

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-521504
(P2020-521504A)

(43) 公表日 令和2年7月27日(2020.7.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 7 6
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-566666 (P2019-566666)
 (86) (22) 出願日 平成30年5月31日 (2018. 5. 31)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年1月29日 (2020. 1. 29)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2018/089252
 (87) 国際公開番号 WO2018/219327
 (87) 国際公開日 平成30年12月6日 (2018. 12. 6)
 (31) 優先権主張番号 201710402559.0
 (32) 優先日 平成29年6月1日 (2017. 6. 1)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国 (CN)

(71) 出願人 519352757
 江▲蘇▼恒瑞医▲薬▼股▲フン▼有限公司
 J I A N G S U H E N G R U I M E D
 I C I N E C O . , L T D .
 中国222047江▲蘇▼省▲リァン▼云
 ▲港▼市▲経▼▲済▼技▲術▼▲開▼▲発▼
 ▼区昆▲ルン▼山路7号
 N O . 7 K U N L U N S H A N R O A
 D , E C O N O M I C A N D T E C
 H N O L O G I C A L D E V E L O P M
 E N T Z O N E , L I A N Y U N G A
 N G , J I A N G S U 2 2 2 0 4 7 ,
 C H I N A

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CD40抗体、その抗原結合フラグメント、およびその医学的使用

(57) 【要約】

抗CD40抗体、その抗原結合フラグメント、およびその医学的使用が提供される。また、抗CD40抗体のCDR領域を含むキメラ抗体およびヒト化抗体、ヒト抗CD40抗体およびその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物、ならびに抗癌剤としてのその適用も提供される。特に、ヒト化抗CD40抗体、およびCD40媒介疾患または障害を治療するための薬物の調製におけるその適用が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 50、配列番号 51、配列番号 52、配列番号 58、配列番号 59 または配列番号 60 からなる群から選択される少なくとも 1 つの L C D R を含む抗体軽鎖可変領域、および / または、

配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 55 または配列番号 56 または配列番号 57 からなる群から選択される少なくとも 1 つの H C D R を含む抗体重鎖可変領域、を含む抗 C D 40 抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 2】

L C D R は、L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 のうちの 1 つ以上を含み、

L C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表において配列番号 6、配列番号 14、配列番号 42、配列番号 50 または配列番号 58 で示され、

L C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表において配列番号 7、配列番号 15、配列番号 43、配列番号 51 または配列番号 59 であり、

L C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表において配列番号 8、配列番号 16、配列番号 44、配列番号 52 または配列番号 60 で示され、および / または

H C D R は、H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 のうちの 1 つ以上を含み、

H C D R 1 のアミノ酸配列は、配列表において配列番号 3、配列番号 11、配列番号 39、配列番号 47 または配列番号 55 で示され、

H C D R 2 のアミノ酸配列は、配列表において配列番号 4、配列番号 12、配列番号 40、配列番号 48 または配列番号 56 で示され、

H C D R 3 のアミノ酸配列は、配列表において配列番号 5、配列番号 13、配列番号 41、配列番号 49 または配列番号 57 で示される請求項 1 に記載の抗 C D 40 抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 3】

前記抗体軽鎖可変領域は、

配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 の配列をそれぞれ有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3、または、

配列番号 14、配列番号 15 および配列番号 16 の配列をそれぞれ有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3、または、

配列番号 42、配列番号 43 および配列番号 44 の配列をそれぞれ有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3、または、

配列番号 50、配列番号 51 および配列番号 52 の配列をそれぞれ有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3、または、

配列番号 58、配列番号 59 および配列番号 60 の配列をそれぞれ有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3、を含み、および / または、

前記抗体重鎖可変領域は、

配列番号 3、配列番号 4 および配列番号 5 の配列をそれぞれ有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、または、

配列番号 11、配列番号 12 および配列番号 13 の配列をそれぞれ有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、または、

配列番号 39、配列番号 40 および配列番号 41 の配列をそれぞれ有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、または、

配列番号 47、配列番号 48 および配列番号 49 の配列をそれぞれ有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、または、

配列番号 55、配列番号 56 および配列番号 57 の配列をそれぞれ有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、を含む請求項 2 に記載の抗 C D 40 抗体またはその抗原結

30

40

50

合フラグメント。

【請求項 4】

前記抗体軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、前記抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 3、配列番号 4 および配列番号 5 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含み、または、

前記抗体軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、前記抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 1 3 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含み、または、

前記抗体軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 4 2、配列番号 4 3 および配列番号 4 4 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、前記抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 3 9、配列番号 4 0 および配列番号 4 1 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含み、または、

前記抗体軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 5 0、配列番号 5 1 および配列番号 5 2 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、前記抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 4 7、配列番号 4 8 および配列番号 4 9 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含み、または、

前記抗体軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 5 8、配列番号 5 9 および配列番号 6 0 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、前記抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 5 5、配列番号 5 6 および配列番号 5 7 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含む請求項 3 に記載の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

マウス抗体またはキメラ抗体である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

前記マウス抗体または前記キメラ抗体の、

重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 1 で示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 2 で示され、または、

重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 9 で示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 1 0 で示され、または、

重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 3 7 で示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 3 8 で示され、または、

重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 4 5 で示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 4 6 で示され、または、

重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 5 3 で示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 5 4 で示される請求項 5 に記載の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

ヒト化抗体またはヒト抗体である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

前記ヒト化抗体の軽鎖可変領域上の軽鎖 F R 領域の配列は、配列番号 2 2 に示されるヒト生殖系列の軽鎖 I G k V 1 - 3 3 配列または配列番号 2 4 に示されるヒト生殖系列の軽鎖 I G k V 2 - 2 8 配列に由来する請求項 7 に記載の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

前記ヒト化抗体の抗体軽鎖配列は、配列番号 1 8 または配列番号 2 0 またはその変異体の配列を有し、好ましくは、変異体が軽鎖中にアミノ酸の 0 ~ 1 0 個の変異を有し、より

10

20

30

40

50

好ましくは、変異が2位および3位で生じ、かつ変異したアミノ酸の両方は、好ましくはI、VまたはLである請求項7に記載の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項10】

前記ヒト化抗体の重鎖可変領域はさらに、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4の重鎖FR領域、またはそれらの変異体を含み、好ましくは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4の重鎖FR領域を含み、より好ましくは、ヒトIgG1またはIgG2の重鎖FR領域を含む請求項7～9のいずれか一項に記載の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項11】

前記ヒト化抗体の前記重鎖可変領域上の重鎖FR領域の配列は、配列番号21に示されるヒト生殖系列の重鎖IGHV1-69配列または配列番号23に示されるヒト生殖系列の重鎖IGHV1-2配列に由来する請求項10に記載の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項12】

前記ヒト化抗体の重鎖配列は、配列番号17または配列番号19またはその変異体の配列を有し、好ましくは、変異体が軽鎖中にアミノ酸の0～10個の変異体を有し、より好ましくは、変異体が6位および8位で生じ、かつ変異したアミノ酸の両方は、好ましくはI、AまたはLである請求項7～11のいずれか一項に記載の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項13】

前記ヒト化抗体は、ヒト化抗体hu9E5またはhu2H6であり、前記ヒト化抗体の可変領域配列は、

前記ヒト化抗体hu2H6については、重鎖可変領域の配列が配列番号26で示され、軽鎖可変領域の配列が配列番号33で示され、

前記ヒト化抗体hu9E5については、重鎖可変領域の配列が配列番号30で示され、軽鎖可変領域の配列が配列番号34で示される請求項7～12のいずれか一項に記載の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項14】

前記ヒト化抗体hu9E5は、配列番号19の重鎖抗体配列および配列番号20の軽鎖抗体配列を含み、前記ヒト化抗体hu2H6は、配列番号17の重鎖抗体配列および配列番号18の軽鎖抗体配列を含む請求項13に記載の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項15】

請求項1～14のいずれか一項に記載の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域を含む多重特異性抗体。

【請求項16】

請求項1～14のいずれか一項に記載の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域を含む単鎖抗体。

【請求項17】

その抗体が、請求項1～14のいずれか一項に記載の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントの軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域を含み、好ましくは、請求項1～15のいずれか一項に記載の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを含む抗体-薬物結合体。

【請求項18】

請求項1～14のいずれか一項に記載の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント、請求項16に記載の多重特異性抗体、または請求項17に記載の単鎖抗体をコードするDNA配列。

【請求項19】

請求項18に記載のDNA配列を含む発現ベクター。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

請求項 19 に記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 21】

細菌、好ましくは大腸菌 (*Escherichia coli*) であり、または、
酵母、好ましくはピキア酵母 (*Pichia pastoris*) であり、または、
哺乳類細胞、好ましくはチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞またはヒト胚性腎臓 (HEK) 293 細胞、である請求項 20 に記載の宿主細胞。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗 CD40 抗体またはその抗原結合フラグメント、請求項 15 に記載の多重特異性抗体、請求項 16 に記載の単鎖抗体、または請求項 17 に記載の抗体 - 薬物結合体、および薬学的に許容される賦形剤、希釈剤または担体を含む医薬組成物。

10

【請求項 23】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗 CD40 抗体またはその抗原結合フラグメント、請求項 15 に記載の多重特異的抗体、請求項 16 に記載の単鎖抗体、請求項 17 に記載の抗体 - 薬物結合体、または CD40 または CD40L が媒介する疾患または状態を治療または予防するための薬剤の製造における請求項 22 に記載の医薬組成物の使用であって、

前記疾患は、癌であることが最も好ましく、前記癌は、リンパ腫、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、肝臓癌、胃癌、大腸癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、食道癌、子宮頸癌、多発性骨髄腫、白血病、胆嚢癌、膠芽腫および黒色腫である使用。

20

【請求項 24】

CD40 または CD40L 媒介疾患または状態を治療および予防するための方法であって、

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗 CD40 抗体またはその抗原結合フラグメント、請求項 15 に記載の多重特異的抗体、請求項 16 に記載の単鎖抗体、請求項 17 に記載の抗体 - 薬物結合体、または請求項 22 に記載の医薬組成物、の治療有効量を対象に投与することを含み、

ここで、前記疾患は、好ましくは癌であり、前記癌は、最も好ましくはリンパ腫、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、肝臓癌、胃癌、結腸直腸癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、食道癌、子宮頸癌、多発性骨髄腫、白血病、胆嚢癌、神経膠芽腫および黒色腫である方法。

30

【請求項 25】

自己免疫疾患を有する患者の症状を改善するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗 CD40 抗体またはその抗原結合フラグメント、請求項 15 に記載の多重特異的抗体、請求項 16 に記載の単鎖抗体、請求項 17 に記載の抗体 - 薬物結合体、または請求項 22 に記載の医薬組成物、の使用。

【請求項 26】

炎症性疾患を有する患者の症状を改善するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗 CD40 抗体またはその抗原結合フラグメント、請求項 15 に記載の多重特異的抗体、請求項 16 に記載の単鎖抗体、請求項 17 に記載の抗体 - 薬物結合体、または請求項 22 に記載の医薬組成物、の使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2017年6月1日に出願された中国特許出願第CN201710402559.0号の優先権を主張する。前述の出願の全内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、抗 CD40 抗体、その抗原結合フラグメント、抗 CD40 抗体の CDR 領域

50

を含むキメラ抗体またはヒト化抗体、ならびにヒト抗CD40抗体およびその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物、ならびに抗癌剤としてのその使用に関する。

【背景技術】

【0003】

健康の最重要課題の一つとして、癌は、長期的に人類社会が直面する重要な課題である。伝統的な手術、化学療法および放射線療法のような治療は、播種性固形腫瘍の治療においてしばしば限定された効果を有する。腫瘍免疫療法、特にT細胞腫瘍免疫療法は、腫瘍療法の分野におけるホットスポットである。腫瘍免疫療法は腫瘍を有する患者においてキラーT細胞を完全に活性化することによって腫瘍を死滅させ、これは腫瘍を処置するための最も有効かつ最も安全な方法でありうる。腫瘍免疫療法は、現在、播種性転移性腫瘍を含むいくつかの異なるタイプの癌の治療において有望な見通しを示している。

10

【0004】

ヒト身体におけるT細胞の活性化は、2つのシグナル伝達経路を含む系を使用する。抗原発現細胞(APC)を介してMHC抗原ペプチドを発現することによってT細胞に第1のシグナルを提供することに加えて、一連の共刺激分子が、第2のシグナルを提供するために必要とされ、したがって、T細胞の正常な免疫応答を可能にする。この二重シグナル伝達経路系は*in vivo*での免疫系のバランスにおいて重要な役割を果たし、これは、自己および非自己抗原に対する異なる免疫応答を活性化するために身体を厳密に調節する。共刺激分子によって提供される第2のシグナルの欠如はT細胞応答の失敗または持続性特異的免疫応答の喪失をもたらし、したがって免疫寛容をもたらす。したがって、第2

20

【0005】

CD40は、細胞表面に発現される糖タンパク質の1つである。これは、腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリーに属し、免疫系において重要な役割を果たす48kDaのI型膜固有糖タンパク質である。それは、B細胞、樹状細胞、単球およびマクロファージのような種々の免疫細胞において発現される。シグナル伝達がCD40によって媒介される場合、特殊化された抗原発現細胞が活性化される。CD40の天然リガンドは、CD154またはCD40Lと呼ばれ、成熟Tリンパ球において主に発現されることが知られている。CD40L媒介シグナル伝達は、免疫細胞の活性化および増殖、ならびにサイトカインおよびケモカインの産生を含む、多くの細胞生物学的事象を誘発しうる。CD40シグナル伝達は、特に腫瘍環境の状況において、T細胞依存性免疫応答にとって極めて重要である。CD40刺激樹状細胞は、腫瘍細胞を根絶する能力を有する腫瘍特異的エフェクターT細胞を活性化できる。

30

【0006】

CD40の発現は、種々の正常細胞およびBリンパ球を含む腫瘍細胞において見出されている。たとえば、黒色腫はCD40を発現する腫瘍であり、一方、固形腫瘍の30%~70%もCD40を発現する。CD40の活性化は、腫瘍特異的T細胞応答の免疫活性化、CD40陽性腫瘍の直接アポトーシス、および刺激によって引き起こされるADCCの体液性反応を含む、抗腫瘍応答を効果的に誘発しうるということが現在知られている(非特許文献1)。さらに、観察された腫瘍根絶は、腫瘍特異性を有する細胞傷害性Tリンパ球の発生と強く関連する。一方、CD40抗体の全身投与は一般に、ショック症候群およびサイトカイン放出症候群などの様々な副作用に関連することも無視すべきではない(非特許文献2)。

