 - 124,01	0,9 - 67,56
Pavian	PBMC	3	1	1	5,19 - 175,07	3,32 - 113,28

1. PBMCs wurden in vitro in Gegenwart von CD40L, 15B8 oder hulG2-Kontrolle kultiviert.

2. Die Proliferationsergebnisse werden berichtet als das Verhältnis von <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau für 15B8 zu hulG2-Kontrolle.

Daten aus einigen Proben sind nicht in der Tabelle wegen der durch CD40L (Positiv-Kontrolle) induzierten CPM < 2000.

3. Die X-fache Erhöhung für CD40L, die in der Tabelle gezeigt wird, ist das Verhältnis der CD40L-cpm zu der cpm von hulG2 bei 5 µg/ml.

CD40L-transfizierte CHO-Zellen wurden vor den Experimenten mit Formaldehyd fixiert.

Tabelle 7: Wirkung von 15B8 auf Hinaufregulation von B-Zell-Aktivierungsmarkern in vitro durch FACS-Analyse.

Art	Zellquelle	Inkubationszeit	Anzahl von Personen bzw. Subjekten	CD54	CD69	HLA-DR	CD25	CD80	CD86
Mensch	CD20 aus PBMC	4h -24h	3	-	-	-	-	N/A	-
Cynomologus-Affe	CD20/19 aus PBMC	4h -3 Tage	2	N/A	1/2 hinauf	1,1 hinauf (Tag 3)	-	-	1/1 hinauf (Tag 3)

1. "-" bedeutet keine Hinaufregulation.

2. "N/A" bedeutet nicht gemessen oder nicht erfolgreich.

3. Nur Zellen aus einem Cynomologus-Affen wurden am Tag 3 wegen begrenzter Zellzahl durch FACS untersucht.

Beispiel 8: 15B8 ist ein Antagonist-anti-CD40-Antikörper in vivo in Cynomologus-Affen

**[0109]** 15B8 kann Proliferation und Hinaufregulation von Zelloberflächen-Aktivierungsmarkern in PBMCs aus Cynomologus-Affen in vitro stimulieren. Um zu bestimmen, ob 15B8 ein Agonist-anti-CD40-Antikörper in diesen Affen in vivo ist, wurde eine Studie durchgeführt, um die Bioverteilung ("biodistribution") von 15B8 und das Schicksal betroffener peripherer B-Zellen (d.h., Extravasation, Apoptose, Aktivierungsstatus oder Komple-

ment-Lyse) zu untersuchen [Biodistribution of 15B8. 72 Antibodies following Intravenous Administration to Non-Naive Male and Female Cynomolgus Monkeys (SNBL.218.3, SNBL USA)].

**[0110]** Cynomolgus-Affen (ein Weibchen und zwei Männchen) erhielten eine einzelne intravenöse Verabreichung von 3 mg/kg 15B8. Die folgenden Parameter wurden überwacht: klinische Anzeichen, Nahrungsaufnahme, Körpergewicht, Pharmakokinetiken, Serumkomplement (CH50), Durchflusszytometrie für B-Zellen (einschließlich apoptotische B-Zellen), T-Zellen und Monozyten. B-Zell-CD40-Rezeptorsättigung mit 15B8 wurde auch gemessen. Die Tiere wurden 24 Stunden nach Erhalten der einzelnen Dosis von 15B8 nekropsiert, und die Standardorgane wurden gewogen. Vor der Studie wurden operative Biopsien von Milz und Achsel-Lymphknoten genommen, um als Basislinien-Kontrollen zu dienen. Bei der Nekropsie wurden Proben von lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben für die Histopathologie und Immunohistochemie genommen. Gewebe wurden mit Antikörpern gegen CD3-, CD40-, CD20-, CD27- und CD38-Antigene immungefärbt. Vorläufige Ergebnisse der Studie werden im Nachstehenden diskutiert.

