

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5421590号  
(P5421590)

(45) 発行日 平成26年2月19日(2014.2.19)

(24) 登録日 平成25年11月29日(2013.11.29)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C O 7 K 16/28	(2006.01)	C O 7 K 16/28	
G O 1 N 33/48	(2006.01)	G O 1 N 33/48	P
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53	Y

請求項の数 33 (全 77 頁)

(21) 出願番号	特願2008-512518 (P2008-512518)	(73) 特許権者	504389991
(86) (22) 出願日	平成18年5月18日(2006.5.18)		ノバルティス アーゲー
(65) 公表番号	特表2008-539791 (P2008-539791A)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
(43) 公表日	平成20年11月20日(2008.11.20)		35
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/019325	(73) 特許権者	500570793
(87) 国際公開番号	W02006/125117		ゾーマ テクノロジー リミテッド
(87) 国際公開日	平成18年11月23日(2006.11.23)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 947
審査請求日	平成21年5月15日(2009.5.15)		10, バークレー, セブンス ストリ
(31) 優先権主張番号	60/682,575		ート 2910
(32) 優先日	平成17年5月18日(2005.5.18)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/749,336	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成17年12月9日(2005.12.9)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
微生物の受託番号	ATCC PTA-5542		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫および／または炎症性成分を有する疾患の診断および治療のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗CD40治療剤での治療に対して応答性である炎症性疾患または自己免疫疾患を有する被験者を同定するのを補助するための方法であって、該方法が、以下：

- a) テスト用生物学的サンプルと有効量の該抗CD40治療剤とを接触させる工程；
- b) 該テスト用生物学的サンプル中の少なくとも1つのバイオマーカーのレベルを検出する工程であって、ここで、該バイオマーカーは、

(i) 細胞アポトーシスのバイオマーカーであって、該アポトーシスのバイオマーカーが、切断されたカスパーゼタンパク質、切断されたポリADP-リボースポリメラーゼ(PARP)、ホスファチジルセリン(PS)の細胞表面発現、ゲノムDNAフラグメント化およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、細胞アポトーシスのバイオマーカー；

(ii) CD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のバイオマーカーであって、該CD40L媒介性CD40シグナル伝達経路が、AKTシグナル伝達経路、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路、およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)シグナル伝達経路からなる群から選択され、そして、該CD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のバイオマーカーが、ホスホ-P13K、ホスホ-PDK1、ホスホ-AKT、ホスホ-MEK、ホスホ-ERK、ホスホ-p38、ホスホ-IKK /  $\gamma$ 、ホスホ-IBタンパク質、および活性化NF- $\kappa$ Bからなる群から選択される、CD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のバイオマーカー；および

( i i i ) 細胞生存のバイオマーカーであって、該細胞生存のバイオマーカーが、 B c l - 2 ファミリーメンバーである抗アポトーシスタンパク質、 I A P アポトーシス阻害剤タンパク質、および T N F 受容体関連因子 - 1 ( T R A F - 1 ) からなる群から選択される、細胞生存のバイオマーカー  
からなる群から選択される、工程；ならびに

c ) 該テスト用生物学的サンプル中の該少なくとも1つのバイオマーカーのレベルと、コントロール用生物学的サンプル中で検出される該少なくとも1つのバイオマーカーのレベルとを比較する工程であって、ここで、該コントロール用生物学的サンプルは、該抗 C D 4 0 治療剤と接触されていない、工程

を含み、ここで、該テスト用生物学的サンプルおよび該コントロール用生物学的サンプルは該被験者由来であり、ここで、該テスト用生物学的サンプルおよび該コントロール用生物学的サンプルは、 C D 4 0 リガンドで刺激された C D 4 0 発現細胞を含み、ここで、該コントロール用生物学的サンプルと比較した、該テスト用生物学的サンプル中の

( i ) 該アポトーシスのバイオマーカーのうちの少なくとも1つのレベルの上昇；および/または

( i i ) 該 C D 4 0 L 媒介性 C D 4 0 シグナル伝達経路のうちの少なくとも1つのバイオマーカーのうちの少なくとも1つのレベルの低下；および/または

( i i i ) 該細胞生存のバイオマーカーのうちの少なくとも1つのレベルの低下が、該抗 C D 4 0 治療剤での治療から恩恵を受ける被験者を示す、方法。

【請求項2】

前記 C D 4 0 発現細胞が、前記接触させる工程よりも前に、 C D 4 0 のリガンドを用いてエクスピボで刺激される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

C D 4 0 の前記リガンドが、可溶性 C D 4 0 L および膜結合 C D 4 0 L からなる群から選択される、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

C D 4 0 発現細胞に関連する炎症性疾患または自己免疫疾患についての被験者の治療における抗 C D 4 0 治療剤の効果をモニタリングするのを補助するための方法であって、該方法が、以下：

a ) ベースライン生物学的サンプル中の少なくとも1つのバイオマーカーのレベルを検出する工程であって、ここで、該ベースライン生物学的サンプルは、1用量の該抗 C D 4 0 治療剤を投与する前である該被験者由来であり、ここで、該ベースライン生物学的サンプルは C D 4 0 発現細胞を含み、ここで、該バイオマーカーは、

( i ) 細胞アポトーシスのバイオマーカーであって、該アポトーシスのバイオマーカーが、切断されたカパーゼタンパク質、切断されたポリ A D P - リボースポリメラーゼ ( P A R P ) 、 ホスファチジルセリン ( P S ) の細胞表面発現、ゲノム D N A フラグメント化およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、細胞アポトーシスのバイオマーカー；

( i i ) C D 4 0 L 媒介性 C D 4 0 シグナル伝達経路のバイオマーカーであって、該 C D 4 0 L 媒介性 C D 4 0 シグナル伝達経路が、 A K T シグナル伝達経路、 N F - B シグナル伝達経路、およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ ( M A P K ) シグナル伝達経路からなる群から選択され、そして、該 C D 4 0 L 媒介性 C D 4 0 シグナル伝達経路のバイオマーカーが、ホスホ - P I 3 K 、 ホスホ - P D K 1 、 ホスホ - A K T 、 ホスホ - M E K 、 ホスホ - E R K 、 ホスホ - p 3 8 、 ホスホ - I K K / 、 ホスホ - I B タンパク質、および活性化 N F - B からなる群から選択される、 C D 4 0 L 媒介性 C D 4 0 シグナル伝達経路のバイオマーカー；および

( i i i ) 細胞生存のバイオマーカーであって、該細胞生存のバイオマーカーが、 B c l - 2 ファミリーメンバーである抗アポトーシスタンパク質、 I A P アポトーシス阻害剤タンパク質、および T N F 受容体関連因子 - 1 ( T R A F - 1 ) からなる群から選択される、細胞生存のバイオマーカー

10

20

30

40

50

からなる群から選択される、工程；

b) 少なくとも1つの引き続いての生物学的サンプル中の該少なくとも1つのバイオマーカーのレベルを検出する工程であって、ここで、該少なくとも1つの引き続いての生物学的サンプルは、該抗CD40治療剤の投与後の該被験者由来である、工程；ならびに

c) 該少なくとも1つの引き続いてのサンプル中の該少なくとも1つのバイオマーカーのレベルと、該ベースライン生物学的サンプル中の該少なくとも1つのバイオマーカーのレベルとを比較し、そして該少なくとも1つのバイオマーカーのレベルの変化と治療効果とを関連付ける工程、

を含み、ここで、該ベースライン生物学的サンプルと比較した、該引き続いての生物学的サンプル中の

10

(i) 該アポトーシスのバイオマーカーのうちの少なくとも1つのレベルの上昇；および/または

(ii) 該CD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のうちの少なくとも1つのバイオマーカーのうちの少なくとも1つのレベルの低下；および/または

(iii) 該細胞生存のバイオマーカーのうちの少なくとも1つのレベルの低下が、該抗CD40治療剤での治療の効果を示す、方法。

【請求項5】

前記被験者は、1用量の前記抗CD40治療剤が投与されている、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

20

前記被験者は、複数用量の前記抗CD40治療剤が投与されている、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記抗CD40治療剤が、ヒトB細胞の表面上で発現されたヒトCD40抗原へ特異的に結合し得るアンタゴニスト抗CD40モノクローナル抗体であり、該モノクローナル抗体は、該B細胞の表面上に発現された該CD40抗原へ結合される際に顕著なアゴニスト活性を有さない、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記抗CD40治療剤が、CD40/CD40L相互作用またはCD40L媒介性CD40シグナル伝達を阻害するCD40リガンド(CD40L)アンタゴニストである、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項9】

前記CD40Lアンタゴニストが、CD40Lへ特異的に結合する抗CD40Lモノクローナル抗体、CD40の可溶性形態、CD40を含む融合タンパク質の可溶性形態、および医薬品からなる群から選択される、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記切断されたカスパーゼタンパク質が、切断されたカスパーゼ3、切断されたカスパーゼ7、および切断されたカスパーゼ9からなる群から選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

40

細胞表面PSがアネキシンV染色によって検出され、そしてゲノムDNAフラグメント化がTUNEL染色によって検出される、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

前記MAPKシグナル伝達経路が、MEK/ERKシグナル伝達経路およびMEK/p38シグナル伝達経路からなる群から選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記Bcl-2ファミリーメンバーがBcl-xlおよびMcl-1からなる群から選択される、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

50

前記 I A P アポトーシス阻害剤タンパク質が、サバイビン、X I A P、および c I A P 1 からなる群から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記テスト用生物学的サンプルおよび前記コントロール用生物学的サンプル中において、C D 4 0 シグナル伝達の少なくとも 1 つのサイトカインマーカのレベルを検出する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法、または前記引き続いての生物学的サンプルおよび前記ベースライン生物学的サンプル中において、C D 4 0 シグナル伝達のうちの少なくとも 1 つのサイトカインマーカのレベルを検出する工程をさらに含む、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記サイトカインマーカが、血管内皮増殖因子 ( V E G F )、インターロイキン ( I L ) - 6、I L - 8、I L - 1 0、顆粒球単球コロニー刺激因子 ( G M - C S F )、腫瘍壊死因子 - ( T N F - )、単球走化性タンパク質 - 1 ( M C P - 1 )、およびマクロファージ炎症性タンパク質 - 1 ( M I P - 1 ) からなる群から選択される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記コントロール用生物学的サンプルと比較した前記テスト用生物学的サンプル中の前記サイトカインマーカの少なくとも 1 つのレベルの低下が、前記抗 C D 4 0 治療剤での治療から恩恵を受ける被験者を示すか、または前記ベースライン生物学的サンプルと比較した前記引き続いての生物学的サンプル中の前記サイトカインマーカのうちの少なくとも 1 つのレベルの低下が、前記抗 C D 4 0 治療剤での治療の効果を示す、請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記抗 C D 4 0 治療剤が、C D 4 0 発現細胞の表面上に発現されたヒト C D 4 0 抗原へ特異的に結合し、その結果、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性 ( A D C C ) 活性を調節する抗 C D 4 0 モノクローナル抗体であり、そして前記バイオマーカがアポトーシスのバイオマーカである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記コントロール用生物学的サンプルと比較した前記テスト用生物学的サンプル中の前記アポトーシスのバイオマーカの少なくとも 1 つのレベルの上昇が、前記抗 C D 4 0 抗体での治療から恩恵を受ける被験者を示すか、または前記ベースライン生物学的サンプルと比較した前記引き続いての生物学的サンプル中の前記アポトーシスのバイオマーカのうちの少なくとも 1 つのレベルの上昇が、該抗 C D 4 0 抗体での治療の効果を示す、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記引き続いての生物学的サンプルおよび前記ベースライン生物学的サンプル中において、該引き続いての生物学的サンプルおよび該ベースライン生物学的サンプル中の C D 4 0 発現細胞における、細胞表面 C D 4 0、細胞表面 C D 4 0 L、ならびに細胞表面 C D 4 0 および細胞表面 C D 4 0 L の両方からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D 4 0 関連因子の発現のレベルを検出する工程をさらに含み、ここで、該ベースライン生物学的サンプルと比較した該引き続いての生物学的サンプル中の該 C D 4 0 関連因子のうちの少なくとも 1 つの発現レベルの低下が、該抗 C D 4 0 治療剤での治療の効果を示す、請求項 4 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

血液または血液成分のベースラインサンプルおよび血液または該血液成分の引き続いてのサンプルを前記被験者から回収する工程、ならびに該ベースラインサンプルおよび該引き続いてのサンプル中の循環可溶性 C D 4 0 または循環可溶性 C D 4 0 L のレベルを検出する工程をさらに含み、ここで、該ベースラインサンプルと比較した該引き続いてのサンプル中の該循環可溶性 C D 4 0 または循環可溶性 C D 4 0 L のうちの少なくとも 1 つの発現のレベルの低下が、該抗 C D 4 0 治療剤での治療の効果を示す、請求項 4 ~ 6 のいずれ

10

20

30

40

50

か 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記被験者の生物学的サンプル中において、該生物学的サンプル中の CD 4 0 発現細胞における、細胞表面 CD 4 0 の発現レベル、細胞表面 CD 4 0 L の発現レベル、または両方を検出する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 3】

被験者から回収された生物学的サンプル中の循環可溶性 CD 4 0 または循環可溶性 CD 4 0 L のレベルを検出する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記バイオマーカーのレベルを検出する工程が、バイオマーカータンパク質発現を検出するために抗体を使用することを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記バイオマーカーのレベルを検出する工程が、核酸ハイブリダイゼーションを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記バイオマーカーのレベルを検出する工程が、定量 RT - PCR を行うことを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記抗 CD 4 0 治療剤が、以下：

a) 配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に示されるヒト CD 4 0 配列の残基 8 2 ~ 8 7 を含むエピトープへ結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；

b) 配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に示されるヒト CD 4 0 配列の残基 8 2 ~ 8 9 を含むエピトープへ結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；ならびに

c) 競合的結合アッセイにおいて、特許寄託番号 P T A - 5 5 4 2 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体 C H I R - 5 . 9 または特許寄託番号 P T A - 5 5 4 3 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体 C H I R - 1 2 . 1 2 と競合するモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；

からなる群から選択されるアンタゴニスト抗 CD 4 0 モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記抗 CD 4 0 治療剤が、以下：

a) 配列番号 2 の相補性決定領域 ( C D R ) 残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 4 の相補性決定領域 ( C D R ) 残基を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；または

b) 配列番号 6 の相補性決定領域 ( C D R ) 残基を含む軽鎖可変ドメインと、配列番号 7 の相補性決定領域 ( C D R ) 残基を含む重鎖可変ドメインとを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント

である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記抗体またはその抗原結合性フラグメントが、以下：

a) 配列番号 2 ；

b) 配列番号 4 ；

c) 配列番号 5 ；

d) 配列番号 2 および配列番号 4 ；

e) 配列番号 2 および配列番号 5 ；

f) 配列番号 6 ；

g) 配列番号 7 ；

10

20

30

40

50

- h) 配列番号 8 ;
- i) 配列番号 6 および配列番号 7 ; ならびに
- j) 配列番号 6 および配列番号 8

から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記抗体またはその抗原結合性フラグメントが、以下：

a) 配列番号 2 に示される可変領域および定常領域の配列を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；

b) 配列番号 4 に示される可変領域および定常領域の配列を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；

c) 配列番号 5 に示される可変領域および定常領域の配列を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；

d) 配列番号 2 に示される可変領域および定常領域の配列と配列番号 4 に示される可変領域および定常領域の配列を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；

e) 配列番号 2 に示される可変領域および定常領域の配列と配列番号 5 に示される可変領域および定常領域の配列を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；

f) 配列番号 6 に示される可変領域および定常領域の配列を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；

g) 配列番号 7 に示される可変領域および定常領域の配列を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；

h) 配列番号 8 に示される可変領域および定常領域の配列を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；

i) 配列番号 6 に示される可変領域および定常領域の配列と配列番号 7 に示される可変領域および定常領域の配列を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；ならびに

j) 配列番号 6 に示される可変領域および定常領域の配列と配列番号 8 に示される可変領域および定常領域の配列を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント；

から選択される、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記抗 CD 40 治療剤が、特許寄託番号 P T A - 5 5 4 2 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体 C H I R - 5 . 9 もしくはその抗原結合性フラグメント、または、特許寄託番号 P T A - 5 5 4 3 として A T C C に寄託されたハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体 C H I R - 1 2 . 1 2 もしくはその抗原結合性フラグメントである、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

前記フラグメントが、F a b フラグメント、F ( a b ' ) <sub>2</sub> フラグメント、F v フラグメント、および単鎖 F v フラグメントからなる群から選択される、請求項 27 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

前記炎症性疾患または自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス ( S L E )、円盤状ループス、ループス腎炎、サルコイドーシス、若年性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、ライター症候群、強直性脊椎炎、痛風性関節炎、臓器または組織移植片の拒絶、対宿主性移植片病、多発性硬化症、高 I g E 症候群、結節性多発性動脈炎、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患、クローン病、セリアック病 ( グルテン過敏性腸症 )、自己免疫性肝炎、悪性貧血、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、強皮症、重症筋無力症、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性甲状腺炎、グレーヴズ病、橋本甲状腺炎、免疫複合体病、慢性疲労

10

20

30

40

50

免疫機能障害症候群（CFIDS）、多発性筋炎および皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、血栓溶解、心筋症、尋常性天疱瘡、間質性肺線維症、サルコイドーシス、I型およびII型糖尿病、1、2、3および4型遅延型過敏症、アレルギーまたはアレルギー性障害、ぜん息、チャグ-ストラウス症候群（アレルギー性肉芽腫症）、アトピー性皮膚炎、アレルギー性および刺激性接触皮膚炎、じんま疹、IgE媒介性アレルギー、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、特発性炎症性ミオパシー、溶血性疾患、アルツハイマー病、ならびに慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシーからなる群から選択される、請求項1～32のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

（発明の分野）

本発明は、診断および予測医学の分野、より詳細には、異常なCD40シグナル伝達に関連する自己免疫および/または炎症性成分を有する疾患の治療における治療剤の効果を測定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

（発明の背景）

腫瘍壊死因子（TNF）ファミリーのリガンドの多くのメンバーおよびそれらの対応する受容体が、アポトーシスを誘導するかまたは細胞生存および増殖を増強することによって正常細胞の増殖を調節する。正常な細胞恒常性を維持するのは、アポトーシスシグナルと生存および増殖シグナルとの間のこのバランスである。少なくとも26のTNFファミリー受容体および18のTNFファミリーリガンドが、現在まで同定された。前記受容体およびリガンドの両方の生物学的に活性な形態は、自己組織化タンパク質三量体である。前記受容体およびリガンドの両方の膜貫通性および可溶性の形態が、同定された。前記受容体の細胞内ドメインは配列相同性を共有しないが、それらの細胞外ドメインは40のアミノ酸システインリッチな繰り返しを含む。それらの細胞質尾部は、細胞内タンパク質の2つの主要なグループ、TNF受容体関連因子（TRAF）およびデスドメイン（DD）含有タンパク質と相互作用することによって、シグナル伝達する。これらの受容体のいくつかの細胞質尾部における少なくとも6つのヒトTRAFおよびTRAF結合部位の間の相互作用は、AKT（プロテインキナーゼBまたはPKBと呼ばれるセリン/トレオニンキナーゼ）、核因子- $\kappa$ B（NF- $\kappa$ B）、およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）を含む、いくつかのシグナル伝達経路を開始させる。例えば、非特許文献1による概説を参照のこと。

20

30

【0003】

TNFファミリー受容体メンバーCD40は、正常および新生物性の両方のヒトB細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、CD8<sup>+</sup>T細胞、内皮細胞、ならびに単球性および上皮細胞の表面上に存在する50-55kDa細胞表面抗原である。CD40抗原はまた、活性化T細胞、活性化血小板、炎症を起こした血管平滑筋細胞、好酸球、関節リウマチ中の滑膜、皮膚線維芽細胞および他の非リンパ球様細胞タイプ上において発現される。

40

【0004】

細胞発現CD40のタイプに依存して、連結反応は、細胞間接着、分化、活性化および増殖を誘導し得る。例えば、その同族リガンド（*cognate ligand*）であるCD40L（CD154とも呼ばれる）へのCD40の結合は、B細胞増殖および形質細胞への分化、抗体産生、アイソタイプスイッチング、およびB細胞記憶産生（*B-cell memory generation*）を刺激する。B細胞分化の間、CD40は、プレB細胞上に発現されるが、形質細胞への分化の際に失われる。

【0005】

CD154としても公知であるCD40リガンド（CD40L）は、2つの類似の生物学的に活性な可溶性形態（それぞれ、18kDaおよび31kDa）でも存在する32-

50

33 kDa 膜貫通タンパク質である（非特許文献 2；非特許文献 3；非特許文献 4）。CD40L は、休止しているものではなく活性化された CD4<sup>+</sup>T-ヘルパー細胞上において発現される（非特許文献 5；非特許文献 6；および非特許文献 7）。CD40 および CD40L の両方がクローン化およびキャラクタライズされた（非特許文献 8；非特許文献 9；非特許文献 10；および非特許文献 11）。ヒト CD40L を記載する特許文献 1 も参照のこと。CD40L 遺伝子がトランスフェクトされそしてそれらの表面上に CD40L タンパク質を発現する細胞は、B 細胞増殖を誘導し得、そして他の刺激性シグナルと一緒に、抗体産生を誘導し得る（非特許文献 9（上述）；および特許文献 1）。自己免疫疾患を有する患者は、健常者には見られない高い血清レベルの可溶性 CD40L（sCD40L）を有する。CD40L の過剰発現は、げっ歯類モデルにおいて全身性エリテマトーデスに類似する自己免疫疾患を引き起こす（非特許文献 12）。対照的に、活性化 T 細胞上に官能性 CD40L が存在しないことは、X 連鎖高 IgM 症候群を引き起こす（非特許文献 13；および非特許文献 14）。さらに、CD40 / CD40L 相互作用を遮断することは、非ヒト霊長類モデルにおいて移植片拒絶を予防し得る。例えば、非特許文献 15 を参照のこと。

10

#### 【0006】

APC における CD40 発現は、これらの細胞の活性化において重要な共刺激役割を果たす。例えば、アゴニスト性抗 CD40 モノクローナル抗体（mAb）が、B 細胞活性化における T ヘルパー細胞（T helper cells）の効果を模倣すると示された。Fc RII を発現する接着細胞に提示されると、これらの抗体は B 細胞増殖を誘導する（非特許文献 16）。さらに、アゴニスト性抗 CD40 mAb は、IL-4 の存在下での IgM、IgG および IgE の分泌について T ヘルパーシグナルに取って代わり得る（非特許文献 17）。さらに、アゴニスト性抗 CD40 mAb は、リンパ節から単離された B 細胞のプログラム細胞死（アポトーシス）を防止し得る。

20

#### 【0007】

これらおよび他の観察が、CD40 および CD40L の相互作用が液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を調節することにおいて極めて重要な役割を果たすという現在の説を支持している。より最近の研究は、多様な生理学および病理学的プロセスにおける CD40 / CD40L 相互作用の遙かにより広い役割を明らかにした。

#### 【0008】

CD40 シグナル変換経路は、多くの細胞内因子の協調的調節に依存する。TNF 受容体ファミリーの他のメンバーと同様に、CD40 は、TRAF-1、TRAF-2、-3、-5 および -6 を含む TRAF を活性化し、これらは、細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）、c-jun アミノ末端キナーゼ（JNK）、p38 MAPK および NF- $\kappa$ B を含む CD40L（膜結合 CD40L または可溶性 CD40L のいずれか）と CD40 との結合に続いて多様なシグナル伝達経路をアップレギュレートする（例えば、非特許文献 18；非特許文献 19 を参照のこと）。

30

#### 【0009】

CD40 を介してのシグナル伝達は、アポトーシスから細胞死を防止することが示された（非特許文献 20）。アポトーシスシグナルは、協調してプログラム細胞死を誘導するために必要である。細胞死シグナルは、小胞体ストレス等の細胞内からの内因性刺激、あるいは FasL または TNF の受容体結合等の外因性刺激を含み得る。シグナル伝達経路は、複雑であり、カスパーゼ 3 およびカスパーゼ 9 等のカスパーゼならびにポリ（ADP リボース）ポリメラーゼ（PARP）の活性化を含む。前記カスケードの間、抗アポトーシスシグナル伝達タンパク質（例えば、Mcl-1 および Bcl-x）ならびに IAP ファミリーのタンパク質のメンバー（例えば、X 連鎖アポトーシス阻害剤（X-Linked Inhibitor of Apoptosis）（XIAP））が、ダウンレギュレートされる（非特許文献 21）。例えば、樹上細胞において、CD40 細胞シグナル伝達は、FasL によって変換されたアポトーシスシグナルを遮断し得る（非特許文献 22）。

40

50

## 【 0 0 1 0 】

したがって、CD40LによるCD40結合および引き続いてのCD40シグナル伝達活性化は、正常な免疫応答に必要な工程である；しかし、CD40シグナル伝達の調節異常は、疾患へ導き得る。CD40シグナル伝達経路は、自己免疫疾患に關与することが示された（非特許文献23および非特許文献24）。さらに、CD40/CD40L相互作用は、炎症性プロセスにおいて重要な役割を果たす。例えば、CD40およびCD40Lの両方が、ヒトおよび実験的アテローム性動脈硬化症病巣において過剰発現される。CD40刺激は、内皮細胞、平滑筋細胞およびマクロファージ等のアテローム関連細胞タイプにおいてマトリクス分解酵素の発現および組織因子発現を誘導する。さらに、CD40刺激は、血管内皮増殖因子（VEGF）、IL-1、IL-6およびIL-8等の炎症性サイトカインならびにICAM-1、E-セレクトリンおよびVCAM等の接着分子の産生を誘導する。CD40/CD40L相互作用の阻害は、動物モデルにおいてアテローム発生を防止する。移植片モデルにおいて、CD40/CD40L相互作用を遮断することは、炎症を防止する。CD40/CD40L結合は、アルツハイマーアミロイドベータペプチドと相乗的に作用し、ミクログリア活性化を促進し、それによって神経毒性に至ることが示された。

10

## 【 0 0 1 1 】

関節リウマチ（RA）を有する患者において、CD40発現が関節軟骨細胞において増加され、したがって、CD40シグナル伝達は、有害なサイトカインおよびマトリクスメタロプロテアーゼの産生に恐らく寄与する。非特許文献25を参照のこと。さらに、滑膜の炎症反応の増幅が、RA患者由来のCD14<sup>+</sup>滑膜細胞上でのCD40の連結反応によるMAPKおよびNF- $\kappa$ Bの活性化によって生じることが示された（非特許文献26）。RAの実験モデルにおいて、抗CD40L抗体治療は、疾患誘導、関節の炎症および抗コラーゲン抗体産生を防止した（非特許文献27）。最後に、臨床試験において、Rituxan（登録商標）（一般的には細胞リンパ腫の治療に適應される）を投与することによりRA患者からCD20<sup>+</sup>陽性B細胞を激減させることが、症状を改善することが示された（非特許文献28）。

20

## 【 0 0 1 2 】

T細胞への抗原の提示の間にCD40/CD40L相互作用を遮断することはまた、T細胞耐性を誘導すると示された。したがって、CD40/CD40L相互作用を遮断することは、初期T細胞活性化を防止し、かつ、該抗原への再暴露に対する長期耐性を誘導する。

30

## 【 0 0 1 3 】

正常な免疫の維持におけるCD40L媒介性CD40シグナル伝達の重要な役割を考慮すると、CD40シグナル伝達を標的にする治療レジメンに応答性である自己免疫および/または炎症性疾患を有する個人を同定するための方法が必要とされる。

【特許文献1】米国特許第5,945,513号明細書

【非特許文献1】YounesおよびKadin、J. Clin. Oncol. 2003年、18:3526-3534

【非特許文献2】Grafら、Eur. J. Immunol. 1995年、25:1749-1754

40

【非特許文献3】Mazzeiら、J. Biol. Chem. 1995年、270:7025-7028

【非特許文献4】Pietravalleら、J. Biol. Chem. 1996年、271:5965-5967

【非特許文献5】Laneら、Eur. J. Immunol. 1992年、22:2573-2578

【非特許文献6】Spriggsら、J. Exp. Med. 1992年、176:1543-1550

【非特許文献7】Royら、J. Immunol. 1993年、151:1-14

50

- 【非特許文献8】Stamenkovič, EMBO J. 1989年、8:1403-1410
- 【非特許文献9】Armitage, Nature, 1992年、357:80-82
- 【非特許文献10】Lederman, J. Exp. Med. 1992年、175:1091-1101
- 【非特許文献11】Hollenbaugh, EMBO J. 1992年、11:4313-4321
- 【非特許文献12】Higuchi, J. Immunol. 2002年、168:9-12
- 【非特許文献13】Allen, Science, 1993年、259:990 10
- 【非特許文献14】Korthauer, Nature, 1993年、361:539
- 【非特許文献15】Wee, Transplantation, 1992年、53:501-507
- 【非特許文献16】Banchereau, Science, 1989年、251:70
- 【非特許文献17】Gascan, J. Immunol. 1991年、147:8
- 【非特許文献18】YounesおよびCarbone, Int. J. Biol. Markers, 1999年、14:135-143
- 【非特許文献19】van KootenおよびBanchereau, J. Leukoc. Biol. 2000年、67:2-17 20
- 【非特許文献20】Makus, J. Immunol. 2002年、14:973-982
- 【非特許文献21】Budihardjo, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 1999年、15:269-290
- 【非特許文献22】Björck, Intl. Immunol. 1997年、9:365-372
- 【非特許文献23】Ichikawa, J. Immunol. 2002年、169:2781-2787
- 【非特許文献24】Moore, J. Autoimmun. 2002年、19:139-145 30
- 【非特許文献25】Gotoh, J. Rheumatol. 2004年、31:1506-1512
- 【非特許文献26】Harigai, Arthritis. Rheum. 2004年、50:2167-2177
- 【非特許文献27】Durie, Science, 1993年、261:1328-1330
- 【非特許文献28】Shaw, Ann. Rheum. Dis. 2003年、62(Suppl. 2):ii55-ii59
- 【発明の開示】
- 【課題を解決するための手段】 40
- 【0014】
- (発明の要旨)
- CD40L媒介性シグナル伝達を調節するおよび/または抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を調節するものを含む、抗CD40治療剤から恩恵を受ける炎症性疾患および/または自己免疫疾患を有する被験者を同定するための方法が提供される。このような抗CD40治療剤としては、CD40/CD40L相互作用、特にCD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するかまたはこれに干渉するアンタゴニスト抗CD40抗体、アンタゴニスト抗CD40L抗体、および医薬、ならびに、さらに、または代わりに、作用機序としてADCC活性を有するアンタゴニスト抗CD40抗体が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態において、該方法は、目的の1またはそれ以上の抗CD 50

40 治療剤に対するエクスピボ細胞性応答をモニターするための、細胞アポトーシス、細胞増殖および生存のバイオマーカーの使用を含む。これらのエクスピボ予測アッセイは、以下を含む：候補被験者由来のテスト用生物学的サンプルおよびコントロール用生物学的サンプルを提供すること、ここで、これらの生物学的サンプルは、インビボまたはエクスピボで、CD40リガンドで刺激されたCD40発現細胞を含む；該テスト用生物学的サンプルと目的の抗CD40治療剤とを接触させること；該テスト用生物学的サンプル中の少なくとも1つのバイオマーカーの発現レベルを検出すること；ならびに、該バイオマーカーの発現レベルと、目的の抗CD40治療剤と接触されていない該コントロール用生物学的サンプル中において検出された対応の発現レベルとを比較すること。これらのエクスピボ予測アッセイにおける使用のためのバイオマーカーとしては、抗CD40治療剤の作用機序に依存して、細胞アポトーシスのバイオマーカー、CD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のバイオマーカーおよび細胞増殖または生存のバイオマーカーを含む、その発現レベルが治療介入に対する反応性の予測指標であるタンパク質および/または遺伝子が挙げられる。抗CD40治療剤がCD40L媒介性CD40シグナル伝達の崩壊によるその作用機序を有する場合、細胞アポトーシス、CD40L媒介性CD40シグナル伝達経路および細胞増殖または生存のバイオマーカーが、これらのエクスピボ予測アッセイにおいて使用され得る。ある実施形態において、CD40L媒介性CD40シグナル伝達の追加のマーカがアッセイされ得、これらとしては、CD40L-CD40相互作用によってアップレギュレートされるサイトカイン、例えば、血管内皮増殖因子(VEGF)、インターロイキン(IL)-6、IL-8、IL-10、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)、およびマクロファージ炎症性タンパク質-1(MIP-1)が挙げられるが、これらに限定されない。抗CD40治療剤がADCCによるその作用機序を有する場合、抗CD40抗体、細胞アポトーシスのバイオマーカーが、これらのエクスピボ予測アッセイにおいて使用され得る。