40

【0007】

現在、多くの国際的な製薬会社が、免疫活性化を特異的に刺激し、腫瘍に対する患者自身の免疫系応答を最大化し、それによって腫瘍細胞を死滅させる目的を達成する、CD40に対するモノクローナル抗体を開発している。関連特許には、特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4、特許文献5、特許文献6、特許文献7、特許文献8、特許文献9、特許文献10、特許文献11、特許文献12、特許文献13、特許文献14、特許文献15、特許文献16、特許文献17、および特許文献18などが含まれる。今日まで

50

、Pfizer（関連製品はRocheにライセンスされている。）、Alligator、および前臨床動物モデルにおいて良好な腫瘍殺傷効果を有することが見出された他の会社、の抗CD40抗体は、フェーズ1の臨床試験に入った。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】中国特許出願公開第1198647号

【特許文献2】中国特許出願公開第1369015号

【特許文献3】中国特許出願公開第1582165号

【特許文献4】中国特許出願公開第100430419号

10

【特許文献5】中国特許出願公開第101014386号

【特許文献6】中国特許出願公開第101237882号

【特許文献7】中国特許出願公開第101289510号

【特許文献8】中国特許出願公開第101490086号

【特許文献9】中国特許出願公開第103842382号

【特許文献10】中国特許出願公開第104918957号

【特許文献11】国際公開第2002/028904号

【特許文献12】国際公開第2011/123489号

【特許文献13】国際公開第2012/149356号

【特許文献14】国際公開第2013/034904号

20

【特許文献15】国際公開第2015/091853号

【特許文献16】国際公開第2016/196314号

【特許文献17】国際公開第2017/040932号

【特許文献18】国際公開第2017/004006号

【0009】

【非特許文献1】Tong et al, Cancer Gene Therapy, 2003, 10: 1-13

【非特許文献2】van Mierlo et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 5561-5566

6

【非特許文献3】J. Biol. Chem, 243, p3558 (1968)

【非特許文献4】Holliger and Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23: 1126-1136

30

【非特許文献5】Using Antibodies: A Laboratory Manual, Chapters 5-8 and 15, Cold Spring Harbor

【非特許文献6】The Immunoglobulin FactsBook, 2001 ISBN 014441351

【非特許文献7】Watson et al. (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., Page 224, (4th edition)

【非特許文献8】Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory

【非特許文献9】Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、高い親和性、高い選択性および高い生物学的活性を有する抗CD40抗体、ならびにCD40およびその経路を刺激することによって免疫応答を活性化するための治療薬/組成物およびその方法、を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、

配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号50、配列番号51、配列番号5

50

2、配列番号58、配列番号59または配列番号60からなる群から選択される少なくとも1つのLCDRを含む抗体軽鎖可変領域、および/または、

配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号55、配列番号56または配列番号57からなる群から選択される少なくとも1つのHCDRを含む抗体重鎖可変領域、を含む抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0012】

好ましい実施形態において、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体軽鎖可変領域は、配列番号6、配列番号14、配列番号42、配列番号50または配列番号58の配列を有するLCDR1を含む抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

10

【0013】

好ましい実施形態において、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体軽鎖可変領域は、配列番号7、配列番号15、配列番号43、配列番号51または配列番号59の配列を有するLCDR2を含む抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【0014】

好ましい実施形態において、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体軽鎖可変領域は、配列番号8、配列番号16、配列番号44、配列番号52または配列番号60の配列を有するLCDR3を含む抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

20

【0015】

好ましい実施形態において、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体重鎖可変領域は、配列番号3、配列番号11、配列番号39、配列番号47または配列番号55の配列を有するHCDR1を含む抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【0016】

好ましい実施形態において、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体重鎖可変領域は、配列番号4、配列番号12、配列番号40、配列番号48または配列番号56の配列を有するHCDR2を含む抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

30

【0017】

好ましい実施形態において、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体重鎖可変領域は、配列番号5、配列番号13、配列番号41、配列番号49または配列番号57の配列を有するHCDR3を含む抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【0018】

好ましい実施形態において、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体軽鎖可変領域は、それぞれ、配列番号6、配列番号7および配列番号8の配列を有するLCDR1、LCDR2およびLCDR3を含む抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

40

【0019】

好ましい実施形態において、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体軽鎖可変領域は、それぞれ、配列番号14、配列番号15および配列番号16の配列を有するLCDR1、LCDR2およびLCDR3を含む抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【0020】

好ましい実施形態において、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体軽鎖可変領域は、それぞれ、配列番号42、配列番号43および配列番号4

50

4 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含む抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【 0 0 2 1 】

好ましい実施形態において、上記の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体軽鎖可変領域は、それぞれ、配列番号 5 0、配列番号 5 1 および配列番号 5 2 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含む。

【 0 0 2 2 】

好ましい実施形態において、上記の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体軽鎖可変領域は、それぞれ、配列番号 5 8、配列番号 5 9 および配列番号 6 0 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含む。

10

【 0 0 2 3 】

好ましい実施形態において、上記の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 3、配列番号 4 および配列番号 5 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含む抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【 0 0 2 4 】

好ましい実施形態において、上記の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 1 3 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含む抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

20

【 0 0 2 5 】

好ましい実施形態において、上記の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 3 9、配列番号 4 0 および配列番号 4 1 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含む抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【 0 0 2 6 】

好ましい実施形態において、上記の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体重鎖可変領域は、それぞれ、配列番号 4 7、配列番号 4 8 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、ならびに配列番号 4 9 を含む抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

30

【 0 0 2 7 】

好ましい実施形態において、上記の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体重鎖可変領域は、それぞれ、配列番号 5 5、配列番号 5 6 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、ならびに配列番号 5 7 を含む抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【 0 0 2 8 】

本発明の好ましい実施形態において、

抗体軽鎖可変領域は、

配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 の配列をそれぞれ有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3、または、

40

配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の配列をそれぞれ有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3、または、

配列番号 4 2、配列番号 4 3 および配列番号 4 4 の配列をそれぞれ有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3、または、

配列番号 5 0、配列番号 5 1 および配列番号 5 2 の配列をそれぞれ有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3、または、

配列番号 5 8、配列番号 5 9 および配列番号 6 0 の配列をそれぞれ有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3、を含み、かつ、

抗体重鎖可変領域は、

配列番号 3、配列番号 4 および配列番号 5 の配列をそれぞれ有する H C D R 1、H C D

50

R 2 および H C D R 3、または、

配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 1 3 の配列をそれぞれ有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、または、

配列番号 3 9、配列番号 4 0 および配列番号 4 1 の配列をそれぞれ有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、または、

配列番号 4 7、配列番号 4 8 および配列番号 4 9 の配列をそれぞれ有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、または、

配列番号 5 5、配列番号 5 6 および配列番号 5 7 の配列をそれぞれ有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3、を含む抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

10

【 0 0 2 9 】

特に好ましい抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントは、以下からなる群から選択されうる。

(1) 抗体軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 3、配列番号 4 および配列番号 5 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含む。

(2) 抗体軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 1 4、配列番号 1 5 および配列番号 1 6 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 1 3 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含む。

20

(3) 抗体軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 4 2、配列番号 4 3 および配列番号 4 4 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 3 9、配列番号 4 0 および配列番号 4 1 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含む。

(4) 抗体軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 5 0、配列番号 5 1 および配列番号 5 2 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 4 7、配列番号 4 8 および配列番号 4 9 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含む。

(5) 抗体軽鎖可変領域は、それぞれ配列番号 5 8、配列番号 5 9 および配列番号 6 0 の配列を有する L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含み、抗体重鎖可変領域は、それぞれ配列番号 5 5、配列番号 5 6 および配列番号 5 7 の配列を有する H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 を含む。

30

【 0 0 3 0 】

好ましい実施形態において、抗体軽鎖可変領域は、配列番号 2 または配列番号 1 0 の配列を有し、抗体重鎖可変領域は、配列番号 1 または配列番号 9 の配列を有する。

【 0 0 3 1 】

上記抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントは、マウス抗体またはキメラ抗体でありうる。

【 0 0 3 2 】

好ましくは、マウス抗体またはキメラ抗体の、

重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 1 で示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 2 で示され、または、

重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 9 で示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 1 0 で示され、または、

軽鎖可変領域 (L C V R) のアミノ酸配列は、配列番号 3 8 で示され、重鎖可変領域 (H C V R) のアミノ酸配列は、配列番号 3 7 で示され、または、

軽鎖可変領域 (L C V R) のアミノ酸配列は、配列番号 4 6 で示され、重鎖可変領域 (H C V R) のアミノ酸配列は、配列番号 4 5 で示され、または、

軽鎖可変領域 (L C V R) のアミノ酸配列は、配列番号 5 4 で示され、重鎖可変領域 (

40

50

H C V R) のアミノ酸配列は、配列番号 5 3 で示される。

【 0 0 3 3 】

本発明の好ましい実施形態において、上記の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントであって、抗体またはその抗原結合フラグメントがマウス抗体またはそのフラグメントである抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【 0 0 3 4 】

本発明の好ましい実施形態において、上記のようなマウス抗体またはそのフラグメントが提供され、ここで、抗体軽鎖可変領域は、マウスの 鎖、 鎖、またはその変異体の軽鎖 F R 領域をさらに含む。

【 0 0 3 5 】

本発明の好ましい実施形態において、マウスの 鎖、 鎖、またはその変異体の軽鎖定常領域をさらに含む上記のマウス抗体またはそのフラグメントが提供される。

【 0 0 3 6 】

本発明の好ましい実施形態において、上記のようなマウス抗体またはそのフラグメントが提供され、ここで、抗体重鎖可変領域は、マウス I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 またはその変異体の重鎖 F R 領域をさらに含む。

【 0 0 3 7 】

本発明の好ましい実施形態において、マウス I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 またはその変異体の重鎖定常領域をさらに含む上記のマウス抗体またはそのフラグメントが提供される。

【 0 0 3 8 】

本発明の好ましい実施形態では、キメラ抗体またはそのフラグメントでありうる上記の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【 0 0 3 9 】

好ましい実施形態において、軽鎖可変領域の配列が配列番号 2 または配列番号 1 0 で示される上記の抗 C D 4 0 キメラ抗体またはそのフラグメントが提供される。

【 0 0 4 0 】

好ましい実施形態において、重鎖可変領域の配列が配列番号 1 または配列番号 9 で示される上記の抗 C D 4 0 キメラ抗体またはそのフラグメントが提供される。

【 0 0 4 1 】

本発明の好ましい実施形態において、ヒト 鎖、 鎖、またはその変異体の軽鎖定常領域をさらに含む上記の抗 C D 4 0 キメラ抗体またはそのフラグメントが提供される。

【 0 0 4 2 】

本発明の好ましい実施形態において、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 またはその変異体の重鎖定常領域をさらに含む上記の抗 C D 4 0 キメラ抗体またはそのフラグメントが提供される。

【 0 0 4 3 】

本発明の好ましい実施形態において、ヒト抗体またはそのフラグメントである上記の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【 0 0 4 4 】

本発明の好ましい実施形態では、ヒト化抗体またはそのフラグメントである上記の抗 C D 4 0 抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【 0 0 4 5 】

本発明の好ましい実施形態において、上記のような抗 C D 4 0 ヒト抗体またはその抗原結合フラグメントが提供され、ここで、ヒト抗体は、配列番号 1 8 または配列番号 2 0 またはその変異体の配列を有し、好ましくは、変異体が軽鎖中にアミノ酸の 0 ~ 1 0 個の変異を有し、より好ましくは、変異が 2 位および 3 位で生じ、かつ変異したアミノ酸の両方は、好ましくは I、V または L である。

【 0 0 4 6 】

本発明の好ましい実施形態において、上記の抗 C D 4 0 ヒト抗体またはその抗原結合フ

10

20

30

40

50

ラグメントが提供され、ここで、ヒト抗体は、配列番号 17 または配列番号 19 またはその変異体の配列を有し、好ましくは、変異体が軽鎖中にアミノ酸の 0 ~ 10 個の変異体を有し、より好ましくは、変異体が 6 位および 8 位で生じ、かつ変異したアミノ酸の両方は、好ましくは I、A または L である。

【0047】

本発明の好ましい実施形態において、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 またはその変異体の定常領域をさらに含む上記の抗 CD40 ヒト抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

【0048】

本発明の好ましい実施形態において、ヒト鎖、鎖またはその変異体の軽鎖 FR 領域をさらに含む上記の抗 CD40 ヒト抗体またはその抗原結合フラグメントが提供される。

10

【0049】

好ましい実施形態において、ヒト抗体の軽鎖可変領域上の軽鎖 FR 領域の配列は、配列番号 22 に示されるヒト生殖系列の軽鎖 IGKV1-33 配列に由来するか、または配列番号 24 に示されるヒト生殖系列の軽鎖 IGKV2-28 配列に由来する上記の抗 CD40 ヒト抗体またはそのフラグメントが提供される。

【0050】

好ましい実施形態において、ヒト抗体軽鎖の配列は、配列番号 33 もしくは配列番号 34 に示される配列、またはその変異体である上記の抗 CD40 ヒト抗体またはそのフラグメントが提供される。

20

【0051】

好ましい実施形態において、ヒト抗体軽鎖の配列は、配列番号 18 もしくは配列番号 20 に示される配列、またはその変異体である上記の抗 CD40 ヒト抗体またはそのフラグメントが提供される。

【0052】

本発明の好ましい実施形態ではヒト抗体の軽鎖可変領域の変異体は、好ましくは、軽鎖中にアミノ酸の 0 ~ 10 個の突然変異を有し、より好ましくは、突然変異が 2 位および 3 位に起こり、突然変異したアミノ酸の両方が、好ましくは、I、V または L である上記のような抗 CD40 ヒト抗体またはそのフラグメントが提供される。

