

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4271440号
(P4271440)

(45) 発行日 平成21年6月3日(2009.6.3)

(24) 登録日 平成21年3月6日(2009.3.6)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 07 K 16/28	(2006.01) C 07 K 16/28
A 61 K 39/395	(2006.01) A 61 K 39/395 N
C 12 P 21/08	(2006.01) A 61 K 39/395 H
	C 12 P 21/08

請求項の数 3 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2002-532486 (P2002-532486)
(86) (22) 出願日	平成13年10月2日 (2001.10.2)
(65) 公表番号	特表2004-517611 (P2004-517611A)
(43) 公表日	平成16年6月17日 (2004.6.17)
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/030857
(87) 国際公開番号	W02002/028904
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002.4.11)
審査請求日	平成16年9月30日 (2004.9.30)
(31) 優先権主張番号	60/237,556
(32) 優先日	平成12年10月2日 (2000.10.2)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	591076811 ノバルティス バクシンズ アンド ダイ アグノスティックス, インコーポレーテッ ド アメリカ合衆国, カリフォルニア 946 08, エミリービル, ホートン ストリー ト 4560
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト抗CD40抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトB細胞の表面で発現されるヒトCD40抗原に特異的に結合し得るヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

該モノクローナル抗体または抗原結合フラグメントが、アゴニスト活性を有さず、これによって、該モノクローナル抗体または抗原結合フラグメントが、該B細胞の表面上で発現されるCD40抗原に結合する場合、該B細胞の増殖が阻害され、

ここで、該モノクローナル抗体が、配列番号17に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号13に示されるアミノ酸配列を含む重鎖と、を含む、

ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項2】

ヒトB細胞の表面で発現されるヒトCD40抗原に特異的に結合し得るヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

該モノクローナル抗体または抗原結合フラグメントが、アゴニスト活性を有さず、これによって、該モノクローナル抗体または抗原結合フラグメントが、該B細胞の表面上で発現されるCD40抗原に結合する場合、該B細胞の増殖が阻害され、

ここで、該モノクローナル抗体が、配列番号7に示されるポリヌクレオチドを含む核酸によってコードされる軽鎖と、配列番号8に示されるポリヌクレオチドを含む核酸によってコードされる重鎖と、を含む、

ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 3】

請求項 1 ~ 2 のうちのいずれか 1 項に記載のヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、CD40に結合し得るヒト抗体、この抗体を使用する方法、およびヒトにおける抗体により媒介される疾患の処置に関する。

【0002】

10

(関連分野の説明)

CD40抗原は、B細胞および他の細胞（樹状細胞を含む）の細胞表面上に発現される糖タンパク質である。B細胞の分化の際に、この分子はプレB細胞に最初に発現され、次いで、B細胞がプラスマ細胞になった場合に細胞表面から見えなくなる。CD40分子と抗CD40抗体との架橋は、B細胞に対する種々の効果を媒介する。CD40抗原は、ヒト神経発育因子（NGF）レセプターおよび腫瘍壊死因子（TNF-）レセプターに関連することが知られており、これにより、CD40がB細胞の活性化において重要な機能を有するリガンドに対するレセプターであることが示唆される。

【0003】

20

CD40は、免疫応答の重要なエレメントである。抗原提示細胞のCD40の、そのリガンド（CD40LまたはCD154と呼ばれる）による係合は、サイトカインの産生および同時刺激分子のアップレギュレーションを引き起こし、Tリンパ球を効果的に活性化する。Bリンパ球のCD40の係合は、B細胞に対する同時刺激シグナルを提供し、抗体産生を駆動する。従って、CD40の係合および活性化のブロックは、抗体および細胞媒介性の免疫応答を抑制する可能性を有する。抗CD40アンタゴニスト抗体は、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス、乾癬、多発性硬化症、炎症性腸疾患（クローン病）、および慢性関節リウマチ）を処置するために使用され得る。このような抗体はまた、自己免疫応答を抑制することにより、器官および組織移植片の拒絶反応を予防するため、悪性Bリンパ球に、CD40により提供される活性化シグナルを与えないことによりリンパ腫を処置するため、および特異的な様式でCD40保有細胞に毒素を送達するために使用され得る。

30

【0004】

これまでに、活性化シグナルを提供することなくCD40に結合するマウスモノクローナル抗体（例えば、5D12）が開示されている。これらの抗体は、インビボおよびインビトロでの免疫応答を阻害する能力を有する。しかし、マウス抗体は、ヒト疾患を処置するために使用され得ない。なぜならば、これらは、ヒト抗マウス抗体を惹起し、その処置の効果を妨げるからである。従って、匹敵する特異性であるが、ヒトアミノ酸配列で構成される抗体に対する必要性が、当該分野に存在する。

【0005】

40

(発明の簡単な要旨)

本発明の主な目的は、ヒトB細胞の表面に位置するヒトCD40抗原に結合し得るヒトモノクローナル抗体を提供することである。この抗体のCD40抗原への結合は、B細胞の増殖または分化を防止する。

【0006】

本発明のさらなる目的は、患者における抗体媒介性の疾患を予防または処置する方法を提供することである。この方法は、このような処置が必要な患者に、CD40保有細胞（例えば、ヒトB細胞またはヒト樹状細胞）の表面に位置するヒトCD40抗原に結合し得る、薬学的に受容可能な賦形剤中の治療有効量のヒトモノクローナル抗体を投与する工程を包含する。この抗体のCD40抗原への結合は、この細胞の増殖または分化を防止する。

【0007】

50

本発明の別の目的は、患者における IgE 媒介性疾患（例えば、アレルギー）を予防または処置する方法を提供することである。この方法は、このような処置が必要な患者に、ヒトB細胞の表面に位置するヒトCD40抗原に結合し得る、薬学的に受容可能な賦形剤中の治療有効量のヒトモノクローナル抗体を投与する工程を包含する。この抗体のCD40抗原への結合は、B細胞の増殖または分化を防止する。

【0008】

本発明のさらに別の目的は、患者における自己免疫疾患（抗体媒介性疾患を含む）を予防または処置する方法を提供することである。この方法は、このような処置が必要な患者に、ヒトB細胞の表面に位置するヒトCD40抗原に結合し得る、薬学的に受容可能な賦形剤中の治療有効量のヒトモノクローナル抗体を投与する工程を包含する。この抗体のCD40抗原への結合は、B細胞の増殖または分化を防止する。本発明による処置について考慮される特定の自己免疫疾患として、全身性エリスマトーデス（SLE）、原発性胆汁性肝硬変（PBC）、および特発性血小板減少性紫斑病（ITP）が挙げられる。

10

【0009】

本発明の別の目的は、腫瘍細胞（非ホジキンリンパ腫を含む）の増殖を阻害する方法を提供することである。

【0010】

上記目的のより好ましい実施形態において、モノクローナル抗体は、15B8、20C4、13E4、12D9、または9F7である。

20

【0011】

（発明の詳細な説明）

抗体は、いくつかの領域から構築され、重要な領域は、相補性決定領域、すなわちCDRである。句「相補性決定領域」は、ネイティブの免疫プロブリン結合部位の天然のFv領域の結合親和性および特異性を一緒に規定するアミノ酸配列をいう。例えば、Chothiaら、J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Kabatら、U.S. Dept. of Health and Human Services NIH発行番号91-3242 (1991)を参照のこと。句「定常領域」は、エフェクター機能に与える抗体分子の部分をいう。ヒト疾患の治療における使用のための非免疫原性抗体を生成することに関するこれまでの研究において、マウス定常領域は、ヒト定常領域により置換されていた。本発明のヒト化抗体の定常領域は、ヒト免疫グロブリンから獲得された。しかし、これらのヒト化抗体はなお、ヒトにおいて望ましくない、そして潜在的に危険な免疫応答を惹起し、親和性を喪失していた。

30

【0012】

本発明のヒトモノクローナル抗CD40抗体は、先行技術のモノクローナル抗体の欠点に取り組んでいる。従って、本発明のヒトモノクローナル抗体は、好ましくは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むよう操作されたトランスジェニック動物を用いて生成される。例えば、WO98/24893は、ヒトIg遺伝子座を有するトランスジェニック動物を開示している。この動物は、内因性の重鎖および軽鎖の遺伝子座の不活性化に起因して、機能的な内因性の免疫グロブリンを生成しない。WO91/10741はまた、免疫原に対する免疫応答をマウントし得るトランスジェニック非靈長類哺乳動物宿主を開示している。この抗体は、靈長類の定常領域および/または可変領域を有し、そして内因性の免疫グロブリンをコードする遺伝子座は置換されているかまたは不活性化されている。WO94/02602は、不活性化された内因性Ig遺伝子座および機能的なヒトIg遺伝子座を有する非ヒト哺乳動物宿主を開示している。米国特許第5,939,598号は、トランスジェニックマウスを作製する方法を開示しており、このマウスは、内因性の重鎖を欠損しており、そして1つ以上の異種性定常領域を含む外因性免疫グロブリン遺伝子座を発現する。

40

【0013】

上記のトランスジェニック動物を使用して、CD40の場合、選択された抗原性分子に対する免疫応答が生成され得、そして抗体産生細胞がこの動物から取り出され得、そしてヒ

50

トモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを生成するために使用され得る。免疫化プロトコル、アジュバントなどは当該分野で公知であり、そして例えば、WO 96 / 33735 に記載されるようなトランスジェニックマウスの免疫において使用される。このモノクローナル抗体は、対応するタンパク質の生物学的活性または生理学的効果を阻害または中和する能力について試験され得る。

【0014】

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体、およびそれらのフラグメント（例えば、F_ab フラグメント、F(a b')₂ フラグメント、F_v フラグメント、および親抗体の抗原結合機能を保持する他のフラグメント）をいう。

10

【0015】

本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、同質の抗体集団を有する抗体組成物をいう。この用語は、抗体の種または起源に関して限定されないし、作製される様式によっても限定されないことが意図される。この用語は、免疫グロブリン全体およびフラグメント（例えば、F_ab フラグメント、F(a b')₂ フラグメント、F_v フラグメント、および抗体の抗原結合機能を保持する他のフラグメント）を含む。任意の哺乳動物種のモノクローナル抗体が、本発明において使用され得る。しかし、実際には、抗体は、代表的に、モノクローナル抗体を生成するのに必要とされるハイブリッド細胞株またはハイブリドーマを作製する際に使用するためのラットまたはマウスの細胞株の利用可能性に起因して、ラットまたはマウス起源の抗体である。

20

【0016】

本明細書中で使用される場合、用語「単鎖抗体」は、結合する抗体の結合ドメイン（重鎖および軽鎖の両方）を決定し、その結合機能の保存を可能にする連結部位を供給することにより調製される抗体をいう。これにより、本質的に、抗原に結合するのに必要とされる可変ドメインの部分のみを有する根本的に短縮された抗体が形成される。単鎖抗体の決定および構築は、Ladner らに対する米国特許第 4,946,778 号に記載されている。

【0017】

本明細書中で使用される場合、用語「CD40 抗原エピトープ」は、本発明の抗 CD40 モノクローナル抗体と免疫反応し得る分子（CD40 抗原自身を除く）をいう。CD40 抗原エピトープは、タンパク質、タンパク質フラグメント、ペプチド、炭水化物、脂質、および他の分子を含み得るが、本発明の目的のためには、最も一般的には、タンパク質、短いオリゴペプチド、オリゴペプチド模倣物（すなわち、CD40 抗原の抗体結合特性を模倣する有機化合物）、またはそれらの組み合わせである。適切なオリゴペプチド模倣物は、とりわけ、PCT 出願 US 91/04282 に記載されている。

30

【0018】

本発明の抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するトランスジェニックマウスにより产生され、そしてヒト細胞（特に、B 細胞）の表面上のヒト CD40 抗原に結合する。これらの抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、単鎖抗体、およびそれらのフラグメントであり得る。

40

【0019】

モノクローナル抗体 15B8、20C4、13E4、12D9、および 9F7 が、実施例において記載されるように調製される。本発明の他の抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座についてトランスジェニックなマウスを用いて同様に調製され得るか、または当該分野で公知の他の方法および／もしくは本明細書中に記載される他の方法により調製され得る。

【0020】

ポリクローナル血清は、従来の方法により調製され得る。一般的に、CD40 抗原を含む溶液が、適切な動物（本発明においては、トランスジェニック動物、好ましくは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するマウス）を免疫するために最初に使用される。好ましい実

50

施形態において、CD40を発現するSf9細胞が、免疫原として使用される。免疫はまた、生理食塩水（好ましくは、フロイント完全アジュバントのようなアジュバント）中で抗原含有溶液を混合または乳化し、そしてこの混合物またはエマルジョンを非経口注入（一般的には、皮下注入または筋肉内注入）することにより実施され得る。50～200μg／注入の用量が、代表的に、十分である。免疫は、一般的に、生理食塩水中のタンパク質（好ましくは、フロイント不完全アジュバントを用いて）の1回以上の注入により、2～6週後にブーストされる。当該分野で公知の方法を用いたインビトロでの免疫によって、抗体が代替的に生成され得、これは、本発明の目的に關して、インビボでの免疫に相当するとみなされる。

【0021】

10

ポリクローナル抗血清は、免疫した動物の血液をガラスまたはプラスチック容器に注ぎ、この血液を25にて1時間インキュベートし、その後4にて2～18時間インキュベートすることにより獲得される。血清は、遠心分離（例えば、1,000×gで10分間）により回収される。約20～50ml／血液が、ウサギから獲得され得る。

【0022】

モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein、Nature 256:495-96(1975)の方法またはその改良版を用いて調製され得る。代表的に、マウスは、上記のように免疫される。しかし、血清を抽出するために動物を出血させずに、脾臓（および必要に応じていくつかの大リンパ節）が取り出され、そして単一細胞に分離される。所望の場合、脾臓細胞は、タンパク質抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁物を適用することにより（非特異的接着細胞の除去後に）スクリーニングされ得る。この抗原に対して特異的な膜結合免疫グロブリンを発現するB細胞は、プレートに結合し、そして懸濁物の残りと共に洗い流されない。次いで、得られるB細胞または全ての分離された脾臓細胞は、黒色腫細胞と融合してハイブリドーマを形成するために誘導され、そして選択培地（例えば、ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン培地、「HAT」）で培養される。得られるハイブリドーマは、限界希釈によりプレーティングされ、そして所望の免疫細胞表面抗原に特異的に結合する（そして関連しない抗原に結合しない）抗体の産生についてアッセイされる。次いで、選択されたMAb分泌ハイブリドーマは、インビトロ（例えば、組織培養ボトルまたは中空纖維リアクターにおいて）またはインビボ（マウスにおける腹水として）のいずれかで培養される。

20

【0023】

30

ハイブリドーマの使用の代替として、抗体は、米国特許第5,545,403号、同第5,545,405号および同第5,998,144号（これらは本明細書中で参考として援用される）に開示されるように、CHO細胞株のような細胞株において産生され得る。簡単に述べると、この細胞株は、軽鎖および重鎖をそれぞれ発現し得るベクターによりトランスフェクトされる。別々のベクター上の2つのタンパク質をトランスフェクトすることにより、キメラ抗体が生成され得る。別の利点は、抗体の正確なグリコシル化である。

【0024】

好ましくは、CD40に対する十分なヒト抗体が、トランスジェニックマウスを免疫することにより獲得される。1つのこのようなマウスは、Xenomouseと称され、そして米国特許第6,075,181号；同第6,091,001号；および同第6,114,598号において開示されている（これらは全て、本明細書中で参考として援用される）。本明細書に開示される抗体を生成するために、ヒトIgG2重鎖遺伝子座およびヒトK軽鎖遺伝子座についてトランスジェニックなマウスを、ヒトCD40を発現するSf9細胞により免疫した。マウスはまた、他のアイソタイプについてもトランスジェニックであり得る。

40

【0025】

Sf9(Spodoptera frugiperda)細胞の生成は、本明細書中で参考として援用される、de Boer、米国特許第6,004,552号に開示される。簡単に述べると、ヒトCD40をコードする配列を、de Boerにより記載されるよ

50

うな転移ベクターを用いて、バキュロウイルス中に組み換えた。このプラスミドを、野生型バキュロウイルスDNAと共にSf9細胞中に同時トランスフェクトした。組換えバキュロウイルス感染Sf9細胞を同定し、クローン精製した。

【0026】

CD40を発現する 5×10^6 個のSf9細胞を、第0日および第14日に、マウスに腹腔内(IP)注入した。最後の注入を少なくとも5週間後に実施し、そして脾臓および胸腺細胞を取り出し、そして細胞融合のために使用した。細胞融合を、de Boerに記載されるように実施した。ハイブリドーマ抗体を、実施例に記載されるようにしてスクリーニングした。5つのハイブリドーマを、CD40リガンド(CD40L)および抗IgMにより誘導されたヒト末梢血B細胞の増殖を阻害するそれらの能力、および抗CD3不活性化されたヒト末梢血T細胞により刺激されたヒト末梢血B細胞によるIgMの産生を阻害するそれらの能力に基づき、さらなる研究のために選択した。