**[0111]** Alle Tiere überlebten bis zur planmäßigen Nekropsie, und es gab keine Wirkungen auf Nahrungsaufnahme, Körpergewicht, CH50-Spiegel oder auf periphere Blut-T-Zell- oder Monozyten-Zahlen. Es gab keine Änderungen bei Organgewichten. Mikroskopische Untersuchung der Milz zeigte moderate diffuse folliculäre Hyperplasie mit Nekrose und/oder neutrophilen Infiltraten in die Keimzentren aller 15B8-behandelten Tiere. Untersuchung von mesenterialen und inguinalen Lymphknoten offenbarte milde bzw. leichte folliculäre Hyperplasie in 2 von 3 Tieren. In anderen Geweben (Leber, Haut, Hirn, Schilddrüse, Lunge, Knochenmark, Nebenniere und Niere) wurden keine behandlungsbezogenen mikroskopischen Wirkungen gesehen bzw. festgestellt.

**[0112]** Immunfärbung mit CD20-, CD27-, CD40- und CD86-Antikörpern offenbarten Erhöhungen bei diesen Markern in Milz- und Lymphknotenfollikeln, die mit der in diesen gleichen Geweben festgestellten folliculären Hyperplasie korrelierten. Erhöhte Färbung von CD20 und CD40 war begrenzt auf die Milz und die Lymphknoten, wohingegen es etwas zusätzliche Färbung von Lebergewebe mit CD27 und von Leber-Kupffer-Zellen und Entzündungszellen durch CD86 gab. CD86-Färbung war auch in thymischen Markzellen und interstitialen Nebennieren-Leukozyten erhöht. Es gab keine Änderungen bei der Immunfärbung von CD3 in 15B8-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrollen.

**[0113]** Diese Befunde zeigen, dass eine einzelne Dosis von 3 mg/kg von 15B8, die einem Cynomolgus-Affen verabreicht wird, Proliferation lymphoider Follikel und/oder Weiterverteilung ("redistribution") von B-Zellen vom peripheren Blut in Milz und Lymphknoten innerhalb einer 24-Stunden-Periode verursachen kann. Antikörper gegen CD20, CD27, CD40 und CD86 erkennen Antigene, die auf B-Zellen und/oder aktivierten B-Zellen, zusammen mit der Erkennung von anderen Zelltypen, exprimiert werden. Erhöhte Anzahlen von Zellen, die diese Antigene exprimieren, wurden in der Milz und den Lymphknoten von behandelten Tieren festgestellt, was auf eine Erhöhung der Anzahl aktivierter CD20+ B-Zellen hindeutet. Diese Studie deutet darauf hin, dass 15B8 ein Agonist-anti-CD40-Antikörper in Cynomolgus-Affen in vivo ist. Die in vitro und in vivo erhaltenen Ergebnisse sind in Cynomolgus-Affen konsistent.

#### Beispiel 9: Wirkung von 15B8 auf periphere B-Zellen in Schimpansen

**[0114]** Zwei Gruppen von 3 männlichen Schimpansen erhielten entweder 0,03 mg/kg oder 3 mg/kg 15B8 durch intravenöse Verabreichung. 15B8-Serumkonzentrationen und periphere B-Zellzahlen wurden sofort nach 15B8-Verabreichung und bis Tag 29 nach der Dosierung ("post-dose") überwacht. Die Ergebnisse des Experiments sind in [Fig. 6](#) gezeigt. Nach Verabreichung von 15B8 bei 3 mg/kg nahmen die 15B8-Serumkonzentrationen in einem dreiphasigen Muster, umfassend eine kurze Verteilungsphase, eine log-lineare Eliminationsphase und eine nichtlineare Eliminationsphase, ab. Die nicht-lineare Eliminationsphase herrschte bei Konzentrationen unter näherungsweise 10 µg/ml vor. Die Halbwertszeit während der log-linearen Phase war näherungsweise 4 Tage. Periphere B-Zellzahlen nahmen sofort nach 15B8-Verabreichung ab und erholten sich innerhalb von 3–4 Wochen wieder. 15B8 wurde im Serum, gebunden an CD40-Oberflächen-Rezeptoren auf zirkulierenden B-Zellen, detektiert. Das Ausmaß der Bindung schien von Tag 2 bis Tag 8 nach der Dosierung relativ unverändert zu bleiben und nahm anschließend bis Tag 29 nach der Dosierung ab. Nach Verabreichung von 15B8 bei 0,03 mg/kg schienen B-Zellen bei 30 Minuten leicht abzunehmen, kehrten aber innerhalb von 4 Stunden wieder auf Werte vor der Dosierung ("pre-dose values") zurück. 15B8-Serumkonzentrationen waren 30 Minuten nach der Dosierung unterhalb der Detektionsgrenze.