30

【0053】

本発明の好ましい実施形態において、ヒト鎖、鎖またはその変異体の軽鎖定常領域をさらに含む上記の抗 CD40 ヒト抗体またはそのフラグメントが提供される。

【0054】

本発明の好ましい実施形態において、ヒト IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 またはその変異体の重鎖 FR 領域をさらに含む上記の抗 CD40 ヒト抗体またはそのフラグメントが提供される。

【0055】

好ましい実施形態において、重鎖可変領域の重鎖 FR 領域は、配列番号 21 に示されるヒト生殖系列の重鎖IGHV1-69 配列に由来するか、または配列番号 23 に示されるヒト生殖系列の重鎖IGHV1-2 配列に由来する上記のような抗 CD40 ヒト抗体またはそのフラグメントが提供される。

40

【0056】

好ましい実施形態では、ヒト抗体の重鎖配列は、配列番号 26 もしくは配列番号 30、またはその変異体で示される上記の抗 CD40 ヒト抗体またはそのフラグメントが提供される。

【0057】

本発明の好ましい実施形態において、上記の抗 CD40 ヒト抗体またはそのフラグメントが提供され、ここで、ヒト抗体の重鎖配列は、配列番号 17 または配列番号 19、またはその変異体として示され、好ましくは、変異体が重鎖可変領域においてアミノ酸の

50

0 ~ 10個の変異を有し、より好ましくは、変異が6位および8位に生じ、そして変異したアミノ酸は、好ましくはI、A、またはLである。

【0058】

本発明の好ましい実施形態において、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはその変異体の重鎖定常領域、好ましくは、IgG1、IgG2またはIgG4の重鎖FR領域、より好ましくは、IgG1またはIgG2の重鎖FR領域をさらに含む上記の抗CD40ヒト化抗体またはそのフラグメントが提供される。

【0059】

本発明の好ましい実施態様において、提供されるのは上記のような抗CD40抗体または抗原結合フラグメントであり、ここで、抗原結合フラグメントは、Fab、Fv、sFv、F(ab')₂、直鎖抗体、単鎖抗体、ナノボディ、ドメイン抗体または多重特異抗体である。

10

【0060】

本発明はさらに、抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント、多重特異性抗体、または上記の単鎖抗体をコードするDNA配列を提供する。

【0061】

本発明はさらに、上記DNA配列を含む発現ベクターを提供する。

【0062】

本発明はさらに、上記の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

【0063】

本発明の好ましい実施形態では、宿主細胞が細菌、好ましくは大腸菌 (*Escherichia coli*) である上記の宿主細胞が提供される。

20

【0064】

本発明の好ましい実施形態において、上記の宿主細胞は、酵母、好ましくはピキア酵母 (*Pichia pastoris*) である。

【0065】

本発明の好ましい実施形態において、上記の宿主細胞は、哺乳類細胞、好ましくはチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞またはヒト胚性腎臓 (HEK) 293細胞である。

【0066】

本発明はさらに、上記のような抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを含む単鎖抗体を提供する。

30

【0067】

本発明はさらに、上記のような抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメントを含む多重特異性抗体を提供する。

【0068】

本発明はさらに、上記の抗CD40抗体の軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域を含む抗体-薬物結合体を提供する。抗体-薬物結合体は当技術分野で周知であり、抗体-リンカー-薬物(毒素)の相互接続によって形成され、公知のリンカーには切断可能なリンカー、下位切断可能なリンカー(たとえば、リンカー(SMCC、SPDPなどを含むが、これらに限定されない))が含まれる。DM1、DM4、MMAE、MMAFなどの毒素も当技術分野で周知である。

40

【0069】

本発明はさらに、抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント、多重特異性抗体、または単鎖抗体、および上記のような薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含む医薬組成物を提供する。

【0070】

本発明はさらに、CD40またはCD40L媒介疾患または状態の治療または予防のための医薬の製造における、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント、多重特異性抗体、一本鎖抗体、抗体-薬物結合体、または医薬組成物の使用を提供し、ここで

50

、当該疾患は、好ましくは癌であり、当該癌は、最も好ましくはリンパ腫、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、肝癌、胃癌、結腸直腸癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、食道癌、子宮頸癌、多発性骨髄腫、白血病、胆嚢癌、神経膠芽腫および黒色腫である。

【0071】

本発明はさらに、CD40またはCD40L媒介疾患または状態を治療および予防するための方法を提供し、該方法は治療有効量の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント、多重特異性抗体、一本鎖抗体、抗体-薬物結合体、または上記の医薬組成物を対象に投与することを含み、当該疾患は好ましくは癌であり、当該癌は、最も好ましくはリンパ腫、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膵臓癌、腎臓癌、肺癌、肝癌、胃癌、結腸直腸癌、膀胱癌、横紋筋肉腫、食道癌、子宮頸癌、多発性骨髄腫、白血病、胆嚢癌、神経膠芽腫および黒色腫である。

10

【0072】

本発明はさらに、自己免疫疾患を有する患者の症状を改善するための医薬の製造における、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント、多重特異性抗体、単鎖抗体、抗体-薬物結合体、または医薬組成物の使用を提供する。

【0073】

本発明はさらに、炎症性疾患を有する患者の症状を改善するための医薬の製造における、上記の抗CD40抗体またはその抗原結合フラグメント、多重特異性抗体、一本鎖抗体、抗体-薬物結合体、または医薬組成物の使用を提供する。

20

【図面の簡単な説明】

【0074】

【図1】CD80活性化分子に基づくDC細胞に対するマウス抗ヒトCD40抗体の活性化を示す図

【図2】CD86活性化分子に基づくDC細胞に対するマウス抗ヒトCD40抗体の活性化を示す図

【図3】ヒトPBMCおよびDC細胞を同時にグラフトしたRajiグラフトリンパ腫の腫瘍増殖曲線を示すグラフ

【図4】ヒトPBMCおよびDC細胞を同時にグラフトしたRajiグラフトリンパ腫をグラフトしたNOGマウスの体重変化を示すグラフ

30

【発明を実施するための形態】

【0075】

1. 定義

当業者が本発明を理解しやすくするために、特定の技術用語および科学用語を以下に具体的に定義する。本明細書の他の箇所で明らかに明確に定義されない限り、本明細書で使用される他のすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。

【0076】

本実施形態で用いられるアミノ酸3文字コードおよび一文字コードは、非特許文献3に記載されている。

【0077】

本発明において使用される「抗体」という用語は、2つの同一の重鎖および2つの同一の軽鎖を鎖間ジスルフィド結合によって連結することによって形成されるテトラペプチド鎖構造である免疫グロブリンを指す。免疫グロブリンの重鎖定常領域は、アミノ酸の組成および順序が異なるので、異なる免疫グロブリンの抗原性は異なる。したがって、免疫グロブリンは5つのクラスに分類されるか、または免疫グロブリンのアイソタイプ（すなわち、IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgE）と呼ばれうる。そして、その対応する重鎖は、それぞれ、 μ 鎖、 δ 鎖、 γ 鎖、 ϵ 鎖および α 鎖である。同じタイプのIgは、ヒンジ領域のアミノ酸組成、ならびに重鎖ジスルフィド結合の数および位置の差異に従って、異なるサブクラスに分けることができる。たとえば、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4に分類できる。軽鎖は、定常領域の違いによって鎖また

40

50

は鎖に分類できる。Igの5つのクラスの各々は、鎖または鎖を有しうる。

【0078】

本発明において、本発明の抗体軽鎖は、ヒトまたはマウス鎖、鎖またはそれらの変異体を含む軽鎖定常領域をさらに含むことができる。

【0079】

本発明において、本発明の抗体重鎖は、ヒトまたはマウスIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはそれらの変異体を含む重鎖定常領域をさらに含むことができる。

【0080】

可変領域（V領域）は、抗体の重鎖および軽鎖のN末端に近い約110アミノ酸から構成され、そのアミノ酸配列がかなり異なる。抗体のC末端に近い残りのアミノ酸配列から構成される定常領域（C領域）は、比較的安定である。可変領域は、3つの超可変領域（HVR）および4つの比較的保存されたフレームワーク領域（FR）を含む。抗体の特異性を決定する3つの超可変領域は、相補性決定領域（CDR）とも呼ばれる。軽鎖可変領域（VL）および重鎖可変領域（VH）の各々は、3つのCDR領域および4つのFR領域からなり、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4の順序でアミノ末端からカルボキシ末端に配列される。軽鎖の3つのCDR領域は、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を指し、重鎖の3つのCDR領域は、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を指す。本発明の抗体または抗原結合フラグメントのVLおよびVH領域のCDRアミノ酸残基の数および位置は、公知のIMGT採番基準に従う。

【0081】

用語「抗原発現細胞」または「APC」は、その表面上にMHCと複合体化した外来抗原を発現する細胞である。T細胞は、T細胞受容体（TCR）を介してこの複合体を認識する。APCの例としては、樹状細胞（DC）、末梢血単核細胞（PBMC）、単球、Bリンパ芽球、および単球由来樹状細胞（DC）が挙げられるが、これらに限定されない。用語「抗原発現」はAPCが抗原を捕捉し、それらがT細胞によって、たとえばMHC-I/MHC-II結合体の成分として認識されることを可能にするプロセスをいう。

【0082】

用語「CD40」は、TNFRSF5としても知られるTNF受容体スーパーファミリーのメンバーである細胞表面受容体を指す。CD40は、樹状細胞、B細胞およびマクロファージの表面に遍在的に発現され、T細胞免疫の産生および維持に必要な分子である。用語「CD40」は、細胞によって天然に発現されるCD40の任意の変異体またはアイソフォームを含む。本発明の抗体は、非ヒト種由来のCD40と交差反応性でありうる。あるいは、抗体はヒトCD40特異的であってもよく、他の種との交差反応性を示さなくてもよい。CD40、またはその任意の変異体もしくはアイソフォームはそれらが天然に発現される細胞または組織から単離されうるか、または当技術分野において一般的であり、そして本明細書中に記載される技術を使用する組換え技術によって産生されうる。好ましくは、抗CD40抗体が正常なグリコシル化パターンを有するヒトCD40を標的とする。

【0083】

用語「組換えヒト抗体」は組換え方法によって調製され、発現され、構築され、または単離されるヒト抗体を含み、関連する技術および方法は、（1）免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックトランスクロモソーム動物（たとえば、マウス）から単離された抗体、またはそれらから調製されたハイブリドーマ、（2）トランスフェクトマなどの抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から単離された抗体、（3）組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、および（4）ヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライシングすることによって調製され、発現され、構築され、または単離された抗体、などが当技術分野で周知である。このような組換えヒト抗体は、生殖系列遺伝子によってコードされる特異的ヒト生殖系列免疫グロブリン配列のみならず、抗体成熟の間に生じるようなその後の再編成および変異も利用する可変領域および定常領域を含む。

10

20

30

40

50

【0084】

本発明における「マウス抗体」という用語は、当技術分野の知識および技能に従って調製されたヒトCD40に対するモノクローナル抗体である。調製時に被験体にCD40抗原を注射し、所望の配列または機能特性を有する抗体を発現するハイブリドーマを単離する。本発明の好ましい実施形態において、マウスCD40抗体またはその抗原結合フラグメントは、マウス鎖、鎖またはその変異体の軽鎖定常領域をさらに含むか、またはマウスIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4の重鎖定常領域またはその変異体をさらに含む。

【0085】

用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列の可変領域および定常領域を有する抗体を含む。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列（たとえば、*in vitro*でのランダムまたは部位特異的突然変異誘発によって、または*in vivo*での体細胞突然変異によって導入される突然変異）によってコードされないアミノ酸残基を含む。しかし、「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳類種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上にグラフトされている抗体（すなわち、「ヒト化抗体」）を含まない。

10

【0086】

「ヒト化抗体」という用語は、CDRグラフト抗体としても知られており、マウスのCDR配列をヒト抗体可変領域のフレームワークにグラフトすることによって産生される抗体を指す。これは、大量のマウスタンパク質成分を保有するキメラ抗体によって誘導される強力な免疫応答を克服できる。免疫原性を低下させることによって引き起こされる活性の低下を回避するために、ヒト抗体可変領域は、活性を維持するために最小限の復帰突然変異に供されうる。

20

【0087】

「キメラ抗体」という用語は、マウス抗体の可変領域をヒト抗体の定常領域と融合させることによって形成される抗体であり、マウス抗体によって誘導される免疫応答を軽減できる。キメラ抗体を構築するために、マウス特異的モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを最初に構築し、選択し、次いで、可変領域遺伝子をマウスハイブリドーマ細胞からクローニングする。続いて、必要に応じてヒト抗体の定常領域遺伝子をクローニングする。マウス可変領域遺伝子およびヒト定常領域遺伝子は、キメラ遺伝子に連結され、次いでヒトベクターに挿入され、そして最後に、キメラ抗体分子は、真核生物または原核生物工業システムにおいて発現される。ヒト抗体の定常領域はヒトIgG1、IgG2、IgG3またはその変形の重鎖定常領域から選択することができ、望ましくはヒトIgG1またはIgG2の重鎖定常領域からなる。

30

【0088】

用語「抗原結合フラグメント」は、抗体および抗体類似体の抗原結合フラグメントを指し、典型的には、親抗体の抗原結合領域または可変領域（たとえば、1つ以上のCDR）の少なくとも一部を含む。抗体フラグメントは、親抗体の結合特異性の少なくとも一部を保持する。一般に、抗体フラグメントは、モルベースで示される場合、親結合活性の少なくとも10%を保持する。好ましくは、抗体フラグメントが標的に対する親抗体の結合親和性の少なくとも20%、50%、70%、80%、90%、95%または100%以上を保持する。抗原結合フラグメントの例としては限定されるものではないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvフラグメント、直鎖抗体、単鎖抗体、ナノボディ、ドメイン抗体、および多特異的抗体が挙げられる。操作された抗体変異体は非特許文献4で概説されている。

40

【0089】

「Fabフラグメント」は、軽鎖、ならびにCH1および重鎖の可変領域からなる。Fab分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。