10

【0027】

最適な阻害活性を示す5つのハイブリドーマを、15B8.8.6(15B8)、20C4.1.6(20C4)、13E4.12.11(13E4)、12D9.9.10(12D9)、9F7.9.11.1(9F7)、および15B8.7.2と命名した。これらのハイブリドーマのいずれも、休止しているヒト末梢血B細胞における増殖を誘導する有意な能力を示さなかった。

【0028】

これらのハイブリドーマの抗体の相対的な結合特性を、フローサイトメトリーにより試験した(実施例に詳細記載される)。簡単に述べると、比較された抗体は、同一または親密に関連するエピトープを認識するそれらの能力にもかかわらず、親和性における差異を示した。例えば、MAb 15B8は、ヒトCD20⁺末梢血リンパ球へのMAb 20C4の結合をブロックしたが、MAb 20C4は、CD20⁺リンパ球へのMAb 15B8の結合をブロックしなかった。ハイブリドーマの示差的なCD40結合を、表4(実施例4)に示す。

20

【0029】

試験した4つのハイブリドーマ(15B8、20C4、12D9、および9F7)は、3つの種(ヒト;アカゲザル;およびカニクイザル)由来の末梢血細胞を染色するモノクローナル抗体を産生した(図7)。

30

【0030】

このモノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチド配列を決定するために、このハイブリドーマからmRNAを調製し、そして標準的な手順を用いて、このmRNAに対してRT-PCRを実施した。PCR産物をゲル上で分析し、配列決定し、そして翻訳した。このポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、表7、実施例11に示されるように配列番号1~18において提供する。

【0031】

5つのモノクローナル抗体(9F7、15B8、12D9、20C4、および13E4)のアミノ酸配列を、図5(軽鎖)および図6(重鎖)に示されるように、マウス抗CD40モノクローナル抗体5H7のアミノ酸配列と比較した。

40

【0032】

5つの開示されるモノクローナル抗体を用いて獲得された結果は、これらの抗体ならびにそれらのフラグメントおよびキメラ形態が拮抗特性を有し、それによりこれらが多くの臨床適用(自己免疫疾患の処置、移植反応および拒絶の処置を含む)に適切であり、遺伝子療法およびタンパク質療法のためのアジュvant療法として適切であり、そして腫瘍細胞(非ホジキンリンパ腫細胞を含む)の増殖を阻害する上で適切であることを示す。さらなる用途として、CD40を発現する悪性細胞により媒介される任意の疾患の処置、およびCD40を発現する細胞の増殖、活性化、または調節に関連する疾患を処置するための使用が挙げられる。5つのMAbの活性を、表1に要約する。

【0033】

50

【表1】

表 1

クローン	B細胞の Ig M 分泌に対する阻害	Jurkat細胞により刺激されたB細胞の増殖に対する阻害	CHO-CD40L細胞により刺激されたB細胞の増殖に対する阻害	抗IgM刺激されたB細胞の増殖に対する阻害	B細胞の増殖に対する刺激	B細胞の増殖を刺激するAb架橋
MS81 12D9.9.10	-29%	-64%	-24%	190%	178%	120%
MS81 15B8.8.6.12	-47%	-81%	-89%	352%	513%	76%
MS81 20C4.1.6	-35%	-74%	-97%	237%	279%	143%
MS81 13E4.12.11	-44%	-50%	n/a	346%	660%	n/a
MS81 9F7.9.11.1	-30%	-71%	-57%	120%	275%	84%

* 1 μg / ml の抗体からの代表的なデータを示した。

【0034】

本発明は、本明細書中に記載される5つのモノクローナル抗体だけでなく、これらとは異なるがCDRを保持する抗体；および1つ以上のアミノ酸付加、欠失、または置換を有する抗体もまた包含する。ここで、この活性は、B細胞増殖および/または抗体分泌を阻害することにより測定される。本発明はまた、例えば、WO 98/52976、「Method for the Production of Non-Immunogenic Proteins」（これは、本明細書中に参考として援用される）に記載されるようにして生成され得る脱免疫抗体（de-immunized antibody）を包含する。本発明のモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む融合タンパク質もまた、本発明の範囲内に含まれる。この融合タンパク質は、当該分野で公知のように、合成され得るかまたは対応するポリヌクレオチドベクターから発現され得る。

【0035】

本発明の抗体は、例えば、特許公報番号EP 0983303A1、WO 00/34317、およびWO 98/52976（これらは、本明細書中に参考として援用される）に記載される方法を用いて生成される、配列のバリエーションを有し得る。例えば、CDR内の配列は、抗体がMHCクラスIIに結合しそして望ましくないヘルパーT細胞応答を誘導し得る原因となることが示されている。保存的置換は、その抗体が結合活性を保持しているが、望ましくないT細胞応答を誘導する能力を失わせることを可能にする。任意のこのような保存的置換または非保存的置換は、当該分野で認識されている方法を用いてなされ得、そして得られる抗体は本発明の範囲内に含まれる。

【0036】

本発明は、好ましいモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖のアミノ酸配列（配列番号1～18）を提供する。この配列は、図5および6に示されるように、整列される。これらの整列は、この抗体の所望の生物学的活性を喪失することなく置換するのにより適した特定のアミノ酸位置を示す。慣用的な方法のみを用いて、当業者は、これらの配列の改変体をコードするプラスミドを構築し得る。この改変抗体は、本明細書中に記載される方法を用いて、アンタゴニスト活性、親和性、特異性、およびアゴニスト活性について慣用的に試験され得る。

【0037】

上記の方法のいずれか、または本明細書中に開示されない他の方法のいずれかによって產生される抗体は、以下の生物学的活性の少なくとも1つを有する場合、本発明の範囲内である：T細胞によって刺激されたヒト末梢B細胞による免疫グロブリン分泌の阻害；Jurkat T細胞によって刺激されたヒト末梢B細胞の増殖の阻害；およびCD40-L発現細胞によって刺激されたヒト末梢B細胞の増殖阻害。これらのアッセイは、本明細書中の実施例に記載されるように実行され得る。

【0038】

これらの抗体はまた、当該分野で公知の標準的なアッセイ（例えば、Biacore）を使用して測定されるように、適切なコントロールと比較して、少なくとも 10^{-5} M、好みしくは少なくとも 10^{-6} ~ 10^{-7} M、より好みしくは少なくとも 10^{-8} M、そして最も好みしくは少なくとも 10^{-9} M（例えば、 10^{-10} M）の単一部位結合親和性（ K_D ）を示す。 10^{-11} M、 10^{-13} M、 10^{-15} M、 10^{-17} Mおよび 10^{-19} Mの結合親和性もまた達成され得る。これらのアッセイは自動化され、そして当該分野において公知の標準的な技術を使用してもアッセイされ得る、MAbの特異性および交差反応性の測定を可能にする。Biacoreアッセイの詳細は、Biacoreの「BIA applications handbook」に提供される。WO01/27160に記載される方法をまた使用して、結合親和性を調節し得る。

10

【0039】

所望の場合、抗体（ポリクローナルであれ、モノクローナルであれ）は、従来技術を使用して標識され得る。適切な標識としては、発蛍光団、発色団、放射性原子（特に 32 Pおよび 125 I）、高電子密度試薬、酵素、および特異的結合パートナーを有するリガンドが挙げられる。酵素は、代表的にはその活性によって検出される。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼは、通常3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジン（TMB）を、分光光度計で定量可能な青色色素に変換する能力によって検出される。「特異的結合パートナー」とは、例えば、抗原およびその抗原に特異的なモノクローナル抗体の場合のような、高い特異性でリガンド分子に結合し得るタンパク質をいう。他の特異的結合パートナーとしては、ビオチンおよびアビジンもしくはストレプトアビジン、IgGおよびプロテインA、ならびに当該分野で公知の多数のレセプター - リガンド対が挙げられる。上の記載は、種々の標識を別個のクラスに分類することを意味せず、同じ標識がいくつかの異なる様式で作用し得ることが、理解されるべきである。例えば、 125 Iは、放射性標識または高電子密度試薬として作用し得る。HRPは、酵素またはMAbに対して抗原として作用し得る。さらに、所望の効果のために種々の標識を組み合わせ得る。例えば、MAbおよびアビジンはまた、本発明の実行において標識を必要とする：従って、MAbをビオチンで標識し得、そしてその存在を、 125 Iで標識したアビジン、またはHRPで標識した抗ビオチンMAbを用いて検出し得る。他の置換および可能性は当業者に容易に明らかであり、本発明の範囲内の等価物とみなされる。

20

【0040】

本発明における使用のための抗体は、任意の適切な技術を用いることによって產生され得る。例えば、WO01/27160は、抗体アクセプターの可変領域フレームワークに対する結合親和性をドナーCDRに付与する方法を開示する。この方法をまた使用して、可変領域または抗体の結合親和性を最適化（例えば、結合親和性を増強）し得る。1以上のCDRを有するヒト化抗体を生成する方法は、米国特許第6,180,370号に記載される。ヒトに対する投与のために最適化された抗体を生成する方法は、WO00/34317に開示され、これは、免疫原性が低いか、または非免疫原性にされたタンパク質の生成を記載する。米国特許第5,514,548号は、標的リガンドに高い親和性で結合するリガンド結合タンパク質（例えば、抗体）の選択のための方法を開示する。米国特許第5,877,397号は、異種抗体を產生し得るトランスジェニック非ヒト動物を開示した。これら全ての特許および特許出願は、本明細書中に参考として援用される。

30

【0041】

（処方物および投与方法）

本発明の抗体は、抗体媒介性疾患（例えば、アレルギー、SLE、PBC、ITP、多発性硬化症、疥癬、クローン病、移植片拒絶およびB細胞リンパ腫）を予防または処置するために、治療的に有効な濃度で投与される。この目的を達成するために、抗体を、当該分野で公知の種々の受容可能な賦形剤を使用して処方し得る。代表的には、抗体は、静脈内または腹腔内のいずれかで、注射によって投与される。この投与を達成するための方法は、当業者に公知である。局所的または経口的に投与され得るか、あるいは粘膜を介して透過し得る組成物を得ることもまた可能であり得る。

40

50

【0042】

患者への投与の前に、処方剤 (formulant) が抗体に添加され得る。液体処方物が好ましい。例えば、これらの処方物は、オイル、ポリマー、ビタミン、炭水化物、アミノ酸、塩、緩衝液、アルブミン、界面活性剤または充填剤を含み得る。好ましくは、炭水化物としては、糖または糖アルコール（例えば、単糖、二糖または多糖）あるいは水溶性グルカンが挙げられる。糖またはグルカンとしては、フルクトース、デキストロース、ラクトース、グルコース、マンノース、ソルボース、キシロース、マルトース、スクロース、デキストラン、ブルラン、デキストリン、シクロデキストリンおよびシクロデキストリン、可溶性デンプン、ヒドロキシエチル（hydroxyethyl）デンプンならびにカルボキシメチルセルロースまたはこれらの混合物が挙げられ得る。スクロースが最も好ましい。「糖アルコール」は、-OH基を有するC₄～C₈の炭化水素として規定され、ガラクチトール、イノシトール、マンニトール、キシリトール、ソルビトール、グリセロールおよびアラビトールが挙げられる。マンニトールが最も好ましい。上記のこれらの糖または糖アルコールは、個々にまたは組み合わせて使用され得る。この糖または糖アルコールが、水性調製物中に可溶である限り、使用される量に固定された制限はない。好ましくは、糖または糖アルコールの濃度は、1.0w/v%と7.0w/v%との間、より好ましくは2.0w/v%と6.0w/v%との間である。好ましいアミノ酸としては、左旋性(L)形態のカルニチン、アルギニンおよびベタインが挙げられるが、他のアミノ酸もまた加えられ得る。好ましいポリマーとしては、2,000と3,000との間の平均分子量を有するポリビニルピロリドン(PVP)または3,000と5,000との間の平均分子量を有するポリエチレングリコール(PEG)が挙げられる。凍結乾燥前または再構成後に溶液中のpH変化を最小化するために、組成物中に緩衝剤を使用することもまた好ましい。大部分の任意の生理学的緩衝剤が使用され得るが、クエン酸塩(titrant)、リン酸塩、コハク酸塩およびグルタミン酸塩の緩衝剤またはこれらの混合物が好ましい。クエン酸緩衝剤が最も好ましい。好ましくは、その濃度は、0.01モル濃度～0.3モル濃度である。処方物に添加され得る界面活性剤は、EP第270,799号および同第268,110号に示される。

【0043】

さらに、抗体は、ポリマーへの共有結合的結合体化によって化学的に修飾されて、例えば、その循環半減期を増大し得る。好ましいポリマーおよびポリマーをペプチドに結合させる方法は、米国特許第4,766,106号；同第4,179,337号；同第4,495,285号および同第4,609,546号（これらは全て、その全体が本明細書中に参考として援用される）に示される。好ましいポリマーは、ポリオキシエチレン化ポリオールおよびポリエチレングリコール(PEG)である。PEGは、室温で水溶性であり、そして一般式： $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ を有し、ここでRは、水素またはアルキル基もしくはアルカノール基のような保護基であり得る。好ましくは、この保護基は、1～8個の炭素原子を有し、より好ましくはメチルである。記号nは、正の整数であり、好ましくは1と1,000との間、より好ましくは2と500との間である。PEGは、1000と40,000との間、より好ましくは2000と20,000との間、より好ましくは3,000と12,000との間の平均分子量を有する。好ましくは、PEGは、少なくとも1つのヒドロキシ基を有し、より好ましくは、これは末端ヒドロキシ基である。このヒドロキシ基が、好ましくは活性化されて、インヒビター上の遊離アミノ基と反応する。しかし、この反応性基の型および量は、本発明の共有結合的に結合体化したPEG／抗体を達成するために変えられ得る。

【0044】

水溶性ポリオキシエチレン化ポリオールもまた、本発明において有用であることが理解される。これらには、ポリオキシエチレン化ソルビトール、ポリオキシエチレン化グルコース、ポリオキシエチレン化グリセロール(POG)などが挙げられ、POGが好ましい。1つの理由は、ポリオキシエチレン化グリセロールのグリセロール骨格が、例えば、動物およびヒトにおいて天然に存在する、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド中

と同じ骨格であるからである。従って、この分枝は、体内において必ずしも外来因子として見られない。POGは、PEGと同じ範囲の好ましい分子量を有する。POGの構造は、Knaufら、J. Bio. Chem. 263: 15064-15070 (1988)に示され、そしてPOG/IL-2結合体の考察は、米国特許第4,766,106号に見出される（これら両方は、その全体が本明細書中で参考として援用される）。

【0045】

循環半減期を増大させるための別の薬物送達システムは、リポソームである。リポソーム送達システムを調製するための方法は、Gabizonら、Cancer Research 42: 4734 (1982); Cafiso、Biochem Biophys Acta 649: 129 (1981); およびSzoka、Ann Rev Biophys Eng 9: 467 (1980)において考察される。他の薬物送達システムが、当該分野で公知であり、例えば、Poznanskyら、Drug Delivery Systems (R. L. Juliano編、Oxford、N.Y.、1980)、253-315頁; M. L. Poznansky、Pharm Revs 36: 277 (1984)に記載されている。

【0046】

液体薬学的組成物を調製した後、分解を防止し、そして滅菌を保つために、凍結乾燥することが好ましい。液体組成物を凍結乾燥するための方法は、当業者に公知である。使用的直前に、この組成物は、さらなる成分を含み得る滅菌希釈剤（例えば、リンガー溶液、蒸留水、または滅菌生理食塩水）で再構成され得る。再構成の際に、この組成物は、好ましくは、当業者に公知の方法を使用して被験体に投与される。

【0047】

上記のように、本発明の抗体および組成物は、ヒト患者を処置して、抗体媒介性の疾患（例えば、アレルギー、SLE、PBCおよびITP）を予防または処置するために使用され得る。好ましい投与経路は、非経口である。非経口投与において、本発明の組成物は、薬学的に受容可能な非経口ビヒクルと組み合わせて、注射可能な単位投薬形態（例えば、溶液、懸濁液または乳濁液）で処方される。このようなビヒクルは、本質的に非毒性であり、かつ非治療剤である。このようなビヒクルの例は、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液およびハンクス溶液である。非水性ビヒクル（例えば、不揮発油およびオレイン酸エチル）もまた使用され得る。好ましいビヒクルは、生理食塩水中5%のデキストロースである。このビヒクルは、少量の添加剤（例えば、緩衝液および保存料を含む、等張性および化学的安定性を増強する物質）を含み得る。

【0048】

投薬量および投与の様式は、個体に依存する。一般に、この組成物は、1 μg/kgと20mg/kgとの間、より好ましくは20 μg/kgと10mg/kgの間、最も好ましくは1mg/kgと7mg/kgとの間の用量で抗体が与えられるように、投与される。適切には、これは、注入またはボーラス投与で与えられ、ボーラス投与後4~6時間にわたって、循環レベルを10~20倍増大させる。連続的な注入はまた、ボーラス投与後に用いられ得る。この場合、抗体は、5 μg/kg/分と20 μg/kg/分との間、より好ましくは7 μg/kg/分と15 μg/kg/分との間の用量で注入され得る。適切な処置レジメンは、WO00/27428およびWO00/27433（これらは、本明細書中で参考として援用される）に開示されている。