#### Beispiel 10: ELISA-Assay zur Immunglobulin-Quantifizierung

**[0115]** Die Konzentrationen von humanem IgM und IgG werden durch ELISA-Assays bestimmt. 96-Well-ELI-

SA-Platten werden 16 Stunden lang bei 4°C mit 4 µg/ml Anti-Human IgG mAb oder mit 1,2 µg/ml Anti-Human IgM mAb in 0,05 M Carbonatpuffer (pH = 9,6) beschichtet. Die Platten werden dreimal mit PBS-0,05% Tween-20 (PBS-Tween) gewaschen und eine Stunde lang mit BSA gesättigt. Nach zwei Waschungen werden die Platten eine Stunde lang bei 37°C mit unterschiedlichen Verdünnungen der Testproben inkubiert. Nach drei Waschungen wird gebundenes Ig durch Inkubation bei 37°C für eine Stunde mit 1 µg/ml Peroxidasemarkiertem Maus-anti-Human-IgG-mAb oder Maus-anti-Human-IgM-mAb detektiert. Platten werden viermal gewaschen, und die gebundene Peroxidase-Aktivität wird durch den Zusatz von o-Phenylendiamin als einem Substrat gezeigt.

## SCHLUSSFOLGERUNGEN

### Zusammenfassung der in vitro-Assays

**[0116]** Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass 15B8 ein agonistischer Anti-CD40-Antikörper in Cynomolgus- und Rhesus-Affen und Pavianen und ein antagonistischer Antikörper in Menschen, Schimpansen und Marmosetten ist. Die Experimente, die abgeschlossen wurden, sind in den untenstehenden Tabellen zusammengefasst.

Tabelle 8: Assays, die agonistische Aktivität messen

Assay	Methodik	Getestete Art bzw. Spezies (agonistische Aktivität + oder -)
Wirkung von 15B8 auf B-Zell-Proliferation	<sup>3</sup> H-Thymidin-Einbau von gereinigten B-Zellen aus dem peripheren Blut in Gegenwart von 15B8, verglichen mit Einbau in Gegenwart von CD40L oder eines agonistischen Antikörpers 626.1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mensch (-)</li> </ul>
Wirkung von 15B8 auf PBMC-Proliferation	<sup>3</sup> H-Thymidin- Einbau von PBMCs in Gegenwart von 15B8, verglichen mit Einbau in Gegenwart von CD40L oder der Isotyp-Kontrolle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mensch (-)</li> <li>• Schimpanse (-)</li> <li>• Cynomologus-Affe (+)</li> <li>• Rhesus-Affe (+)</li> <li>• Pavian (+)</li> <li>• Marmosette (-)</li> </ul>
Wirkung von 15B8 auf Hinaufregulation von B-Zell-Aktivierungsmarkern	Gemessene Hinaufregulation bei der Expression von B-Zell-Aktivierungsmarkern in PBMCs, stimuliert durch 15B8 oder seine Isotyp-Kontrolle unter Verwendung von FACS-Analyse; Wirkung von 15B8, verglichen mit der der Isotyp-Kontrolle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mensch (-)</li> <li>• Schimpanse (-)</li> <li>• Cynomologus-Affe (+)</li> <li>• Rhesus-Affe (+)</li> <li>• Pavian (+)</li> <li>• Marmosette (-)</li> </ul>
Wirkung von 15B8, querverknüpft mit einem sekundären Antikörper, fixiert an einer Kunststoffoberfläche, auf PBMC-Proliferation	<sup>3</sup> H-Thymidin- Einbau in Gegenwart von 15B8, querverknüpft mit zweitem Antikörper, verglichen mit Einbau in Gegenwart von CD40L, 15B8 alleine oder der Isotyp-Kontrolle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mensch (-)</li> <li>• Schimpanse (-)</li> </ul>
Wirkung von 15B8 auf Hinaufregulation von FasL und Apoptose	Hinaufregulation bei der Expression von FasL und Apoptose, gemessen durch FACS-Detektion von B-Zellen mit positiver Färbung von bzw. durch Anti-FasL und Annexin V (Marker für Apoptose) durch die Stimulation von CD40L, 15B8 und der Isotyp-Kontrolle.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mensch (-)</li> <li>• Schimpansen (-)</li> <li>• Cynomologus-Affe (-/+)</li> </ul>