【0090】

「Fc」領域は、抗体のCH1およびCH2ドメインを含む2つの重鎖フラグメントを

50

含む。2つの重鎖フラグメントは、2つ以上のジスルフィド結合およびCH3ドメインの疎水性相互作用によって一緒に保持される。

【0091】

「Fab'フラグメント」は、軽鎖と、VHドメイン、CH1ドメイン、およびCH1ドメインとCH2ドメインとの間の領域を含む重鎖の一部と、を含む。したがって、鎖間ジスルフィド結合は2本の重鎖の間で形成され、F(ab')₂分子を形成できる。

【0092】

「F(ab')₂フラグメント」は、CH1ドメインと、CH2ドメインの間の定常領域の一部を含む2つの軽鎖と2つの重鎖と、を含み、それによって2つの重鎖の間にジスルフィド結合を形成する。したがって、F(ab')₂フラグメントは2本の重鎖間のジスルフィド結合によって結合した2本のFab'フラグメントからなる。

10

【0093】

「Fv領域」は、重鎖および軽鎖の両方からの可変領域を含むが、定常領域を欠く。

【0094】

用語「多重特異性抗体」は、その最も広い意味で使用され、多重エピトープ特異性を有する抗体を包含する。これらの多重特異性抗体には重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)(ここで、VH-VLユニットは多重エピトープ特異性を有する。)を含む抗体、2つ以上のVLおよびVH領域を有し、各VH-VLユニットは同じ標的の異なる標的または異なるエピトープに結合する抗体、2つ以上の単一可変領域を有し、各単一可変領域は同じ標的の異なる標的または異なるエピトープに結合する抗体、全長抗体、抗体フラグメント、ダイアボディ、二重特異性ダイアボディおよびトリアボディ、共有結合または非共有結合された抗体フラグメント、などが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0095】

用語「抗体-薬物結合体」(ADC)は、1つ以上の異種化学合成分子に結合された抗体または抗体フラグメントをいい、細胞傷害性物質に結合された抗体または抗体フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。

【0096】

用語「単鎖抗体」は、完全な抗原結合部位を有する最小の抗体フラグメントであるリンカーペプチドを介して抗体の重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を連結することによって形成される単鎖組換えタンパク質である。

30

【0097】

用語「ドメイン抗体フラグメント」は、重鎖可変領域または軽鎖可変領域鎖のみを含む免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントである。いくつかの場合において、2つ以上のVH領域は、ペプチドリンカーに共有結合して、二価ドメイン抗体フラグメントを形成する。二価ドメイン抗体フラグメントの2つのVH領域は、同じまたは異なる抗原を標的とすることができる。

【0098】

本明細書で使用される「CD40への結合」という用語は、ヒトCD40と相互作用する能力を指す。本発明で使用される「抗原結合部位」という用語は、抗原上で別個であり、本発明の抗体または抗原結合フラグメントによって認識される三次元空間部位を指す。

40

【0099】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたは抗体に特異的に結合する抗原上の部位を指す。エピトープは隣接するアミノ酸によって形成されうるものであり、隣接しないアミノ酸はタンパク質の三次フォールディングによって並置される。隣接するアミノ酸によって形成されるエピトープは典型的には変性溶媒への暴露後に維持され、一方、三次フォールディングによって形成されるエピトープは典型的には変性溶媒での処理後に失われる。エピトープは、典型的には固有の空間的コンホメーションにおいて少なくとも3~15アミノ酸を含む。どのエピトープが所与の抗体によって結合されるかを決定するための方法は、免疫プロッティングおよび免疫沈降アッセイなどを含む、当技術分野で周知である。エピトープの空間的コンホメーションを決定するための方法は、当技術分野の技術

50

および本明細書に記載される技術（たとえば、X線結晶構造解析および二次元核磁気共鳴）を含む。

【0100】

本明細書中で使用される場合、用語「特異的に結合する」または「選択的に結合する」は、所定の抗原上のエピトープへの抗体の結合をいう。典型的には組換えヒトCD40を被検体として用い、抗体をリガンドとして用いると、機器内で表面プラズモン共鳴（SPR）技術により測定した場合、約 10^{-7} M未満またはさらに少ない平衡解離定数（ K_D ）を有する所定の抗原に抗体が結合し、所定の抗原への結合に対するその親和性は所定の抗原または密接に関連した抗原以外の非特異的抗原（BSA等）への結合に対するその親和性の少なくとも2倍である。「抗原を認識する抗体」という用語は、ここでは「抗体に特異的に結合する」という用語と同じ意味で使用できる。

10

【0101】

用語「交差反応」は、異なる種からのCD40に結合する本発明の抗体の能力をいう。たとえば、ヒトCD40に結合する本発明の抗体はまた、別の種のCD40に結合しうる。交差反応性は結合アッセイ（たとえば、SPRおよびELISA）における精製抗原との抗体の特異的反応性、またはCD40を生理学的に発現する細胞との抗体の結合または機能的相互作用を検出することによって測定される。交差反応性を決定するための方法は本明細書中に記載されるような標準的な結合アッセイ（たとえば、表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイ、またはフローサイトメトリー）を含む。

20

【0102】

用語「阻害する（inhibit）」、「阻害（inhibition）」、「遮断（blockade）」または「遮断する（block）」は、互換的に使用され、部分的小および完全な阻害/遮断の両方を包含する。リガンドの阻害/遮断は、好ましくはリガンド結合が阻害または遮断なしに生じる場合に生じる活性の正常なレベルまたはタイプを減少または変化させる。阻害および遮断はまた、抗CD40抗体と接触しないリガンドと比較して、抗CD40抗体と接触した場合のリガンド結合親和性の任意の測定可能な減少を含むことが意図される。

【0103】

用語「増殖の阻害」（たとえば、細胞を含む）は、細胞増殖における任意の測定可能な減少を含むことが意図される。

【0104】

用語「免疫応答を誘導する」および「免疫応答を増強する」は互換的に使用され、特定の抗原に対する免疫応答の刺激（すなわち、受動的または適応的）をいう。CDCまたはADCを誘導するのに特異的な「誘導する」という用語は、特異的な直接細胞殺傷メカニズムを刺激することを指す。

30

【0105】

本発明において記載される「ADC」、すなわち抗体依存性細胞傷害性とは、Fc受容体を発現する細胞が抗体のFc部分を認識することによって、抗体でコーティングされた標的細胞を直接的に死滅させることを意味する。抗体のADCエフェクター機能は、IgG上のFcセグメントの修飾によって低減または排除できる。修飾は抗体の重鎖定常領域における突然変異、たとえば、IgG1のN297A、L234A、L235A；IgG2/4キメラ、IgG4のF235E、およびL234A/E235A突然変異からなる群より選択される突然変異を指す。

40

【0106】

抗体および抗原結合フラグメントを産生および精製するための方法は周知であり、そして先行技術（たとえば、非特許文献5）において見出されうる。たとえば、マウスをヒトCD40またはそのフラグメントで免疫化することができ、得られた抗体を再生し、精製し、従来の方法によりアミノ酸配列決定に供することができる。抗原結合フラグメントはまた、従来の方法によって調製されうる。本発明の抗体または抗原結合フラグメントは、1つ以上のヒトFR領域を非ヒトCDR領域に導入するように遺伝子操作される。ヒト生殖系列FR配列は、Immunogenetics（IMGT）のウェブサイト（<http://>

50

/IMGT.cines.fr) または非特許文献 6 から入手可能である。

【0107】

本発明の操作された抗体または抗原結合フラグメントは、従来の方法によって調製および精製されうる。対応する抗体の cDNA 配列をクローニングし、GS 発現ベクターに組換えることができる。CHO 細胞は、組換え免疫グロブリン発現ベクターによって安定にトランスフェクトされうる。当該分野で周知のより推奨される方法として、哺乳類発現系は、特に FC 領域の高度に保存された N 末端において、抗体のグリコシル化を生じる。安定なクローンは、ヒト抗原に特異的に結合する抗体を発現させることによって得られる。陽性クローンを、バイオリアクター中の無血清培地中で増殖させて、抗体を産生した。抗体が分泌される培養培地は、従来の技術によって精製および収集されうる。抗体は、従来の方法で濾過によって濃縮できる。可溶性混合物および多量体は、モレキュラーシーブ、イオン交換などの従来の方法によっても除去できる。得られた生成物は、(たとえば -70 で) 直ちに凍結するか、または凍結乾燥する必要がある。

10

【0108】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体を指す。本発明のモノクローナル抗体 (mAb) は、単クローン細胞系から得られる抗体を指し、細胞系は、真核細胞系、原核細胞系、またはファージクローン細胞系に限定されない。モノクローナル抗体または抗原結合フラグメントは、たとえば、ハイブリドーマ技術、組換え技術、ファージディスプレイ技術、合成技術 (たとえば、CDR グラフト)、または他の先行技術を使用して、組換え的に得られ得る。

20

【0109】

動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官または生物学的流体に適用する場合、「投与」および「治療」は、外因性薬物、治療薬、診断薬または組成物を動物、ヒト、対象物、細胞、組織、器官または生物学的流体と接触させることを指す。「投与」および「治療」はたとえば、治療、薬物動態、診断、研究、および実験方法を指すことができる。細胞の処理は試薬を細胞と接触させること、ならびに試薬を流体と接触させることを含み、流体は細胞と接触している。「投与」および「処置」はまた、たとえば、試薬、診断薬、結合組成物によって、または別の細胞によって、*in vitro* および *ex vivo* で細胞を処置することを意味する。「治療」は、ヒト、動物または研究対象に適用される場合、研究および診断用途に対する治療的処置、予防または予防手段を指す。

30

【0110】

「治療」は、治療剤が治療効果を有することが知られている疾病の 1 つ以上の症状を有する患者に対して、本発明の結合化合物のいずれかを含む組成物のような、内用または外用の治療剤を投与することを意味する。一般に、治療剤は、治療される対象または集団における 1 つ以上の疾患の症状を、そのような症状の変性を誘導するか、またはそのような症状の進行を任意の臨床的に測定不可能な程度まで阻害するかにかかわらず、効果的に軽減する量で投与される。任意の特定の疾患の症状を軽減するのに有効な治療剤の量 (「治療有効量」とも呼ばれる。) は、疾患状態、患者の年齢および体重、ならびに患者において所望の効果を引き出す薬物の能力などの様々な要因に応じて変動しうる。疾患の症状が軽減されたかどうかは、病状の重症度または進行を評価するために医師または他の医療専門家によって一般的に使用される任意の臨床試験方法によって評価できる。本発明の実施形態 (たとえば、治療方法または調製物) は各患者に共通する標的疾患の症状を改善するのに有効ではないかもしれないが、スチューデント t 検定、カイ二乗検定、Mann および Whitney に基づく U 検定、Kruskal-Wallis 検定 (H 検定)、Jonckheere-Terpstra 検定、および Wilcoxon 検定などの当技術分野で公知の任意の統計学的試験方法に従って、標的疾患の症状を統計学的に有意な数の患者において軽減すべきであることが決定される。

40

【0111】

「保存的修飾」または「保存的置換または置換」はタンパク質中のアミノ酸を、タンパク質の生物学的活性を変化させることなく頻繁に変化させることができるように、類似の特徴 (たとえば、電荷、側鎖サイズ、疎水性/親水性、骨格コンホメーションおよび剛性

50

など)を有する他のアミノ酸で置換することを指す。通常、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換は生物学的活性を実質的に変化させないことが、当業者によって公知である(たとえば、非特許文献7を参照のこと)。さらに、構造的または機能的に類似したアミノ酸の置換は、生物学的活性を破壊しそうにない。アミノ酸の一般的な保存的置換は以下の通りである。

【0112】

【表1】

元の残基	置換残基の例	好ましい置換残基
Ala(A)	Val, leu, ile	val
Arg(R)	Lys, gln, asn	lys
Asn(N)	Gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp(D)	Glu, asn	glu
Cys(C)	Ser, ala	ser
Gln(Q)	Asn, glu	asn
Glu(E)	Asp, gln	asp
Gly(G)	ala	ala
His(H)	Arg, asn, gln, lys	arg
Ile(I)	Leu, val, met, ala, phe, Norleucine	leu
Leu(L)	Ile, Norleucine, val, met, ala, phe	ile
Lys(K)	Arg, gln, asn	arg
Met(M)	Leu, phe, ile	leu
Phe(F)	Tyr, leu, val, ile, ala	tyr
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	Tyr, phe	tyr
Tyr(Y)	Phe, trp, thr, ser	phe
Val(V)	Leu, ile, met, phe, ala, Norleucine	leu

10

20

30

40

【0113】

用語「から本質的になる」またはその変形は、明細書および特許請求の範囲を通して使用されるように、すべてのそのような要素または要素の群を含み、任意選択で、前記要素に性質が類似または異なる他の要素を含み、他の要素は、所与の投薬計画、方法または組成物の本質的または新規な特性を有意に変更しない。非限定的な例として、列挙されたアミノ酸配列から本質的になる結合化合物はまた、結合化合物の特性に有意に影響しない1つ以上のアミノ酸を含みうる。

【0114】

本発明による物体に適用される「天然に存在する」という用語は、物体が天然に見出されうるという事実を指す。たとえば、天然の供給源から単離されうる。そして、実験室に

50

において意図的に人工的に改変されていない生物（ウイルスを含む）中に存在するポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列は天然に存在する。

【0115】

「有効量」は、医学的状態の症状または徴候を改善または予防するのに十分な量を含む。有効量はまた、診断を可能にするかまたは容易にするのに十分な量を意味する。特定の患者または獣医学的被験体についての有効量は、処置されるべき状態、患者の全体的な健康、投与方法の経路および投薬量、ならびに副作用の重篤度のような因子に依存して変化しうる。有効量は、有意な副作用または毒性効果を回避する最大用量または投薬レジメンでありうる。

【0116】

「外因性」とは、バックグラウンドに従って、生体、細胞、または人体の外部で産生される物質をいう。「内因性」とは、バックグラウンドに従って、細胞、生物またはヒトの体内で産生される物質をいう。