#### 【0015】

本発明の他の実施形態において、抗CD40治療剤での介入から恩恵を受ける個人または個人の部分母集団を予測する1またはそれ以上のCD40関連因子の発現レベルについて、候補被験者をスクリーニングする。したがって、1実施形態において、候補被験者、例えば、自己免疫および/または炎症性成分を含む疾患を有する被験者から回収された生物学的サンプルが、生物学的サンプルの細胞上における細胞表面CD40抗原の発現レベル、生物学的サンプルの細胞上における細胞表面CD40Lの発現レベル、可溶性CD40(sCD40)の循環レベル、および可溶性CD40L(sCD40L)の循環レベルからなる群から選択される1またはそれ以上のCD40関連因子について、スクリーニングされる。これらのCD40関連因子は、前記疾患の予測指標であり得、そして、抗CD40治療剤の作用機序に関わらず、抗CD40治療剤での治療介入に応答するかまたは応答しない被験者を同定するためにさらに使用され得る。コントロールまたは参照標準と比較した場合、生物学的サンプル中の1またはそれ以上のこれらのCD40関連因子の増加された発現レベルは、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を調節するか、ADCCを調節するか、または両方を調節する抗CD40治療剤での治療介入から恩恵を受ける個人を示す。このスクリーニング法で同定された候補被験者は、目的の抗CD40治療剤で治療され得るか、または、本明細書中に記載されるエクスピボ予測アッセイを使用して抗CD40治療剤に対する応答性についてさらにスクリーニングされ得る。

#### 【0016】

なお他の実施形態において、他のクラスの治療剤では結果の悪い予後を有するが抗CD40治療剤での介入から恩恵を受ける候補被験者の部分母集団を規定するために、1またはそれ以上の臨床的に有用な予測マーカーの有無について、候補被験者がスクリーニングされる。この様式において、候補被験者から回収された生物学的サンプルが、その作用機序がCD40標的化またはCD40L媒介性CD40シグナル伝達によるものではない、現在の治療剤では結果の悪い予後を示すことが公知である1またはそれ以上の臨床的に有用な予測マーカーについてスクリーニングされる。所定の自己免疫または炎症性疾患につ

10

20

30

40

50

いての任意の臨床的に有用な予測マーカーが、該スクリーニング法において含まれ得る。このスクリーニング法で同定された部分母集団中の候補被験者は、本明細書中で記載されるエクスピボ予測アッセイを使用して、抗CD40治療剤に対する応答性についてさらにスクリーニングされ得る。

【0017】

本発明はまた、炎症性疾患または自己免疫疾患を有する被験者の治療における抗CD40治療剤の効果をモニタリングするための方法を提供する。この様式において、本明細書中に開示されるエクスピボ予測アッセイを使用して前もってスクリーニングされていてもまたはされていなくてもよい、抗CD40治療剤での治療を受ける被験者は、細胞アポトーシス、細胞増殖および生存の少なくとも1つのバイオマーカーの発現のインビボ変化、ならびに/あるいは該抗CD40治療剤での治療に続いての1またはそれ以上のCD40L媒介性CD40シグナル伝達経路についてモニタリングされる。アッセイされる特定のバイオマーカーは、上述の治療剤の作用機序に基づいて選択され得る。あるいは、またはさらに、該被験者は、該抗CD40治療剤での治療に続いての、細胞上における細胞表面CD40抗原、細胞上における細胞表面CD40L、sCD40の循環レベル、およびsCD40Lの循環レベルからなる群から選択される1またはそれ以上のCD40関連因子の発現レベルのインビボ変化について、モニタリングされ得る。この様式において、第1の生物学的サンプルが被験者から得られ、そしてアッセイされる各因子についてのベースライン発現レベルを得るためにこれらのバイオマーカーおよび/またはCD40関連因子の1またはそれ以上の発現レベルについてアッセイされ、そして次いで1またはそれ以上の引き続いての(subsequent)生物学的サンプルが該被験者から得られ、そして同一のバイオマーカーおよび/またはCD40関連因子についてアッセイされ、ここで該引き続いての生物学的サンプルは、目的の抗CD40治療剤の少なくとも1回の投薬量の投与に続いて得られる。モニタリングは、抗CD40治療剤が被験者に投与される任意の所定の治療プロトコルの効果を確かめるために、期間中の1点でまたは期間中の複数点で行われ得る。アッセイされるバイオマーカーに依存して、任意の2つの時点の間のバイオマーカーの発現レベルの低下または増加は、炎症性疾患または自己免疫疾患の治療における抗CD40治療剤の効果を示し得る。モニタリングによって1またはそれ以上のCD40関連因子の発現レベルの低下が明らかとなった場合、このような結果は、炎症性疾患または自己免疫疾患の治療における抗CD40治療剤の効果を示し得る。

【0018】

生物学的サンプル中におけるこれらの種々のバイオマーカーおよびCD40関連因子ならびに任意の臨床的に有用な予測マーカーの発現レベルは、例えば、免疫組織化学技術または核酸ベースの技術(例えば、インサイチュハイブリダイゼーションおよびRT-PCR)を使用して、タンパク質レベルまたは核酸レベルで検出され得る。ある実施形態において、少なくとも1つのバイオマーカーの発現の上昇されたレベルまたは増加は、抗CD40治療剤での治療に対してポジティブな治療応答を示す。他の実施形態において、少なくとも1つのバイオマーカーの発現の低下されたレベルまたは減少は、抗CD40治療剤での治療に対してポジティブな治療応答を示す。

【0019】

本発明の方法は、全身性エリテマトーデス(SLE)、円盤状ループス(discoid lupus)、ループス腎炎、サルコイドーシス、若年性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、ライター症候群、強直性脊椎炎、痛風性関節炎、臓器または組織移植片の拒絶、対宿主性移植片病、多発性硬化症、高IgE症候群、結節性多発性動脈炎、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患、クローン病、セリアック病(グルテン過敏性腸症)、自己免疫性肝炎、悪性貧血、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、強皮症、重症筋無力症、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、免疫複合体病、慢性疲労免疫機能障害症候群(CFIDS)、多発性筋炎および皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、血栓溶解、心筋症、尋常性天疱瘡、間質性肺線維症(pulmonary interstitial fibrosis)、サルコイドーシス、I型およびII型

10

20

30

40

50

糖尿病、1、2、3および4型遅延型過敏症、アレルギーまたはアレルギー性障害 (allergic disorders)、ぜん息、チャグ-ストラウス症候群 (アレルギー性肉芽腫症)、アトピー性皮膚炎、アレルギー性および刺激性接触皮膚炎、じんま疹 (urticaria)、IgE媒介性アレルギー (IgE-mediated allergy)、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、特発性炎症性ミオパシー (idiopathic inflammatory myopathies)、溶血性疾患、アルツハイマー病、ならびに慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー等が挙げられるが、これらに限定されない、自己免疫および/または炎症性成分を含む疾患を予防、改善または治療することにおいて抗CD40治療介入が有益である被験者を同定するために使用され得る。

#### 【0020】

(発明の詳細な説明)

本発明は、ADCCを調節するか、CD40シグナル伝達、特に、CD40とCD40リガンド (CD40L) との相互作用によって媒介されるCD40シグナル伝達経路に干渉するか、または両方を行う、CD40受容体を標的にする抗CD40治療剤での治療から恩恵を受ける炎症性疾患または自己免疫疾患を有する被験者を同定するための方法に関する。1実施形態において、該方法は、CD40L媒介性CD40シグナル伝達に関連する3つのクラスのバイオマーカー、特に、細胞増殖または生存および細胞アポトーシス経路のバイオマーカー、ならびに重要なCD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のバイオマーカー (AKT、NF- $\kappa$ B、およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) シグナル伝達経路を含む) の発現レベルに対する、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するかまたはこれに干渉するアンタゴニスト抗CD40治療剤の効果モニタリングするための、エクスピボ予測アッセイの使用を含む。CD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するかまたはこれに干渉するアンタゴニスト抗CD40治療剤の効果モニタリングするために役立つ追加のマーカーとしては、本明細書下記において記載されるような、CD40L媒介性CD40シグナル伝達によってアップレギュレートされるサイトカインが挙げられる。細胞アポトーシス経路についてのバイオマーカーも、ADCCを調節する抗CD40治療剤、例えば、作用機序としてADCCを有する抗CD40抗体の効果モニタリングするために役立つ。 「CD40アンタゴニスト」と本明細書中で呼ばれる、CD40シグナル伝達のアンタゴニストとして作用する治療剤は、CD40受容体へのCD40Lの結合によって通常誘導される1またはそれ以上のシグナル伝達合図に干渉し得る。本発明のエクスピボ予測アッセイは、CD40を標的にしかつADCCを調節するCD40アンタゴニストおよび治療剤での介入から恩恵を受ける被験者と、これらのタイプの治療剤での介入が有益ではない被験者とを区別するために使用され得る。候補被験者は、さらに、または代わりに、CD40L媒介性CD40シグナル伝達および/またはADCCを調節する抗CD40治療剤での治療介入から恩恵を受ける候補被験者の個人または部分母集団を規定するために、1以上のCD40関連因子および/または1以上の臨床的に有用な予測マーカーの有無、あるいは上昇または低下されたレベルについて、スクリーニングされ得る。これらのスクリーニング方法において同定された被験者は、本明細書中で記載されるエクスピボ予測アッセイを使用して、さらにスクリーニングされ得る。本明細書中で記載されるバイオマーカーおよびCD40関連因子はまた、CD40シグナル伝達および/またはADCCを調節する抗CD40治療剤での治療の効果モニタリングすることにおいて、ならびに炎症性疾患または自己免疫疾患を有する患者の部分母集団または個人患者における薬物応答性について原因を解明することにおいて使用される。

#### 【0021】

「CD40抗原」、「CD40細胞表面抗原」、「CD40受容体」、または「CD40」によって、腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体ファミリーに属する膜貫通糖タンパク質が意図される (例えば、米国特許第5,674,492号および第4,708,871号; Stamenkovic et al. (1989) EMBO 8:1403; Clark (1990) Tissue Antigens 36:33; Barclay e

10

20

30

40

50

t al. (1997) The Leucocyte Antigen Facts Book (2d ed.; Academic Press, San Diego)を参照のこと)。この遺伝子の選択的スプライシングされた転写物変異体によってコードされる、ヒトCD40の2つのアイソフォームが、同定された。第1のアイソフォーム(「ロングアイソフォーム」または「アイソフォーム1」としても公知)は、277アミノ酸前駆体ポリペプチド(配列番号11(GenBankアクセッション番号X60592およびNM\_001250を参照のこと)によってコードされる、配列番号12(初めはGenBankアクセッション番号CAA43045と報告され、そしてアイソフォーム1(GenBankアクセッション番号NP\_001241)と同定された)として発現され、これはまた、最初の19残基によって示されるシグナル配列を有する。第2のアイソフォーム(「ショートアイソフォーム」または「アイソフォーム2」としても公知)は、203アミノ酸前駆体ポリペプチド(配列番号9(GenBankアクセッション番号NM\_152854)によってコードされる、配列番号10(GenBankアクセッション番号NP\_690593))として発現され、これはまた、最初の19残基によって示されるシグナル配列を有する。ヒトCD40のこれら2つのアイソフォームの前駆体ポリペプチドは、それらの最初の165残基(即ち、配列番号10および配列番号12の残基1-165)を共通して共有する。ショートアイソフォームの前駆体ポリペプチド(配列番号10に示される)は、コードセグメントを欠いている転写物変異体(配列番号9)によってコードされ、これは、翻訳フレームシフトへ導き;得られるCD40アイソフォームは、CD40のロングアイソフォームに含まれるもの(配列番号12の残基166-277に示されるC末端)と比べて短くかつ異なるC末端(配列番号10の残基166-203)を含む。本発明の目的について、用語「CD40抗原」、「CD40細胞表面抗原」、「CD40受容体」または「CD40」は、CD40のショートアイソフォームおよびロングアイソフォームの両方を含む。

#### 【0022】

CD40抗原は、本明細書中の他のところに記載されるような、種々の細胞タイプの表面上に提示される。「表面上に提示される」および「表面上に発現される」によって、CD40抗原の全てまたは一部が細胞の外部へ暴露される。提示または発現されるCD40抗原は、完全にまたは部分的にグリコシル化され得る。

#### 【0023】

「アゴニスト活性」によって、物質がアゴニストとして作用することが意図される。アゴニストは、細胞上の受容体と結合し、そして該受容体の天然リガンドによって開始されるものに類似するかまたはこれと同一である反応または活性を開始する。例えば、CD40のアゴニストは、以下に限られないが、以下の応答のいずれかまたは全てを誘導する:細胞増殖および/または分化;ICAM-1、E-セレクトリン、VCAM等の分子を介しての細胞間接着のアップレギュレーション;VEGF、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF等の炎症性サイトカインの分泌;TRAF(例えば、TRAF-1、TRAF2、TRAF3)、MAPキナーゼ(例えば、NIK(NF- $\kappa$ B誘導キナーゼ)、I- $\kappa$ Bキナーゼ(IKK / ))、転写因子NF- $\kappa$ B、Ras等の経路ならびにMEK/ERK経路、PI3K/AKT経路、P38MAPK経路等によるCD40受容体を介してのシグナル変換;XIAP、Mcl-1、Bcl-x等の分子による抗アポトーシスシグナルの変換;Bおよび/またはT細胞記憶産生(memory generation);B細胞抗体産生;B細胞アイソタイプスイッチング、II型MHCおよびCD80/86の細胞表面発現のアップレギュレーション等。

#### 【0024】

「アンタゴニスト活性」によって、物質がアンタゴニストとして作用することが意図される。例えば、CD40のアンタゴニストは、アゴニストリガンド(特に、CD40L)へのCD40受容体の結合によって誘導される応答のいずれかの誘導を防止または減少させる。アンタゴニストは、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、好ましくは40%、45%、50%、55%、60%、より好ましくは70%、80%、8

10

20

30

40

50

5%、そして最も好ましくは90%、95%、99%または100%、アゴニスト結合に対する応答のいずれか1つまたはそれ以上の誘導を減少させ得る。抗CD40治療剤(例えば、抗CD40抗体)のアンタゴニスト活性およびCD40リガンド結合特異性を測定するための方法は、当業者に公知であり、そして標準競合的結合アッセイ、B細胞による免疫グロブリン分泌をモニタリングするためのアッセイ、B細胞増殖アッセイ、Banc hereau様B細胞増殖アッセイ、抗体産生についてのT細胞ヘルパーアッセイ(T cell helper assays)、B細胞増殖共刺激アッセイ、およびB細胞活性化マーカーのアップレギュレーションについてのアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、WO00/75348および米国特許第6,087,329号に開示されるアッセイを参照のこと。また、2003年11月4日、2003年11月26日、および2004年4月27日に出願され、そしてそれぞれ米国特許出願第60/517,337号(代理人整理番号PP20107.001(035784/258442))、第60/525,579号(代理人整理番号PP20107.002(035784/271525))、および第60/565,710号(代理人整理番号PP20107.003(035784/277214))が割り当てられた「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」という表題の仮出願、ならびに2004年11月4日に出願され、そしてWO2005/044854として公開された「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」という表題が再び付けられた国際特許出願第PCT/US2004/037152号(代理人整理番号PP20107.004(035784/282916))を参照のこと;これらの各々の内容は、それら全体が、参照により本明細書中に組み込まれる。

#### 【0025】

「顕著な」アゴニスト活性によって、B細胞応答アッセイにおいて測定される場合の、中性物質またはネガティブコントロールによって誘導されるアゴニスト活性よりも少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%高いアゴニスト活性が意図される。好ましくは、「顕著な」アゴニスト活性は、B細胞応答アッセイにおいて測定される場合の、中性物質またはネガティブコントロールによって誘導されるアゴニスト活性よりも少なくとも2倍高いまたは少なくとも3倍高いアゴニスト活性である。したがって、例えば、目的のB細胞応答がB細胞増殖である場合、「顕著な」アゴニスト活性は、中性物質またはネガティブコントロールによって誘導されるB細胞増殖のレベルよりも少なくとも2倍高いまたは少なくとも3倍高いB細胞増殖のレベルの誘導である。1実施形態において、CD40へ結合しない非特異的免疫グロブリン(例えば、IgG1)が、ネガティブコントロールとして役立つ。「顕著なアゴニスト活性を有さない」物質は、B細胞応答アッセイ等のバイオアッセイにおいて測定される場合の、中性物質またはネガティブコントロールによって誘導されるアゴニスト活性よりも約25%以下より高い、好ましくは、中性物質またはネガティブコントロールによって誘導されるアゴニスト活性よりも約20%以下より高い、15%以下より高い、10%以下より高い、5%以下より高い、1%以下より高い、0.5%以下より高い、または約0.1%以下より高いアゴニスト活性を示す。

#### 【0026】

本発明のある実施形態において、抗CD40治療剤は、アンタゴニスト抗CD40抗体である。このような抗体は、ヒト細胞上のCD40抗原へ結合される場合に、上述の顕著なアゴニスト活性を有さない。本発明の1実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体は、1細胞性応答において顕著なアゴニスト活性を有さない。本発明の別の実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体は、2以上の細胞性応答(例えば、増殖および分化、または増殖、分化、および、B細胞について、抗体産生)のアッセイにおいて顕著なアゴニスト活性を有さない。本発明のある実施形態において、目的の抗CD40治療剤は、本明細書以下で記載されるような、完全なヒトモノクローナル抗体CHIR-12.

12またはCHIR-5.9、あるいはその抗原結合性フラグメントである。

【0027】

当該分野において公知のアッセイのいずれかが、抗CD40治療剤が1以上のB細胞応答のアンタゴニストとして作用するかどうかを測定するために使用され得る。ある実施形態において、治療剤は、B細胞増殖、B細胞分化、抗体産生、細胞間接着、B細胞記憶産生(B cell memory generation)、アイソタイプスイッチング、II型MHCおよびCD80/86の細胞表面発現のアップレギュレーション、ならびにVEGF、IL-8、IL-12およびTNF等の炎症性サイトカインの分泌からなる群から選択される少なくとも1つのB細胞応答のアンタゴニストとして作用する抗CD40抗体である。特に興味深いのは、ヒトB細胞の表面上のヒトCD40抗原へ結合される際に、B細胞増殖に関して顕著なアゴニスト活性を有さないアンタゴニスト抗CD40抗体である。

10

【0028】

1つのこのような実施形態において、抗CD40抗体は、本明細書以下の実施例4に記載されるもののようなB細胞増殖アッセイにおいて測定されるB細胞増殖のアンタゴニストであり、そしてアンタゴニスト抗CD40抗体は、中性物質またはネガティブコントロールによって誘導されるB細胞増殖よりも約25%以下より高い、好ましくは、中性物質またはネガティブコントロールによって誘導されるB細胞増殖よりも約20%以下より高い、15%以下より高い、10%以下より高い、5%以下より高い、1%以下より高い、0.5%以下より高い、または約0.1%以下より高いレベルでB細胞増殖を刺激する。

20

【0029】

他の実施形態において、前記抗CD40抗体は、別のCD40抗体(例えば、本明細書以下の実施例4に記載されるもののようなB細胞増殖アッセイにおいて測定されるS2C6抗CD40抗体)によって誘導されるB細胞増殖のアンタゴニストであり、そして該アンタゴニスト抗CD40抗体の存在下において他の抗CD40抗体によって刺激されるB細胞増殖のレベルは、該アンタゴニスト抗CD40抗体の非存在下において他の抗CD40抗体によって誘導されるB細胞増殖の約25%以下(即ち、少なくとも75%阻害)、好ましくは、該アンタゴニスト抗CD40抗体の非存在下において他の抗CD40抗体によって誘導されるB細胞増殖の約20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、1%以下、0.5%以下、または約0.1%以下である。

30

【0030】

なお他の実施形態において、抗CD40抗体は、本明細書以下の実施例4に記載のB細胞活性アッセイにおいて測定される細胞株EL4B5によって誘導されるB細胞増殖のアンタゴニストであり、そして該アンタゴニスト抗CD40抗体の存在下においてEL4B5によって刺激されるB細胞増殖のレベルは、該アンタゴニスト抗CD40抗体の非存在下においてこの細胞株によって誘導されるB細胞増殖の約25%以下(即ち、少なくとも75%阻害)、好ましくは、該アンタゴニスト抗CD40抗体の非存在下においてこの細胞株によって誘導されるB細胞増殖の約20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、1%以下、0.5%以下、または約0.1%以下である。

【0031】

なお他の実施形態において、抗CD40抗体は、本明細書以下の実施例4に記載されるB細胞による抗体産生についてのヒトT細胞ヘルパーアッセイ(human T-cell helper assay)において測定されるヒトB細胞によるヒトT細胞誘導抗体産生のアンタゴニストである。この様式において、該アンタゴニスト抗CD40抗体の存在下においてT細胞によって刺激されるB細胞によるIgG抗体産生、IgM抗体産生、またはIgGおよびIgMの両方の抗体産生のレベルは、該アンタゴニスト抗CD40抗体の非存在下においてT細胞によって刺激されるB細胞によるそれぞれの抗体産生の約50%以下(即ち、少なくとも75%阻害)、好ましくは、該アンタゴニスト抗CD40抗体の非存在下においてT細胞によって刺激されるB細胞によるそれぞれの抗体産生の約25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、5%以下、1%以下、0.5%以

40

50

下、または約 0.1% 以下である。

【0032】

「CD40リガンド」によって、1またはそれ以上のCD40シグナル伝達経路に結合しそしてこれを活性化し得る任意のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質が意図される。したがって、「CD40リガンド」としては、全長CD40リガンドタンパク質、ならびにCD40発現細胞上における結合およびCD40シグナル伝達刺激の作用を行うに十分な活性を保持するそれらの変異体およびフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。天然CD40リガンド、例えば、ヒトCD40リガンド(CD40L; CD154としても公知)に対する修飾としては、置換、欠失、切断、伸長、融合タンパク質、フラグメント、ペプチド模倣物等が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のある実施形態において、エクスピボ予測アッセイは、生物学的サンプルのCD40発現細胞上におけるCD40シグナル伝達を刺激するための、可溶性CD40L、例えば、可溶性組換えヒトCD40L(Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK)の使用を含む。

10

【0033】

「CD40L媒介性CD40シグナル伝達」によって、細胞表面受容体CD40とCD40リガンドとの相互作用から生じる生物学的活性のいずれもが意図される。CD40シグナル伝達の例は、CD40発現細胞の増殖および生存、ならびにCD40発現細胞中の1以上のCD40シグナル伝達経路の刺激へ導くシグナルである。CD40「シグナル伝達経路」または「シグナル変換経路」は、CD40受容体とCD40リガンド(例えば、CD40L)との相互作用から生じ、そして、該シグナル経路介して伝達された場合に、該シグナル伝達カスケードにおいて1以上の下流の分子(downstream molecules)の活性化へ導くシグナルを発生させる、少なくとも1つの生化学反応、または一群の生化学反応を意味するように意図される。シグナル変換経路は、細胞表面CD40受容体から原形質膜を横切って、そして一連のシグナル変換分子中の1以上を介して、細胞の細胞質を介して、そして場合によっては、細胞の核への、シグナルの伝達へ導く多数のシグナル変換分子を含む。本発明に特に興味深いのは、AKTシグナル伝達経路(これは、AKTの活性化、および最終的にNF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路を介してのNF- $\kappa$ Bの活性化へ導く); およびマイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)シグナル伝達経路(それぞれERKおよびp38の活性化へ導く、MEK/ERKシグナル伝達経路およびMEK/p38シグナル伝達経路を含む)を含む、CD40シグナル変換経路である。これらのシグナル伝達経路の活性化と遮断とのバランスは、本明細書以下で記載される細胞生存またはアポトーシスのいずれかを好む。

20

30

【0034】

本発明の方法は、エクスピボ予測アッセイ、および、検出工程において、またはこれらのエクスピボ予測アッセイにおいて検査される候補抗CD40治療剤として、抗体を使用する、予測アッセイに関する。以下の用語および定義は、このような抗体に適用される。

【0035】

「抗体」および「免疫グロブリン」(Ig)は、同一の構造的特徴を有する糖タンパク質である。これらの用語は同意語として使用される。場合によっては、免疫グロブリンの抗原特異性が知られているかもしれない。

40

【0036】

用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、そして完全に組み合わされた抗体、抗原へ結合し得る抗体フラグメント(例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、一本鎖抗体、ダイアボディ、キメラ抗体(antibody chimeras)、ハイブリッド抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体等)、ならびに前述のものを含む組換えペプチドを網羅する。

【0037】

用語「モノクローナル抗体」および「mAb」は、本明細書中で使用される場合、抗体の実質的に均一な母集団から得られた抗体をいい、即ち、該母集団を含む該個々の抗体は

50

、少量で存在し得る可能な自然に生じる突然変異を除いて同一である。

【0038】

「天然抗体」および「天然免疫グロブリン」は、通常、2本の同一の軽(L)鎖および2本の同一の重(H)鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖へ連結されており、一方、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なっている。重鎖および軽鎖はまた一定間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、1つの末端に変域ドメイン(V<sub>H</sub>)、それに続く多数の定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端に変域ドメイン(V<sub>L</sub>)および他方の末端に定常ドメインを有し；軽鎖の定常領域は、重鎖の第1の定常領域と並んでおり、軽鎖の変域ドメインは重鎖の変域ドメインと並んでいる。特定のアミノ酸残基は、軽鎖変域ドメインと重鎖変域ドメインとの間の界面を形成していると考えられている。

10

【0039】

用語「可変」は、変域ドメインの特定部分が抗体間で配列が(in sequence)広範囲に異なるという事実をいう。可変領域は、抗原結合特異性を与える。しかし、可変性は、抗体の変域ドメインにわたって均等には分配されていない。それは、軽鎖変域ドメインおよび重鎖変域ドメインの両方において、相補性決定領域(CDR)または超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中される。変域ドメインのより高度に保存される部分は、フレームワーク(FR)領域にある。天然の重鎖および軽鎖の可変領域は、各々、4つのFR領域を含み、大部分は、3つのCDRによって連結された、プリーツシート立配置を採用し、これらは、ループ連結を形成し、そして場合によっては、該プリーツシート構造の一部を形成する。各鎖中のCDRは、FR領域によって近位に保持されており、そして他の鎖からのCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al. (1991) NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, pages 647-669を参照のこと)。定常領域は、抗体が抗原へ結合する際に直接関与せず、しかし、Fc受容体結合、抗体依存性細胞毒性における抗体の沈降、補体依存性細胞傷害の開始、およびマスト細胞脱顆粒等の、種々のエフェクター機能を示す。

20

【0040】

用語「超可変領域」は、本明細書中で使用される場合、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基(即ち、軽鎖変域ドメインにおける残基24-34(L1)、50-56(L2)、および89-97(L3)、ならびに重鎖変域ドメインにおける31-35(H1)、50-65(H2)、および95-102(H3); Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD)ならびに/あるいは「超可変ループ」由来のそれらの残基(即ち、軽鎖変域ドメイン中の残基26-32(L1)、50-52(L2)、および91-96(L3)、ならびに重鎖変域ドメイン中の(H1)、53-55(H2)、および96-101(H3); Clothia and Lesk, (1987) J. Mol. Biol., 196:901-917)を含む。「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書中で考えられるように、超可変領域残基とは異なる変域ドメイン残基である。

30

40

【0041】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の部分、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合性または可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab<sub>2</sub>、およびFvフラグメント；ダイアボディ；線形抗体(Zapata et al. (1995) Protein Eng. 10:1057-1062)；一本鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられる。抗体のパパイン消化によって、各々が単一の抗原結合性部位を有する、「Fab」フラグメン

50

トと呼ばれる、2つの同一の抗原結合性フラグメントと、その名称が容易に結晶化するその能力を反映する残基「Fc」フラグメントとが作製される。ペプシン処理によって、2つの抗原結合性部位を有しかつ依然として抗原を架橋し得るF(ab')<sub>2</sub>フラグメントが作製される。

【0042】

「Fv」は、完全な抗原認識および結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、堅い非共有性結合での、1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインからなる。各可変ドメインの3つのCDRが相互作用してV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二量体の表面上に抗原結合部位を規定するのは、この立体配置である。集散的に、6つのCDRは、抗体へ抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン（または、抗原について特異的である3つのみのCDRを含むFvの半分）でさえ、全結合部位よりも低い親和性であるが、抗原を認識しそしてこれに結合する能力を有する。

10

【0043】

Fabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン(C<sub>H</sub>1)を含む。Fabフラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の1以上のシステインを含む重鎖C<sub>H</sub>1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基を加えることによって、Fab'フラグメントとは相違している。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有するFab'についての本明細書中での表示である。Fab'フラグメントは、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントの重鎖ジスルフィド架橋を還元することによって作製される。抗体フラグメントの他の化学的カップリングはまた公知である。

20

【0044】

任意の脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ( )およびラムダ( )と呼ばれる、2つの明確に異なるタイプの1つへ帰属され得る。

【0045】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは、異なるクラスへ帰属され得る。ヒト免疫グロブリンの5つの主要なクラス、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMが存在し、そして、これらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2へさらに分割され得る。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元立体配置は、周知である。異なるアイソタイプは、異なるエフェクター機能を有する。例えば、ヒトIgG1およびIgG3アイソタイプは、ADCC（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害）活性を有する。

30

【0046】

用語「標識」は、本明細書中で使用される場合、「標識化」抗体を作製するように抗体へ直接的にまたは間接的に結合される検出可能な化合物または組成物をいう。標識は、それ自体で検出可能であってもよく（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、または、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学的变化を触媒し得る。

【0047】

「宿主細胞」は、本明細書中で使用される場合、組換えベクターまたは他のトランスファーポリヌクレオチドについてのレシピエントとして使用され得るかまたは使用された微生物または真核細胞または単細胞体として培養された細胞株をいい、そしてトランスフェクトされた元々の細胞の子孫を含む。単一細胞の子孫は、自然な、偶然の、または意図的な突然変異に起因して、元々の親とは形態学的にまたはゲノムもしくはトータルDNA補体的に必ずしも完全に同一ではないかもしれないと理解される。

40

【0048】

「ヒトエフェクター細胞」は、1以上のFcRを発現し、そしてエフェクター機能を行う白血球である。好ましくは、該細胞は、少なくともFcRIIIを発現し、そして抗原依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）エフェクター機能を行う。ADCCを媒介する

50

ヒト白血球の例としては、末梢血単核細胞（P B M C）、ナチュラルキラー（N K）細胞、単球、マクロファージ、好酸球および好中球が挙げられ、P B M CおよびN K細胞が好ましい。A D C C活性を有する抗体は、典型的に、I g G 1またはI g G 3アイソタイプのものである。I g G 1およびI g G 3抗体を単離することに加えて、このようなA D C C媒介性抗体は、非A D C C抗体由来の可変領域または可変領域フラグメントをI g G 1またはI g G 3アイソタイプ定常領域へ工作することによって作製され得ることに注意のこと。

【0049】

用語「F c受容体」または「F c R」は、抗体のF c領域へ結合する受容体を記載するために使用される。好ましいF c Rは、天然配列ヒトF c Rである。しかし、好ましいF c Rは、I g G抗体へ結合するもの（受容体）であり、そしてF c R I、F c 7 R I IおよびF c R I I Iサブクラスの受容体（これらの受容体の対立遺伝子多型およびあるいはスプライスされた形態を含む）を含む。F c R I I受容体は、その細胞質ドメインが主に相違する類似のアミノ酸配列を有する、F c R I I A（「活性化受容体」）およびF c R I I B（「阻害受容体」）を含む。活性化受容体F c R I I Aは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（I T A M）を含む。阻害受容体F c R I I Bは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベース阻害モチーフ（I T I M）を含む（Daeron（1997）Annu. Rev. Immunol. 15: 203 - 234を参照のこと）。F c Rは、Ravetch and Kinet（1991）Annu. Rev. Immunol. 9: 457 - 492；Capelle et al.（1994）Immunomethods 4: 25 - 34；およびde Haas et al.（1995）J. Lab. Clin. Med. 126: 330 - 341に概説される。将来同定されるものも含む他のF c Rは、本明細書中において用語「F c R」によって含まれる。該用語はまた、胎児への母性I g Gの移動を担う新生児受容体F c R nを含む（Guyer et al.（1976）J. Immunol. 117: 587およびKim et al.（1994）J. Immunol. 24: 249）。

【0050】

ヒト抗体を作製するための多くの方法が存在する。例えば、分泌細胞が、エプスタイン-バーウイルス（E B V）での感染によって不死化され得る。しかし、E B V感染細胞は、クローン化するのが困難であり、そして通常、比較的低い収率の免疫グロブリンしか産生しない（James and Bell（1987）J. Immunol. Methods 100: 5 - 40）。将来において、ヒトB細胞の不死化は、所定の組み合わせのトランスフォーミング遺伝子を導入することによって、場合により達成されるかもしれない。このような可能性は、S V 40ラージ発癌タンパク質およびH - r a sの発癌性対立遺伝子と共のテロメラーゼ触媒サブユニットの発現が、正常なヒト上皮および線維芽細胞の腫瘍形成性変換を生じさせたという最近の実証によって強調される（Hahn et al.（1999）Nature 400: 464 - 468）。免疫付与時に、内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体のレパトリーを産生し得るトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作製することが、現在可能である（Jakobovits et al.（1993）Nature 362: 255 - 258；Lonberg and Huszar（1995）Int. Rev. Immunol. 13: 65 - 93；Fishwild et al.（1996）Nat. Biotechnol. 14: 845 - 851；Mendez et al.（1997）Nat. Genet. 15: 146 - 156；Green（1999）J. Immunol. Methods 231: 11 - 23；Tomizuka et al.（2000）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722 - 727；Little et al.（2000）Immunol. Today 21: 364 - 370において概説される）。例えば、キメラおよび生殖細胞（germ-line）突然変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（J<sub>H</sub>）遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体の産生の完全な阻害を生