Tabelle 9: Assays, die antagonistische Aktivität messen

Assay	Methodik	Getestete Art bzw. Spezies (agonistische Aktivität + oder -)
Inhibierung von CD40L-vermittelter B-Zell-Proliferation durch 15B8	Stimulation von B-Zell-Proliferation durch CD40L-exprimierende CHO-Zellen wurde gemessen durch $^3\text{H}$ -Thymidin- Einbau. $^3\text{H}$ -Thymidin- Einbau in Gegenwart von 15B8, verglichen mit der in Gegenwart von Isotyp-Kontrolle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mensch (+)</li> <li>• Marmosette (+)</li> <li>• Schimpansen (+)</li> </ul>
Inhibierung von T-Helferzellen-vermittelter B-Zell-Antikörper-Produktion durch 15B8	B-Zellen wurden kultiviert mit bestrahlten T-Zellen, aktiviert mit Anti-CD3-Antikörper in der Gegenwart von 15B8. Der Level von B-Zell-IgM-Produktion wurde durch ELISA beurteilt.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mensch (+)</li> </ul>

**[0117]** 15B8 ist ein spezifischer monoklonaler Anti-Human-CD40-Antikörper ("anti-human CD40 specific monoclonal antibody") mit Human-IgG<sub>2</sub>-Subtyp und mit Kreuzreaktivität zu CD40 nur aus nicht-humanen Primaten. Durch ausgiebiges in vitro-Testen wurde gezeigt, dass 15B8 ein Antagonist-anti-CD40 zu dem CD40, das auf humanen B-Zellen, PBMCs aus Mensch, Schimpanse und Marmosette exprimiert wird, ist. Jedoch wurde gezeigt, dass 15B8 Agonistenaktivität hat, wenn es an das CD40, das auf PBMCs aus Affen (Cynomologus, Rhesus und Pavian) exprimiert wird, in vitro gebunden ist. Diese Agonistenaktivität von 15B8 wurde in vivo in Cynomologus-Affen bestätigt. 15B8 hatte keine Agonistenaktivität in der Gegenwart oder Abwesenheit von IL-4, wenn in Primärkulturen von Lymphomzellen aus Rituxanempfindlichen und resistenten NHL-Patienten getestet wurde. 15B8 kann auch CD40L-stimuliertes Wachstum der Lymphom-Zellen aus der ähnlichen bzw. gleichen Gruppe von Patienten unter beiden Bedingungen inhibieren. 15B8 hat das Potential, B-Zell-Malignitäten, wie Nicht-Hodgkin-Lymphom (NHL) zu modifizieren, wobei der CD40/CD40L-Weg ("CD40/CD40L pathway") eine Rolle bei der Pathogenese der Krankheiten spielen kann.