【0049】

（非ホジキンリンパ腫治療のための、抗CD40抗体治療の使用）

非ホジキンリンパ腫（NHL）は、脾臓、胸腺およびリンパ節の成分に由来する（Jandl J. H.、Non-Hodgkin's lymphomas、Jandl J H (編) : Blood, Textbook of Hematology、Boston、MA、Little Brown、1996、853-887頁）。これは、元々B細胞およびT細胞に由来するリンパ球悪性疾患の一群からなる。低悪性度のNHLを有する患者は、通常、放射線療法および化学療法に応答性ではない。この低い応答率および高い再

発の可能性は、9年未満の患者生存期間の中央値に寄与する。

【0050】

CD40による生存／増殖シグナルの不均衡およびFasによる不活発なデス(death)シグナルは、低悪性度のB系統悪性疾患(慢性リンパ球白血病(CLL)およびNHLを含む)の病因において重要な役割を果たす(Ghia P.、Adv. Cancer Res.、2000、79:157-73)。低悪性度NHLにおける研究は、疾患の発症が、Fas経路を介したアポトーシスの減少およびCD40を介した生存シグナルの増大の結果としての、リンパ腫細胞の蓄積に起因することを示唆する(Ghia P.、Adv. Cancer Res.、2000、79:157-73)。このことは、化学療法または放射線療法(これは、活発に増殖している細胞を特異的に標的化する)に対するリンパ腫細胞の非感受性を説明し得る。10

【0051】

本発明はさらに、新規NHL治療に関し、これは、CD40に対する抗体を使用して、NHL細胞への生存シグナルをブロックすることを包含する。この戦略は、発行された科学文献中の多数の観察によって支持される。CD40は、B細胞の発生を通じて、B細胞表面で発現される。研究によって、CD40が、悪性B細胞への生存シグナルを提供し、インビトロでの増殖を刺激することを実証した(Romano M. F.ら、Leuk Lymphoma、2000年1月、36(3-4):255-62; Furman R. R.、J. Immunol.、2000年2月15日、164(4):2200-6; Kitada S.、Br. J. Haematol.、1999年9月、106(4):95-1004; Romano M. F.、Blood、1998年8月1日、92(3):990-5; Jacob A.、Leuk. Res.、1998年4月、22(4):379-82; Wang D.、Br. J. Haematol.、1997年5月、97(2):409-17; Planken E. V.、Leukemia、1996年3月、10(3):488-93; Greiner A.、Am. J. Pathol.、1997年5月、150(5):1583-93)。インビボのCD40シグナル伝達のためのCD40Lを提供する微小環境が存在するという、患者からの証拠が存在する: CD40は、B系統のNHLを有する患者の86%において、リンパ腫細胞上に発現される(Uckun F. M.、Blood、1990年12月15日、76(12):2449-56)。同じB細胞リンパ腫細胞におけるCD40/CD40Lの同時発現の発見は、20NHL患者におけるオートクライイン増殖シグナルループの可能性を提起する(Cloodi K.、Br. J. Haematol.、1998年10月、103(1):270-5)。NHL患者の血清における可溶性CD40Lの有意な増加もまた存在する(Younes A.、Br. J. Haematol.、1998年1月、100(1):135-41)。可溶性CD40Lは、初代NHLリンパ腫細胞培養物において、リンパ腫細胞の増殖を誘導し得る(Andersen N. S.、Blood、2000年9月15日、96(6):2219-25; Buske C.、Leukemia、1997年11月、11(11):1862-7)。CD40Lの発現は、低悪性度MALTリンパ腫において、腫瘍周辺領域において増大する(Carbone A.、Am. J. Pathol.、1995年10月、147(4):912-22; Greiner A.、Dev. Immunol.、1998、6(3-4):187-95)。B細胞系統の腫瘍上で発現される高レベルのCD40、およびこれらの悪性細胞への生存シグナルとしてのその機能を考慮して、アンタゴニストの抗CD40抗体は、NHLにおいて治療的価値を有し得る。30

【0052】

15B8(ヒトIgG2重鎖遺伝子座およびヒトK軽鎖遺伝子座を有するトランスジェニックマウス(Xenomouse、Abgenix)の免疫によって生成されるヒトIgG2サブタイプの抗ヒトCD40モノクローナル抗体)を使用した。臨床前NHLインビトロモデルにおける15B8の潜在的な効力を実証するために、15B8を、rituximab処置したNHL患者または未処置のNHL患者のいずれかから得た悪性B細胞(4050)

NHL細胞)を使用して試験した。rituximabは、再発性または抵抗性の、低悪性度または小胞性のNHLの処置のための、抗CD20モノクローナル抗体である。

【0053】

初代リンパ腫細胞は、標準的な培養倍地中で増殖せず、培養物中で数日後にアポトーシスに陥るので、腫瘍細胞を、B細胞増殖因子であるインターロイキン-4(IL-4)の存在下または非存在下で、照射したCD40リガンド(CD40L)トランスフェクトフィーダー細胞(Arpin, C.、Science, 1995, 268:720-722)と同時培養した。次いで、示された濃度(0.01μg/ml~10μg/ml)の抗体(アゴニストの抗CD40 MS81、またはアンタゴニストの抗CD40 15B8あるいはアイソタイプコントロールのhu IgG2)を、培地に添加した。37での48時間のインキュベーション後、培養細胞を³H-チミジンで18時間パルスした。次いで、この細胞を収集し、そして³H-チミジン取り込み量について分析した(Schultz, J. L.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92:8200-8204)。全てのサンプル条件は、3連であった。

【0054】

これらのNHL細胞初代培養物アッセイにおいて、15B8単独もIL-4との組み合わせも、NHL細胞のインビトロでの増殖を刺激しなかった。対照的に、アゴニストの抗CD40 MS81は、同じ条件下でNHL細胞の増殖を誘導した。15B8は、インビトロにおいて、CD40Lによって刺激されるNHL細胞の増殖(P=0.05)ならびにCD40LおよびIL-4によって刺激されるNHL細胞の増殖(P<0.05)の統計的に有意な阻害を示した。それぞれ、1~10μg/mlまたは0.1~10μg/mlの濃度範囲で、15B8は、CD40LまたはCD40LおよびIL-4によって刺激されるNHL細胞の増殖の、統計的に有意な用量に関連する阻害を示した(P<0.005)。

【0055】

リンパ腫について開発された治療剤中のヒト抗原特異的なMabの評価のために現在使用される、2種類の臨床前モデルが存在する。1つのモデルは、異種移植マウスのインビトロモデルであり、ここで、EBV形質転換リンパ腫細胞株(例えば、Daudi(バーキットリンパ腫)細胞またはRaji(バーキットリンパ腫)細胞)が、SCID/ヌードマウスに異種移植される。しかし、これらのモデルにおいて、結果は、特定の不死細胞株(これは、1つのEBV形質転換細胞に由来する)に対する影響を反映するだけである。バーキットリンパ腫細胞は、リンパ芽球細胞であることが公知である(Ambinder R. F.、Cancer Treat. Res., 1999, 99:27-45; Quintanilla-Martinez L.、Leuk. Lymphoma, 1998年6月、30(1-2):111-21; Klein G.、Acta Microbiol. Immunol. Hung.、1996, 43(2-3):97-105)が、一方、NHL患者由来のリンパ腫細胞は、成熟B細胞段階であると考えられる(Ghia P.、Adv. Cancer Res., 2000, 79:157-73)。B細胞のEBV形質転換は、CD40シグナル伝達経路中の多くの構成要素の変化を生じる(Uchida J.、Science, 1999年10月8日、286(5438):300-3; Farrell P. J.、Biomed. Pharmacother., 1997, 51(6-7):258-67)。NHL細胞および正常B細胞におけるCD40シグナル伝達とは対照的に、CD40シグナル伝達は、EBV形質転換バーキットリンパ腫細胞株における増殖停止を導く(Fukuda M.、Viral Immunol.、2000, 13(2):215-29; Baker M. P.、Blood, 1998年10月15日、92(8):2830-43)。従って、異種移植モデルにおけるアンタゴニスト抗CD40 Mab(15B8)の試験の結果は、NHL患者による抗体(15B8)に対する応答を予測することはできない。

【0056】

他のモデルは、NHL患者由来のリンパ球細胞のインビトロ増殖阻害アッセイであり、こ

10

20

30

40

50

れを、本明細書中で使用した。その利点は、この結果が、NHL患者由来のリンパ腫細胞の、試験される薬剤(15B8)に対する感受性を予測することである。しかし、その結果は、規定された条件下でのインビトロの研究から得られる。以前に公開された研究は、ラット抗マウスCD40(これは、インビトロでADCCおよびCDCを誘導できない)が、2つの同質遺伝的なマウスBリンパ腫モデル(BCL1およびA31)において良好な効力を示したことを報告した(Tutt A.L.、J. Immunol.、1998年9月15日、161(6):3176-85)。抗マウスCD40に関する抗腫瘍効果は、試験された抗Idよりも時間的にゆっくりと生じた。抗マウスCD40は、試験されたマウスモデルにおいて抗Idのようなシグナル伝達を指向しない、表面CD40発現に依存する、重要な増殖シグナルをブロックすることによって、作動し得る。この研究は、抗CD40によるCD40/CD40Lシグナル伝達のブロックが、インビトロで有効であり得ることを示唆する。15B8は、ヒトIgG2サブタイプであるので、試験した場合、インビトロでFcレセプターに結合せず、ADCCおよびCDCをインビトロで誘導できなかった。15B8は、ラット抗マウスCD40に対して類似の特性のものである。このデータは、15B8が、NHL患者、特にRituxan耐性患者にとって有益であるという仮説を支持する。

【0057】

ここで、本発明は、特定の有利な実施形態を示す以下の実施例を参照して示される。しかし、これらの実施形態は、例示であり、いかようにも本発明を限定するとは解釈されるべきでないことに、留意すべきである。

【0058】

(実施例)

(一般的な方法)

(免疫グロブリン定量のためのELISAアッセイ)

ヒトIgMおよびIgGの濃度を、ELISAによって推定した。96ウェルのELISAプレートを、0.05Mの炭酸塩緩衝液(pH9.6)中の2μg/mlのヤギ抗ヒトIgG MAb(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Marine)または2μg/mlのヤギ抗ヒトIgM MAb 4102(Bio Source International, Calif.)を用いて、4にて16時間インキュベートすることによってコーティングした。プレートをPBS-0.05%Tween-20(PBS-Tween)で3回洗浄し、そしてBSAで1時間飽和させた。2回の洗浄後、プレートを、異なる希釈の試験サンプルと共に、37で2時間インキュベートした。3回の洗浄後、結合したIgGを、1μg/mlのペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ヒトIgG MAbまたはヤギ抗ヒトIgM MAbと共に、37で2時間インキュベートすることによって検出した。プレートを4回洗浄し、そして結合したペルオキシダーゼ活性を、O-フェニレンジアミンを基質として添加することによって検出した。ヒトIgGまたはIgM標準(Caltaq, Burlingame, CA)を使用して、各アッセイについての標準曲線を確立した。

【0059】

(ヒト末梢血からの末梢血単核細胞(PBMC)の単離)

50mlのポリエチレンチューブあたり、20mlのFicoll-Paque溶液(低内毒素、Pharmacia)を、30分間、3つのチューブに添加し、その後血液を添加した。このFicoll-Paque溶液を室温まで温めた。1:10希釈の3Lの漂白剤を調製し、これを使用して血液を含有する全てのチューブおよびピペットを洗浄した。血液を、Ficoll層を乱さずに、1.5ml血液/1mlのFicoll-Paqueで、Ficoll-Paque溶液の上部に層にした。これらのチューブを、室温にて1700rpmで30分間遠心分離し、ブレーキをかけて遠心分離をオフにした。上層(血漿)を可能な限り多く除去し、溶液の第二層を除去するのを回避するために、減圧を最小にした。第二層(これは、Bリンパ球およびTリンパ球を含む)を、滅菌パスツールピペットを用いて収集し、そして2本の50mlポリスチレンチューブに配置した。収集物

10

20

30

40

50

を、添加物を含まない冷RPMI（3倍容積）をもちいて希釈し、そしてチューブを1000RPMで10分間遠心分離した。媒体を吸引によって除去し、そして両方の50mlチューブからの細胞を、合計10mlの冷RPMI（添加剤を含む）中に再懸濁し、そして15mlのチューブに移した。細胞を、血球計を用いて計数し、次いで、1000RPMで10分間遠心分離した。媒体を除去し、細胞を4mlのRPMI中に再懸濁した。この画分は、PBMCを含んだ。

【0060】

（PBMCからのB細胞の単離）

100μlのDynabeads（抗hCD19）を、5mlのプラスチックチューブに配置した。3mlの滅菌PBSをこのビーズに添加し、混合し、磁性ホルダに配置し、次いで2分間静置させた。溶液を、パストールピペットを使用して除去し、3mlの滅菌PBSを添加し、混合し、そして磁性ホルダに配置し、次いで2分間静置させた。滅菌PBSを用いるこの手順を、もう一度繰り返して、合計3回洗浄した。PBMCをこのビーズに添加し、そして混合しながら4で30分間インキュベートした。PBMCおよびビーズを含むチューブを、磁性ホルダに2分間配置し、次いで溶液を磁性ホルダ中の新たな5mlチューブに移した。2分後、溶液を、新たな15mlチューブに移した。この工程をもう4回繰り返し、最初の4回の溶液を15mlチューブに収集し、1000RPMで5分間遠心分離した。この工程によって、T細胞分離のためのペレットを生成した。

【0061】

100μlのRPMI（添加剤を含む）を添加してビーズを収集し、そして溶液を0.7mlのチューブに移した。10μlのDyna1 Detachable Beadsを、室温にて懸濁液に添加し、そしてそれを45分間回転させた。懸濁液を新たな5mlチューブに移し、そして3mlのRPMI（添加剤を含む）を添加した。チューブを、2分間磁性ホルダに配置した。溶液を、ホルダ内の新たな5mlチューブに移し（2分間）、次いで15mlチューブに移した。上記の工程をもう3回繰り返し、溶液を15mlチューブに収集した。15mlチューブを1000RPMで10分間遠心分離し、この細胞を10mlのRPMIに再懸濁した。洗浄をもう2回繰り返し、合計3回洗浄した。細胞を、最後の遠心分離前に計数した。この工程によって、B細胞の精製を完了した。細胞を、90%FCSおよび10%DMSO中に保存し、そして-80で冷凍した。

【0062】

（T細胞の単離）

ヒトT細胞Enrichment Column（R&D systems、抗hCD3カラムキット）を、2mlの10×カラム洗浄緩衝液および18mlの滅菌希釈水を混合することによって、20mlの1×カラム洗浄緩衝液を使用して、調製した。このカラムを70%エタノールで浄化し、そして15mlチューブの上部に置いた。カラムの上部キャップを最初に外して、カラムの底に気泡が入ることを回避した。次に、底のキャップを外して、先端を70%エタノールで洗浄した。カラム内の液体を、15mlチューブ内に排出させた。カラムの緩衝液が、白色フィルタのレベルまで排出された後、新たな滅菌15mlチューブを、カラムの下に配置した。B細胞を枯渇させたPBMC画分を、1mlの緩衝液中に懸濁し、そしてカラムの上部に添加した。細胞を、カラムを用いて室温にて10分間インキュベートさせた。T細胞を、各々2mlの1×カラム洗浄緩衝液の4アリコートを用いて、カラムから溶出させた。収集したT細胞を、1000RPMで5分間遠心分離した。上清を除去し、細胞を10mlのRPMI中に再懸濁した。細胞を計数し、そしてもう1回遠心分離した。上清を除去し、T細胞の精製を完了した。細胞を、90%FCSおよび10%DMSO中に保存し、そして-80で冷凍した。

【0063】

上記の手順について、RPMI組成物は、10%FCS（56度にて45分間不活化した）、1%Pen/Strep（100u/mlのペニシリン、0.1μg/mlのストレプトマイシン）、1%グルタミン酸、1%ピルビン酸ナトリウム（sodium pyruvate）、50μM 2-MEを含んだ。

10

20

30

40

50

【0064】

(フローサイトメトリー アッセイ)

Ramos 細胞 (10^6 細胞 / サンプル) を、 $100\mu l$ の一次抗体 (PBS - BSA 中 $10\mu g / ml$) 中で、 4 度 20 分間インキュベートした。 PBS - BSA または HBS - BSA で 3 回洗浄した後、 細胞を、 ヤギ抗 (ヒト IgG) 抗体 (Caltag) の FITC 標識 F(ab')₂ フラグメント $100\mu l$ 中で、 4 度 20 分間インキュベートした。 PBS - BSA で 3 回および PBS で 1 回洗浄した後、 細胞を、 $0.5ml$ の PBS 中に再懸濁した。 分析を、 FACSCAN V (Becton Dickinson, San Jose, Calif.) を用いて実行した。

【0065】

10

(ハイブリドーマクローンの生成)