10

20

30

40

50

じる (Jakobovits et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555)。このような生殖細胞 (germ-line) 突然変異マウスにおけるヒト生殖細胞 (germ-line) 免疫グロブリン遺伝子の導入は、抗原投与時にヒト抗体の産生を生じる (Jakobovits et al. (1993) Nature 362:255-258)。Mendez et al. (1997) (Nature Genetics 15:146-156) は、抗原が投与された際に高親和性完全ヒト抗体を産生するトランスジェニックマウスの株を作製した。これは、上述の内因性 J<sub>H</sub> セグメントへの欠失を伴うマウスへのメガ塩基対ヒト重鎖および軽鎖座の生殖細胞統合 (germ-line integration) によって達成された。これらのマウス (XenoMouse (登録商標) II テクノロジー (Abgenix; Fremont, California)) は、約 66 V<sub>H</sub> 遺伝子、完全 D<sub>H</sub> および J<sub>H</sub> 領域、ならびに 3 つの異なる定常領域を含む 1,020 kb のヒト重鎖座を有し、そしてまた 32 V<sub>L</sub> 遺伝子、J<sub>L</sub> セグメント、および C<sub>L</sub> 遺伝子を含む 800 kb のヒトを有する。このようなマウスにおいて産生された抗体は、遺伝子再配列、集合、およびレパートリーを含む、全ての点で、ヒトにおいて見られるものに非常によく似ている。該ヒト抗体は、マウス座において遺伝子再配列を防止する内因性セグメントの欠失に起因して、内因性抗体に対して優先的に発現される。このようなマウスは、特に興味深い抗原で免疫化され得る。

10

## 【0051】

このような免疫を与えられた動物由来の血清は、初期抗原に対する抗体反応性についてスクリーニングされ得る。リンパ球は、リンパ節または脾臓細胞から単離され得、そして CD138 陰性および CD19 陽性細胞について選択することによって、B 細胞についてさらに選択され得る。1 態様において、このような B 細胞培養物 (BCC) は、上述のハイブリドーマを作製するために骨髓腫細胞へ融合され得る。

20

## 【0052】

別の態様において、このような B 細胞培養物は、好ましくは、初期抗原に対する反応性についてさらにスクリーニングされ得る。このようなスクリーニングとしては、標的 / 抗原タンパク質を用いての酵素結合イムノソルベント検定法 (ELISA)、目的の抗原に結合する公知の抗体を用いての競合アッセイ、ならびに標的抗原を発現する一過性にトランスフェクトされた CHO または他の細胞へのインビトロ結合が挙げられる。

30

## 【0053】

本発明の予測アッセイにおける使用のための、バイオマーカー、サイトカインマーカー、CD40 関連因子、および臨床的に有用な予測マーカー

ある実施形態において、本発明の方法は、細胞生存、増殖、アポトーシス、および CD40 シグナル伝達経路の 1 以上のバイオマーカーの発現レベルの変化をモニタリングするためのエキスビボ予測アッセイの使用を含む。該エキスビボ予測アッセイは、単独で、または例えば以下の他の予測アッセイと組み合わせて使用され得る：他の CD40 関連因子の発現に基づいて、ならびに / あるいは抗 CD40 治療剤で発揮されるものとは異なる作用機序を有する標準的な治療剤での治療介入では結果の悪い予後を示す他の臨床的に有用な予測マーカーの有無または上昇もしくは低下された発現に基づいて、抗 CD40 治療剤での治療に応答性である、炎症性疾患または自己免疫疾患を有する候補被験者同定する予測アッセイ。「抗 CD40 治療剤での治療に応答性」によって、抗 CD40 治療剤で治療した場合に、治療が求められる自己免疫疾患および / または炎症性疾患に関してポジティブな治療応答を有する候補被験者 (即ち、本明細書以下で記載の炎症性疾患または自己免疫疾患を有する個人) が意図される。

40

## 【0054】

(エキスビボ予測アッセイにおける使用のためのバイオマーカー)

シグナル伝達経路は、シグナル変換を促進するタンパク質ファミリーによって特徴付けられる。タンパク質および核酸分子を指す場合、用語「ファミリー」は、共通の構造ドメインまたはモチーフを有し、そして本明細書中で記載される十分なアミノ酸またはヌクレ

50

オチド配列相同性を有する、2またはそれ以上のタンパク質または核酸分子を意味するように意図される。このようなファミリーメンバーは、天然または非天然であり得、そして同一または異なる種由来であり得る。例えば、ファミリーは、ヒト起源の第1タンパク質、ならびにヒト起源の他の異なるタンパク質を含み得、または代わりに、非ヒト起源の相同体を含み得る。ファミリーのメンバーはまた、共通の機能的特徴を有し得る。

【0055】

セリン/トレオニンキナーゼのAKT（プロテインキナーゼBについて、場合によってはPKBと呼ばれる）ファミリーは、細胞増殖、生存、および代謝に一体的に関与する。PKBは、レトロウイルス癌遺伝子として元々同定された。現在、AKTファミリーの3つの変異体、480残基AKT-1、481残基AKT-2、および479残基AKT-3がキャラクタライズされている。本発明の目的について、AKTファミリーのタンパク質のメンバーは、一般的に、AKTタンパク質と呼ばれ、しかし、本発明の方法は、AKTの全ての3つの形態、即ち、AKT-1、AKT-2およびAKT-3、ならびにそれらの変異体に適用されることが認識される。

10

【0056】

AKTは、PH（プレクストリン相同）ドメインを含む、増殖因子調節されたセリン/トレオニンキナーゼである。このPHドメインは、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ（PI3K）、ホスファチジルイノシトール-3,4-ビスホスフェート、およびホスファチジルイノシトール-3,4,5-トリホスフェートの脂質産物と相互作用し、これは、細胞の細胞質ゾルからその原形質膜へのAKTのトランスロケーションを生じさせる。このトランスロケーションは、上流の活性化キナーゼPDK1（ホスホイノシチド依存性キナーゼ1）へAKTを提示するために、必要とされる。種々の生存および増殖因子、例えば、PDGF、EGF、インスリン、トロンピン、およびNGFは、AKTのトランスロケーションを活性化することが知られている。AKT/PKBタンパク質の活性化（即ち、リン酸化）形態は、GSK-3（グリコーゲン合成酵素キナーゼ3）、eNOS（内皮一酸化窒素合成酵素）、FKHR1（フォークヘッド転写因子ファミリーメンバー1）、Bad（Bcl-2プロアポトーシスファミリーメンバー）、およびp21CIP（細胞周期進行のインヒビター）を含む多数の基質をリン酸化する。これらの作用は、アポトーシスの抑制、グルコース代謝の制御、細胞増殖、転写、翻訳、細胞移動、および血管新生等の多様な生物学的効果を生じさせ得る。活性化AKT（即ち、p-AKT）は、下流のエフェクター分子のリン酸化を含むいくつかの異なる経路を介して細胞生存を促進する。まず、p-AKTは、Bad/Bcl-x1複合体のBad成分をリン酸化することによって、アポトーシスを阻害する。リン酸化Badは、14-3-3へ結合し、Bad/Bcl-x1複合体の分離を生じさせ、そしてそれによってBcl-x1を遊離させて細胞生存を可能にする。次に、IκB（IκB）ファミリーの阻害タンパク質との結合によって細胞質中で不活性に維持されているNF-κBは、NF-κB誘導キナーゼ（NIK）との相互作用によって活性化され得るか、またはそれは、AKTシグナル伝達経路によって活性化され得る。この様式において、活性化AKT（即ち、p-AKT）は、IκBキナーゼ多タンパク質複合体（IKK-γ）の中間リン酸化を介して、IκBファミリー（例えば、IκB）のNF-κB阻害分子を活性化し；IκBの活性化は、その分解および以前に結合されたNF-κBの放出へ導き、これは、この転写因子の活性化へ導く。NF-κBの活性化形態は、次いで、核へトランスロケートしそして数百の遺伝子の発現を調節してアポトーシスを妨害し得る。AKTが細胞生存を促進しそしてアポトーシスを妨害する別の手段は、タンパク質分解酵素カスパーゼ9またはフォークヘッド転写因子（例えば、FKHRL1）のリン酸化による。

20

30

40

【0057】

ある実施形態において、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するかまたはこれに干渉する抗CD40治療剤での治療から恩恵を受ける炎症性疾患または自己免疫疾患を有する被験者を同定するための本発明の方法は、AKTおよびNF-κBシグナル伝達経路を介してのCD40シグナル伝達に対する抗CD40治療剤の効果をモニタリングす

50

るためのエクスピボ予測アッセイの使用を含む。この様式において、候補被験者から回収されたテスト用生物学的サンプルを、本明細書以下で記載のCD40L媒介性CD40シグナル伝達の調節を可能にするに十分な時間の間、目的の抗CD40治療剤と接触させ、そして次いで、そのサンプルを、リン酸化AKT (p-AKT)、リン酸化PI3K (p-PI3K)、リン酸化PDK1 (p-PDK1)、リン酸化IKK- $\alpha$  /  $\beta$  (p-IKK- $\alpha$  /  $\beta$ )、リン酸化I $\kappa$ B (p-I $\kappa$ B; 例えば、p-I $\kappa$ B- $\alpha$ )、および活性化NF- $\kappa$ Bからなる群から選択される少なくとも1つのCD40シグナル伝達バイオマーカーの発現レベルの変化についてアッセイする。コントロール用生物学的サンプルについて観察されたものに対する、抗CD40治療剤とのインキュベーションに対する応答におけるCD40L刺激されたCD40発現細胞を含むテスト用生物学的サンプル中のこれらのリン酸化バイオマーカーの低下された発現レベルの検出は、CD40L媒介性CD40シグナル伝達のダウンレギュレーションを示し、したがって、抗CD40治療剤でのポジティブな治療結果を示す。ある実施形態において、AKTおよびNF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路を介してのCD40シグナル伝達の任意の所定のバイオマーカーの発現レベルは、コントロール用生物学的サンプル中において検出されるものに対して少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%減少される。

#### 【0058】

CD40 / CD40L相互作用はまた、MEK / ERKシグナル伝達経路、MEK / p38シグナル伝達経路、およびMEKK / JNK / JNKシグナル伝達経路を含む、MAPKシグナル伝達カスケードの活性化へ導く。全てのMAPK経路は、連続するリン酸化事象を介して作動し、転写因子をリン酸化しそして遺伝子発現を調節する。それらはまた、細胞内事象を調節するために、細胞質ゾル標的をリン酸化し得る。それらのカスケードは、細胞増殖、分化、発生、細胞周期、および発癌性シグナルの伝達の調節に關与する。本発明の方法に対して特に興味深いのは、MEK / ERKおよびMEK / p38シグナル伝達経路の活性化である。

#### 【0059】

MAPキナーゼ(細胞外シグナル調節プロテインキナーゼ、またはERKとも呼ばれる)は、スリーキナーゼカスケード(three-kinase cascade)における終末酵素であり、ここで、各酵素は、該配列における次のメンバーをリン酸化しそしてそれによって活性化する。各MAPKモジュールは、3つのプロテインキナーゼからなる: MAPKキナーゼキナーゼ(またはMEKK)、これはMAPKキナーゼ(またはMEK)を活性化し、これは、次いで、MAPK / ERK酵素を活性化する。MEKKは、触媒コア内のSerまたはThr残基(Ser-X-X-X-Ser / Thr)においてMEK酵素の1以上を二重にリン酸化し、そしてそれによって活性化する、セリン/トレオニン特異的プロテインキナーゼである。MEKは、MAPKのTXYコンセンサス配列内のThrおよびTyrの両方をリン酸化することによってMAPKを活性化する、セリン/トレオニン/チロシン特異的プロテインキナーゼである。この二重リン酸化は活性化のために必要とされる。ERK1 (p44)、ERK2 (p42)、p38 / HOG、およびJNK / SAPKは、平行経路で關連するなお別個のターミナルMAPKを示す。

#### 【0060】

ある実施形態において、抗CD40治療剤での治療から恩恵を受ける炎症性疾患または自己免疫疾患を有する被験者を同定するための本発明の方法は、MEK / ERKおよびMEK / p38経路を介してのCD40シグナル伝達に対する抗CD40治療剤の効果をモニタリングするためのエクスピボ予測アッセイの使用を含む。この様式において、候補被験者から回収されたテスト用生物学的サンプルを、本明細書以下で記載のCD40L媒介性CD40シグナル伝達の調節を可能にするに十分な時間の間、目的の抗CD40治療剤と接触させ、そして次いで、そのサンプルを、リン酸化MEK (p-MEK)、例えば、p-MEK1、p-MEK2、p-MEK3およびp-MEK6、リン酸化ERK (p-

10

20

30

40

50

ERK)、例えば、p-ERK1またはp-ERK2、ならびにリン酸化p38(p-p38)からなる群から選択される少なくとも1つのCD40シグナル伝達バイオマーカの発現レベルの変化についてアッセイする。コントロール用生物学的サンプルについて観察されたものと比較した、抗CD40治療剤とのインキュベーションに対する応答におけるCD40L刺激されたCD40発現細胞を含むテスト用生物学的サンプル中のこれらのリン酸化バイオマーカの低下された発現レベルの検出は、CD40L媒介性CD40シグナル伝達のダウンレギュレーションを示し、したがって、抗CD40治療剤でのポジティブな治療結果を示す。ある実施形態において、MEK/ERKおよびMEK/p38経路を介してのCD40シグナル伝達の任意の所定のバイオマーカの発現レベルは、コントロール用生物学的サンプル中において検出されるものに対して少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%減少される。

10

#### 【0061】

CD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するかまたはこれに干渉する抗CD40治療剤での治療に対する候補被験者の応答性はまた、CD40L媒介性CD40シグナル伝達の任意のサイトカインマーカの発現レベルに対する該治療剤のエクスピボ効果をモニタリングすることによって、アッセイされ得る。インビボでのその天然リガンドによるCD40の結合は、CD40発現細胞のタイプに依存して、多数の炎症性サイトカインのアップレギュレーションを生じさせる。正常なB細胞のエクスピボCD40L刺激は、血管内皮増殖因子(VEGF)、インターロイキン(IL)-6、IL-8、IL-10、腫瘍壊死因子-(TNF-)、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)、およびマクロファージ炎症性タンパク質-1(MIP-1)が挙げられるがこれらに限定されないいくつかのサイトカインの産生のアップレギュレーションを生じさせ、一方、単球のエクスピボCD40L刺激は、本明細書以下に記載されるように、VEGF、IL-6、IL-8、IL-10、TNF-、MCP-1およびMIP-1の産生のアップレギュレーションを生じさせる。

20

#### 【0062】

本発明のスクリーニング方法によれば、候補被験者から回収されたテスト用生物学的サンプルを、本明細書以下に記載のCD40L媒介性CD40シグナル伝達の調節を可能にするに十分な時間の間、目的の抗CD40治療剤と接触させ、そして次いで、そのサンプルを、VEGF、IL-6、IL-8、IL-10、TNF-、MCP-1およびMIP-1からなる群から選択される少なくとも1つのサイトカインマーカの発現レベルの変化についてアッセイする。サイトカインの発現レベルは、本明細書以下において記載されるように、当該分野において公知の任意の検出方法を使用して、達成され得る。コントロール用生物学的サンプルについて観察されたものと比較した、抗CD40治療剤とのインキュベーションに対する応答におけるCD40L刺激されたCD40発現細胞を含むテスト用生物学的サンプル中のこれらのサイトカインマーカの低下された発現レベルの検出は、CD40L媒介性CD40シグナル伝達のダウンレギュレーションを示し、したがって、抗CD40治療剤でのポジティブな治療結果を示す。ある実施形態において、任意の所定のサイトカインの発現レベルは、コントロール用生物学的サンプル中において検出されるものに対して少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%減少される。

30

40

#### 【0063】

AKT、NF- $\kappa$ BおよびMAPKシグナル伝達経路は、全て、細胞増殖および生存に関与する。免疫系において、アポトーシスは、T細胞レパートリーの選択、自己反応性TおよびBリンパ球の欠失、免疫応答の終了に続く末梢エフェクターT細胞の除去、免疫記憶の調節、ならびにCTLおよびNK細胞による標的細胞の細胞傷害性において重要な役割を果たす。CD40発現細胞におけるCD40生存シグナル伝達を遮断しかつ細胞アポ

50

トーシスプロセスを促進し得る治療剤は、CD40L 媒介性 CD40 シグナル伝達に関連する自己免疫および/または炎症性成分を有する疾患を治療することにおいて有利であり得る。

#### 【0064】

したがって、CD40 発現細胞における CD40 シグナル伝達をモニタリングすることに加えて、抗 CD40 治療剤での治療から恩恵を受ける炎症性疾患または自己免疫疾患を有する被験者を同定するための本発明の方法は、アポトーシスの1以上のバイオマーカー、特に、切断されたカスパーゼタンパク質および切断されたポリADPリボースポリメラーゼ (PARP) を含むがこれらに限定されない細胞プロアポトーシスタンパク質の発現に対する抗 CD40 治療剤の効果をモニタリングするエクスピボ予測アッセイの使用を含む。アッセイされ得るアポトーシスの追加のバイオマーカーとしては、細胞表面での原形質膜の変化、例えば、細胞表面ホスファチジルセリン (phosphatidylserine) (PS) の存在、およびゲノムDNAの切断またはフラグメント化が挙げられるが、これらに限定されない。PSは、通常、原形質膜の内側にもっぱら局在しており、しかし、その間細胞膜がインタクトなままであるアポトーシス細胞死の初期の間、細胞の外部表面へトランスロケートされる。細胞表面PSおよびゲノムDNAフラグメント化の存在は、例えば、本明細書以下で記載されるように、それぞれ、アネキシンV染色およびTUNEL染色によって検出され得る。コントロール用生物学的サンプルについて観察されたものと比較した、抗CD40治療剤とのインキュベーションに対する応答におけるCD40L刺激されたCD40発現細胞を含むテスト用生物学的サンプル中のアポトーシスのこれらのバイオマーカーの1以上の増加された発現レベルの検出は、抗CD40治療剤でのポジティブな治療結果を示す。ある実施形態において、アポトーシスの任意の所定のバイオマーカーの発現レベルは、コントロール用生物学的サンプル中において検出されるものに対して、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、200%、250%、300%、またはそれ以上、増加される。

#### 【0065】

代わりに、または上述のエクスピボアッセイと組み合わせて、本発明の方法は、Bcl-2ファミリーメンバーである抗アポトーシスタンパク質、IAPアポトーシス阻害剤タンパク質 (IAP apoptosis inhibitor protein)、およびTNF受容体関連因子-1 (TRAF-1) を含むがこれらに限定されない細胞増殖および/または生存のバイオマーカーである1以上のタンパク質の使用を含む。コントロール用生物学的サンプルについて観察されたものと比較した、抗CD40治療剤とのインキュベーションに対する応答におけるCD40L刺激されたCD40発現細胞を含む生物学的サンプル中の細胞増殖および/または細胞生存のこれらのバイオマーカーの低下された発現レベルの検出は、抗CD40治療剤でのポジティブな治療結果を示す。ある実施形態において、コントロール用生物学的サンプル中において検出されるものに対して、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%減少される。

#### 【0066】

カスパーゼファミリーのタンパク質のメンバーは、細胞アポトーシスの主要なエフェクターである。カスパーゼは、不活性前駆形態またはいわゆる「チモーゲン」として細胞内に存在するシステインプロテアーゼである。チモーゲンは、死受容体媒介経路またはアポトーシスのミトコンドリア経路を介して、アポトーシスの誘導に続いて、切断され、活性化酵素を形成する。例えば、Gupta et al. (2003) Intl. J. Oncol. 22: 15-20を参照のこと; その全体が参照により本明細書中に組み込まれる。アポトーシス経路に依存して、種々のカスパーゼがアポトーシスプロセスを開始させ、カスパーゼ8および10は死受容体経路を開始させ、そしてカスパーゼ9はミトコン

10

20

30

40

50

ドリア経路を開始させる。活性イニシエータカスパーゼは、次いで、エフェクターカスパーゼ、例えば、カスパーゼ3、6および7を活性化し（即ち、切断し）、アポトーシスを誘導する。これらのエフェクターカスパーゼは、アポトーシスを受ける細胞中において観察される典型的な形態学的変化へ導く重要な（key）細胞タンパク質を切断する。

【0067】

したがって、ある実施形態において、抗CD40治療剤での治療から恩恵を受ける炎症性疾患または自己免疫疾患を有する被験者を同定するための本発明の方法は、アポトーシスに関連する特定の細胞タンパク質のタンパク質分解をモニタリングするためのエクスピボ予測アッセイの使用を含む。例えば、ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ（PARP-1）は、アポトーシスの間、特異的に切断される。PARP-1は、いくつかの各タンパク質へのポリ（ADP-リボース）鎖の付加を触媒するDNA結合タンパク質であり、DNA損傷修復において重要な役割を果たすと考えられている。PARP-1は、細胞ストレス、例えば、熱ショック、電離放射線、発癌物質への暴露、および化学療法薬剤での治療の間、迅速に活性化される（Scovassi and Poirier (1999) *Mol Cell Biochem.* 199: 125-137; Wyllie (1997) *Eur. J. Cell Biol.* 73: 189-197）。アポトーシスの間、活性化された（即ち、切断された）カスパーゼ3は、次に、PARP-1を切断し；実際に、89kDaおよび24kDaタンパク質分解フラグメントの分離は、アポトーシスの顕著な特徴として受容される（Scovassi and Poirier (1999) 前述；Wyllie et al. (1997) 前述）。本明細書中に記載のエクスピボ予測アッセイは、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を調節しおよび/またはADCCを調節する抗CD40治療剤に対する応答において候補被験者から得られたテスト用生物学的サンプル中における、1以上の切断されたカスパーゼタンパク質（例えば、切断されたカスパーゼ3、切断されたカスパーゼ7、および切断されたカスパーゼ9）のレベル、ならびに必要なに応じて、切断PARP-1、細胞表面PS、および/またはゲノムDNAフラグメント化のレベルの変化をモニタリングする。生物学的サンプル中のアポトーシスパイオマーカーの上昇されたレベルは、本明細書以下で記載のものを含む、当業者に公知の任意の方法を使用して検出され得る。

【0068】

細胞生存および増殖のバイオマーカーとしては、Bcl-2ファミリーのタンパク質のメンバーである抗アポトーシスタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。少なくとも16メンバーを含むBcl-2ファミリーのタンパク質は、細胞アポトーシスの調節に関与する。該ファミリーメンバーのいくつかは、抗アポトーシス性、例えば、Bcl-2、Bcl-x1、Mcl-1、Bcl-w、およびA1であり、そしてしたがって細胞生存のバイオマーカーであり、そして他のものはプロアポトーシス性（例えば、Bid、Bim、Bik、Bmf、Bad、Hrk、BNIP3、Bax、Bak、およびBok）であり、そしてしたがってアポトーシス活性のバイオマーカーである。Bcl-2ファミリーメンバーは、ミトコンドリア外膜における孔形成（ここを通過して、シトクロムc（Cyt c）および他の膜間タンパク質が通過することができる）；ならびにプロアポトーシスファミリーメンバーと抗アポトーシスファミリーメンバーとの間のヘテロ二量体を含む、多くの異なる機構を介して作用すると示唆されている。

【0069】

CD40シグナル伝達およびアポトーシスの調節に対する抗CD40治療剤の効果は、細胞生存/アポトーシスのこれらのバイオマーカーの1以上をモニタリングするための本明細書中に記載のエクスピボ予測アッセイで評価され得る。特に興味深い細胞生存のバイオマーカーとしては、抗アポトーシスタンパク質Bcl-x1およびMcl-1が挙げられるが、これらに限定されない。

【0070】

ミトコンドリア膜タンパク質Bcl-2をコードする、bcl-2遺伝子は、最初、B細胞リンパ腫において同定され（Tsujimoto et al. (1984) *Sc*

10

20

30

40

50

ience 226:1097)、ここで、原因である遺伝子病変は、免疫グロブリンプロモーターの制御下で**bcl-2**遺伝子を置く染色体転座( $t(14:18)$ )とキャラクタライズされた。**Bcl-2**の得られる過剰発現は、そうでなければB細胞恒常性を維持するアポトーシス細胞死の正常な進行を遅延させ、B細胞の蓄積および濾胞性リンパ腫を生じさせる(Adams and Cory, 1998; Cory (1994) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 345:289)。**Bcl-2**は、ホモ二量体として存在し得るか、または**bax**を有するヘテロ二量体を形成し得る。ヘテロ二量体として、**bax**はアポトーシスを誘導するように作用する。しかし、**bax-Bcl-2**複合体の形成はアポトーシスを遮断する。**Bcl-2**発現はまた、薬剤耐性の発達において役割を果たし得る。

10

## 【0071】

**bcl-2**遺伝子と相同性を有するいくつかの遺伝子が、引き続いてキャラクタライズされ、以下が挙げられる：**a1**、これは、GM-CSFまたはLPSに対する応答においてマクロファージ中において迅速に誘導される、80アミノ酸A1タンパク質をコードする(Linet al. (1993) J Immunol. 151:1979-1988)；**mcl-1**、マクロファージ分化を受ける骨髄細胞系における初期応答遺伝子(Kozopas et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3516-3520)；ならびに**bak**、アポトーシスを増強し得る**bcl-2**相同体(Chittenden et al. (1995) Nature 374:733; Kiefer et al. (1995) Nature 374:736)。**bcl-2**遺伝子産物と相互作用するおよび/またはこれと構造的に関連する他のタンパク質、例えば、**Bcl-x1**および**Bcl-xs**(Boise et al. (1993) Cell 74:597)；**Ced-9**(Vaux et al. (1992) Science 258:1955)もまた同定された。

20

## 【0072】

**Bcl-2**タンパク質に密接に関連する**bcl-x**遺伝子産物**Bcl-x**もまた、アポトーシスから細胞を保護する。ヒト**Bcl-x**の選択的スプライシングは、少なくとも2つの異なる**Bcl-x** mRNA種、**Bcl-x1**および**Bcl-xs**を生じさせ得る。ラージ**bcl-x** mRNAの主要なタンパク質産物(233アミノ酸)、**Bcl-x1**は、増殖因子撤退時に細胞死を阻害し(Boise et al. (1993) Cell 74:597-608)、そしてそのトランスジェニック発現は、胸腺細胞成熟化を変化させ、増加された数の成熟胸腺細胞へ導く(Chao et al. (1995) J. Exp. Med. 182:821-828; Grillot et al. (1995) J. Exp. Med. 182:1973-1983)。

30

## 【0073】

骨髄細胞白血病に関連する遺伝子**mcl-1**は、骨髄細胞白血病における分化のプロゲラミングの間初期に発現されるタンパク質、**Mcl-1**をコードする(例えば、米国特許出願公開第20020086321号を参照のこと)。**Mcl-1**のカルボキシル部分は、**Bcl-2**との相同性を共有する。**Bcl-2**ファミリーの他のメンバーと同様に、**Mcl-1**は、生存能から死へ、または増殖から分化への、細胞運命における遷移のプロゲラミングとの関連によって特徴付けられる。

40

## 【0074】

**Bcl-2**ファミリーのメンバーに加えて、本発明の方法における使用のための細胞生存バイオマーカーとしては、バキュロウイルスIAP遺伝子と関係するアポトーシスのインヒビターの遺伝子ファミリーのメンバーが挙げられる(Bimbaum et al (1994) J. Virol. 68:2521-2528; Clem et al. (1994) Mol. Cell Biol. 14:5212-5222; Duckett et al. (1996) EMBO J. (1996) 15:2685-2694; Hay et al. (1995) Cell 83:1253-1262; Liston et al. (1996) Nature 379:349-353; Rothe e

50

t al. (1995) Cell 83:1243-1252; Roy et al. (1995) Cell 80:167-178)。少なくとも8個のヒトIAPが同定された (Salvesen and Duckett (2002) Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3:401-410)。

【0075】

IAPは、進化的に高度に保存されており；それらは、1～3の約70アミノ酸アミノ末端Cys/HisバキユロウイルスIAP繰り返し(BIR)およびRINGフィンガーという名のカルボキシ末端亜鉛結合ドメインによって構成された類似の構造を共有する。IAPファミリータンパク質は、アポトーシスおよび腫瘍形成の調節において潜在的に重要な役割を有すると認識されている (Deveraux and Reed (1999) Genes Dev. 13:239-252; Tamm et al. (2000) Clin. Cancer Res. 6:1796-1803)。

10

【0076】

IAPは、上流および末端カスパーゼを阻害することによって、細胞死を抑制する(例えば、Thompson (1995) Science 267:1456を参照のこと)。カスパーゼ3および7の活性化(即ち、切断された)形態は、XIAP、c-IAP1およびc-IAP2によって直接阻害され(例えば、Roy et al. (1997)(前述)を参照のこと)、これらはまた、プロカスパーゼ9のシトクロムc誘導活性化を遮断することによって、プロカスパーゼ3、6および7のタンパク質分解プロセッシングを防止し得る (Deveraux et al. (1998) EMBO J. 17:2215-2223)。IAPファミリーに関連する種々のアポトーシスインヒビターをコードする核酸の治療的および診断的使用が、特許文献に記載された。例えば、国際特許出願番号WO97/06255、WO97/26331、およびWO97/32601を参照のこと。細胞生存のバイオマーカーとして使用され得るIAPタンパク質の例としては、XIAP、cIAP1、cIAP2、およびサバイビン(survivin)が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0077】

XIAPは、最も広範囲に発現され、そしてカスパーゼの最も強力なインヒビターである(例えば、Takahashi et al. (1998) J. Biol. Chem. 273:7787; Reed (1994) J. Cell Biol. 124:1を参照のこと)。サバイビンは、約16.5kDaの細胞質タンパク質であり(例えば、米国特許出願公開第20030100525号を参照のこと)、単一のBIR、およびRINGフィンガーの代わりに高電荷カルボキシル末端コイルドコイル領域を含み、これは、B細胞前駆体中に移動される際に、増殖因子(IL-3)撤去によって誘導されるアポトーシスを阻害する (Ambrosini et al. (1997) Nature Med. 3:917-921)。外因性サバイビンタンパク質の過剰発現は、用量依存性様式で、p53誘導アポトーシスから細胞を救い、このことは、サバイビンの損失が、p53依存性アポトーシス経路を少なくとも部分的に媒介することを示唆している (Mirza et al. (2002) Oncogene 21:2613-2622)。

30

【0078】

本発明の方法における使用のための細胞生存の別の代表的なバイオマーカーは、TRAF-1である。TRAFファミリーメンバーは、CD40の細胞質ドメインへ結合し、そしてB細胞生存、増殖、分化、アイソタイプスイッチング、胚中心の発達および液性記憶応答を調節する、複数のシグナル伝達経路の活性化を媒介する(例えば、Pullen et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:14246-14254を参照のこと)。CD40受容体の活性化は、TRAF-1遺伝子の転写 (Schwenzer et al. (1999) J. Biol. Chem. 274(27):19368-19374) およびヒト単球におけるTRAF-1発現の強力なアップレギュレーション (Pearson et al. (2001) Internat. Immunol. 13(3):273-283) を生じさせ得ることが報告された。CD40受容体活

40

50

性化に対する応答における T R A F - 1 遺伝子発現の変化は、薬物効果を予測し、それによって、C D 4 0 L 媒介性 C D 4 0 シグナル伝達および細胞生存 / アポトーシスの調節に対する抗 C D 4 0 治療剤の効果を評価および / またはモニタリングするための好適なバイオマーカーを提供する。T R A F - 1 発現の変化は、本明細書以下に記載されるように、ノザンプロットまたは定量 R T - P C R 等の技術によって m R N A レベルで、あるいは例えばウエスタンプロットによってタンパク質レベルで、容易に検出され得る。

【 0 0 7 9 】

細胞生存の前述のバイオマーカーは、これらのバイオマーカーの 1 つまたは全てを含む任意の組み合わせで、ならびに細胞増殖の他のバイオマーカーと組み合わせ、本明細書に記載のエクスピボ予測アッセイにおいてモニタリングされ得る。したがって、1 実施形態において、本明細書に記載のエクスピボ予測アッセイはまた、候補被験者由来のテスト用生物学的サンプル中において、細胞増殖バイオマーカー K i 6 7 の発現をモニタリングするために使用される。

【 0 0 8 0 】

K i 6 7 は、静止細胞の G 0 期にはないが、分裂細胞の G 1、S、M および G 2 期にある細胞の核中に存在する細胞周期関連核蛋白質である ( G e r d e s e t a l . ( 1 9 8 4 ) J . I m m u n o l . 1 3 3 , 1 7 1 0 - 1 7 1 5 ) 。これらの理由のために、それは細胞増殖マーカーとして使用される。