**[0118]** Alle Veröffentlichungen und Patentanmeldungen, die in der Beschreibung genannt sind, lassen den Stand der Fachleute in dem Gebiet, das diese Erfindung betrifft, erkennen. Fachleute in dem Gebiet werden viele Entsprechungen zu den spezifischen Ausführungsformen der hierin beschriebenen Erfindung erkennen oder fähig sein, sie unter Verwendung von nicht mehr als Routineexperimenten zu bestimmen. Es ist beabsichtigt, dass solche Entsprechungen durch die folgenden Ansprüche umfasst werden.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Chu, Keting  
Masuoka, Lorianne

<120> **Verfahren zur Therapie von  
B-Zellmalignitäten**

<130> PP18094.001

<150> 60/237,556

<151> 2000-10-02

<160> 4

<170> FastSEQ für Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(336)

<400> 1

gat att gtg atg acc cag tct cca ctc tct ctg tcc gtc gcc cct gga	48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly	
1 5 10 15	

cag ccg gcc tcc atc tcc tgt aag tct agt cag agc ctc ctg gag agt	96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser	
20 25 30	

tat gga gag acc tat ttg tat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag cct	144
Tyr Gly Glu Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro	
35 40 45	

cca cag ctc ctg atc tat gca gtt ttt aag cgg ttc tct gga gtg cca	192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Val Phe Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro	
50 55 60	

gat agg ttc agt ggc agc ggg tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc	240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	
65 70 75 80	

agc cgg gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac tgc atg caa agt	288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser	
85 90 95	

atg cag ctt cct ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa	336
Met Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105 110	

<210> 2

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly	
1 5 10 15	
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Glu Ser	
20 25 30	

Tyr Gly Glu Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
                   35                  40                  45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Val Phe Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro  
           50                  55                  60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
   65                  70                  75                  80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser  
                   85                  90                  95  
 Met Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
           100                  105                  110

<210> 3  
 <211> 366  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)...(366)

<400> 3  
 cag gtg cag ctg cag gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
   1                  5                  10                  15  
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc aat aac ttt 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Phe  
                   20                  25                  30  
 ggc ata cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144  
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                  40                  45  
 gca gtt ata tca tat gat gga agt gat aaa tat tat gca gac tcc gtg 192  
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
           50                  55                  60  
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg aat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asn  
   65                  70                  75                  80  
 ctg caa atg aat agt ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95  
 gcg aga gat cgt cgg tat tac tac cac tac tac ggt atg gac gtc tgg 336  
 Ala Arg Asp Arg Arg Tyr Tyr Tyr His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp  
           100                  105                  110  
 ggc caa ggg acc atg gtc acc gtc tcc tca 366  
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
           115                  120

<210> 4  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
   1                  5                  10                  15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Phe  
           20                  25                  30  
 Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
           35                  40                  45  
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50						55						60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Asn	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Asp	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	His	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	
			100					105					110			
Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
		115					120									

### Patentansprüche

1. Verwendung eines humanen monoklonalen Anti-CD40-Antikörpers oder eines Antigen-bindenden Fragments davon bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Krankheit, die maligne B-Zellen umfasst, wobei der monoklonale anti-CD40-Antikörper oder das Fragment davon frei von signifikanter Agonistenaktivität ist, wenn der Antikörper oder das Fragment davon ein CD40-Antigen an einer normalen humanen B-Zelle bindet, und wobei der Anti-CD40-Antikörper oder das Fragment davon Antagonistenaktivität aufweist, wenn der Antikörper oder das Fragment davon ein CD40-Antigen an einer malignen humanen B-Zelle bindet, wobei der humane monoklonale anti-CD40-Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) dem monoklonalen Antikörper, der durch die Hybridomzelllinie 15B8 produziert wird;
- b) einem monoklonalen Antikörper, der eine Aminosäuresequenz umfasst, die aus der Gruppe, die aus SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 4 besteht, ausgewählt ist;
- c) einem monoklonalen Antikörper, der eine Aminosäuresequenz hat, die durch ein Nucleinsäuremolekül codiert wird, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3 besteht; und
- d) einem monoklonalen Antikörper, wobei der monoklonale Antikörper ein Fragment eines monoklonalen Antikörpers, der in a), b) oder c) angeführt ist, ist und das Fragment die Fähigkeit, spezifisch an humanes CD40 zu binden, beibehält, wobei die Behandlung eine positive therapeutische Antwort bei dem Patienten fördert.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der humane Anti-CD40-Antikörper oder das Fragment davon Antagonistenaktivität aufweist, wenn der Antikörper oder das Fragment davon das CD40-Antigen an der normalen humanen B-Zelle bindet.

3. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der humane Anti-CD40-Antikörper eine Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von wenigstens etwa  $10^{-5}$  M hat.

4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei der humane Anti-CD40-Antikörper eine  $K_d$  von wenigstens etwa  $10^{-8}$  M bis etwa  $10^{-20}$  M hat.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei der humane Anti-CD40-Antikörper eine  $K_d$  von wenigstens etwa  $5 \times 10^{-9}$  M bis etwa  $10^{-16}$  M hat.

6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der humane Anti-CD40-Antikörper der monoklonale Antikörper ist, der durch die Hybridomzelllinie 15B8 produziert wird.

7. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die malignen B-Zellen ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus B-Zell-Lymphom-Zellen, Nicht-Hodgkin-Lymphom-Zellen, schnell wachsenden B-Zell-Lymphom-Zellen, intermediär wachsenden B-Zell-Lymphom-Zellen, langsam wachsenden B-Zell-Lymphom-Zellen, akuten lymphoblastischen B-Zell-Leukämie-Zellen, multiplen Myelom-Zellen, chronischen lymphozytische Leukämie-Zellen, myeloblastischen Leukämie-Zellen und Hodgkin-Krankheit-Zellen.

8. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Behandlung die Verabreichung wenigstens einer therapeutisch wirksamen Dosis einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die den humanen monoklonalen Anti-CD40-Antikörper oder das Fragment davon umfasst, an den Patienten umfasst.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die therapeutisch wirksame Dosis des humanen monoklonalen Anti-CD40-Antikörpers oder des Fragments davon im Bereich von etwa 0,01 mg/kg bis etwa 40 mg/kg liegt.

10. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Behandlung Verabreichung von

mehreren therapeutisch wirksamen Dosen des humanen monoklonalen Anti-CD40-Antikörpers oder des Fragments davon umfasst.

11. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Antigen-bindende Fragment ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem Fab-Fragment, einem  $F(ab')_2$ -Fragment, einem Fv-Fragment und einem Einzelketten-Fv-Fragment.

12. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Proliferation der malignen humanen B-Zellen inhibiert wird, wenn der Anti-CD40-Antikörper oder das Antigen-bindende Fragment davon an CD40-Antigen an der malignen humanen Zelle bindet.

13. In vitro-Verfahren zur Inhibierung der Proliferation von malignen Zellen einer B-Zelllinie, wobei das Verfahren In-Kontakt-Bringen der malignen Zellen mit einer wirksamen Menge eines humanen monoklonalen Anti-CD40-Antikörpers oder einem Antigen-bindenden Fragment davon umfasst, wobei der Antikörper oder das Fragment davon frei von signifikanter Agonistenaktivität ist, wenn der Antikörper oder das Fragment ein CD40-Antigen an einer normalen humanen B-Zelle bindet, wodurch, wenn der Antikörper oder das Fragment davon an CD40-Antigen an den malignen Zellen bindet, die Proliferation der malignen Zellen inhibiert wird, wobei der humane monoklonale Anti-CD40-Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) dem monoklonalen Antikörper, der durch die Hybridomzelllinie 15B8 produziert wird;
- b) einem monoklonalen Antikörper, der eine Aminosäuresequenz umfasst, die aus der Gruppe, die aus SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 4 besteht, ausgewählt ist;
- c) einem monoklonalen Antikörper, der eine Aminosäuresequenz hat, die durch ein Nucleinsäuremolekül codiert wird, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3 ausgewählt ist; und
- d) einen monoklonalen Antikörper, wobei der monoklonale Antikörper ein Fragment eines monoklonalen Antikörpers, der in a), b) oder c) angeführt ist, ist, und das Fragment die Fähigkeit, spezifisch an humanes CD40 zu binden, beibehält.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die malignen Zellen aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus B-Zell-Lymphom-Zellen, Nicht-Hodgkin-Lymphom-Zellen, schnell wachsenden B-Zell-Lymphom-Zellen, intermediär wachsenden B-Zell-Lymphom-Zellen, langsam wachsenden B-Zell-Lymphom-Zellen, akuten lymphoblastischen B-Zell-Leukämie-Zellen, multiplen Myelom-Zellen, chronischen lymphozytische Leukämie-Zellen, myeloblastischen Leukämie-Zellen und Hodgkin-Krankheit-Zellen besteht.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, wobei der humane Anti-CD40-Antikörper eine Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) von wenigstens etwa  $10^{-5}$  M hat.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei der humane Anti-CD40-Antikörper eine  $K_d$  von wenigstens etwa  $10^{-8}$  M bis etwa  $10^{-20}$  M hat.