先に de Boer ら、 J. Immunol. Meth. 113: 143 (1988) によって記載されたように、 50% ポリエチレングリコールを用いて、 免疫したマウス由来の脾細胞を、 SP2/0 または P3x63Ag8.653 マウス骨髄腫細胞と $10:1$ の比率で融合した。 この融合細胞を、 ヒポキサンチン ($0.1mM$)、 アミノブテリン ($0.01mM$)、 チミジン ($0.016mM$) および $0.5ng / ml$ の hIL-6 (Genzyme, Cambridge, Mass.) を補充した完全 IMDM 培地中に再懸濁した。 次いで、 この融合細胞を、 96 ウェル組織培養プレートのウェル間に分配して、 各ウェルを、 平均して 1 増殖ハイブリドーマに維持した。

【0066】

20

10 ~ 14 日後に、 ハイブリドーマ集団の上清を特異的抗体生成についてスクリーニングした。 ハイブリドーマクローンによる特異的抗体生成のスクリーニングのために、 各ウェルからの上清をプールし、 そして最初に抗 CD40 活性特異性について、 ELISA によって試験した。 次いで、 この陽性物を、 FACS アッセイについて上に記載したように、 EBV で形質転換した B 細胞の蛍光細胞染色のために使用した。 陽性ハイブリドーマ細胞を、 $0.5ng / ml$ hIL-6 を含む IMDM / FBS 中の限界希釈によって 2 回クローン化した。

【0067】

(実施例 1)

(Sf9 細胞におけるヒト CD40 の発現)

30

CD40 をコードする組換えウイルスオートグラファ (Autographa) カリフォルニアカバキュロウイルス (AcNPV) に感染させた Sf9 昆虫細胞を、 24 ウェルプレートにおいて 48 時間培養した。 組織培養培地を除去した後、 このプレートを、 1% BSA を含む PBS (PBS - BSA) 中の $0.25ml$ の抗体と共に、 室温 (RT) にて 45 分間インキュベートした。 PBS - BSA を用いて 3 回洗浄した後、 このプレートを、 PBS - BSA 中の西洋わさびペルオキシダーゼに結合体化したヤギ抗 (マウス全 Ig) 免疫グロブリン (Zymed, South San Francisco, Calif.) の $1/250$ 希釈 ($250\mu l$) と共に、 室温にて 35 分間インキュベートした。 結合していないペルオキシダーゼ活性を、 PBS - BSA で 5 回洗浄して除去した。 結合したペルオキシダーゼ活性を、 $10ml$ のエタノール ($10mM$ 酢酸ナトリウム、 $10mM$ EDTA 緩衝液 (pH 5.0) を含有する) 中に、 $2mg / ml$ の $3',3',5',5'$ -テトラメチルベンジン ($0.5ml$) を希釈し、 そして $0.03\% (v/v)$ H_2O_2 を添加することによって調製したアッセイ混合物の添加によって明らかにした。 この反応を、 $1M H_2SO_4$ ($100\mu l$) の添加によって 10 分後に停止させた。

40

【0068】

(実施例 2)

(ヒト免疫グロブリントランスジェニックマウスにおいて惹起された抗体)

ヒト IgG2 重鎖遺伝子座およびヒト K 軽鎖遺伝子座に対するトランスジェニックマウスを、 ヒト CD40 を発現する Sf9 細胞で免疫した。 免疫の方法を、 de Boer、 米国特許第 6,004,552 号に記載されるように実行した。 要するに、 マウスを、 Ac

50

C D 4 0 ウィルスに感染させた S f 9 細胞 (5×10^6 個) を用いて、0 日目および 14 日目に腹腔内注射した。21 日目に、 $100 \mu l$ の血清を特異的抗体の存在について試験するためにはじめに獲得した。少なくとも 2 週間の静置期間後、このマウスに、A c C D 4 0 ウィルスに感染させた 5×10^6 細胞を用いる最後の注射を受けさせた。この最後の注射の 3 日後に、脾細胞を細胞融合のために使用した。

【 0 0 6 9 】

マウスを、E L I S A において、組換え体 C D 4 0 とのマウスの血清反応性に基づく融合について選択した。免疫したマウス由来の脾細胞を、K o h l e r および M i l s t e i n 、N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 - 9 6 (1 9 7 5) の方法 (改変を伴う) によって、マウス骨髄腫細胞 (N S / O) に融合した。H A T 選択培地におけるハイブリドーマの増殖を、E L I S A において、C D 4 0 に結合するこれらの能力に基づくさらなる特徴付けのために選択した。非トランスフェクト S f 9 細胞溶解物に結合した抗体または抗マウス軽鎖抗体を生成したハイブリドーマを、考察からはずした。S f 9 細胞溶解物に結合しなかった C D 4 0 結合抗体または抗マウス軽鎖抗体を生成したハイブリドーマを、サブクローニングした。サブクローニングを、さらなる特徴付けのための抗体を生成するために使用した。ハイブリドーマ抗体をまた、それらの表面上でヒト C D 4 0 を発現する R a m o s リンパ腫細胞を染色する能力について試験した。E L I S A によって測定した場合の、最大半減の C D 4 0 結合を示す抗体の濃度を以下の表 2 に示す。

【 0 0 7 0 】

(表 2)

(E L I S A による最大半減 C D 4 0 結合を示す抗 C D 4 0 抗体の濃度)

【 0 0 7 1 】

【 表 2 】

抗体	EC50 (ng/ml)
5H7	10
12D9	15
15B8	40
20C4	15
9F7	15

10

20

30

次いで、ハイブリドーマ抗体を、抗 C D 2 8 活性化ヒト末梢血 T 細胞で刺激したヒト末梢血 B 細胞による I g M の生成を阻害する能力について選択した (図 1) 。ハイブリドーマ抗体を、C D 4 0 L および抗 I g M によって誘導されるヒト末梢血 B 細胞の増殖を阻害する能力について、さらにスクリーニングした (図 2) 。ハイブリドーマをまた、休止しているヒト末梢血 B 細胞における増殖を誘導する能力についてスクリーニングした (図 3) 。いくつかのハイブリドーマ (例えば、3 6 C 4 - G 2) は、著しい刺激性活性を示した。従って、C D 4 0 に結合し得る場合でさえ、全てヒト抗体が所望の阻害効果を提示するとは限らない。4 つのハイブリドーマを、最適阻害活性を有する約 3 6 個から選択した。

【 0 0 7 2 】

(実施例 3)

(選択したハイブリドーマの結合特性)

4 つのハイブリドーマを、上記の実施例 2 に記載のように、B 細胞活性化に関するこれらの阻害効果に基づいて選択した。これらの結合特性を、センサー表面上に捕捉された抗 C D 4 0 抗体を有する移動相として可溶性組換え C D 4 0 を用いる B I A c o r e 評価によって決定した。阻害抗体は、表 3 に示すように、本明細書中に記載される使用にとって適切な種々の結合親和性を示した。

【 0 0 7 3 】

(表 3)

【 0 0 7 4 】

【 表 3 】

40

50

抗体	Ka (M-1s-1)	Kd (sec ⁻¹)	KD (M)
5H7 F _{ab} *	2.4 x 10 ⁶	3.5 x 10 ⁻³	1.4 x 10 ⁻⁹
5H7 Ab**	1.5 x 10 ⁶	4.1 x 10 ⁻³	2.8 x 10 ⁻⁹
15B8**	1.16 x 10 ⁶	3.6 x 10 ⁻³	3.1 x 10 ⁻⁹
20C4**	1.9 x 10 ⁵	3.6 x 10 ⁻²	1.8 x 10 ⁻⁷
12D9**	1.5 x 10 ⁵	1.0 x 10 ⁻¹	6.7 x 10 ⁻⁷
9F7**	1.35 x 10 ⁵	2.2 x 10 ⁻²	1.7 x 10 ⁻⁷

10

* 固定相 = C D 4 0 、 移動相 = F_a b

** 固定相 = 抗体、 移動相 = s C D 4 0

(実施例 4)

(C D 4 0 に結合する可変ハイブリドーマ)

選択したモノクローナル抗体の相対的な結合特性を、 フローサイトメトリーによって試験した。全血を、 F I T C - 結合体化 1 5 B 8 および抗 C D 2 0 - P E C y 5 の 0 . 1 μ g を添加した、 種々の濃度の非標識ハイブリドーマ抗体と共に 3 0 分間インキュベートした。次いで、 R B C を溶解し、 白血球集団を固定し、 そして分析のための標本を獲得した。

【 0 0 7 5 】

これらの研究は、 非標識 1 5 B 8 が、 ヒト末梢血由来の C D 2 0 + リンパ球への非標識 2 0 C 4 の結合をブロックすることを示す (表 4) 。対照的に、 非標識 2 0 C 4 は、 この細胞集団への標識 1 5 B 8 の結合を弱くブロックするだけであった。従って、 2 つの抗体は、 同様かまたは密接に関連したエピトープを認識するが、 B i a c o r e 分析において示される親和性の差異はまた、 低親和性抗体のより弱い競合能力に反映される。標識 M A b を、 ヒト、 R h e s u s (M a c a c a m u l a t t a) およびカニクイザル (M a c a c a f a s c i c u l a r i s) マカーチ由来の末梢血細胞を染色するために使用した。全 3 種を、 1 5 B 8 、 2 0 C 4 、 1 2 D 9 および 9 F 7 の M A b によって染色した (図 7) 。

【 0 0 7 6 】

(表 4)

【 0 0 7 7 】

【 表 4 】

20

30

チューブ#	抗体-1	μg	抗体-2	μg	huWB		% MFI 減少
					#1219	MFI*	
1	-	-	15B8-FITC	0.1	100 μl	72.0	
2	HulgG2	0.1	15B8-FITC	0.1	100 μl	117.5	-63.19%
3	HulgG2	0.5	15B8-FITC	0.1	100 μl	97.0	-34.72%
4	HulgG2	1	15B8-FITC	0.1	100 μl	103.8	-44.17%
5	15B8	0.1	15B8-FITC	0.1	100 μl	22.0	69.44%
6	15B8	0.5	15B8-FITC	0.1	100 μl	20.5	71.53%
7	15B8	1	15B8-FITC	0.1	100 μl	25.9	64.03
8	20C4	0.1	15B8-FITC	0.1	100 μl	91.6	-27.22%
9	20C4	0.5	15B8-FITC	0.1	100 μl	70.3	2.36%
10	20C4	1	15B8-FITC	0.1	100 μl	61.0	15.28%
11	-	-	20C4-FITC	0.1	100 μl	82.3	
12	HulgG2	0.1	20C4-FITC	0.1	100 μl	82.6	-0.61%
13	HulgG2	0.5	20C4-FITC	0.1	100 μl	74.4	9.60%
14	HulgG2	1	20C4-FITC	0.1	100 μl	82.4	-0.12%
15	15B8	0.1	20C4-FITC	0.1	100 μl	18.3	77.76%
16	15B8	0.5	20C4-FITC	0.1	100 μl	21.3	74.12%
17	15B8	1	20C4-FITC	0.1	100 μl	22.3	72.90%
18	20C4	0.1	20C4-FITC	0.1	100 μl	30.2	63.30%
19	20C4	0.5	20C4-FITC	0.1	100 μl	22.6	72.54%
20	20C4	1	20C4-FITC	0.1	100 μl	20.8	74.73%

* M F I : 平均の蛍光強度

10

20

(実施例5)

(ヒト末梢B細胞による免疫グロブリン分泌の阻害)

プレートを、抗ヒトCD3 (2 μg/ml、UCHT1、NE/LE、Pharmingen)を用いて、4にて一晩コートした。この予めコートしたプレートを、PBSを用いて3回洗浄した。T細胞を、3000R adで放射線照射した。このB細胞を、1mlあたり10⁴個で、RPMI (+)に再懸濁した。100 μlのB細胞を、このウェル中に添加し、次いで抗CD40抗体をウェル中に添加した。このT細胞を、1mlあたり10⁵個で、RPMI (+)に再懸濁した。ヒト組換え体IL2 (Chiron、-20で保藏した10u/μlの水溶液)を、細胞懸濁液に200u/mlまで添加した。100 μlの懸濁液を各ウェルに入れ、B細胞および抗体と十分に混合した。RPMI (+)をウェルに添加し、計200 μlにした。ELISAのために細胞を遠心沈殿させた後、このプレートを、培地の回収前の8日間、37にてインキュベートした。その結果を、以下の表5に示す。

30

【0078】

(表5)

(T細胞刺激B細胞によるIgM分泌に関するモノクローナル抗体の効果)

【0079】

【表5】

抗体	O.D.
なし	0.67
15B8	0.35
20C4	0.43
12D9	0.47
13E4	0.37

40

この結果は、本発明に記載の抗体の存在下において、T細胞刺激ヒト末梢血B細胞による免疫グロブリン(IgM)の分泌が減少することを示す。

【0080】

(実施例6)

(Jurkat刺激したヒト末梢B細胞の増殖の阻害)

B細胞を、上記のように精製した。10⁴個の精製したB細胞、10⁵個の照射 (300

50

0 Rad) した Jurkat 細胞、試験されるべき抗体を、抗 CD3 でコートした 96 ウェルプレートに添加した。このプレートを 37 ℃ にて 4 日間にわたってインキュベートし、最後の 18 時間の間に ³H - チミジンを用いて細胞を標識した。この細胞を収集し、そして計数した。この結果を以下の表 6 に示す。

【0081】

(表 6)

(Jurkat 細胞刺激した B 細胞増殖に対する抗体の効果)

【0082】

【表 6 】

抗体	1 分あたりのカウント (cpm)
なし	14,000
5H7, 10 µg/ml	8,000
5H7, 0.1 µg/ml	9,000
15B8, 1 µg/ml	10,500
13E4, 1 µg/ml	11,000
20C4, 1 µg/ml	10,500

10

この結果は、本発明の抗体の存在下において、 Jurkat 細胞によって刺激される B 細胞増殖が阻害されることを示す。

【0083】

20

(実施例 7)

(CD40L 刺激したヒト末梢 B 細胞の増殖の阻害)

B 細胞を上記のように精製した。 10^4 個の精製した B 細胞、 2×10^4 個のホルムアルデヒド固定した CHO - CD40L 細胞、および試験されるべき抗体を、抗 CD3 コートした 96 ウェルプレートに添加した。このプレートを 37 ℃ にて 4 日間にわたってインキュベートし、最後の 18 時間の間に ³H - チミジンを用いて細胞を標識した。この細胞を収集し、そして計数した。この結果を以下の図 1 に示す。

【0084】

(実施例 8)

(B 細胞増殖の刺激)

30

B 細胞 (1 ウェルあたり、 1×10^4 個) を、 U 底 96 ウェルマイクロタイプラートにおいて、 10 % 胎仔ウシ血清を補充した RPMI (200 µl) 中で培養した。 B 細胞を、固定した抗 (IgM) 抗体 (5 µg / ml、 Sigma) の添加によって刺激した。種々の濃度の MAb を、初めに微少培養物に添加し、そして増殖を 18 時間のパルス後、 ³H - チミジンの取り込みを測定することによって 4 日目に評価した。この結果を図 2 に示す。

【0085】

(実施例 9)

(抗 IgM によって刺激されたヒト末梢 B 細胞の増殖に対する抗 CD40 抗体の効果)

10^4 個の精製した B 細胞、抗 IgM ビーズ (5 µg / ml、 Sigma) 、および試験されるべき抗体を、 96 ウェルプレートに添加した。このプレートを 37 ℃ にて 4 日間にわたってインキュベートし、最後 18 時間の間に ³H - チミジンを用いて細胞を標識した。この細胞を収集し、そして計数した。この結果を図 3 に示す。

40

【0086】

(実施例 10)

(ヒト末梢 B 細胞の増殖に対する抗 CD40 抗体架橋の効果)

10^4 個の精製した B 細胞を、抗 CD40 コートした 96 ウェルプレートに添加した。このプレートを 37 ℃ にて 4 日間にわたってインキュベートし、最後 18 時間の間に ³H - チミジンを用いて細胞を標識した。この細胞を収集し、そして計数した。この結果を図 4 に示す。

50

【0087】

(実施例11)

(ヒト抗CD40抗体のポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列)

mRNAを、実施例2に記載のように生成したハイブリドーマから調製し、RT-PCRをmRNAに関して実施した。プライマーの2つのセットを、PCR産物を生成するために使用した：ユニバーサルプライマーまたは重鎖および軽鎖のファミリーのプールのプライマー；ならびにファミリー特異的プライマー。PCR産物をゲル上で分析し、配列決定し、そして翻訳した。ポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、表7にまとめた配列表において提供する。

【0088】

10

(表7)

【0089】

【表7】

配列番号	抗体	領域
1	12D9	重鎖定常領域 ポリヌクレオチド
2	12D9	重鎖定常領域 アミノ酸
3	20C4	VK1ポリヌクレオチド
4	20C4	VH1ポリヌクレオチド
5	9F7	VK1ポリヌクレオチド
6	9F7	VH1ポリヌクレオチド
7	15B8	VK3ポリヌクレオチド
8	15B8	VH1ポリヌクレオチド
9	13E4	VH1ポリヌクレオチド
10	12D9	VH1ポリヌクレオチド
11	9F7	VH1アミノ酸
12	12D9	VH1アミノ酸
13	15B8	VH1アミノ酸
14	20C4	VH1アミノ酸
15	9F7	VK1アミノ酸
16	12D9	VK1アミノ酸
17	15B8	VK1アミノ酸
18	20C4	VK1アミノ酸