【 0 0 8 1 】

したがって、本発明のエクスピボ予測アッセイにおいてモニタリングされるバイオマーカーとしては、上述の細胞生存およびアポトーシスタンパク質、ならびに本明細書で上述の C D 4 0 シグナル伝達経路に關与するタンパク質が挙げられる。モニタリングは、タンパク質または核酸レベルであり得る。したがって、バイオマーカーとしては、これらのタンパク質およびこれらのタンパク質をコードする遺伝子が挙げられる。検出がタンパク質レベルである場合、バイオマーカータンパク質は、全長ポリペプチドまたはその任意の検出可能なフラグメントを含み、そしてこれらのタンパク質配列の変異体を含み得る。同様に、検出がヌクレオチドレベルである場合、バイオマーカー核酸としては、全長コード配列を含む D N A、全長コード配列のフラグメント、これらの配列の変異体、例えば、自然に生じる変異体またはスプライス変異体、あるいはこのような配列の相補体が挙げられる。バイオマーカー核酸としてはまた、R N A、例えば、目的のバイオマーカータンパク質をコードする全長配列を含む、m R N A、目的の全長 R N A のフラグメント、またはこれらの配列の変異体が挙げられる。バイオマーカータンパク質およびバイオマーカー核酸としてはまた、これらの配列の変異体が挙げられる。「フラグメント」によって、ポリヌクレオチドの部分またはアミノ酸配列の部分およびしたがってそれによってコードされるタンパク質が意図される。バイオマーカーヌクレオチド配列のフラグメントであるポリヌクレオチドは、一般的に、少なくとも 1 0、1 5、2 0、5 0、7 5、1 0 0、1 5 0、2 0 0、2 5 0、3 0 0、3 5 0、4 0 0、4 5 0、5 0 0、5 5 0、6 0 0、6 5 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0、1, 0 0 0、1, 1 0 0、1, 2 0 0、1, 3 0 0、または 1, 4 0 0 連続ヌクレオチド、あるいは本明細書中に開示される全長バイオマーカーポリヌクレオチド中に存在するヌクレオチドの数までを含む。バイオマーカーポリヌクレオチドのフラグメントは、一般的に、少なくとも 1 5、2 5、3 0、5 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、または 2 5 0 連続アミノ酸、あるいは本発明の全長バイオマーカータンパク質中に存在するアミノ酸の総数までをコードする。「変異体」は、実質的に類似の配列を意味するように意図される。一般的に、本発明の特定のバイオマーカーの変異体は、当該分野において公知の配列アラインメントプログラムによって決定されるように、そのバイオマーカーと少なくとも約 4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % またはそれ以上配列同一性を有する。前記タンパク質およびこれらのマーカーの各々についての対応のコード配列は、当該分野において公知である。本明細書以下の実施例 3 の表 6 を参照のこと。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 2 】

(他の予測アッセイにおける使用のためのCD40関連因子および臨床的に有用な予測マーカー)

本発明の方法によれば、抗CD40治療剤での治療から恩恵を受ける炎症性疾患または自己免疫疾患を有する患者の個人または部分母集団がまた、1以上のCD40関連因子の有無、あるいは上昇されたまたは低下されたレベルを求める予測アッセイを使用して同定され得る。これらのCD40関連因子に基づいて抗CD40治療剤での治療に応答性であると同定された被験者が、該抗CD40治療剤で治療され得る。あるいは、それらは、本明細書に記載のエクスピボ予測アッセイを使用して、抗CD40治療剤での治療から恩恵を受ける可能性についてさらにスクリーニングされ得、例えば、該炎症性疾患または自己免疫疾患が、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するかまたはADCC活性を調節するか、あるいはこれらの作用機序の両方を有する、抗CD40治療剤での治療に対してより応答性であるかどうかを同定する。

10

## 【 0 0 8 3 】

目的のCD40関連因子としては、細胞表面CD40抗原の発現レベル、細胞表面CD40Lの発現レベル、可溶性CD40(sCD40)の循環レベル、および可溶性CD40L(sCD40L)の循環レベルが挙げられるが、これらに限定されない。この様式において、候補被験者から回収された生物学的サンプルを、これらのCD40関連因子の少なくとも1つの発現レベルについて分析する。これらのCD40関連因子の発現レベルは、自己免疫疾患および/または炎症性疾患についての予測マーカーとして使用され得る。それらは、抗CD40治療剤に応答するかまたは応答しない被験者の診断法として有用であり得る。

20

## 【 0 0 8 4 】

当該分野において公知の任意の方法が、これらのマーカーの分析について使用され得る。例えば、候補被験者から得られた血液サンプル中の、sCD40またはsCD40Lの循環レベルは、例えば、ELISA、ラジオイムノアッセイ(RIA)、電気化学発光(ECL)、ウエスタンブロット、多重化技術、または他の類似の方法によって測定され得る。CD40またはCD40Lの細胞表面発現は、例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学、ウエスタンブロット、免疫沈降、磁気ビーズ選択、細胞表面CD40を発現する細胞の定量によって測定され得る。CD40およびCD40L RNA発現レベルは、RT-PCR、Q<sub>t</sub>-PCR、マイクロアレイ、ノザンブロット、または他の類似の技術によって測定され得る。CD40抗原、CD40L、および可溶性CD40Lについての配列は、当該分野において公知である。例えば、本明細書以下の実施例3の表7を参照のこと。ある実施形態において、CD40発現細胞によって分泌されるsCD40とこれらの細胞の表面からタンパク質分解的に切断されるsCD40との区別を確認するために、sCD40が単離され、そして配列決定される。分泌されるsCD40および/またはタンパク質分解的に切断されたsCD40の発現レベルは、目的の抗CD40治療剤での治療に対する疾患の応答性および/または疾患状態に対して相互に関連付けられ得る。

30

## 【 0 0 8 5 】

本発明の他の実施形態において、抗CD40治療剤での治療から恩恵を受ける炎症性疾患または自己免疫疾患を有する患者の部分母集団が、当該分野において公知の1以上の臨床的に有用な予測マーカーについて候補被験者をスクリーニングすることによって同定される。臨床的に有用なマーカーの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血清インターロイキン(IL)-18、このレベルは原発性胆汁性肝硬変の重篤度に関連する(Yamano et al. (2000) Clin. Exp. Immunol. 122: 227-231); 可溶性細胞間接着分子-1(ICAM-1)、この発現は初期の疾患においてよりも後期の原発性胆汁性肝硬変においてより大きく、そしてこれは組織学的進行に相互に関係がある(Lim et al. (1994) Hepatology 20: 882-888); ICAM-1およびCD40等の細胞接着分子の細胞発現、これは、ループス腎炎の結果を予測するに役立つ(Daniel et al. (

40

50

2001) *Kidney Int.* 60:2215-2221); 血清可溶性IL-2受容体(sIL-2R)レベル、これは、関節リウマチ(RA)における臨床疾患活性の優れたモニターであるようである(Wood et al. (1988) *J. Autoimmun.* 1:353-361); 腸管多剤耐性タンパク質(MDRI)、このレベルは生体肝移植の結果についての強力な予後指標である(Hashida et al. (2001) *Clin. Pharmacol. Ther.* 69:308-316); 血清ロイシンアミノペプチダーゼ、この増加されたレベルは全身性エリテマトーデスについての活性指標であり得る(Inokuma et al. (1999) *Rheumatology (Oxford)* 38:705-708); C反応性タンパク質、これは炎症の一般的な指標である; ならびにアルファ1-アンチトリプシン、これはクローン病、結腸炎および回腸炎における疾患活性の指標である(Meyers et al. (1985) *Gastroenterology* 89:13-18); これらの参考文献は、それらの全体が、参照により本明細書中に組み込まれる。

10

## 【0086】

したがって、現存の治療剤に対してあまり応答性でない自己免疫および/または炎症性疾患を有する患者の部分母集団が、これらの臨床的に有用な予測マーカーの1以上を使用する本明細書中に開示される予測アッセイを含む、現在使用されるアッセイ方法によって容易に同定され得る。これらの臨床的に有用な予測マーカーに基づいてこれらの部分母集団の1つに入る被験者が同定されると、該被験者は、CD40L媒介性CD40シグナル伝達および/またはADCC活性を調節する抗CD40治療剤でこの被験者を治療することの利益を評価するために、本明細書の上記で同定されたエクスピボ予測アッセイの1以上を使用してさらにスクリーニングされ得る。

20

## 【0087】

## 予測アッセイ

本発明のある実施形態において、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を調節するか、ADCCを調節するか、または両方を調節する、抗CD40治療剤での潜在的な治療的利益が、CD40発現細胞におけるCD40シグナル伝達の刺激によって媒介される自己免疫疾患および/または炎症性疾患について治療介入の必要がある候補被験者から回収された生物学的サンプル中における、細胞増殖および生存、細胞アポトーシス、ならびにCD40シグナル伝達経路の上述のバイオマーカーの1以上の発現レベルの変化をモニタリングするエクスピボ予測アッセイを使用して評価される。「CD40発現細胞」によって、CD40抗原を発現する細胞が意図される。細胞中のCD40発現を検出するための方法は、当該分野において周知であり、そしてPCR技術、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、ELISA等が挙げられるが、これらに限定されない。エクスピボアッセイが、生物学的サンプル中の目的の1以上のバイオマーカーの発現レベルの好ましい変化を生じさせる場合、該抗CD40治療剤での治療介入が正当化される。さらに、本明細書中で議論されるバイオマーカー、サイトカインマーカー、およびCD40関連因子が、本明細書中に開示されるエクスピボ予測アッセイを使用してスクリーニングされていてもされていなくてもよい被験者における抗CD40治療剤の治療効果をモニタリングするために、そしてしたがって同一の抗CD40治療剤でのさらなる治療が正当化されるかどうか、または代替の治療プロトコルが必要であるかもしくは望ましいかどうかを決定するために、使用され得る。抗CD40治療剤での治療が、本発明の方法によって決定されるように、正当化される場合、該治療剤が、任意の好適な投与経路によって投与され得る。

30

40

## 【0088】

CD40L媒介性CD40シグナル伝達を調節するか、ADCCを調節するか、または両方を調節する、抗CD40治療剤での治療介入について考慮されている候補被験者は、CD40発現細胞におけるCD40シグナル伝達によって媒介されるいずれかの炎症性疾患または自己免疫疾患で苦しめられおり得るか、あるいはこれらが発症するかまたは再発するという危険な状態にあり得る。炎症性疾患は、炎症および組織破壊、またはそれらの

50

組み合わせによって特徴付けられる。「炎症性疾患」は、任意の炎症性免疫介在性プロセスを含み、ここで、免疫応答の開始事象または標的は、例えば、同種抗原、異種抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、未知の抗原、またはアレルゲンを含む、非自己抗原を含む。

【0089】

さらに、本発明の目的について、用語「炎症性疾患」は「自己免疫疾患」を含む。本明細書中で使用される場合、用語「自己免疫」は、一般的に、「自己」抗原を関与させる炎症性免疫介在性プロセスを含むように理解される。自己免疫疾患において、自己抗原は、宿主免疫応答を誘導する。

【0090】

また、本発明の方法は、組織移植片拒絶に関連する炎症の治療についての抗CD40治療剤の効果を評価するために使用され得る。「移植片(transplant)拒絶」または「移植片(graft)拒絶」は、HLA抗原および血液型抗原等を含むがこれらに限定されない移植片に対する任意の宿主開始免疫応答(host-mounted immune response)をいう。

【0091】

本発明はまた、例えば骨髄移植に関連するもの等の、対宿主性移植片病の治療についての抗CD40治療剤の効果を評価するために使用され得る。このような対宿主性移植片病において、ドナー骨髄は、リンパ球およびリンパ球へ成熟する細胞を含む。ドナーのリンパ球は、非自己としてレシピエントの抗原を認識し、そして炎症性免疫応答を開始させる。したがって、本明細書中で使用される場合、「対宿主性移植片病」または「対宿主性移植片反応」は、ドナーリンパ球が宿主抗原に対して反応する任意のT細胞媒介性免疫応答をいう。

【0092】

自己免疫および/または炎症性疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：全身性エリテマトーデス(SLE)、円盤状ループス(discoid lupus)、ループス腎炎、サルコイドーシス、若年性関節炎を含む炎症性関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、ライター症候群、強直性脊椎炎、および痛風性関節炎、臓器または組織移植片の拒絶、超急性、急性、または慢性拒絶および/または対宿主性移植片病、多発性硬化症、高IgE症候群、結節性多発性動脈炎、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患、クローン病、セリアック病(グルテン過敏性腸症)、自己免疫性肝炎、悪性貧血、自己免疫性溶血性貧血、乾癬、強皮症、重症筋無力症、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性甲状腺炎、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、免疫複合体病、慢性疲労免疫機能障害症候群(CFIDS)、多発性筋炎および皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、血栓溶解、心筋症、尋常性天疱瘡、間質性肺線維症(pulmonary interstitial fibrosis)、I型およびII型糖尿病、1、2、3および4型遅延型過敏症、アレルギーまたはアレルギー性障害(allergic disorders)、治療用タンパク質に対する望ましくない/意図的でない免疫応答(例えば、米国特許出願第US2002/0119151号およびKoren, et al. (2002) Curr. Pharm. Biotechnol. 3:349-60を参照のこと)、ぜん息、チャージ-ストラウス症候群(アレルギー性肉芽腫症)、アトピー性皮膚炎、アレルギー性および刺激性接触皮膚炎、じんま疹(urticaria)、IgE媒介性アレルギー(IgE-mediated allergy)、アテローム性動脈硬化症、脈管炎、特発性炎症性ミオパシー(idiopathic inflammatory myopathies)、溶血性疾患、アルツハイマー病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー等。いくつかの他の実施形態において、本発明の方法は、以下が挙げられるがこれらに限定されない肺炎症についての抗CD40治療剤での治療から恩恵を受ける個人を同定するために使用される：肺移植片拒絶、ぜん息、サルコイドーシス、気腫、嚢胞性線維症、特発性肺線維症、慢性気管支炎、アレルギー性鼻炎および肺のアレルギー性疾患、例えば過敏性肺炎、好酸球性肺炎、骨髄および/または肺移植または他の原因に起因する閉塞性細気管支炎、移植片アテローム性動脈硬化症/移植片静脈硬化症、ならびに自己免疫疾患(例えば

10

20

30

40

50

、関節リウマチおよびエリテマトーデス)、脈管、コラーゲンから生じる肺線維症。

【0093】

他の実施形態において、本発明の方法は、その作用機序がCD40L媒介性CD40シグナル伝達の調節、ADCCの調節、または両方によるものとは異なる他の公知の治療的処置に対して最初に耐性である、あるいはこれに対する耐性を生じる、自己免疫疾患および炎症性疾患を同定および処置するために有用である。前記エキスピボ予測アッセイが、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を調節するか、ADCCを調節するか、または両方を調節する1以上の抗CD40治療剤での治療介入が望ましい患者の部分母集団を同定するために、使用され得る。

【0094】

用語「予後」は、当該分野において認識され、そして治療介入に対する応答の起こり得るコース(likely course)、および疾患または疾患進行の起こり得るコースについて、特に、疾患寛解、疾患再発および死の可能性についての予測を含む。本発明のエキスピボ予測アッセイは、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を調節するか、ADCCを調節するか、または両方を調節する、特定の抗CD40治療剤または抗CD40治療剤のクラスに対する、候補被験者の応答を予測するために使用され得る。「候補被験者の応答を予測すること」によって、目的の被験者が特定の抗CD40治療剤でポジティブまたはネガティブな結果を経験する可能性を評価することが意図される。本発明の目的について、本発明のエキスピボ予測アッセイの文脈において「ポジティブな治療結果を示す」は、候補被験者が、考慮中の抗CD40治療剤での治療に対する応答において有利な結果を経験する増加された可能性を意味するように意図され、そしてしたがって、その抗CD40治療剤での治療介入は正当化される。対照的に、「ネガティブな治療結果を示す」は、患者が、考慮中の抗CD40治療剤での治療介入から恩恵を受けない増加された可能性を意味するように意図され、したがって、その抗CD40治療剤での治療介入は正当化されない。

【0095】

CD40L媒介性CD40シグナル伝達を調節する抗CD40治療剤での治療介入で達成され得る有利な結果は、任意のポジティブな治療的応答を含む。自己免疫疾患および/または炎症性疾患に関しての「ポジティブな治療的応答」によって、これらの抗体またはその抗原結合性フラグメントとの抗炎症性活性に関連する該疾患の改善、ならびに/あるいは該疾患に関連する症状の改善が意図される。即ち、抗増殖性効果；CD40発現細胞のさらなる増殖の防止；炎症性サイトカイン、接着分子、プロテアーゼ、免疫グロブリン(CD40保有細胞がB細胞である場合)、それらの組み合わせ等を含むがこれらに限定されない炎症性応答の減少、抗炎症性タンパク質の増加された産生、自己反応性細胞の数の減少、免疫寛容の増加、自己反応性細胞生存の阻害、ならびに/あるいはCD40発現細胞の刺激によって媒介される1以上の症状の減少が観察され得る。このようなポジティブな治療的応答は、投与経路に限定されず、そしてドナー、ドナー組織(例えば、臓器かん流等)、ホスト、それらの任意の組み合わせ等への投与を含み得る。

【0096】

臨床応答は、磁気共鳴画像(MRI)スキャン、X線画像法、コンピュータ断層撮影(CT)スキャン、フローサイトメトリーまたは蛍光活性化細胞選別装置(FACS)分析、組織学、肉眼病理学(gross pathology)、および血液化学(ELISA、RIA、クロマトグラフィー等によって検出可能な変化が挙げられるがこれらに限定されない)等のスクリーニング技術を使用して評価され得る。これらのポジティブな治療的応答に加えて、抗CD40治療剤での治療を受ける被験者は、該疾患に関連する症状の改善の有利な効果を経験し得る。

【0097】

ある実施形態において、本発明の方法における使用のためのエキスピボ予測アッセイは、以下を含む：本明細書中に記載の抗CD40治療剤での治療介入についての予測(prognosis)が必要である被験者由来のテスト用生物学的サンプルおよびコントロー

10

20

30

40

50

ル用生物学的サンプルを提供すること、ここで、該テスト用およびコントロール用生物学的サンプルは、インビトロまたはエクスピボのいずれかで、CD40リガンドで刺激されたCD40発現細胞を含む；該テスト用生物学的サンプルと有効量の目的の抗CD40治療剤とを接触させること；このテスト用生物学的サンプル中の少なくとも1つのバイオマーカのレベルを検出すること、ここで、該バイオマーカは、目的の抗CD40治療剤の作用機序に依存して、細胞アポトーシスのバイオマーカ、CD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のバイオマーカ、および細胞生存のバイオマーカからなる群から選択される；ならびに、該テスト用生物学的サンプル中の該バイオマーカのレベルと、該抗CD40治療剤と接触されていない、該コントロール用生物学的サンプル中で検出される該バイオマーカのレベルとを比較すること。抗CD40治療剤が、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するかまたはこれに干渉し、そしてまたADCCを調節するアンタゴニストである場合、細胞増殖および生存、アポトーシス、ならびにCD40L媒介性CD40シグナル伝達のこれらのバイオマーカのいずれかまたは全てについての本明細書中に開示されるエクスピボ予測アッセイは、その抗CD40治療剤での治療に対して応答性である炎症性疾患または自己免疫疾患を有する被験者を同定するために、CD40L媒介性CD40シグナル伝達によってアップレギュレートされるサイトカインマーカについてのアッセイ、および/または本明細書中に記載のCD40関連因子の1以上についてのアッセイと組み合わせるあるいは単独で、該治療剤の可能性のある有利な効果を評価するために使用され得る。抗CD40治療剤が、ADCC活性を調節することによるその作用機序を有する場合（例えば、抗CD40抗体）、アポトーシスの1以上のマーカについてのエクスピボ予測アッセイが、その抗CD40治療剤での治療に対して応答性である炎症性疾患または自己免疫疾患を有する被験者を同定するために、本明細書中に記載の1以上のCD40関連因子についてのアッセイと組み合わせるあるいは単独で、該治療剤の可能性のある有利な効果を評価するために使用され得る。

#### 【0098】

本発明のエクスピボ予測アッセイによれば、目的の抗CD40治療剤と接触されているテスト用生物学的サンプル中の、1以上のバイオマーカ、および必要に応じて1以上のサイトカインマーカの発現レベルが、コントロール用生物学的サンプル中の該バイオマーカおよび必要に応じてサイトカインマーカの発現レベルと比較される。「テスト用生物学的サンプル」によって、候補被験者から得られたCD40発現細胞を含む生物学的サンプルが意図され、そしてこれは、候補被験者の治療のための考慮中の抗CD40治療剤と接触される。「コントロール用生物学的サンプル」によって、テスト用生物学的サンプルと比較され得る生物学的サンプルが意図され、ここで、それはまた、ほぼ同じ数および種類のCD40発現細胞を含み、そしてテスト用生物学的サンプルを得るために使用されたものと等しい様式および同じ時間枠で候補被験者から得られており、そしてこれは、テストサンプルと同一の実験条件下に供され、しかしこれは、目的の抗CD40治療剤とは接触されない。テスト用生物学的サンプルおよびコントロール用生物学的サンプルは、被験者から得られた単一の生物学的サンプルから提供され得、そしてその一方がテスト用生物学的サンプルと呼ばれそしてそのもう一方がコントロール用生物学的サンプルと呼ばれるサブサンプルへ分割され得る。あるいは、テスト用生物学的サンプルおよびコントロール用生物学的サンプルは、2以上の生物学的サンプルから提供され得、これらはプールされ得、そして次いで上述のサブサンプルへ細分され得るか、あるいはこれらは、個々に、テスト用生物学的サンプルおよびコントロール用生物学的サンプルを示し得る。

#### 【0099】

候補被験者から得られたCD40発現細胞が、生物学的サンプルの回収前にインビボでCD40Lによって構造的に刺激されているかもしれないと認識される一方、CD40関連活性、例えば、細胞増殖およびCD40シグナル伝達の刺激に対する抗CD40治療剤のアンタゴニスト効果が効果的に評価され得るように、テスト用およびコントロール用生物学的サンプルのCD40発現細胞をエクスピボで刺激することが好ましい。

#### 【0100】

この様式において、CD40発現細胞のテスト用生物学的サンプルと目的の抗CD40治療剤とを接触させる前に、候補被験者から回収された任意の所定の生物学的サンプル中のCD40発現細胞は、エキスビボ予測アッセイにおいて使用されるテスト用およびコントロール用生物学的サンプルのCD40発現細胞上におけるCD40シグナル伝達のアップレギュレーションを確実にするために、例えばCD40Lで刺激され得る。可溶性CD40Lが挙げられるがこれに限定されないCD40Lの任意の供給源が使用され得る。他の好適なCD40刺激分子としては、例えば、CD40の細胞外ドメインへ特異的に結合するアゴニスト抗体が挙げられ得る。したがって、ある実施形態において、好適なCD40刺激分子としては、膜結合CD40L（例えば、細胞の原形質膜へ結合されたCD40L、例えば、CD40Lを発現するホルムアルデヒド固定CHO細胞トランスフェクタント；またはリポソームもしくはミセル等の合成脂質ベースの支持体へ組み込まれたCD40L）、可溶性CD40L、アゴニスト抗CD40抗体、例えば、抗ヒトCD40抗体G28-5（Bristol-Myers Squibb, Seattle, Washington）、ならびにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。1以上のCD40シグナル伝達経路を刺激するための、回収された生物学的サンプルまたはそのサブサンプルの細胞と接触される刺激分子の有効量は、使用されるリガンドのタイプ等の因子（例えば、単量体または多量体；溶解性および透過性等）およびCD40発現細胞上のCD40受容体の量に依存する。好ましくは、約1.0nM～約1mMのCD40Lまたは可溶性CD40Lが、CD40シグナル伝達を刺激するために使用される。

#### 【0101】

ある実施形態において、生物学的サンプルまたはそのサブサンプル中のCD40発現細胞は、CD40シグナル伝達を刺激するに十分な時間の間、可溶性CD40Lと共に該生物学的サンプルまたはそのサブサンプルをインキュベートすることによって、接触工程前に、可溶性組換えヒトCD40L（Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK）で刺激される。ある実施形態において、インキュベーション時間は、約10分～約4時間である。インキュベーション期間の間存在する可溶性CD40Lの量は、滴定によって容易に測定される。1実施形態において、可溶性CD40Lの量は約1μg/mLである。テスト用生物学的サンプルを目的の抗CD40治療剤と接触させるための任意の受理可能なプロトコルが、本発明のエキスビボ予測アッセイにおいて使用され得る。考慮される因子としては、生物学的サンプルまたはそのサブサンプルを含む容器中の接触される細胞の数；テスト用生物学的サンプルと接触される抗CD40治療剤の濃度；テスト用生物学的サンプル中における細胞と抗CD40治療剤とのインキュベーション時間；適用可能である場合、テスト用生物学的サンプルと接触される、刺激分子、例えば、CD40L、可溶性CD40L、またはその刺激性フラグメントもしくは変異体の濃度；ならびに、適用可能である場合、テスト用生物学的サンプル中の該細胞との該刺激分子のインキュベーション時間が挙げられるが、これらに限定されない。このような因子の決定は、テストされる生物学的サンプルのタイプ、保持容器のサイズ、該容器中の液体の量、試験される抗CD40治療剤の化学的組成（即ち、サイズ、量（charge）等）等の変数に基づいて、当業者によって達成され得る。

#### 【0102】

1実施形態において、好適な数のCD40発現細胞を含むテスト用生物学的サンプルまたはそのサブサンプルが、96ウェル組織培養皿へ添加される。細胞の好適な数は、本明細書中の他の箇所記載される1以上の検出方法を使用して1以上のCD媒介活性（即ち、細胞増殖および細胞生存、アポトーシスのレベル、CD40シグナル伝達経路）の変化が検出され得る細胞数である。ある実施形態において、好適な細胞数は、96ウェル組織培養皿の1ウェル当たり約1～約 $1 \times 10^6$ 細胞である。組織培養皿への細胞の添加に続いて、細胞は、該細胞と抗CD40治療剤との接触前に、約0～約96時間、プレインキュベートされ得る。ある実施形態において、細胞は、本明細書で上述のCD40刺激分子と共にプレインキュベートされる。

#### 【0103】

有効量の抗CD40治療剤が、本明細書中の他の箇所が開示される1以上の検出方法を使用して調節が検出可能となるように、目的のCD40媒介活性(即ち、CD40L媒介性CD40シグナル伝達、CD40へ結合する薬剤のADCC活性、または両方)の調節を提供するために、テスト用生物学的サンプルの細胞へ添加される。有効量は、当然ながら、試験される抗CD40治療剤に依存する。一般的に、抗CD40治療剤の有効量は、96ウェルプレートの1ウェル当たり約1nM~約10mMの薬剤である。1実施形態において、抗CD40治療剤は、アンタゴニスト抗CD40抗体、例えば、CHIR-12.12またはCHIR-5.9完全ヒトモノクローナル抗体、またはその抗原結合性フラグメントであり、そして有効量は、約0.01μg/mL~約30μg/mLであり、約0.01μg/mL、0.1μg/mL、0.5μg/mL、1μg/mL、5μg/mL、10μg/mL、20μg/mL、および30μg/mL、ならびに約0.01μg/mL~約30μg/mLの他のこのような値を含む。テスト用生物学的サンプルまたはそのサブサンプル中の細胞は、抗CD40治療剤を細胞と相互作用させかつ1以上の生物学的応答を生じさせるに好適な長さの時間の間、インキュベートさせる。ある実施形態において、抗CD40治療剤とテスト用生物学的サンプルまたはそのサブサンプルの細胞との好ましいインキュベーション時間は、約1分~約48時間である。他の実施形態において、インキュベーション時間は、約20分、約30分、約1時間、約4時間、約12時間、約22時間、または約24時間である。

#### 【0104】

テスト用およびコントロール用生物学的サンプルとして役立つ生物学的サンプルは、CD40抗原を発現する細胞を含む細胞、組織または体液の任意のコレクションであり得る。このような生物学的サンプルの例としては、血液、リンパ、組織サンプル、スミア等が挙げられるが、これらに限定されない。生物学的サンプルは、当該分野における任意の受理可能な手順を使用して、例えば、体液の針吸引、組織サンプルの除去等によって、候補被験者から回収され得る。生物学的サンプルがアッセイ前に保存されなければならない場合、生物学的サンプルは、スライドガラスへ移され得るか、あるいは後での調製のために凍結され得るかまたは固定液中に直ぐに配置され得る。

#### 【0105】

前述されるように、タンパク質またはヌクレオチドレベルでの目的のバイオマーカーの検出は、当業者に公知の任意の方法を使用して達成され得る。「発現を検出すること」または「のレベルを検出すること」によって、生物学的サンプル中のバイオマーカータンパク質または遺伝子の量または存在を測定することが意図される。したがって、「発現を検出すること」は、バイオマーカーが、発現されていない、検出可能に発現されていない、低レベルで発現されている、通常レベルで発現されている、または過剰発現されていると測定される場合を含む。CD40L媒介性CD40シグナル伝達に対する抗CD40治療剤の効果を測定するために、CD40リガンドで(インビボまたはエクスピボのいずれかで)刺激されたCD40発現細胞を含むテスト用生物学的サンプルが、該治療剤に細胞応答を生じさせるに十分な時間の間、抗CD40治療剤と接触され、そして次いで、そのテスト用生物学的サンプル中の目的の1以上のバイオマーカーの発現レベルが、該抗CD40治療剤と接触されていないコントロール用生物学的サンプル中で検出される発現レベルと比較される。ある実施形態において、細胞のコントロール用生物学的サンプルは、CD40L媒介性CD40シグナル伝達に干渉しない中性物質またはネガティブコントロールと接触される。例えば、1実施形態において、CD40へ結合しない非特異的免疫グロブリン(例えば、IgG1)がネガティブコントロールとして役立つ。検出は、経時でのバイオマーカーの変化のモニタリングを可能にする時間の間、起こり得る。検出はまた、目的の任意の所定のバイオマーカーについての「用量応答」曲線を作成するために、種々の濃度の抗CD40治療剤への暴露を伴って起こり得る。

#### 【0106】

テスト用およびコントロール用生物学的サンプル中の、本発明のバイオマーカー、および必要に応じてサイトカインマーカーの発現を検出するための方法は、核酸またはタンバ

10

20

30

40

50

ク質レベルでの該マーカーの量または存在を測定する任意の方法を含む。このような方法は、当該分野において周知であり、そしてウエスタンブロット、ノザンブロット、E L I S A、免疫沈降、免疫蛍光検査法、フローサイトメトリー、免疫組織化学、核酸ハイブリダイゼーション技術、核酸逆転写法、および核酸増幅法が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、バイオマーカーの発現は、例えば、特定のバイオマーカータンパク質に対して指向される抗体を使用して、タンパク質レベルにおいて検出される。これらの抗体は、ウエスタンブロット、E L I S A、多重化技術 ( m u l t i p l e x i n g t e c h n o l o g i e s )、免疫沈降、または免疫組織化学技術等の種々の方法で使用され得る。ある実施形態において、サイトカインマーカーの検出は、電気化学発光 ( E C L ) によって達成される。バイオマーカーおよび必要に応じてサイトカインマーカーについてのこれらの検出方法のいずれも、臨床情報の評価、従来の予測方法、他の C D 4 0 関連因子の発現、特に細胞表面 C D 4 0 および / または C D 4 0 L の発現ならびに可溶性 C D 4 0 および / または C D 4 0 L の循環レベル、ならびに本明細書において上述のものに限定されないがこれらを含む、当該分野において公知の臨床的に有用な予測マーカーの発現または存在と組み合わせられ得る。この様式において、開示される方法は、自己免疫疾患または炎症性疾患が本明細書中に記載の抗 C D 4 0 治療剤での治療介入から恩恵を受ける候補被験者のより正確な決定を可能にし得る。

#### 【 0 1 0 7 】

したがって、ある実施形態において、C D 4 0 発現細胞に関連する炎症性または自己免疫疾患を有する候補被験者は、本明細書に記載のエキスピボ予測アッセイを使用して、目的の抗 C D 4 0 治療剤に対する応答性について試験され、ここで、1 以上の C D 4 0 媒介活性に対する該治療剤の効果が評価される。エキスピボ予測アッセイのさらなる改良が望ましい場合、候補被験者は、本明細書上に記載の 1 以上の C D 4 0 関連因子、本明細書上に記載のものを含む 1 以上の臨床的に有用な予測マーカー、または両方の、発現のレベルまたは発現の非存在について、検査され得る。この様式において、C D 4 0 発現細胞を含む生物学的サンプルは、候補被験者から回収され得、そして目的の C D 4 0 関連因子および / または臨床的に有用な予測マーカーの発現のレベルまたは発現の非存在について評価され得る。本明細書上に記載の C D 4 0 発現細胞を含む任意の生物学的サンプルが、これらの予測アッセイのために回収され得る。さらに、当業者に公知の任意の検出方法が、本明細書の他の箇所で記載されるように、目的の C D 4 0 関連因子および / または臨床的に有用な予測マーカーの発現のレベルまたは発現の非存在を検出するために使用され得る。

#### 【 0 1 0 8 】

1 以上の C D 4 0 関連因子の発現レベルが、抗 C D 4 0 治療剤での治療に応答性である炎症性疾患または自己免疫疾患を有する被験者を同定するために評価される場合、生物学的サンプルが被験者から回収され、そしてそのサンプル中の発現レベルが、コントロールまたは参照標準中のその因子の発現レベルと比較される。細胞表面 C D 4 0 および / または細胞表面 C D 4 0 L の発現レベルについて、C D 4 0 発現および / または C D 4 0 L 発現細胞を含む任意の生物学的サンプルが、本明細書上に記載のように、使用され得る。s C D 4 0 および / または s C D 4 0 L の循環レベルについて、血液サンプルあるいは血漿または血清等の血液成分を含むサンプルが、候補被験者から得られ得る。「コントロール」または「参照標準」によって、同一の生物学的供給源のものであり ( 即ち、組織または体液 ) かつ炎症性または自己免疫疾患を有する被験者と該疾患に苦しんでいない健常者とを区別する基準が意図される。当業者は、該疾患を有さない健常者および該疾患を有する被験者中のこれらの C D 4 0 関連因子 ( 即ち、細胞表面 C D 4 0、細胞表面 C D 4 0 L、s C D 4 0、s C D 4 0 L ) の発現レベルを測定し、年齢、性別、人種等について制御し、そしてこれらの発現レベルを比較して健常者において予期される標準的な発現レベルを決定することによって、参照標準を提供することができる。ある実施形態において、炎症性または自己免疫疾患を有する候補被験者における発現レベルは、参照標準における発現レベルよりも少なくとも 2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、