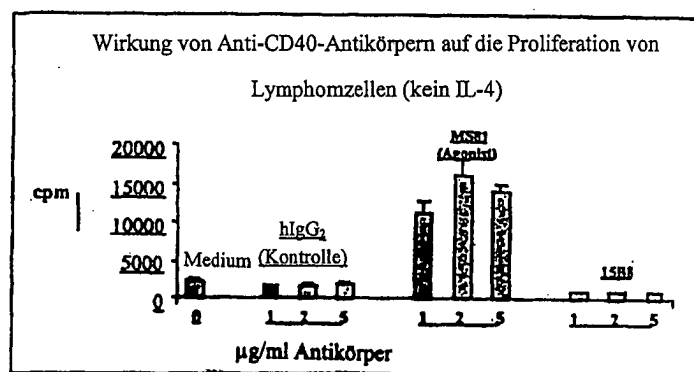
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der humane Anti-CD40-Antikörper eine  $K_d$  von wenigstens etwa  $5 \times 10^{-9}$  M bis etwa  $10^{-16}$  M hat.

18. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, wobei der humane monoklonale Anti-CD40-Antikörper der monoklonale Antikörper ist, der durch die Hybridomzelllinie 15B8 produziert wird.

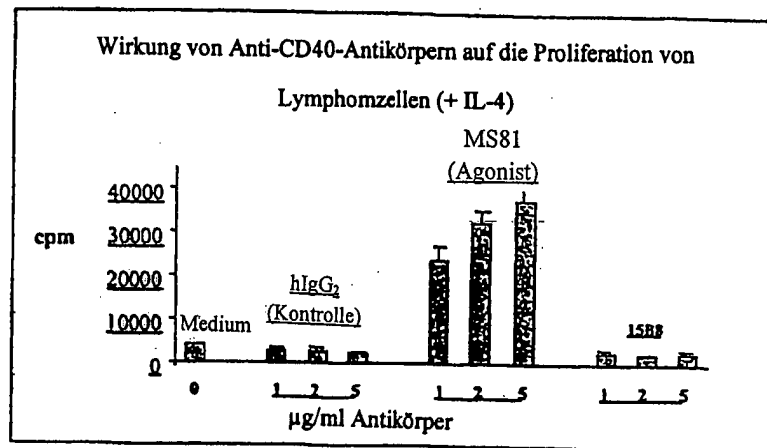
Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