抗体の特異的領域を、図5、6および8～14に示す。この情報を使用して、本発明に従う使用のためのさらなるモノクローナル抗体を設計し得る。これらのモノクローナル抗体は、1つ以上のフレームワークまたはCDR領域の置換により、本明細書中に記載される抗体とは異なり得る。このモノクローナル抗体はまた、1つ以上のアミノ酸置換によって異なり得、これはフレームワークおよびCDRの特定領域において異なることが示される（図5および6）。一旦、アミノ酸配列が設定されると、慣用的手順が使用され、モノクローナル抗体の発現のための対応するポリヌクレオチド配列を構築し得る。モノクローナル抗体の発現および精製は、米国特許第5,545,403号、同第5,545,405号および同第5,998,144号（本明細書中で参考として援用される）中に開示されるような、当該分野で公知の方法を用いて行われる。

40

【0090】

(実施例12)

(インビトロでの悪性B細胞増殖に対する15B8の効果)

15B8がインビトロにおいてCD40L様の増殖シグナルを提供するかどうかを試験するため、腫瘍に浸潤されたリンパ節由来のB細胞（NHL細胞）を、抗体未処置のNHL

50

患者1人、*rituximab*感受性のNHL患者1人および*rituximab*耐性のNHL患者1人より、採取した。これらのNHL細胞を、以下の4つの異なる培養条件下で研究した：抗体の添加なし（培地）；ヒトアイソタイプ抗体IgG2の添加（コントロール）；抗CD40抗体MS81（アゴニスト抗体）の添加；および15B8の添加。IL-4の存在下または非存在下にて、全ての抗体を1 μ g/mL、2 μ g/mLおよび5 μ g/mLで試験した。2人の患者由来のNHL細胞を、上記のように同じ4つの条件下でIL-4（2ng/ml）の存在下で、培養した。B細胞増殖を、上記の 3 H-チミジン取り込みにより測定した。

【0091】

抗CD40抗体15B8は、1 μ g/mL、2 μ g/mLおよび5 μ g/mLの濃度では、IL-4の存在下または非存在下のどちらでも、NHL細胞が増殖するように刺激しなかった。対照的に、同じ濃度で試験したアゴニスト抗CD40抗体（MS81）は、IL-4の存在下および非存在下で、全ての患者のサンプルにおいてNHL細胞増殖を刺激した。1人の患者からの代表的な結果を、以下に示す（図15および図16）。上記2人の患者由来のNHL細胞のIL-4存在下での結果、および3人の患者由来のNHC細胞のIL-4非存在下での結果は、同等であった。これらの結果は、15B8が、アゴニスト抗CD40抗体ではなく、そしてインピトロにおいて*rituximab*感受性のNHL患者、*rituximab*未処理のNHL患者または*rituximab*耐性のNHL患者由来のNHL細胞の増殖を刺激しないことを示す。

【0092】

NHL細胞のFACS分析を、直接標識した15B8-FITCまたは15B8+抗Hu IgG2-FITCの一方を用いて実施し、試験されたNHL細胞表面にCD40が発現されていること、および15B8がNHL細胞に結合することを確認した。*rituximab*感受性の患者2人および*rituximab*耐性の患者4人（合計6人の患者）由来のNHL細胞を試験した。全ての患者由来のNHL細胞は、CD40を発現し、そして15B8に結合した。所定のどの患者においても15B8結合陽性細胞集団は、約66%～91%であった。

【0093】

（実施例13）

（15B8は、インピトロでNHL細胞のCD40Lで刺激した増殖を阻害する）
インピトロにおいてCD40Lによって提供される増殖シグナルをブロックする15B8の能力を評価するため、患者由来のNHL細胞を、実施例12に記載するように、4つの異なる条件下でCD40L発現フィーダー細胞上の懸濁物中にて培養した：抗体の添加なし（培地）；ヒトアイソタイプ抗体IgG2の添加（コントロール）；抗CD40抗体MS81（アゴニスト抗体）の添加；および15B8の添加。全ての抗体を、IL-4存在下または非存在下で1 μ g/mL、2 μ g/mLおよび5 μ g/mLの濃度で添加した。抗体未処置の患者1人、*rituximab*感受性の患者2人、および*rituximab*耐性の患者5人（合計8人の患者）由来のNHL細胞を、上記と同じ4つの条件下で、IL-4の存在下（2ng/ml）にて培養した。*rituximab*感受性の患者3人および*rituximab*耐性の患者4人（合計7人の患者）由来のNHL細胞を、同様の条件下でIL-4の非存在下にて培養した。NHL細胞の増殖を、 3 H-チミジン取り込みにより測定した。

【0094】

以下の表8は、インピトロでCD40L単独で刺激した、*rituximab*感受性の患者2人（一方の患者からのデータは、2回の別々の実験において再現性があった）、および*rituximab*耐性の患者4人（合計6人の患者）由来のNHL細胞の増殖に対する15B8の阻害効果を示す。1人の患者（A）の細胞からの代表的な結果を示す（図17）。15B8は、6人の患者において、コントロールと比較した場合、約12～68%増殖を阻害する。15B8細胞による阻害程度は、患者サンプルおよび15B8の用量レベルに依存して変化する。試験した7人の患者サンプルのうちの6つからのデータの統計

10

20

30

40

50

学的分析は、CD40L刺激したNHLの細胞増殖の15B8による阻害が、1μg/mlで有意なことを示す($p = 0.05$)。統計学的に有意な用量応答($p < 0.005$)が存在し、この阻害効果は15B8用量の増加とともに増強される。

【0095】

(表8)

(IL-4非存在下におけるNHL患者細胞のCD40-L刺激した増殖に対する15B8 Mabの効果¹)

【0096】

【表8】

患者ID	患者の型 ²	処置用量 (ug/ml)	15B8% 阻害 ³
A	CR	1	56.61
		2	58.99
		5	63.16
A	CR	1	61.96
		2	60.41
		5	64.75
		10	60.29
B	CR	1	なし
		2	なし
		5	なし
		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. 患者由来のNHL細胞を、培地、アゴニストCD40(MS81)、アンタゴニスト抗CD40(15B8)またはhuIgG2アイソタイプコントロールの存在下にて、ヒトCD40Lを発現するマウスL細胞と共にインビトロにて培養した。NHL細胞の増殖を、3H-チミジン取り込みによって測定した(rituximab感受性の患者1人からのデータは、CD40Lのcpmが2000未満であるので表にはない)

2. 抗CD20 Mab治療に対する患者の応答；CR、完全に応答を示す患者；NR、応答のない患者

3. 15B8%阻害 = 100 - (15B8 cpm / huIgG2 cpm × 100) ; 3つの測定の平均を示す。

【0097】

(以下の)表9は、インビトロにおいてCD40LおよびIL-4の両方によって刺激された、抗体未処置の患者1人、rituximab感受性の患者2人(両患者のサンプルからのデータは、再現性よく2回繰り返された)、およびrituximab耐性の患者5人(合計8人の患者)由来のNHL細胞の増殖に対する15B8の阻害効果を示す。15B8は、1μg/mlで、NHL細胞のCD40LおよびIL-4の媒介性増殖を有意($p < 0.05$)に阻害した。阻害の程度は、インビトロで、8人全ての患者に由来する

10

20

30

40

50

サンプルにおいて、高用量（5または10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）で、18~69%の範囲であった。0.01~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の15B8濃度範囲で、15B8によるこの阻害効果の統計学的に有意な用量応答（ $p < 0.005$ ）が存在する（図18は、代表的な、1つの用量応答曲線を示す）。

【0098】

これらのインビトロにおける結果は、15B8を用いた処置が患者のNHL細胞に対するCD40媒介性増殖シグナルをブロックし得ることを、示唆する。

【0099】

（表9）

（IL-4の存在下での、CD40-L刺激されたNHL患者細胞に対する15B8 M 10 Abの効果¹）

【0100】

【表9】

患者ID	患者の型 ²	処置用量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	15B8% 阻害 ³
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	なし
		2	16.79
		5	21.64
		10	12.63
D	NR	1	1.95
		2	6.43

20

30

患者ID	患者の型 ²	処置用量 (ug/ml)	15B8 % 阻害 ³
		5	20.95
		10	26.31
E	NR	1	1.91
		2	2.74
		5	28.36
		10	28.26
F	NR	1	なし
		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	なし
		2	なし
		5	7.81
		10	18.47
I	未処置	0.01	なし
		0.04	13.16
		0.2	15.64
		1	16.20
		5	21.53
		10	24.51

1. 患者由来のNHL細胞を、表1に記載する条件下、ヒトCD40Lを発現するマウスL細胞と共に2ng/mlでのIL-4(ヒトインターロイキン-4)の存在下で培養した。

2. 抗CD20 Mab治療に対する患者の反応；CR、完全な応答を示す患者；NR、応答のない患者；未処置、未処置の患者

3. hIgG2と比較した%阻害。15B8 %阻害 = 100 - (15B8 cpm / hIgG2 cpm × 100)

(実施例14)

(インビトロでの異なる種における15B8のアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性の実証)

15B8がアゴニスト抗CD40であるか、またはアンタゴニスト抗CD40であるか否かを決定するために、15B8を、ヒトおよび5つの異なる靈長類種(チンパンジー(chimp)、マーモセット、カニクイザル、アカゲザル、およびヒヒを含む)由来の細胞を用いて、以下に記載するいくつかのインビトロアッセイにて試験した。

【0101】

15B8は、ヒト末梢血B細胞を活性化せず、ヒト、チンパンジーおよびマーモセットにおいてインビトロでPBMC増殖を引き起こさない。末梢血から得られたヒトB細胞上のCD40の活性化は、B細胞の増殖を導く(van Kooten C., J. Leukoc. Biol., 2000 Jan., 67(1):2-17; Denton M.D., Pediatr. Transplant., 1998 Feb., 2(1):6-15; Evans D.E., J. Immunol., 2000 Jan. 15, 164(2):688-97; Noelle R.J., Agents Actions Suppl., 1998, 49:17-22; Lederman S.ら, Curr. Opin. Hematol., 1996, 3(1):77-86)。15B8がB細胞上のCD40を活性化するか否かを試験するために、末梢血由来の新しく単離したヒトB細胞またはPBMCを用いて、一連の増殖アッセイを実行した。このアッセイにおいて15B8の効果を、³Hメチル-チミジン取り込みによって測定した(John E. Colligan

10

20

30

40

50

ら, Current Protocols in Immunology, Vol. 13 : 12, John Wiley & Sons, Inc., 1991; Kwekkeboom J., Immunology, 1993 Jul, 79 (3) : 439 - 444)。以下の表10の濃度0.2 μg/ml、1 μg/mlおよび5 μg/mlにおいて示されるように、15B8は、CD40Lに対する効果（これは、ヒトB細胞に対する強力な増殖促進効果を実証する）と比較して、精製B細胞増殖に対して最小の効果しか有さなかった。表3に示されるように、2人の健康なボランティア由来の精製B細胞における結果は、比較可能である。

【0102】

15B8をさらに、新しく単離したヒトPBMCを用いたヒトPBMC増殖の刺激に対して、CD40Lと比較した。以下の表10に要約されるように、15B8は、16人のボランティア由来の試験したサンプルにおいて0.2~5 μg/mlの範囲の濃度にて、3-Hメチル-チミジン取り込みによって測定した場合、インビトロにおけるヒトPBMC増殖を刺激しない（John E. Coliganら、Current Protocols in Immunology, Vol. 13: 12, John Wiley & Sons, Inc., 1991; Kwekkeboom J., Immunology, 1993 Jul, 79 (3) 439 - 444）。

【0103】

(表10)

(15B8抗体によるヒト、チンパンジーおよびマーモセットにおけるPBMC/B細胞増殖の刺激¹)

【0104】

【表10】

種	細胞供給源	サンプル数	用量(ug/ml)	hIgG2, ベース	CD40L, 増加(倍) ³	15B8, 増加(倍) ²
ヒト	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
ヒト	PBMC	5	5	1	9.36-91.60	0.40-2.28
		15	1	1	9.36-91.60	0.35-2.38
		12	0.2	1	9.36-91.60	0.41-3.74
マーモセット	PBMC	3	5	1	29.24-90.3	2.05-7.2
		5	1	1	7.99-90.3	1.35-5.79
チンパンジー-PBMC	PBMC	1	5	1	10.15	2.46
		5	1	1	5.12-9.2	0.66-5.2

1. B細胞/PBMCを、CD40L、15B8またはhIgG2アイソタイプコントロールの存在下でインビトロで培養した。

2. 細胞増殖の結果を、hIgG2コントロールに対する15B8の3H-チミジン取り込みの割合として報告する。

いくつかのサンプル由来のデータは、2000よりも小さいCD40L（ポジティブコントロール）によって誘導されたCPMについて、表に含めていない。

3. 表に示すCD40Lについての増加(倍)は、5 μg/mlのhIgG2のcpmに対するCD40Lのcpmの割合である。

CD40L: 実験前にホルムアルデヒドで固定した、CD40LでトランスフェクトしたCHO細胞。

【0105】

B細胞活性化の際、多数の細胞表面タンパク質がアップレギュレートされる（Denton M.D., Pediatr. Transplant., 1998 Feb., 2 (1) : 6-15; Evans D.E., J. Immunol., 2000 Jan. 15, 164 (2) : 688-97; Noelle R.J., Agents Action

10

20

30

40

50

s Suppl. , 1998 , 49 : 17 - 22 ; Lederman S.ら, Curr. Opin. Hematol. , 1996 , 3 (1) : 77 - 86)。15B8がヒトB細胞を活性化しないこと、およびCD40に結合した場合にアゴニストシグナルを誘導しないことを確認するために、B細胞活性化マーカーをアップレギュレートするその能力を、精製ヒトPBMCを用いたFACS分析によって試験した。15B8処理したヒトB細胞において、CD25、CD69、CD86、HLA-DRおよびICAM-1 (CD54)のような活性化マーカーの発現のアップレギュレーションは、存在しなかった (表4)。これらのマーカーのレベルは、細胞を15B8またはhuIgG2コントロールのいずれかで処理した場合と類似していた (表11)。対照的に、CD69は、3人の健康なボランティア由来の試験したPBMCサンプルにおいて、一貫してCD40Lによってアップレギュレートされた。

【0106】

(表11)

(FACSによる、インビトロにおけるB細胞活性化マーカーのアップレギュレーションに対する15B8の効果)

【0107】

【表11】

種	細胞供給源	インキュベーション時間	被験体数	CD54	CD69	HLA-DR	CD25	CD80	CD86
ヒト	PBMC由来のCD20	4時間～24時間	3	-	-	-	-	N/A	-
チンパンジー	PBMC由来のCD20	4時間～24時間	3	N/A	-	N/A	N/A	N/A	N/A

1. “ - ”は、アップレギュレーションがないことを意味する。

2. “ N / A ”は、測定しなかったかまたは成功しなかったことを意味する。

【0108】

B細胞活性化のさらなる結果は、表面FasLのアップレギュレーションおよびアポトーシスである (Revy P. , Eur. J. Immunol. , 1998 Nov. , 28 (11) : 3648 - 3654 ; Carey G. B. , Immunol. Rev. , 2000 Aug. , 176 : 105 - 115 ; Ju S. T. , Int. Rev. Immunol. , 1999 , 18 (5 - 6) : 485 - 513 ; Baumgarth N. , Immunol. Rev. , 2000 Aug. , 176 : 171 - 180)。15B8がアゴニスト抗CD40抗体ではないことを確認するために、ヒトB細胞のFasL発現およびアポトーシスを誘導するその能力もまた、試験した。細胞表面上のアネキシンV染色は、初期アポトーシスマーカーとして使用され得る (Ju S. T. , Int. Rev. Immunol. , 1999 , 18 (5 - 6) : 485 - 513)。ヒトB細胞を末梢血から精製し、15B8とインキュベートした。FACS分析を使用して、アネキシンVおよび抗FasLのポジティブ染色を用いて細胞を検出した。15B8と共にインキュベートした細胞またはアイソタイプコントロール (huIgG2) 抗体と共にインキュベートした細胞との間に、2つの試薬による表面染色に、有意な差異は存在しなかった。この結果は、15B8がインビトロにおいてヒトB細胞のアポトーシスを誘導しないことを示す。これらのデータはさらに、15B8がヒトB細胞に対するアゴニスト抗CD40抗体ではない証拠を提供する。

【0109】

15B8は、靈長類由来のCD20ポジティブPBMCの表面上で発現されるCD40と交差反応する。15B8が他の靈長類種 (例えば、チンパンジーおよびマーモセット) 由来のB細胞上のCD40を活性化し得るか否かを試験するために、15匹のチンパンジーおよび5匹のマーモセット由来の新しく単離したチンパンジーPBMCおよびマーモセッ