10

20

30

40

50

100%、150%、200%、250%、300%高い。抗CD40治療剤での治療の適用性は、1以上のこれらのCD40関連因子の発現レベルを検出することによって評価され得ることが認識され、ここで、参照標準と比べて生物学的サンプル中の増加された発現レベルは、該被験者が目的の抗CD40治療剤での治療に応答性であろう炎症性または自己免疫疾患を有することを確立するに十分であり、CD40媒介活性に対する抗CD40治療剤のエクスピボ効果（例えば、細胞生存および増殖、ならびに/あるいはADCC活性）についてさらにスクリーニングする必要がない。

#### 【0109】

本発明はまた、本発明のエクスピボ予測アッセイを行うためのキットを包含する。例えば、該キットは、生物学的サンプル中において、タンパク質または核酸レベルで、本明細書中に記載のバイオマーカー、例えば、アポトーシス、細胞増殖または生存、あるいはCD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のバイオマーカーを検出し得る標識された化合物または薬剤と、目的の抗CD40治療剤との該サンプルのインキュベーションに続いて、該サンプル中の該バイオマーカーの量を測定するための手段（例えば、目的のバイオマーカーをコードするRNAへ結合するオリゴヌクレオチドプローブまたは抗体）とを含み得る。キットは、目的の各個のバイオマーカーを検出し得る個々の標識された化合物または薬剤と該サンプル中の各バイオマーカーの量を検出するための手段とを含めることによって、目的の複数のバイオマーカーの検出を可能にするように包装され得る。キットはまた、該エクスピボ予測アッセイが抗CD40治療剤でのポジティブな治療結果を示す結果を生じる場合に被験者を治療するための指示書を含み得る。

#### 【0110】

抗体ベースのキットについて、該キットは、例えば、以下を含み得る：（1）目的のバイオマーカーへ結合する第1抗体（例えば、固体支持体へ結合される）；および、必要に応じて、（2）該バイオマーカーまたは該第1抗体へ結合し、そして検出可能な薬剤へ結合されている、第2の異なる抗体。オリゴヌクレオチドベースのキットについて、該キットは、例えば、以下を含み得る：（1）バイオマーカーをコードする核酸配列へハイブリダイズするオリゴヌクレオチド（例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド）、または（2）目的のバイオマーカーをコードする核酸分子を増幅するに結うような一対のプライマー。キットはまた、例えば、緩衝液、保存剤、またはタンパク質安定剤を含み得る。キットはまた、検出可能な薬剤（例えば、酵素または基質）を検出するために必要な成分を含み得る。キットはまた、アッセイされそして含まれるテストサンプルと比較され得るコントロールサンプルまたは一連のコントロールサンプルを含み得る。キットの各成分は、通常、個々の容器内に入れられ、そして種々の容器の全ては、試験された被験者が抗CD40治療剤での治療についての候補であるかどうかを観察するための指示書と共に、単一のパッケージ内にある。

#### 【0111】

##### 検出方法

候補被験者の生物学的サンプル中のバイオマーカー、サイトカインマーカー、または目的のCD40関連因子タンパク質（例えば、細胞生存または増殖のバイオマーカー、アポトーシスのバイオマーカー、CD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のバイオマーカー、循環可溶性CD40またはCD40L、細胞表面CD40またはCD40L、あるいは臨床的に有用な予測マーカー）を特定しそして定量するための任意の手段が、考慮される。したがって、ある実施形態において、生物学的サンプル中の目的のバイオマーカータンパク質の発現レベルは、そのバイオマーカータンパク質またはその生物学的に活性化変異体と特異的に相互作用し得る結合性タンパク質の手段によって検出される。好ましくは、標識された抗体、その結合性部分、または他の結合パートナーが、使用され得る。用語「標識」は、本明細書中で使用される場合、「標識された」抗体を作製するように、抗体へ直接的にまたは間接的に結合されている検出可能な化合物または組成物をいう。標識は、それ自体検出可能であってもよく（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、あるいは、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学変化を触媒してもよ

い。バイオマーカータンパク質の検出のための抗体は、起源がモノクローナルであってもポリクローナルであってもよく、あるいは合成的にまたは組換えで作製されてもよい。複合化タンパク質の量、例えば、結合性タンパク質（例えば、該バイオマーカータンパク質へ特異的に結合する抗体）と結合されたバイオマーカータンパク質の量は、当業者に公知の票銃的なタンパク質検出方法を使用して測定される。免疫アッセイ設計、理論およびプロトコルの詳細なレビューは、当該分野における多数のテキストにおいて見られ得る（例えば、Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY)); Coligan et al., eds. (1994) *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc., New York, NYを参照のこと)。

10

**【0112】**

種々のアッセイが、標識された抗体でタンパク質を検出するために利用可能である。ワンステップアッセイにおいて、検出される目的の標的タンパク質は、もしそれが存在するならば、固定化され、そして標識された抗体と共にインキュベートされる。標識された抗体は、固定化された標的タンパク質分子へ結合する。結合されていない分子を除去するために洗浄した後、標識の存在についてサンプルをアッセイする。標準形式において、1サンプル当たり単一のタンパク質がアッセイされる。最近の多重化技術を使用して、複数のタンパク質が、各検出工程について異なる標識を使用することによって、単一のサンプル中においてアッセイされ得る。

20

**【0113】**

ツーステップアッセイにおいて、目的の固定化された標的タンパク質分子が、標識されていない抗体と共にインキュベートされる。次いで、標的タンパク質-非標識抗体複合体は、存在する場合、該非標識抗体について特異的である第2の標識抗体へ結合される。サンプルが洗浄され、標識の存在についてアッセイされる。

**【0114】**

抗体を標識するために使用されるマーカーの選択は、適用に依存して変化する。しかし、マーカーの選択は、当業者に容易に決定され得る。これらの標識抗体は、目的のバイオマーカータンパク質の存在を検出するために、免疫学的検定ならびに組織学的適用において使用され得る。標識抗体は、ポリクローナルであってもモノクローナルであってもよい。さらに、目的のタンパク質を検出することにおける使用のための抗体は、本明細書中の他の箇所に記載されるように、放射性原子、酵素、発色性または蛍光性部分、あるいは比色タグで標識され得る。タグ標識の選択は、所望の検出制限に依存する。酵素アッセイ (ELISA) は、典型的に、酵素でタグ付けされた複合体と酵素基質との相互作用によって形成される着色産物の検出を可能にする。検出可能な標識として役立つ放射性核種としては、例えば、I - 131、I - 123、I - 125、Y - 90、Re - 188、Re - 186、At - 211、Cu - 67、Bi - 212、およびPd - 109が挙げられる。検出可能な標識として役立つ酵素の例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、およびグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼが挙げられるが、これらに限定されない。発色部分としては、フルオレセインおよびローダミンが挙げられるが、これらに限定されない。抗体は、当該分野において公知の方法によって、これらの標識へ結合され得る。例えば、酵素および発色分子は、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド等のカップリング剤によって抗体へ結合され得る。あるいは、結合は、リガンド-レセプター対を介して生じ得る。好適なリガンド-レセプター対の例は、ビオチン-アビジンまたはビオチン-ストレプトアビジン、および抗体-抗原である。

30

40

**【0115】**

ある実施形態において、本発明は、血清または他の生物学的流体中の、本明細書中において上述のような1以上のバイオマーカーまたは目的の他のタンパク質を検出するための

50

サンドイッチ技術の使用を考慮する。国際公開番号WO93/09437に記載されるように、このような技術は、目的のタンパク質を結合し得る2つの抗体を使用する：例えば、これらの一方は、検出可能な化合物で標識されているが溶液中に遊離しており、これらのもう一方は、固体支持体上へ固定されている。第2抗体について使用され得る化学標識の例としては、放射性同位体、蛍光化合物、および酵素、あるいは反応物質または酵素基質へ暴露されると着色されたまたは電気化学的に活性な生成物を生じる他の分子が挙げられるが、これらに限定されない。目的のバイオマーカまたは他のタンパク質を含有するサンプルが、このシステムへ置かれると、目的のバイオマーカまたは他のタンパク質は、固定化抗体および標識抗体の両方へ結合する。結果は、支持体表面上の「サンドイッチ」免疫複合体である。複合体化されたタンパク質は、結合されていないサンプル成分および過剰の標識抗体を洗浄除去し、そして支持体表面上のタンパク質へ複合体化された標識抗体の量を測定することによって、検出される。サンドイッチ免疫学的検定法は、十分な検出限界を有する標識が使用される場合、非常に特異的かつ非常に高感度である。

10

## 【0116】

生物学的サンプルは個々にスクリーニングされ得；あるいは、生物学的流体の多数のサンプルが、例えば、広範囲に使用されかつ容易に自動化可能である従来の96ウェルマイクロタイターフォーマットを使用して、同時にスクリーニングされ得る。96ウェルプレートは熱量測定的に分析するために、いくつかの市販の分光器（「プレートリーダー」）もまた存在する。さらに、生物学的サンプルが、当該分野において周知の方法を使用して、1つのバイオマーカ、または複数のマーカ、例えば一団のバイオマーカについてスクリーニングされ得る。

20

## 【0117】

好ましい実施形態において、生物学的サンプル（例えば、体液のサンプル）中の1以上のバイオマーカまたは目的の他のタンパク質の発現が、ラジオイムノアッセイまたは酵素免疫測定法（ELISA）、競合的結合酵素免疫測定法、ドットプロット（例えば、Promega Protocols and Applications Guide（2<sup>nd</sup> ed. ; Promega Corporation（1991）を参照のこと）、ウエスタンプロット（例えば、Sambrook et al.（1989）Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Vol. 3, Chapter 18（Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY）を参照のこと）、クロマトグラフィー、好ましくは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、あるいは当該分野に公知の他のアッセイによって検出される。したがって、検出アッセイは、免疫プロット、免疫拡散、免疫電気泳動、または免疫沈降等の工程を含み得るが、これらに限定されない。

30

## 【0118】

任意の所定のタンパク質検出アッセイについて、CD40発現細胞を含む生物学的サンプルまたはそのサブサンプルが、抗体-抗原複体の形成を可能にするに十分な時間の間、結合パートナー、例えば、目的のバイオマーカまたは他のタンパク質についての、抗体、または検出可能に標識された抗体と接触され、そして次いで、抗体結合が、本明細書上記に記載の任意の手段によって検出される。バイオマーカ、CD40関連因子、および本明細書中に記載の臨床的に有用な予測マーカに対する抗体および検出可能に標識された抗体は、当該分野において周知であり、そして市販されている。例えばCell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts ; DAKO, Copenhagen, Denmark等から市販される、アポトーシス、細胞生存、およびCD40シグナル伝達経路、ならびに臨床的に有用な予測マーカに対して特異的な抗体を例えば参照のこと。あるいは、抗体またはこれらの抗体の検出可能に標識された形態は、当該分野に周知の抗体産生法を使用して、作製され得、そして本明細書以下においてさらに説明される。

40

## 【0119】

カスパーゼのバイオマーカについての多数のアッセイキットが市販されている。例え

50

ば、Homogeneous Caspases Assay (Roche Applied Sciences, Indianapolis, Indiana) は、マイクロプレートにおけるカパーゼ活性の定量的インビトロ測定についての蛍光分析である。アッセイは、例えば、96ウェルプレートにおける100の検査、および384ウェルプレート (Cat. No. 3005372) における400の検査を可能にする、ハイスループットスクリーニングのために特に有用である。このアッセイは、例えば血清または血漿を含む生物学的サンプル中の、カパーゼ-2、カパーゼ-3、カパーゼ-7、および少ない程度に、カパーゼ-6、カパーゼ-8、カパーゼ-9、およびカパーゼ-10を含む、いくつかのカパーゼの検出を可能にする。Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> アッセイ (Cat. No. 1774425; Roche Applied Sciences, Indianapolis, Indiana) は、それぞれDNAおよびヒストンへ向けられたマウスモノクローナル抗体を使用する、定量サンドイッチ-酵素-免疫アッセイ原理に基づく。このアッセイは、アポトーシスから死んだ細胞の細胞質へ放出されるモノおよびオリゴヌクレオソームの特異的検出および定量を可能にする。それは、細胞溶解産物、血清、培養上澄み液等を含む、種々のサンプルについて使用され得る。

10

## 【0120】

細胞表面PSは、PSについてのアネキシンVの高親和性に基づく、任意の市販のアネキシンV染色試薬を使用して検出され得る。例えば、Roche Applied Scienceから市販されるアネキシンV染色試薬を参照のこと。FITCをアネキシンVへ結合することによって、フローサイトメトリーにより単一細胞に基づくアポトーシス細胞を同定および定量することが可能である。FITC-アネキシンV (緑色蛍光) および失活 (non-vital) 色素ヨウ化プロピジウム (赤色蛍光) で細胞を同時に染色することは、インタクトな細胞 (FITC-PI-)、初期アポトーシス (FITC+PI-)、および後期アポトーシスまたは壊死細胞 (FITC+PI+) の識別を提供し得る。

20

## 【0121】

さらに、生物学的サンプル中の上昇されたアポトーシスは、アポトーシスの特徴であるDNAフラグメント化を検出する核酸ベースの方法で確認され得る。アガロースゲルにおける電気泳動を使用して分割された場合、アポトーシスDNAは、例えば壊死または他の非特異的DNA分解において観察される核酸のスミアとは対照的に、最初、特徴的な「はしご (ladder)」パターンを有する。DNAフラグメント化を検出するための一般的な組織化学技術は、末端標識されたDNAを使用する。このようなものためのキット、例えば、APOLERT DNAフラグメント化キット (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California) は、市販されている。このアッセイは、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (Tdt) によるdUTPニック末端標識化 (TUNEL) に基づき、ここで、Tdtは、アポトーシスを受ける細胞中のフラグメント化DNAの遊離3'ヒドロキシル末端でのフルオレセイン-dUTPの組込みを触媒する。

30

## 【0122】

当該分野において公知の任意の方法が、サイトカインマーカの産生を検出するために使用され得る。標準的なアッセイはELISA形式を含み、ここで、1サンプル当たり1サイトカインが測定される。あるいは、より感受性の高い技術は、電気化学発光 (ECL) である。1実施形態において、サイトカイン産生は、例えば、高性能サイトカインアッセイのための市販のMeso Scale Discovery (登録商標) システム (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland) 等のマルチアレイシステムを使用して、ECLを使用してアッセイされる。サンプル中の複数のサイトカイン (または他の被分析物) を1度で測定することを可能にする他のフォーマットとしては、多重化技術 (multiplex technologies) が挙げられる。1つのこのような製品は、Luminex (登録商標) ビーズテクノロ

40

50

ジー (Luminex Corporation, Austin, Texas) であり、ここで、特定のバイオアッセイに特異的な試薬 (例えば、サイトカインに対する抗体) でコーティングされた 100 色までの着色マイクロスフェアが、一緒に混合され得、そしてレーザー技術を使用して分析され得る。

【0123】

候補被験者から得られた生物学的サンプル中の、本明細書中に記載の 1 以上のバイオマーカー、サイトカイン、CD40 関連因子、および臨床的に有用な予測マーカーの存在はまた、核酸レベルで測定され得る。発現を評価するための核酸ベースの技術は、当該分野において周知であり、そして例えば、生物学的サンプル中のバイオマーカー mRNA のレベルを測定することが挙げられる。多くの発現検出法は、単離された RNA を使用する。mRNA の単離に対して選択しない任意の RNA 単離技術が、RNA の精製のために使用され得る (例えば、Ausubel et al, ed. (1987-1999) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York を参照のこと)。さらに、多数の組織サンプルは、例えば米国特許第 4,843,155 号に開示されるシングルステップ RNA 単離法等の、当業者に周知の技術を使用して、容易に処理され得る。

10

【0124】

したがって、ある実施形態において、目的のバイオマーカーまたは他のタンパク質の検出は、核酸プローブを使用して核酸レベルでアッセイされる。用語「核酸プローブ」は、特に意図される標的核酸分子、例えば、ヌクレオチド転写物へ選択的に結合し得る任意の分子をいう。プローブは、当業者によって合成され得、あるいは好適な生物学的調製物から誘導され得る。プローブは、例えば、放射性標識、蛍光標識、酵素、化学発光タグ、比色タグ、あるいは上記で議論されるかまたは当該分野において公知である他の標識またはタグで、標識されるように特異的に設計され得る。プローブとして使用され得る分子の例としては、RNA および DNA が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0125】

例えば、単離された mRNA は、サザンまたはノザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析およびプローブ分析が挙げられるがこれらに限定されない、ハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイにおいて使用され得る。mRNA レベルの検出のための 1 つの方法は、単離された mRNA と、検出される遺伝子によってコードされる mRNA へハイブリダイズし得る核酸分子 (プローブ) とを接触させることを含む。核酸プローブは、例えば、全長 cDNA、またはその部分、例えば、長さが少なくとも 7、15、30、50、100、250 または 500 ヌクレオチドであり、かつ、本明細書上記に記載のバイオマーカー、CD40 関連因子、または臨床的に有用な予測マーカーをコードする mRNA またはゲノム DNA へストリンジントな条件下で特異的にハイブリダイズするに十分であるオリゴヌクレオチドであり得る。mRNA とプローブとのハイブリダイゼーションは、目的のバイオマーカーまたは他の標的タンパク質が発現されていることを示す。

30

【0126】

1 実施形態において、mRNA は、固体表面上に固定化され、そして、例えば、単離された mRNA をアガロースゲル上で移動させそしてゲルから膜 (例えば、ニトロセルロース) へ mRNA を移すことによって、プローブと接触される。代替の実施形態において、プローブが固体表面上へ固定化され、そして mRNA が、例えば遺伝子チップアレイにおいて、該プローブと接触される。当業者は、目的のバイオマーカーまたは他のタンパク質をコードする mRNA のレベルを検出することにおける使用のために、公知の mRNA 検出法を容易に採用し得る。

40

【0127】

サンプル中の目的の mRNA のレベルを測定するための代替の方法は、例えば、RT-PCR (例えば、米国特許第 4,683,202 号を参照のこと)、リガーゼ連鎖反応 (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193)、自立配列複製 (self-sustained sequence r

50

eplication) (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-ベータレプリカーゼ (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製 (米国特許第5,854,033号) または任意の他の核酸増幅法による核酸増幅のプロセス、続いて、当業者に周知の技術を使用しての増幅された分子の検出を含む。これらの検出スキームは、特に、このような分子が非常に少ない数で存在する場合の核酸分子の検出について有用である。本発明の特定の態様において、バイオマーカー発現、CD40 関連因子または他の臨床的に有用な予測マーカーの発現は、定量蛍光RT-PCR (即ち、TaqMan (登録商標) システム) によって評価される。

10

**【0128】**

目的のRNAの発現レベルは、メンブレンプロット (例えば、ノザン、ドット等のハイブリダイゼーション分析において使用される)、マイクロウェル、サンプルチューブ、ゲル、ビーズまたはファイバー (または結合された核酸を含む固体支持体) を使用して、モニタリングされ得る。米国特許第5,770,722号、第5,874,219号、第5,744,305号、第5,677,195号および第5,445,934号を参照のこと。これらは、参照により本明細書中に組み込まれる。発現の検出はまた、溶液中において核酸プローブを使用することを含み得る。

**【0129】**

20

本発明の1実施形態において、マイクロアレイが、1以上のバイオマーカー、CD40 関連因子、および/または臨床的に有用な予測マーカーの発現を検出するために使用される。マイクロアレイは、異なる実験間での再現性のために、この目的のために特によく適している。DNAマイクロアレイは、多数の遺伝子の発現レベルの同時測定のための1つの方法を提供する。各アレイは、固体支持体へ結合された捕捉プローブの再現可能なパターンからなる。標識されたRNAまたはDNAは、アレイ上の相補プローブへハイブリダイズし、次いで、レーザスキャニングによって検出される。アレイ上の各プローブについてのハイブリダイゼーション強度が測定され、相対的遺伝子発現レベルを示す定量値へ変換される。米国特許第6,040,138、第5,800,992号および第6,020,135号、第6,033,860号、および第6,344,316号を参照のこと。これらは、参照により本明細書中に組み込まれる。高密度オリゴヌクレオチドアレイは、サンプル中の多数のRNAについての遺伝子発現プロフィールを測定するために特に有用である。

30

**【0130】**

機械的合成法を使用するこれらのアレイの合成のための技術は、例えば、米国特許第5,384,261号に記載されており、その全体が、参照により本明細書中に組み込まれる。平面アレイ表面が好ましいが、アレイは、実質的に任意の形状の表面上において、または多様な表面上においてさえ、作製され得る。アレイは、ビーズ、ゲル、ポリマー表面、ファイバー (例えば、光ファイバー)、ガラス、または任意の他の好適な支持体上のペプチドまたは核酸であり得る。米国特許第5,770,358号、第5,789,162号、第5,708,153号、第6,040,193号および第5,800,992号を参照のこと。これらの各々は、全ての目的についてその全体が本明細書中に組み込まれる。アレイは、診断または包括的なデバイスなどの取り扱いを可能にするような様式で、パッケージされ得る。例えば、米国特許第5,856,174号および第5,922,591号を参照のこと。これらは、参照により本明細書中に組み込まれる。

40

**【0131】**

1つのアプローチにおいて、サンプルから単離されたトータルmRNAは、標識されたcRNAへ変換され、そして次いで、オリゴヌクレオチドアレイへハイブリダイズされる。各サンプルは別個のアレイへハイブリダイズされる。相対的転写物レベルが、サンプル中およびアレイ上に存在する好適なコントロールを参照して算出され得る。

50

## 【0132】

## 抗CD40治療剤

本明細書中に記載のエクスピボ予測アッセイは、目的の抗CD40治療剤での治療から恩恵を受ける、CD40発現細胞に関連する炎症性疾患および/または自己免疫疾患を有する被験者を同定するために使用され得る。特に興味深いのは、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を調節するおよび/またはADCCを調節する抗CD40治療剤である。このような抗CD40治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：CD40へ結合されると、CD40L媒介性シグナル伝達を遮断するかもしくはこれに干渉するおよび/またはADCC活性を調節するアンタゴニスト抗CD40抗体、CD40Lアンタゴニスト（抗CD40L抗体を含む）、CD40へ結合し得るがCD40シグナル伝達を誘導しないCD40Lの突然変異形態、可溶性CD40、CD40を含む融合タンパク質の可溶性形態、ならびにCD40L-CD40相互作用を崩壊させるかもしくはこれに干渉するおよび/またはCD40シグナル伝達に干渉する薬剤、例えば、米国特許出願公開第20040067982号（これは、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる）に開示されるCD40：CD40L結合妨害化合物。特に興味深いのは、アンタゴニスト抗CD40治療剤、例えば、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するに役立つ、アンタゴニスト抗CD40抗体およびアンタゴニスト抗CD40L抗体、またはそれらの抗原結合性フラグメント、ならびにADCCを調節する抗CD40治療剤、例えば、抗CD40抗体およびその抗原結合性フラグメントである。

10

## 【0133】

## （抗CD40抗体）

CD40に対するモノクローナル抗体は、当該分野において公知である。例えば、McMichael, ed. (1987; 1989) *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, New York)におけるB細胞抗原に関する箇所；米国特許第5,674,492号；第5,874,082号；第5,677,165号；第6,056,959号；WO00/63395；国際公開番号WO02/28905およびWO02/28904；Gordon et al. (1988) *J. Immunol.* 140:1425；Valle et al. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19:1463；Clark et al. (1986) *PNAS* 83:4494；Paulie et al. (1989) *J. Immunol.* 142:590；Gordon et al. (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:1535；Jabara et al. (1990) *J. Exp. Med.* 172:1861；Zhang et al. (1991) *J. Immunol.* 146:1836；Gascan et al. (1991) *J. Immunol.* 147:8；Bancheureau et al. (1991) *Clin. Immunol. Spectrum* 3:8；ならびにBancheureau et al. (1991) *Science* 251:70を参照のこと；これらの全ては、参照により本明細書中に組み込まれる。他の抗CD40モノクローナル抗体としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ヒト化抗CD40抗体、例えば、SGN-40 (Tai et al. (2004) *Cancer Res.* 64:2846-52；米国特許第6,838,261号)、これは、マウス抗CD40抗体SGN-14 (Francisco et al. (2000) *Cancer Res.* 60:3225-31)のヒト化形態である；および米国特許出願公開第2004/0120948号に開示されるアゴニストおよびアンタゴニスト抗体；それらの全体が、参照により本明細書中に組み込まれる。

20

30

40

## 【0134】

1実施形態において、前記エクスピボ予測アッセイは、アンタゴニスト抗CD40抗体での治療の適合性または効果を検査するために使用される。本発明の方法における使用のためのアンタゴニスト抗CD40抗体としては、ヒト細胞の表面上で発現されたヒトCD40抗原へ特異的に結合し得る、モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント

50

が挙げられる。ある実施形態において、本発明の方法における使用のためのアンタゴニスト抗CD40抗体は、CD40細胞表面抗原について強い単一部位結合親和性を示す。このようなモノクローナル抗体は、Biacore™等の標準アッセイを使用して測定した場合、少なくとも $10^{-5}$  M、少なくとも $3 \times 10^{-5}$  M、好ましくは少なくとも $10^{-6}$  M ~  $10^{-7}$  M、より好ましくは少なくとも $10^{-8}$  M ~ 約 $10^{-12}$  Mの、CD40についての解離平衡定数( $K_D$ )を示す。Biacore分析は当該分野において公知であり、そして詳細は、「BIA applications handbook」に提供される。WO 01/27160に記載の方法が、結合親和性を調節するために使用され得る。

#### 【0135】

特に興味深いのは、ヒト細胞上のCD40抗原へ結合される場合に、本明細書上記に定義される顕著なアゴニスト活性を有さないがアンタゴニスト活性を示す、アンタゴニスト抗CD40抗体である。本発明の1実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体は、B細胞応答において顕著なアゴニスト活性を有さない。本発明の別の実施形態において、1以上のB細胞応答(例えば、増殖と分化、または、増殖と分化と抗体産生)のアッセイにおいて顕著なアゴニスト活性を有さない。好適なモノクローナル抗CD40抗体は、ヒト定常領域を有し;好ましくは、それらはまた、完全にまたは部分的にヒト化されたフレームワーク領域を有し;そして最も好ましくは、完全なヒト抗体またはその抗原結合性フラグメントである。このようなモノクローナル抗体の例は、CHIR-5.9およびCHIR-12.12と本明細書中で呼ばれる抗体である。

#### 【0136】

モノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12は、本発明の方法における使用についてアンタゴニスト抗CD40抗体を示す。CHIR-5.9およびCHIR-12.12抗体は、ハイブリドーマ細胞株131.2F8.5.9(本明細書中において細胞株5.9と呼ばれる)および153.8E2.D10.D6.12.12(本明細書中において細胞株12.12と呼ばれる)から産生されるIgG<sub>1</sub>アイソタイプの完全ヒト抗CD40モノクローナル抗体である。これらの細胞株は、ヒトIgG<sub>1</sub>重鎖およびヒト鎖座を含む免疫化ゼノタイプック(xenotypic)マウス由来の脾細胞を使用して作製された(Xenomouse(登録商標)technology; Abgenix; Fremont, California)。脾臓細胞は、マウスメラノーマSP2/0細胞(Sierra Biosource)と融合された。得られたハイブリドーマを数回サブクローン化し、安定な細胞株5.9および12.12を作製した。本発明の他の抗体は、ヒト免疫グロブリン座遺伝子導入マウスを使用して、あるいは当該分野において公知のおよび/または本明細書中に記載の他の方法によって、同様に作製され得る。

#### 【0137】

CHIR-12.12抗体の可変領域のヌクレオチドおよびアミノ酸配列、ならびにCHIR-5.9抗体の可変領域のアミノ酸配列が開示される。より詳細には、mAb CHIR-12.12についての軽鎖および重鎖についてのリーダー、可変、および定常領域についてのアミノ酸配列を、配列番号2(mAb CHIR-12.12の軽鎖についての完全配列)、配列番号4(mAb CHIR-12.12の重鎖についての完全配列)、ならびに配列番号5(配列番号4に記載のmAb CHIR-12.12の重鎖の変異体についての完全配列、ここで、該変異体は、配列番号4の153位のアラニン残基についてのセリン置換を含む)に記載する。mAb CHIR-12.12の軽鎖および重鎖をコードするヌクレオチド配列を、配列番号1(mAb CHIR-12.12の軽鎖についてのコード配列)および配列番号3(mAb CHIR-12.12の重鎖についてのコード配列)に記載する。CHIR-5.9 mAbについての軽鎖および重鎖についてのリーダー、可変、および定常領域についてのアミノ酸配列を、配列番号6(mAb CHIR-5.9の軽鎖についての完全配列)、配列番号7(mAb CHIR-5.9の重鎖についての完全配列)、ならびに配列番号8(配列番号7に記載のmAb CH

10

20

30

40

50

I R - 5 . 9 の重鎖の変異体についての完全配列、ここで、該変異体は、配列番号 7 の 1 5 8 位のアラニン残基についてのセリン置換を含む)に記載する。さらに、C H I R - 5 . 9 および C H I R - 1 2 . 1 2 抗体を発現するハイブリドーマを、それぞれ、P T A - 5 5 4 2 および P T A - 5 5 4 3 の特許寄託名で A T C C に寄託した。

【 0 1 3 8 】

アンタゴニスト活性に加えて、本発明の方法における使用のための抗 C D 4 0 抗体は、腫瘍細胞に対して別の作用機構を有し得る。例えば、天然 C H I R - 5 . 9 および C H I R - 1 2 . 1 2 抗体は、A D C C 活性を有する。あるいは、C H I R - 5 . 9 および C H I R - 1 2 . 1 2 抗体の可変領域は、A D C C 活性を有する別の抗体アイソタイプ上において発現され得る。本明細書下記に記載されるように、細胞毒、治療剤、または放射性金属イオンもしくは放射性同位体へ、C H I R - 5 . 9 または C H I R - 1 2 . 1 2 の天然形態、組換え形態、または抗原結合性フラグメントを結合させることも可能である。

【 0 1 3 9 】

C H I R - 5 . 9 および C H I R - 1 2 . 1 2 モノクローナル抗体は、E L I S A タイプアッセイにおいて可溶性 C D 4 0 へ結合し、細胞表面 C D 4 0 への C D 4 0 リガンドの結合を防止し、そしてフロサイトメトリーアッセイによって測定されるように、予め結合されている C D 4 0 リガンドを置換する。抗体 C H I R - 5 . 9 および C H I R - 1 2 . 1 2 は、C D 4 0 へ結合することについて互いに競合するが、1 5 B 8 [ 2 0 0 0 年 1 0 月 2 日に出願された「Human Anti - CD 4 0 Antibodies」という表題の米国仮出願シリアル番号 6 0 / 2 3 7 , 5 5 6、ならびに 2 0 0 1 年 1 0 月 2 日に出願された「Human Anti - CD 4 0 Antibodies」とまた表題が付けられた P C T 国際出願番号 P C T / U S 0 1 / 3 0 8 5 7 (代理人整理番号 P P 1 6 0 9 2 . 0 0 3) に記載される抗 C D 4 0 モノクローナル抗体；これらは両方とも、それらの全体が、参照により本明細書中に組み込まれる]とは競合しない。ヒト健常者由来の B 細胞の増殖に対する効果についてインビトロで試験される場合、C H I R - 5 . 9 および C H I R - 1 2 . 1 2 は、アンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体として作用する。さらに、C H I R - 5 . 9 および C H I R - 1 2 . 1 2 は、健常者由来のヒトリンパ球の強力な増殖を誘導しない。これらの抗体は、抗体依存性細胞性細胞傷害 (A D C C) によって、C D 4 0 発現標的細胞を死滅させ得る。B i a c o r e <sup>T M</sup> アッセイによって測定される場合、ヒト C D 4 0 についての C H I R - 5 . 9 の結合親和性は  $1 . 2 \times 1 0^{-8}$  M であり、そして C H I R - 1 2 . 1 2 の結合親和性は  $5 \times 1 0^{-10}$  M である。

【 0 1 4 0 】

上述のモノクローナル抗体 C H I R - 5 . 9 および C H I R - 1 2 . 1 2 の結合特徴を共有する他のアンタゴニスト抗 C D 4 0 抗体としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：( 1 ) それぞれ特許寄託番号 P T A - 5 5 4 2 および特許寄託番号 P T A - 5 5 4 3 として A T C C へ寄託された、1 3 1 . 2 F 8 . 5 . 9 (本明細書中で細胞株 5 . 9 と呼ばれる) および 1 5 3 . 8 E 2 . D 1 0 . D 6 . 1 2 . 1 2 (本明細書中で細胞株 1 2 . 1 2 と呼ばれる) という名のハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体；( 2 ) 配列番号 2 に示される配列、配列番号 4 に示される配列、配列番号 5 に示される配列、配列番号 2 および配列番号 4 に示される両方の配列、ならびに配列番号 2 および配列番号 5 に示される両方の配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体；( 3 ) 配列番号 6 に示される配列、配列番号 7 に示される配列、配列番号 8 に示される配列、配列番号 6 および配列番号 7 に示される両方の配列、ならびに配列番号 6 および配列番号 8 に示される両方の配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体；( 4 ) 配列番号 1 に示される配列、配列番号 3 に示される配列、ならびに配列番号 1 および配列番号 3 に示される両方の配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子によってコードされるアミノ酸配列を有するモノクローナル抗体；( 5 ) ハイブリドーマ細胞株 5 . 9 または 1 2 . 1 2 によって産生されるモノクローナル抗体に結合し得るエピトープに結合するモノクローナル抗体；( 6 ) 配列番号 1 0 または配列番号 1 2 に示されるアミノ酸配列の残基 8 2 ~ 8 7 を含むエピトープ