FIGUR 1

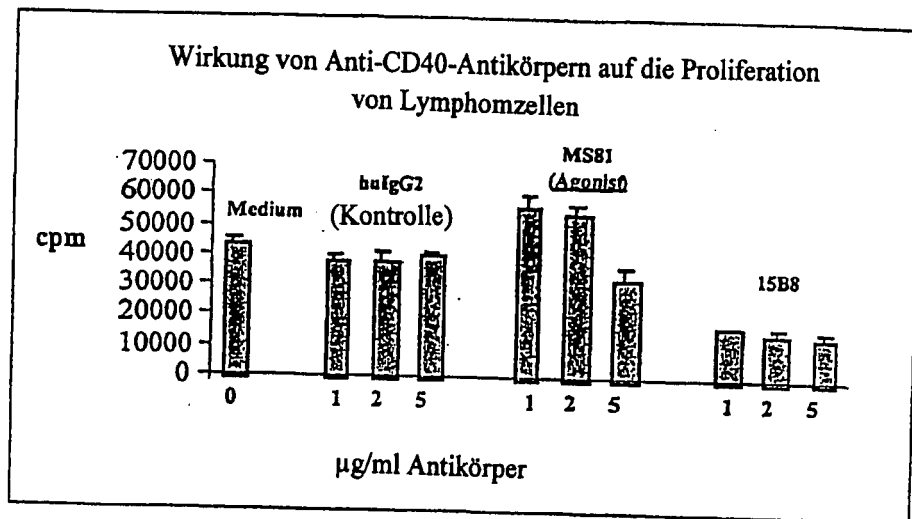


FIGUR 2

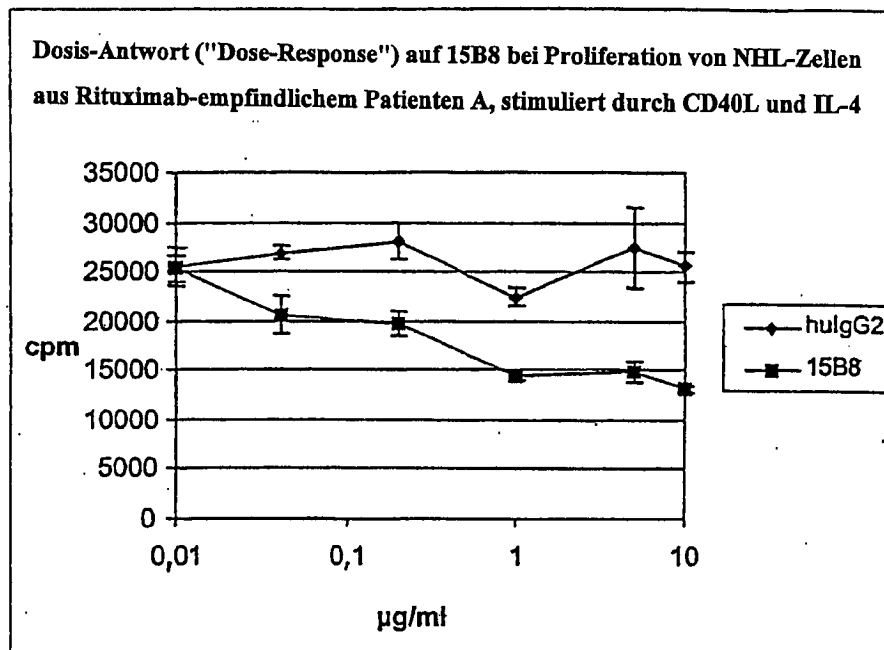




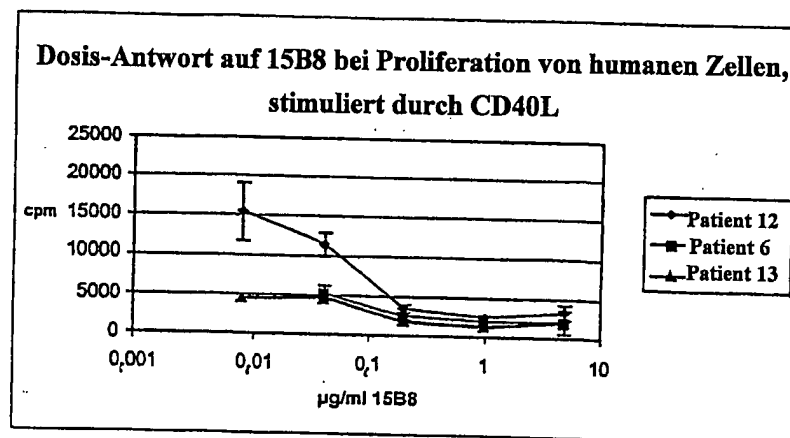
FIGUR 3



FIGUR 4



FIGUR 5



FIGUR 6