10

20

30

40

50

ト P B M C を用いて、同じ増殖アッセイを実行した。ヒト P B M C を用いた結果と同様に、15B8は、6匹のチンパンジーおよび5匹のマーモセット由来のP B M C のインビトロにおける増殖を、1 μ g / m l 濃度および5 μ g / m l 濃度において刺激しなかった（上記の表3）。15B8はまた、試験した3個のチンパンジー - P B M C サンプルにおいて、活性化マーカー（C D 6 9）の発現をアップレギュレートしなかった（表4）。15B8は、6匹のチンパンジー由来の試験した全サンプルにおけるインビトロでの24時間刺激および48時間刺激の後に、ヒト P B M C コントロールと類似して、チンパンジー P B M Cにおいて、F a s L 発現およびアポトーシスに何の影響も示さなかった。

【0110】

プラスチック表面に固定された二次抗体による架橋15B8は、B細胞増殖を刺激するその能力を増大しなかった（データは示さず）。この架橋アッセイにおいてヒトおよびチンパンジー由来のP B M C を用いて試験した場合、15B8は細胞増殖を刺激しなかった。この観察は、インビオで投与された場合の、他のF c レセプター発現細胞への抗15B8（H A H A）またはF c の結合誘導の際に、15B8がB細胞増殖に対して刺激性である（アゴニストである）ことの危険性を低減することを示す。

【0111】

まとめると、15B8は、インビトロにおいて、ヒトB細胞 / P B M C においてもチンパンジー / マーモセットのP B M C においても、活性化シグナルを開始しない。従って、15B8は、ヒト、チンパンジーおよびマーモセットにおいて、アゴニスト抗C D 4 0 抗体ではない。

【0112】

（実施例15）

（15B8は、インビトロで、ヒト、チンパンジーおよびマーモセットにおけるアンタゴニスト抗C D 4 0 抗体である）

15B8がアンタゴニスト抗C D 4 0 であるか否かを決定するために、C D 4 0 - C D 4 0 L 相互作用を阻害するその能力を、C D 4 0 L 媒介ヒトB細胞増殖アッセイにおいて試験した（K w e k k e b o o m J . , I m m u n o l o g y , 1 9 9 3 J u l , 7 9 (3) : 4 3 9 - 4 4 4）。ヒトC D 4 0 L を発現するトランスフェクトしたC H O 細胞株を使用して、精製したヒト末梢血B細胞またはP B M C の増殖を刺激した。10人の健康なボランティア由来のヒトB細胞および3人の健康なボランティア由来のヒトP B M C を試験した。試験した全サンプルにおいて、15B8は、0 . 2 ~ 5 μ g / m l の濃度範囲にて、C D 4 0 L を発現するC H O 細胞により媒介される増殖を42 ~ 88 % 抑制した（表12）。図19は、3人の個体由来の細胞を用いた代表的な用量応答曲線を示す。15B8の影響のない用量は、0 . 0 0 8 μ g / m l であり、そして0 . 2 μ g / m l にて飽和用量に達する（図19）。この観察は、アンタゴニスト抗C D 4 0 抗体としての15B8が、細胞表面に発現されるC D 4 0 L によって提供される、ヒトB細胞およびP B M C における増殖シグナルを阻害し得ることを示す。

【0113】

（表12）

（15B8抗体を用いたP B M C / B細胞のC D 4 0 L 誘導増殖の阻害¹）

【0114】

【表12】

10

20

30

40

種	細胞供給源	サンプル数	用量 (ug/ml)	CD40L (ベース)	hIgG2, 阻害(%)	15B8, 阻害(倍) 2
ヒト	B	7	5	100	(-27) - 14%	45-85%
		9	1	100	(-93) - 11%	42-87%
		6	0.2	100	(-20) - (-6)%	44-82%
ヒト	PBMC	1	5	100	13%	45%
		2	1	100	3-32%	76-88%
マーモセット	PBMC	3	1	100	1-35%	68-84%
チンパンジーPBMC	PBMC	3	1	100	(-3) - 21%	55-73%

1. B細胞 / PBMCを、15B8またはhIgG2コントロールの存在下で、CD40Lを発現するCHO細胞と共にインビトロで培養した。CD40LをトランスフェクトしたCHO細胞を、実験前にホルムアルデヒドで固定した。細胞増殖を、³H-チミジン取り込みによって測定した。

2. “15B8 阻害%” = 100 - (15B8 cpm / CD40L cpm × 100)

-倍のCD40L(ポジティブコントロール)によって誘導された増殖について、いくつかのサンプル由来のデータは表中に含めていない。

【0115】

9匹のチンパンジーおよび3匹のマーモセット由来の新しく単離したPBMCを用いて、さらなるアッセイを実行した。ヒトPBMCを用いたように、15B8は、CD40L発現CHO細胞によって刺激されたチンパンジーPBMCおよびマーモセットPBMCの増殖を、1μg/mlの濃度レベルにて阻害し得た(上記表5)。15B8による阻害は、3匹のチンパンジーおよび3匹のマーモセット由来のPBMCサンプルにおいて、それぞれ、約55~73%および68~84%であった(上記の表5)。

【0116】

活性化されたB細胞は、多数の生物学的応答(例えば、増殖および抗体産生)を引き起こそ。T細胞依存性抗原によるB細胞の活性化は、CD4⁺T-ヘルパー(Th)細胞を含む。このT細胞ヘルパー細胞は、他の同時刺激因子およびサイトカインの相互作用と一緒に、B細胞上のCD40とTh細胞表面上のCD40Lとの相互作用の、協調作用によって媒介される。Denton M.D., Pediatr. Transplant., 1998 Feb., 2(1):6-15; Evans D.E., J. Immunol., 2000 Jan. 15, 164(2):688-97; Noel1le R.J., Agents Actions Suppl., 1998, 49:17-22; Lederman S.ら, Curr. Opin. Hematol., 1996, 3(1):77-86; Mackey M.F.ら, J. Leukoc. Biol., 1998, 63(4):418-428。15B8がTヘルパー細胞により媒介されるB細胞抗体産生をブロックし得るか否かを試験するために、精製したヒト末梢血B細胞を、抗CD3抗体で活性化した精製照射T細胞の存在下で培養した。ELISAアッセイを使用して、IgM産生のレベルを測定した。15B8は、このアッセイにおいてIgM産生を約30%低減した(データは示さず)。従って、15B8は、T細胞によって媒介されるB細胞免疫グロブリン産生を低減し得る。

【0117】

まとめると、15B8は、ヒト、チンパンジーおよびマーモセットにおいてCD40Lにより誘導されるBp細胞 / PBMC増殖を阻害し、そしてインビトロにおける精製ヒトB細胞によるT細胞誘導性(induced)抗体産生を阻害する。これらのデータは、15B8が、インビトロにおいて、ヒトB細胞ならびにチンパンジーおよびマーモセット由来のPBMCにおいて、アンタゴニスト抗CD40抗体であることを実証する。

【0118】

(実施例16)

(15B8は、インビトロにおいて、アゴニスト抗サル(アカゲザル、カニクイザル、お

10

20

30

40

50

およびヒヒ) CD40 抗体である)

FACS 分析は、15B8 がサル(カニクイザル、アカゲザルおよびヒヒ)の末梢血由來の B 細胞表面上に発現される CD40 に結合することを実証する。新しく単離したカニクイザル PBMC に対する 15B8 の効果を、ヒトおよびチンパンジーについて上記に記載した増殖アッセイと同じ増殖アッセイにて試験した(John E. Coliganら, Current Protocols in Immunology, Vol. 13: 12, John Wiley & Sons, Inc., 1991; Kwekkeboom J., Immunology, 1993 Jul, 79 (3): 439-444)。ヒト PBMC と対照的に、15B8 は、³H メチル-チミジン取り込みによって測定した場合に、インビトロで増殖するようにカニクイザル PBMC を刺激することが見出された(以下の表 13)。1 μg / ml レベルにおいて、15B8 は、17 匹のサル由來の試験した 22 個のサンプルにおいて(5 匹のサル由來のサンプルを 2 回試験した)、hu Ig G2 コントロールと比較して、PBMC の増殖を 6 ~ 129.7 倍刺激した(以下の表 13)。5 μg / ml レベルにおいて、15B8 によって刺激された増殖は、サル由來の 4 個のサンプルにおいて 14 ~ 24 倍であり、そして 2 匹のサル由來の 2 個のサンプルにおいて約 1.25 倍または 1.85 倍であった(表 13)。このことは、5 μg / ml の濃度レベルにおいて、15B8 がカニクイザル由來の PBMC に対するその増殖刺激効果について、飽和用量を超える限界であり得ることを示唆する。表面マーカーによる活性化状態についての B 細胞のさらなる FACS 分析によって、15B8 が、サル B 細胞上で CD 69、CD86 および HLA-DR のアップレギュレーションを誘導することが示された(表 14)。これらのデータは、15B8 は、インビトロにおいてカニクイザル由來の末梢血 B 細胞上で発現される CD40 に対して、アゴニスト抗体であることを示唆する。

【0119】

15B8 のこのアゴニスト効果がカニクイザル特異的ではないことを確認するために、アカゲザルおよびヒヒ由來の PBMC を用いて同じアッセイを実行した。以下の表 13 に示されるように、カニクイザルの細胞から得られた結果と類似の結果が観察された。15B8 はインビトロにおいて、アカゲザルおよびヒヒ由來の PBMC の増殖を刺激した(以下の表 13)。5 匹のアカゲザルおよび 3 匹のヒヒ由來の PBMC を用いた、15B8 のアゴニスト活性を示す(表 13)。

【0120】

(表 13)

(15B8 で刺激した、ヒト、カニクイザル、アカゲザルおよびヒヒ由來の PBMC の増殖¹)

【0121】

【表 13】

種	細胞供給源	サンプル数	用量 (ug/ml)	hu Ig G2, ベース	CD40L, 増加(倍) ³	15B8, 増加(倍) ²
ヒト	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
アカゲザル	PBMC	5	1	1	12.71-89.67	27.34-50.9
カニクイザル	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
ヒヒ	PBMC	3	1	1	5.19-175.07	3.32-113.28

1. PBMC を、CD40L、15B8 または hu Ig G2 コントロールの存在下でインビトロで培養した。

2. 増殖結果を、hu Ig G2 コントロールに対する 15B8 の³H-チミジン取り込みの割合として報告する。

いくつかのサンプル由來のデータは、2000 よりも小さい CD40L (ポジティブコン

10

20

30

40

50

トロール)によって誘導されたC P Mについて、表に含めていない。

3. 表に示すC D 4 0 Lについての増加(倍)は、5 μ g / m lのh u I g G 2のc p mに対するC D 4 0 Lのc p mの割合である。C D 4 0 LをトランスフェクトしたC H O細胞を、実験前にホルムアルデヒドで固定した。

【0122】

(表14)

(F A C S分析による、インビトロでのB細胞活性化マーカーのアップレギュレーションに対する15B8の効果)

【0123】

【表14】

10

種	細胞供給源	インキュベーション時間	被験体数	C D 54	C D 69	HLA-DR	C D 25	C D 80	C D 86
ヒト	PBMC由来のCD20	4時間～24時間	3	-	-	-	-	N/A	-
カニクイザル	PBMC由来のCD20/19	4時間～3日間	2	N/A	1/2アップ	1/1アップ(3日)	-	-	1/1アップ(3日)

1. “-”は、アップレギュレーションがないことを意味する。

2. “N/A”は、測定しなかったかまたは成功しなかったことを意味する。

20

3. 1匹のカニクイザル由来の細胞のみを、3日目にF A C Sによって分析した。

【0124】

(実施例17)

(15B8は、カニクイザルにおいてインビトロでのアゴニスト抗C D 4 0抗体である)

15B8は、インビトロにおいて、カニクイザル由来のP B M Cにおける細胞表面活性化マーカーの増大およびアップレギュレーションを刺激し得る。15B8がサルにおいてインビトロでのアゴニスト抗C D 4 0抗体であるか否かを決定するために、15B8の生体分布および冒された末梢B細胞の運命(すなわち、過剰な拡大(e x t r a v a s t i o n)、アポトーシス、活性化状態または補体溶解(c o m p l e m e n t l y s i s)を調べる研究を実行した[B i o d i s t r i b u t i o n 15B8.72 A n t i b o d i e s f o l l o w i n g I n t r a v e n o u s A d m i n i s t r a t i o n t o N o n - N a i v e M a l e a n d F e m a l e C y n o m o l g u s M o n k e y s (S N B L . 2 1 8 . 3 , S N B L U S A)]。

30

【0125】

カニクイザル(1匹の雌および2匹の雄)に、3 m g / k g 15B8の単回静脈内投与をした。以下のパラメーターをモニターした：臨床徵候、給餌の消費、体重、薬物動態、血清補完(C H 5 0)、B細胞(アポトーシスB細胞を含む)、T細胞、および単球についてのフローサイトメトリー。15B8でのB細胞C D 4 0レセプター飽和もまた、測定した。単回用量の15B8を与えた24時間後に動物の検死を行ない、そして標準的な器官の重量を測定した。脾臓および腋窩(a x i l l a r y)リンパ節の試験前手術生検を採取して、ベースラインコントロールとした。検死において、リンパ組織および非リンパ組織を、組織病理学および免疫組織化学についてサンプルにした。C D 3抗原、C D 4 0抗原、C D 2 0抗原、C D 2 7抗原、およびC D 3 8抗原に対する抗体を用いて、組織を免疫染色した。この研究の予備的な結果を、以下に考察する。

40

【0126】

全動物が予定した検死まで生存し、給餌の消費にも、体重にも、C H 5 0レベルにも、末梢血T細胞数にも単球数にも影響を与えたなかった。器官の重量に変化はなかった。脾臓の顕微鏡試験によって、壊死を伴なう中程度に分散した小胞性過形成(f o l l i c u l a r h y p e r p l a s i a)および/または15B8処理した動物の胚中心における好中球性の浸潤が示された。腸間膜リンパ節および単径部リンパ節の試験によって、3匹中

50

2匹の動物における軽症の小胞性過形成が明らかになった。処理に関連する微視的な影響は、他の組織（肝臓、皮膚、脳、甲状腺、肺、骨髄、副腎および腎臓）において見出されなかった。

【0127】

CD20抗体、CD27抗体、CD40抗体、およびCD86抗体を用いた免疫染色によって、脾臓小胞およびリンパ節小胞におけるこれらのマーカーの増大が明らかとなり、このことは、これらと同じ組織中で見出された小胞性過形成と相関する。CD20およびCD40の増大した染色は、脾臓およびリンパ節に限定されたが、いくつかのさらなる染色（CD27での肝臓組織の染色、ならびにCD86による肝臓クップファー細胞および炎症細胞の染色）が存在した。CD86染色はまた、胸腺髄細胞および副腎間質白血球においても増大した。コントロールと比較して、15B8処理動物においてCD3の免疫染色に変化は存在しなかった。

10

【0128】

これらの知見は、カニクイザルに投与される15B8の3mg/kgの単回用量が、24時間の期間内で、リンパ小胞の増殖ならびに/または脾臓およびリンパ節における末梢血からのB細胞の再分布をもたらし得ることを示す。CD20、CD27、CD40およびCD86に対する抗体は、他の細胞型の認識と一緒に、B細胞および/または活性化B細胞上に発現された抗原を認識する。これらの抗原を発現する細胞の数の増大が、処理動物の脾臓およびリンパ節で見出され、このことは、活性化CD20+ B細胞数の増大を示唆する。この研究は、15B8が、カニクイザルにおいてインビボでのアゴニスト抗CD40抗体であることを示唆する。インビトロおよびインビボで得られた結果は、カニクイザルにおいて一致する。

20

【0129】

この結果は、15B8がカニクイザル、アカゲザルおよびヒヒにおいてアゴニスト抗CD40抗体であり、そして、ヒト、チンパンジーおよびマーモセットにおいてアンタゴニスト抗体であることを示唆する。

【0130】

15B8は、ヒトIgG2サブタイプを有する抗ヒトCD40特異的モノクローナル抗体であり、非ヒト靈長類由来のCD40のみと交差反応性を有する。広範囲のインビトロ試験を通して、15B8は、ヒトB細胞、ヒト、チンパンジーおよびマーモセット由来のPBM C上に発現されるCD40に対してアンタゴニスト抗CD40であることが示された。しかし、15B8は、インビトロにおいて、サル（カニクイザル、アカゲザル、およびヒヒ）由来のPBM C上に発現されるCD40に結合する場合、アゴニスト活性を有することが示された。15B8のこのアゴニスト活性を、インビボにおいて、カニクイザルで確認した。Rituxan感受性およびRituxan耐性NHL患者由来のリンパ腫の初代培養物中で試験した場合、15B8は、IL-4の存在下および非存在下でアゴニスト活性を有さない。15B8はまた、両方の条件下の類似する患者群由来のリンパ腫細胞の、CD40Lで刺激した増殖を阻害し得る。15B8は、B細胞悪性腫瘍（例えば、非ホジキンリンパ腫（NHL））を変更する能力を有し、ここで、CD40/CD40L経路は、その疾患の病因に対して一定の役割を果たし得る。これらの結果を、以下の表に要約する。