へ結合するモノクローナル抗体；(7)競合的結合アッセイにおいてモノクローナル抗体CHIR-5.9またはCHIR-12.12と競合するモノクローナル抗体；ならびに(8)CHIR-12.12またはCHIR-5.9モノクローナル抗体あるいは前記項目(1)~(7)の前記モノクローナル抗体の抗原結合性フラグメントであるモノクローナル抗体、ここで該フラグメントは、ヒトCD40抗原へ特異的に結合する能力を保持している。

#### 【0141】

当業者は、本明細書中に記載の抗体およびこれらの抗体の抗原結合性フラグメントが、当該分野において周知の方法を使用して組換えで作製されそして本明細書以下で記載される抗体およびその抗原結合性フラグメントを含み、そして例えば、組換えで作製されたモノクローナル抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12を含むことを認識する。

10

#### 【0142】

さらなるアンタゴニスト抗CD40抗体としては、5D12、3A8および3C6と呼ばれるモノクローナル抗体が挙げられ、これらは、それぞれATCCアクセッション番号HB 11339、HB 12024およびHB 11340を有するハイブリドーマによって分泌される。例えば、米国特許第6,315,998号を参照のこと；その全体が参照により本明細書中に組み込まれる。

#### 【0143】

他のアンタゴニスト抗CD40抗体は、当該分野において公知である。例えば、米国特許出願公開番号20020142358および20030059427に開示されるF4-465という名のハイブリドーマによって産生されるヒト抗CD40抗体を参照のこと；それらの全体が参照により本明細書中に組み込まれる。F4-465は、HACマウスから得られ(Kuroiwa et al(2000) Nature Biotech. 10:1086(2000))、そしてしたがってヒトラムダ軽鎖を発現する。

20

#### 【0144】

(アンタゴニスト抗-CD40L抗体)

CD40Lへ結合しそしてそれによってCD40/CD40L相互作用またはCD40L媒介性CD40シグナル伝達に干渉する抗体は、当該分野において公知である。例としては、国際特許公開WO95/06666に開示されるものが挙げられるが、これらに限定されず、その内容は、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる。具体例としては、American Type Culture Collection(ATCC)、10801 University Blvd., Manassas, Va. 20110-2209に寄託され、そしてそれぞれATCCアクセッション番号HB11713およびHB11712が付与された、それぞれ、89-76および24-31ハイブリドーマによって産生される、89-76および24-31と言う名のアンタゴニスト抗CD40L抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0145】

抗体の作製

本発明の方法における使用のための抗体、例えば、本明細書中に開示されるアンタゴニスト抗CD40抗体、および目的のバイオマーカーまたは他の臨床的に有用な予測マーカーへ特異的に結合する任意の抗体は、当業者に公知の任意の抗体産生方法を使用して作製され得る。したがって、ポリクローナル血清が従来の方法によって調製され得る。一般的に、目的の抗原(例えば、CD40抗原またはCD40L抗原)を含有する溶液が、先ず、好適な動物、好ましくは、マウス、ラット、ウサギ、またはヤギを免疫化するために使用され得る。ウサギまたはヤギが、得られ得る血清の量、ならびに標識された抗ウサギおよび抗ヤギ抗体の利用可能性に起因して、ポリクローナル血清の調製のために好ましい。

40

#### 【0146】

ポリクローナル血清は、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座を有するマウスにおいて、調製され得る。好ましい実施形態において、目的のタンパク質(例えば、CD40またはCD40L)を発現するSf9細胞が、免疫原として使用され

50

る。生理食塩水中において、好ましくはフロイント完全アジュバント等のアジュバント中において、該抗原含有溶液を混合または乳化し、そして該混合液または乳化液を非経口的に（一般的に、皮下または筋肉内に）注射することによって、免疫化はまた行われ得る。50 - 200  $\mu\text{g}$  / 注射の用量が典型的に十分である。免疫化は、一般的に、好ましくはフロイント完全アジュバントを使用して、生理食塩水中の該タンパク質の1以上の注射で、2 ~ 6週間、高められる。あるいは、本発明の目的のためにインビボ免疫化と等価であると考えられる場合、当該分野に公知の方法を使用してインビトロ免疫化によって、抗体を作製してもよい。ガラスまたはプラスチック容器へ免疫化された動物を出血させ（bled）、血液を25で1時間インキュベートし、続いて4で2 ~ 18時間インキュベートすることによって、ポリクローナル抗血清が得られる。血清は遠心分離（例えば、10分間1,000  $\times$  g）によって回収される。1出血当たり約20 ~ 50 mLが、ウサギから得られ得る。

【0147】

Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) 細胞の作製は、米国特許第6,004,552号に開示されており、これは参照により本明細書中に組み込まれる。CD40の場合、手短かに言えば、ヒトCD40をコードする配列が、トランスファーウイルスを使用してバキュロウイルスへ組換えられた。該プラスミドが、野生型バキュロウイルスDNAと共に、Sf9細胞へ共トランスフェクトされた。組換えバキュロウイルス感染Sf9細胞が同定され、そしてクローン化で精製された。

【0148】

好ましくは、抗体は、性質がモノクローナルである。「モノクローナル抗体」によって、実質的に均一の抗体の母集団から得られる抗体が意図され、即ち、該母集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能性のある自然に生じる突然変異を除けば同一である。該用語は、抗体の種または供給源に関して限定されない。該用語は、完全な免疫グロブリン、ならびにフラグメント、例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fvおよび抗体の抗原結合性機能を保持する他のものを包含する。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、単一の抗原部位、例えば、抗CD40抗体または抗CD40L抗体の場合、それぞれ、CD40細胞表面抗原またはCD40L細胞表面抗原に対して指向されている。さらに、種々の決定基（エピトープ）に指向される種々の抗体を典型的に含む従来の（ポリクローナル）抗体調製とは対照的に、各ポリクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基へ指向される。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な母集団の抗体から得られるという抗体の特徴を示し、そして任意の特定の方法によって抗体の作製が必要とされると解釈されない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製されても、または組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと）によって作製されてもよい。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Marks et al. (1991) *J Mol Biol.* 222:581-597; および米国特許第5,514,548号に記載される技術を使用して、ファージ抗体ライブラリから単離されてもよい。

【0149】

「エピトープ」によって、抗体が作製されそして抗体が結合する抗原性分子の部分が意図される。エピトープは、線形アミノ酸残基（即ち、エピトープ内の残基が、線形様式で、1つずつ連続的に配置されている）、非線形アミノ酸残基（本明細書中において「非線形エピトープ」と呼ばれ；これらのエピトープは、連続的に配置されていない）、または線形および非線形アミノ酸残基の両方を含み得る。

【0150】

モノクローナル抗体は、Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495-496の方法、またはその修飾法を使用して作製され得る。典型的に、マウスが、抗原を含有する溶液で免疫化される。生理食塩水中において、好ましくはフロイ

10

20

30

40

50

ント完全アジュバント等のアジュバント中において、抗原含有溶液を混合または乳化し、そして該混合液または乳化液を非経口的に注射することによって、免疫化は行われ得る。当該分野において公知の任意の免疫化法が、本発明のモノクローナル抗体を得るために使用され得る。動物の免疫化後、脾臓（および必要に応じて、いくつかの大きなリンパ節）が除去され、そして単一細胞へ分離される。脾臓細胞は、目的の抗原でコーティングされたプレートまたはウェルへ細胞懸濁液を適用することによって、スクリーニングされ得る。前記抗原に特異的な免疫グロブリンが結合されたB細胞発現膜は、該プレートに結合し、そして洗い流されない。得られるB細胞、または全ての分離される脾臓細胞は、次いで、誘導され、メラノーマ細胞と融合され、ハイブリドーマが作製され、そして選択培地において培養される。得られる細胞は、連続希釈によりめっきされ、そして目的の抗原へ特異的に結合する（そして無関係の抗原へ結合しない）抗体の産生についてアッセイされる。次いで、選択されたモノクローナル抗体（mAb）を分泌するハイブリドーマが、インビトロ（例えば、培養瓶または中空繊維リアクターにおいて）またはインビボ（マウス中の腹水として）で培養される。

10

#### 【0151】

本発明の方法における使用のための抗体、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体またはアンタゴニスト抗CD40L抗体が、組換えDNA法を使用して作製される場合、該モノクローナル抗体をコードするDNAが、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子へ特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）、容易に単離されそして配列決定される。本明細書中に記載のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として役立つ。一旦単離されると、DNAは、発現ベクター中へ配置され得、これは次いで、宿主細胞（例えば、大腸菌細胞、シミアンCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、またはそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないメラノーマ細胞）へトランスフェクトされ、組換え宿主細胞中におけるモノクローナル抗体の合成が得られる。抗体をコードするDNAの細菌中における組換え発現についての総説としては、Skerra et al. (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5: 256およびPhickthun (1992) Immunol. Revs. 130: 151が挙げられる。あるいは、抗体は、米国特許第5,545,403号；第5,545,405号；および第5,998,144号に開示されるように、CHO細胞株等の細胞株中において産生され得る；これらは、参照により本明細書中に組み込まれる。手短かに言えば、細胞株は、それぞれ軽鎖および重鎖を発現し得るベクターでトランスフェクトされる。別個のベクター上の2つのタンパク質をトランスフェクトすることによって、キメラ抗体が作製され得る。別の利点は、抗体の正しいグリコシル化である。

20

30

#### 【0152】

ある実施形態において、アンタゴニスト抗CD40抗体、例えば、CHIR-12.12またはCHIR-5.9抗体、あるいはそれらの抗原結合性フラグメントが、マーカーとしてグルタミン合成酵素を使用する、GS遺伝子発現系（Lonza Biologies, Portsmouth, New Hampshire）を使用してCHO細胞中において産生される。また、米国特許第5,122,464号；第5,591,639号；第5,658,759号；第5,770,359号；第5,827,739号；第5,879,936号；第5,891,693号；および第5,981,216号を参照のこと；これらの内容は、それらの全体が、参照により本明細書中に組み込まれる。

40

#### 【0153】

さらに、本発明の方法における使用のための抗体は、所望の結合特性を有するキメラ抗体であり得る。したがって、例えば、本発明の方法における使用のためのキメラ抗CD40抗体は、本明細書中に記載のCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗体の結合特性を有し得る。「キメラ」抗体によって、最も好ましくは組換えデオキシリボ核酸技術を使用して誘導され、かつ、ヒト（免疫学的に「関連する」種、例えば、チンパンジーを含む）および非ヒト成分の両方を含む抗体が意図される。したがって、キ

50

メラ抗体の定常領域が、最も好ましくは、天然ヒト抗体の定常領域と実質的に同一であり；キメラ抗体の可変領域が、最も好ましくは、非ヒト供給源から誘導され、そして目的の抗原（例えば、CD40またはCD40L抗原）に対して所望の抗原特異性を有する。非ヒト供給源は、ヒト抗原またはヒトCD40抗原を含む材料に対する抗体を作製するために使用され得る任意の脊椎動物供給源であり得る。このような非ヒト供給源としては、げっ歯類（例えば、ウサギ、ラット、マウス等；例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと；これは参照により本明細書中に組み込まれる）および非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿など；例えば、米国特許第5,750,105号および第5,756,096号を参照のこと；これらは参照により本明細書中に組み込まれる）が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中において使用される場合、句「免疫学的に活性な」は、例えばキメラ抗CD40抗体またはキメラ抗CD40L抗体を参照して使用される場合、それぞれ、ヒトCD40またはヒトCD40Lへ結合するキメラ抗体を意味する。

10

## 【0154】

「ヒト化」によって、非ヒト免疫グロブリン配列から誘導される最小限の配列を含有する抗体の形態が意図される。大部分について、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、ここで、該レシピエントの超可変領域（相補性決定領域またはCDRとしても公知）由来の残基が、所望の特性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類等の非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域由来の残基によって置換されている。句「相補性決定領域」は、天然免疫グロブリン結合部位の天然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 et al (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Kabat et al (1991) U.S. Dept. of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)を参照のこと。句「定常領域」は、エフェクター機能を与える抗体分子の部分を用いる。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作製することに関する以前の研究において、マウス定常領域が、ヒト定常領域によって置換された。被験者（subject）ヒト化抗体の定常領域が、ヒト免疫グロブリンから誘導された。しかし、これらのヒト化抗体は、依然として、ヒトにおいて望まれないそして潜在的に危険な免疫応答を生じ、そして親和性の損失が存在した。本発明の方法における使用のための、ヒト化抗体、例えば、ヒト化抗CD40抗体は、目的の親抗体、例えば、本明細書中に記載のCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗体によって示されるものと類似の結合特性を有する。

20

30

## 【0155】

ヒト化は、ヒト抗体の対応の配列の代わりにげっ歯類または突然変異げっ歯類CDRまたはCDR配列を使用することによって、Winterおよび共同研究者の方法（Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536）に従って本質的に行われ得る。また、米国特許第5,225,539号；第5,585,089号；第5,693,761号；第5,693,762号；第5,859,205号を参照のこと；参照により本明細書中に組み込まれる。ある場合において、ヒト免疫グロブリンの1以上の可変領域のフレームワーク領域中の残基が、対応の非ヒト残基によって置換される（例えば、米国特許第5,585,089号；第5,693,761号；第5,693,762号；および第6,180,370号を参照のこと）。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体において見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体性能をさらに改善するために（例えば、所望の親和性を得るために）行われる。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、そして典型的には2つの可変ドメインから実質的に全て構成されてなり、ここで、全てまたは実質的に全ての超可変領域が、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、そして全てまたは実質的に全てのフレームワ

40

50

ーク領域が、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、必要に応じて、さらに、免疫グロブリン定常領域 (Fc)、典型的にヒト免疫グロブリンのもの、の少なくとも部分を含む。さらなる詳細については、Jones et al. (1986) Nature 331: 522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-329; および Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 を参照のこと; 参照により本明細書中に組み込まれる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、実質的にヒト可変ドメイン未満 (substantially less than an intact human variable domain) が非ヒト種由来の対応の配列によって置換されている抗体を含み得る。実際には、ヒト化抗体は、典型的に、いくつかのCDR残基および場合によってはいくつかのフレームワーク残基が、げっ歯類抗体における類似部位由来の残基で置換されているヒト抗体である。例えば、米国特許第5,225,539号; 第5,585,089号; 第5,693,761号; 第5,693,762号; 第5,859,205号を参照のこと。また、米国特許第6,180,370号、および国際公開番号WO01/27160を参照のこと; ここで、ヒト化抗体および所定の抗原に対する改善された親和性を有するヒト化抗体を作製するための技術が開示されている。

10

## 【0156】

本発明はまた、不活性化内因性免疫グロブリン (Ig) 座を特徴とする、非ヒト哺乳動物宿主、より詳細にはトランスジェニックマウス中において産生された、異種または修飾化抗体を使用して行われ得る。このようなトランスジェニックマウスにおいて、宿主免疫グロブリンの軽鎖および重鎖サブユニットの発現のためのコンピテント内因性遺伝子が、非機能的にされており、そして類似のヒト免疫グロブリン座で置換されている。これらのトランスジェニック動物は、軽鎖または重鎖宿主免疫グロブリンサブユニットの実質的に非存在下で、ヒト抗体を産生する。例えば、米国特許第5,877,397号および第5,939,598号を参照のこと; 参照により本明細書中に組み込まれる。

20

## 【0157】

ある実施形態において、例えばCD40に対する完全ヒト抗体は、トランスジェニックマウスを免疫化することによって得られる。1つのこのようなマウスは、XenoMouse (登録商標) 技術 (Abgenix; Fremont, California) を使用して得られ、そして米国特許第6,075,181号、第6,091,001号、および第6,114,598号に開示されており、これらの全てが参照により本明細書中に組み込まれる。本明細書中に開示される抗体を作製するために、ヒトIgG<sub>1</sub>重鎖座およびヒトK軽鎖座が遺伝子導入されたマウスが、ヒトCD40を発現するSf9細胞で免疫化された。マウスはまた、他のアイソタイプについてトランスジェニックであり得る。本発明の方法において有用な完全なヒト抗CD40抗体は、本明細書中に開示されるCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗体によって示されるものと類似の結合特性によって特徴付けられる。

30

## 【0158】

目的の特定の抗体 (例えば、抗CD40抗体または抗CD40L抗体) のフラグメントが、それらが全長抗体の所望の親和性を保持する限り、本発明の方法における使用に好適である。したがって、例えば、抗CD40抗体のフラグメントは、CD40 B細胞表面抗原へ結合する能力を保持する。このようなフラグメントは、対応の全長抗体と類似の特性によって特徴付けられる。したがって、例えば、全長アンタゴニスト抗CD40抗体のフラグメントは、ヒト細胞の表面上に発現されたヒトCD40抗原へ特異的に結合し、そして、ヒトCD40発現細胞上のCD40抗原へ結合される場合に、顕著なアゴニスト活性を有さないが、アンタゴニスト活性を示す。このようなフラグメントは、本明細書中において「抗原結合性」フラグメントと呼ばれる。

40

## 【0159】

抗体の好適な抗原結合性フラグメントは、全長抗体の部分、一般的にはその抗原結合性または可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、およ

50

びFvフラグメントならびに一本鎖抗体分子が挙げられるが、これらに限定されない。「Fab」によって、軽鎖および重鎖の部分から構成されてなる免疫グロブリンの一価の抗原結合性フラグメントが意図される。F(ab')<sub>2</sub>によって、両方の軽鎖および両方の重鎖の部分を含む免疫グロブリンの二価の抗原結合性フラグメントが意図される。「一本鎖Fv」または「sFv」抗体フラグメントによって、抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含むフラグメントが意図され、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。例えば、米国特許第4,946,778号、第5,260,203号、第5,455,030号、および第5,856,456号を参照のこと；参照により本明細書中に組み込まれる。一般的に、Fvポリペプチドは、さらに、Fvポリペプチドは、sFvに抗原結合のために望ましい構造を形成させるV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインとの間のポリペプチドリッカーをさらに含む。sFvの概説については、Pluckthun (1994) *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenburg and Moore (Springer-Verlag, New York), pp. 269 - 315を参照のこと。本明細書中に開示されるアンタゴニスト抗CD40抗体の抗原結合性フラグメントはまた、本明細書以下に記載されるように、細胞毒へ結合されて標的細胞の死を生じさせ得る。

10

## 【0160】

抗体または抗体フラグメントは、例えば、McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552 - 554 (1990) および米国特許第5,514,548号に記載の技術を使用して作製される抗体ファージライブラリから単離され得る。Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624 - 628 およびMarks et al. (1991) *J Mol. Biol.* 222:581 - 597は、ファージライブラリを使用し、マウスおよびヒト抗体それぞれの単離を記載している。引き続いての刊行物は、チェイン・シャッフリング (Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10:779 - 783)、ならびに非常に大きなファージライブラリを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染およびインビボ組換え (Waterhouse et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:2265 - 2266) によって高親和性 (nM範囲) ヒト抗体の作製を記載する。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離についての伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の実行可能な代替法である。

20

30

## 【0161】

種々の技術が、抗体フラグメントの作製のために開発されてきた。伝統的に、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解消化によって誘導された (例えば、Morimoto et al. (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107 - 117 (1992) およびBrennan et al. (1985) *Science* 229:81を参照のこと)。しかし、これらのフラグメントは、現在、組換え宿主細胞によって直接産生され得る。例えば、抗体フラグメントは、上述の抗体ファージライブラリから単離され得る。あるいは、Fab'-SHフラグメントは、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを形成するために、大腸菌から直接回収されそして化学的にカップリングされ得る (Carter et al. (1992) *Bio/Technology* 10:163 - 167)。別のアプローチによれば、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、組換え宿主細胞培養物から直接単離され得る。抗体フラグメントの作製のための他の技術は、当業者に明らかである。

40

## 【0162】

本発明の方法における使用のためのアンタゴニスト抗CD40抗体としては、以下が挙げられる：本明細書中に開示されるCHIR-5.9およびCHIR-12.12モノクローナル抗体、ならびにこの抗体とは異なるが該CDRを保持する抗体；1以上のアミノ酸付加、欠失、または置換を有する抗体、ここで、アンタゴニスト活性は、B細胞増殖および/または分化の阻害によって測定される。本発明はまた、脱免疫化 (de-immu

50

n i z e d ) 抗体、特に脱免疫化アンタゴニスト抗CD40抗体を含み、これは、例えば、国際公開番号WO98/52976およびWO0034317に記載されるように作製され得；参照により本明細書中に組み込まれる。この様式において、本発明のアンタゴニスト抗CD40抗体中の残基は、ヒトCD40発現細胞に対するそれらのアンタゴニスト活性を保持しつつ、ヒトに対する非免疫原性またはより低い免疫原性を該抗体に与えるように修飾され、ここで、このような活性は本明細書中の他の箇所に記載のアッセイによって測定される。目的の抗体、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体またはアンタゴニスト抗CD40L抗体、あるいはそれらのフラグメントを含む融合タンパク質もまた、本発明の範囲内にあり、この融合タンパク質は、当該分野において公知であるように、合成されるかまたは対応のポリヌクレオチドベクターから発現され得る。このような融合タンパク質は、本明細書中の他の箇所に記載されるように、抗体の複合化を参照して説明される。

10

#### 【0163】

目的の結合特異性を有する任意の公知の抗体は、例えば、特許公開番号EP0983303A1、WO00/34317およびWO98/52976に記載の方法を使用して作製される配列変化を有し得；参照により本明細書中に組み込まれる。例えば、CDR中の配列は、抗体をII型MHCへ結合させ、そして望まれないヘルパーT細胞応答を誘導し得る。保存的置換は、該抗体に結合活性を保持させ得るが、望まれないT細胞応答を誘導するその能力を失わせ得る。任意のこのような保存的または非保存的置換は、本明細書中の他の箇所に記載されるもの等の分野で認識される方法を使用して行われ得、そして得られる抗体はまた、本発明の方法において使用され得る。変異体抗体は、本明細書中に記載の方法を使用して、特定の活性、例えば、アンタゴニスト活性、親和性、および特異性について、慣用的に試験され得る。

20

#### 【0164】

抗CD40治療剤がアンタゴニスト抗CD40抗体である場合、任意の上述の方法、または本明細書中に開示されていない任意の他の方法によって作製されるアンタゴニスト抗CD40抗体は、CHIR-12.12またはCHIR-5.9抗体と類似の様式で使用され得、ここで、それは、以下の生物学的活性の少なくとも1つを有する：インビトロおよび/またはインビボにおいて：T細胞によって刺激される正常ヒト末梢B細胞による免疫グロブリン分泌の阻害；CD40L発現細胞または可溶性CD40リガンド(sCD40L)によって刺激される正常ヒト末梢B細胞の生存および/または増殖の阻害；ジャーカトT細胞によって刺激される正常ヒト末梢B細胞の生存および/または増殖の阻害；sCD40Lまたは固相CD40Lによって刺激される任意の細胞中における「生存」抗アポトーシス細胞内の阻害；ならびに、sCD40Lまたは固相CD40Lとの結合時の任意の細胞中におけるCD40シグナル変換の阻害、CD40保有標的細胞またはCD40への同族リガンドを有する細胞(T細胞およびB細胞を含むが、これらに限定されない)の欠失、アネルギーおよび/または耐性誘導、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性T細胞の増殖または活性化の誘導(例えば、CD40-CD40L干渉によるドナー同種抗原特異的組織拒絶、van Maurik et al. (2002) J. Immunol. 169:5401-5404を参照のこと)、任意の機構による細胞傷害性(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、補体依存性細胞傷害(CDC)、増殖のダウンレギュレーション、および/または標的細胞中のアポトーシスが含まれるが、これらに限定されない)、標的細胞サイトカイン分泌および/または細胞表面分子発現の調節、ならびにそれらの組み合わせ。このような生物学的活性についてのアッセイは、本明細書、ならびに2003年11月4日、2003年11月26日、および2004年4月27日に出願され、そしてそれぞれ米国特許出願第60/517,337号(代理人整理番号PP20107.001(035784/258442))、第60/525,579号(代理人整理番号PP20107.002(035784/271525))、および第60/565,710号(代理人整理番号PP20107.003(035784/277214))が与えられた「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal A

30

40

50

ntibodies and Methods for Their Use」という表題の仮出願、ならびに2004年11月4日に出願され、「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」という表題がまた付けられた国際特許出願番号PCT/US2004/037152(代理人整理番号PP20107.004(035784/282916))に記載されるように行われ得る;これらの各々の内容は、それらの全体が、参照により本明細書中に組み込まれる。また、Schultze et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8200-8204; Denton et al. (1998) Pediatr. Transplant. 2:6-15; Evans et al. (2000) J. Immunol. 164:688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49:17-22; Lederman et al. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77-86; Coligan et al. (1991) Current Protocols in Immunology 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) Immunology 79:439-444;ならびに米国特許第5,674,492号および第5,847,082号に記載のアッセイを参照のこと;参照により本明細書中に組み込まれる。

#### 【0165】

本明細書中に記載のCD40抗原エピトープに特異的なアンタゴニスト抗CD40抗体を検出するための代表的なアッセイは、「競合的結合アッセイ」である。競合的結合アッセイは、未知物質が、その特異的抗体への標識された既知のリガンドの結合を該するそれらの能力によって検出および定量される、血清学的アッセイである。これはまた、競合的阻害アッセイと呼ばれる。代表的な競合的結合アッセイにおいて、標識されたCD40ポリペプチドが、例えば、本発明のモノクローナル抗体の1以上のエピトープに対して惹起されたモノクローナル抗体と組み合わせ、サンプル中の候補抗体によって沈降される。目的のエピトープと特異的に反応する抗CD40抗体は、CD40タンパク質または目的のCD40タンパク質の特定のエピトープを含むタンパク質のフラグメントに対して作製された一連の抗体をスクリーニングすることによって、同定され得る。例えば、ヒトCD40について、目的のエピトープは、配列番号9に記載の配列(GenBankアクセッション番号NM\_152854をまた参照のこと)によってコードされる、配列番号10に記載のヒトCD40のショートアイソフォーム(GenBankアクセッション番号NP\_690593を参照のこと)、あるいは配列番号11に記載の配列(GenBankアクセッション番号X60592およびNM\_001250を参照のこと)によってコードされる、配列番号12に記載のヒトCD40のロングアイソフォーム(GenBankアクセッション番号CAA43045およびNP\_001241を参照のこと)の線形および/または非線形アミノ酸残基を含む。あるいは、前もって同定された好適なアンタゴニスト抗CD40抗体を用いての競合的結合アッセイが、前もって同定された抗体に匹敵するモノクローナル抗体を選択するために、使用され得る。

#### 【0166】

このようなイムノアッセイにおいて使用される抗体は、標識されていても標識されていなくてもよい。非標識抗体は、凝集反応において利用され得る;標識抗体は、広範囲の標識を利用する、広範囲のアッセイにおいて使用され得る。抗CD40抗体と目的のエピトープとの抗体-抗原複合体の形成の検出は、該抗体へ検出可能な物質を結合させることによって、促進され得る。好適な検出手段としては、放射性核種、酵素、補酵素、蛍光体(fluorescers)、化学発光体(chemiluminescers)、色原体、酵素基質または補因子、酵素阻害剤、補欠分子族複合体、フリーラジカル、粒子、色素等の標識の使用を含む。好適な酵素の例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ;好適な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ;好適な蛍光材料の例としては、ウンベリフェロン、フ

10

20

30

40

50

ルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリンが挙げられ；発光材料の例は、ルミノールであり；生物発光材料の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ；好適な放射性材料の例としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、または $^3\text{H}$ が挙げられる。このような標識された試薬は、種々の周知のアッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素免疫法、例えば、ELISA、蛍光免疫測定法等において使用され得る。例えば、米国特許第3,766,162号；第3,791,932号；第3,817,837号；および第4,233,402号を参照のこと。

#### 【0167】

任意の前述の抗体、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体またはその抗体フラグメントは、本発明の方法における使用の前に、複合化され得る。複合化された抗体を作製する方法は、当該分野において公知である。したがって、抗体は、間接的な標識化または間接的な標識化アプローチを使用して、標識され得る。「間接的な標識化」または「間接的な標識化アプローチ」によって、キレート剤が抗体へ共有結合され、そして少なくとも1つの放射性核種が該キレート剤へ挿入されることが意図される。例えば、Srivagta va and Mease (1991) Nucl. Med. Bio. 18: 589-603に記載のキレート剤および放射性核種を参照のこと；参照により本明細書中に組み込まれる。好適な標識としては、フルオロフォア、発色団、放射性原子（特に、 $^{32}\text{P}$ および $^{125}\text{I}$ ）、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。酵素は典型的にそれらの活性によって検出される。例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼは、分光光度計で定量可能な、青色色素へ3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を変換するその能力によって通常検出される。「特異的結合パートナー」は、例えば抗原およびそれに特異的なモノクローナル抗体の場合のように、高特異性を有するリガンド分子を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またはストレプトアビジン、IgGおよびプロテインA、ならびに当該分野における多数のレセプター-リガンドカップルが挙げられる。同一の標識がいくつかの異なる様式で役立つため、上記の説明は種々の標識を別個のクラスへ分類するように意味されないことが、理解される。例えば、 $^{125}\text{I}$ は、放射性標識または高電子密度試薬として役立つ。HRPは、酵素またはmAbについての抗原として役立つ。さらに、所望の効果のために種々の標識が組み合され得る。例えば、mAbおよびアビジンはまた、本発明の実施において標識を必要とし；したがって、mAbをビオチンで標識し、そしてその存在を、 $^{125}\text{I}$ で標識されたアビジンで、またはHRPで標識された抗ビオチンmAbで検出してもよい。他の置換および可能性は、当業者に容易に明らかであり、そして本発明の範囲内の等価物として考えられる。

#### 【0168】

あるいは、目的の抗体、例えば、抗CD40抗体は、「直接的な標識化」または「直接的な標識化アプローチ」を使用して標識され得、ここで、放射性核種が抗体へ（典型的にアミノ酸残基を介して）直接共有結合される。好ましい放射性核種は、Srivagta va and Mease (1991) (前述)に提供されている。間接的な標識化アプローチが特に好ましい。また、例えば、国際出願番号WO00/52031およびWO00/52473、ここで、放射性標識を抗体へ結合するためにリンカーが使用されている；ならびに米国特許出願第6,015,542号に記載の抗CD40抗体の標識化形態を参照のこと；参照により本明細書中に組み込まれる。

#### 【0169】

##### 抗体の変異体

本発明の方法は、当該分野に公知の抗体の変異体を使用して行われ得る。このような変異体は、親抗体の所望の結合特性を保持する。したがって、例えば、試験される抗CD40治療剤がアンタゴニスト抗CD40抗体である場合、変異体抗体は、親のアンタゴニスト抗CD40抗体、例えば、CHIR-12.12またはCHIR-5.9抗体の、結合特性を保持する。抗体変異体を作製するための方法は、当該分野において一般的に利用可

10

20

30

40

50

能である。下記の議論はアンタゴニスト抗CD40抗体の変異体を参照するが、該方法は、目的の任意の抗体、例えば、本明細書中に開示されるバイオマーカーまたは臨床的に有用な予測マーカーへ特異的に結合する抗体に一般的に適用可能である。

【0170】

例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体（例えば、本明細書中に記載のCHIR-5.9またはCHIR-12.12モノクローナル抗体）のアミノ酸配列変異体は、目的の抗体をコードするクローン化DNA配列における突然変異によって、作製され得る。突然変異誘導およびヌクレオチド配列改変のための方法は、当該分野において周知である。例えば、Walker and Gastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York); 米国特許第4,873,192号; ならびにそれらにおいて引用される文献参照のこと; 参照により本明細書中に組み込まれる。目的のポリペプチドの生物学的活性に影響を与えない好適なアミノ酸置換についてのガイドランスは、Dayhoff et al. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.) におけるモデルにおいて見られ得、参照により本明細書に組み込まれる。保存的置換、例えば、1つのアミノ酸を類似の特性を有する別のものとの交換することが、好ましいかもしれない。保存的置換の例としては、Gly Ala、Val Ile Leu、Asp Glu、Lys Arg、Asn Gln、およびPhe Trp Tyrが挙げられるが、これらに限定されない。

【0171】

目的の抗体（例えば、目的のアンタゴニスト抗CD40抗体ポリペプチド）の変異体を作製することにおいて、変異体が、所望の活性（即ち、類似の結合親和性）を有し続け、そして、アンタゴニスト抗CD40抗体の場合、ヒト細胞の表面上に発現されるヒトCD40抗原へ特異的に結合し得、そしてヒトCD40発現細胞上のCD40抗原へ結合される場合、顕著なアゴニスト活性を有しないがアンタゴニスト活性を示すように、修飾が行われる。明らかに、変異体ポリペプチドをコードするDNAにおいてなされた任意の突然変異は、読み取り枠の外に該配列を配置してはならず、そして好ましくは、第2のmRNA構造を生じさせ得る相補領域を作製しない。例えば、EP特許出願公開第75,444号を参照のこと。

【0172】

さらに、抗体、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体の定常領域は、多数の様式でエフェクター機能を変化させるように突然変異され得る。例えば、米国特許第6,737,056B1および米国特許出願公開第2004/0132101A1号を参照のこと、これらは、Fc受容体への抗体結合を最適にするFc変異を開示する。

【0173】

好ましくは、参照抗体、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体の変異体は、該参照抗体、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体分子、例えば、本明細書中に記載のCHIR-5.9またはCHIR-12.12モノクローナル抗体について、または該参照抗体分子のより短い部分に対して、少なくとも70%または75%配列同一性、好ましくは少なくとも80%または85%配列同一性、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%または95%配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。より好ましくは、該分子は、少なくとも96%、97%、98%または99%配列同一性を共有する。本発明の目的について、パーセント配列同一性は、12のギャップオープンペナルティーおよび2のギャップエクステンションペナルティーを含むアフィンギャップサーチ(6

10

20

30

40

50

2のBLOSUMマトリクス)を使用して、Smith-Watermanホモロジーサーチアルゴリズムを使用して、同定される。Smith-Watermanホモロジーサーチアルゴリズムは、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489において教示されている。変異体は、わずか1~15アミノ酸残基、わずか1~10アミノ酸残基、例えば6~10、わずか5、わずか4、3、2または1アミノ酸残基だけ、例えば、参照抗体、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体と相違しているかもしれない。

【0174】

2つのアミノ酸配列の最適なアラインメントに関して、変異体アミノ酸配列の連続セグメントは、参照アミノ酸配列に関して、追加のアミノ酸残基または欠失されたアミノ酸残基を有し得る。参照アミノ酸配列への比較のために使用される連続セグメントは、少なくとも20の連続アミノ酸残基を含み、そして30、40、50、またはそれ以上のアミノ酸残基であり得る。保存的残基置換またはギャップに関連する配列同一性についての補正が、行われ得る(Smith-Watermanホモロジーサーチアルゴリズムを参照のこと)。

【0175】

治療方法

本明細書中に記載のエクスピボ予測アッセイはまた、CD40発現細胞に関連する炎症性疾患および/または自己免疫疾患についての治療の必要がある被験者についての治療方法において使用され得る。したがって、ある実施形態において、エクスピボ予測アッセイは、候補被験者において行われ、そしてアッセイの結果が、抗CD40治療剤での治療で好ましい応答を予測する場合、次いで、該被験者はその抗CD40治療剤で処置される。上述されるように、エクスピボ予測アッセイから得られた情報は、抗CD40治療剤での利益に関して決定を与えるために単独で使用され得る。あるいは、エクスピボ予測アッセイは、本明細書中に記載される1以上のCD40関連因子の発現レベルまたは発現の有無についてスクリーニングする予測アッセイ；特定の炎症性または自己免疫疾患についての1以上の臨床的に有用な予測マーカー(例えば、本明細書中に記載されるような臨床的に有用な予測マーカー)の発現レベルまたは発現の有無についてスクリーニングする予測アッセイ、あるいは両方と組み合わせて使用され得る。

【0176】

この様式において、本発明のエクスピボ予測アッセイを単独でまたは本明細書中に記載の他の予測アッセイと組み合わせて使用して同定された被験者は、候補被験者における疾患の治療について有利であるとスクリーニングプロセスにおいて同定された1以上の治療有効用量の抗CD40治療剤でさらに治療され得る。「治療」は、被験者への抗CD40治療剤の適用または投与、あるいは被験者由来の単離された組織または細胞株への抗CD40治療剤の適用または投与として本明細書中において規定され、ここで、該被験者は、自己免疫疾患および/または炎症性疾患、自己免疫疾患および/または炎症性疾患に関連する症状、あるいは自己免疫疾患および/または炎症性疾患の発症への素因を有し、ここで、目的は、自己免疫疾患および/または炎症性疾患、自己免疫疾患および/または炎症性疾患の関連症状、あるいは自己免疫疾患および/または炎症性疾患の発症への素因を、治療、治癒、緩和、軽減、変化、緩和、改善、改善するか、またはこれに影響を与えることである。「治療」によって、被験者への抗CD40治療剤を含む薬学的組成物の適用または投与、あるいは被験者由来の単離された組織または細胞株へのアンタゴニスト抗CD40治療剤を含む薬学的組成物の適用または投与が意図され、ここで、該被験者は、自己免疫疾患および/または炎症性疾患、自己免疫疾患および/または炎症性疾患に関連する症状、あるいは自己免疫疾患および/または炎症性疾患の発症への素因を有し、ここで、目的は、自己免疫疾患および/または炎症性疾患、自己免疫疾患および/または炎症性疾患の関連症状、あるいは自己免疫疾患および/または炎症性疾患の発症への素因を、治療、治癒、緩和、軽減、変化、緩和、改善、改善するか、またはこれに影響を与えることである。

10

20

30

40

50

## 【0177】

「抗炎症性活性」によって、炎症の軽減または予防が意図される。本明細書中の他の箇所記載される少なくとも1つの抗CD40治療剤での治療は、自己免疫疾患および/または炎症性疾患の治療に関して有益である生理学的応答を生じさせ、ここで、該疾患は、CD40抗原を発現する細胞を含む。本発明の方法は、増殖、活性化等の細胞における表現型変化を防止することにおいて有用であり得る。

## 【0178】

「治療有効用量または量」または「有効量」によって、投与されると、自己免疫疾患および/または炎症性疾患を有する患者の治療に関してポジティブな治療的応答をもたらす抗CD40治療剤の量が意図される。本発明のある実施形態において、抗CD40治療剤は、アンタゴニスト抗CD40抗体、アンタゴニスト抗CD40L抗体、またはそれらの抗原結合性フラグメントであり、そして抗CD40抗体、抗CD40L抗体、またはそれらの抗原結合性フラグメントの治療有効量は、約0.01mg/kg～約40mg/kg、約0.01mg/kg～約30mg/kg、約0.1mg/kg～約30mg/kg、約1mg/kg～約30mg/kg、約3mg/kg～約30mg/kg、約3mg/kg～約25mg/kg、約3mg/kg～約20mg/kg、約5mg/kg～約15mg/kg、または約7mg/kg～約12mg/kgの範囲内にある。該治療方法は、抗CD40治療剤、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体、アンタゴニスト抗CD40L抗体、またはその抗原結合性フラグメントの、治療有効量の単回投与あるいは治療有効量の複数回投与を含み得る。

## 【0179】

ある実施形態において、本発明のエクスピボ予測アッセイは、特定の抗CD40治療剤での治療に対する応答性または応答性の欠如についての生理学的基準を確定するために、使用され得る。したがって、被験者における炎症性または自己免疫疾患が抗CD40治療剤での治療に最初は応答性であり、そして該疾患のCD40発現細胞がこの治療ラインに対して耐性を生じる場合、該エクスピボ予測アッセイが、どのCD40L-CD40相互作用がこれらのCD40発現細胞の耐性に寄与するのかを規定するために、使用され得る。

## 【0180】

CD40L媒介性CD40シグナル伝達のバイオマーカー、即ち、アポトーシス、細胞増殖および生存のバイオマーカー、CD40L媒介性CD40シグナル伝達のサイトカインマーカー、ならびに本明細書中に記載のCD40関連因子はまた、抗CD40治療剤での治療の効果をモニタリングするために、単独でまたはそれらのいずれかを組み合わせて、使用され得る。この様式において、抗CD40治療剤での治療を受け、上述の予測アッセイを使用して抗CD40治療剤での治療の適合性について予めスクリーニングされていてもまたはされていなくてもよい、被験者は、細胞アポトーシス、細胞増殖および生存、ならびに/あるいは1以上のCD40シグナル伝達経路の少なくとも1つのバイオマーカーの発現のインピボ変化についてモニタリングされ、ここで、抗CD40治療剤での治療に続いて、サイトカイン産生が、(抗CD40治療剤の作用機序に依存して)必要に応じてモニタリングされる。あるいは、またはさらに、該被験者は、抗CD40治療剤での治療に続いて、細胞上の細胞表面CD40抗原、細胞上の細胞表面CD40L、循環レベルのsCD40および循環レベルのsCD40Lからなる群から選択される1以上の発現レベルのインピボ変化について、モニタリングされ得る。

## 【0181】

この様式において、第1の生物学的サンプルは、目的の抗CD40治療剤での治療前に被験者から得られ、そして1以上のこれらのバイオマーカーおよび/またはCD40関連因子の発現レベルについてアッセイされ、アッセイされた各因子の発現のベースラインレベルを得る。この第1の生物学的サンプルは、「ベースライン生物学的サンプル」と呼ばれる。同一の組織タイプまたは体液の1以上の引き続いての生物学的サンプルが、該被験者から得られ、そして同一のバイオマーカーおよび/またはCD40関連因子についてア

10

20

30

40

50

ッセイされ、ここで、該引き続いての生物学的サンプルは、少なくとも1用量の目的の抗CD40治療剤の投与に続いて得られる。モニタリングは、任意の所定の治療プロトコルの効果を確認するために、経時での単一のポイントで、または経時での複数のポイントで生じ得、ここで、抗CD40治療剤が被験者へ投与される。アッセイされるバイオマーカーに依存して、2つの時点の間のバイオマーカーのレベルの低下または増加が、炎症性または自己免疫疾患の治療における抗CD40治療剤の効果を示し得る。モニタリングが1以上のCD40関連因子の発現レベルの低下を示す場合、このような結果は、炎症性または自己免疫疾患の治療における抗CD40治療剤の効果を示し得る。

#### 【0182】

したがって、ある実施形態において、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するかまたはこれに干渉する抗CD40治療剤での被験者の治療の効果が、以下によってモニタリングされる：該被験者由来のベースライン生物学的サンプルを得ること、そして本明細書上に記載の細胞生存および/またはCD40L媒介性CD40シグナル伝達経路の1以上のバイオマーカーの発現レベルを検出すること；少なくとも1用量の治療剤、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体（例えば、CHIR-12.12またはCHIR-5.9）またはそれらの抗原結合性フラグメントを該被験者に投与すること；例えば、約30分～約12時間、約30分～約6時間、約30分～約4時間、および約1時間～約4時間を含む、約30分～約24時間内に、該被験者から引き続いての生物学的サンプルを得ること；ならびに、該引き続いての生物学的サンプル中の細胞生存および/またはCD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のバイオマーカーの発現レベルを検出すること；ここで、該ベースライン生物学的サンプル中の発現レベルと比較した場合の該引き続いての生物学的サンプル中の発現レベルの低下は、該抗CD40治療剤での治療の効果を示す。検出は、本明細書中の他の箇所に開示の方法を含む、当該分野において公知の任意の方法を使用して達成され得る。ある実施形態において、発現レベルは、ベースライン生物学的サンプル中において検出されるものに比べて、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%減少される。少なくとも25%のベースラインからのパーセント変化（即ち、ベースライン生物学的サンプルに比べて少なくとも25%の減少）は、抗CD40治療剤での効果を示し、少なくとも30%または少なくとも40%のパーセント変化によって中間的応答が示される。好ましくは、ベースラインからのパーセント変化は、少なくとも50%（即ち、ベースライン生物学的サンプルに比べて少なくとも50%の減少）またはそれ以上である。

#### 【0183】

ある実施形態において、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するかまたはこれに干渉する抗CD40治療剤での被験者の治療の効果が、以下によってモニタリングされる：該被験者由来のベースライン生物学的サンプルを得ること、そして本明細書上に記載のCD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のサイトカインマーカーの発現レベルを検出すること；少なくとも1用量の治療剤、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体（例えば、CHIR-12.12またはCHIR-5.9）またはそれらの抗原結合性フラグメントを該被験者に投与すること；投与後、例えば、約24時間～約3週間（約48時間、約72時間、約1週間、または約2週間を含む）内に、該被験者から引き続いての生物学的サンプルを得ること；ならびに、該引き続いての生物学的サンプル中の細胞生存および/またはCD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のバイオマーカーの発現レベルを検出すること；ここで、該ベースライン生物学的サンプル中の発現レベルと比較した場合の該引き続いての生物学的サンプル中の発現レベルの低下は、該抗CD40治療剤での治療の効果を示す。検出は、本明細書中の他の箇所に開示の方法を含む、当該分野において公知の任意の方法を使用して達成され得る。さらに、CD40L媒介性CD40シグナル伝達によって影響されないサイトカイン（例えば、IL-1b、GM-CSF、およびIL-12；本明細書下記の実験セクションを参照のこと）が、データを標準化するためにコントロールとして使用され得る。ある実施形態において、発現レベルは、ベースライ

10

20

30

40

50

ン生物学的サンプル中において検出されるものに比べて、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%減少される。少なくとも20%のベースラインからのパーセント変化（即ち、ベースライン生物学的サンプルに比べて少なくとも20%の減少）は、抗CD40治療剤での効果を示す。ある実施形態において、血清または血清抽出物を含むベースライン生物学的サンプルは、サイトカインの引き続いての分析のために凍結される。

#### 【0184】

他の実施形態において、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するかまたはこれに干渉するか、あるいはその作用機序としてADCCを有する、抗CD40治療剤での被験者の治療の効果は、以下によってモニタリングされる：該被験者由来のベースライン生物学的サンプルを得ること、そして本明細書上に記載の1以上のバイオマーカーの発現レベルを検出すること；少なくとも1用量の治療剤、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体（例えば、CHIR-12.12またはCHIR-5.9）またはそれらの抗原結合性フラグメントを該被験者に投与すること；投与後、例えば、約8時間、12時間、24時間、36時間、48時間、または72時間内に、そして必要に応じて再度、投与から約1週間、約2週間、または約3週間後に、該被験者から引き続いての生物学的サンプルを得ること；ならびに、該引き続いての生物学的サンプル中のアポトーシスのバイオマーカーの発現レベルを検出すること；ここで、該ベースライン生物学的サンプル中の発現レベルと比較した場合の該引き続いての生物学的サンプル中の発現レベルの上昇は、該抗CD40治療剤での治療の効果を示す。検出は、本明細書中の他の箇所に開示の方法を含む、当該分野において公知の任意の方法を使用して達成され得る。ある実施形態において、発現レベルは、ベースライン生物学的サンプル中において検出されるものと比べて、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、125%、150%、200%、250%、300%またはそれ以上、増加される。少なくとも20%またはそれ以上のベースラインからのパーセント変化（即ち、ベースライン生物学的サンプルに比べて少なくとも20%の増加）は、抗CD40治療剤での効果を示す。

#### 【0185】

なお他の実施形態において、CD40L媒介性CD40シグナル伝達を遮断するかまたはこれに干渉し、ADCCを調節し、あるいは両方を行う、抗CD40治療剤での被験者の治療の効果は、以下によってモニタリングされる：該被験者由来のベースライン生物学的サンプルを得ること、そして本明細書上に記載の1以上のCD40関連因子（即ち、細胞上の細胞表面CD40および/またはCD40L、ならびに/あるいは循環レベルのsCD40および/またはsCD40L）の発現レベルを検出すること；少なくとも1用量の治療剤、例えば、アンタゴニスト抗CD40抗体（例えば、CHIR-12.12またはCHIR-5.9）またはそれらの抗原結合性フラグメントを該被験者に投与すること；例えば、約1日（即ち、24時間）、2日、3日、4日、または1週間内に、該被験者から引き続いての生物学的サンプルを得ること；ならびに、該引き続いての生物学的サンプル中のCD40関連因子の発現レベルを検出すること；ここで、該ベースライン生物学的サンプル中の発現レベルと比較した場合の該引き続いての生物学的サンプル中の発現レベルの低下は、該抗CD40治療剤での治療の効果を示す。ある実施形態において、発現レベルは、ベースライン生物学的サンプル中において検出されるものに比べて、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%減少される。

#### 【0186】

これらのアッセイのいずれか1つまたは組み合わせが、作用機序に依存して、目的の抗CD40治療剤での炎症性または自己免疫疾患を有する被験者の治療の効果モニタリン

10

20

30

40

50

グするために行われ得ることが、認識される。効果が実証されると、引き続いての用量の抗CD40治療剤が、推奨される投与レジメンに従って、例えば、毎日、1日おきに、週3回、週2回、週1回、隔週、月1回等に、投与され得る。あるいは、目的のマーカー（即ち、細胞増殖および生存のバイオマーカー、CD40L媒介性CD40シグナル伝達経路のバイオマーカー、サイトカインマーカー、CD40関連因子、およびそれらの任意の組み合わせ）のインビボ発現レベルが、投与頻度に対してのガイドとして役立ち得、そしてまた、投与される治療有効量についての指標として役立ち得る。この様式において、引き続いての生物学的サンプルが、目的のそれぞれのマーカーの発現レベルの受理可能な減少または増加を示し続ける場合、それぞれのマーカーの発現レベルがベースライン生物学的サンプル中において観察されるものに近づく時まで、抗CD40治療剤でのさらなる投与が遅延され得る。いくつかのバイオマーカーは、治療剤の効果と独立して変動し得、これはまた半減期および滞留時間において変動するため、投与頻度へのガイドとして該マーカー（即ち、アポトーシス、細胞生存、CD40シグナル伝達経路のバイオマーカー、サイトカインマーカー、および/またはCD40関連因子）の発現レベルを使用する場合、好ましくは少なくとも2つの連続的な指標（例えば、24～48時間の期間内）が考慮される。

10

## 【0187】

これらのアッセイの結果が、細胞生存の1以上のバイオマーカー、CD40シグナル伝達経路の1以上のバイオマーカー、および/または1以上のCD40関連因子の発現の減少に関して、CD40L媒介性CD40シグナル伝達の所望のダウンレギュレーションを示し続ける場合、抗CD40治療剤でのさらなる治療が正当化される。経時での治療効果のモニタリングを可能にし、そして治療が継続されるべきかまたは停止されるべきかを決定するために、本明細書上記に記載されるように、生物学的サンプルが、治療期間の間、種々の時間間隔で回収され得る。

20

## 【0188】

以下の実施例は、例示のために提供され、そして限定のために提供されるものではない。

## 【実施例】

## 【0189】

（導入）

30

下記の実施例において使用したアンタゴニスト抗CD40抗体は、CHIR-5.9およびCHIR-12.12である。CHIR-5.9およびCHIR-12.12抗CD40抗体は、ヒトIgG<sub>1</sub>重鎖座およびヒト軽鎖座を有するトランスジェニックマウス（Xenomouse（登録商標）技術（Abgenix；Fremont, California））の免疫化によって作製される、ヒトIgG<sub>1</sub>サブタイプ抗ヒトCD40モノクローナル抗体（mAbs）である。CD40細胞外ドメインを発現するSF9インタクト細胞を免疫原として使用した。

## 【0190】

手短に言えば、Boer et al. (1988) J. Immunol. Meth. 113:143によって以前に記載されるように、50%ポリエチレングリコールを使用して、免疫化マウス由来の脾細胞を、SP2/0またはP3x63Ag8.653マウスメラノーマ細胞と10:1の割合で融合した。融合された細胞を、ヒポキサンチン（0.1mM）、アミノプテリン（0.01mM）、チミジン（0.016mM）、および0.5ng/mL hIL-6（Genzyme, Cambridge, Massachusetts）が補充された完全IMDM培地において際懸濁させた。次いで、各ウェルが平均で1つの成長するハイブリドーマを含有するように、融合された細胞を96ウェル組織培養プレートのウェルに分配した。

40

## 【0191】

10～14日後、ハイブリドーマ母集団の上澄み液を、特異的抗体産生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産生のスクリーニングについて

50

、各ウェルからの上澄み液をプールし、そして先ず、E L I S Aによって抗C D 4 0 活性特異性について試験した。次いで、陽性を、標準F A C Sアッセイを使用するE B V形質転換B細胞の蛍光細胞染色について使用した。陽性ハイブリドーマ細胞を、0.5 ng / mL h I L - 6を含有するI M D M / F B S中において限界希釈によって2回クローン化した。

【0192】

トータルで31のマウス脾臓をマウスメラノーマSP2/0細胞と融合し、E L I S Aにおいて組換えC D 4 0を認識する895の抗体を作製した。A b g e n i x X e n o M o u s e (登録商標)技術(A b g e n i x ; F r e m o n t , C a l i f o r n i a )を使用して作製されたハイブリドーマの平均約10%が、ヒトカッパ鎖の代わりにマウスラムダ軽鎖を含有した。マウスラムダ鎖を含有する抗体を選択した。細胞表面C D 4 0への結合も示した260の抗体のサブセットを、さらなる分析のために選択した。一連のサブクローニング手順の間選択された安定なハイブリドーマを、結合および機能アッセイにおける更なるキャラクタライゼーションのために使用した。選択プロセスのさらなる詳細については、2003年11月4日、2003年11月26日、および2004年4月27日に出願され、そしてそれぞれ米国特許出願第60/517,337号(代理人整理番号PP20107.001(035784/258442))、第60/525,579号(代理人整理番号PP20107.002(035784/271525))、および第60/565,710号(代理人整理番号PP20107.003(035784/277214))が割り当てられた「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」という表題の係属中の仮出願、ならびに2004年11月4日に出願され、そしてWO2005/044854として公開された「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」という表題が再び付けられた国際特許出願第PCT/US2004/037152号(代理人整理番号PP20107.004(035784/282916))を参照のこと;これらの各々の内容は、それら全体が、参照により本明細書中に組み込まれる。

【0193】

7つの他のハイブリドーマ由来のクローンが、アンタゴニスト活性を有すると同定された。それらの相対的なアンタゴニスト力およびADCC活性に基づいて、2つのハイブリドーマクローンを、さらなる評価のために選択した(下記表1)。それらを131.2F8.5.9(5.9)および153.8E2.D10.D6.12.12(12.12)と命名する。

【0194】

【表1】

表1. 抗CD40 IgG1抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12でのデータの初期セットのまとめ

マザーハイブリドーマ	ハイブリドーマクローン	細胞表面結合	アンタゴニスト	ADCC	CDC	CMCC#	V領域DNA配列
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	有
153.8E2	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	++++	-	12056	有

マウスハイブリドーマ株131.2F8.5.9(CMCC#12047)およびハイブリドーマ株153.8E2.D10.D6.12.12(CMCC#12056)を、それぞれ、特許寄託番号PTA-5542およびPTA-5543で、American Type Culture Collection(ATCC;10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209(USA))へ寄託した。

【0195】

候補抗体の可変領域をコードするcDNAを、PCRで増幅し、クローン化し、そして

配列決定した。CHIR-12.12抗体の軽鎖および重鎖についてのアミノ酸配列を、配列番号2 (mAb CHIR-12.12についての軽鎖) および配列番号4 (mAb CHIR-12.12についての重鎖) に示す。mAb CHIR-12.12についての重鎖の変異体を配列番号5に示し、これは、配列番号4の153位のアラニン残基の代わりにセリン残基を有する点で配列番号4と相違している。CHIR-12.12抗体の軽鎖および重鎖をコードするヌクレオチド配列を、配列番号1 (mAb CHIR-12.12の軽鎖についてのコード配列) および配列番号3 (mAb CHIR-12.12の重鎖についてのコード配列) に示す。CHIR-5.9抗体の軽鎖および重鎖についてのアミノ酸配列を、配列番号6 (mAb CHIR-5.9についての軽鎖) および配列番号7 (mAb CHIR-5.9についての重鎖) に示す。mAb CHIR-5.9の重鎖の変異体を配列番号8に示し、これは、配列番号7の158位のアラニン残基の代わりにセリン残基を有する点で配列番号7と相違している。

10

## 【0196】

独立したハイブリドーマから誘導された抗体について予測されるように、相補性決定領域 (CDR) におけるヌクレオチド配列の実質的なバリエーションが存在する。V<sub>H</sub>のCDR3領域の多様性は、抗体特異性を最も顕著に決定すると考えられる。

## 【0197】

FACS分析によって示されるように、CHIR-5.9およびCHIR-12.12は、ヒトCD40へ特異的に結合し、そしてCD40リガンド結合を防止し得る。両方のmAbは、細胞表面CD40へ予め結合されたCD40リガンドに競合してこれを除去し得る。ヒトCD40に対するCHIR-5.9の結合親和性は $1.2 \times 10^{-8}$  Mであり、そしてヒトCD40に対するCHIR-12.12の結合親和性は $5 \times 10^{-10}$  Mである。

20

## 【0198】

CHIR-12.12およびCHIR-5.9モノクローナル抗体は、強力なアンタゴニストであり、そして正常なB細胞のインビトロCD40リガンド媒介性増幅を阻害し、ならびに、NHLおよびCLL患者由来の癌細胞のインビトロCD40リガンド媒介性増幅を阻害する。CHIR-12.12モノクローナル抗体は、正常ヒトBリンパ球において、CD40リガンド (CD40L) によって媒介される生存およびシグナル伝達経路を直接阻害する。インビトロで、両方の抗体は、ADCCによってNHL患者由来の原発性癌細胞を死滅させる。用量依存性抗腫瘍活性が、異種移植片ヒトリンパ腫モデルにおいて見られた。これらの結果のより詳細な説明、ならびにそれらを得るために使用したアッセイについては、2003年11月4日、2003年11月26日、および2004年4月27日に出願され、そしてそれぞれ米国特許出願第60/517,337号 (代理人整理番号PP20107.001 (035784/258442))、第60/525,579号 (代理人整理番号PP20107.002 (035784/271525))、および第60/565,710号 (代理人整理番号PP20107.003 (035784/277214)) が割り当てられた「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」という表題の係属中の仮出願、ならびに2004年11月4日に出願され、そしてWO2005/044854として公開された「Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use」という表題が再び付けられた国際特許出願第PCT/US2004/037152号 (代理人整理番号PP20107.004 (035784/282916)) を参照のこと；これらの各々の内容は、それら全体が、参照により本明細書中に組み込まれる。

30

40

## 【0199】

実施例1：CHIR-12.12はCD40L媒介性細胞シグナル伝達を遮断する可溶性CD40リガンド (CD40L) は、B細胞を活性化し、そして生存および増殖の増強、ならびにNF- $\kappa$ B、ERK/MAPK、PI3K/AKT、およびp38シグ

50

ナル伝達経路の活性化を含む、種々の態様の機能的応答を誘導する。さらに、CD40L 媒介性CD40刺激は、正常なB細胞中における、切断PARPの還元および抗アポトーシスタンパク質、XIAPおよびMcl-1の誘導によって、生存シグナルを提供する。CD40L 媒介性CD40刺激はまた、TRAF2およびTRAF3にCD40細胞質ドメインへ結合させる。

#### 【0200】

下記の研究は、CHIR-12.12が、正常ヒトB細胞におけるこれらの刺激効果の全てを直接阻害したことを実証する。例えば、CHIR-12.12処理は、時間および用量依存カスパーゼ-9、カスパーゼ-3およびPARPの増加した切断ならびにXIAPおよびMcl-1の還元を生じさせ、B細胞アポトーシスを回復させた。CHIR-12.12での処理はまた、CD40L 媒介性CD40刺激の応答において、IKK (NF- $\kappa$ B経路)、ERK、AKT、およびp38のリン酸化を阻害した。さらに、CHIR-12.12は、初期CD40L 媒介性CD40刺激無しには、これらのアポトーシス効果を誘導しないことが判った。

#### 【0201】

CHIR-12.12は、PARPの切断を誘導することによって、CD40リガンドにより媒介される生存を阻害した。

#### 【0202】

これらの実験において、健康なドナー由来の $0.6 \times 10^6$ 正常ヒトB細胞(85-95%のパーセント純度)を、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  sCD40L (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK)で刺激した。次いで、CHIR-12.12 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびコントロールIgGを添加した。細胞を、0、20分、2時間、6時間、18時間、および26時間で回収した。切断されたカスパーゼ-9、切断されたカスパーゼ-3、切断PARP、および $\beta$ -アクチンコントロールを、ウエスタンブロットによって細胞溶解物中において検出した。

#### 【0203】

手短に言えば、CD40L 媒介性CD40刺激は生存シグナルを提供することが観察され、何故ならば、それは経時において切断されたカスパーゼ-9、切断されたカスパーゼ-3、または切断PARPの増加を生じさせず、細胞はアポトーシスを受けていなかったことを示すためである。しかし、CHIR-12.12での処理は、これらの切断産物の増加を生じさせ、CHIR-12.12処理は、sCD40L刺激された正常B細胞における生存シグナル伝達に対するCD40Lの効果は無効にし、B細胞アポトーシスを買回すことを示す(データは示さず)。

#### 【0204】

CHIR-12.12は、「生存」抗アポトーシスタンパク質の発現を阻害した。

#### 【0205】

これらの実験において、健康なドナー由来の $0.6 \times 10^6$ 正常ヒトB細胞(85-95%のパーセント純度)を、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  sCD40L (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK)で刺激した。次いで、CHIR-12.12 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびコントロールIgGを添加した。細胞を、0、20分、2時間、6時間、18時間、および26時間で回収した。Mcl-1、XIAP、CD40、および $\beta$ -アクチンコントロールを、ウエスタンブロットによって細胞溶解物中において検出した。手短に言えば、sCD40L刺激は、経時でのMcl-1およびXIAPの持続した発現を生じさせた。しかし、CHIR-12.12でのsCD40L刺激細胞の処理は、経時でのこれらのタンパク質発現の減少を生じさせた(データは示さず)。Mcl-1およびXIAPはアポトーシス経路を遮断し得る「生存」シグナルであるため、これらの結果は、CHIR-12.12処理がsCD40L刺激正常B細胞中におけるアポトーシスに対する遮断を除去することを実証する。

#### 【0206】

CHIR-12.12処理は正常B細胞におけるIKK (Ser180) およびIK

10

20

30

40

50

K (Ser181) のリン酸化を阻害した。

【0207】

これらの実験において、健康なドナー由来の  $0.6 \times 10^6$  正常ヒトB細胞 (85-95%のパーセント純度) を、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  sCD40L (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK) で刺激した。次いで、CHIR-12.12 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびコントロールIgGを添加した。細胞を、0および20分で回収した。リン酸化IKK (Ser180) およびIKK (Ser181) ならびにトータルIKK を、ウエスタンブロットによって細胞溶解物中において検出した。

【0208】

手短に言えば、sCD40Lによる刺激は、経時でのIKK (Ser180) およびIKK (Ser181) のリン酸化を生じさせ；しかし、CHIR-12.12での処理は、正常B細胞においてsCD40L刺激に対するこの応答を無効にした (データは示さず)。

【0209】

CHIR-12.12処理は、用量依存性様式で、CD40リガンドにより媒介される生存を阻害した。

【0210】

これらの実験において、健康なドナー由来の  $0.6 \times 10^6$  正常ヒトB細胞 (85-95%のパーセント純度) を、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  sCD40L (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK) で刺激した。次いで、CHIR-12.12 (0.01、0.1、0.2、0.5、 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびコントロールIgGを添加した。細胞を24時間で回収した。切断PARPおよび - アクチンコントロールをウエスタンブロットによって細胞溶解物中において検出した。

【0211】

手短に言えば、CHIR-12.12処理は、用量依存様式で、sCD40L刺激細胞においてPARP切断の増加を生じさせ、そしてしたがって、sCD40L刺激された正常B細胞において生存シグナル伝達経路を無効にした (データは示さず)。

【0212】

CHIR-12.12治療は、用量依存性様式で「生存」抗アポトーシスタンパク質の発現を阻害した。

【0213】

これらの実験において、健康なドナー由来の  $0.6 \times 10^6$  正常ヒトB細胞 (85-95%のパーセント純度) を、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  sCD40L (Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK) で刺激した。次いで、CHIR-12.12 (0.5、2、および  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびコントロールIgGを添加した。細胞を22時間で回収した。Mcl-1、XIAP、切断PARP、および - アクチンコントロールをウエスタンブロットによって細胞溶解物中において検出した。

【0214】

手短に言えば、CHIR-12.12処理は、用量依存様式で、sCD40L刺激された細胞中において、Mcl-1およびXIAP発現を減少させ、そして切断PARP発現を増加させ、そしてしたがって、sCD40L刺激された正常B細胞中において、アポトーシス経路に対するこれらの遮断を無効にした (データは示さず)。

【0215】

CHIR-12.12は、可溶性CD40Lシグナル伝達の非存在下において、抗アポトーシスタンパク質、切断PARP、およびXIAPの発現に影響を与えなかった。

【0216】

これらの実験において、健康なドナー由来の  $1.0 \times 10^6$  正常ヒトB細胞 (85-9

10

20

30

40

50

5%のパーセント純度)を、CHIR-12.12(10 µg/mL)およびコントロールIgGのみで処理した(即ち、抗体を添加する前に、細胞はsCD40Lで予め刺激しなかった)。細胞を0、4、14、および16時間で回収した。XIAP、切断PARP、および -アクチンコントロールをウエスタンブロットによって細胞溶解物中において検出した。

【0217】

手短に言えば、結果は、sCD40L刺激無しに、細胞は、IgG処理コントロール細胞およびCHIR-12.12細胞の両方において、増加された濃度の切断PARPを発現し、一方、XIAPの発現は一定のままであることを示す(データは示さず)。これらのデータは、CHIR-12.12は、CD40L刺激無しでは、正常なヒトB細胞においてアポトーシスを誘導しないことを示している。

10

【0218】

CHIR-12.12は、正常なB細胞におけるIKKa(Ser180)およびIKK(Ser181)、AKT、ERK、およびp38のリン酸化を阻害した。

【0219】

これらの実験において、健康なドナー由来の $1.0 \times 10^6$ 正常ヒトB細胞(85-95%のパーセント純度)を、1%FBS含有培地において血清飢餓させ(serum starve)、そして1 µg/mL sCD40L(Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK)で刺激した。培養物をCHIR-12.12(1および10 µg/mL)およびコントロールIgGd処理した。細胞を0および20分で回収した。ホスホ-IKK、ホスホ-IKK、トータルIKK、ホスホ-ERK、トータルERK、ホスホ-AKT、トータルAKT、ホスホ-p38、およびトータルp38を、ウエスタンブロットによって細胞溶解物中において検出した。