【0117】

「相同性」は、2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列間の配列類似性を指す。両方の比較配列中の位置が同じ塩基またはアミノ酸モノマーサブユニットによって占有される場合、たとえば、2つのDNA分子の各位置がアデニンによって占有される場合、その分子はその位置で相同である。2つの配列間の相同性のパーセンテージは、2つの配列によって共有される一致するまたは相同な位置の数を比較された位置の数で割って100%を乗じた関数である。たとえば、配列が最適にアラインメントされる場合、2つの配列中の10個の位置のうち6個が一致するか、または相同である場合、2つの配列は60%相同である。一般に、比較は、相同性の最大パーセンテージが2つの配列をアラインメントさせることによって得られる場合に行われる。

【0118】

本明細書で使用される「細胞」、「細胞系」および「細胞培養物」という表現は互換的に使用することができ、そのような名称はすべて、それらの子孫を含む。したがって、「形質転換体」および「形質転換細胞」という語は、移入の数にかかわらず、初代試験細胞およびそれに由来する培養物を含む。また、すべての子孫は意図的または意図的でない突然変異のために、DNA含量に関して正確に同一ではないことがあることも理解されるべきである。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングされたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫が含まれる。異なる名前が意味される場合、それらは文脈から明確に区別可能である。

【0119】

「任意の (optional)」または「任意に (optionally)」は、イベントまたは環境がどこで発生するか、または発生しないかを含めて、後述するイベントまたは環境が発生してもよいが、必ずしも発生しなくてもよいことを意味する。たとえば、「任意に1~3個の抗体重鎖可変領域を含む」は特定の配列の抗体重鎖可変領域が存在しうることを意味するが、必ずしも存在する必要はない。

【0120】

「医薬組成物」は、本明細書に記載の化合物の1つ以上、またはその生理学的/薬学的に許容される塩もしくはプロドラッグ、および他の化学成分、ならびに生理学的/薬学的に許容される担体および賦形剤などの他の成分を含む混合物を意味する。医薬組成物の目的は活性成分の吸収を促進し、それによって生物学的活性を発揮する生物の投与を促進することである。

【実施例】

【0121】

以下の実施例は本発明をさらに説明するものであり、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。本発明の実施形態において特定の条件を示さない実験方法は通常、従来条件（たとえば、非特許文献8および非特許文献9）に従って、または原料もしくは商品の製造業者によって推奨される条件に従って実施される。特定の供給源のない試薬は、

10

20

30

40

50

市場から購入される常用試薬である。

【0122】

〔実施例1 免疫抗原、スクリーニングされた抗原の配列およびその調製〕

H i s 標識ヒトCD40 (h - C D 4 0 - h i s) 組換えタンパク質、F c 標識ヒトCD40 (h - C D 4 0 - F c) 組換えタンパク質、H i s 標識マウスCD40 (m - C D 4 0 - h i s) 組換えタンパク質およびH i s 標識アカゲザルCD40 (アカゲザル - C D 4 0 - h i s) 組換えタンパク質 (# C D 0 - C 5 2 H 7) は、Acrobiosystemsから購入した精製市販タンパク質であった。それぞれの配列を下表に示す。これらのタンパク質は、以下の実施例の実験において使用されうる。

【0123】

【表2】

名称	アミノ酸配列の始端および末端	Genbank 受入番号
h-CD40-his	Glu21-Arg193	AAH12419.1
h-CD40-Fc	Glu21-Arg193	NP_001241.1
m-CD40-his	Val24-Arg193	P27512
rhesus-CD40-his	Glu21-Arg193	NP_001252791.1

10

【0124】

〔実施例2 抗体ハイブリドーマの調製〕

抗ヒトCD40モノクローナル抗体は、実験的C57BL/6マウス、雌、6~8週齢 (Zhao Yan (Suzhou) New Drug Research Center Co., Ltd.、動物生産ライセンス番号201503259) であるマウスを免疫することによって産生した。給餌環境はSPFレベルとした。マウスを購入し、20~25の温度および40~60%の湿度で12/12時間の明/暗サイクル調整を伴う実験室環境で1週間飼料を与えた。環境に適応したマウスを2つのケージに分け、各ケージに5匹のマウスを入れた。

20

【0125】

免疫抗原は、F c タグ化ヒト修飾CD40組換えタンパク質 (h - C D 4 0 - F c 、濃度1 μ g / μ l までリン酸緩衝液中に製剤化) であった。フロイントアジュバント (Sigma、ロット番号:F5881/F5506) を乳化に使用し、フロイント完全アジュバント (CFA) を一次免疫に使用し、核酸アジュバント (CpG、Sangon Biotech) および注射用アルミニウム (Imject Alum、Thermo、ロット番号:PH203866) を残りの追加免疫に使用した。免疫化は、0日目、14日目、28日目、42日目、56日目、および70日目に行った。血液検査は21、35、49、63、77日目に採血し、ELISAによりマウス血清を検出し、マウス血清中の抗体価を測定した。

30

【0126】

4回目の免疫時に、脾臓細胞融合を、抗体力価が高く、血清中で安定する傾向があるマウスにおいて行った。融合の3日前に追加免疫を行い、リン酸緩衝液を配合した抗原溶液10 μ g を各マウスに腹腔内 (IP) 注射した。脾臓リンパ球を、最適化されたPEG媒介融合工程を使用して骨髓腫細胞Sp2/0細胞 (ATCC (登録商標) CRL-8287TM) と融合させて、ハイブリドーマ細胞を得、そして良好な *in vitro* 活性を有する5つのモノクローナルハイブリドーマ細胞株を選択した。

40

【0127】

〔実施例3 ELISA結合アッセイ〕

抗CD40抗体の結合特性をELISAアッセイによって検出した。hisタグを有するCD40組換えタンパク質をコーティングに直接使用し、抗体を添加した後、二次抗体 (HRP結合抗抗体Fc抗体) およびHRP基質TMBを添加することによって、抗原に対する抗体の結合活性を検出した。

【0128】

50

96ウェルマイクロタイタープレートを、100 μ l/ウェルのヒトまたはアカゲザルCD40-hisタンパク質で0.5 μ g/mlの濃度でコーティングし、4で一晚インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液、ウェルあたり250 μ lで3回洗浄した。各すすぎにおいてプレートを10秒間振とうして、十分な洗浄を確実にした。200 μ lのブロッキング溶液を各ウェルに添加し、室温で2時間インキュベートした。次に、プレートをウェル当たり250 μ lで3回洗浄した。各すすぎにおいてプレートを10秒間振とうして、十分な洗浄を確実にした。試験対象の抗CD40抗体100 μ lを希釈した希釈液を各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベートし、次いで、ウェルあたり250 μ lのすすぎ緩衝液でプレートを3回すすいだ。希釈剤で1:20000に希釈したHRP標識ヤギ抗ヒトIgG二次抗体100 μ lを各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベ

10

【0129】

異なる生殖系列CD40に対するマウスハイブリドーマ抗体のELISA結合

【表3】

抗体株	ヒトCD40-his ELISA EC50 (ng/ml)	アカゲザルCD40-his ELISA EC50 (ng/ml)	マウスCD40-his ELISA EC50
1D9	10.01	9.808	No binding
2H6	7.063	7.207	No binding
9E5	5.996	6.704	No binding
14C10	8.808	9.494	No binding
38B4	12.9	11.81	No binding

20

【0130】

〔実施例4 抗CD40抗体は、CD40およびCD40Lの結合を遮断する〕

30

この実験では、スクリーニングされた抗ヒトCD40抗体を検出し、*in vitro*ブロッキングアッセイによりヒトCD40およびヒトCD40Lの結合を遮断する。具体的には、Fcタグ付きCD40組換えタンパク質(h-CD40-Fc)を96ウェルマイクロタイタープレート上にコーティングした。抗CD40抗体を添加してエピトープに完全に結合し、エピトープを占めた後、hisタグ付きCD40Lを添加した。hisタグを検出することにより、CD40のCD40Lへの結合量を計算し、次いでCD40活性部位を遮断するCD40抗体のIC50値を計算した。

【0131】

96ウェルマイクロタイタープレートを、100 μ l/ウェルのヒトまたはアカゲザルCD40-Fcタンパク質で1 μ g/mlの濃度でコーティングし、4で一晚インキュベ

40

50

た。450nmにおけるOD値をThermo MultiSkanFcプレートリーダーによって測定し、CD40LへのCD40結合を遮断するCD40抗体のIC50値を計算した。

【0132】

ヒトhCD40/hCD40LのELISAブロッキング結果

【表4】

抗体株	ELISAブロッキング ヒトhCD40/hCD40L IC50(μg/ml)
1D9	0.2634
2H6	0.2682
9E5	0.2787
14C10	0.3001
38B4	0.2934

10

【0133】

〔実施例5 Biacore親和性測定〕

ヒト抗体捕捉抗体を、Biacore機器(Biacore X100、GE)のCM5バイオセンサーチップに、ヒト抗体捕捉キット(Cat.BR-1008-39、GE)の記載に記載の方法に従って共有結合させ、それによって、親和性に基づいて試験される特定量のキメラまたはヒト化抗体を捕捉した。次いで、一連の濃度勾配CD40抗原(Acrobiosystemsから購入)をチップの表面に流し、Biacore X100(GE)を用いてリアルタイムで反応シグナルを検出し、結合および解離曲線を得た。解離の各サイクルの完了後、バイオチップをすすぎ、ヒト抗体捕捉キットによって提供される再生溶液で再生した。Amine Coupping Kits(Cat.BR-1000-50、GE)をGEから購入し、HBS-EP+10X緩衝液(Cat.BR-1006-69、GE)を脱イオン水により希釈してHBS-EP+1X緩衝液(pH7.4)を得た。実験データを、BiacoreX100 Evaluation Software 2.0(GEソフトウェア)によって(1:1)結合モデルに適合させ、表11および12に示す親和性値を得た。

20

30

【0134】

〔実施例6 レポーター遺伝子に基づく抗CD40抗体の細胞活性試験〕

ヒトcd40遺伝子およびNF- κ B媒介SEAPゲノムで安定にトランスフェクトされたHEK-Blue CD40L細胞(Cat#hkb-CD40)を、Invitrogenから購入した。したがって、CD40シグナル伝達経路の活性化レベルは、QUANTI-Blue(SEAPの基質)によって上清中の分泌SEAPを検出することによって特徴付けることができる。この実験では、CD40抗体の*in vitro*細胞生存率を、細胞HEK-Blue CD40Lの活性化を検出することによってEC50値に従って評価した。HEK-Blue CD40L細胞を、10%FBS、100μg/mlゼオシンおよび30μg/mlプラスチジンを含むDMEM培地中で培養し、週2~3回継代し、継代比は1:5または1:10であった。細胞を継代培養するとき、培地をピペティングによって除去し、細胞層を5mlの0.25%トリプシンですすいだ。次いで、トリプシンをピペティングによって除去し、細胞をインキュベーター中で3~5分間消化し、続いて新鮮な培地で細胞を懸濁した。100μLの細胞懸濁液を5×10⁵セル/mlの密度で96ウェル細胞培養プレートに加え、培地は10%FBS、100μg/mlのゼオシンおよび30μg/mlのプラストサイジンを含んだDMEMであった。一方、96ウェルプレートの周囲には、滅菌水100μlのみを添加した。プレートをインキュベーター(37℃、5%CO₂)中で24時間インキュベートした。細胞が壁に付着した後、試験される勾配希釈抗体100μlを各ウェルに添加した。プレートをインキュベーター中で20~24時間インキュベートした(37℃、5%CO₂)。次に、40μlの細胞

40

50

上清を各ウェルから新しい96ウェル平底プレートに取り、160 μ lのQUANTI-BLue基質溶液を添加し、プレートをインキュベーター中で暗所で1~3時間インキュベートした。620nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Thermo MultiskanFc)で測定し、EC50値を計算してCD40抗体の*in vitro*細胞生存率を評価した。

【0135】

レポーター遺伝子に基づく抗CD40抗体の細胞活性

【表5】

抗体株	HEK293-CD40L 細胞活性アッセイ EC50 (μ g/ml)	
1D9	+++	0.01454
2H6	+++	0.01511
9E5	++	0.01712
14C10	+++	0.01087
38B4	++	0.0365

10

【0136】

〔実施例7 抗cd40抗体のアッセイを活性化するDC細胞〕

20

PBMCを正常ヒト末梢血から単離し、次いで単球をCD14 MACSビーズで選別した。10ng/mlのIL4および100ng/mlのGM-CSFを含有するRPMI 1640培地を細胞に添加し、6日間培養し、それによってMoDC細胞(単球由来の樹状細胞)の誘導培養を行った。6日後、細胞を採取し、 1×10^5 細胞を採取し、CD209-PE、CD1a-PerCP/Cy5.5およびCD14-PE/Cy7で染色し、FACSを用いて、MoDCが成功裏に誘導されたかどうかを分析した(上記の操作は、当技術分野では全て従来操作である)。成功裏に誘導されたDCを収集し、そして試験されるべき種々の抗体および対応する勾配濃度を有する参照抗体をそれぞれ添加した(抗体の勾配濃度については図1を参照のこと)。培養の48時間後、細胞を回収し、その後CD80、CD86およびHLA-DRで染色し、データをFACSアッセイによ

30

【0137】

〔実施例8 抗CD40抗体のクローニングおよび配列決定〕

上記でスクリーニングおよび同定された5つの抗体のハイブリドーマサブクローンを選択し、対数増殖期のハイブリドーマ細胞を収集した。RNAを、キットの指示に従ってトリゾール(Invitrogen、15596-018)を用いて抽出し、逆転写した(PrimeScriptTM Reverse Transcriptase、Takara、cat #2680A)。次いで、得られたcDNAを、マウスIg-プライマーセット(Novagen、TB326 Rev.B 0503)を使用するPCRによって増幅し、配列決定のために配列決定会社に送った。5つのマウス抗体の配列を最終的に得た。

40

【0138】

マウスmAb 2H6の重鎖および軽鎖可変領域配列は以下の通りである。

【0139】

2H6 HCVR
 QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFSDYLI EWAKQR
 PGQGLEWIGVINPGSGGSNYNEKIKDRATLTADKSSSTAY
 MQLSSLTSEDSAVYFCARGGGGFTYWGQGT LVT VSA

50

(配列番号1)

【0140】

2H6 LCV R

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

(配列番号2)