30

【0131】

（表15）

（アゴニスト活性を測定するアッセイ）

40

【0132】

【表15】

アッセイ	方法論	試験した種(+または-のアゴニスト活性)
B細胞増殖に対する15B8の効果	CD40Lまたはアゴニスト抗体626.1の存在下での取り込みと、15B8の存在下での末梢血由来の精製B細胞の ³ H-チミジン取り込みを比較。	・ヒト(-)
PBMC増殖に対する15B8の効果	CD40Lまたはアソタイプコントロールの存在下での取り込みと、15B8の存在下でのPBMCの ³ H-チミジン取り込みを比較。	・ヒト(-) ・チンパンジー(-) ・カニクイザル(+) ・アカゲザル(+) ・ヒビ(+) ・マーモセット(-)
B細胞活性化マーカーのアップレギュレーションに対する15B8の効果	FACS分析を用いた、15B8またはそのアイソタイプコントロールによって刺激されたPBMCにおけるB細胞活性化マーカー発現のアップレギュレーションを測定; アソタイプコントロールの効果と15B8の効果を比較。	10 ・ヒト(-) ・チンパンジー(-) ・カニクイザル(+) ・アカゲザル(+) ・ヒビ(+) ・マーモセット(-)
プラスチック表面上に固定された二次抗体に架橋された15B8の、PBMC増殖に対する効果	CD40L 15B8単独またはアソタイプコントロールの存在下での取り込みと、第2Abで架橋した15B8の存在下での ³ H-チミジン取り込みを比較。	・ヒト(-) ・チンパンジー(-)
FasLおよびアポトーシスのアップレギュレーションに対する15B8の効果	CD40L、15B8およびアイソタイプコントロールの刺激による、抗FasLおよびアネキシンV(アポトーシスについてのマーカー)のポジティブ染色を用いた、B細胞のFACS検出による、FasL発現およびアポトーシスのアップレギュレーションを測定。	20 ・ヒト(-) ・チンパンジー(-) ・カニクイザル(-/+)

(表16)

(アンタゴニスト活性を測定するアッセイ)

【0133】

【表16】

アッセイ	方法論	試験した種(+または-のアンタゴニスト活性)
CD40Lにより媒介されるB細胞増殖の15B8による阻害	CD40Lを発現するCHO細胞によるB細胞増殖の刺激を、 ³ H-チミジン取り込みによって測定した。アイソタイプコントロールの存在下における ³ H-チミジン取り込みと15B8の存在下における ³ H-チミジン取り込みを比較。	30 ・ヒト(+) ・マーモセット(+) ・チンパンジー(+)
Tヘルパー細胞により媒介されるB細胞抗体産生の15B8による阻害	B細胞を、15B8の存在下で抗CD3抗体を用いて活性化した、精製した照射T細胞と共に培養した。B細胞IgM産生のレベルを、ELISAによって評価した。	・ヒト(+)

本発明は、特定の実施形態を参照して記載された。しかし、本出願は、添付の特許請求の範囲の精神および範囲から逸脱することなく当業者によってなされ得る変更および置換を含むことが、意図される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、CD40L発現細胞により刺激されたB細胞の増殖に対する抗CD40抗体の効果を示す棒グラフである。

40

【図2】 図2は、B細胞増殖に対する抗CD40抗体の効果を示す棒グラフである。

【図3】 図3は、抗IgMにより誘導されたB細胞の増殖に対するCD40抗体の効果を示す棒グラフである。

【図4】 図4は、ヒト末梢B細胞の増殖に対する架橋された抗CD40抗体の効果を示す棒グラフである。

【図5】 図5は、5つのヒト抗CD40抗体および5H7の軽鎖のアミノ酸配列の比較である。配列番号は、以下の通りである。

5H7：配列番号19、25

9F7：配列番号20、26

15B8：配列番号21、27

50

1 2 D 9 : 配列番号 2 2 、 2 8

2 0 C 4 : 配列番号 2 3 、 2 9

1 3 E 4 : 配列番号 2 4 、 3 0

【図 6】 図 6 は、 5 つのヒト抗 C D 4 0 抗体および 5 H 7 の重鎖のアミノ酸配列の比較である。配列番号は、以下の通りである。

5 H 7 : 配列番号 3 1 、 3 7

9 F 7 : 配列番号 3 2 、 3 8

1 5 B 8 : 配列番号 3 3 、 3 9

1 2 D 9 : 配列番号 3 4 、 4 0

2 0 C 4 : 配列番号 3 5 、 4 1

1 3 E 4 : 配列番号 3 6 、 4 2

10

【図 7】 図 7 は、 C D 4 0 を発現する細胞に結合するモノクローナル抗体 1 5 B 8 の F A C S 分析の結果を示す。図 7 は、この抗体が、 3 種（ヒト、アカゲザル、およびカニクイザル）由来の末梢血細胞を染色することを示した。

【図 8】 図 8 は、ヒトモノクローナル抗体 1 2 D 9 の v K 領域の D N A およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号 4 3 および 4 4 ）を提供する。

【図 9】 図 9 は、ヒトモノクローナル抗体 1 2 D 9 の重鎖定常領域の D N A およびアミノ酸配列（それぞれ、配列番号 1 および 2 ）を提供する。

【図 10】 図 10 は、ヒトモノクローナル抗体 2 0 C 4 の v K . 1 および v h 1 領域の D N A 配列（それぞれ、配列番号 3 および 4 ）を提供する。

20

【図 11】 図 11 は、ヒトモノクローナル抗体 9 F 7 の v K . 1 および v h 1 領域の D N A 配列（それぞれ、配列番号 5 および 6 ）を提供する。

【図 12】 図 12 は、ヒトモノクローナル抗体 1 5 B 8 の v K . 3 および v h 1 領域の D N A 配列（それぞれ、配列番号 7 および 8 ）を提供する。

【図 13】 図 13 は、ヒトモノクローナル抗体 1 3 E 4 および 1 2 D 9 の v h 1 領域の D N A 配列（それぞれ、配列番号 9 および 1 0 ）を提供する。

【図 14】 図 14 は、以下に示されるヒトモノクローナル抗体の以下の領域のアミノ酸配列を提供する。

9 F 7 V H 1 : 配列番号 1 1

30

1 2 D 9 V H 1 : 配列番号 1 2

1 5 B 8 V H 1 : 配列番号 1 3

2 0 C 4 V H 1 : 配列番号 1 4

9 F 7 V K 1 : 配列番号 1 5

1 2 D 9 V K 1 : 配列番号 1 6

1 5 B V K 1 : 配列番号 1 7

2 0 C 4 V K 1 : 配列番号 1 8

【図 15】 図 15 は、ある患者からの細胞を用いて、抗 C D 4 0 抗体 M S 8 1 が、 I L - 4 の存在下および非存在下で N H L 細胞の増殖を刺激したことを示す。

【図 16】 図 16 は、第 2 の患者からの細胞を用いて、抗 C D 4 0 抗体 M S 8 1 が、 I L - 4 の存在下および非存在下で N H L 細胞の増殖を刺激したことを示す。

40

【図 17】 図 17 は、抗 C D 4 0 抗体 1 5 B 8 が、ある患者において、 N H L 細胞の増殖を阻害することを示す。

【図 18】 図 18 は、リツキサン（ R i t u x a n ）感受性の患者由来の N H L 細胞の増殖における、 1 5 B 8 に対する用量応答を示す。これらの細胞を、 C D 4 0 L および I L - 4 により刺激した。

【図 19】 図 19 は、 3 人の個体由来の細胞を用いて、 C D 4 0 L により刺激されたヒト B 細胞の増殖に対する 1 5 B 8 の効果についての代表的な用量応答曲線を示す。

【配列表】

20	25	30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
100	105	110	
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp			
115	120	125	
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp			
130	135	140	
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly			10
145	150	155	160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn			
165	170	175	
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp			
180	185	190	
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro			
195	200	205	
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu			
210	215	220	
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn			
225	230	235	240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile			
245	250	255	
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr			20
260	265	270	
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys			
275	280	285	
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys			
290	295	300	
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu			
305	310	315	320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
325			

<210> 3
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3		30
gaaattgttt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccaggggaa aggagccacc		60
ctcicctgca gggccagtcg gagtgttagc tacagctact tagcctggta ccagcagaaaa		120
cctggccagg ctcccaggtc cctcatctat ggtgcattcca gcagggccac tggcatccca		180
gacaggttca gtggcagttgg gtctggaaaca gacttcactc tcaccatcg cagactggag		240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcat cagtatggta actcatttcg gacgttcggc		300
caagggacca aggtggaaat caaa		324

<210> 4

<211> 348
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 caggtgctgc aggagtctgg gggagggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc
 tggcagccct ctggattcac cttcagtagc tatggcatgg actgggtccg ccaggctcca
 gcaaggggc tggagtggtt ggcagtttta tcataatgcg gaagtaataa atactatgca
 gactcagtga agggccatt caccatctcc agagacaattt ccaagaacac gctgtatctg
 caaatgaaca gcctgagacc tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgcg agatacagtg
 aggggcttgc actactgggg ccagggaaatc ctggtcaccc tctccctca 60
 120
 180
 240
 300
 348

<210> 5
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

<400> 5
 gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc
 atctcttgca gatctagtc gaccatgtt catatgtt gacacaccta ttttagatgg
 tacctcgaga aaccaggcca gtctccaaag ctctctgtat ccaaagtttca acccgattt
 tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatitcac actcaagatc
 agcagagtgg agcctgagga tctggaaatttatttgc ttcaaggttc acatgttcca
 ttcactttcg gccctgggac caaagtgtat atcaaa 60
 120
 180
 240
 300
 336

<210> 6
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 6
 caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc gtggccagc ctgggaggc cctgagactc
 tcctgtcgag cctctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccggccaggct
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaaagtat taaataactat
 gctgactccg tgaaggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
 ctgcaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt actactgtgc gagagatcat
 gggagtaacc cccttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 60
 120
 180
 240
 300
 354

<210> 7
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gatattgtga tgacccagtc tccactctct ctgtccgtcg cccctggaca gccggccctcc
 atctcctgtt agtctagtc gaggccctcg gagagttatg gagagaccta tttgtattgg
 tacctcgaga agccaggcca gcctccacag ctctgtatc atgcagttt taagcggttc
 tctggagtgcc cagataggtt cagtggcagc ggttcaggga cagatitcac actgaaaatc
 agccgggtgg aggctgagga tgggggtt tattactgca tgcaaagtat gcagcttcct
 ctcaacttgc gggaggagc caaggtggag atcaaa 60
 120
 180
 240
 300
 336

<210> 8
 <211> 366
 <212> DNA

30

<213> Homo sapiens

<400> 8

cagggtcagc	tgcaggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtcag	cctctggatt	caccttcaat	aacttggca	tacactgggt	ccgcccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatcatatg	atggaagtga	taaatattat	180
gcagactccg	tgaagggcgc	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgaat	240
ctgcaaatga	atagtctgag	agctgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagatcg	300
cggttattact	accactacta	cggtatggac	gtctgggccc	aagggaccat	ggtcaccg	360
tcctca						366

<210> 9

<211> 527

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 9

tggacatata	tatgggtgac	aatgacatcc	actttgcctt	tctctccaca	ggcgccgact	60
cccaagggtc	gtgtcagcag	tctggggctg	aggtgaagaa	gectggggcc	tcagtgaagg	120
tctcctgc	ggcttctgga	tacacccca	ccgactacta	tatgcactgg	gtgcgacagg	180
cccttggca	aggacttgg	tggatggat	ggatcaaccc	taacagtgg	ggcacaaact	240
atgcacagaa	gtttcagggc	agggtcacca	tgaccaggga	cacgtccatc	agtatagcct	300
acatggagct	ggacaggctg	agatctgacg	acacggccgt	gtattactgt	gcgagagatg	360
agatccatgc	agcagatggt	atctactatt	tctacggct	ggacgtctgg	ggccaaggga	420
ccacggtcac	cgtctccctca	ggtgagtc	gtgcacggat	ccacccaatg	cccatgagcc	480
cagacactgg	acgctgaacc	tcgcggacag	ttaagaaccc	aggggccc		527

<210> 10

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 10

cagggtcagc	tgcaggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tcctgtcag	cctctggatt	caccttcaat	agctatggca	tggactgggt	ccgcccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagtt	atatcatatg	atggaagtaa	taatgtactat	180
gcagactca	tgaagggcgc	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacactgtat	240
ctgcaatga	acagactgag	agctgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gcgagataca	300
gtgaggggct	ttgactactg	gggcccaggga	atccctggtca	ccgttctcc	a	351

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	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	Ser	Tyr	
									20	25		30			
Gly	Met	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	Ile	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
									50	55		60			

30

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 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 His Gly Ser Asn Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12 10
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser 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 Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Leu Ser Tyr Asp Gly Ser Asn 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 Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Thr Val Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13 20
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser 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 His Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

30

<210> 14
<211> 117
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 14
 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 Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Leu Ser Tyr Ala Gly Ser Asn 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 Tyr
 65 70 75 80 100
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Thr Val Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly His Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Ser Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Tyr Ile Lys
 100 105 110

<210> 16
<211> 105
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

```

<400> 16
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
    1           5           10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Ser

```

20	25	30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu		
35	40	45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65	70	75
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe		
85	90	95
Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Gln		
100	105	

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 17			
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	

20

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Gly Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Ser			
20	25	30	
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35	40	45	
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu			
65	70	75	80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Asn Ser Phe			
85	90	95	
Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100	105		

30

【 図 1 】

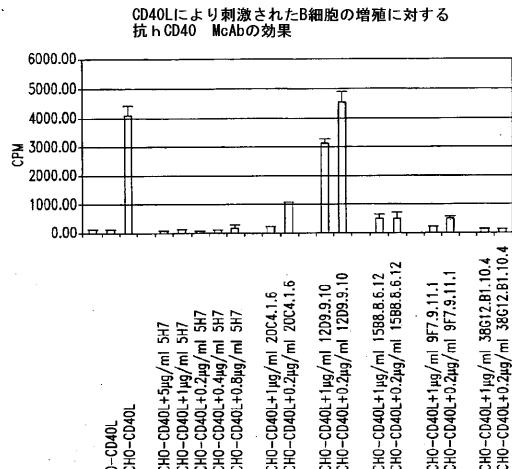


Fig. 1

【 四 2 】

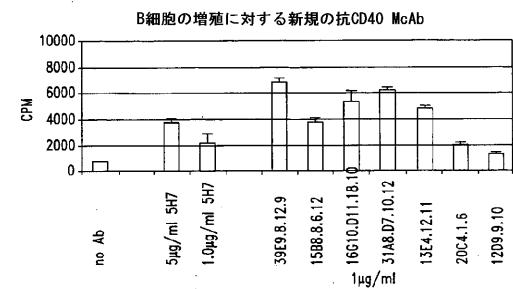


Fig. 2

〔 図 3 〕

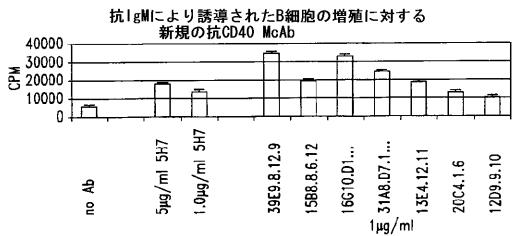


Fig. 3

〔 4 〕

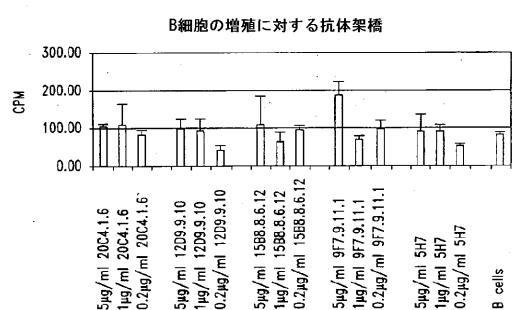


Fig. 4

(5)

配列2. 5H7と比較した、選択されたハイブリドーマの
軽鎖の推定アミノ酸配列

Frm1	CDR1	Frm2	CDR2
547 DIVITOAPLSPLVSLGDOASCSRSSLUNSLNSNIGHTLYHLYKPGKSPGKLLVYKWSRFS			
977 -VLM-T-----	TI-H--H-E-----		-S-----
1588 --M-S---S-AP-QP--K-----	LE-V-Q--Y-----	P-Q-----	AVFK-
1209 E-L-S-GT-SL-P-RL-TL---A-	VTSYSLA-----	Q-----	GA-S-AT
2024 E-L-S-GT-SL-P-GL-TL---A-	VTSYSLA-----	Q-----	RA-G-S-AT
1364 --CL-S-S-SA-V--RVT-T-A-G	IRN DLG-----	Q-----	AA-SLO-

Frm3	CDR3	Frm4
547	GIVDFRFGSGSGTDFTLK1SRV	CDR3
977	EAEDLGWYFCSQSHVPMWFGGTXELK	
1588	-P-----Y-F-G-	
1209	-V-----Y-M-MQL-	-V-YI-
204	-T----L-P-F-A-Y-Q-YGSSRF-	Q-O-Q-I-
1364	-I-----T-L-P-F-A-Y-HQNSRF-	Q-V-Y-I-
	-S-----R-E-T-SLQP-PAT-Y-L-HNSRCS-	