20

【0220】

手短に言えば、sCD40L刺激は、IKK / リン酸化、ERKリン酸化、AKTリン酸化、およびp38リン酸化の増加を生じさせ、したがって、細胞の生存およびまたは増殖へ導いた。CHIR-12.12での細胞の処理は、正常なB細胞におけるこれらのシグナル伝達経路に対するsCD40L刺激の効果を無効にした(データは示さず)。

【0221】

CHIR-12.12は、CD40シグナル伝達カスケードにおいて、PI3KおよびMEK / ERK等の複数のシグナル伝達経路を阻害する。

30

【0222】

これらの実験において、健康なドナー由来の $1.0 \times 10^6$ 正常ヒトB細胞(85-95%のパーセント純度)を、1%FBS含有培地において血清飢餓させ(serum starve)、そして1 µg/mL sCD40L(Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK)で刺激した。培養物をまた、CHIR-12.12(1および10 µg/mL)、Wortmanin(PI3K/AKTインヒビター; 1および10 µM)、LY 294002(PI3K/AKTインヒビター; 10および30 µM)、およびPD98095(MEKインヒビター; 10および30 µg/mL)で処理した。細胞を0および20分で回収した。ホスホ-ERK、ホスホ-AKT、トータルAKT、ホスホ-IKK / 、およびトータルを、ウエスタンブロットによって細胞溶解物中において検出した。

40

【0223】

手短に言えば、結果は、CHIR-12.12は、これらのシグナル変換分子の全てのリン酸化を無効にし、一方、前記シグナル変換インヒビターは、シグナル伝達の特異的無効化のみを示したことを示しており、CHIR-12.12は、CD40L刺激によって媒介されるこれらのシグナル変換分子のアップストリームを恐らく阻害することを示している(データは示さず)。

【0224】

50

CHIR-12.12は、正常B細胞において、CD40の細胞質ドメインへのシグナル伝達分子TRAF2およびTRAF3の結合を阻害する。

【0225】

これらの実験において、健康なドナー由来の $4.0 \times 10^6$ 正常ヒトB細胞(85-95%のパーセント純度)を、1%FBS含有培地において4時間血清飢餓させ(serum starve)、そして $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  sCD40L(Alexis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK)で刺激した。細胞を0および20分で回収した。CD40を、ポリクローナル抗CD40(Santa Cruz Biotechnology, CA)を使用して免疫沈降させ、そして抗TRAF2 mAb(Santa Cruz Biotechnology, CA)、抗TRAF3 mAb(Santa Cruz Biotechnology, CA)、および抗CD40 mAb(Santa Cruz Biotechnology, CA)で、ウエスタンブロットにおいてプローブした。

10

【0226】

手短に言えば、結果は、TRAF2およびTRAF3は、sCD40L刺激後、CD40で共沈降したことを示している。対照的に、CHIR-12.12での処理は、sCD40L刺激された正常B細胞中において、CD40-TRAF2/3シグナル伝達複合体の形成を無効にした。CD40発現に変化はなかった(データは示さず)。

【0227】

理論に拘束されないが、これらの実験結果、および上述の実験における結果は、CHIR-12.12抗体が、特性の独特の組み合わせを有する二重作用アンタゴニスト抗CD40モノクローナル抗体であることを示している。この完全なヒトモノクローナル抗体は、B細胞の生存および増殖についてのCD40L媒介性CD40シグナル伝達経路を遮断し;このアンタゴニズムは、最終的な細胞死へ導く。CHIR-12.12はまた、エフェクター細胞による認識および結合を媒介し、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を開始させる。CHIR-12.12がいったんエフェクター細胞へ結合されると、細胞溶解酵素が放出され、B細胞アポトーシスおよび溶解へ導く。CHIR-12.12は、前臨床モデルにおけるのと比較した場合、リツキシマブよりも強力な抗腫瘍抗体である。

20

【0228】

実施例2: CD40+細胞におけるCD40リガンド誘導性サイトカイン分泌の評価  
そのリガンドによるCD40の刺激は、正常B細胞についての生存および増殖シグナルを提供する。アンタゴニスト抗CD40抗体CHIR-12.12は、ヒト末梢血リンパ球の増殖を誘導しないが、CD40L誘導リンパ球増殖を阻害する。CD40シグナル伝達はまた、細胞を誘導し、種々のサイトカインを産生させる。この実施例において、正常B細胞および単球によるサイトカイン産生を調節するCHIR-12.12の能力を試験した。

30

【0229】

細胞(1ウェル当たり $1 \times 10^5$ 細胞)を、CD40L(CD40トランスフェクトされた、ホルムアルデヒド固定化CHO細胞、1ウェル当たり $2 \times 10^5$ )の存在下または非存在下で、96ウェルプレート中において培養した。細胞を、37°Cで24時間、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、hulgG1(コントロール)またはCHIR-12.12と共にインキュベートし、そして上澄み液を収穫した。hIL-6、hIL-8、hIL-10、hTNF- $\alpha$ 、hGM-CSF、hIL-1b、hIL-12p70、MCP-1およびMIP-1 $\beta$ の産生を、Meso Scale Discovery(登録商標)マルチアレイシステム(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland)によって測定した。

40

【0230】

CD40Lの非存在下でCHIR-12.12のみで培養した細胞は、バックグラウンドを超えるいずれのサイトカインも産生せず、CHIR-12.12はサイトカイン産生についてアゴニスト活性を有さないことを示唆している。対照的に、正常B細胞中にお

50

る hIL-10、hTNF- $\alpha$ 、hIL-8、hIL-6、MCP-1 および MIP-1 $\beta$  の CD40L 誘導産生 (n = 3) (表 2)。これらの培養物への CHIR-12.12 の添加は、全てのサイトカインの産生を阻害した (表 3 を参照のこと)。

【 0 2 3 1 】

【 表 2 】

表 2: 正常 B 細胞からの CD40L 誘導性サイトカイン分泌 (値は、バックグラウンドに対する誘導の倍数 (folds) である)

サイトカイン	ドナー 1	ドナー 2	ドナー 3
hIL-1b	誘導なし	誘導なし	誘導なし
hIL-12p70	誘導なし	ND	誘導なし
hIL-10	3.6	ND	3.6
hGM-CSF	誘導なし	ND	誘導なし
hTNF- $\alpha$	3.7	4.8	22.8
hIL-8	7.7	14.7	49.3
hIL-6	5.7	3.8	20.5
MCP-1	5.5	試験されず	1.7
MIP-1 $\beta$	2.2	2.6	17.8

10

【 0 2 3 2 】

【 表 3 】

表 3: CHIR-12.12 は、CD40L によって誘導される全てのサイトカインの正常 B 細胞からの分泌を阻害する (値は阻害% である)

サイトカイン	ドナー 1	ドナー 2	ドナー 3
hIL-1b	誘導なし	誘導なし	誘導なし
hIL-12p70	誘導なし	ND	誘導なし
hIL-10	90.5	ND	94.4
hGM-CSF	誘導なし	ND	誘導なし
hTNF- $\alpha$	92.8	97.4	98.5
hIL-8	98.2	84.7	99.5
hIL-6	92.2	99.9	99.3
MCP-1	55.3	試験されず	25.7
MIP-1 $\beta$	54.4	92	92.5

20

30

CHIR-12.12 は、hIL-10、hTNF- $\alpha$ 、hIL-8、hIL-6、MCP-1、および MIP-1 $\beta$  の CD40 誘導性単球産生を阻害する (n = 1) (表 4 対表 5)。

【 0 2 3 3 】

## 【表4】

表4: 単球からのCD40誘導性サイトカイン分泌  
(値は、バックグラウンドに対する誘導の倍数(folds)  
である)

サイトカイン	ドナー 1
hIL1-b	誘導なし
hIL-12p70	誘導なし
hIL-10	4.2
hGM-CSF	誘導なし
hTNF- $\alpha$	13.8
hIL8	123.5
hIL6	77.9
MCP-1	289.9
MIP-1 $\beta$	161.9

10

## 【0234】

## 【表5】

表5: CHIR-12. 12は、CD40Lによって誘導される  
単球からの全てのサイトカインの分泌を阻害する(値は  
阻害%である)

サイトカイン	ドナー 1
hIL-1b	誘導なし
hIL-12p70	誘導なし
hIL-10	58.5
hGM-CSF	誘導なし
hTNF- $\alpha$	60.1
hIL-8	43.7
hIL-6	64.9
MCP-1	92.6
MIP-1 $\beta$	32.4

20

一緒になって、これらのデータは、CHIR-12.12が、CD40リガンド媒介性  
生存、増殖およびサイトカイン産生についての強力なアンタゴニストであることを示して  
いる。

30

## 【0235】

CD40連結はまた、正常内皮細胞および単球(Melter et al. (2000) Blood 96(12):3801-3808; Flaxenburg et al. (2004) J. Immunol. 172:7503-7509)ならびにリウマチ骨膜線維芽細胞(Choi et al. (2000) J. Immunol. 164:5055-5061)におけるVEGFの発現を誘導し得る。炎症性部位でのCD40L媒介性CD40シグナル伝達は、線維芽細胞およびVEGFの組織単球/マクロファージ産生を刺激し、新脈管形成へ導き、これは、慢性炎症プロセスを促進および維持すると考えられる(例えば、Monaco et al. (2004) Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy 3(1):35-42を参照のこと)。したがって、VEGFレベルの変化は、CD40L媒介性CD40シグナル伝達の有用なサイトカインマーカーを提供し得る。VEGFは分泌タンパク質であるため、VEGFタンパク質発現の変化は、ウエスタンブロットまたはELISA等の技術を使用して、細胞培養上澄み液中または患者血液サンプルから得られた血漿中において容易に検出され得る。あるいは、それは、ノザンブロットまたは定量RT-PCR等の多数の技術のいずれかを使用して、細胞/組織サンプルから得られたmRNAから検出され得る。

40

## 【0236】

別の実験において、単球におけるVEGFのCD40L誘導産生を、上述のものと類似

50

の様式で試験する。これらの細胞培養物へのCHI R - 1 2 . 1 2の添加は、VEGFのCD40L誘導産生を阻害することが判る。

【0237】

実施例3：バイオマーカーおよび予測マーカー

本発明の方法において使用されるエクスピボ予測アッセイおよび追加の予測アッセイは、その成熟タンパク質配列およびヌクレオチド配列が当該分野において公知であるバイオマーカーの発現レベルについて生物学的サンプルをスクリーニングすることを必要とする。例えば、下記表2および3に示す情報を参照のこと。タンパク質レベル（例えば、抗体プローブ）または核酸レベル（例えば、PCRプローブ）で、これらのバイオマーカーを検出するためのプローブは、この配列情報に基づいて設計され得ること、およびプローブは、本明細書中に開示される配列の変異体を検出するように設計され得ることが、認識される。

10

【0238】

【表6】

表6: バイオマーカーについてのアミノ酸およびヌクレオチド配列

バイオマーカー名	アクセッション番号	アクセッション番号
AKT-1	<u>NM_005163</u>	<u>NP_005154</u>
AKT-2	<u>NM_001626</u>	<u>NP_001617</u>
AKT-3	<u>AF135794</u>	<u>AAD24196</u>
PI3K	<u>Y13892</u>	<u>CAA74194</u>
PDK1	<u>BC006339</u>	<u>AAH06339</u>
IKK $\alpha$	<u>AF012890</u>	<u>AAC51662</u>
IKK $\beta$	<u>AF031416</u>	<u>AAC64675</u>
I $\kappa$ B	<u>BT006743</u>	<u>Q15653</u>
NF- $\kappa$ B	<u>NM_003998</u>	<u>NP_003989</u>
MEK1	<u>L11284</u> <u>NM_002755</u>	<u>NP_002746</u>
MEK2	<u>L11285</u> <u>NM_030662</u>	<u>NP_109587</u>
MEK3	<u>NM_002746</u>	<u>NP_002737</u>
MEK6	<u>U49732</u>	<u>AAB05035</u>
ERK1	<u>NM_002746</u>	<u>NP_002737</u>
ERK2	<u>NM_002745</u>	<u>NP_002736</u>
p38	<u>L35253</u>	<u>AAA74301</u>
カスパーゼ 3	<u>NM_004346</u>	<u>NP_004337</u>
カスパーゼ 7	<u>BT006683</u>	<u>AAP35329</u>
カスパーゼ 9	<u>BT006911</u>	<u>AAP35557</u>
PARP	<u>NM_001618</u>	<u>NP_001609</u>
Bcl-2	<u>M14745</u>	<u>AAA35591</u>
Bcl-xl	<u>Z23115</u>	<u>CAA80661</u>
バイオマーカー名	アクセッション番号	アクセッション番号
Mcl-1	<u>AF118124</u>	<u>AAD13299</u>
XIAP	<u>U45880</u>	<u>AAC50373</u>
cIAP1	<u>U45879</u>	<u>AAC50372</u>
サバイピン	<u>U75285</u>	<u>AAC51660</u>
TRAF-1	<u>NM_005658</u>	<u>NP_005649</u>
Ki67	<u>X65550</u>	<u>CAA46519</u>

20

30

40

【0239】

## 【表7】

表7: CD40およびCD40Lについてのアミノ酸およびヌクレオチド配列

名称	ヌクレオチド配列		アミノ酸配列	
	アクセッション番号	配列番号	アクセッション番号	配列番号
CD40 ショートアイソフォーム	<u>NM_152854</u>	配列番号 9	<u>NP_690593</u>	配列番号 10
CD40 ロングアイソフォーム	<u>X60592</u>	配列番号 11	<u>CAA43045</u>	配列番号 12
CD40L	<u>NM_000074</u>	配列番号 13	<u>NP_000065</u>	配列番号 14
可溶性 CD40L	<u>NM_000074</u>	配列番号 15 (配列番号 13の ヌクレオチド 139-786)	<u>NP_000065</u>	配列番号 16 (配列番号 14の残基 47-261)

## 実施例 4 : 抗 CD 4 0 治療剤のアンタゴニスト活性についてのアッセイ

以下の実施例は、抗 CD 4 0 抗体のアンタゴニスト活性を評価するために使用され得る。これらのアッセイのためのヒト B 細胞は、本質的に De Groot et al. (1990) Lymphokine Research (1990) 9 : 321 に記載されるように、例えば、扁桃摘出術を受ける個人から得られる扁桃からの単離によって、得ることができる。手短かに言えば、該組織をメスの刃で分散し、食細胞および NK 細胞を 5 mM L - ロイシンメチルエステルでの処理によって枯渇させ、そして T 細胞を、2 - アミノエチルイソチオウロニウムで処理したヒツジ赤血球 (SRBC) での 1 サイクルのロゼティング (rosetting) によって除去する。得られた B リンパ球調製物の純度は、抗 - (CD 20) mAb B1 (Coulter Clone, Hialeah, FL) または抗 - (CD 3) mAb OKT3 (Ortho, Raritan, NJ) およびウサギ抗 - (マウス Ig) の FITC 結合化 F(ab')<sub>2</sub> フラグメント (Zymed, San Francisco, CA) での間接的な免疫蛍光標識、ならびに FACS 分析によって確認され得る。

## 【0240】

## (B 細胞増殖アッセイ)

B 細胞 (1 ウェル当たり  $4 \times 10^4$ ) を、平底 96 ウェルマイクロタイタープレート中において、10% ウシ胎児血清が補充された 200  $\mu$ L IMDM 中で培養する。B 細胞を、固定化抗 - (IgM) 抗体 (Immunobeads; 5  $\mu$ g/mL; BioRad, Richmond, California) の添加によって刺激する。必要に応じて、100 U/mL 組換え IL - 2 を添加する。種々の濃度のテストモノクローナル抗体 (mAb) を、マイクロ培養物 (microcultures) の開始時に添加し、そして増殖を 18 時間パルスング (pulsing) 後、(<sup>3</sup>H) - チミジンの組込みの測定によって第 3 日に評価する。

## 【0241】

アンタゴニスト抗 CD 4 0 抗体は、固定化抗 IgM の存在下または固定化抗 IgM および IL - 2 の存在下において、ヒト B 細胞増殖を顕著には共刺激しない。

## 【0242】

## (Bancheureau 様 B 細胞増殖アッセイ)

Bancheureau et al. (1991) Science (1991) 251 : 70 によって記載されるものに類似の培養系において B 細胞増殖を刺激する抗 CD 4 0 モノクローナル抗体の能力を試験するために、ヒト Fc RII の HR 対立遺伝子形態を発現するマウス 3T6 トランスフェクタント細胞を使用する。B 細胞 (1 ウェル当たり  $2 \times 10^4$ ) を、10% ウシ胎児血清および 100 U/mL 組換え IL - 4 が補充された 200  $\mu$ L IMDM 中、 $1 \times 10^4$  トランスフェクタント細胞 (放射線照射、5000 Rad) の存在下、平底マイクロウェル中において、培養する。B 細胞の添加前に、3

10

20

30

40

50

T6細胞を、少なくとも5時間、培養プラスチックへ付着させる。抗CD40mAbを、15ng/mLから2000ng/mLまで変動する濃度で添加し、そしてB細胞の増殖を、 $[^3\text{H}]$ チミジンでの18時間パルシング(pulsing)後、第7日に、チミジン組込みの測定によって評価する。

#### 【0243】

(アンタゴニスト抗CD40 mAbを使用時のS2C6刺激化B細胞増殖の阻害)  
アンタゴニスト抗CD40モノクローナル抗体(mAbs)または、上述のB細胞増殖アッセイを使用して、S2C6(SGN-14としても公知、これは、報告によれば、正常B細胞の増殖のCD40刺激のアゴニストである; Francisco et al. (2000) Cancer Res. 60:3225-3231)等の抗CD40抗体によってB細胞増殖の刺激を阻害するそれらの能力によって特徴付けられ得る。ヒト扁桃B細胞(1ウェル当たり $4 \times 10^4$ )を、抗CD40 mAb S2C6(1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )およびSephadex Mの存在下、マイクロウェル中、200 $\mu\text{L}$ で培養する。目的の種々の濃度の抗CD40 mAbを添加し、そして $[^3\text{H}]$ -チミジン組込みを3日後に評価する。コントロール抗-(グルコセレブロシダーゼ)mAbとして、8E4が類似の濃度で添加され得る。Barneveld et al. (1983) Eur. J. Biochem. 134:585。アンタゴニスト抗CD40抗体は、少なくとも75%またはそれ以上、mAb S2C6によって抗IgM誘導性ヒトB細胞増殖の共刺激を阻害し得る(即ち、アンタゴニスト抗CD40抗体の存在下でのS2C6刺激化増殖は、アンタゴニスト抗CD40抗体の非存在下で観察されるもの25%以下である)。対照的に、-グルコセレブロシダーゼに対して無関係mAbである8E4の等価量では、有意な阻害は見られない。Barneveld et al (前出)。このような結果は、抗CD40mAbは、ヒトB細胞の増殖についての刺激性シグナルを送達せず、しかし、逆に、別のmAbでCD40を誘導することによって発せられる刺激性シグナルを阻害し得ることを示す。

#### 【0244】

(EL4B5細胞でのB細胞活性化アッセイ)  
Zubler et al. (1985) J. Immunol. (1985) 134:3662は、EL4B5としても公知の、マウス胸腺腫EL-4株の突然変異サブクローンが、マウス起源およびヒト起源の両方のB細胞を強力に刺激して、インビトロで免疫グロブリン分泌血漿細胞へ増殖および分化することを観察した。この活性化は、抗原独立性でありそして制限MHCではないことが判った。ヒトB細胞の最適な刺激のために、活性化ヒトT細胞由来の上澄み液の存在が必要とされ、しかしB細胞応答はまた、EL4B5細胞がホルボール-12-ミリステート13-アセテート(PMA)またはIL-Iで予め活性化される場合に生じた。Zubler et al (1987) Immunological Reviews 99:281;およびZhang et al (1990) J. Immunol. 144:2955。この培養系におけるB細胞活性化は効率的であり-限定希釈実験は、大部分のヒトB細胞が、活性化されて抗体分泌細胞へ増殖および分化し得ることを示した。Wen et al (1987) Eur. J. Immunol 17:887。

#### 【0245】

10%熱不活性化ウシ胎児血清、5ng/mLホルボール-12-ミリステート13-アセテート(Sigma)および5%ヒトT細胞上澄み液が補充された200 $\mu\text{L}$  IMDM中、平底マイクロタイタープレート中において、B細胞(1ウェル当たり1000)を、放射線照射(5000 Rad)EL4B5細胞(1ウェル当たり $5 \times 10^4$ )と共に培養する。mAbを培養物の開始時に種々の濃度で添加し、そして $[^3\text{H}]$ -チミジンでの18時間パルシング後、第6日に、チミジン組込みを評価する。T細胞上澄み液の調製のために、精製T細胞を、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  PHAおよび10ng/mL PMAの存在下で36時間、 $10^6/\text{mL}$ の密度で培養する。Wen et al. (1987) Eur. J. Immunol. (1987) 17:887。T細胞上澄み液を該細胞の遠

10

20

30

40

50

心分離によって得、そして - 20 で保存する。E L 4 B 5 - B細胞培養物中におけるヒトB細胞の増殖を増大させることにおけるT細胞上澄み液の効果を試験し、そして最も有効な上澄み液を実験において使用するためにプールする。E L 4 B 5 誘導性ヒトB細胞増殖に対する抗C D 4 0抗体の効果を評価する場合、M O P C - 1 4 1 ( I g G 2 b ) 等のモノクローナル抗体が、コントロールとして添加され得る。

【 0 2 4 6 】

アンタゴニスト抗C D 4 0抗体は、例えば、少なくとも75%またはそれ以上、E L 4 B 5細胞株によって刺激されたB細胞増殖を阻害し得る(即ち、アンタゴニスト抗C D 4 0抗体の存在下でのE L 4 B 5誘導性B細胞増殖は、アンタゴニスト抗C D 4 0抗体の非存在下で観察されるものの25%以下である)。対照的に、M O P C - 1 4 1等のコントロール抗体は、E L 4 B 5誘導性B細胞増殖に対して有意な効果を有さない。

10

【 0 2 4 7 】

( B細胞による抗体産生についてのヒトT細胞ヘルパーアッセイ )

アンタゴニスト抗C D 4 0抗体は、B細胞による免疫グロブリン産生のアンタゴニストとして作用し得る。抗C D 4 0抗体は、T細胞ヘルパーアッセイにおける活性化T細胞で、接触依存性様式で、刺激されたB細胞による免疫グロブリン産生を阻害する該抗体の能力を評価することによって、このタイプのアンタゴニスト活性について試験され得る。この様式で、96ウェル組織培養プレートを、抗C D 3 m A b C L B - T 3 / 3 ( C L B , A m s t e r d a m , T h e N e t h e r l a n d s ) の1 : 5 0 0希釈の腹水でコーティングする。示されるように、共刺激m A bを添加する: 抗C D 2 m A b s C L B - T 1 1 . 1 / 1およびC L B - T 1 1 . 2 / 1 ( C L B , A m s t e r d a m , T h e N e t h e r l a n d s )、両方の腹水1 : 1 0 0 0、ならびに抗C D 2 8 m A b C L B - 2 8 / 1 ( C L B , A m s t e r d a m , T h e N e t h e r l a n d s )。引き続き、扁桃T細胞(放射線照射、3 0 0 0 R a d ; 1ウェル当たり $10^5$ )、扁桃B細胞(1ウェル当たり $10^4$ )、およびr I L - 2 ( 2 0 U / m L )を添加する。各細胞培養物の最終量は、2 0 0  $\mu$  Lである。8日後、細胞を遠心分離で沈降させ、そして細胞を含まない上澄み液を収穫する。(希釈された)サンプル中のヒトI g MおよびI g Gの濃度を、下記に記載するように、E L I S Aによって評価する。

20

【 0 2 4 8 】

1実施形態において、抗C D 3 m A bを用いてそして異なるm A bを用いてまたは用いずにコーティングした96ウェルプレート中において、ヒト扁桃B細胞( $10^4$ /ウェル)を、放射線照射された精製T細胞(3 0 0 0 r a d、 $10^5$ /ウェル)と共に培養する。培養8日後に、B細胞による免疫グロブリン産生の測定のために、上澄み液を収穫する。B細胞による免疫グロブリン産生を、下記に記載されるE L I S Aによって評価する。目的の抗C D 4 0抗体を、培養物の開始から種々の濃度で添加する。コントロールとして、m A b M O P C - 1 4 1が添加され得る。

30

【 0 2 4 9 】

アンタゴニスト抗C D 4 0抗体は、少なくとも50%またはそれ以上、ヒトT細胞によって刺激されるB細胞I g GおよびI g M抗体産生を阻害し得る(即ち、アンタゴニスト抗C D 4 0抗体の存在下でのT細胞誘導性抗体産生は、アンタゴニスト抗C D 4 0抗体の非存在下で観察されるものの50%以下である)。対照的に、M O P C - 1 4 1等のコントロール抗体は、B細胞によるT細胞誘導性抗体産生に対して有意な効果を有さない。

40

【 0 2 5 0 】

(免疫グロブリン定量のためのE L I S Aアッセイ)

ヒトI g MおよびI g Gの濃度をE L I S Aによって評価する。4 で16時間のインキュベーションによって、0 . 0 5 M炭酸緩衝液(p H = 9 . 6)中、96ウェルE L I S Aプレートを、4  $\mu$  g / m Lマウス抗ヒトI g G m A b M H 1 6 - 0 1 ( C L B , A m s t e r d a m , T h e N e t h e r l a n d s ) または1 . 2  $\mu$  g / m Lマウス抗ヒトI g M m A b 4 1 0 2 ( T a g o , B u r l i n g a m e , C A )でコーティングする。プレートをP B S - 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 ( P B S - T w e e n )

50

で3回洗浄し、そして1時間BSAで飽和させる。2回洗浄後、プレートを、種々の希釈のテストサンプルと共に、37で1時間インキュベートする。3回洗浄後、結合されたIgを、1µg/mLペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒトIgG mAb MH 16-01 (CLB)またはマウス抗ヒトIgM mAb MH 15-01 (CLB)と共に37で1時間インキュベーションすることによって検出する。プレートを4回洗浄し、そして結合されたペルオキシダーゼ活性を、基質としてのO-フェニレンジアミンの添加によって明らかにする。ヒト標準血清(H00、CLB)を、各アッセイについての標準曲線を確立するために使用する。

#### 【0251】

実施例5：CHIR-12.12処理は、正常ヒトB細胞中におけるCD40リガンド媒介性CD40生存およびシグナル伝達経路を遮断する

10

CD40リガンド(CD40L)によるCD40の活性化は、正常なBリンパ球の生存、増殖および分化を調節し得る。B細胞中において、CD40の連結反応は、腫瘍壊死因子受容体関連因子(TRAF)とのその結合、ならびに細胞増殖および生存に関する複数の下流のシグナル伝達経路の引き続いての活性化へ導く。この経路の活性化は、培養された正常B細胞へのCD40の添加がそれらの生存および増殖を促進する場合、エクスピボで実証され得る。下記に記載のさらなる研究を、正常ヒトB細胞中におけるCD40L媒介性CD40生存およびシグナル伝達経路に対するCHIR-12.12モノクローナル抗体の効果をさらにキャラクタライズするために行った。

#### 【0252】

20

MACS B細胞単離キット(Miltenyi Biotech INC, Auburn, CA)を使用して、ネガティブセレクションによって、末梢血から正常ヒトB細胞を精製し、そして、10µg/mLのCHIR-12.12またはアイソタイプコントロールh1gG1の存在下において、2µg/mLの組換えヒト可溶性CD40L(rhscD40L)有りまたは無しで、24時間培養した。細胞を溶解し、そして全ての細胞溶解物を、SDS-PAGE、ならびにヒトcPARP、Mc1-1、Bcl-x1、p-Aktおよびp-p38 MAPKに特異的な抗体を使用するウエスタンブロッティングによって、分離した。全ての膜を剥離し、そして好適である場合、-アクチンまたはトータルAktもしくはp38 MAPKタンパク質のいずれかについて再プローブした。結果を図1に示す。

30

#### 【0253】

正常ヒトB細胞のCD40L刺激は、アポトーシスマーカー(cPARP)のレベルを減少させ、そして抗アポトーシスマーカー(Mc1-1、Bcl-x1)の発現を増加させ、したがってこれらの細胞の増殖/生存を誘導する。さらに、CD40L誘導性B細胞生存は、Aktおよびp38 MAPKのリン酸化と関連した。対照的に、エクスピボでのCD40L刺激された正常B細胞のCHIR-12.12処理は、抗アポトーシスタンパク質Mc1-1およびBcl-x1の発現を阻害し、そして、下流のシグナル伝達タンパク質のリン酸化を阻害し、最終的にはB細胞のアポトーシスへ導く。

#### 【0254】

本明細書に記載の本発明の多くの修飾および他の実施形態が、前述の説明および関連の図面に示される技術を有するこれらの発明が属する当業者に明らかである。したがって、本発明は開示される特定の実施形態に限定されないこと、ならびに修飾および他の実施形態が添付の特許請求の範囲内に含まれるように意図されることが、理解される。特定の用語が本明細書中で使用されるが、それらは、一般的かつ記述的な意味でのみ使用され、そして限定のためではない。

40

#### 【0255】

本明細書中に記載の全ての刊行物および特許出願は、本発明が属する当業者のレベルを示す。全ての刊行物および特許出願は、各々の刊行物または特許出願が参照により組み込まれるように具体的かつ個々に示されるのと同程度に、参照により本明細書中に組み込まれる。

50

【図面の簡単な説明】

【 0 2 5 6 】

【図 1】図 1 は、正常なヒト B 細胞のシグナル伝達および生存が CD 4 0 L によって誘導されそして CHIR - 1 2 . 1 2 によって遮断されることを示す。

【 図 1 】

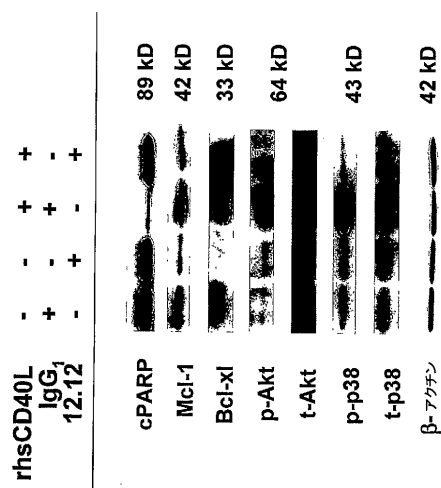


Figure 1

【配列表】

0005421590000001.app

0005421590000002.xml

## フロントページの続き

微生物の受託番号 ATCC PTA-5543

(72)発明者 オーカーマン, シャロン リー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94662-8097, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8097, ノバルティス ヴァクシNZ アンド ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド

(72)発明者 ジャラル, バヒジャ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94662-8097, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8097, ノバルティス ヴァクシNZ アンド ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド

(72)発明者 ルクマン, モハマト  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94662-8097, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8097, ノバルティス ヴァクシNZ アンド ダイアグノスティクス, インコーポレイテッド

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特表2005-508176(JP,A)  
Journal of Immunology, 2001, Vol.167, No.5, p.2942-2949  
International Immunopharmacology(2001), Vol. 1, p. 277-294  
Journal of Clinical Investigation, (1999), Vol. 103, No. 2, p. 281-290  
International Immunology, (2002), Vol. 14, No. 9, p. 973-982  
臨床免疫, 2003年, Vol.40, p.487-493  
遺伝子医学, 1999年, Vol.3, p.64-69

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00

C07K 16/28

CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	用于诊断和治疗具有自身免疫和/或炎性成分的疾病的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5421590B2</a>	公开(公告)日	2014-02-19
申请号	JP2008512518	申请日	2006-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司 爱克索马技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司 ZOMA科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	诺华公司 ZOMA科技有限公司		
[标]发明人	オーカーマンシャロンリー ジャラルバヒジャ ルクマンモハマド		
发明人	オーカーマン, シャロン リー ジャラル, バヒジャ ルクマン, モハマド		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/68 C07K16/28 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/00 A61P3/00 A61P19/00 A61P25/00 A61P29/00 G01N33/5091 G01N33/533 G01N33/564 G01N33/57484 G01N33/582 G01N2800/24 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/68.A C07K16/28 G01N33/48.P G01N33/53.Y		
代理人(译)	夏木森下		
审查员(译)	三罗·哈马达		
优先权	60/682575 2005-05-18 US 60/749336 2005-12-09 US		
其他公开文献	JP2008539791A5 JP2008539791A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了鉴定具有炎性疾病和/或自身免疫疾病的受试者的方法，所述疾病将受益于调节CD40L介导的CD40信号传导的抗CD40治疗剂。该方法包括使用细胞凋亡，细胞增殖和存活的生物标志物，以及CD40信号传导途径，以监测对一种或多种感兴趣的抗CD40治疗剂的体外反应，其调节CD40表达细胞上的CD40信号传导。离体预后测定可以单独使用或与其他预后测定结合使用，以鉴定将受益于抗CD40治疗剂治疗的候选受试者。本发明的方法还包括使用这些生物标志物来监测用抗CD40治疗剂治疗的体内功效。

表1. 抗CD40 IgG1抗体CHIR-5.9およびCHIR-12.12でのデータの初期セットのまとめ

マザー ハイブド-マ	ハイブド-マクローン	細胞表面結合	アンタゴニスト	ADCC	CDC	CMCC	V領域 DNA配列
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	有
153.8E2	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	++++	-	12056	有