【0141】

mAb 2H6のCDR配列を下表に示す。

【表6】

10

名称	配列	番号
HCDR1	GYAFSDYLIE	配列番号3
HCDR2	VINPGSGGSNYNEKIKD	配列番号4
HCDR3	GGGGFTY	配列番号5
LCDR1	RASQDISNYLN	配列番号6
LCDR2	FASRLHS	配列番号7
LCDR3	QQGSTLPWT	配列番号8

【0142】

マウス9E5の重鎖および軽鎖可変領域配列は以下の通りである。

20

【0143】

9E5 HCV R

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

(配列番号9)

【0144】

9E5 LCV R

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

30

(配列番号10)

【0145】

9E5のCDR配列を下表に示す。

【表7】

名称	配列	番号
HCDR1	GYILTTYWIT	配列番号11
HCDR2	DIHPGSGSTKYNEKFKS	配列番号12
HCDR3	RDY	配列番号13
LCDR1	RSSQNIVNSQGNTYLE	配列番号14
LCDR2	KVTNRFS	配列番号15
LCDR3	FQASLVPWT	配列番号16

40

【0146】

1D9の重鎖および軽鎖可変領域配列は以下の通りである。

【0147】

1D9 HCV R

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

50

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

(配列番号 37)

【0148】

1 D 9 L C V R

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

(配列番号 38)

【0149】

1 D 9 の C D R 配列を下表に示す。

【表 8】

名称	配列	番号
HCDR1	GYAFTNYLIN	配列番号 39
HCDR2	ILNPGSGGTNYNENFKD	配列番号 40
HCDR3	GSPGFAY	配列番号 41
LCDR1	RASQDINIYLN	配列番号 42
LCDR2	STSGLHS	配列番号 43
LCDR3	QQGYTLPYT	配列番号 44

10

20

【0150】

1 4 C 1 0 の重鎖および軽鎖可変領域配列は以下の通りである。

【0151】

1 4 C 1 0 H C V R

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

(配列番号 45)

【0152】

1 4 C 1 0 L C V R

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

(配列番号 46)

【0153】

1 4 C 1 0 の C D R 配列を下表に示す。

【表 9】

名称	配列	番号
HCDR1	GYAFTNYLIE	配列番号 47
HCDR2	VINPEFGGTNYNEKFKG	配列番号 48
HCDR3	GGGGFTY	配列番号 49
LCDR1	RASQDISSHLN	配列番号 50
LCDR2	YTSRLHS	配列番号 51
LCDR3	QQGNTLPWT	配列番号 52

30

40

【0154】

3 8 B 4 の重鎖および軽鎖可変領域配列は以下の通りである。

【0155】

50

3 8 B 4 H C V R
 Q V R L K Q S G A E L V R P G A S V K V S C K A S G Y T F T D Y Y I N W V K Q R
 P G Q G L E W I A G I Y P G T G N T Y Y N E K F K G K A T L T A E R S S S T A Y
 M Q L T S L T S E D S A V Y F C T R R G L P S L C F D Y W G Q G T T L T V S S
 (配列番号 53)

【0156】

3 8 B 4 L C V R
 D F Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P
 D G T V K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E P
 E D I A T Y Y C Q Q Y S K L P P T F G G G T K L E I K
 (配列番号 54)

10

【0157】

3 8 B 4 の C D R 配列を下表に示す。

【表 10】

名称	配列	番号
HCDR1	GYTFTDYYIN	配列番号 55
HCDR2	GIYPGTGNTYYNEKFKG	配列番号 56
HCDR3	RGLPSLCFDY	配列番号 57
LCDR1	SASQGISNYLN	配列番号 58
LCDR2	YTSSLHS	配列番号 59
LCDR3	QQYSKLPPT	配列番号 60

20

【0158】

これらの中で、2つの最適抗体 2H6 および 9E5 をその後の開発に供した。得られた可変領域配列をヒト抗体 IgG1 の定常領域配列にそれぞれライゲーションし、ヒト-マウスキメラ抗体配列を得、分子クローニング技術によりキメラ抗体の配列を pCP 発現ベクター (MabSpace biology Co, Ltd. より購入) に挿入した。これらの配列は、PCR による増幅後に配列決定および同定され (分子クローニングなどの分子生物学的操作手法が従来の操作条件に従って実施される。非特許文献 9 参照。)、HEK293 細胞発現系を使用して、ヒト-マウスキメラ抗体 2H6-C および 9E5-C を得ることができる。MabSelect SuRe (GE Lifesciences) アフィニティークロマトグラフィーによって精製されたキメラ抗体を特徴付けるために、種々の *in vitro* 活性アッセイを行った。データを下表に示す。

30

【0159】

キメラ抗体の *in vitro* 活性

【表 11】

キメラ抗体	ヒト CD40-his ELISA EC50 (ng/ml)	ヒト hCD40/hCD40L ELISA ブロッキング IC50 (μg/ml)	HEK293-CD40 細胞結合 EC50 (μg/ml)	Biacore 親和性 K _D (nM)
2H6-C	4.565	0.6275	0.02593	3.98
9E5-C	1.346	0.1218	0.03333	2.68
対照品 (Alligator) (hIgG1)	5.628	0.2583	0.01638	20.35
対照品 (Pfizer) (hIgG4)	3.288	0.7233	0.39650	65.9

40

【0160】

〔実施例 9 マウス抗体ヒト化実験〕

50

得られたマウス抗体 2 H 6 および 9 E 5 の典型的な V H / V L C D R 構造に基づいて、重鎖および軽鎖可変領域配列を抗体生殖系列データベースと比較して、高い相同性を有するヒト生殖系列テンプレートを得た。ここで、ヒト生殖系列軽鎖フレームワーク領域はヒト軽鎖遺伝子に由来し、本発明の抗体の軽鎖フレームワーク領域は、好ましくはヒト生殖系列軽鎖テンプレート V k 1 - 3 3 / J K 4 (2 H 6) または V k 2 - 2 8 / J K 4 (9 E 5) である。ヒト生殖細胞系重鎖フレームワーク領域はヒト重鎖に由来し、本発明の抗体の重鎖フレームワーク領域は以下に示すように、好ましくはヒト生殖細胞系重鎖テンプレート V H 1 - 6 9 / J H 6 (2 H 6) または V H 1 - 2 / J H 6 (9 E 5) である。

【 0 1 6 1 】

2 H 6 の重鎖骨格部位は、好ましくはヒト生殖系列重鎖テンプレート I G H V 1 - 6 9 (配列番号 2 1) である。

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

【 0 1 6 2 】

2 H 6 の軽鎖骨格部位は、好ましくはヒト生殖系列軽鎖テンプレート I G k V 1 - 3 3 (配列番号 2 2) である。

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

【 0 1 6 3 】

9 E 5 の重鎖骨格部位は、好ましくはヒト生殖系列重鎖テンプレート I G H V 1 - 2 (配列番号 2 3) である。

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

【 0 1 6 4 】

9 E 5 の軽鎖骨格部位は、好ましくはヒト生殖系列軽鎖テンプレート I G k V 2 - 2 8 (配列番号 2 4) である：

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

【 0 1 6 5 】

マウス抗体の C D R 領域を、選択されたヒト化テンプレート上にグラフトして、ヒト化可変領域を置換し、次いで、対応するヒト I g G 定常領域 (好ましくは、重鎖は I g G 1 であり、軽鎖は) と組換えた。次いで、マウス抗体の三次元構造に基づいて、埋め込まれた残基、C D R と直接相互作用する残基、および V L および V H のコンホメーションに重要な影響を有する残基を復帰突然変異させ、C D R 領域の化学的に不安定なアミノ酸残基を最適化して、最終的なヒト化分子を得る。その重鎖可変領域配列を配列番号 2 5 ~ 3 0 に示し、軽鎖可変領域配列を配列番号 3 1 ~ 3 6 に示す。

【 0 1 6 6 】

h u 2 H 6 - H 1 a (配列番号 2 5)

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

【 0 1 6 7 】

h u 2 H 6 - H 1 b (配列番号 2 6)

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

40

【0168】

hu2H6 - H1c (配列番号27)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSDYLI EWV RQA
PGQG LEWIGVINPGSGGSNYNEKIKDRATLTADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGGGGFTYWGQGT LVT VSS FGGQ
TKLEIK

【0169】

hu9E5 - H1a (配列番号28)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWITWV RQA
PGQG LEWMGDIHPGSGSTKYNEKFKSRVTMTVDTSISTAY
MELSR LRS EDTAVYYCARRDYWGQGT T V T V S S

10

【0170】

hu9E5 - H1b (配列番号29)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWITWV RQA
PGQG LEWMGDIHPGSGSTKYNEKFKSRVT L T V D T S I S T A Y
MELSR LRS EDTAVYYCARRDYWGQGT T V T V S S

【0171】

hu9E5 - H1c (配列番号30)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYILTTYWITWV RQA
PGQG LEWMGDIHPGSGSTKYNEKFKSRVT L T V D T S I S T A Y
MELSR LRS EDTAVYYCARRDYWGQGT T V T V S S

20

【0172】

hu2H6 - L1a (配列番号31)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKP
GKAPKLLLNFA SRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTF T I S S L Q P
EDIATYYCQQGSTLPWTFGGG TKVEIK

【0173】

hu2H6 - L1b (配列番号32)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKP
GKAPKLLLNFA SRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTF T I S S L Q P
EDIATYYCQQGSTLPWTFGGG TKVEIK

30

【0174】

hu2H6 - L1c (配列番号33)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKP
GKTIKLLLNFA SRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTF T I S S L Q P
EDIATYYCQQGSTLPWTFGGG TKVEIK

【0175】

hu9E5 - L1a (配列番号34)

DIVMTQSPPLSLPVTPEGEPASISCRSSQNI VNS QGNTYLEW
YLQKPGQSPQLLIYKVTNRFSGVPDRFSGSGSGTDF T L K I
SRVEAEDVGVYYCFQASLVPWTFGGG TKVEIK

40

【0176】

hu9E5 - L1b (配列番号35)

DVVM TQSPPLSLPVTPEGEPASISCRSSQNI VNS QGNTYLEW
YLQKPGQSPQLLIYKVTNRFSGVPDRFSGSGSGTDF T L K I
SRVEAEDVGVYYCFQASLVPWTFGGG TKVEIK

【0177】

hu9E5 - L1c (配列番号36) :

DVLM TQSPPLSLPVTPEGEPASISCRSSQNI VNS QGNTYLEW
YLQKPGQSPQLLIYKVTNRFSGVPDRFSGSGSGTDF T L K I

50

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

【0178】

最終的なヒト化 hu2H6 (H1b 重鎖および L1c 軽鎖を含む) および hu9E5 抗体分子 (H1c 重鎖および L1a 軽鎖を含む) を、上記の発現試験および軽鎖および重鎖の組み合わせの復帰突然変異の数の比較、ならびにその完全な軽鎖および重鎖配列をそれぞれ配列番号 17 ~ 20 に示すことによって選択した。

【0179】

hu2H6 HC

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

10

20

(配列番号 17)

【0180】

hu2H6 LC

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

30

(配列番号 18)

【0181】

hu9E5 HC

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

40

(配列番号 19)

【0182】

hu9E5 LC

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

50

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

(配列番号20)

【0183】

〔実施例10 ヒト化抗体試験データ〕

ヒト、アカゲザルCD40に対する本発明のヒト化抗体hu2H6、hu9E5の結合活性、ブロッキング活性等を下表に示す。結果は、本発明のヒト化抗ヒトCD40抗体のELISA結合およびブロッキング活性が陽性抗体PfizerおよびAlligatorのそれに匹敵することを示した。特に、ヒトCD40に対するhu9E5のBiacore測定親和性は陽性抗体対照品(Alligator)の9倍であり、対照品(Pfizer)の3倍であった。

10

【0184】

ヒト化hu2H6およびhu9E5抗体のIn vitro活性

【表12】

	ヒト CD40-his ELISA EC50 (ng/ml)	アカゲザル CD40-his ELISA EC50 (ng/ml)	ヒト hCD40/hCD40L ELISA ブロッキング IC50(μg/ml)	HEK293-CD40 細胞結合 EC50(μg/ml)	Biacore 親和性 K _D (M)
Hu2H6-11	3.680	2.945	0.6735	0.01538	1.120E-8
Hu9E5-25	1.650	1.661	0.3084	0.13970	5.301E-9
対照品(Alligator) (hIgG1)	1.293	1.243	0.6471	1.36200	1.66E-7
対照品(Pfizer) (hIgG4)	3.976	3.561	0.3106	0.01907	2.035E-8

20

【0185】

〔実施例11 マウスにおける腫瘍増殖に対する抗CD40抗体の阻害〕

正常なヒト末梢血を採取し、健康なヒトPBMCを密度勾配遠心分離によって単離した。CD14⁺マイクロビーズキットを用いて単球を選別し、キットに付属するプロトコールに従ってCD14⁺単球を単離した。すなわち、10⁷細胞ごとに20μlの抗CD14マイクロビーズを加え、4℃で15分間インキュベートした。次いで、細胞を磁気カラムに添加し、3回すすいだ。磁気柱内の細胞、すなわちCD14⁺単球を採取した。10ng/mlのIL4および100ng/mlのGM-CSFを含むRPMI 1640培地をCD14⁺単球に添加し、それによって単球を6日間培養し(培養法は当技術分野で一般的な方法である)、MODC細胞の誘発培養を実施した。残りの細胞にIL-2を含むRPMI 1640を添加し、培養後に懸濁細胞を回収した(培養方法および細胞回収方法はいずれも当該技術分野における従来の方法である)。CD3⁺マイクロビーズキットを用いてT細胞を選別した。6日後、MODC細胞およびCD3⁺T細胞を回収し、それぞれ1:5:20の比率でRaji細胞(上海バイオテクノロジーセルバンク研究所、10%ウシ胎仔血清を含むRPMI 1640培地中で培養)と混合し、それぞれのNOGマウス(Nanjing Galaxy Biopharma、5日間の適応給餌)に皮下接種した。実験動物を、一定の温度および湿度を有する独立した換気ボックス中に保持した。繁殖室の温度は18.0~26.0℃、湿度は40~70%、換気は10~20回/時、昼夜は12時間/12時間で切り替えた。

30

40

【0186】

実験群には、ヒトIgG1抗体対照群、hu2H6、hu9E5および参照抗体G12が含まれ、各群の用量は3mg/kgであった。各群の5匹のマウスに、週1回、6週間、3回の連続投与を行った。全実験中、ベニヤーノギスを用いて週2回腫瘍の長軸径と広軸径を測定し、腫瘍体積(mm³)=0.5×(腫瘍長軸径×腫瘍広軸径²)を算出した

50

。 相対腫瘍阻害率 TGI (%) は、 $TGI \% = (1 - T / C) \times 100 \%$ により算出した。
 T / C (%) は相対腫瘍増殖速度、すなわち、ある時点での処置群および対照群の相対腫瘍体積または腫瘍重量のパーセンテージである。T および C は、それぞれ、特定の時点における処置群および IgG1 対照群の腫瘍体積 (TV) または腫瘍重量 (TW) である。

【 0 1 8 7 】

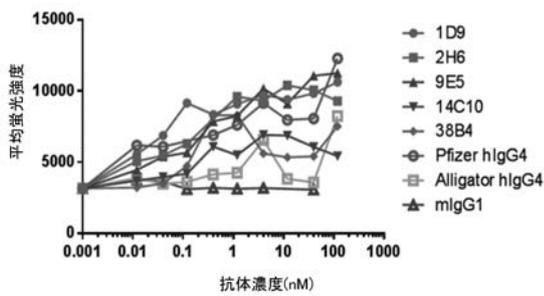
結果は、ヒト化抗 CD40 抗体 hu2H6 および hu9E5 が IgG1 対照と比較して非常に有意な抗腫瘍効果を有し、腫瘍が 21 日間の投与後にほぼ完全に排除されたことを示した； hu2H6 および hu9E5 の抗腫瘍効果は図 3 および図 4 に示されるように、参照抗体 G12 と概して同等またはわずかに良好であった。

10

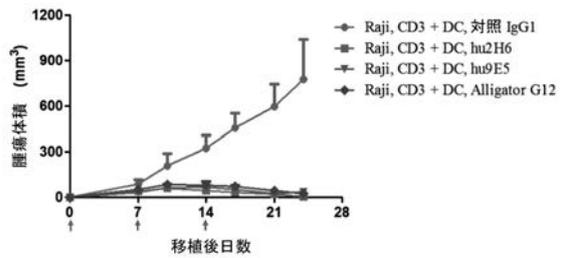
【 0 1 8 8 】

以上、本発明の具体的な実施形態について説明したが、当業者であれば、これらは単なる例示であり、本発明の原理および精神から逸脱することなく、本発明に様々な変更または修正を加えることができ、これらの均等な形態も、本出願の添付の特許請求の範囲によって定義される範囲内にあることを理解されたい。

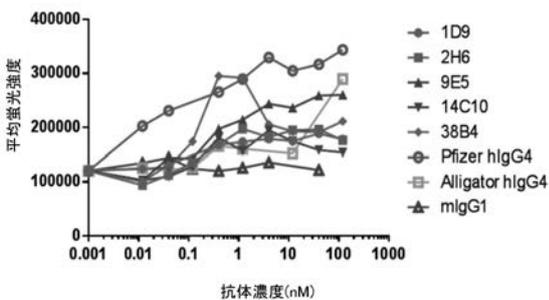
【 図 1 】



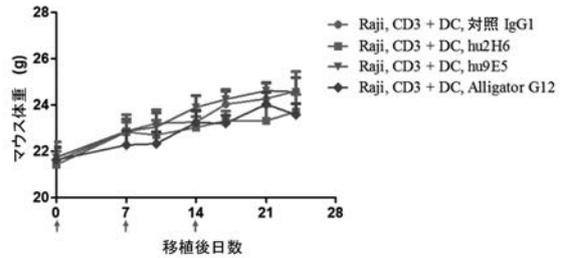
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



【配列表】

2020521504000001.app

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/089252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61K; A61P	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CNKI; DWPI; ISI Web of Science and Keyterms: 抗体, 抗原, CD40, Bp50, antibod???, antigen, etc. Genbank, EMBL, STN Registry, 中国专利生物序列检索系统和氨基酸序列, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT and amino acid sequence: SEQ ID NOS: 9-16, 37-44, etc.	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
A	CN 101508734 A (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) 19 August 2009 (2009-08-19) entire description
A	CN 102448989 A (BAYLOR RESEARCH INSTITUTE) 09 May 2012 (2012-05-09) entire description
A	CN 102918063 A (BOEHRINGER INGELHEIM CORPORATION) 06 February 2013 (2013-02-06) entire description
A	CN 1582165 A (PFIZER PRODUCTS INC. ET AL.) 16 February 2005 (2005-02-16) entire description
A	CN 104918957 A (APEXIGEN INC.) 16 September 2015 (2015-09-16) entire description
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 August 2018	05 September 2018
Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China	
Facsimile No. (86-10)62019451	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/089252

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 24
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv) – methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: claims 1-23 and 25-26 (partial), relating to an anti-CD40 antibody comprising three LCDRs and three HCDRs of the antibody 1D9 or an antigen-binding fragment thereof, a multispecific antibody, a single-chain antibody, an antibody-drug conjugate, an encoding DNA sequence thereof, an expression vector, a host cell, a pharmaceutical composition and the pharmaceutical use;
- [2] Invention 2: claims 1-23 and 25-26 (partial), relating to an anti-CD40 antibody comprising three LCDRs and three HCDRs of the antibody 2H6 or an antigen-binding fragment thereof, a multispecific antibody, a single-chain antibody, an antibody-drug conjugate, an encoding DNA sequence thereof, an expression vector, a host cell, a pharmaceutical composition and the pharmaceutical use;
- [3] Invention 3: claims 1-23 and 25-26 (partial), relating to an anti-CD40 antibody comprising three LCDRs and three HCDRs of the antibody 9E5 or an antigen-binding fragment thereof, a multispecific antibody, a single-chain antibody, an antibody-drug conjugate, an encoding DNA sequence thereof, an expression vector, a host cell, a pharmaceutical composition and the pharmaceutical use;
- [4] Invention 4: claims 1-23 and 25-26 (partial), relating to an anti-CD40 antibody comprising three LCDRs and three HCDRs of the antibody 14C10 or an antigen-binding fragment thereof, a multispecific antibody, a single-chain antibody, an antibody-drug conjugate, an encoding DNA sequence thereof, an expression vector, a host cell, a pharmaceutical composition and the pharmaceutical use; and
- [5] Invention 5: claims 1-23 and 25-26 (partial), relating to an anti-CD40 antibody comprising three LCDRs and three HCDRs of the antibody 38B4 or an antigen-binding fragment thereof, a multispecific antibody, a single-chain antibody, an antibody-drug conjugate, an encoding DNA sequence thereof, an expression vector, a host cell, a pharmaceutical composition and the pharmaceutical use;
- [6] The same or corresponding technical feature between the five groups of inventions is "murine anti-human CD40 antibody". This technical feature is already disclosed in the prior art (such as CN 1522264 A, published on August 18, 2004, see description, embodiments 3-17). Therefore, these five inventions do not share a same or corresponding special technical feature that makes a contribution over the art, and do not belong to a single general inventive concept. Therefore, the present application does not meet the requirement of unity of invention as defined in PCT Rule 13.1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/089252

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-23, 25, 26 (part)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/089252

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101508734	A	19 August 2009	AT	374214	T	15 October 2007
				DK	1391464	T3	14 January 2008
				US	2009123466	A1	14 May 2009
				CA	2658221	C	27 November 2012
				AU	2009200017	A1	05 February 2009
				US	7193064	B2	20 March 2007
				US	2007077242	A1	05 April 2007
				EP	2011802	A2	07 January 2009
				US	2004120948	A1	24 June 2004
				EP	2009027	B1	21 May 2014
				EP	2011802	A3	15 April 2009
				PT	1391464	E	15 November 2007
				CA	2658221	A1	07 November 2002
				US	7537763	B2	26 May 2009
				US	2010234578	A1	16 September 2010
				EP	2009027	A1	31 December 2008
CN	102448989	A	09 May 2012	EP	2406286	B1	18 May 2016
				MX	2011009438	A	02 April 2012
				US	2014234344	A1	21 August 2014
				JP	5653945	B2	14 January 2015
				HK	1168117	A1	26 August 2016
				AU	2010222942	A1	06 October 2011
				US	2017114142	A1	27 April 2017
				EP	2406286	A4	29 May 2013
				DK	2406286	T3	22 August 2016
				JP	2015028021	A	12 February 2015
				ES	2584956	T3	30 September 2016
				CN	102448989	B	30 September 2015
				WO	2010104761	A3	06 January 2011
				WO	2010104761	A2	16 September 2010
				CN	106432493	A	22 February 2017
				CA	2754862	A1	16 September 2010
				EP	2406286	A2	18 January 2012
				JP	2012520074	A	06 September 2012
				JP	6329842	B2	23 May 2018
				PT	2406286	T	19 August 2016
				BR	PI1009455	A2	01 March 2016
				JP	2017061463	A	30 March 2017
US	9562104	B2	07 February 2017				
US	9567401	B2	14 February 2017				
US	2010239575	A1	23 September 2010				
TW	201100099	A	01 January 2011				
AU	2010222942	B2	10 January 2013				
TW	1571264	B	21 February 2017				
AR	076106	A1	18 May 2011				
CN	102918063	A	06 February 2013	EP	2796467	A1	29 October 2014
				AP	4082	A	29 March 2017
				US	2014179907	A1	26 June 2014
				UA	107827	C2	25 February 2015
				SG	183947	A1	30 October 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/089252

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		UY 33306 A	31 October 2011
		CO 6612271 A2	01 February 2013
		LT 2796467 T	10 May 2018
		JP 2013523130 A	17 June 2013
		MX 2012011112 A	15 October 2012
		US 2015315282 A1	05 November 2015
		AP 201206457 D0	31 August 2012
		EP 2552965 A2	06 February 2013
		HR P20180542 T1	04 May 2018
		KR 101760242 B1	21 July 2017
		BR 112012024713 A2	10 January 2017
		JP 5752865 B1	22 July 2015
		GE P20166486 B	10 June 2016
		AU 2011235214 B2	23 April 2015
		NZ 602020 A	30 May 2014
		CL 2012002737 A1	15 February 2013
		IL 236740 A	30 November 2016
		PT 2796467 T	02 May 2018
		DK 2796467 T3	07 May 2018
		EP 2796467 B1	28 March 2018
		MX 340140 B	28 June 2016
		EA 201201357 A1	30 April 2013
		EP 3178851 A1	14 June 2017
		TW 1494126 B	01 August 2015
		PE 01592013 A1	10 March 2013
		KR 20130064723 A	18 June 2013
		MA 34091 B1	05 March 2013
		MY 155950 A	31 December 2015
		US 2011243932 A1	06 October 2011
		JP 2015145383 A	13 August 2015
		AU 2011235214 A1	13 September 2012
		IL 236740 D0	26 February 2015
		RS 57114 B1	29 June 2018
		ES 2665592 T3	26 April 2018
		CA 2794332 A1	06 October 2011
		US 2017058039 A1	02 March 2017
		CN 102918063 B	29 June 2016
		IL 221639 A	31 July 2016
		TW 201201836 A	16 January 2012
		SI 2796467 T1	31 May 2018
		US 8591900 B2	26 November 2013
		AR 081750 A1	17 October 2012
		US 2016222124 A1	04 August 2016
		WO 201123489 A2	06 October 2011
CN	1582165 A	16 February 2005	TN SNO4078 A1 01 June 2006
			EA 011449 B1 27 February 2009
			HU 0402247 A3 28 September 2012
			EP 1476185 B1 31 July 2013
			CA 2466128 C 29 October 2013
			JP 4616555 B2 19 January 2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/089252

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		UY 27537 A1	28 February 2003
		DO P2002000507 A	15 May 2003
		WO 03040170 A9	10 June 2004
		PL 214289 B1	31 July 2013
		PL 214634 B1	30 August 2013
		CA 2466128 A1	15 May 2003
		AP 1918 A	13 November 2008
		EG 25801 A	08 August 2012
		MA 27139 A1	03 January 2005
		TW 201034686 A	01 October 2010
		US 2003211100 A1	13 November 2003
		GT 200200228 A	26 September 2008
		CR 10878 A	12 January 2011
		SI 1476185 T1	31 December 2013
		HR P20040525 B1	02 June 2017
		TW 200306204 A	16 November 2003
		PT 1476185 E	05 November 2013
		BR 0214137 A	14 September 2004
		AU 2002356926 B2	04 January 2007
		MY 137641 A	27 February 2009
		EP 1476185 A4	04 April 2007
		KR 20050063749 A	28 June 2005
		US 2016152713 A1	02 June 2016
		EP 2343086 A2	13 July 2011
		DK 1476185 T3	14 October 2013
		RS 52484 B	28 February 2013
		IL 161823 D0	20 November 2005
		CY 1115675 T1	25 January 2017
		AP 200403034 D0	30 June 2004
		CN 103450360 B	02 November 2016
		EP 2343086 A3	22 February 2012
		CU 23745 A3	31 January 2012
		JP 5547532 B2	16 July 2014
		JP 2010213704 A	30 September 2010
		US 2009169563 A1	02 July 2009
		NO 20042388 A	09 August 2004
		GE P20074222 B	25 October 2007
		ME 00503 B	10 October 2011
		ZA 200404207 B	31 August 2005
		CN 103450360 A	18 December 2013
		US 2013024956 A1	24 January 2013
		EP 1476185 A2	17 November 2004
		US 2006093600 A1	04 May 2006
CN	104918957 A	16 September 2015	US 9994640 B2 12 June 2018
			AU 2013337903 A1 07 May 2015
			EP 2914627 A1 09 September 2015
			CA 2888763 A1 08 May 2014
			HK 1213581 A1 08 July 2016
			JP 2015533853 A 26 November 2015
			US 2014120103 A1 01 May 2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/089252

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		WO 2014070934 A1	08 May 2014
		US 9676861 B2	13 June 2017
		KR 20150079787 A	08 July 2015
		US 2017246297 A1	31 August 2017

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2018/089252
A. 主题的分类 C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61K; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS; CNKI; DWPI; ISI Web of Science和关键词:抗体, 抗原, CD40, Bp50, antibod???, antigen, 等 Genbank, EMBL, STN Registry, 中国专利生物序列检索系统和氨基酸序列: SEQ ID NO:9-16, 37-44, 等		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101508734 A (协和发酵麒麟株式会社) 2009年 8月 19日 (2009 - 08 - 19) 说明书全文	1-23, 25-26 (部分)
A	CN 102448989 A (贝勒研究院) 2012年 5月 9日 (2012 - 05 - 09) 说明书全文	1-23, 25-26 (部分)
A	CN 102918063 A (贝林格林. 英格海姆国际有限公司) 2013年 2月 6日 (2013 - 02 - 06) 说明书全文	1-23, 25-26 (部分)
A	CN 1582165 A (辉瑞产品公司等) 2005年 2月 16日 (2005 - 02 - 16) 说明书全文	1-23, 25-26 (部分)
A	CN 104918957 A (埃派斯进有限公司) 2015年 9月 16日 (2015 - 09 - 16) 说明书全文	1-23, 25-26 (部分)
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		
<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2018年 8月 20日		国际检索报告邮寄日期 2018年 9月 5日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 贾涛 电话号码 86-(010)-62411993

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告	国际申请号 PCT/CN2018/089252
第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)	
<p>根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 权利要求: 24 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即: [1] PCT实施细则39.1(iv) — 治疗人体或者动物体的外科手术或者疗法。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 权利要求: 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 权利要求: 因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。</p>	
第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)	
<p>本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:</p> <p>[1] 发明1: 权利要求1-23, 25-26(部分), 涉及包含抗体1D9的3个LCDR和3个HCDR的抗CD40抗体或其抗原结合片段、多特异性抗体、单链抗体、抗体-药物偶联物、其编码DNA序列、表达载体、宿主细胞、药物组合物及制药用途;</p> <p>[2] 发明2: 权利要求1-23, 25-26(部分), 涉及包含抗体2H6的3个LCDR和3个HCDR的抗CD40抗体或其抗原结合片段、多特异性抗体、单链抗体、抗体-药物偶联物、其编码DNA序列、表达载体、宿主细胞、药物组合物及制药用途;</p> <p>[3] 发明3: 权利要求1-23, 25-26(部分), 涉及包含抗体9E5的3个LCDR和3个HCDR的抗CD40抗体或其抗原结合片段、多特异性抗体、单链抗体、抗体-药物偶联物、其编码DNA序列、表达载体、宿主细胞、药物组合物及制药用途;</p> <p>[4] 发明4: 权利要求1-23, 25-26(部分), 涉及包含抗体14C10的3个LCDR和3个HCDR的抗CD40抗体或其抗原结合片段、多特异性抗体、单链抗体、抗体-药物偶联物、其编码DNA序列、表达载体、宿主细胞、药物组合物及制药用途; 和</p> <p>[5] 发明5: 权利要求1-23, 25-26(部分), 涉及包含抗体38B4的3个LCDR和3个HCDR的抗CD40抗体或其抗原结合片段、多特异性抗体、单链抗体、抗体-药物偶联物、其编码DNA序列、表达载体、宿主细胞、药物组合物及制药用途;</p> <p>[6] 这5项发明的相同或相应的技术特征为“鼠抗人CD40抗体”, 这一技术特征已经被现有技术公开(例如, CN1522264A, 公开日2004年08月18日, 参见说明书实施例3-17)。因此, 这5项发明不具有相同或相应的体现发明对现有技术作出贡献的特定技术特征, 不属于一个总的发明构思, 因而不满足发明单一性的要求, 不符合PCT实施细则 13.1的规定。</p>	

表 PCT/ISA/210 (第1页续页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/089252

第111栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求： 1-23, 25-26（部分）
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2018/089252			
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)	
CN	101508734	A	2009年 8月 19日	AT	374214	T	2007年 10月 15日
				DK	1391464	T3	2008年 1月 14日
				US	2009123466	A1	2009年 5月 14日
				CA	2658221	C	2012年 11月 27日
				AU	2009200017	A1	2009年 2月 5日
				US	7193064	B2	2007年 3月 20日
				US	2007077242	A1	2007年 4月 5日
				EP	2011802	A2	2009年 1月 7日
				US	2004120948	A1	2004年 6月 24日
				EP	2009027	B1	2014年 5月 21日
				EP	2011802	A3	2009年 4月 15日
				PT	1391464	E	2007年 11月 15日
				CA	2658221	A1	2002年 11月 7日
				US	7537763	B2	2009年 5月 26日
				US	2010234578	A1	2010年 9月 16日
				EP	2009027	A1	2008年 12月 31日
CN	102448989	A	2012年 5月 9日	EP	2406286	B1	2016年 5月 18日
				MX	2011009438	A	2012年 4月 2日
				US	2014234344	A1	2014年 8月 21日
				JP	5653945	B2	2015年 1月 14日
				HK	1168117	A1	2016年 8月 26日
				AU	2010222942	A1	2011年 10月 6日
				US	2017114142	A1	2017年 4月 27日
				EP	2406286	A4	2013年 5月 29日
				DK	2406286	T3	2016年 8月 22日
				JP	2015028021	A	2015年 2月 12日
				ES	2584956	T3	2016年 9月 30日
				CN	102448989	B	2015年 9月 30日
				WO	2010104761	A3	2011年 1月 6日
				WO	2010104761	A2	2010年 9月 16日
				CN	106432493	A	2017年 2月 22日
				CA	2754862	A1	2010年 9月 16日
				EP	2406286	A2	2012年 1月 18日
				JP	2012520074	A	2012年 9月 6日
				JP	6329842	B2	2018年 5月 23日
				PT	2406286	T	2016年 8月 19日
				BR	PI1009455	A2	2016年 3月 1日
				JP	2017061463	A	2017年 3月 30日
				US	9562104	B2	2017年 2月 7日
US	9567401	B2	2017年 2月 14日				
US	2010239575	A1	2010年 9月 23日				
TW	201100099	A	2011年 1月 1日				
AU	2010222942	B2	2013年 1月 10日				
TW	I571264	B	2017年 2月 21日				
AR	076106	A1	2011年 5月 18日				
CN	102918063	A	2013年 2月 6日	EP	2796467	A1	2014年 10月 29日
				AP	4082	A	2017年 3月 29日
				US	2014179907	A1	2014年 6月 26日
				UA	107827	C2	2015年 2月 25日
				SG	183947	A1	2012年 10月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2018/089252	
检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)		
		UY 33306 A	2011年 10月 31日		
		CO 6612271 A2	2013年 2月 1日		
		LT 2796467 T	2018年 5月 10日		
		JP 2013523130 A	2013年 6月 17日		
		MX 2012011112 A	2012年 10月 15日		
		US 2015315282 A1	2015年 11月 5日		
		AP 201206457 D0	2012年 8月 31日		
		EP 2552965 A2	2013年 2月 6日		
		HR P20180642 T1	2018年 5月 4日		
		KR 101760242 B1	2017年 7月 21日		
		BR 112012024713 A2	2017年 1月 10日		
		JP 5752865 B1	2015年 7月 22日		
		GE P20166486 B	2016年 6月 10日		
		AU 2011235214 B2	2015年 4月 23日		
		NZ 602020 A	2014年 5月 30日		
		CL 2012002737 A1	2013年 2月 15日		
		IL 236740 A	2016年 11月 30日		
		PT 2796467 T	2018年 5月 2日		
		DK 2796467 T3	2018年 5月 7日		
		EP 2796467 B1	2018年 3月 28日		
		MX 340140 B	2016年 6月 28日		
		EA 201201357 A1	2013年 4月 30日		
		EP 3178851 A1	2017年 6月 14日		
		TW I494126 B	2015年 8月 1日		
		PE 01592013 A1	2013年 3月 10日		
		KR 20130064723 A	2013年 6月 18日		
		MA 34091 B1	2013年 3月 5日		
		MY 155950 A	2015年 12月 31日		
		US 2011243932 A1	2011年 10月 6日		
		JP 2015145383 A	2015年 8月 13日		
		AU 2011235214 A1	2012年 9月 13日		
		IL 236740 D0	2015年 2月 26日		
		RS 57114 B1	2018年 6月 29日		
		ES 2665592 T3	2018年 4月 26日		
		CA 2794332 A1	2011年 10月 6日		
		US 2017058039 A1	2017年 3月 2日		
		CN 102918063 B	2016年 6月 29日		
		IL 221639 A	2016年 7月 31日		
		TW 201201836 A	2012年 1月 16日		
		SI 2796467 T1	2018年 5月 31日		
		US 8591900 B2	2013年 11月 26日		
		AR 081750 A1	2012年 10月 17日		
		US 2016222124 A1	2016年 8月 4日		
		WO 2011123489 A2	2011年 10月 6日		
CN	1582165 A	2005年 2月 16日	TN SN04078 A1	2006年 6月 1日	
			EA 011449 B1	2009年 2月 27日	
			HU 0402247 A3	2012年 9月 28日	
			EP 1476185 B1	2013年 7月 31日	
			CA 2466128 C	2013年 10月 29日	
			JP 4616555 B2	2011年 1月 19日	

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2016年1月)

国际检索报告 关于同族专利的信息			国际申请号 PCT/CN2018/089252	
检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)	
		UY 27537 A1	2003年 2月 28日	
		DO P2002000507 A	2003年 5月 15日	
		WO 03040170 A9	2004年 6月 10日	
		PL 214289 B1	2013年 7月 31日	
		PL 214634 B1	2013年 8月 30日	
		CA 2466128 A1	2003年 5月 15日	
		AP 1918 A	2008年 11月 13日	
		EG 25801 A	2012年 8月 8日	
		MA 27139 A1	2005年 1月 3日	
		TW 201034686 A	2010年 10月 1日	
		US 2003211100 A1	2003年 11月 13日	
		GT 200200228 A	2008年 9月 26日	
		CR 10878 A	2011年 1月 12日	
		SI 1476185 T1	2013年 12月 31日	
		HR P20040525 B1	2017年 6月 2日	
		TW 200306204 A	2003年 11月 16日	
		PT 1476185 E	2013年 11月 5日	
		BR 0214137 A	2004年 9月 14日	
		AU 2002356926 B2	2007年 1月 4日	
		MY 137641 A	2009年 2月 27日	
		EP 1476185 A4	2007年 4月 4日	
		KR 20050063749 A	2005年 6月 28日	
		US 2016152713 A1	2016年 6月 2日	
		EP 2343086 A2	2011年 7月 13日	
		DK 1476185 T3	2013年 10月 14日	
		RS 52484 B	2013年 2月 28日	
		IL 161823 D0	2005年 11月 20日	
		CY 1115675 T1	2017年 1月 25日	
		AP 200403034 D0	2004年 6月 30日	
		CN 103450360 B	2016年 11月 2日	
		EP 2343086 A3	2012年 2月 22日	
		CU 23745 A3	2012年 1月 31日	
		JP 5547532 B2	2014年 7月 16日	
		JP 2010213704 A	2010年 9月 30日	
		US 2009169563 A1	2009年 7月 2日	
		NO 20042388 A	2004年 8月 9日	
		GE P20074222 B	2007年 10月 25日	
		ME 00603 B	2011年 10月 10日	
		ZA 200404207 B	2005年 8月 31日	
		CN 103450360 A	2013年 12月 18日	
		US 2013024956 A1	2013年 1月 24日	
		EP 1476185 A2	2004年 11月 17日	
		US 2006093600 A1	2006年 5月 4日	
		US 9994640 B2	2018年 6月 12日	
		AU 2013337903 A1	2015年 5月 7日	
		EP 2914627 A1	2015年 9月 9日	
		CA 2888763 A1	2014年 5月 8日	
		HK 1213581 A1	2016年 7月 8日	
		JP 2015533853 A	2015年 11月 26日	
		US 2014120103 A1	2014年 5月 1日	
CN	104918957 A	2015年 9月 16日		

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/089252

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		WO 2014070934 A1	2014年 5月 8日
		US 9676861 B2	2017年 6月 13日
		KR 20150079787 A	2015年 7月 8日
		US 2017246297 A1	2017年 8月 31日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2016年1月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

- (71) 出願人 516174208
上海恒瑞医薬有限公司
SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD
中華人民共和国 200245 上海市閔行区文井路 279 号
NO. 279 WENJING ROAD, MINHANG DISTRICT, SHANGHAI 200245, CHINA
- (74) 代理人 110001818
特許業務法人 R & C
- (72) 発明者 ヤン, シュウド
中国 ジャンス 222047 リエンユンガン エコノミック・アンド・テクノロジカル・ディ
ヴェロップメント・ゾーン クンルンシャン・ロード ナンバー 7
- (72) 発明者 ジャン, ジャフア
中国 ジャンス 222047 リエンユンガン エコノミック・アンド・テクノロジカル・ディ
ヴェロップメント・ゾーン クンルンシャン・ロード ナンバー 7
- (72) 発明者 フー, チューエ
中国 シャンハイ 200245 ミンハン・ディストリクト エコノミック・アンド・テクノ
ロジカル・ディヴェロップメント・ゾーン ウェンジン・ロード ナンバー 279
- (72) 発明者 ジャン, リャンシャン
中国 ジャンス 222047 リエンユンガン エコノミック・アンド・テクノロジカル・ディ
ヴェロップメント・ゾーン クンルンシャン・ロード ナンバー 7
- (72) 発明者 ツァオ, グオチン
中国 ジャンス 222047 リエンユンガン エコノミック・アンド・テクノロジカル・ディ
ヴェロップメント・ゾーン クンルンシャン・ロード ナンバー 7
- (72) 発明者 チェン, シュエミン
中国 ジャンス 222047 スジョウ インダストリアル・パーク シンフー・ストリート
ナンバー 218 バイオベイ ビー 6 501
- (72) 発明者 テン, フェイ
中国 ジャンス 222047 スジョウ インダストリアル・パーク シンフー・ストリート
ナンバー 218 バイオベイ ビー 6 501

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA05

4B065 AA26X AA77X AA91X AA92Y AA93X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25
CA44
4C076 AA95 CC27 EE59 FF70
4C085 AA14 BB31 CC22 EE01 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA28 FA74 GA26