Fig. 5

【図6】

重鎖	CDR1	CDR2
5H7 QYQLESQPLVAPSQSLSTTCVSGFSL5	RYSYV	WYDOPGKGLEM.G
9F7 G-V-D-GR-RLS-AA--TF-	S-GH	---A-----VA
1209 G-V-D-GR-RLS-AA--TF-	S-GH	---A-----VA
13E4 Q-AEVKK-CA-YKVS-KA-YIFT	D-YH	---A-Q---M-
1588 G-V-D-GR-RLS-AA--TFN	NFGIH	---A-----VA
2024 G-V-D-GR-RLS-AA--TF	S-GH	---A-----VA

Frn3	CDR3	Frn4
5H7 RLSISKTSKSVFLKMSLQTDATAMYCYR	TGQ	WLGITSVIVSS
9F7 -FT-R-N-NTLY-Q---RAE---V--A-	DH-SNPL	--L-----
1209 -FT-R-N-NTLY-Q---RAE---V--A-	DTYRGF	--IL-----
13E4 -VTHTR-I-TAYMELDR-RS---V--A-	DEILAAQGIIYFYGL-V	--T-----
1588 -FT-R-N-NTLY-Q---RAE---V--A-	DRRYYHHTYGM-V	--M-----
2024 -FT-R-N-NTLY-Q---RPE---V--A-	DTYRGF	--IL-----

軽鎖	CDR1	CDR2
5H7 D1V10AQLSLVSLQGQASITC	RSSCSLYNSHNTYH	KVSNRF5
9F7 -VLM-T-----	---T-H---H---E	-----S
1209 E-L-S-GT-SL-P-ER-TL-	-A---VSYSLA	--Q---A-R---GA-S-AT
13E4 -QL-S-S-SA-V-RVT-T-	-A-G IRN DLG	--Q---A-RR---AA-SLQ-
1588 -M-S-S-S-AP-DF-----	K---LE-Y---Y	--P-Q---AVFX-----
2024 E-L-S-GT-SL-P-EG-TL-	-A---VSYSLA	--Q---A-R---GA-S-AT

Frn3	CDR3	Frn4
5H7 GVPORFSGSSGGTDFLKISRVEAOLGVYFC	S03HYPWT	FGGGTYLEK
9F7 -P-----I-Y-	F-GS---F-	--P-VYI-
1209 -I-----T-L-P-F-A-Y-	Q-YGSSFR-	--Q---Q-I-
13E4 -S-----R-E-T-SLQF-FAT-Y-	L-HNSS-CS	--Q---I-
1588 -----V-Y-	M-NOL-L-	--V-I-
2024 -I-----T-L-P-F-A-Y-	H-YGNSFR-	--Q---V-I-

Fig. 6

【図8】

1209v
+2 E I V L T Q S P G T L S 1
GAATTC TCTGAGCA GCTCCAGG ACCCTGCTT
GCTTTAAC AACAGTGGT CTAAGCTCG TGGGACAA
+2 L L S P G E R A T L S C R A S Q S V
51 TGTTCGAGG GAAAAGCC ACCCTCTT CGAGGCGAG TCAGATGTT
ACAGAGTCC CCTTTCTGG TGGGAGAGA CTCGGCGTC AGTCTACAA
+2 E S Y S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R
101 AGCTAACCT ACTTACGCTG GTTACACAG AAGCTGCCC AGCTCCCG
TGTGTTGCGA TGAATGCGC CAGTGTGTC TTTGGACGG TCCGAGGTC
+2 L L I Y G A S S R A T G I P D R
151 ATCTTCATC TATGGTGCT CGACAGGG CACTGCTATC CGACAGCT
TGAGCTAGT ATACACAGTA GGTCGCTCC GTGACGCTAG GTTGTCTG
+2 F S G S G S G S T D F T L T I S R L
201 TCACTGGC5 TGGTGCTGGA ACAGACTCA CTTCACATC CGACAGCTG
AGTCACGTC ACCAGACGT TGTCTGAGT GAGAGTGTA GTGTCGTC
+2 E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S F
251 GAGCTGTGG ATTTCGAGT GTTACTGT CGACAGATG GTGACTTATT
CTGGACTCTC TAAAGCTCA CATAATGCA GTCTGCTATC CATCGAGTA
+2 R T F G Q G T K Q E J K
301 TGGAGCTTC GCGACGAGGA CGACGAGGA GATCAA
ACCTGCAAG CGGGTTCCTT GTTGTGCTCT CTAGTT

Fig. 8

【図7】

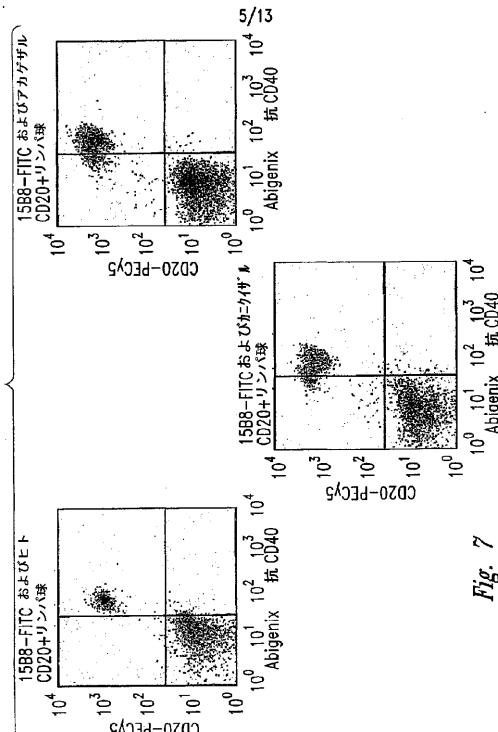


Fig. 7

【図9】

1209v
60
GCTCCACCA AGGGCCATC GGTCTCCG CTGGGCGCT BCTCAGGAG CACCTCGAG
AGCACCGG CCTGGCGTC CTGGTCAGG GACTCTCC CGAACCGGT GAGGTTGTCG 120
TGGAACTCG GGTCTTCAG CABGGCGTG CACACTTCG CACGTCGCT ACAGCTCTCA
GAACCTCTACT CGCTCAGACG CTGGTGACG GTGCGCTCA GCACTCTCG CACCCAGAC 180
TACACCTGCA ACCTGATAGCA CGACGCCAG ACACCAAGA TGACAGACG AGTGTGCGC 240
300
360
420
480
540
600
660
720
780
840
900
960
978
AAATGTTG TGAGTCGCC AGCTTCGCA GCAACCTCG TGCAAGACG GTCACTGTC
CTTCTCCCG CGAACCCCA GCAACCCCT ATGATCTCG CGACCCCTGA GTCACTGTC
GTGGTGTTGG AGTGAGCGCA CGAACCCCG GAGGTCAGT TCACTCTGA CTGGGAGGCG
GTGAGGTCG ATATGCTCA GACAGACCA CGGGAGGAG AGTCACTACG CAGCTTGCT
GTGCTGAGG TGCTCAGCG GTGCGCTGA CGACGCCAG GTACAGCTCA GTCACAGTC
AGGTTGCTCA ACAGACGCT CGACGCCAG ATGAGAAAGA ATGCTCTCA AACGAGGG
CGACGCCAG AACAGACG GTACACCTCG CGAACCCAG GAGGAGGAT GACCAAGAC
CGCTGACCC TGTCTGCTG GTGCAAGACG TCTACCCCA GCAACCTCG CTGGGAGTGS
GAGGAGCTG CGAACCCCG GACAGACCA CGAACCCAG TCTCCATCT GTGCTGAC
GCTCTCTCT GTGCGCTGA GTGAGGAGT GTGACACCC ACTACACGA CGAGAGCTC
TCCCTGCTC CGGTAA

ASTKGPSVFP LAPCRSTSE STAALGCLVK DYPPEPVIVS WNSGALTSGV HTPVANLQSS
GLYLSLSVNT VPSMFTGDT YTCVNDKPS NTKIVDVKEN KKVCEPCP APPVAGPSV
LPPPKDRLT MISRIPVTC VVWVNSHDP EVQVNMVYD VEVHAKTPK REEDNFNTR
VVSLLTVRQ QHNGKEYKC KVSKMGLPAP TKTCTSKG QPPEPWYTL PSREEMTK
QVSLTCVKG FYPSSDAVEN ESNQEPNEY KTTPPMLSD GSFFLYSKL VDKSRMNGH
VFCSCVMMHEA LHHYTKOSSL SLSPK 326

Fig. 9

【図10】

20C4Vh1
GAAATTGTT TGACCGACCC TCCAGGACCT CTGCTTTGTG CTCCAGGGAA AGGACGACCC
CTCTCTGCA GGCGCACTCA GAGGTGTACG TACAGCTACT TAGCCCTGAA CAGACGAA
CTGTGCGAGG CTCCAGGCT CCTCATATGTT GGTGAACTCA GCAGGGCGAC TGCATCTCA
GACAGGTTG GTGGCACTG GTCGAGCA GACTCACTCA TACCCATGAG CAGACTGAG
CTGAAATT TTGAGGTTA TTACTGTAT CAGTATGTA ACTCTATTG GACGTGTCG
CAAGGACCA AGGTGAAAT CAA

60
120
180
240
300
324

Fig. 10

【図11】

9F7Vh1
GATGTTGTTA TGACCCAAAC TCACTCTTC CTGCTGTCG GTCCTGGAGA TCAAGCTCC
ATCTCTGAA GACTCTAGCA GACCATTTG CATACTATG GACACACCA TTTAGATGG
TACCTGGATC AACCGGCGCA GTCCTCAAG CTCTGATCT CCAAGTTCG CAAAGGTT
TCTGGGTT CAGACAGTT CAGTGGAGT GGTCAAGGA CAGATTACG ACTCAAGATC
ACGAGATG ACCTCTGAGA TCTGGAATT TATTATGCT TCAAGGTT ACATTTCCA
TTCACTTGC GCCTGGAC GAGGAGGCT CGTGTACCC TCTCTCTCA

60
120
180
240
300
336

Fig. 11

【図12】

15B8Vh3
GATATTGTA TGACCGACCC TCACTCTTC CTGCTGTCG GCGCTGAGA GCGCGGCTCC
ATCTCTGCA ATGCTAGCA GAGCTCTGAG GAGGTTAGT GAGAGCTA TTGTTATGTTG
TACCTGAGA AGGAGGCGCA GTCCTCAAG CTCTGATCT CCAAGTTCG CAAAGGTT
TCTGGAGTC CAGATGGTTT CAGTGGAGT GGTCAAGGA CAGATTACG ACTCAAGATC
ACGAGATG ACCTCTGAGA TCTGGAATT TATTATGCT TCAAGGTT ACATTTCCA
CTGAAATT TTGAGGTTA TTACTGTAT CAGTATGTA ACTCTATTG GACGTGTCG
CAAGGACCA AGGTGAAAT CAA

60
120
180
240
300
336

Fig. 12

【図13】

13E4Vh1
CAGGTGAGC TICGACGATC TGGGGCTGAG GTGAGAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGTGC
TCTCTGAGG CTCTGATG CACCTTACG GACTACTATA TCACTCTGTT GCGACAGCC
CTGGACAG GACTCTGAGT GATGGATGG ATCAACCTCA ACATCTGTT CACAACTAT
GCGACAGATG TCAAGGGCGC AGTCACTATG ACCAGGAGA CTCCTCATG TATAGCTTC
ATGAGCTGG ACASSTGAG ATCTGAGCAC AGGCTCTGTT ATTACTCTG GAGAGATGAG
ATCTCTGGAG CAGATGGATG CTACTATTC TACGTCTGG AGCTCTGGGG CCAAGGAGAC
ACGGTCAAG TCTCTCTCA

60
120
180
240
300
360
378

Fig. 13

【図14】

9F7Vh1
QVQESGGGWVOPGRSLRLSCAASGFTSSYGMWVROAPGKLEWAVISYDSIKYADSYVKGRFTISRDNKNTLY
LQNSLRAEDTAYYYCARDTVRFQDYGQGILTVSS

12D9Vh1
QVQESGGGWVOPGRSLRLSCAASGFTSSYGMWVROAPGKLEWAVISYDSIKYADSYVKGRFTISRDNKNTLY
LQNSLRAEDTAYYYCARDTVRFQDYGQGILTVSS

15B8Vh1
QVQESGGGWVOPGRSLRLSCAASGFTSSYGMWVROAPGKLEWAVISYDSIKYADSYVKGRFTISRDNKNTLY
LQNSLRAEDTAYYYCARDTVRFQDYGQGILTVSS

20C4Vh1
QVQESGGGWVOPGRSLRLSCAASGFTSSYGMWVROAPGKLEWAVISYDSIKYADSYVKGRFTISRDNKNTLY
LQNSLRAEDTAYYYCARDTVRFQDYGQGILTVSS

9F7Vh1
DVLMTQTPLSLSPGEGATLSCRSASVSYSLWYQKPGQPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRL
SRVEDAVGYYCQYQGSSFRITFQGPKVYIK

12D9Vh1
EIVLTO5PTLSLSPGEGATLSCRSASVSYSLWYQKPGQPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRL
SRVEDAVGYYCQYQGSSFRITFQGPKVYIK

15B8Vh2
D1WMTOSPLSLSPGEGATLSCRSASVSYSLWYQKPGQPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRL
SRVEDAVGYYCQYQGSSFRITFQGPKVYIK

20C4Vh1
EIVLTO5PTLSLSPGEGATLSCRSASVSYSLWYQKPGQPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRL
SRVEDAVGYYCQYQGSSFRITFQGPKVYIK

Fig. 14

【図15】

リンパ腫細胞に対する
抗CD40抗体の効果 (IL-4なし)

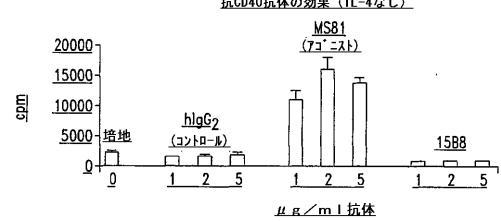


Fig. 15

【図16】

リンパ腫細胞の増殖に対する
抗CD40抗体の効果 (+IL-4)

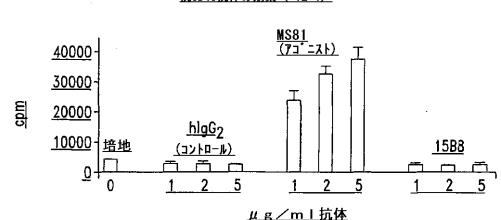


Fig. 16

【図17】

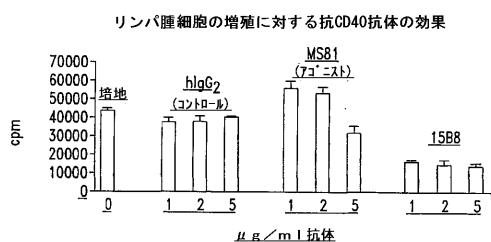


Fig. 17

【図18】

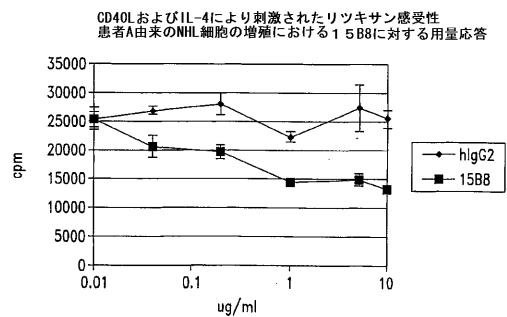


Fig. 18

【図19】

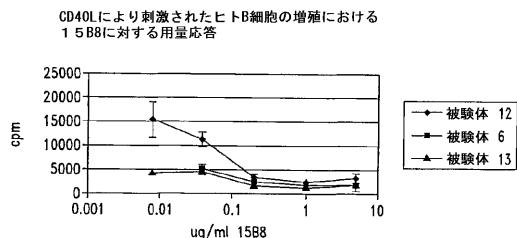


Fig. 19

フロントページの続き

(72)発明者 チュ, ケティン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリンゲイム, イーストン ドライブ 2
017

(72)発明者 ワン, チャンギュ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94530, エル セリート, カールソン ブールバード
3101 ナンバー4

(72)発明者 ヨシハラ, コーリン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エメリービル, ホートン ストリート 45
60

(72)発明者 ドネリー, ジョン ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94608, エメリービル, ホートン ストリート 45
60

審査官 清水 晋治

(56)参考文献 国際公開第96/034096 (WO, A1)

欧州特許第00945465 (EP, B1)

特表2002-532304 (JP, A)

特許第4202127 (JP, B2)

特開2008-074870 (JP, A)

特開2009-019046 (JP, A)

FRANCISCO, J.A. et al., Agonistic Properties and in Vivo Antitumor Activity of the Anti-CD40 Antibody SGN-14, Cancer Research, 米国, 2000年 6月15日, Vol.60, No.12, p.3225-3231

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-15/90

C07K 14/00-19/00

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed