



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113603782 A

(43) 申请公布日 2021.11.05

(21) 申请号 202110985193.0

A61P 19/06 (2006.01)

(22) 申请日 2016.05.27

A61P 19/08 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/168425 2015.05.29 US

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201680031563.4 2016.05.27

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

(71) 申请人 艾伯维公司

A61P 31/14 (2006.01)

地址 美国伊利诺伊州

A61P 17/00 (2006.01)

(72) 发明人 L·贝纳特伊尔

A61P 11/02 (2006.01)

M·A·阿吉里亚迪 B·L·麦克雷

A61P 1/16 (2006.01)

谢仲明

A61P 33/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

A61P 13/12 (2006.01)

代理人 权陆军 梅黎

A61P 9/14 (2006.01)

(51) Int.Cl.

A61P 25/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 21/04 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书115页

序列表69页 附图28页

(54) 发明名称

抗CD40抗体及其用途

(57) 摘要

本发明涉及抗CD40抗体及期用途。本发明涵盖拮抗性抗CD40抗体及其抗原结合部分。具体而言，本发明涉及人源化抗CD40抗体。在某些实施例中，本发明的抗体中和人类CD40 (hCD40) 活性。本发明的抗体或抗体部分可用于检测CD40并抑制CD40活性，例如在患有CD40活性有害的病症的人类受试者中。

1. 一种经分离抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合片段结合由SEQ ID NO:1的拓扑区Cys62-Phe67、Gln79-Cys83、Arg90-Thr99及Thr24-Cys37限定的人类CD40的表位。
2. 如权利要求1所述的经分离抗体或其抗原结合部分,其中该抗体或其抗原结合部分为拮抗性抗体。
3. 如前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中该抗体或其抗原结合部分包含:包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR3的重链可变区及包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR3的轻链可变区。
4. 如前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中该抗体或其抗原结合部分包含:包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2的重链可变区及包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2的轻链可变区。
5. 如前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中该抗体或其抗原结合部分包含:包含具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR2的重链可变区及包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2的轻链可变区。
6. 如前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中该抗体或其抗原结合部分包含:包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1的重链可变区及包含具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1的轻链可变区。
7. 如前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中该抗体或其抗原结合部分为IgG同种型。
8. 如权利要求7所述的抗体或其抗原结合部分,其中该抗体或其抗原结合部分为IgG1或IgG4同种型。
9. 如前述权利要求中任一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中该抗体或其抗原结合部分在Jurkat细胞报道基因分析中具有至少50nM的IC50。
10. 一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其包含:包含具有如SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3的轻链可变区和/或包含具有如SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3的重链可变区。

抗CD40抗体及其用途

[0001] 本申请是国际申请日为2016年5月27日的国际申请PCT/US2016/034716进入中国、申请号为201680031563.4的题为“抗CD40抗体及其用途”的发明专利申请的案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本发明主张2015年5月29日申请的美国临时申请第62/168,425号的优先权，其全部内容以引用的方式并入本文中。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有序列表，该序列表已以ASCII格式以电子方式提交且其全部内容以引用的方式并入本文中。该ASCII复本创建于2016年5月12日，命名为117813-10420_SL.txt且大小为91,019字节。

技术领域

[0006] 本发明涉及CD40 (CD40) 抗体及其抗原结合部分，及其在预防和/或治疗各种疾病中的用途。

背景技术

[0007] CD40为肿瘤坏死因子(TNF)受体家族成员，其在B细胞发育、淋巴细胞活化及抗原呈递细胞(APC)功能方面起重要作用。在器官特异性自体免疫疾病以及全身性自体免疫(诸如全身性红斑性狼疮症(SLE))中，上皮细胞、白血球及血管内皮上的CD40表达升高。在患有诸如克罗恩氏病(Crohn's disease)的慢性发炎性疾病的患者中，破坏CD40L/CD40信号传导路径可减少诸如IL-23及TNF的促炎性细胞因子产生，减弱T辅助细胞分化及功能，及抑制巨噬细胞活化。CD40与CD40L的相互作用诱导体液及细胞介导的免疫反应。CD40调控这对配体-受体活化B细胞及其他抗原呈递细胞(APC)，包括树突状细胞(DC)。

[0008] CD40为48kDa I型跨膜蛋白(van Kooten, J Leukoc Biol. 2000年1月; 67 (1) : 2-17)，其表达于各种造血型细胞(淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞)及非造血型细胞(上皮细胞、内皮细胞、纤维母细胞)上。CD40L主要表达于经活化的T细胞、B细胞及血小板上。关于CD40/CD40L生物学的大部分了解来自APC(树突状细胞(DC)或B细胞上的CD40表达)及表达CD40L的T细胞之间的相互作用。在静息B细胞上，CD40L接合(engagement)驱动B细胞活化、增殖及记忆B细胞发育(Kehry, Immunol. 1996年4月1日; 156 (7) : 2345-8)。CD40信号传导还是免疫球蛋白类别转换及生发中心形成所需。CD40/CD40L信号传导路径在B细胞生物学中的重要性在CD40或CD40L缺陷型小鼠中显而易见，CD40或CD40L缺陷型小鼠缺少生发中心且T依赖性抗体反应遭到阻抑。然而，在CD40-/-小鼠中，非T依赖性IgG反应依然完好，表明这些小鼠中所缺少的为细胞-细胞相互作用。CD40缺陷型小鼠在T细胞区室中也有缺陷。树突状细胞上经由CD40发生的信号传导上调II类MHC以及各种共刺激分子，诸如CD80及CD86，且促进DC的成熟。成熟DC经由产生诸如IL-2及IL-12的细胞因子来刺激CD4+T细胞的活化及存活。低效的T细胞激活似乎为CD40L-/-小鼠中有缺陷的T依赖性体液反应的主要原因(Grewal, Nature. 1995年12月7日; 378 (6557) : 617-20)。在患有X连锁高IgM症候群的人类中

可见到类似B细胞表型。这些患者患有因消除CD40/CD40L信号传导的CD40L基因座中的突变所致的原发性免疫缺乏症。这些个体具有升高的IgM水平且不能产生IgA、IgG及IgE，导致机会性感染风险增加(Adriana, J Clin Immunol. 2008年5月;28增刊1:S62-6)。

[0009] CD40信号传导路径对静息或原生淋巴细胞及APC转换为经活化/成熟表型极为重要。虽然可以在不存在CD40/CD40L信号传导的情况下发生T细胞激活及B细胞活化，但此路径为产生稳固的应变性免疫反应所需的。CD40与CD40L的接合导致TNF受体相关因子(TRAFF)募集至CD40的细胞质域(Bishop, Adv Exp Med Biol. 2007; 597: 131-51)。各种TRAFF蛋白的磷酸化引起典型及非典型NF κ B路径的活化。此外，JAK3与CD40细胞质尾的结合引起STAT5活化，STAT5活化诱导DC成熟以及TNF及IFN γ 产生。TRAFF6依赖性PI3K活化为DC中的关键存活信号，同时TRAFF2/TRAFF6具有NF κ B活化及上调CD80表达的冗余功能(Hostager, J Biol Chem. 2003年11月14日; 278 (46): 45382-90)。TRAFF 2、3、5及6均已显示在借由CD40信号传导介导的免疫球蛋白类别转换中起重要作用(Leo, Proc Natl Acad Sci U S A. 1999年2月16日; 96 (4): 1421-1426)。

[0010] 诸多自体免疫疾病的发病机制中涉及到CD40/CD40L信号传导路径，此类自体免疫疾病包括全身性红斑性狼疮症(SLE)、发炎性肠病(IBD)、多发性硬化症、类风湿性关节炎及休格连氏症候群(Sjogren's syndrome)(Law及Grewal, Adv Exp Med Biol. 2009; 647: 8-36)。在遭到慢性自体免疫破坏的组织(包括肾脏、肠道及关节)中，巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞及B细胞上的CD40表达升高(Borcherding, Am J Pathol. 2010年4月; 176 (4): 1816-27; Sawada-Hase, Am J Gastroenterol. 2000年6月; 95 (6): 1516-23)。在患有SLE、IBD及休格连氏症候群的患者中，可溶性CD40L升高，与这些患者的炎症负荷一致。

[0011] 慢性肠炎中CD40/CD40L路径的一些最早证据来自临床前模型，其中抗CD40L mAb保护啮齿动物不患上实验性结肠炎(de Jong, Gastroenterology. 2000年9月; 119 (3): 715-23; Liu, J Immunol. 2000年6月1日; 164 (11): 6005-14; Stuber, J Exp Med 1996年2月1日, 183 (2): 693-8)。疾病活动评分降低与肠道中促炎性细胞因子产生减少及防止慢性体重减轻的保护减弱有关。在CD40或CD40L基因缺陷型动物中观察到了类似结果(de Jong, Gastroenterology. 2000年9月; 119 (3): 715-23)。在疾病发作之后用抗CD40L mAb治疗小鼠仍可有效降低疾病活动性，表明此路径对于维持慢性发炎性疾病至关重要。此外，CD40激动性抗体足以在缺少淋巴细胞的小鼠中驱动肠炎(Uhlig, Immunity. 2006年8月; 25 (2): 309-18)。使用CD40 siRNA获得的较新数据还显示CD40信号传导在结肠炎中的重要作用(Arranz, J Control Release. 2013年2月10日; 165 (3): 163-72)。在克罗恩氏病中，固有层单核细胞及上皮细胞以高水平表达CD40且末梢血液中富含CD40+单核细胞。此外，已将CD40基因座中的多态现象与IBD易感性增加联系起来。在经抗TNF抗体治疗的克罗恩氏病患者中，转录谱指出，具有适当的药物治疗反应的患者体内的CD40 mRNA水平降低。然而，在对TNF抑制剂反应不良的患者中，CD40 mRNA水平不变，表明CD40依赖性、TNF非依赖性路径会促进这些患者发炎。研究表明，抑制CD40介导的信号传导在IBD以及其他自体免疫疾病的发病机制中为重要的。因此，仍然需要可出于治疗目的用于治疗诸如克罗恩氏病的慢性发炎性疾病及病症的拮抗性抗CD40抗体及其抗原结合部分。

发明内容

[0012] 本发明涉及拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分。本发明抗体包括但不限于能够结合人类CD40且基本上不含激动活性(agonist activity)的拮抗性人源化抗体及其抗原结合部分。

[0013] 在第一方面中，本发明的特征在于一种经分离抗体或其抗原结合部分，其中该抗体或其抗原结合片段结合由SEQ ID NO:1的拓扑区(topographic region) Cys62-Phe67、Gln79-Cys83、Arg90-Thr99及Thr24-Cys37限定的人类CD40的表位。在一个实施例中，抗体或其抗原结合部分为拮抗性抗体。在一个实施例中，抗体或其抗原结合部分为基本上不含激动活性的拮抗性抗体。

[0014] 在另一实施例中，抗体或其抗原结合部分包含：包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR3的重链可变区及包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的CDR3的轻链可变区。在另一实施例中，抗体或其抗原结合部分包含：包含具有SEQ ID NO:111的氨基酸序列的CDR2的重链可变区及包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2的轻链可变区。在另一其他实施例中，抗体或其抗原结合部分包含：包含具有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的CDR2的重链可变区及包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2的轻链可变区。在另一实施例中，抗体或其抗原结合部分包含：包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1的重链可变区及包含具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR1的轻链可变区。

[0015] 在一个实施例中，抗体或其抗原结合部分为IgG同种型。在另一相关实施例中，抗体或其抗原结合部分为IgG1或IgG4同种型。

[0016] 在一个实施例中，抗体或其抗原结合部分在Jurkat细胞报道基因分析中具有至少50nM的IC50。

[0017] 在另一方面中，本发明的特征在于一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分，其包含：包含具有如SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3的轻链可变区和/或包含具有如SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3的重链可变区。在一个实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的轻链可变区包含具有如SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3且其中重链可变区包含具有如SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3。在另一实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的重链可变区进一步包含具有如SEQ ID NO:42中所阐述的氨基酸序列的CDR2。在另一其他实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的轻链可变区进一步包含具有SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR2。在另一实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的重链可变区进一步包含具有如SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的CDR1。在另一其他实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的轻链可变区进一步包含具有如SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列的CDR1。

[0018] 在另一实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包含：包含SEQ ID NO:6、42及8的CDR组的重链可变区及包含SEQ ID NO:21、11及12的CDR组的轻链可变区。

[0019] 在一个实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分经人源化。在另一实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分进一步包含人类受体框架。在另一相关实施例中，人类受体框架包含选自SEQ ID NO:82-106的氨基酸序列。在另一实施例中，人类受体框架包含至少一个框架区氨基酸取代，其中该框架的氨基酸序列与该人类受体框架的序列至少65%同一且包含至少70个与人类受体框架同一的氨基酸残基。在另一实施例中，人类受体

框架包含至少一个在关键残基处的框架区氨基酸取代,该关键残基选自:

- [0020] 与CDR相邻的残基;
 - [0021] 糖基化位点残基;
 - [0022] 稀有残基;
 - [0023] 能够与人类CD40相互作用的残基;
 - [0024] 能够与CDR相互作用的残基;
 - [0025] 典型残基 (canonical residue);
 - [0026] 介于重链可变区与轻链可变区之间的接触残基;
 - [0027] 游标区 (Vernier zone) 内的残基;以及
 - [0028] 在Chothia限定的可变重链CDR1与Kabat限定的第一重链框架之间重叠的区域中的残基。
- [0029] 在另一相关实施例中,关键残基选自48H、49H及36L。在一个实施例中,关键残基取代是在可变重链区中且为V48I或S49A。在另一实施例中,关键残基取代是在可变轻链区中且为Y36F。
- [0030] 在一个实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包含有包含SEQ ID NO:28中所阐述的氨基酸序列的重链可变区。在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包含有包含SEQ ID NO:20中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0031] 在一个实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分基本上不含激动活性。在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分抑制CD40与CD40配体 (CD40L) 或与可溶性CD40配体 (sCD40L) 的结合。在另一其他实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分结合食蟹猴CD40 (cyno CD40)。在一个实施例中,抗CD40抗体或其抗原结合部分结合人类及食蟹猴CD40,但不结合大鼠、兔或小鼠CD40。
- [0032] 在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分能够调节CD40的生物功能。在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分能够中和CD40。在又另一其他实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分抑制NF- κ B活化。
- [0033] 在一个实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分与CD40的结合速率常数 (K_{on}) 选自至少约 $10^2 M^{-1} s^{-1}$;至少约 $10^3 M^{-1} s^{-1}$;至少约 $10^4 M^{-1} s^{-1}$;至少约 $10^5 M^{-1} s^{-1}$;及至少约 $10^6 M^{-1} s^{-1}$;如借由表面等离子共振所量测。
- [0034] 在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分与CD40的解离常数 (K_D) 选自由以下组成的组:至多约 $10^{-7} M$;至多约 $10^{-8} M$;至多约 $10^{-9} M$;至多约 $10^{-10} M$;至多约 $10^{-11} M$;至多约 $10^{-12} M$;及至多约 $10^{-13} M$ 。
- [0035] 在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包含人类IgM恒定域、人类IgG1恒定域、人类IgG2恒定域、人类IgG3恒定域、人类IgG4恒定域、人类IgA恒定域或人类IgE恒定域的重链免疫球蛋白恒定域。在相关实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的重链免疫球蛋白恒定区域为人类IgG1恒定域。在另一相关实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的人类IgG1恒定域包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸序列。
- [0036] 在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分进一步包含有包含人类Ig κ 恒定域或人类Ig λ 恒定域的轻链免疫球蛋白恒定域。在相关实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的人类Ig κ 恒定域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或其中人类Ig λ 恒定域

包含氨基酸序列SEQ ID NO:81。

[0037] 在某些实施例中,本发明的特征还在于一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其与如本文所述的方面及实施例中的任一者中所阐述的抗体或其抗原结合部分相竞争。

[0038] 在另一方面中,本发明的特征在于一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其包含:包含如SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的重链CDR1;包含如SEQ ID NO:42中所阐述的氨基酸序列的重链CDR2;包含如SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的重链CDR3;包含如SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列的轻链CDR1;包含如SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的轻链CDR2;及包含如SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0039] 在另一方面中,本发明的特征在于一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其包含:包含SEQ ID NO:28中所阐述的氨基酸序列的重链可变域及包含SEQ ID NO:20中所阐述的氨基酸序列的轻链可变域。在另一方面中,本发明的特征在于一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其包含:包含与SEQ ID NO:28具有至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的重链可变域和/或包含与SEQ ID NO:20具有至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列的轻链可变域。

[0040] 在另一方面中,本发明的特征在于一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其包含:包含SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列或与SEQ ID NO:41具有至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的重链;和/或包含SEQ ID NO:40中所阐述的氨基酸序列或与SEQ ID NO:40具有至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的序列的轻链。在一个实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的重链包含SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列,且拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的轻链包含SEQ ID NO:40中所阐述的氨基酸序列。

[0041] 在另一方面中,本发明的特征在于一种抗CD40抗体,其包含:包含如SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列的重链及包含如SEQ ID NO:40中所阐述的氨基酸序列的轻链。

[0042] 在一个实施例中,本发明的抗体或其抗原结合部分是重组性的。

[0043] 在某些实施例中,本发明的特征还在于一种药物组合物,其包含如本文所述的方面及实施例中的任一者中所阐述的抗CD40抗体或其抗原结合部分及药学上可接受的载体。

[0044] 在其他某些实施例中,本发明的特征还在于一种药物组合物,其包含如本文所述的方面及实施例中的任一者中所阐述的抗CD40抗体或其抗原结合部分及聚山梨醇酯。在另一相关实施例中,聚山梨醇酯为聚山梨醇酯80。

[0045] 在另一实施例中,药物组合物包含组氨酸缓冲剂。

[0046] 在另一其他实施例中,药物组合物包含多元醇。在相关实施例中,多元醇选自甘露糖醇、山梨糖醇、海藻糖或蔗糖。

[0047] 在另一实施例中,药物组合物的pH为约4至约8。在相关实施例中,药物组合物的pH为约5至约7。

[0048] 在另一实施例中,药物组合物经冻干。

[0049] 在其他实施例中,本发明的特征还在于一种经分离核酸,其编码本文所述的方面及实施例中的任一者的拮抗性抗CD40抗体氨基酸序列。在另一实施例中,本发明的特征在于一种运载体,其包含经分离核酸。在相关实施例中,运载体选自pcDNA、pTT、pTT3、pEFBOS、

pBV、pJV及pBJ运载体。

[0050] 在另一实施例中，宿主细胞包含运载体。在相关实施例中，宿主细胞为原核细胞或真核细胞。在另一实施例中，真核细胞为原生生物细胞、动物细胞、植物细胞、真菌细胞、酵母细胞、哺乳动物细胞、禽类细胞或昆虫细胞。在另一其他实施例中，哺乳动物细胞为CHO细胞或COS细胞。

[0051] 在某些实施例中，本发明的特征还在于一种制造拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的方法，该方法包含在培养基中在足以产生拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分的条件下培养本文所述的方面及实施例中的任一者的宿主细胞的步骤。在其他实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分是通过该方法制造。

[0052] 在其他实施例中，本发明的特征还在于一种用于降低人类CD40活性的方法，该方法包含使人类CD40与本文所述的方面及实施例中的任一者的抗体或其抗原结合部分接触，使得人类CD40活性降低的步骤。在另一实施例中，该方法为活体外方法。

[0053] 在其他某些实施例中，本发明的特征还在于一种用于治疗患有CD40有害的病症的人类受试者的方法，包含向该受试者投与有效量的本文所述的方面及实施例中的任一者的抗CD40抗体或其抗原结合部分。

[0054] 在其他实施例中，本发明的特征还在于一种用于降低患有CD40活性有害的病症的人类受试者中的人类CD40活性的方法，该方法包含向该人类受试者投与本文所述的方面及实施例中的任一者的抗体或其抗原结合部分，使得该人类受试者中的人类CD40活性降低的步骤。

[0055] 在另一实施例中，抗体或其抗原结合部分是在向该受试者投与第二药剂之前、同时或之后投与。在另一相关实施例中，该第二药剂是选自：能够结合人类IL-12的抗体或其片段；PGE2；LPA；NGF；CGRP；SubP；RAGE；组胺；组胺受体阻断剂；缓激肽；IL-1 α ；IL-1 β ；VEGF；PLGF；氨甲蝶呤（methotrexate）；皮质类固醇、糖皮质激素受体调节剂；环孢素（cyclosporin）、雷帕霉素（rapamycin）、FK506、非类固醇消炎剂、吸入性类固醇； β 激动剂；短效或长效 β 激动剂；白三烯或白三烯受体的拮抗剂；ADVAIR；IgE抑制剂；抗IgE抗体；XOLAIR；磷酸二酯酶抑制剂；PDE4抑制剂；黄嘌呤（xanthine）；抗胆碱能药物；肥大细胞稳定剂；色甘酸（Cromolyn）；IL-4抑制剂；IL-5抑制剂；嗜酸性粒细胞趋化因子（eotaxin）/CCR3抑制剂；组胺或其受体，包括H1、H2、H3及H4的拮抗剂；前列腺素D或其受体DP1及CRTH2的拮抗剂；TNF拮抗剂；TNF受体的可溶性片段；ENBREL；TNF酶拮抗剂；TNF转化酶（TACE）抑制剂；蕈毒碱受体拮抗剂；TGF- β 拮抗剂；干扰素 γ ；吡非尼酮（perfenidone）；化学治疗剂氨甲蝶呤；来氟米特（leflunomide）；西罗莫司（sirolimus）（雷帕霉素）或其类似物CCI-779；COX2或cPLA2抑制剂；NSAID；免疫调节剂；p38抑制剂；TPL-2、MK-2及NFkB抑制剂；布地赛德（budenoside）；表皮生长因子；皮质类固醇；环孢素（cyclosporine）；柳氮磺胺吡啶（sulfasalazine）；氨基水杨酸盐；6-巯基嘌呤；硫唑嘌呤（azathioprine）；甲硝哒唑（metronidazole）；脂肪加氧酶抑制剂；美沙拉嗪（mesalamine）；奥色拉嗪（olsalazine）；巴柳氮（balsalazide）；抗氧化剂；血栓素抑制剂；IL-1受体拮抗剂；抗IL-1 β 抗体；抗IL-6抗体；生长因子；弹性蛋白酶抑制剂；吡啶基-咪唑化合物；LT、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、

IL-33、EMAP-II、GM-CSF、FGF或PDGF的抗体或激动剂;CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90或其配体的抗体;FK506;雷帕霉素;霉酚酸酯(mycophenolate mofetil);布洛芬(ibuprofen);泼尼松龙(prednisolone);磷酸二酯酶抑制剂;腺苷激动剂;抗血栓剂;补体抑制剂;肾上腺素剂;IRAK、NIK、IKK、p38或MAP激酶抑制剂;IL-1 β 转化酶抑制剂;TNF- α 正交转化酶抑制剂;T细胞信号传导抑制剂;金属蛋白酶抑制剂;6-巯基嘌呤;血管紧张素转化酶抑制剂;可溶性细胞因子受体;可溶性p55 TNF受体;可溶性p75 TNF受体;sIL-1RI;sIL-1RII;sIL-6R;抗炎性细胞因子;IL-4;IL-10;IL-11;或TGF- β 。

[0056] 在另一实施例中,该病症是选自:呼吸障碍;哮喘;过敏性及非过敏性哮喘;因感染所致的哮喘;因呼吸道合胞病毒(RSV)感染所致的哮喘;慢性阻塞性肺病(COPD);涉及气道发炎的病况;嗜酸性粒细胞增多症;纤维化及过量黏液产生;囊肿性纤维化;肺纤维化;异位性病症;特应性皮炎;荨麻疹;湿疹;过敏性鼻炎;过敏性肠胃炎;皮肤的发炎性和/或自体免疫性病况;胃肠器官的发炎性和/或自体免疫性病况;发炎性肠病(IBD);溃疡性结肠炎;克罗恩氏病(Crohn's disease);肝脏的发炎性和/或自体免疫性病况;肝硬化;肝纤维化;由B型和/或C型肝炎病毒所引起的肝纤维化;硬皮病;肿瘤或癌症;肝细胞癌;胶质母细胞瘤;淋巴瘤;霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma);病毒感染;细菌感染;寄生虫感染;HTLV-1感染;阻抑保护性1型免疫反应的表达及在疫苗接种期间阻抑保护性1型免疫反应的表达。

[0057] 在另一其他实施例中,病症选自自体免疫性或发炎性疾病,诸如全身性红斑性狼疮症(SLE),盘状狼疮,狼疮性肾炎,类肉瘤病,发炎性关节炎,包括但不限于幼年型关节炎,类风湿性关节炎,银屑病性关节炎,莱特尔氏症候群(Reiter's syndrome),强直性脊柱炎及痛风性关节炎,器官或组织移植的排斥反应,超急性、急性或慢性排斥反应和/或移植植物抗宿主疾病,多发性硬化症,高IgE症候群,结节性多动脉炎,原发性胆汁性肝硬化症,发炎性肠病,克罗恩氏病,腹腔疾病(麸质敏感性肠病),自体免疫性肝炎,恶性贫血,自体免疫性溶血性贫血,银屑病,硬皮病,重症肌无力,自体免疫性血小板减少性紫癜,自体免疫甲状腺炎,格雷氏病(Grave's disease),桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis),免疫复合性疾病,慢性疲劳免疫功能障碍症候群(CFIDS),多发性肌炎及皮肌炎,冷球蛋白血症,血栓溶解,心肌症,寻常天疱疮,肺间质纤维化,类肉瘤病,I型及II型糖尿病,1、2、3及4型迟发型过敏,过敏或过敏性病症,对治疗蛋白的不希望的/非预期免疫反应,哮喘,彻奇-斯全司症候群(Churg-Strauss syndrome)(过敏性肉芽肿痛),特应性皮炎,过敏性及刺激性接触性皮炎,荨麻疹,IgE介导的过敏,动脉粥样硬化,血管炎,特发性发炎性肌病,溶血性疾病,阿兹海默氏病(Alzheimer's disease),慢性发炎性脱髓鞘多发性神经病,休格连氏病(Sjogren's)及银屑病。

[0058] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗发炎性肠病(IBD)。

[0059] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗溃疡性结肠炎。

[0060] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗克罗恩氏病。

[0061] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗全身性红斑性狼疮症(SLE)。

[0062] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗类肉瘤病。

[0063] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗幼年型关节炎。

[0064] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗类风湿性关节炎。

[0065] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗银屑病性关节炎。

[0066] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗强直性脊柱炎。

[0067] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗化脓性汗腺炎。

[0068] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗眼色素层炎。

[0069] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗休格连氏病。

[0070] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗银屑病。

[0071] 在另一其他实施例中,抗体或其抗原结合片段是通过至少一种选自以下的模式投与:非经肠、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊椎内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、推注、经阴道、经直肠、经颊、舌下、鼻内及经皮。

[0072] 在其他某些实施例中,本发明的特征还在于一种借由免疫分析判定测试样品中CD40或其片段的存在情况的方法,其中免疫分析包含使测试样品与至少一种本文所述的方面及实施例中的任一者的抗体或其抗原结合部分及至少一种可检测标记接触。在另一实施例中,该方法进一步包含以下步骤:(i)使该测试样品与该至少一种抗体或其抗原结合部分接触,其中该抗体或其抗原结合部分结合至该CD40或其片段上的表位,从而形成第一复合物;(ii)使该复合物与该至少一种可检测标记接触,其中该可检测标记结合至该第一复合物上或该CD40或其片段上未与该抗体或其抗原结合部分结合的表位,从而形成第二复合物;及(iii)基于由该第二复合物中的该可检测标记产生的信号检测该测试样品中该CD40或其片段的存在情况,其中该CD40或其片段的存在情况与由该可检测标记产生的信号直接相关。在另一相关实施例中,该方法进一步包含以下步骤:(i)使该测试样品与该至少一种抗体或其抗原结合部分接触,其中该抗体或其抗原结合部分结合至该CD40或其片段上的表位,从而形成第一复合物;(ii)使该复合物与该至少一种可检测标记接触,其中该可检测标记与该CD40或其片段竞争结合至该抗体或其抗原结合部分,从而形成第二复合物;及(iii)基于由该第二复合物中的该可检测标记产生的信号检测该测试样品中该CD40或其片段的存在情况,其中该CD40或其片段的存在情况与由该可检测标记产生的信号间接相关。

[0073] 在一个实施例中,本发明提供一种DVD-Ig,其包含本文所述的结合区,例如CDR。在

一个实施例中，本发明的DVD-Ig包含四条多肽链，其中两条多肽链包含VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n，其中VD1为第一重链可变域，VD2为第二重链可变域，C为重链恒定域，X1为接头，但必须不为CH1，且X2为Fc区；且两条多肽链包含VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n，其中VD1为第一轻链可变域，VD2为第二轻链可变域，C为轻链恒定域，X1为接头，但必须不为CH1，且X2不包含Fc区；且n为0或1；其中该结合蛋白的所述四条多肽链形成四个功能性抗原结合位点。在一个实施例中，DVD的第一(和/或第二)重链包含如SEQ ID NO:6、42及8中所阐述的CDR组。在一个实施例中，第一(和/或第二)轻链可变区包含如SEQ ID NO:21、11及12中所阐述的CDR组。在一个实施例中，本发明的DVD-Ig为单特异性的且结合huCD40。在另一实施例中，本发明的DVD-Ig为多特异性的且结合CD40及第二分子目标。

附图说明

[0074] 图1A以图形方式描绘嵌合抗体(抗体1(Ab1))对比激动剂对照及已知拮抗性抗体(4D11(Astellas)及Bib(Boehringer))的拮抗活性。图1B以图形方式描绘与图1A中相同的嵌合抗体Ab1在使用与图1A中相同的激动剂及拮抗剂对照的激动性分析中的活性。

[0075] 图2以图形方式描绘人源化抗体Ab101对比抗体4D11、抗体B1b、IgG抗体(对照)及激动性对照抗体(2141)的激动活性(图2A)及拮抗活性(图2B)。

[0076] 图3以图形方式描绘人源化抗体Ab101的活体内研究的结果。图3A以图形方式描绘已接受人类PBMC以及Ig对照、CTLA4-Ig融合体或Ab101抗体的huscid小鼠中的IgG产量。图3B以图形方式描绘已投与与图3A中相同的药剂的相同小鼠模型中的B细胞存活率。

[0077] 图4显示抗人类CD40鼠抗体拮抗剂的氨基酸序列比对及比对所得的共有序列。图4A显示抗体3(Ab3)(SEQ ID NO:48)、Ab1(SEQ ID NO:9)及抗体2(Ab2)(SEQ ID NO:76)的可变轻链的序列比对及可变轻链共有序列(SEQ ID NO:116)。图4B显示Ab3(SEQ ID NO:44)、Ab1(SEQ ID NO:5)及Ab2(SEQ ID NO:75)的可变重链的序列比对及可变重链共有序列(SEQ ID NO:117)。

[0078] 图5A及图5B以图形方式描绘在实例7中所述的单核细胞活化分析中Ab102对人类CD40的代表性中和效能(拮抗活性)(图5A)及激动活性(图5B)。在各分析中，单核细胞活化与TNF浓度增加一致。

[0079] 图6以图形方式描绘在预防性投与抗体138(Ab138)的情况下内视镜检评分的剂量反应性抑制。以15、5、1.5及0.5mg/kg的剂量测试抗体138。使用IgG阴性对照。抗p40IL-12/23处理用作阳性对照。疾病借由转移至动物的CD45Rbhi细胞介导。RB低是指阴性对照组。CD45RB低细胞不介导疾病。

[0080] 图7以图形方式描绘用于测定投与抗体138(Ab138)后结肠中的IBA1+巨噬细胞的免疫组织化学分析的结果。结肠切片的组织学分析显示巨噬细胞减少(通常量测炎症)。使用IgG阴性对照。抗p40IL-12/23处理用作阳性对照。

[0081] 图8以图形方式描绘在结肠炎的T细胞转移模型中在最后一次给药后96小时循环抗体138(Ab138)的血清水平(等于 $C_{\text{低谷}}$)。血清水平显示具有剂量反应性。抗p40IL-12/23处理用作阳性对照。在0.5mg/kg组中仅1只动物具有可量测的Ab138水平。

[0082] 图9A以图形方式描绘在结肠炎小鼠模型中投与抗体138后的内视镜检结果。在内视镜检证实有疾病之后，在细胞注射后三周起始抗体138(Ab138)处理，且注意到MEDAI总评

分的剂量反应性抑制。最高剂量(15mg/kg)达至统计显著性(图9A)。

[0083] 图9B以图形方式描绘在投与抗体138后的组织学结果。结肠中的IBA1+巨噬细胞的组织学分析以骨髓发炎的量测结果示出在图9B中。

[0084] 图10以图形方式描绘结果,其显示,相比于仅用媒剂处理的对照动物(实线),Ab102阻抑抗KLH IgM及抗KLH IgG(虚线)。以0(仅媒剂)或10mg/kg的剂量向食蟹猴(两只/性别/组)皮下(SC)投与Ab102,持续5周。在第8天,给所有动物投与钥孔血蓝蛋白(KLH)。在相对于KLH投与第-11天、第-7天、第0天、第4天、第7天、第10天、第14天及第21天(KLH天数)自各动物收集血清样品。

[0085] 图11A为显示在MRL/lpr小鼠中抗CD40抗体138处理预防蛋白尿的图。给予小鼠15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周。单独投与磷酸盐缓冲盐水(PBS)媒剂用作对照。按<300mg/dL的尿蛋白的百分比测定蛋白尿。

[0086] 图11B为描绘结果的图,其显示抗CD40抗体138处理延长了MRL/lpr小鼠的存活期。给予动物15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周。单独投与媒剂用作对照。示出随时间推移的存活百分比。

[0087] 图12A为描绘结果的图,其显示抗CD40抗体138处理预防肾炎发展。图12A显示在给予了15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周的小鼠中,在第29天及第63天,抗体138对肾小球疾病的作用。单独投与PBS媒剂用作对照。按照0至4的等级评定肾小球疾病。随着不断变老的MRL小鼠中肾小球疾病的严重程度加剧,5及15mg/kg抗体138维持功效,使肾小球疾病降到最低。基于以下准则,按等级0-4给血管周发炎评分:0-至多一些稀有淋巴细胞;1-一些淋巴细胞形成松散的聚集体;2-淋巴细胞形成离散的小聚集体;3-淋巴细胞极化聚集,膨胀至邻近静脉腔中,但未能完全包围弓形动脉;4-淋巴细胞完全聚集在弓形动脉周围且延伸至弓形动脉的外膜中。

[0088] 图12B为描绘结果的图,其显示抗CD40抗体处理预防肾炎发展。图12B描绘结果,其显示在给予了15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周的小鼠中,在第29天及第63天,抗体138对肾血管周(PV)发炎的作用。单独投与PBS媒剂用作对照。在29天及63天时,5及15mg/kg的抗CD40抗体可有效减少肾脏中的血管周(PV)浸润。

[0089] 图12C为显示抗CD40抗体138处理预防肾炎发展的图。图12C显示在给予了15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周的小鼠中,在第29天及第60天时,抗体138对小管间质性发炎(TI)的作用。单独投与PBS媒剂用作对照。在疾病早期, TI降低。

[0090] 图13A为显示抗CD40抗体138处理预防唾液腺发炎的图。图13A显示在给予了15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周的小鼠中,在第29天及第60天,抗体138对唾液腺发炎的作用。单独投与PBS媒剂用作对照。基于以下准则,按等级0-4给导管周围发炎评分:0-至多一些稀有白血球;1-一些白血球形成松散的聚集体;2-白血球形成离散的小聚集体;3-白血球极化聚集,完全包围导管;4-白血球聚集,延伸至唾液腺的腺实质中。

[0091] 图13B为显示抗CD40抗体138处理预防关节发炎的图。图13B显示在给予了15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周的小鼠中,在

第29天及第60天,抗体138对关节发炎的作用。单独投与PBS媒剂用作对照。基于以下准则,按照0-4之等级给每小鼠两个脚爪中每一个的关节发炎评分:0-无发炎;1-在关节间隙中有一些白血球;2-在关节间隙内常见白血球,且有轻度滑膜增生;3-白血球膨胀至关节间隙中,且有中等滑膜增生;4-白血球及滑膜增生,延伸且聚结在关节间隙内,具有显著的骨侵蚀和/或骨增生。每只小鼠的评分相加所得的可能总评分为8。

[0092] 图14为一组四副图(i-iv),其显示抗CD40抗体138预防脾脏中的滤泡性辅助T细胞(Tfh)及生发中心(GC)B细胞的膨胀,如借由流式细胞术所测定。给予小鼠15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周。单独投与PBS媒剂用作对照。图(i)显示在第29天脾脏中的Tfh细胞的数目。图(ii)显示在第63天脾脏中的Tfh细胞的数目。图(iii)显示在第29天脾脏中的GC B细胞的数目。图(iv)显示在第63天脾脏中的GC B细胞的数目。

[0093] 图15A为显示抗CD40抗体138处理预防第29天的总循环IgG水平增加的图。给予小鼠15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周及15mg/kg抗体1×/周。单独投与PBS媒剂用作对照。

[0094] 图15B为显示抗CD40抗体138处理预防第63天的总循环IgG水平增加的图。给予小鼠15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周及15mg/kg抗体1×/周。单独投与PBS媒剂用作对照。

[0095] 图16A为显示在第29天抗CD40抗体138处理对抗双链DNA(抗dsDNA)效价的影响的图。给予小鼠15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周。单独投与PBS媒剂用作对照。在第29天,测定抗dsDNA效价。

[0096] 图16B为显示在第63天抗CD40抗体138处理针对抗双链DNA(抗dsDNA)效价的图。给予小鼠15mg/kg抗体2×/周、5mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周。单独投与PBS媒剂用作对照。在第63天,测定抗dsDNA效价。

[0097] 图17A为显示预防性给予抗CD40抗体138预防蛋白尿的图。在26周龄小鼠中开始预防性治疗,且该研究排除蛋白尿小鼠。给予小鼠15mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周。单独投与PBS媒剂用作对照。按<300mg/dL的尿蛋白的百分比测定蛋白尿。

[0098] 图17B为显示使用SLE小鼠模型,预防性给予抗CD40抗体138延长存活期的图。在26周龄小鼠中开始预防性治疗,且该研究排除蛋白尿小鼠。给予小鼠15mg/kg抗体2×/周、1.5mg/kg抗体2×/周或15mg/kg抗体1×/周。单独投与PBS媒剂用作对照。评定直至36周龄的存活百分比。

[0099] 图18A为显示经抗体138以15mg/kg的剂量腹膜内处理2×/周的小鼠随时间推移产生低蛋白尿的图,如借由尿蛋白级别(mg/dL当量)所示。腹膜内投与媒剂PBS,2×/周,用作对照。以10mg/kg的剂量经口(PO)给予泼尼松龙,一天一次(SID)。未经媒剂PBS处理的对照小鼠及经泼尼松龙处理的小鼠均未产生低蛋白尿。指定蛋白尿的阈值为300mg/dL。

[0100] 图18B为显示经抗体138以15mg/kp的剂量腹膜内处理2×/周的小鼠自蛋白尿恢复的速率的图。基于如借由正常尿蛋白百分比所测定的自蛋白尿恢复的速率,自蛋白尿恢复的平均时间为23±7天。腹膜内投与媒剂PBS,2×/周,用作对照。以10mg/kg的剂量经口(PO)给予泼尼松龙,一天一次(SID)。

[0101] 图18C为显示经抗CD40抗体138以15mg/kp的剂量腹膜内处理2×/周的小鼠的存活期显著延长的图,如借由存活百分比所示。腹膜内投与媒剂PBS,2×/周,用作对照。经口(PO)给予泼尼松龙,一天一次(SID)。

[0102] 图19A为显示借由用抗体138以15mg/kp IP 2×/周、1.5mg/kg 2×/周、15mg/kg 1×/周的剂量预防性治疗来保存唾液产量的图。媒剂PBS用作对照。以10mg/kg的剂量投与泼尼松龙。7周龄NZBWF-1小鼠(其为未患病的较年幼的小鼠)的唾液产量用作进一步比较。测定唾液量(mg)。经抗CD40处理的小鼠的唾液产量相对均一。

[0103] 图19B为显示借由用抗CD40抗体138以15mg/kp IP 2×/周、1.5mg/kg 2×/周、15mg/kg 1×/周的剂量预防性治疗来保存唾液量的图。媒剂PBS用作对照。以10mg/kg的剂量投与泼尼松龙。测定唾液量/体重(mg/gm)。经抗CD40抗体处理的小鼠的唾液产量显著大于未经处理的对照小鼠。

[0104] 图20A为显示借由用抗CD40抗体138以15mg/kg的剂量治疗性治疗来保存唾液产量的图。以10mg/kg的剂量投与泼尼松龙。11周龄小鼠的唾液产量用作进一步比较。测定唾液量(mg)。

[0105] 图20B为显示借由用抗CD40抗体138以15mg/kg的剂量治疗性治疗来保存唾液产量的图。以10mg/kg的剂量投与泼尼松龙。11周龄小鼠的唾液产量用作进一步比较。测定唾液量/体重(mg/gm)。

具体实施方式

[0106] 本发明涉及拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分及其用途。本发明的各种方面涉及抗体及抗体片段及其药物组合物以及用于制造此类抗体及片段的核酸、重组表达运载体及宿主细胞。本发明还涵盖使用本发明抗体检测人类CD40、活体外或活体内抑制人类CD40/CD40L活性及预防或治疗诸如慢性发炎性疾病及克罗恩氏病的疾病或病症的方法。

[0107] 除非本文中另外定义,否则结合本发明使用的科学与技术术语应具有由一般技术者通常理解的含义。术语的含义及范畴应为清楚的,然而,在任何潜在不明确性的情况下,本文所提供的定义优先于任何字典或外部定义。此外,除非上下文另外需要,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。在本申请中,除非另外说明,否则使用“或”意指“和/或”。此外,术语“包括(including)”以及诸如“包括/includes)”及“包括/included)”的其他形式的使用不具限制性。此外,除非另外具体说明,否则诸如“元件”或“组件”的术语涵盖包含一个单元的元件及组件以及包含一个以上子单元的元件及组件两者。

[0108] 一般而言,本文中所描述的结合细胞及组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学及蛋白质与核酸化学及杂交使用的命名法及其技术为本领域中熟知且常用的。除非另外指明,否则本发明的方法及技术通常根据本领域中熟知的常规方法且如本说明书通篇所引用及讨论的各种一般性及较特定提及中所描述来进行。酶促反应及纯化技术根据制造商的说明书如本领域中通常所实现或如本文中所述来进行。本文中所述的结合分析化学、合成有机化学及医药与药物化学使用的命名法及其实验室程序及技术为在本领域中熟知且常用的。关于化学合成、化学分析、药物制备、调配及传递及患者治疗,使用标准技术。

[0109] 为较容易地理解本发明,下文对所选术语加以定义。

[0110] 如本文所用的术语“多肽”是指氨基酸的任何聚合链。术语“肽”及“蛋白质”可与术

语多肽互换使用且也指氨基酸的聚合链。术语“多肽”涵盖天然或人工蛋白质、蛋白质片段及蛋白质序列的多肽类似物。多肽可为单体或聚合的。

[0111] 术语“经分离蛋白质”或“经分离多肽”为如下蛋白质或多肽：根据其来源或衍生源而不与其在天然状态中所伴随的天然结合组分结合；基本上不含来自同一物种的其他蛋白质；由来自不同物种的细胞表达；或在自然界中不存在。因此，化学合成或在不同于其天然来源的细胞的细胞系统中合成的多肽将与其天然结合组分“分离”。蛋白质还可借由使用本领域中熟知的蛋白质纯化技术进行分离而使得基本上不含天然结合组分。经分离多肽的实例为经分离抗体或其抗原结合部分。

[0112] 如本文所用的术语“回收”是指借由例如使用本领域中熟知的蛋白质纯化技术进行分离，使得诸如多肽的化学物质基本上不含天然结合组分的过程。

[0113] 如本文所用的术语“人类CD40”及“人类CD40野生型”（本文中简写为hCD40，hCD40wt）是指I型跨膜蛋白。在一个实施例中，术语人类CD40意欲包括重组人类CD40（rhCD40），其可以借由标准重组表达方法制备。表1提供人类CD40的氨基酸序列（即，SEQ ID NO.1）及其细胞外域的氨基酸序列（即，SEQ ID NO:107），其为本领域中已知的。

[0114] 表1：人类CD40的序列

	序列识别符	蛋白质	序列
[0115]	SEQ ID NO.:1	人类 CD40	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQY LINSQCCSLCQPGQKLVDCTEFTETECLPCGE SEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKG TSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPG FGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKC HPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRL RALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAP HPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGQP VTQEDGKESRISVQERQ
[0116]	SEQ ID NO.:107	人类 CD40 细胞外域	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVDCTE FTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDP NLGLRVQQKGTTSETDTICTCEEGWHCTSEACE SCV

[0117] 如本文所用的“生物活性”是指CD40受体的所有固有生物特性。CD40的生物特性包括但不限于结合CD40L；参与B细胞发育；参与淋巴细胞活化；参与抗原呈递细胞功能；调控树突状细胞、巨噬细胞及B细胞的活性；诱导在巨噬细胞及树突状细胞中产生发炎性细胞因子；上调抗原呈递；上调T细胞刺激；及促进B细胞中的免疫球蛋白类别转换。

[0118] 如本文关于抗体、蛋白质或肽与第二化学物质的相互作用所用的术语“特异性结合”或“特异性地结合”意指该相互作用视化学物质上特定结构（例如，抗原决定子或表位）的存在而定；若抗体对表位“A”具有特异性，则在含经标记“A”及该抗体的反应中，含表位A（或未经标记的游离A）的分子的存在将减少结合至该抗体的经标记A的量。

[0119] 如本文所用的术语“激动剂”是指当与相关分子（例如CD40）接触时，导致该分子的某一活性或功能的量值相比于在不存在激动剂的情况下所观测到的活性或功能的量值增加的调节剂。

[0120] 如本文所用的术语“拮抗剂”或“抑制剂”是指当与相关分子接触时，导致该分子的某一活性或功能的量值相比于在不存在拮抗剂的情况下所观测到的活性或功能的量值减小的调节剂。具体的相关拮抗剂包括阻断或调节人类CD40 (hCD40) 的生物或免疫活性的那些拮抗剂。hCD40的拮抗性抗体可以例如抑制与CD40L一起培养(或暴露于CD40L)的初级人类B细胞(诸如将B细胞与表达CD40L的人类T细胞一起培养)的CD86上调。在一个实施例中，基本上不含激动活性的拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分定义为在激动性分析中，诸如实例7中所述的激动性单核细胞分析，活性水平相对于阴性对照等于一个标准偏差或在一个标准偏差的内。

[0121] 本发明的抗体或其抗原结合部分为拮抗性抗体或其抗原结合部分，其造成CD40活性或功能相比于在不存在该抗体或其抗原结合部分的情况下CD40活性或功能降低。在特定实施例中，该抗体或其抗原结合部分基本上不含激动活性，即该抗体或其抗原结合部分不会造成CD40活性或功能的量值相比于在不存在该抗体或其抗原结合部分的情况下CD40活性或功能增加。激动活性及拮抗活性还可使用本领域中已知的方法评定，例如使用与NFkB介导的碱性磷酸酶(AP)相关的表达CD40的报导细胞系表达人类CD40、或B细胞分析。此外，在一个实施例中，激动活性及拮抗活性可以使用实例7中所述的活体外单核细胞激动性及拮抗性分析评定。

[0122] 术语“抑制与CD40L的结合”是指抗体或其抗原结合片段防止CD40与配体CD40L结合的能力。如此抑制与CD40L的结合将导致降低或消除由CD40与CD40L的结合介导的生物活性。

[0123] 如本文广泛使用的术语“抗体”是指由四条多肽链(两条重(H)链及两条轻(L)链)构成，保留免疫球蛋白(Ig)分子的主要表位结合特征的任何Ig分子或其任何功能片段、突变体、变异体或衍生物。此类突变体、变异体或衍生物抗体形式在本领域中已知。其非限制性实施例于下文加以论述。

[0124] 在全长抗体中，各重链由重链可变区(本文中简写为HCVR或VH)及重链恒定区构成。重链恒定区由三个域(CH1、CH2及CH3)构成。各轻链由轻链可变区(本文中简写为LCVR或VL)及轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。VH及VL区可进一步再分成高变区，称为互补决定区(CDR)，穿插有称为框架区(FR)的较保守区。各VH及VL由三个CDR及四个FR构成，自氨基端至羧基端按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。免疫球蛋白分子可为任何类型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子类。

[0125] 如本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”(或简称为“抗体部分”或“抗体片段”)是指抗体中保留与抗原(例如hCD40)特异性结合的能力的一或多个片段。已显示，抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来执行。此类抗体实施例还可为双特异性、双重特异性或多特异性形式；特异性结合至两个或更多个不同抗原。术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”内所涵盖的结合片段的实例包括(i) Fab片段，一种由VL、VH、CL及CH1域组成之单价片段；(ii) F(ab')₂片段，一种包含两个借由铰链区的二硫桥键连接的Fab片段的二价片段；(iii) 由VH及CH1域组成的Fd片段；(iv) 由抗体单臂的VL及VH域组成的Fv片段；(v) dAb片段(Ward等人，(1989) Nature 341:544-546; Winter等人，PCT公开案 WO 90/05144 A1，其以引用的方式并入本文中)，其包含单一可变域；及(vi) 经分离互补决

定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域(VL及VH)由独立基因编码,但其可使用重组方法借由合成接头连接,合成接头能够将其制造成VL与VH区配对形成单价分子的单一蛋白质链(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等人(1988)Science 242:423-426;及Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。此类单链抗体还意欲涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”内。还涵盖其他形式的单链抗体,诸如双功能抗体。双功能抗体为二价双特异性抗体,其中VH及VL域在单一多肽链上表达,但使用过短以致于不允许同一条链上的两个结构域之间进行配对的接头,由此迫使该结构域与另一条链的互补结构域配对且产生两个抗原结合位点(参见例如,Holliger,P.等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J.等人(1994)Structure 2:1121-1123)。此类抗体结合部分为本领域中已知的(Kontermann及Dubel编, Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag.New York.第790页 (ISBN 3-540-41354-5))。

[0126] 如本文所用的术语“抗体构建体”是指包含一或多个本发明的抗原结合部分连接至接头多肽或免疫球蛋白恒定域的多肽。接头多肽包含两个或更多个借由肽键连接的氨基酸残基且用于连接一或多个抗原结合部分。此类接头多肽为本领域中熟知的(参见例如,Holliger,P.等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,R.J.等人(1994)Structure 2:1121-1123)。免疫球蛋白恒定域是指重链或轻链恒定域。人类IgG重链及轻链恒定域氨基酸序列为本领域中已知的且呈现于表2中。

[0127] 表2:人类IgG重链恒定域及轻链恒定域的序列

蛋白质	序列识别符	序列
		12345678901234567890123456789012
[0128] <i>Ig γ-1 恒定区</i>	SEQ ID NO.:2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
<i>Ig γ-1 恒定区突变体</i>	SEQ ID NO.:3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
蛋白质	序列识别符	序列
		12345678901234567890123456789012
[0129] <i>Igκ 恒定区</i>	SEQ ID NO.:4	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKAD YEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECE
<i>Igλ 恒定区</i>	SEQ ID NO.:81	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT ECS

[0130] 再者，抗体或其抗原结合部分可为借由抗体或抗体部分与一种或多种其他蛋白质或肽的共价或非共价结合而形成的较大免疫黏附分子的一部分。此类免疫黏附分子的实例包括使用抗生蛋白链菌素核心区制造四聚scFv分子 (Kipriyanov, S.M. 等人 (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) 及使用半胱氨酸残基、标志肽及C端聚组氨酸标签制造二价且生物素化的scFv分子 (Kipriyanov, S.M. 等人 (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058)。诸如Fab及F(ab')₂片段的抗体部分可使用常规技术，诸如对全抗体分别进行木瓜酶

或胃蛋白酶消化,由全抗体制备。此外,抗体、抗体部分及免疫黏附分子可使用如本文中所述的标准重组DNA技术获得。

[0131] 如本文所用的“经分离抗体”意欲指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合hCD40的经分离抗体基本上不含特异性结合除hCD40以外的抗原的抗体)。然而,特异性结合hCD40的经分离抗体可以与其他抗原,诸如来自其他物种的CD40分子具有交叉反应性。另外,经分离抗体可以基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0132] 术语“嵌合抗体”是指包含来自一个物种的重链及轻链可变区序列及来自另一物种的恒定区序列的抗体,诸如具有鼠重链及轻链可变区连接至人类恒定区的抗体。

[0133] 术语“CDR移植抗体”是指包含来自一个物种的重链及轻链可变区序列,但VH和/或VL的CDR区中的一个或多个的序列经另一物种的CDR序列置换的抗体,诸如具有鼠重链及轻链可变区,其中鼠CDR中的一个或多个(例如CDR3)已被人类CDR序列置换的抗体。

[0134] 术语“Kabat编号”、“Kabat限定”及“Kabat标记”在本文中可互换地使用。这些术语为本领域中公认的,是指给比抗体或其抗原结合部分的重链及轻链可变区中的其他氨基酸残基可变(即,高变)的氨基酸残基编号的系统(Kabat等人(1971)Ann.NY Acad.Sci.190:382-391;及Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,美国健康与公共事业部(U.S. Department of Health and Human Services),NIH出版编号91-3242)。就重链可变区而言,高变区范围就CDR1而言是自氨基酸位置31至35,就CDR2而言是自氨基酸位置50至65,且就CDR3而言是自氨基酸位置95至102。就轻链可变区而言,高变区范围就CDR1而言是自氨基酸位置24至34,就CDR2而言是自氨基酸位置50至56,且就CDR3而言是自氨基酸位置89至97。

[0135] 如本文所用,术语“受体”及“受体抗体”是指提供或编码一或多个框架区的氨基酸序列的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的抗体或核酸序列。在一些实施例中,术语“受体”是指提供或编码恒定区的抗体氨基酸或核酸序列。在另一实施例中,术语“受体”是指提供或编码框架区及恒定区中的一个或多个的抗体氨基酸或核酸序列。在一特定实施例中,术语“受体”是指提供或编码一或多个框架区的氨基酸序列的至少80%、优选至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的人类抗体氨基酸或核酸序列。根据此实施例,受体可含有至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个或至少10个不出现于人类抗体的一或多个特定位置的氨基酸残基。受体框架区和/或受体恒定区可例如源自或获自种系抗体基因、成熟抗体基因、功能性抗体(例如本领域中熟知的抗体、处于研发中的抗体或市售抗体)。

[0136] 如本文所用,术语“CDR”是指在抗体可变序列内的互补决定区。重链及轻链的可变区中各自存在三个CDR,对于各可变区,此类CDR命名为CDR1、CDR2及CDR3。如本文所用的术语“CDR组”是指存在于能够结合抗原的单一可变区中的一组三个CDR。这些CDR的精确边界已根据不同系统不同地加以限定。由Kabat(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987)及(1991))所述的系统不仅提供适用于抗体的任何可变区的明确的残基编号系统,且还提供限定三个CDR的精确残基边界。这些CDR可称为Kabat CDR。Chothia及同事(Chothia等人,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)及Chothia等人,Nature 342:877-883(1989))发现,Kabat CDR内的某些子部分采用几乎相同的肽主链构象,即使在氨基酸序列层面具有极大差异。这

些子部分称为L1、L2及L3或H1、H2及H3，其中“L”及“H”分别表示轻链区及重链区。这些区可称为Chothia CDR，其具有与Kabat CDR重叠的边界。限定与Kabat CDR重叠的CDR的其他边界已由Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) 及 MacCallum (J Mol Biol 262 (5) : 732-45 (1996)) 描述。其他CDR边界限定可不严格遵循以上系统中的一者，但仍然将与Kabat CDR重叠，但其可根据特定残基或残基组或甚至全部CDR不显著影响抗原结合的预测或实验发现而缩短或延长。本文中所用的方法可利用根据这些系统中任一者限定的CDR，但优选实施例使用Kabat或Chothia限定的CDR。

[0137] 如本文所用，术语“典型 (canonical)”残基是指CDR或构架中限定如Chothia等人 (J.Mol.Biol.196:901-907 (1987); Chothia等人, J.Mol.Biol.227:799 (1992), 均以引用的方式并入本文中) 所限定的特定典型CDR结构的残基。根据Chothia等人，多种抗体的CDR的重要部分具有几乎相同的肽主链构象，即使在氨基酸序列层面差异极大。各典型结构主要为形成环的氨基酸残基的相邻区段指定一组肽主链扭转角。

[0138] 如本文所用，术语“供体”及“供体抗体”是指提供一或多个CDR的抗体。在一个优选实施例中，供体抗体为来自某一物种的不同于获得或产生的框架区的抗体的抗体。在人源化抗体的情况下，术语“供体抗体”是指提供一或多个CDR的非人类抗体。

[0139] 如本文所用，术语“框架”或“框架序列”是指可变区减去CDR剩余的序列。因为CDR序列的精确限定可借由不同系统确定，所以框架序列的含义相对应地需要不同解释。六个CDR(轻链的CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3及重链的CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)还将轻链及重链上的框架区在各链上分成四个子区(FR1、FR2、FR3及FR4)，其中CDR1位于FR1与FR2之间，CDR2位于FR2与FR3之间，且CDR3位于FR3与FR4之间。在不指定具体子区为FR1、FR2、FR3或FR4的情况下，如借由其他所提及的框架区表示单一天然产生的免疫球蛋白链的可变区内的组合的FR。如本文所用，FR表示四个子区之一，且FRs表示构成框架区的四个子区中的两者或两者以上。

[0140] 人类重链及轻链受体序列为本领域中已知的。在本发明的一个实施例中，人类重链及轻链受体序列选自表3及表4中所述的序列。

[0141] 表3:重链受体序列

SEQ ID No.	蛋白质区	序列
		12345678901234567890123456789012
82	VH1-18&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
83	VH1-18&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
84	VH1-18&JH6 FR3	RVTMTTDSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR
85	VH1-18&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
82	21/28&JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
86	21/28&JH4 FR2	WVRQAPGQRLEWMG
87	21/28&JH4 FR3	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
88	21/28&JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
89	VH2-26&JH6 FR1	QVTLKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSL
90	VH2-26&JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLAH
91	VH2-26&JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCAR
85	VH2-26&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

SEQ ID No.	蛋白质区	序列
		12345678901234567890123456789012
92	M60&JH4 FR1	QVTLRESPALVKPTQLTLCYGFSL
93	M60&JH4 FR2	WIRQPPGKALEWLA
94	M60&JH4 FR3	RLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAR
88	M60&JH4 FR4	WGQGTLTVSS
82	VH1-46&JH6 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
83	VH1-46&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG
95	VH1-46&JH6 FR3	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR
85	VH1-46&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS

[0143] 表4:轻链受体序列

SEQ ID No.	蛋白质区	序列
		12345678901234567890123456789012
96	A20&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
97	A20&JK4 FR2	WYQQKPGKVPKLLIY
98	A20&JK4 FR3	GVPNSRFSGSQGTDFTLTISSLQPEDVATYYC
99	A20&JK4 FR4	FGGGTTKVEIKR
96	III-3R&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
114	III-3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY
100	III-3R&JK4 FR3	GVPNSRISGSQGTDFFTISSLQPEDIATYYC
99	III-3R&JK4 FR4	FGGGTTKVEIKR
101	A1&JK4 FR1	DVVMQTQPLSLPVTLGQPASISC
102	A1&JK4 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
103	A1&JK4 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
99	A1&JK4 FR4	FGGGTTKVEIKR
104	01&JK2 FR1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC
105	01&JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY
103	01&JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC
106	01&JK2 FR4	FGQGTTKLEIKR

[0146] 如本文所用,术语“种系抗体基因”或“基因片段”是指由未经历导致基因重排及突变以表达特定免疫球蛋白的成熟过程的非淋巴细胞编码的免疫球蛋白序列。(参见例如,Shapiro等人,Crit.Rev.Immunol.22(3):183-200(2002);Marchalonis等人,Adv Exp Med Biol.484:13-30(2001))。由本发明的各种实施例所提供的优点之一源自以下认识:种系抗体基因比成熟抗体基因更有可能保留物种中个体的主要氨基酸序列结构特征,因此当治疗上用于彼物种时不大可能被识别为来自外来源。

[0147] 如本文所用,术语“关键”残基是指可变区内对抗体、尤其人源化抗体的结合特异性和/或亲和力影响较大的某些残基。关键残基包括但不限于以下中的一个或多个:与CDR相邻的残基、潜在糖基化位点(可为N或O糖基化位点)、稀有残基、能够与抗原相互作用的残基、能够与CDR相互作用的残基、典型残基、介于重链可变区与轻链可变区之间的接触残基、光标区内的残基及在Chothia限定的可变重链CDR1与Kabat限定的第一重链框架之间重叠的区域中的残基。

[0148] 如本文所用,术语“人源化抗体”为免疫特异性结合至相关抗原(例如人类CD40)且包含基本上具有人类抗体的氨基酸序列的框架(FR)区及基本上具有非人类抗体的氨基酸序列的互补决定区(CDR)的抗体或其变异体、衍生物、类似物或片段。如本文所用,术语“基本上”在CDR的情况下是指CDR的氨基酸序列与非人类抗体CDR的氨基酸序列至少80%、优选至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%同一。人源化抗体基本上包含所有至少一个且通常两个可变域(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv),其中所有或基本上所有CDR区对应于非人类免疫球蛋白(即,供体抗体)的CDR区且所有或基本上所有框架区为具有人类免疫球蛋白共有序列的框架区。优选地,人源化抗体还包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人类免疫球蛋白的恒定区。在一些实施例中,人源化抗体含有轻链以及重链的至少可变域。抗体还可包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3及CH4区。在一些实施例中,人源化抗体仅含人源化轻链。在一些实施例中,人源化抗体仅含人源化重链。在特定实施例中,人源化抗体仅含轻链和/或人源化重链的人源化可变域。

[0149] 人源化抗体可选自任何类别的免疫球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA及IgE;及任何同种型,包括但不限于IgG 1、IgG2、IgG3及IgG4。人源化抗体可以包含来自一种以上类别或同种型的序列,且可以使用本领域中熟知的技术选择特定恒定域以使所需效应功能优化。

[0150] 人源化抗体的框架区及CDR区不必准确对应于亲本序列,例如供体抗体CDR或共有框架可借由至少一个氨基酸残基的取代、插入和/或缺失而突变诱发,使得该位点的CDR或框架残基不对应于供体抗体或共有框架。然而,在一个优选实施例中,此类突变不多。通常,至少80%、优选至少85%、更优选至少90%且最优选至少95%的人源化抗体残基将对应于亲本FR及CDR序列的那些残基。如本文所用,术语“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。如本文所用,术语“共有免疫球蛋白序列”是指由相关免疫球蛋白序列家族中最频繁出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见例如,Winnaker,From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987))。在免疫球蛋白家族中,共有序列中的各位置由该家族中最频繁出现于该位置的氨基酸占据。若两个氨基酸同等频繁地出现,则共有序列中可包括任一个。

[0151] 如本文所用,“游标”区是指如Foote及Winter(1992,J.Mol.Biol.224:487-499,其以引用的方式并入本文中)所描述,可调整CDR结构且微调与抗原的合适度的框架残基子集。光标区残基形成CDR下的层且可影响CDR结构及抗体亲和力。

[0152] 术语“多价结合蛋白”在本说明书中用于表示包含两个或更多个抗原结合位点的结合蛋白。多价结合蛋白优选经工程改造以具有三个或三个以上抗原结合位点,且一般不为天然产生的抗体。术语“多特异性结合蛋白”是指能够结合两个或更多个相关或不相关靶标的结合蛋白。

[0153] 如本文中可互换地使用的术语“双重可变域”或“DVD”或“DVD-Ig”为包含两个或更多个抗原结合位点且为四价或多价结合蛋白的抗原结合蛋白。此类DVD可为单特异性的,即,能够结合一个抗原;或多特异性的,即,能够结合两个或更多个抗原。包含两个重链DVD多肽及两个轻链DVD多肽的DVD结合蛋白称为DVD Ig。DVD Ig的每一半包含重链DVD多肽及轻链DVD多肽及两个抗原结合位点。各结合位点包含重链可变域及轻链可变域,且每抗原结合位点在抗原结合时涉及总共6个CDR。在一个实施例中,本文所述的CDR(例如,SEQ ID NO:6、42及8(重链)及21、11及12(轻链))用于抗CD40DVD中。DVD-Ig结构的实例为本领域中已知

的且描述于例如美国专利第7,612,181号中,其以引用的方式并入本文中。

[0154] 如本文所用,术语“中和”是指当抗体或其抗原结合部分特异性结合细胞因子受体时,细胞因子受体的生物活性的中和。优选地,中和抗体或其抗原结合部分为与hCD40的结合造成hCD40的生物活性抑制的中和抗体。优选地,中和抗体或其抗原结合部分结合hCD40且使hCD40的生物学活性降低至少约20%、40%、60%、80%、85%或85%以上。中和抗体或其抗原结合部分对hCD40的生物活性的抑制可以借由量测hCD40生物活性的本领域中熟知的一种或多种指示剂来评定。

[0155] 术语“活性”包括以下活性:诸如抗体对抗原的结合特异性/亲和力,例如结合至hCD40抗原的抗hCD40抗体,和/或抗体的中和效能,例如与hCD40的结合抑制hCD40的生物活性(例如结合CD40L)的抗hCD40抗体;参与B细胞发育;参与淋巴细胞活化;参与抗原呈递细胞功能;调控树突状细胞、巨噬细胞及B细胞的活性;诱导在巨噬细胞及树突状细胞中产生发炎性细胞因子;上调抗原呈递;上调T细胞刺激;及促进B细胞中的免疫球蛋白类别转换。

[0156] 用于评定本发明抗CD40抗体的活性的例示性分析包括如本文所阐述的活体外及活体内分析。具体而言,可使用此类分析来判定抗CD40抗体为激动性抗体抑或拮抗性抗体。

[0157] 举例而言,与人类CD40的结合及CD40-CD40L相互作用的抑制可以使用表达人类CD40的细胞系,经由FACS分析进行分析。拮抗活性及激动活性可以使用与NF_kB介导的碱性磷酸酶(AP)相关的表达CD40的报导细胞系表达人类CD40来评定。当经由CD40接收到信号时,NF_kB活化导致AP的分泌,其借由比色底物来量测。作为例示性拮抗性分析,CD40报导细胞系可以与表达CD40L的Jurkat细胞系一起培养(以提供生理配体相互作用)或与可溶性CD40L一起培养,且可以评定抗CD40抗体阻断NF_kB信号的能力。至于例示性激动性分析,可以用抗CD40抗体处理人类CD40报导细胞系且如上所述量测NF_kB信号。

[0158] 可替代地,可以采用B细胞激动性分析,其中用低剂量抗IgM及IL4活化B细胞,随后添加CD40拮抗性抗体。B细胞活化的增强可以按CD86的上调来量测,CD86的上调又指示激动活性。类似地,可以采用B细胞拮抗性分析,其中将初级人类B细胞与表达CD40L的人类T细胞系一起培养,表达CD40L的人类T细胞系经由CD40/CD40L相互作用导致B细胞活化及CD86表达上调。初级人类B细胞的CD86上调的抑制指示拮抗活性。

[0159] 术语“表位”包括能够特异性结合至抗体或其抗原结合部分的任何多肽决定子。在某些实施例中,表位决定子包括分子的化学活性表面基团(诸如氨基酸、糖侧链、磷酰基或磺酰基),且在某些实施例中,可具有特定三维结构特征和/或荷质比特征。在各种实施例中,表位可为线性或依序表位,即,氨基酸的线性序列,抗原(即,CD40)的一级结构的线性序列。可替代地,在其他实施例中,表位可为当抗原呈递其二级结构时具有特定三维形状的构象表位。举例而言,构象表位可以包含抗原的非线性、即非依序氨基酸。

[0160] 在一个特定实施例中,表位为抗原中由抗体或其抗原结合部分结合的区域。在某些实施例中,当抗体或其抗原结合部分在蛋白质和/或大分子的复杂混合物中优先识别其目标抗原时,称其特异性结合抗原。

[0161] 如本文所用的术语“人类抗体”意欲包括具有来源于人类种系免疫球蛋白序列的可变区及恒定区的抗体。本发明的人类抗体可以包括不由人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,借由活体外随机或位点特异性突变诱发或借由活体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR中且尤其在CDR3中。然而,如本文所用的术语“人类抗体”不意欲包括来

源于另一哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已移植于人类框架序列上的抗体。

[0162] 如本文所用的术语“重组人类抗体”意欲包括借由重组手段制备、表达、产生或分离的所有人类抗体,诸如使用转染至宿主细胞中的重组表达运载体表达的抗体(进一步描述于下文第II C部分中);自重组组合性人类抗体文库分离的抗体(Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech.15:62-70; Azzazy H. 及 Highsmith W.E., (2002) Clin. Biochem. 35:425-445; Gavilondo J.V. 及 Lerrick J.W. (2002) BioTechniques 29:128-145; Hoogenboom H. 及 Chames P. (2000) Immunology Today 21:371-378);自针对人类免疫球蛋白基因转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体(参见例如 Taylor, L.D. 等人 (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295; Kellermann S-A. 及 Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597; Little M. 等人 (2000) Immunology Today 21:364-370);或借由涉及将人类免疫球蛋白序列剪接至其他DNA序列中的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人类抗体具有来源于人类种系免疫球蛋白序列的可变区及恒定区。然而,在某些实施例中,此类重组人类抗体经历活体外突变诱发(或当使用针对人类Ig序列转基因的动物时,活体内体细胞突变诱发),且因此重组抗体的VH及VL区的氨基酸序列为虽然来源于且涉及人类种系VH及VL序列,但可能活体内不天然存在于人类抗体种系谱内的序列。一个实施例提供能够结合人类CD40的完全人类抗体,其可以使用本领域中熟知的技术产生,诸如但不限于使用人类Ig噬菌体文库,诸如在Jermutus等人的PCT公开案第WO 2005/007699 A2号中所揭示的那些人类Ig噬菌体文库。

[0163] 如本文所用的术语“表面等离子共振”指允许借由例如使用 BIACore 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.) 在生物传感器矩阵内检测蛋白浓度变化来分析实时生物特异性相互作用的光学现象。有关进一步说明,参见 Jönsson, U. 等人 (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jönsson, U. 等人 (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B. 等人 (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; 及 Johnnson, B. 等人 (1991) Anal. Biochem. 198:268-277。

[0164] 如本文所用的术语“ k_{on} ”意欲指抗体与抗原结合形成如本领域中已知的抗体/抗原复合物的结合速率常数。

[0165] 如本文所用的术语“ k_{off} ”意欲指抗体自如本领域中已知的抗体/抗原复合物解离的解离速率常数。

[0166] 如本文所用的术语“ K_D ”意欲指如本领域中已知的特定抗体-抗原相互作用的解离常数。

[0167] 如本文所用的术语“经标记抗体”是指并入有准备鉴别抗体或其抗原结合部分的标记的抗体。优选地,标记为可检测标志物,例如并入经放射性标记的氨基酸或连接至可以借由带标志的抗生物素蛋白(例如,含有可以借由光学法或比色法检测的荧光标志物或酶活性的抗生蛋白链菌素)检测的生物素基部分的多肽。多肽标记的实例包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 或 ^{153}Sm);荧光标记(例如,FITC、若丹明(rhodamine)、镧系磷光体)、酶标记(例如,辣根过氧化酶、荧光素酶、碱性磷酸酶);化学发光标志物;生物素基;由二级报导基因识别的预定多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合域、表位标签);及磁化剂,诸如钆螯合物。

[0168] 如本文所用的术语“晶体”及“结晶”是指以晶体形式存在的抗体或其抗原结合部分。晶体为物质的一种固态形式，其不同于诸如非晶形固态或液晶态的其他形式。晶体由原子、离子、分子(例如蛋白质，诸如抗体)或分子集合体(例如，抗原/抗体复合物)的规则、重复、三维数组组成。这些三维数组系根据本领域中充分理解的特定数学关系排列。在晶体中重复的基本单元或构建块称为不对称单元。不对称单元在排列中符合给定的经良好定义的晶体学对称性的重复提供晶体的“单位晶胞”。单位晶胞在所有三个维度上借由规律变换(regular translation)重复，得到晶体。参见Giege,R.及Ducruix,A.Barrett,Crystallization of Nucleic Acids and Proteins,a Practical Approach,第2版,第201-16页,Oxford University Press,New York,New York,(1999)。

[0169] 如本文所用的术语“聚核苷酸”是指两种或两种以上核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核苷酸或任一核苷酸类型的修饰形式)的聚合物形式。该术语包括单链及双链形式的DNA,但优选为双链DNA。

[0170] 如本文所用的术语“经分离聚核苷酸”应意指如下聚核苷酸(例如具有基因组、cDNA或合成来源或其某种组合)：根据其来源，“经分离聚核苷酸”与自然界中与“经分离聚核苷酸”一起发现的聚核苷酸的全部或一部分不结合；可操作地连接至自然界中不连接的聚核苷酸；或在自然界中不以较大序列的一部分存在。

[0171] 如本文所用的术语“运载体”意欲指能够转运其已连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的运载体为“质粒”，其是指可将额外DNA区段接合至其中的环形双链DNA环。另一类型的运载体为病毒运载体，其中额外DNA区段可接合至病毒基因组中。某些运载体能够在引入其的宿主细胞中自主复制(例如，具有细菌复制起点的细菌运载体及游离型哺乳动物运载体)。其他运载体(例如非游离型哺乳动物运载体)在引入宿主细胞中后可整合至宿主细胞的基因组中，且进而与宿主基因组一起复制。此外，某些运载体能够引导其可操作地连接的基因的表达。此类运载体在本文中称为“重组表达运载体”(或简称为“表达运载体”)。一般而言，用于重组DNA技术中的表达运载体常常呈质粒形式。由于质粒为运载体的最常用形式，因而在本说明书中，“质粒”及“运载体”可互换使用。然而，本发明意欲包括提供等效功能的其他形式的表达运载体，诸如病毒运载体(例如，复制缺陷反转录病毒、腺病毒及腺相关病毒)。

[0172] 术语“可操作地连接”是指所描述的组分处于准许其以其预期方式起作用的关系中的并接。“可操作地连接”至编码序列的控制序列是以使编码序列的表达在与控制序列兼容的条件下达成的方式接合。“可操作地连接”的序列包括与相关基因相邻的表达控制序列及以反式起作用或在一定距离起作用以控制相关基因的表达控制序列。如本文所用的术语“表达控制序列”是指实现所接合的编码序列的表达及加工所需的聚核苷酸序列。表达控制序列包括适当转录起始、终止、启动子及强化子序列；有效RNA加工信号，诸如剪接及聚腺苷酸化信号；使细胞质mRNA稳定的序列；增强翻译效率的序列(即科扎克共有序列(Kozak consensus sequence))；增强蛋白质稳定性的序列；及必要时增强蛋白质分泌的序列。此类控制序列的性质视宿主生物体而不同；在原核生物中，此类控制序列一般包括启动子、核糖体结合位点及转录终止序列；在真核生物中，此类控制序列一般包括启动子及转录终止序列。术语“控制序列”意欲包括其存在对表达及加工而言至关重要的组分，且还可包括其存在有利的额外组分，例如前导序列及融合搭配物序列。本发明的蛋白质构建体可使用本领

域中已知的表达运载体及宿主细胞表达及纯化,包括表达盒、运载体、重组宿主细胞及用于自单一开放阅读框架重组表达及蛋白水解加工重组聚合蛋白质及前体蛋白 (pre-protein) 的方法(例如WO 2007/014162,其以引用的方式并入本文中)。

[0173] 如本文所定义,“转化”是指外源性DNA借以进入宿主细胞的任何过程。转化可在天然或人工条件下使用本领域中熟知的各种方法进行。转化可依赖于用于将外来核酸序列插入原核或真核宿主细胞中的任何已知方法。方法是基于待转化的宿主细胞来加以选择且可包括但不限于病毒感染、电穿孔、脂质体转染及粒子轰击。此类“转化”细胞包括所插入的DNA能够作为自主复制质粒或作为宿主染色体的一部分进行复制的稳定转化细胞。其还包括短暂表达所插入的DNA或RNA持续有限时间段的细胞。

[0174] 如本文所用的术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)意欲指已引入外源性DNA的细胞。应了解,此类术语不仅意欲指特定受试者细胞,而且指此类细胞的后代。因为可能由于突变或环境影响而在随后几代中出现某些修饰,所以此类后代实际上可能与亲本细胞不同一,但仍包括在如本文所用的术语“宿主细胞”的范畴内。优选地,宿主细胞包括选自任一生命界的原核及真核细胞。优选真核细胞包括原生生物、真菌、植物及动物细胞。最优先选地,宿主细胞包括但不限于原核细胞系大肠杆菌(E.Coli);哺乳动物细胞系CHO、HEK 293 及COS;昆虫细胞系Sf9;及真菌细胞酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

[0175] 可使用标准技术进行重组DNA、寡核苷酸合成及组织培养及转化(例如电穿孔、脂质体转染)。可根据制造商的说明书或如通常在本领域中所实现或如本文所描述执行酶促反应及纯化技术。前述技术及程序一般可根据本领域中熟知的常规方法及如在本说明书通篇中所引用及论述的各种一般性及较特定参考文献中所描述般执行。参见例如Sambrook等人Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)),其出于任何目的以引用的方式并入本文中。

[0176] 如本领域中所知及如本文所用,“转基因生物体”是指具有含转基因的细胞的生物体,其中引入生物体(或生物体的祖先)中的转基因表达在生物体中天然地不表达的多肽。“转基因”为DNA构建体,其稳定地且可操作地整合至发展出转基因生物体的细胞的基因组中,引导所编码的基因产物在转基因生物体的一或多个细胞类型或组织中表达。

[0177] 术语“调控”及“调节”可互换使用,且如本文所用,是指相关分子的活性(例如,hCD40的生物活性)的变化或更改。调节可为相关分子的某些活性或功能的量值增加或减小。分子的例示性活性及功能包括但不限于结合特征、酶活性、细胞受体活化及信号转导。

[0178] 相应地,如本文所用的术语“调节剂”为能够改变或更改相关分子的活性或功能(例如hCD40的生物活性)的化合物。举例而言,调节剂可导致分子的某一活性或功能的量值相比在不存在调节剂的情况下所观测到的活性或功能的量值增加或减小。在某些实施例中,调节剂为抑制剂,其使分子的至少一种活性或功能的量值减小。例示性抑制剂包括但不限于蛋白质、肽、抗体、肽体、碳水化合物或小有机分子。肽体描述于例如WO 01/83525中。

[0179] 如本文所用,术语“有效量”是指疗法的足以降低或改善病症或其一种或多种症状的严重程度和/或持续时间;预防病症进展;引起病症消退;预防与病症相关的一种或多种症状复发、发展、发作或进展;检测病症;或增强或改善另一疗法(例如预防剂或治疗剂)的预防或治疗效果的量。

[0180] 如本文所用,术语“无反应者(non-responder)”用于指患有IBD(例如克罗恩氏病

或溃疡性结肠炎),在用TNF α 抑制剂治疗后其临床疾病状态无改善或改善有限或不当(例如,CDAI评分不降低、皮质类固醇的使用不减少)的受试者。在一个实施例中,TNF无反应者为患有IBD,在用TNF α 抑制剂治疗后其克罗恩氏病活动性指数(CDAI)评分未能实现减少100分或100分以上的受试者。在一个实施例中,无反应者为患有IBD,在用TNF α 抑制剂治疗后其克罗恩氏病活动性指数(CDAI)评分未能在特定时间范围内实现减少100分或100分以上的受试者。

[0181] I.结合人类CD40(hCD40)的抗体

[0182] 本发明的一个方面提供结合CD40、包括人类CD40(hCD40)的拮抗性人源化抗体或其抗原结合部分。本发明的其他实施例包括结合至CD40的鼠单克隆抗体或其抗原结合部分,以及包含本文所述的抗CD40鼠抗体的可变区的嵌合抗体。优选地,本发明抗体为不具有显著激动活性的拮抗性抗CD40(例如,抗人类CD40)抗体。

[0183] 1.衍生自抗体1(Ab1)的人源化抗hCD40拮抗性抗体

[0184] 本发明至少部分地基于对具有拮抗特征且在某些实施例中基本上不具有激动活性的人源化抗CD40抗体的鉴别。

[0185] 如实例1中所描述,鉴别三种拮抗性抗hCD40鼠抗体,即Ab1(SEQ ID NO:9中所述的VL序列及SEQ ID NO:5中所述的VH序列)、Ab2(SEQ ID NO:76中所述的VL序列及SEQ ID NO:75中所述的VH序列)及Ab3(SEQ ID NO:48中所述的VL序列及SEQ ID NO:44中所述的VH序列)。

[0186] 基于鼠拮抗性抗体Ab1、Ab2及Ab3的CDR氨基酸序列的比对确定共有CDR序列。VH CDR1、CDR2及CDR3区的共有氨基酸序列分别描述于SEQ ID NO:78、79及80中,且VL CDR1、CDR2及CDR3氨基酸序列的共有氨基酸序列分别描述于SEQ ID NO:108、109及110中。所有序列还描述于下表5及图4中。

[0187] 表5.抗CD40杂交瘤CDR氨基酸序列比对

	杂交瘤	CDR1	CDR2	CDR3	
[0188]	重链 (按出现的次序分别为SEQ ID NO: 45-47、6-8、6、42、8及78-80)	Ab3 Ab1 Ab2 共有序列	GYTFTSYTMH GFTFSDYGMN GFTFSDYGMN GFTFSDYGMN Y TS T H	YINPSSDYPNQ KFKD YISSGRSNIYYADT VKG YISSGRGNIYYAD TVKG YISSGR NIYYADTVKG NPSS YPN NQKF D	WGYSFDY SWGYFDV SWGYFDV SWGYFDV WGYS
	轻链 (按出现的次序分别为SEQ ID NO: 49-51、10-12、10-12及108-110)	Ab3 Ab1 Ab2 共有序列	RSSKSLLHS- NGNTYLY KSSQSLNSGN QKNYLT KSSQSLNSGN QKNYLT KSSQSLNSGN QKNYLT R K H-GNT Y	RMSTLAS WASTRES WASTRES WASTRES RM LA	MQHLEYPLT QNDYTYPLT QNDYTYPLT QNDYTYPLT MQHLE

[0189] 重链CDR1域的共有氨基酸序列如SEQ ID NO:78 (G (F/Y) TF (S/T) (D/S) Y (G/T) M (N/H)) 所阐述。可变重链CDR2域的共有氨基酸序列如SEQ ID NO:79 (YI (S/N) (S/P) (G/S) (R/S) (D/S/G) (N/Y) (I/P) (Y/N) Y (A/N) (D/Q) (T/K) (V/F) K (G/D)) 所阐述。可变重链CDR3域的共有氨基酸序列阐述于SEQ ID NO:80 ((S/W) (W/G) (G/Y) (Y/S) FDV) 中。

[0190] 可变轻链CDR1域的共有氨基酸序列如SEQ ID NO:108 ((K/R) SS (Q/K) SLL (N/H) S (G/-) N (Q/G) (K/N) (N/T) YL (T/Y)) 所阐述。可变轻链CDR2域的共有氨基酸序列如SEQ ID NO:109 ((W/R) (A/M) ST (R/L) (E/A) S) 所阐述。可变轻链CDR3域的共有氨基酸序列如SEQ ID NO:110 ((Q/M) (N/Q) (D/H) (Y/L) (T/E) YPLT) 所阐述。

[0191] 在一个实施例中,本发明提供一种抗CD40拮抗性抗体或其抗原结合部分,其包含可变轻链,该可变轻链包含具有SEQ ID NO:108的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:109的氨基酸序列的CDR2、具有SEQ ID NO:110的氨基酸序列的CDR3;且包含可变重链,该可变重链包含具有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的CDR1、具有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的CDR2、具有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的CDR3。

[0192] 在鉴别鼠抗体Ab1、Ab2及Ab3之后,选择抗体Ab1及Ab3进行人源化(描述于下文实例2中)。表11及表12分别提供人源化Ab1及Ab3的CDR、VH及VL区的氨基酸序列。具体而言,基于Ab3产生九种不同的人源化抗体(参见下文实例2及表12)。还基于Ab1产生四种不同的人源化抗体,包括以下:

[0193] A) huAb1VH.1/VL.1 (如SEQ ID NO:13所阐述的VH氨基酸序列及分别如SEQ ID NO:6、7及8所阐述的VH CDR1、CDR2及CDR3序列;及如SEQ ID NO:14所阐述的VL氨基酸序列及分别如SEQ ID NO:10、11及12所阐述的VL CDR1、CDR2及CDR3序列);

[0194] B) huAb1VH.1A/VL.1 (如SEQ ID NO:15所阐述的VH氨基酸序列及分别如SEQ ID NO:6、7及8所阐述的VH CDR1、CDR2及CDR3序列;及如SEQ ID NO:14所阐述的VL氨基酸序列

及分别如SEQ ID NO:10、11及12所阐述的VL CDR1、CDR2及CDR3序列)；

[0195] C) huAb1VH.1/VL.1A(如SEQ ID NO:13所阐述的VH氨基酸序列及分别如SEQ ID NO:6、7及8所阐述的VH CDR1、CDR2及CDR3序列；及如SEQ ID NO:16所阐述的VL氨基酸序列及分别如SEQ ID NO:10、11及12所阐述的VL CDR1、CDR2及CDR3序列)；及

[0196] D) huAb1VH.1A/VL.1A(如SEQ ID NO:15所阐述的VH氨基酸序列及分别如SEQ ID NO:6、7及8所阐述的VH CDR1、CDR2及CDR3序列；及如SEQ ID NO:16所阐述的VL氨基酸序列及分别如SEQ ID NO:10、11及12所阐述的VL CDR1、CDR2及CDR3序列)。

[0197] 进一步修饰Ab1的人源化版本以移除轻链CDR1中的潜在脱酰胺位点。分析六个变异huAb1抗体，且此类抗体中的四个经鉴别为CD40的拮抗剂。六个抗体在此称为Ab1v1、Ab1v2、Ab1v3、Ab1v4、Ab1v5及Ab1v6(CDR及可变序列提供于下表13中)。在六个人源化Ab1变异数中，选择huAb1v1，因为其具有尤其优异的拮抗活性。huAb1v1的重链可变序列提供于SEQ ID NO:15中，且CDR1、CDR2及CDR3序列分别描述于SEQ ID NO:6、7及8中。huAb1v1的轻链可变序列提供于SEQ ID NO:20中，且CDR1、CDR2及CDR3序列分别描述于SEQ ID NO:21、11及12中。

[0198] 进一步突变诱发抗体huAb1v1的重链CDR2，产生十七种变异数体(描述于下文实例4中)。这些huAb1v1重链CDR2变异数体在本文中称为huAb1v1CDR2v1至huAb1v1CDR2v17。huAb1v1CDR2v1至huAb1v1CDR2v17重链的序列提供于表16中，其中选择VH huAb1v1CDR2v7作为针对CD40具有尤其优异的拮抗活性，同时仍然相对不含激动活性的克隆。huAb1v1CDR2v7的重链可变序列提供于SEQ ID NO:28中，且CDR1、CDR2及CDR3序列分别描述于SEQ ID NO:6、42及8中。

[0199] 在选择huAb1v1CDR2v7VH(SEQ ID NO:28的VH及分别在SEQ ID NO:6、42及8中所述的CDR1、CDR2及CDR3序列)及huAb1v1VL(SEQ ID NO:20的VL及分别在SEQ ID NO:21、11及12中所述的CDR1、CDR2及CDR3序列)之后，将可变区克隆至两个不同的IgG背景中，产生两个抗CD40拮抗性抗体，即Ab101及Ab102。表6(及表19)提供与这些IgG抗体有关的本发明特定实施例的全长重链及轻链序列。在表6中，恒定区加下划线且CDR域呈粗体。

[0200] 表6:人源化抗CD40抗体Ab101及Ab102及其重链及轻链序列

	Ab	重链序列	HC SEQ ID NO:	轻链序列	LC SEQ ID NO:
[0201]					

[0202]

Ab10 1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSDYGMNWVRQA PGKGLEWIAYISSGRGNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVV TVPSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	39	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSLL NRGNQKNYLTWFQ QKPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISLQAEDV AVYYCQNDYTYPLT FGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	40
Ab10 2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSDYGMNWVRQA PGKGLEWIAYISSGRGNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVV TVPSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD QLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHN YTQKSLSLSPGK	41	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSLL NRGNQKNYLTWFQ QKPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISLQAEDV AVYYCQNDYTYPLT FGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	40

[0203]

Ab10 2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSDYGMNWVRQA PGKGLEWIAYISSGRGNIYYA DTVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVWGQGTTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVV TVPSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD QLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHN YTQKSLSLSPGK	41	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSLL NRGNQKNYLTWFQ QKPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISLQAEDV AVYYCQNDYTYPLT FGQGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDST YSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	40
-----------	---	----	--	----

[0204] 因此,在一个实施例中,本发明涉及一种拮抗性抗CD40抗体(Ab101),其包含具有如SEQ ID NO:40中所阐述的氨基酸序列的轻链及具有如SEQ ID NO:39中所阐述的氨基酸序列的重链。在一个替代实施例中,本发明涉及一种拮抗性抗CD40抗体(Ab102),其包含具

有如SEQ ID NO:40中所阐述的氨基酸序列的轻链及具有如SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列的重链。

[0205] 因此,本发明包括具有拮抗活性的鼠、嵌合及人源化抗CD40抗体。在某些实施例中,本发明提供一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其包括具有含有如SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3的轻链可变区及/或具有含有如SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3的重链可变区。在一个特定实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括:具有如SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的重链CDR1、具有如SEQ ID NO:42中所阐述的氨基酸序列的重链CDR2、具有如SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的重链CDR3、具有如SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列的轻链CDR1、具有如SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的轻链CDR2及具有如SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的轻链CDR3。在一个特定实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括具有SEQ ID NO:28中所阐述的氨基酸序列的重链可变域及具有SEQ ID NO:20中所阐述的氨基酸序列的轻链可变域。在一个实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括具有SEQ ID NO:41中所阐述的氨基酸序列的重链及包含SEQ ID NO:40中所阐述的氨基酸序列的轻链。在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括具有SEQ ID NO:39中所阐述的氨基酸序列的重链及包含SEQ ID NO:40中所阐述的氨基酸序列的轻链。

[0206] 本发明中包括具有表5、6、11、12、13、14、16、17、18及19中所述的氨基酸序列(可变或CDR)的抗体。因此,在一个方面中,本发明涉及一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其具有轻链可变区,该轻链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:10、17、19或21中所阐述的氨基酸序列的CDR1;(b)具有如SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR2;及(c)具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3。可替代地或呈组合形式,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括重链可变区,该重链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的CDR1;(b)具有如SEQ ID NO:7或42中所阐述的氨基酸序列的CDR2;及(c)具有SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0207] 在一个特定实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分具有轻链可变区及重链可变区,轻链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:10中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3;重链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:7中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0208] 在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分具有轻链可变区及重链可变区,轻链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:19中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3;重链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:7中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0209] 在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分具有轻链可变区及重链可变区,轻链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序

列的CDR3；重链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:7中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0210] 在另一实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分具有轻链可变区及重链可变区，轻链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3；重链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:7中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0211] 在另一实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分具有轻链可变区及重链可变区，轻链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:21中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3；重链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:42中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0212] 在另一实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分具有轻链可变区及重链可变区，轻链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:108中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:109中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:110中所阐述的氨基酸序列的CDR3；重链可变区包含(a)具有如SEQ ID NO:78中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:79中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:80中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0213] 在本发明之又另一方面中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包含：包括如SEQ ID NO:5、13、15或22-38中所阐述的氨基酸序列的重链可变区；和/或包括如SEQ ID NO:9、14、16、18、20或43中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区。

[0214] 在一个特定实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括：包括如SEQ ID NO:5中所阐述的氨基酸序列的重链可变区及包括如SEQ ID NO:9中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区。

[0215] 在另一实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括：包括如SEQ ID NO:13中所阐述的氨基酸序列的重链可变区及包括如SEQ ID NO:14、16或18中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区。

[0216] 在另一实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括：包括如SEQ ID NO:15中所阐述的氨基酸序列的重链可变区及包括如SEQ ID NO:14、16、18、20或43中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区。

[0217] 在另一实施例中，拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括：包括如SEQ ID NO:28中所阐述的氨基酸序列的重链可变区及包括如SEQ ID NO:20中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区。

[0218] 本文所述的抗体、尤其抗体Ab102对CD40具有拮抗活性，基本上无激动活性。因此，在本发明中包括结合至由抗体Ab102及Ab101识别的表位的抗体。在一个特定实施例中，本发明包括一种经分离抗体或其抗原结合部分，其中该抗体或其抗原结合片段结合人类

CD40,使得含有结合至由SEQ ID NO:1的拓扑区Cys62-Phe67、Gln79-Cys83、Arg90-Thr99及Thr24-Cys37限定的表位的该抗体或其抗原结合片段的CD40与CD40配体(CD40L)的结合遭到抑制。在另一方面中,本发明涉及一种能够结合人类CD40的抗体或其抗原结合片段,其结合至人类CD40中的如下表位:其包含SEQ ID NO:1的氨基酸残基Cys62-Phe67(Cys62、Gly63、Glu64、Ser65、Glu66、Phe67)、Gln79-Cys83(Gln79、His80、Lys81、Tyr82、Cys83)、Arg90-Thr99(Arg90、Val191、Gln92、Gln93、Lys94、Gly95、Thr96、Ser97、Glu98及Thr99)及Thr24-Cys37(Thr24、Ala25、Cys26、Arg27、Glu28、Lys29、Gln30、Tyr31、Leu32、Ile33、Asn34、Ser35、Gln36、Cys37)中的三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十、二十一、二十二、二十三、二十四、二十五、二十六、二十七、二十八、二十九、三十、三十一、三十二、三十三、三十四个或所有。

[0219] 在另一实施例中,本发明提供对CD40具有拮抗活性的重链CDR2区。具体地,VH CDR2氨基酸序列YISSGRXNIYYADTVKG(SEQ ID NO:112)的残基55(残基X)已经鉴别为在相对于具有残基S55的亲本CDR2序列增加抗体的拮抗活性方面起作用。在HC CDR2的位置55处的残基Thr、Asp、Val、Leu、Ile及Met导致相对于在位置55处的其他氨基酸而言,拮抗活性水平降低。在一个实施例中,本发明提供一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其包含:包含具有SEQ ID NO:111的氨基酸序列的CDR2的重链可变区及包含具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的CDR2的轻链可变区。可变重抗体链及轻抗体链中可与SEQ ID NO:111组合的CDR1及CDR3域氨基酸序列在全篇中均有描述,包括例如表13及表18。

[0220] 在另一实施例中,本发明提供具有经鉴别为拮抗剂/激动剂开关的残基的轻链CDR1区。如下文实例3中所述,VL CDR1区KSSQSLLNSGNQKNYLT(SEQ ID NO:10)在残基“S”处的“NS”基序的修饰会引起拮抗性抗体切换至拮抗性抗体。因此,在一个实施例中,本发明包括一种具有CDR1 VL区的拮抗性抗CD40抗体,其包含SEQ ID NO:113(KSSQSLLNXGNQKNYLT;其中X不为氨基酸残基Pro)。

[0221] 本文中的术语“竞争性抗体”是指任何数目的靶向同一分子或稳定但非共价连接的超分子实体、优选同一分子(即CD40)的抗体,其中至少一者能够特异性降低另一者的可量测结合,优选地借由在空间上妨碍其他抗体对其目标表位(如上所述)的获取或借由在目标实体中诱导和/或稳定降低目标对其他抗体的亲和力的构象,更优选地借由结合至与前者足够靠近、与前者重叠或与前者相同的表位而直接阻断对其他目标表位的获取,最优选地重叠或相同,尤其相同。在本文中,若两个表位共享其化学结构、优选其氨基酸序列的一部分,则称其“重叠”;且若其化学结构、优选其氨基酸序列相同,则称其“同一”。

[0222] 在特定实施例中,竞争性抗体或其抗原结合部分为与本文所提出的抗体中的任一者相竞争的抗体或其抗原结合部分。在一个实施例中,本发明提供一种竞争性抗体,其可以与本文所述的抗体(例如,Ab101或Ab102)竞争且结合至人类CD40的拓扑表位(topographical epitope),包括残基Cys62-Phe67、Gln79-Cys83、Arg90-Thr99及Thr24-Cys37。

[0223] 在特定实施例中,激动性抗体包含重链可变区及轻链可变区,重链可变区包括(a)具有SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:7中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3;轻链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:74中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:11中

所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0224] 在其他特定实施例中,激动性抗体包含重链可变区及轻链可变区,重链可变区包括(a)具有SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:7中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3;轻链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:17中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0225] 在其他实施例中,激动性抗CD40抗体或其抗原结合部分包含:包括如SEQ ID NO:15或13中所阐述的氨基酸序列的重链可变区;和/或包括如SEQ ID NO:77或43中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区。

[0226] 2.衍生自抗体3 (Ab3) 的人源化抗CD40抗体

[0227] 下表11中提供用于鼠Ab3的重链及轻链的人源化版本的氨基酸序列。因此,本发明的特征进一步在于包含来自抗体3 (Ab3) 的可变和/或CDR序列的抗体。

[0228] 在一个方面中,本发明提供一种人源化抗体或其抗原结合部分,其包括轻链可变区及重链可变区,轻链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:49中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:50中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:51中所阐述的氨基酸序列的CDR3;重链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:45中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:46中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:47中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0229] 因此,在一个方面中,本发明涉及一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其具有轻链可变区,该轻链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:49中所阐述的氨基酸序列的CDR1;(b)具有如SEQ ID NO:50中所阐述的氨基酸序列的CDR2;及(c)具有SEQ ID NO:51中所阐述的氨基酸序列的CDR3。可替代地或呈组合形式,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括重链可变区,该重链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:45中所阐述的氨基酸序列的CDR1;(b)具有如SEQ ID NO:46中所阐述的氨基酸序列的CDR2;及(c)具有SEQ ID NO:47中所阐述的氨基酸序列的CDR3。

[0230] 在本发明之又另一方面中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包含:包括如SEQ ID NO:44、52、54或55中所阐述的氨基酸序列的重链可变区;和/或包括如SEQ ID NO:48、53、56或57中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区。

[0231] 在一个特定实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括:包括如SEQ ID NO:44中所阐述的氨基酸序列的重链可变区及包括如SEQ ID NO:48中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区。

[0232] 在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括:包括如SEQ ID NO:52中所阐述的氨基酸序列的重链可变区及包括如SEQ ID NO:53、56或57中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区。

[0233] 在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括:包括如SEQ ID NO:54中所阐述的氨基酸序列的重链可变区及包括如SEQ ID NO:53、56或57中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区。

[0234] 在另一实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分包括:包括如SEQ ID NO:55中所阐述的氨基酸序列的重链可变区及包括如SEQ ID NO:53、56或57中所阐述的氨基酸

序列的轻链可变区。

[0235] 3. 抗CD40嵌合抗体

[0236] 嵌合抗体为抗体的不同部分衍生自不同动物物种的分子,诸如具有衍生自鼠单克隆抗体的可变区及人类免疫球蛋白恒定区的抗体。用于制造嵌合抗体的方法为本领域中已知的。参见例如Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi等人, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies等人, (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; 美国专利第5,807,715号; 第4,816,567号; 及第4,816,397号,其以全文引用的方式并入本文中。此外,可以使用关于借由自具有适当抗原特异性的小鼠抗体分子剪接基因以及自具有适当生物活性的人类抗体分子剪接基因来制造“嵌合抗体”所研发的技术 (Morrison等人, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger等人, 1984, Nature 312:604-608; Takeda等人, 1985, Nature 314:452-454, 其各自以全文引用的方式并入本文中)。

[0237] 在另一方面中,本发明涉及一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其具有轻链可变区及重链可变区,轻链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:10中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3;重链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:42中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3。在一个特定实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分具有包括SEQ ID NO:76中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区及包括SEQ ID NO:75中所阐述的氨基酸序列的重链可变区。

[0238] 在另一方面中,本发明涉及一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其具有轻链可变区及重链可变区,轻链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:49中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:50中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:51中所阐述的氨基酸序列的CDR3;重链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:45中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:46中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:47中所阐述的氨基酸序列的CDR3。在一个特定实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分具有包括SEQ ID NO:48中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区及包括SEQ ID NO:44中所阐述的氨基酸序列的重链可变区。

[0239] 在另一方面中,本发明涉及一种拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分,其具有轻链可变区及重链可变区,轻链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:10中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:11中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:12中所阐述的氨基酸序列的CDR3;重链可变区包括(a)具有如SEQ ID NO:6中所阐述的氨基酸序列的CDR1、(b)具有如SEQ ID NO:7中所阐述的氨基酸序列的CDR2及(c)具有SEQ ID NO:8中所阐述的氨基酸序列的CDR3。在一个特定实施例中,拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分具有包括SEQ ID NO:9中所阐述的氨基酸序列的轻链可变区及包括SEQ ID NO:5中所阐述的氨基酸序列的重链可变区。

[0240] 以上经分离抗CD40抗体CDR序列建立起CD40抗体或其抗原结合部分的新颖家族,其根据本发明分离且包括包含表5、11-13及15-18中所列的CDR序列的抗体。为产生及选择关于hCD40具有优选CD40结合和/或中和活性的本发明CDR,可以使用本领域中已知用于产生本发明抗体及评定那些抗体的CD40结合和/或中和特征的标准方法,包括但不限于本文

中具体描述的那些方法。

[0241] 4. 表征本发明抗体

[0242] 本发明的抗CD40抗体为拮抗性抗体且可以展现出降低或中和CD40活性的高能力，例如借由本领域中已知且如本文所述的若干活体外及活体内分析中的任一者评定。在某些实施例中，本发明的抗CD40抗体为拮抗性抗体且基本上不含激动活性。拮抗活性及激动活性可借由本领域中已知的分析测定，包括本文所述的那些分析。举例而言，与人类CD40的结合及CD40-CD40L相互作用的抑制可以使用表达人类CD40的细胞系，经由FACS分析进行分析。

[0243] 在一个实施例中，使用报导细胞系测定抗CD40抗体的CD40拮抗活性或激动活性。举例而言，拮抗活性及激动活性可以使用与NF κ B介导的碱性磷酸酶(AP)相关的表达CD40的报导细胞系表达人类CD40来评定。当经由CD40接收到信号时，NF κ B活化导致AP的分泌，其借由比色底物来量测。作为例示性拮抗性分析，可以将CD40报导细胞系与表达CD40L的Jurkat细胞系一起培养(以提供生理配体相互作用)或与可溶性CD40L一起培养，其中可以评定抗CD40抗体阻断NF κ B信号(如借由标准方法所测定，存在少量AP或不存在AP)的能力。作为例示性激动性分析，可以用抗CD40抗体处理人类CD40报导细胞系且如上所述量测NF κ B信号(以超过阴性对照的AP存在情况呈现)。CD40报导细胞系的实例为HEK-BlueTM CD40L细胞(InvivoGen)，其用以经由在CD40刺激后NF- κ B活化时胚胎碱性磷酸酶(SEAP)的分泌来量测CD40L的生物活性。CD40L-CD40相互作用可以借由使用QUANTI-Blue(InvivoGen)评定SEAP的水平来监测。

[0244] 在一个实施例中，如借由拮抗性可溶性CD40L报道基因分析所测定，本发明的抗CD40拮抗性抗体或其抗原结合片段的IC50为0.4nM或0.4nM以下。在一个实施例中，如借由拮抗性CD40报道基因分析在Jurkat细胞系中所测定，本发明的抗CD40拮抗性抗体或其抗原结合片段的IC50为51nM或51nM以下。在一个实施例中，如借由拮抗性CD40报道基因分析在Jurkat细胞系中所测定，本发明的抗CD40拮抗性抗体或其抗原结合片段的IC50为3.4nM或3.4nM以下。在一个实施例中，如借由拮抗性CD40报道基因分析在Jurkat细胞系中所测定，本发明的抗CD40拮抗性抗体或其抗原结合片段的IC50为0.9nM或0.9nM以下。

[0245] 在一个实施例中，使用B细胞激动性分析测定抗CD40抗体的CD40拮抗活性或激动活性。举例而言，可以采用B细胞激动性分析，其中用低剂量抗IgM及IL4活化B细胞，随后添加CD40拮抗性抗体。B细胞活化的增强可以按CD86的上调来量测，CD86的上调又指示激动活性。类似地，可以采用B细胞拮抗性分析，其中将初级人类B细胞与表达CD40L的人类T细胞系一起培养，表达CD40L的人类T细胞系经由CD40/CD40L相互作用导致B细胞活化及CD86表达上调。初级人类B细胞的CD86上调的抑制指示拮抗活性。

[0246] 在一个实施例中，使用抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)介导的分析测定抗CD40抗体的CD40拮抗活性或激动活性。拮抗活性及激动活性可以借由抗体介导ADCC的能力来评定。拮抗性CD40抗体将为ADCC的有效介体，然而激动性抗体将不具有ADCC活性。抗体依赖性细胞毒性(ADCC)是指借由巨噬细胞、NK细胞、嗜中性白血球细胞等的活化诱导的一类细胞毒性，此类细胞借由经由其表面上所表达的Fc受体结合至抗体恒定区来识别目标细胞。补体依赖性细胞毒性(CDC)是指借由补体系统的活化诱导的一类细胞毒性，其经由抗体与抗原的结合发生。ADCC及CDC活性降低意指如相比于例如对照抗CD40拮抗性抗体，诸如由

杂交瘤4D11(寄存编号FERM BP-7758)产生的单克隆抗体,那些活性降低。EP 1707627 B1以全文引用的方式并入本文中,描述用于测定ADCC及CDC活性的分析。

[0247] 另外,可以使用经固定抗CD40 Ab刺激的树突状细胞(DC)的生物活性来分析激动活性。DC咸信为最有效的抗原呈递细胞,其能够拾取非淋巴组织中的Ag且将其携带至次级淋巴器官,响应于诸如危险信号及帮助信号的成熟刺激,激活T细胞。相比之下,在不活化的情况下借由DC呈现Ag导致次级淋巴组织中具有同源TCR的效应T细胞的消除或调节T细胞的诱导。因此,在周边组织中关于不成熟DC的成熟信号的存在或不存充当诱导应变性免疫反应或耐受性的开关。关于DC成熟的大部分CD4+T细胞帮助信号由DC上所表达的CD40与经活化的CD4+T细胞上的CD40配体(L)之间的相互作用提供。因此,CD40刺激借由上调CCR7的表达,诱导DC迁移至次级淋巴组织中。Watanabe等人2003 J Immunol;171:5828-5836描述可用于判定抗CD40抗体是否可以活化DC的分析来测定激动活性及拮抗活性。此类例示性分析包括测定经固定抗CD40 Ab刺激的BM-DC上的MHC I类/II类Ag及共刺激分子的表达、经固定抗CD40 Ab刺激的BM-DC的活体内迁移活性、经固定抗CD40 Ab刺激的BM-DC的活体外迁移活性及CCR7表达。

[0248] 在一个实施例中,抗CD40抗体或其抗原结合部分的激动活性使用活体外单核细胞活化分析测定,诸如下文实例7中所述的分析。活体外单核细胞活化分析包括使单核细胞暴露于抗CD40抗体或其抗原结合部分,其中若抗体或其抗原结合部分为CD40的活化剂(激动剂),则引起TNF产量增加。使用活体外单核细胞活化分析,基本上不含激动活性的拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分将导致不产生TNF或产生少量TNF,如实例7中所描述。

[0249] 在一个实施例中,基本上不含激动活性的拮抗性抗CD40抗体或其抗原结合部分在活体外CD40激动性分析、例如实例7中所述的激动性单核细胞分析中,具有在阴性对照的一个标准偏差的内的活性。

[0250] 激动性分析进一步描述于US 5786456、US 2011/0243932及EP 1707627 B1中,其各自以全文引用的方式并入本文中。用于测试抗体功能的拮抗性分析进一步描述于US 7361345、US 2011/0243932及EP 1707627B1中,其各自以引用的方式并入本文中。

[0251] 在优选实施例中,经分离抗体或其抗原结合部分结合人类CD40,其中抗体或其抗原结合部分以约 0.1s^{-1} 或 0.1s^{-1} 以下的 k_{off} 速率常数自人类CD40解离,如借由表面等离子共振所测定;或其以约 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 或 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 以下的 IC_{50} 抑制人类CD40活性。可替代地,抗体或其抗原结合部分可以约 $1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ 以下的 k_{off} 速率常数自人类CD40解离,如借由表面等离子共振所测定;或可以约 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 或 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 以下的 IC_{50} 抑制人类CD40活性。可替代地,抗体或其抗原结合部分可以约 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 以下的 k_{off} 速率常数自人类CD40解离,如借由表面等离子共振所测定;或可以约 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 或 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 以下的 IC_{50} 抑制人类CD40活性。可替代地,抗体或其抗原结合部分可以约 $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 以下的 k_{off} 速率常数自人类CD40解离,如借由表面等离子共振所测定;或可以约 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 或 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 以下的 IC_{50} 抑制CD40活性。可替代地,抗体或其抗原结合部分可以约 $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 以下的 k_{off} 速率常数自人类CD40解离,如借由表面等离子共振所测定;或可以约 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 或 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 以下的 IC_{50} 抑制CD40。可替代地,抗体或其抗原结合部分可以约 $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 以下的 k_{off} 速率常数自人类CD40解离,如借由表面等离子共振所测定;或可以约 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 或 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 以下的 IC_{50} 抑制CD40活性。

[0252] 如下文实例所述使抗体人源化。借由从头合成 (de novo synthesis) 可变域或借由突变诱发寡核苷酸引物及聚合酶链反应, 或借由允许CDR移植植物中的每一者的回复突变与其他突变的不同组合, 向CDR移植抗体序列中引入框架回复突变。将鼠单克隆CD40抗体的人源化可变区克隆至IgG表达运载体中用于功能表征。

[0253] 在某些实施例中, 抗体包含重链恒定区, 诸如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区。优选地, 重链恒定区为IgG1重链恒定区或IgG4重链恒定区。此外, 抗体可包含轻链恒定区, κ 轻链恒定区或 λ 轻链恒定区。优选地, 抗体包含 κ 轻链恒定区。可替代地, 抗体部分可为例如Fab片段或单链Fv片段。

[0254] 5.产生抗CD40人源化抗体

[0255] 如上所述, 人源化抗体为来自结合所需抗原的非人类物种抗体的抗体分子, 其具有一或多个来自非人类物种的互补决定区 (CDR) 及来自人类免疫球蛋白分子的框架区。已知人类Ig序列已揭示, 例如, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;

[0256] www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immuno-logy.html.www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html; www.biotech.ufl.edu/.about.hc1/; www.pebio.corn/pa/340913/340913.html-; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites-geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;

[0257] www.unizh.ch/.about.honegger/AH0sem-inar/Slide01.html;

[0258] www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/;

[0259] www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;

[0260] www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/abo-ut.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/frproducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html。Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S.Dept.Health(1983), 各自以全文引用的方式并入本文中。如本领域中所知,

如此导入的序列可用于降低免疫原性或降低、增强或修改结合、亲和力、结合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期或任何其他适合特征。

[0261] 人类框架区中的框架残基可经来自CDR供体抗体的相应残基取代,以更改、优选地改善抗原结合。这些框架取代借由本领域中熟知的方法鉴别,例如借由使CDR与框架残基的相互作用模型化以鉴别对于抗原结合而言重要的框架残基,且进行序列比较以鉴别特定位置处的异常框架残基。(参见例如Queen等人的美国专利号5,585,089;Riechmann等人,Nature 332:323(1988),其以全文引用的方式并入本文中。)三维免疫球蛋白模型通常可获得,且为本领域中的熟练技术人员所熟悉。可利用说明且显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。这些显示的检查使得可分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能方面的可能性作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以此方式,可自共有序列及导入序列选择FR残基且组合以便达成所需抗体特征,诸如对目标抗原的亲和力增加。一般而言,CDR残基直接且最显著参与影响抗原结合。抗体可以使用此项技术中已知的各种技术人源化,此类技术诸如但不限于以下各者中所述的那些技术:Jones等人,Nature 321:522(1986);Verhoeven等人,Science 239:1534(1988);Sims等人,J. Immunol. 151:2296(1993);Chothia及Lesk,J. Mol. Biol. 196:901(1987);Carter等人,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285(1992);Presta等人,J. Immunol. 151:2623(1993);Padlan,Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991);Studnicka等人,Protein Engineering 7(6):805-814(1994);Roguska.等人,PNAS 91:969-973(1994);PCT公开案W0 91/09967;PCT/:US 98/16280、US 96/18978、US 91/09630、US 91/05939、US 94/01234、GB 89/01334、GB 91/01134、GB 92/01755;W0 90/14443、W0 90/14424、W0 90/14430、EP 229246、EP 592,106;EP 519,596、EP 239,400、美国专利号5,565,332、5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5814476、5763192、5723323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539、4,816,567,其各自以全文引用的方式并入本文中,包括其中所引用的参考文献。

[0262] 抗CD40人源化抗体的实例提供于上文第1部分及第2部分及下文实例中。

[0263] II. 制造抗体及产抗体的细胞系

[0264] 本发明抗体可借由本领域中已知的多种技术中的任一者制造。

[0265] 1. 抗CD40单克隆抗体,使用杂交瘤技术

[0266] 可以使用本领域中已知的各种技术制备单克隆抗体,此类技术包括使用杂交瘤、重组及噬菌体呈现技术或其组合。举例而言,可以使用融合瘤技术产生单克隆抗体,包括本领域中已知及例如Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版1988);Hammerling等人,Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier,N.Y.,1981)(此类参考文献以全文引用的方式并入)中所教示的那些杂交瘤技术。如本文所用的术语“单克隆抗体”不限于经由杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指衍生自单一克隆,包括任何真核、原核或噬菌体克隆的抗体,且并非产生抗体的方法。

[0267] 使用杂交瘤技术制造及筛选特异性抗体的方法在本领域中为常规且熟知的。在一个实施例中,本发明提供产生单克隆抗体的方法以及由该方法产生的抗体,该方法包含将分泌本发明抗体的杂交瘤细胞(其中优选地,杂交瘤是通过融合自经本发明抗原免疫的小

鼠分离的脾细胞产生)与骨髓瘤细胞一起培养且随后筛选由分泌能够结合本发明多肽的抗体的杂交瘤克隆的融合产生的杂交瘤(参见实例1)。简言之,可以用CD40抗原免疫小鼠。在一个优选实施例中,CD40抗原与佐剂一起投与以刺激免疫反应。此类佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂(Freund's adjuvant)、RIBI(胞壁酰二肽)或ISCOM(免疫刺激复合物)。此类佐剂可以借由将多肽隔离在局部沉积中而避免多肽快速分散,或其可以含有刺激宿主分泌巨噬细胞趋化因子及免疫系统的其他组分的物质。优选地,若将投与多肽,则免疫时程将涉及多肽的两次或两次以上投与,时间跨越数周。

[0268] 在用CD40抗原免疫动物之后,可自动物获得抗体和/或产抗体细胞。借由给动物放血或杀死动物,自动物获得含抗CD40抗体的血清。血清可按其自动物获得的形式使用,可自血清获得免疫球蛋白部分,或可自血清纯化出抗CD40抗体。以此方式获得的血清或免疫球蛋白为多株,从而具有一系列各种各样的特性。

[0269] 在检测免疫反应时,例如检测小鼠血清中对抗原CD40具有特异性的抗体,收集小鼠脾脏且分离脾细胞。随后借由熟知技术将脾细胞融合至任何适合的骨髓瘤细胞,例如来自可获自ATCC的细胞系SP20的细胞。借由极限稀释法选择及克隆杂交瘤。随后借由本领域中已知的方法,针对分泌能够结合CD40的抗体的细胞分析杂交瘤克隆。腹水通常含有大量抗体,可以借由用阳性杂交瘤克隆免疫小鼠来产生。

[0270] 在另一实施例中,可由经免疫动物制备产抗体永生化杂交瘤。在免疫之后,杀死动物且如本领域中所熟知,将脾脏B细胞融合至永生化骨髓瘤细胞。参见例如Harlow及Lane之前述文献。在一个优选实施例中,骨髓瘤细胞不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌性细胞系)。在融合及抗生素选择之后,使用CD40或其部分或表达CD40的细胞筛选杂交瘤。在一个优选实施例中,使用酶联免疫分析(ELISA)或放射免疫分析(RIA)、优选ELISA执行初始筛选。ELISA筛选的实例提供于WO 00/37504中,其以引用的方式并入本文中。

[0271] 针对所要特征,包括稳固杂交瘤生长、高抗体产量及所要抗体特征,选择、克隆及进一步筛选产抗CD40抗体的杂交瘤,如下文进一步论述。杂交瘤可活体内在同基因型动物中、在缺乏免疫系统的动物(例如裸小鼠)中或在活体外细胞培养中培养及扩大。选择、选殖及扩大杂交瘤的方法已为一般技术者所熟知。

[0272] 在一个优选实施例中,杂交瘤为如上所述的小鼠杂交瘤。在另一优选实施例中,在非人类、非小鼠物种中,诸如在大鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马中产生杂交瘤。在另一实施例中,杂交瘤为人类杂交瘤,其中人类非分泌性骨髓瘤与表达抗CD40抗体的人类细胞融合。

[0273] 识别特定表位的抗体片段可借由已知技术产生。举例而言,本发明的Fab及F(ab')₂片段可使用酶,诸如木瓜酶(用于产生Fab片段)或胃蛋白酶(用于产生F(ab')₂片段),由免疫球蛋白分子的蛋白水解分裂产生。F(ab')₂片段含有可变区、轻链恒定区及重链的CH1域。

[0274] 2. 抗CD40单克隆抗体,使用SLAM

[0275] 在本发明的另一方面中,使用本领域中称为选则淋巴细胞抗体法(selected lymphocyte antibody method; SLAM)的程序,自单一经分离淋巴细胞产生重组抗体,如美国专利号5,627,052、PCT公开案WO 92/02551及Babcock, J.S.等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:7843-7848中所述。在此方法中,使用抗原特异性溶血性溶菌斑检定法筛选分泌相关抗体的单细胞,例如源自第1部分中所述的经免疫动物中的任一者的淋巴细胞,其中使用诸如生物素的接头将抗原CD40、CD40的子单元或其片段偶联至绵羊

红血细胞,且用于鉴别分泌对CD40具有特异性的抗体的单细胞。在鉴别出相关的分泌抗体的细胞之后,借由反转录酶-PCR自细胞夺回重链及轻链可变区cDNA,且这些可变区随后可在适当免疫球蛋白恒定区(例如,人类恒定区)的背景下在诸如COS或CHO细胞的哺乳动物宿主细胞中表达。经源自活体内选择的淋巴细胞的经扩增免疫球蛋白序列转染的宿主细胞随后可经历进一步分析及活体外选择,例如借由淘选经转染细胞以分离表达CD40抗体的细胞。经扩增的免疫球蛋白序列可以诸如借由活体外亲和力成熟法进一步活体外操控,诸如PCT公开案WO 97/29131及PCT公开案WO 00/56772中所述的那些方法。

[0276] 3. 抗CD40单克隆抗体,使用转基因动物

[0277] 在本发明的另一实施例中,借由用CD40抗原免疫包含一些或所有人类免疫球蛋白基因座的非人类动物来产生抗体。在一个优选实施例中,非人类动物为XENOMOUSE转基因小鼠,其为包含人类免疫球蛋白基因座的大片段且在小鼠抗体产生方面有缺陷的经工程改造的小鼠品系。参见例如Green等人Nature Genetics 7:13-21 (1994) 及美国专利5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598及6,130,364。还参见1991年7月25日公开的WO 91/10741、1994年2月3日公开的WO 94/02602、1996年10月31日公开的WO 96/34096及WO 96/33735、1998年4月23公开的WO 98/16654、1998年6月11日公开的WO 98/24893、1998年11月12日公开的WO 98/50433、1999年9月10日公开的WO 99/45031、1999年10月21日公开的WO 99/53049、2000年2月24日公开的WO 0009560及2000年6月29日公开的WO 00/037504。XENOMOUSE转基因小鼠产生完全人类抗体的成人样人类谱,且产生抗原特异性人类Mab。XENOMOUSE转基因小鼠经由引入人类重链基因座及x轻链基因座的兆碱基(megabase)大小的种系组态YAC片段而含有人类抗体谱的约80%。参见Mendez等人,Nature Genetics 15:146-156 (1997); Green及Jakobovits J.Exp.Med.188:483-495 (1998),其揭示内容以引用的方式并入本文中。

[0278] 4. 抗CD40单克隆抗体,使用重组抗体文库

[0279] 还可使用活体外方法制造本发明抗体,其中对抗体文库进行筛选以鉴别具有所需结合特异性的抗体。重组抗体文库的此类筛选方法为本领域中熟知的且包括以下各者中所述的方法:例如Ladner等人的美国专利5,223,409;Kang等人的PCT公开案WO 92/18619;Dower等人的PCT公开案WO 91/17271;Winter等人的PCT公开案WO 92/20791;Markland等人的PCT公开案WO 92/15679;Breitling等人的PCT公开案WO 93/01288;McCafferty等人的PCT公开案WO 92/01047;Garrard等人的PCT公开案WO 92/09690;Fuchs等人(1991)Bio/Technology 9:1370-1372;Hay等人(1992)Hum Antibod Hybridomas 3:81-85;Huse等人(1989)Science 246:1275-1281;McCafferty等人,Nature (1990) 348:552-554;Griffiths等人(1993)EMBO J 12:725-734;Hawkins等人(1992)J Mol Biol 226:889-896;Clackson等人(1991)Nature 352:624-628;Gram等人(1992)PNAS 89:3576-3580;Garrad等人(1991)Bio/Technology 9:1373-1377;Hoogenboom等人(1991)Nuc Acid Res 19:4133-4137;及Barbas等人(1991)PNAS 88:7978-7982;美国专利申请公开案20030186374及PCT公开案WO 97/29131,其内容各自以引用的方式并入本文中。

[0280] 重组抗体文库可来自经CD40或CD40的一部分(诸如细胞外域)免疫的受试者。可替代地,重组抗体文库可来自未经处理的受试者,即,尚未用CD40免疫的受试者,诸如来自尚未用人类CD40免疫的人类受试者的人类抗体文库。借由用包含人类CD40的肽筛选重组抗体

文库来选择本发明抗体,从而选择那些识别CD40的抗体。执行此类筛选及选择的方法为本领域中熟知的,诸如在前述段落中的参考文献中所述。为选择对hCD40具有特定结合亲和力的本发明抗体,诸如以特定 k_{off} 速率常数自人类CD40解离的那些抗体,可使用本领域中已知的表面等离子共振法选择具有所需 k_{off} 速率常数的抗体。为选择对hCD40具有特定中和活性的本发明抗体,诸如具有特定 IC_{50} 的那些抗体,可使用本领域中已知用于评定hCD40活性的抑制的标准方法。

[0281] 在一个方面中,本发明涉及一种经分离抗体或其抗原结合部分,其结合人类CD40。优选地,抗体为中和抗体。在各种实施例中,抗体为重组抗体或单克隆抗体。

[0282] 举例而言,本发明抗体还可使用本领域中已知的各种噬菌体呈现方法产生。在噬菌体呈现方法中,功能抗体域呈现于携带编码其的聚核苷酸序列的噬菌体粒子的表面上。具体而言,此类噬菌体可以用于呈现自库或组合抗体文库(例如,人类或鼠类)表达的抗原结合域。表达结合相关抗原的抗原结合域的噬菌体可用抗原来选择或鉴别,例如使用经标记抗原或结合或捕捉至固体表面或珠粒的抗原。这些方法中所用的噬菌体通常为丝状噬菌体,其包括自具有以重组方式融合至噬菌体基因III或基因VIII蛋白质的Fab、Fv或经二硫化物稳定的Fv抗体域的噬菌体表达的fd及M13结合域。可用以制造本发明抗体的噬菌体呈现方法的实例包括以下各者中所揭示的那些的那些噬菌体呈现方法:Brinkman等人,J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995);Ames等人,J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995);Kettleborough等人,Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994);Persic等人,Gene 187 9-18 (1997);Burton等人,Advances in Immunology 57:191-280 (1994);PCT申请案PCT/GB 91/01134;PCT公开案WO 90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/15982;WO 95/20401;及美国专利5,698,426;5,223,409;5,403,484;5,580,717;5,427,908;5,750,753;5,821,047;5,571,698;5,427,908;5,516,637;5,780,225;5,658,727;5,733,743及5,969,108,其各自以全文引用之方式并入本文中。

[0283] 如上文参考文献中所述,在噬菌体选择之后,可以自噬菌体分离抗体编码区且用其产生完整抗体,包括人类抗体或任何其他所需抗原结合片段,且在任何理想宿主中表达,该宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母及细菌,例如如下文详细描述。举例而言,还可使用本领域中已知的方法,采用用于以重组方式产生Fab、Fab'及F(ab')2片段的技术,诸如在PCT公开案WO 92/22324;Mullinax等人,BioTechniques 12 (6):864-869 (1992);及Sawai等人,AJRI 34:26-34 (1995);及Better等人,Science 240:1041-1043 (1988)(所述参考文献以全文引用的方式并入中)中所揭示的那些方法。可用于产生单链Fv及抗体的技术的实例包括在美国专利4,946,778及5,258,498;Huston等人,Methods in Enzymology 203:46-88 (1991);Shu等人,PNAS 90:7995-7999 (1993);及Skerra等人,Science 240:1038-1040 (1988)中所述的那些技术。

[0284] 替代借由噬菌体呈现筛选重组抗体文库,可以应用本领域中已知用于筛选大组合文库的其他方法来鉴别本发明的双重特异性抗体。一种类型的替代表达系统为重组抗体文库按RNA-蛋白质融合体表达的表达系统,如Szostak及Roberts的PCT公开案WO 98/31700以及Roberts,R.W.及Szostak,J.W.(1997)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:12297-12302中所述。在此系统中,借由活体外转译在3'端携带肽基受体抗生素嘌呤霉素(puromycin)的合成mRNA,在mRNA与其所编码的肽或蛋白质之间创建共价融合体。因此,可以基于所编码肽或蛋

白质(例如抗体或其部分)的性质,诸如抗体或其部分与双重特异性抗原的结合,自复杂的mRNA混合物(例如组合文库)富集特异性mRNA。编码自筛选此类文库回收的抗体或其部分的核酸序列可以借由如上所述的重组手段(例如,在哺乳动物宿主细胞中)来表达,且此外,可以借由已将突变引入最初选择的序列中的mRNA-肽融合体的额外几轮筛选或借由如上所述用于重组抗体的活体外亲和力成熟的其他方法进行进一步亲和力成熟。

[0285] 在另一种方法中,本发明抗体还可使用本领域中已知的酵母呈现方法产生。在酵母呈现方法中,使用遗传方法将抗体域系栓至酵母细胞壁且使其呈现于酵母的表面上。具体而言,该酵母可以用于呈现自库或组合抗体文库(例如,人类或鼠类)表达的抗原结合域。可以用以制造本发明抗体的酵母呈现方法的实例包括在Wittrup等人(美国专利6,699,658)(其以引用的方式并入本文中)中所揭示的那些酵母呈现方法。

[0286] 5. 制造重组CD40抗体

[0287] 本发明抗体可借由本领域中已知的多种技术中的任一者制造。举例而言,自宿主细胞表达,其中编码重链及轻链的表达运载体借由标准技术转染至宿主细胞中。术语“转染”的各种形式意欲涵盖常用于引入外源性DNA至原核或真核宿主细胞中的各种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-聚葡萄糖转染及其类似技术。尽管有可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明抗体,但抗体在真核细胞中的表达为优选的,且在哺乳动物宿主细胞中为最优选的,因为此类真核细胞(且尤其哺乳动物细胞)与原核细胞相比更可能组装且分泌经适当折叠且具免疫活性的抗体。

[0288] 用于表达本发明的重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括Urlaub及Chasin,(1980) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220中所述的dhfr-CHO细胞,其与例如如R.J.Kaufman及P.A.Sharp(1982) Mol.Biol.159:601-621中所述的DHFR可选择标志物一起使用)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞及SP2细胞。当将编码抗体基因的重组表达运载体引入哺乳动物宿主细胞中时,借由培养宿主细胞持续足以允许抗体在宿主细胞中表达或更优选地,将抗体分泌至宿主细胞生长的培养基中的时间段产生抗体。可使用标准蛋白质纯化方法自培养基回收抗体。

[0289] 宿主细胞还可用于产生功能性抗体片段,诸如Fab片段或scFv分子。应了解,以上程序的变化在本发明的范畴内。举例而言,可能需要用编码本发明抗体的轻链和/或重链的功能片段的DNA转染宿主细胞。还可使用重组DNA技术来移除一些或所有并非结合至相关抗原所需的编码轻链及重链中的任一者或两者的DNA。本发明抗体还涵盖自此类截短的DNA分子表达的分子。此外,可借由标准化学交联方法使本发明抗体与第二抗体交联而产生双功能抗体,其中一条重链及一条轻链为本发明抗体且另一条重链及轻链对除相关抗原以外的抗原具有特异性。

[0290] 在用于重组表达本发明的抗体或其抗原结合部分的优选系统中,借由磷酸钙介导的转染将编码抗体重链及抗体轻链的重组表达运载体引入dhfr-CHO细胞中。在重组表达运载体内,将抗体重链及轻链基因各自可操作地连接至CMV强化子/AdMLP启动子调控组件以驱动高水平的基因转录。重组表达运载体亦携带DHFR基因,其允许使用氨基蝶呤选择/扩增来选择已经运载体转染的CHO细胞。培养所选转化体宿主细胞以允许表达抗体重链及轻链,且自培养基回收完整抗体。使用标准分子生物学技术来制备重组表达运载体、转染宿主细胞、选择转化体、培养宿主细胞及自培养基回收抗体。再者,本发明提供一种借由在适合培

养基中培养本发明的宿主细胞直至合成本发明的重组抗体来合成本发明的重组抗体的方法。该方法可以进一步包含自培养基分离重组抗体。

[0291] 本发明的另一实施例提供一种糖基化抗体或其抗原结合部分，其中抗体或其抗原结合部分包含一或多个碳水化合物残基。新生活体内蛋白质产生可以经历进一步加工，称为转译后修饰。具体而言，可以酶促方式(称为糖基化的过程)添加糖(糖基)残基。所得蛋白质携带共价连接的寡糖侧链，称为糖基化蛋白质或糖蛋白。抗体为在Fc域以及可变域中含有一或多个碳水化合物残基的糖蛋白。Fc域中的碳水化合物残基对Fc域的效应功能具有重要影响，且对抗体的抗原结合或半衰期影响极小(R.Jeffeiris,Biotechnol.Prog.21(2005),第11-16页)。相比之下，可变域的糖基化会对抗体的抗原结合活性产生影响。可变域中的糖基化可能由于位阻而可能对抗体结合亲和力具有不利影响(Co,M.S.等人,Mol.Immunol.(1993)30:1361-1367)，或造成对抗原的亲和力增加(Wallick,S.C.等人,Exp.Med.(1988)168:1099-1109;Wright,A.等人,EMBO J.(1991)10:2717-2723)。

[0292] 本发明的一个方面涉及产生糖基化位点突变体，其中抗体或其抗原结合部分的O或N连接的糖基化位点已经突变。本领域中的熟练技术人员可以使用标准熟知技术产生此类突变体。保留生物活性，但具有增加或降低的结合活性的糖基化位点突变体为本发明的另一目标。

[0293] 在另一实施例中，修改本发明的抗体或抗原结合部分的糖基化。举例而言，可制得去糖基化抗体(即，缺乏糖基化的抗体)。可更改糖基化以例如增加抗体对抗原的亲和力。此类碳水化合物修饰可借由例如更改抗体序列内的一或多个糖基化位点来完成。举例而言，可进行一或多个氨基酸取代，从而消除一或多个可变区糖基化位点，以借此消除该位点的糖基化。此类去糖基化可增加抗体对抗原的亲和力。此类方法进一步详细描述于PCT公开案WO 2003016466 A2及美国专利5,714,350及6,350,861中，其各自以全文引用之方式并入本文中。

[0294] 另外地或可替代地，可以制得糖基化类型更改的经修饰的本发明抗体，诸如具有降低量的海藻糖基残基的低海藻糖基化抗体或具有增加的等分GlcNAc结构的抗体。此类经更改的糖基化模式已证明会提高抗体的ADCC能力。此类碳水化合物修饰可借由例如在糖基化机制更改的宿主细胞中表达抗体来实现。糖基化机制更改的细胞在本领域中已有描述且可用作表达本发明的重组抗体以借此产生糖基化更改的抗体的宿主细胞。参见例如Shields,R.L.等人(2002)J.Biol.Chem.277:26733-26740;Umana等人(1999)Nat.Biotech.17:176-1以及欧洲专利EP 1,176,195;PCT公开案WO 03/035835;WO 99/54342 80，其各自以全文引用之方式并入本文中。

[0295] 蛋白质糖基化视相关蛋白质的氨基酸序列以及表达蛋白质的宿主细胞而定。不同生物体可以产生不同糖基化酶(例如，糖基转移酶及糖苷酶)，且具有不同的可用底物(核苷酸糖)。归因于此类因素，蛋白质糖基化模式及糖基残基的组成可以视表达特定蛋白质的宿主系统而不同。适用于本发明的糖基残基可以包括但不限于葡萄糖、半乳糖、甘露糖、海藻糖、N-乙酰葡萄糖胺及唾液酸。优选地，糖基化抗体或其抗原结合部分包含糖基残基，使得糖基化模式为人类。

[0296] 本领域中的熟练技术人员已知，不同蛋白质糖基化可以产生不同蛋白质特征。举例而言，在诸如酵母的微生物宿主中产生且利用酵母内源性路径糖基化的治疗蛋白的功效

相比于在诸如CHO细胞系的哺乳动物细胞中表达的相同蛋白质的功效而言会降低。此类糖蛋白还可在人类中具有免疫原性且在投与之后显示降低的活体内半衰期。人类及其他动物中的特定受体可以识别特定糖基残基且促进自血流中快速清除蛋白质。其他不良影响可以包括在蛋白质折叠、溶解度、对蛋白酶的易感性、移行、转运、区室化、分泌、由其他蛋白质或因子识别、抗原性或过敏原性方面的改变。因此，医师可能偏爱具有特定组成及糖基化模式的治疗蛋白，例如与在人类细胞中或在既定受试者动物的物种特异性细胞中产生的糖基化组成及模式相同或至少类似的糖基化组成及模式。

[0297] 表达不同于宿主细胞的蛋白质的糖基化蛋白质可借由对宿主细胞进行遗传修饰以表达异源糖基化酶来达成。使用本领域中已知的技术，医师可以产生展现人类蛋白质糖基化的抗体或其抗原结合部分。举例而言，已对酵母菌株进行遗传修饰以表达非天然存在的糖基化酶，使得在这些酵母菌株中产生的糖基化蛋白质(糖蛋白)展现与动物细胞、尤其人类细胞的蛋白质糖基化相同的蛋白质糖基化(美国专利公开案第20040018590号及第20020137134号及PCT公开案WO 2005100584 A2)。

[0298] 除抗体或其抗原结合部分之外，本发明还涉及一种对本发明的此类抗体或其抗原结合部分具有特异性的抗个体基因型(抗Id)抗体。抗Id抗体为识别通常与另一抗体的抗原结合区相关的独特决定子的抗体。抗Id可以借由用抗体或其抗原结合部分或其含CDR区免疫动物来制备。经免疫动物将识别免疫抗体的个体基因型决定子且对其起反应，且产生抗Id抗体。抗Id抗体还可用作“免疫原”诱导另一动物中的免疫反应，产生所谓的抗抗Id抗体。

[0299] 此外，本领域中的熟练技术人员应了解，相关蛋白质可使用经基因工程改造以表达各种糖基化酶的宿主细胞文库表达，使得该文库的宿主细胞成员产生具有变异糖基化模式的相关蛋白质。医师可以随后选择且分离具有特定新颖糖基化模式的相关蛋白质。优选地，具有经过特定选择的新颖糖基化模式的蛋白质展现出改良或更改的生物特性。

[0300] III. 拮抗性抗CD40抗体的用途

[0301] 鉴于其与人类CD40结合的能力，本发明的抗人类CD40抗体或其部分可用于使用常规免疫分析，诸如酶联免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)或组织免疫组织化学，检测人类CD40(例如，在生物样品中，诸如血清或血浆)。本发明提供一种用于检测生物样品中的人类CD40的方法，其包含使生物样品与本发明的抗体或抗体部分接触且检测结合至人类CD40的抗体(或抗体部分)或未结合抗体(或抗体部分)，从而检测生物样品中的人类CD40。可用可检测物质直接或间接标记抗体以促进已结合或未结合抗体的检测。适合的可检测物质包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料及放射性材料。适合酶的实例包括辣根过氧化酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶；适合辅基复合物的实例包括抗生蛋白链菌素/生物素及抗生物素蛋白/生物素；适合荧光材料的实例包括伞酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红素；发光材料的实例包括鲁米诺(Luminol)；且适合放射性材料的实例包括³H、¹⁴C、³⁵S、⁹⁰y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、¹⁶⁶Ho、或¹⁵³Sm。

[0302] 代替标记抗体，可以借由竞争免疫分析，利用经可检测物质标记的rhCD40标准品及未标记的抗人类CD40抗体，在生物流体中分析人类CD40。在此分析中，将生物样品、经标记的rhCD40标准品及抗人类CD40抗体合并且测定结合至未标记抗体的经标记rhCD40标准品的量。生物样品中的人类CD40的量与结合至抗CD40抗体的经标记rhCD40标准品的量成反比。类似地，还可借由竞争免疫分析，利用经可检测物质标记的rhCD40标准品及未标记的抗

人类CD40抗体,在生物流体中分析人类CD40。

[0303] 本发明的抗体及抗体部分优选能够活体外及活体内中和人类CD40活性。因此,本发明的此类抗体及抗体部分可用于抑制hCD40活性,例如在含有hCD40的细胞培养中、在具有与本发明抗体交叉反应的CD40的人类受试者中或其他哺乳动物受试者中。在一个实施例中,本发明提供一种用于抑制hCD40活性的方法,其包含使hCD40与本发明的抗体或抗体部分接触,使得hCD40活性遭到抑制。举例而言,在含有或疑似含有hCD40的细胞培养中,可以向培养基中添加本发明的抗体或抗体部分以抑制培养物中的hCD40活性。

[0304] 在另一实施例中,本发明提供一种用于降低受试者、有利地为患有CD40活性有害的疾病或病症的受试者中的hCD40活性的方法。本发明提供用于降低患有此类疾病或病症的受试者中的CD40活性的方法,该方法包含向受试者投与本发明的抗体或抗体部分,使得受试者中的CD40活性降低。优选地,CD40为人类CD40,且受试者为人类受试者。可替代地,受试者可为表达本发明抗体能够结合的CD40的哺乳动物。再者,受试者可为已引入CD40(例如,借由投与CD40或借由表达CD40转基因)的哺乳动物。本发明抗体可以出于治疗目的投与给人类受试者。此外,本发明抗体可以投与给表达该抗体能够结合的CD40的非人类哺乳动物,出于兽医学目的或作为人类疾病的动物模型。关于后者,此类动物模型可适用于评估本发明抗体的治疗功效(例如,测试剂量及投药时程)。

[0305] 如本文所用,术语“CD40活性有害的病症”意欲包括在患有该病症的受试者中CD40的存在已显示会或疑似会引起该病症的病理生理学或为造成该病症恶化的因素的疾病及其他病症。因此,CD40活性有害的病症为预期CD40活性降低可缓解病症的症状和/或进程的病症。此类病症可例如由患有该病症的受试者的生物流体中CD40的浓度增加(例如,受试者的血清、血浆、滑液等中CD40的浓度增加)证明,其可以例如使用如上所述的抗CD40抗体检测。可用本发明抗体及其变异体或其抗原结合片段治疗的病症的非限制性实例包括下文有关本发明抗体的药物组合物的部分中所论述的那些病症。举例而言,适合病症包括但不限于全身性红斑性狼疮症(SLE)、盘状狼疮、狼疮性肾炎、类肉瘤病、幼年型关节炎、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、莱特尔氏症候群、强直性脊柱炎、痛风性关节炎、器官或组织移植的排斥反应、移植物抗宿主疾病、多发性硬化症、高IgE症候群、结节性多动脉炎、原发性胆汁性肝硬化症、发炎性肠病、克罗恩氏病、腹腔疾病(麸质敏感性肠病)、自体免疫性肝炎、恶性贫血、自体免疫性溶血性贫血、银屑病、硬皮病、重症肌无力、自体免疫性血小板减少性紫癜、自体免疫甲状腺炎、格雷氏病、桥本氏甲状腺炎、免疫复合性疾病、慢性疲劳免疫功能障碍症候群(CFIDS)、多发性肌炎及皮肌炎、冷球蛋白血症、血栓溶解、心肌症、寻常天疱疮、肺间质纤维化、类肉瘤病、I型及II型糖尿病、1、2、3及4型迟发型过敏、过敏或过敏性病症、哮喘、彻奇-斯全司症候群(过敏性肉芽肿病)、特应性皮炎、过敏性及刺激性接触性皮炎、荨麻疹、IgE介导的过敏、动脉粥样硬化、血管炎、特发性发炎性肌病、溶血性疾病、阿兹海默氏病及慢性发炎性脱髓鞘多发性神经病。在一个特定实施例中,疾病或病症为慢性发炎性病症。在一个特定实施例中,CD40活性有害的病症为发炎性肠病(IBD),包括但不限于克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

[0306] 在其他实施例中,本发明的抗CD40抗体或抗原结合部分用于治疗TNF α 活性有害的病症,包括但不限于类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎、化脓性汗腺炎、幼年型特发性关节炎、银屑病性关节炎、银屑病、强直性脊柱炎及克罗恩氏病。在一个实施例中,TNF α 活性有害的

病症为眼色素层炎。

[0307] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗患有发炎性肠病(IBD)的人类受试者。

[0308] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗溃疡性结肠炎。

[0309] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗克罗恩氏病。

[0310] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗全身性红斑性狼疮症(SLE)。

[0311] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗类肉瘤病。

[0312] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗患有幼年型关节炎的人类受试者。

[0313] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗类风湿性关节炎。

[0314] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗银屑病性关节炎。

[0315] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗患有强直性脊柱炎的人类受试者。

[0316] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗化脓性汗腺炎。

[0317] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗眼色素层炎。

[0318] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗休格连氏病。

[0319] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗银屑病。

[0320] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗特应性皮炎。

[0321] 在一个实施例中,本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)是用于治疗硬皮病。

[0322] 归因于CD40在先天性及应变性免疫反应中的重要作用,本发明的抗CD40 mAb将具有治疗未经生物制剂治疗的患者(*biologic naïve patient*)及抗TNF不当的反应群体的潜能。本发明提供一种能够抑制CD40信号传导的治疗,阻抑诸如TNF及IL-23产生的分子路径及维持肠道慢性发炎的黏着/共刺激分子表达。基于经抗TNF治疗的克罗恩氏病患者的表达谱分析,用抗CD40治疗可能具有延伸超出抗TNF反应群体以治疗较宽范围的克罗恩氏病患者的潜力。在某些实施例中,本发明提供一种治疗对抗TNF疗法不起反应的IBD患者子群体的方法。此类IBD患者可能患有克罗恩氏病或溃疡性结肠炎,且对用TNF α 抑制剂治疗不起反应或反应有限,TNF α 抑制剂诸如但不限于英利昔单抗(*infliximab*)、阿达木单抗

(adalimumab)、聚乙二醇化赛妥珠单抗(certolizumab pegol)或戈利木单抗(golimumab)。本文所述的抗CD40拮抗性抗体可用于治疗患有克罗恩氏病或溃疡性结肠炎的TNF无反应者。在某些实施例中，本发明包括一种治疗患有中度至重度活跃的克罗恩氏病且为抗TNF无反应者的患者(例如成人患者)的方法。

[0323] 本发明抗体或其抗原结合部分可以单独或以组合形式使用以治疗此类疾病。应了解，本发明抗体或其抗原结合部分可以单独或与额外药剂(例如治疗剂)组合使用，该额外药剂由本领域中的熟练技术人员出于其既定目的来加以选择。举例而言，额外药剂可为本领域中公认适用于治疗待借由本发明抗体治疗的疾病或病况的治疗剂。额外药剂还可为赋予治疗组合物有益属性的药剂，例如影响组合物黏度的药剂。应进一步了解，将包括在本发明内的组合为适用于其既定目的的那些组合。以下阐述的药剂是出于说明性目的且不意欲受限制的。作为本发明的一部分的组合可为本发明的抗体及至少一种选自以下清单的额外药剂。组合还可包括一种以上额外药剂，例如两种或三种额外药剂，若组合如此，则所形成的组合物可以执行其既定功能。

[0324] 组合疗法可以包括一种或多种CD40拮抗剂，例如抗CD40抗体或其片段，与一种或多种额外治疗剂一起调配和/或共投与，该一种或多种额外治疗剂例如一种或多种细胞因子及生长因子抑制剂、免疫抑制剂、消炎剂(例如全身性消炎剂)、抗纤维化剂、代谢抑制剂、酶抑制剂和/或细胞毒性或细胞生长抑制剂、有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂、基因疗法运载体、烷基化剂、抗血管生成剂、抗代谢物、含硼剂、化学保护剂、激素、抗激素剂、皮质类固醇、光敏性治疗剂、寡核苷酸、放射性核素剂、拓扑异构酶(topoisomerase)抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂或放射增敏剂，如本文详细描述。

[0325] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与第二药剂组合用于治疗发炎性肠病(IBD)。在某些实施例中，第二药剂为美沙拉嗪、巴柳氮、硫唑嘌呤、6-MP、氨甲蝶呤、英利昔单抗、赛妥珠单抗、阿达木单抗、戈利木单抗、那他珠单抗(natalizumab)、维多珠单抗(vedolizumab)、优特克单抗(ustekinumab)或其组合。

[0326] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与第二药剂组合用于治疗SLE，其中第二药剂为硝基贴剂(nitropaste)/硝化甘油、硝苯地平(nifedipine)、西地那非(sildenafil)、他达拉非(tadalafil)或其组合。

[0327] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与第二药剂组合用于治疗SLE，其中第二药剂为皮质类固醇、内源性类固醇生产者、NSAID、消炎剂、缓解疾病的抗风湿性药物(disease-modifying antirheumatic drug; DMARD)、免疫抑制剂、抗凝血剂或其组合。

[0328] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与皮质类固醇组合用于治疗SLE。可使用的皮质类固醇的实例包括泼尼松龙、甲泼尼龙(methylprednisolone)、泼尼松(prednisone)或其组合。

[0329] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与影响内源性类固醇产生的药剂(例如促皮质素(阿克撒(Acthar)))组合用于治疗SLE。

[0330] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与局部或注射疗法组合用于治疗SLE。此类疗法的实例包括但不限于皮质酮、氢皮质酮、吡美莫司乳膏(pimecrolimus cream)、他克莫司软膏(tacrolimus ointment)、咪喹莫特(imiquimod)

或其组合。

[0331] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与非类固醇消炎药(NSAID)组合用于治疗SLE。可用于组合疗法中的NSAID的实例包括但不限于吲哚美辛(indomethacin)、萘丁美酮(nabumetone)、塞内昔布(celecoxib)、布洛芬、萘普生(naproxen)、双氯芬酸(diclofenac)或其组合。

[0332] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与消炎药组合用于治疗SLE。在其他实施例中，消炎药为乙酰胺苯酚和/或水杨酸盐。

[0333] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与缓解疾病的抗风湿性药物(DMARD)组合用于治疗SLE。DMARD的实例包括但不限于羟氯喹(hydroxychloroquine)(Plaquenil)、氯奎(chloroquine)、氨甲蝶呤(瑞玛翠(Rheumatrex))、来氟米特(爱诺华(Arava))、柳氮磺胺吡啶或其组合。

[0334] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与贝利单抗(Belimumab)(本利斯塔(Benlysta))、利妥昔单抗(Rituximab)(美罗华(Rituxan))、静脉内Ig或其组合组合使用。

[0335] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与免疫抑制剂组合用于治疗SLE。免疫抑制剂的实例包括但不限于硫唑嘌呤(依木兰(Imuran))、环磷酰胺(癌得星(Cytoxan))、环孢素、他克莫司及霉酚酸酯。

[0336] 在一个实施例中，本发明的抗CD40抗体或其抗原结合部分(例如Ab102)与抗凝血剂组合用于治疗SLE。抗凝血剂的实例包括但不限于阿司匹林(aspirin)、肝素、华法林(warfarin)及依诺肝素(exenatide)(拉福诺克斯(Lovenox))。

[0337] 优选额外治疗剂的其他实例可以与一种或多种CD40拮抗剂(例如抗CD40抗体或其片段)共投与和/或调配。此类组合可用于治疗如本文所阐述的CD40相关病症。可以与一或多种抗CD40抗体或其片段共投与和/或调配的治疗剂的额外实例包括以下中的一个或多个：尤其是TNF拮抗剂(例如TNF受体的可溶性片段，例如p55或p75人类TNF受体或其衍生物，例如75kD TNFR-IgG(75kD TNF受体-IgG融合蛋白，依那西普))；TNF酶拮抗剂，例如TNF转化酶(TACE)抑制剂；蕈毒碱受体拮抗剂；TGF- β 拮抗剂；干扰素 γ ；吡非尼酮；化学治疗剂，例如氨甲蝶呤、来氟米特或西罗莫司(雷帕霉素)或其类似物，例如CCI-779；COX2及cPLA2抑制剂；非类固醇消炎药(NSAID)；免疫调节剂；p38抑制剂、TPL-2、MK-2及NF κ B抑制剂。

[0338] 其他优选组合为抑制细胞因子的消炎药(CSAID)；其他人类细胞因子或生长因子以及这些细胞因子及生长因子的受体的抗体或拮抗剂，此类细胞因子及生长因子例如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21、IL-31、干扰素、EMAP-II、GM-CSF、FGF、EGF、PDGF及内皮素-1。本发明的抗体或其抗原结合部分可与细胞表面分子(诸如CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD90、CTLA)或其配体(包括CD154(gp39或CD40L))的抗体组合。

[0339] 治疗剂的优选组合可以干扰发炎级联反应中的不同点；优选实例包括TNF拮抗剂，如嵌合、人源化或人类TNF抗体、阿达木单抗(修美乐(HUMIRA)；D2E7；PCT公开案第WO 97/29131号)、CA2(瑞米凯德(REMICADE))、CDP 571及可溶性p55或p75TNF受体、其衍生物(p75TNFR1gG(依那西普)或p55TNFR1gG(来那西普(LENERCEPT)))以及TNF转化酶(TACE)抑制剂；类似地，出于相同原因，IL-1抑制剂(白介素-1转化酶抑制剂、IL-1RA等)可为有效的。其

他优选组合包括白介素4。

[0340] 可调整给药方案以提供最优所需反应(例如治疗或预防反应)。举例而言,可投与单一药团,可随时间投与若干分次剂量,或可依治疗情况的紧急性所指示按比例减少或增加剂量。就易投药性及剂量的均一性而言,将非经肠组合物调配成单位剂型尤其有利。如本文所用的单位剂型是指适合作为单一剂量用于待治疗的哺乳动物受试者的物理个别单元;各单元含有经计算可产生所需治疗效果的预定量之活性化合物与所需药物载体结合。本发明的单位剂型的规格由下列情况指定且直接视下列情况而定:(a)活性化合物的独特特征及欲达成的特定治疗或预防效果,及(b)混合此类活性化合物以治疗个体敏感性的技术中的固有限制。

[0341] 应注意,剂量值可随欲缓解的病状的类型及严重程度变化。此外应了解,对任何特定受试者而言,特定给药方案应根据受试者需要及投与组合物或监督组合物投与的人员的专业判断而随时调整,且本文所阐述的剂量范围仅为示意性的,且不意欲限制所要求的组合物的范畴或实践。

[0342] 在另一方面中,本申请的特征在于一种治疗(例如,治愈、阻抑、改善、延迟或预防发作或预防再现或复发)或预防受试者中CD40活性有害的病症的方法。该方法包括:以足以治疗或预防CD40相关病症的量向受试者投与CD40结合剂(尤其拮抗剂),例如本文所述的抗CD40抗体或其片段。CD40拮抗剂(例如抗CD40抗体或其片段)可单独或与如本文所述的其他治疗模式组合向受试者投与。

[0343] 在另一方面中,本申请提供一种用于活体外检测样品(例如,生物样品,诸如血清、血浆、组织、生检)中CD40的存在情况的方法。本发明方法可用于诊断病症,例如发炎性病症。该方法包括:(i)使样品或对照样品与如本文所述的抗CD40抗体或其片段接触;及(ii)检测在抗CD40抗体或其片段与样品或对照样品之间的复合物形成情况,其中样品相对于对照样品在复合物形成方面的统计学显著变化指示样品中CD40的存在情况。

[0344] 在又另一方面中,本申请提供一种用于活体内检测CD40的存在情况的方法(例如,在受试者中活体内成像)。本发明方法可用于诊断病症,例如CD40相关病症。该方法包括:(i)在允许抗体或片段与CD40结合的条件下,向个体或对照个体投与如本文所述的抗CD40抗体或其片段;及(ii)检测抗体或片段与CD40之间的复合物形成情况,其中个体相对于对照个体在复合物形成方面的统计学显著变化指示CD40的存在情况。

[0345] 置换Fc部分中的氨基酸残基以更改抗体效应功能为本领域中已知的(Winter等人的美国专利第5,648,260号;第5624821号)。抗体的Fc部分介导若干重要的效应功能,例如细胞因子诱导、ADCC、吞噬作用、补体依赖性细胞毒性(CDC)以及抗体及抗原-抗体复合物的半衰期/清除率。在一些情况下,这些效应功能为治疗性抗体所需的,但在其他情况下,视治疗目标而定,可能为不必要的或甚至有害的。某些人类IgG同种型,尤其IgG1及IgG3,分别经由结合至Fc γ R及补体C1q来介导ADCC及CDC。新生的Fc受体(FcRn)为决定抗体的循环半衰期的关键组分。在一实施例中,抗体恒定区(例如抗体的Fc区)中的至少一个氨基酸残基发生置换,使得抗体的效应功能更改。

[0346] 一个实施例提供一种经标记抗体或其抗原结合部分,其中本发明的抗体或抗体部分经衍生或与一或多个功能分子(例如,另一种肽或蛋白质)连接。举例而言,本发明的经标记抗体或其抗原结合部分可以借由将本发明的抗体或抗体部分(借由化学偶联、基因融合、

非共价结合或以其他方式)功能上连接至一种或多种其他分子实体来衍生,该一种或多种其他分子实体诸如另一种抗体(例如双特异性抗体或双功能抗体)、可检测试剂、药物制剂、可以介导抗体或抗体部分与另一种分子(诸如抗生蛋白链菌素核心区或聚组氨酸标签)的结合的蛋白质或肽和/或选自由以下组成的组的细胞毒性剂或治疗剂:有丝分裂抑制剂、抗肿瘤抗生素、免疫调节剂、基因疗法运载体、烷基化剂、抗血管生成剂、抗代谢产物、含硼剂、化学保护剂、激素、抗激素剂、皮质类固醇、光敏性治疗剂、寡核苷酸、放射性核素剂、拓扑异构酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、放射增敏剂及其组合。

[0347] 可适用于衍生化本发明的抗体或抗体部分的可检测试剂包括荧光化合物。例示性荧光可检测剂包括荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯、藻红素及其类似物。还可用可检测酶,诸如碱性磷酸酶、辣根过氧化酶、葡萄糖氧化酶及其类似者衍生化抗体。当抗体用可检测酶衍生化时,其是通过添加酶用于产生可检测反应产物的其他试剂来检测。举例而言,当存在可检测剂辣根过氧化酶时,添加过氧化氢及二氨基联苯胺产生可检测的着色反应产物。抗体还可用生物素衍生化,且经由抗生素蛋白或抗生蛋白链菌素结合的间接量测来检测。

[0348] 本发明的另一实施例提供一种结晶抗体或其抗原结合部分。优选地,本发明涉及如本文中所揭示的完整抗CD40抗体及其片段的晶体,包含此类晶体的调配物及组合物。在一个实施例中,结晶抗体或其抗原结合部分的活体内半衰期大于抗体或其抗原结合部分的可溶性对应物。在另一实施例中,抗体或其抗原结合部分在结晶之后保留生物活性。

[0349] 本发明的结晶抗体或其抗原结合部分可根据本领域中已知及如以引用的方式并入本文中的WO 02072636中所揭示的方法产生。

[0350] IV. 药物组合物

[0351] 本发明还提供药物组合物,其包含本发明的抗体或其抗原结合部分及药学上可接受的载体。

[0352] 本发明的药物组合物可包括“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明的抗体或抗体部分。“治疗有效量”是指在必需剂量下及在必需时间内可有效达成所需治疗结果的量。抗体或抗体部分的治疗有效量可由本领域中的熟练技术人员确定且可视以下因素而变化:诸如个体的疾病状态、年龄、性别及体重以及抗体或抗体部分在个体中引起所需反应的能力。治疗有效量还为抗体或抗体部分的治疗有益作用超过任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”是指在必需剂量下及在必需时间内,可有效达成所需预防结果的量。通常,由于预防剂量是在疾病之前或在疾病早期用于受试者,因此预防有效量将小于治疗有效量。

[0353] 包含本发明抗体的药物组合物是用于但不限于诊断、检测或监控病症;预防、治疗、管理或改善病症或其一种或多种症状;和/或研究。在一个特定实施例中,组合物包含一种或多种本发明抗体。在另一实施例中,药物组合物包含一种或多种本发明抗体及一种或多种除本发明抗体以外的用于治疗CD40活性有害的病症的预防剂或治疗剂。优选地,预防剂或治疗剂已知适用于或已用于或当前正用于预防、治疗、管理或改善病症或其一种或多种症状。根据这些实施例,组合物可进一步包含载体、稀释剂或赋形剂。

[0354] 本发明的抗体及抗体部分可并入适用于向受试者投与的药物组合物中。通常,药物组合物包含本发明的抗体或抗体部分及药学上可接受的载体。如本文所用,“药学上可接受的载体”包括生理学上兼容的任何及所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂及抗真菌剂、等

张剂及吸收延迟剂及其类似物。药学上可接受的载体的实例包括水、生理食盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇及其类似物中的一个或多个以及其组合。在许多情况下，在组合物中包括等张剂，例如糖、多元醇(诸如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠将为优选的。药学上可接受的载体可进一步包含极少量的辅助物质，诸如湿润剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂，其可增加抗体或抗体部分的存放期或有效性。

[0355] 已知各种传递系统且其可用于投与一或多种本发明抗体或一或多种本发明抗体与适用于预防、管理、治疗或改善病症或其一或多种症状的预防剂或治疗剂的组合，例如囊封于脂质体、微粒、微胶囊、能够表达抗体或抗体片段的重组细胞中；受体介导的内饮作用(参见例如Wu及Wu, J.Biol.Chem. 262: 4429-4432 (1987))；将核酸构建为反转录病毒或其他载体之一部分；等等。投与本发明的预防剂或治疗剂的方法包括但不限于非经肠投与(例如皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内及皮下)、硬膜外投与、瘤内投与及黏膜投与(例如鼻内及经口途径)。另外，还可使用肺部投药，例如使用吸入器或喷雾器，及用气雾剂调配。参见例如美国专利第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号及第4,880,078号；及PCT公开案第WO 92/19244号、第WO 97/32572号、第WO 97/44013号、第WO 98/31346号及第WO 99/66903号，其各自以全文引用的方式并入本文中。在一个实施例中，本发明抗体、组合疗法或本发明组合物使用Alkermes AIR经肺药物传递技术(Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.)投与。在一个特定实施例中，本发明的预防剂或治疗剂系肌肉内、静脉内、瘤内、经口、鼻内、经肺或皮下投与。预防剂或治疗剂可借由任何便利途径投与，例如借由输注或快速注射，借由经上皮或黏膜皮肤衬层(例如口腔黏膜、直肠及肠黏膜等)吸收，且可与其他生物活性剂一起投与。投药可为全身性或局部的。

[0356] 在一个特定实施例中，可能需要将本发明的预防剂或治疗剂局部投与至需要治疗的区域；此可借由例如但不限于局部输注、注射或借助于植入物来达成，该植入物为多孔或无孔材料，包括膜及基质，诸如硅橡胶膜(silastic membrane)、聚合物、纤维基质(例如TISSUEL)或胶原蛋白基质。在一个实施例中，将有效量的一种或多种本发明抗体拮抗剂局部投与至受试者的受侵袭区域，从而预防、治疗、管理和/或改善病症或其症状。在另一实施例中，将有效量的一种或多种本发明抗体与有效量的一种或多种除本发明抗体以外的疗法(例如，一种或多种预防剂或治疗剂)组合局部投与至受试者的受侵袭区域，从而预防、治疗、管理和/或改善病症或其一种或多种症状。

[0357] 在另一实施例中，本发明的预防剂或治疗剂可以在控制释放或持续释放系统中传递。在一个实施例中，可使用泵来达成控制释放或持续释放(参见Langer之前述文献；Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald等人, 1980, Surgery 88:507; Saudek等人, 1989, N Engl. J. Med. 321:574)。在另一实施例中，可使用聚合材料达成本发明疗法的控制释放或持续释放(参见例如, Medical Applications of Controlled Release, Langer及Wise(编), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen及Ball(编), Wiley, New York (1984); Ranger及Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; 还参见Levy等人, 1985, Science 228:190; During等人, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard等人, 1989, J. Neurosurg. 71:105)；美国专利第5,679,377号；美国专利第5,916,597号；美国

专利第5,912,015号;美国专利第5,989,463号;美国专利第5,128,326号;PCT公开案第W0 99/15154号;及PCT公开案第W0 99/20253号。用于持续释放调配物的聚合物的实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸2-羟基乙酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚(甲基丙烯酸)、聚乙交酯(PLG)、聚酸酐、聚(N-乙烯吡咯啶酮)、聚(乙烯醇)、聚丙烯酰胺、聚(乙二醇)、聚丙交脂(PLA)、聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)及聚原酸酯。在一个优选实施例中,用于持续释放调配物中的聚合物为惰性,不含可滤出杂质,储存稳定,无菌且生物可降解。在又另一实施例中,控释释放或持续释放系统可邻近预防或治疗目标置放,从而仅需要全身剂量的一部分(参见例如,Goodson, Medical Applications of Controlled Release,同前文献,第2卷,第115-138页(1984))。

[0358] 控制释放系统在Langer的综述(1990,Science 249:1527-1533)中有所论述。本领域中的熟练技术人员已知的任何技术皆可用于制造包含一种或多种本发明治疗剂的持续释放调配物。参见例如美国专利第4,526,938号;PCT公开案W0 91/05548;PCT公开案W0 96/20698;Ning等人,1996,“Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel”,Radiotherapy&Oncology 39:179-189;Song等人,1995,“Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions”,PDA Journal of Pharmaceutical Science&Technology 50:372-397;Cleek等人,1997,“Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application”,Pro.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.24:853-854;及Lam等人,1997,“Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery”,Proc.Int'l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.24:759-760,其各自以全文引用的方式并入本文中。

[0359] 在本发明组合物为编码预防剂或治疗剂的核酸的特定实施例中,可活体内投与核酸以促进其所编码的预防剂或治疗剂的表达,此借由将其构建为适当核酸表达载体的一部分且投与其,使得其变成细胞内,例如借由使用反转录病毒载体(参见美国专利第4,980,286号),或借由直接注射,或借由使用微粒轰击(例如,基因枪;Biolistic,Dupont),或用脂质或细胞表面受体或转染剂包覆包衣,或借由将其连同已知进入细胞核的同源盒样肽一起投与(参见,例如Joliot等人,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:1864-1868)。可替代地,核酸可借由同源重组引入细胞内且并入宿主细胞DNA内用于表达。

[0360] 将本发明的药物组合物调配成与其预期投与途径兼容。投与途径的实例包括但不限于非经肠,例如静脉内、皮内、皮下、经口、鼻内(例如吸入)、经皮(例如局部)、经黏膜及经直肠投与。在一个特定实施例中,组合物根据常规程序调配为适合于静脉内、皮下、肌肉内、经口、鼻内或局部投与给人类的药物组合物。通常,用于静脉内投与的组合物为于无菌等张水性缓冲剂中的溶液。必要时,组合物还可包括增溶剂及诸如利多卡因(lignocaine)的局部麻醉剂以减轻注射位点的疼痛。

[0361] 若本发明的组合物将局部投与,则此类组合物可以软膏、乳膏、经皮贴片、润肤液、凝胶、洗发精、喷雾、气雾剂、溶液、乳液的形式或本领域中的熟练技术人员熟知的其他形式调配。参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms,第19版,Mack Pub.Co.,Easton,Pa.(1995)。关于不可喷雾的局部剂型,通常采用包含与局部施用兼容的载体或一种或多种赋形剂且动态黏度优选大

于水的黏性至半固体或固体形式。适合调配物包括但不限于溶液、悬浮液、乳液、乳膏、软膏、散剂、擦剂、油膏及其类似者，必要时将其灭菌或与用于影响诸如渗透压的各种特性的助剂（例如防腐剂、稳定剂、湿润剂、缓冲剂或盐）混合。其他适合的局部剂型包括可喷雾的气雾剂制剂，其中优选与固体或液体惰性载体组合的活性成分与加压挥发性物质（例如气态推进剂，诸如氟氯烷（freon））混合封装或封装于挤压瓶中。必要时，还可向药物组合物及剂型中添加增湿剂或保湿剂。此类额外成分的实例为本领域中熟知的。

[0362] 若本发明方法包含鼻内投与组合物，则该组合物可调配成气雾剂形式、喷雾剂、薄雾或滴液形式。具体而言，根据本发明使用的预防剂或治疗剂宜借助于使用适合推进剂（例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他适合气体），以气雾剂喷雾呈现形式自加压包装或喷雾器传递。在加压气雾剂的情况下，剂量单位可借由提供可传递计量的量的阀来决定。可调配含有化合物与诸如乳糖或淀粉的适合粉末基质的粉末混合物的胶囊及药筒（由例如明胶构成）用于吸入器或吹入器中。

[0363] 若本发明方法包含经口投与，则组合物可调配为锭剂、胶囊、扁囊剂、胶囊锭、溶液、悬浮液及其类似者的口服形式。锭剂或胶囊可借由常规手段用药物学上可接受的赋形剂制备，此类赋形剂诸如黏合剂（例如，预胶凝化玉米淀粉、聚乙烯吡咯啶酮或羟丙基甲基纤维素）；填充剂（例如，乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙）；润滑剂（例如，硬脂酸镁、滑石或硅石）；崩解剂（例如，马铃薯淀粉或乙醇酸淀粉钠）或湿润剂（例如，月桂基硫酸钠）。锭剂可借由本领域中熟知的方法包覆。用于经口投与的液体制剂可呈但不限于溶液、糖浆或悬浮液形式，或其可呈现为干燥产品，在使用之前用水或其他适合媒剂复原。此类液体制剂可借由常规手段用药物学上可接受的添加剂制备，此类添加剂诸如悬浮剂（例如山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪）；乳化剂（例如卵磷脂或阿拉伯胶（acacia））；非水性媒剂（例如杏仁油、油性酯、乙醇或分馏植物油）；及防腐剂（例如，对羟基苯甲酸甲酯或丙酯或山梨酸）。此类制剂还可酌情含有缓冲盐、调味剂、着色剂及甜味剂。用于经口投与的制剂可经适当调配以缓慢释放、控制释放或持续释放预防剂或治疗剂。

[0364] 本发明方法可包含例如借由使用吸入器或喷雾器经肺投与与气雾剂一起调配的组合物。参见例如美国专利第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号及第4,880,078号；及PCT公开案第W0 92/19244号、第W0 97/32572号、第W0 97/44013号、第W0 98/31346号及第W0 99/66903号，其各自以全文引用的方式并入本文中。在一个特定实施例中，本发明抗体、组合疗法和/或本发明组合物使用Alkermes AIR经肺药物传递技术（Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.）投与。

[0365] 本发明方法可包含借由注射（例如借由快速注射或连续输注）投与经调配用于非经肠投与的组合物。注射用调配物可以添加有防腐剂的单位剂型（例如，于安瓿或多剂量容器中）呈现。组合物可采用诸如于油性或水性媒剂中的悬浮液、溶液或乳液的形式且可含有诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂的调配剂。可替代地，活性成分可呈在使用之前用适合媒剂（例如，无菌无热原质水）复原的粉末形式。

[0366] 本发明方法可另外包含投与调配为储槽式制剂的组合物。此类长效调配物可借由植入（例如，皮下或肌肉内）或借由肌肉内注射来投与。因此，举例而言，组合物可用适合的聚合或疏水性物质（例如，如于可接受的油中的乳液）或离子交换树脂或微溶衍生物（例如，

微溶盐)调配。

[0367] 本发明方法涵盖投与经调配为中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包括与阴离子形成的盐,诸如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐;及与阳离子形成的盐,诸如衍生自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因(procaine)等的盐。

[0368] 一般而言,组合物的成分单独提供或以单位剂型混合在一起,例如呈于标明活性剂的量的气密密封式容器(诸如安瓿或药囊)中的干燥冻干粉末或无水浓缩物形式。当投与模式为输注时,组合物可用含有无菌药物级水或生理食盐水的输注瓶分配。当投与模式为注射时,可提供一安瓿注射用无菌水或生理食盐水以使得可在投与之前混合成分。

[0369] 具体而言,本发明还规定,本发明的一种或多种预防剂或治疗剂或者药物组合物是封装于标明药剂的量的气密密封式容器(诸如安瓿或药囊)中。在一个实施例中,本发明的一种或多种预防剂或治疗剂或者药物组合物是以干燥无菌冻干粉末或无水浓缩物形式提供于气密密封式容器中且其可复原(例如用水或生理食盐水)至适当浓度以向受试者投与。优选地,本发明的一种或多种预防剂或治疗剂或药物组合物是以至少5mg、更优选至少10mg、至少15mg、至少25mg、至少35mg、至少45mg、至少50mg、至少75mg或至少100mg的单位剂量以干燥无菌冻干粉末形式提供于气密密封式容器中。本发明的冻干预防剂或治疗剂或药物组合物应在2°C至8°C下储存在其初始容器中,且本发明之预防剂或治疗剂或药物组合物应在复原后1周内、较佳5天内、72小时内、48小时内、24小时内、12小时内、6小时内、5小时内、3小时内或1小时内投与。在一个替代实施例中,本发明的一种或多种预防剂或治疗剂或药物组合物系以液体形式提供于标明药剂的数量及浓度的气密密封式容器中。优选地,液体形式的所投与组合物以至少0.25mg/ml、更优选至少0.5mg/ml、至少1mg/ml、至少2.5mg/ml、至少5mg/ml、至少8mg/ml、至少10mg/ml、至少15mg/kg、至少25mg/ml、至少50mg/ml、至少75mg/ml或至少100mg/ml提供于气密密封式容器中。液体形式应在2°C至8°C下储存在其初始容器中。

[0370] 本发明的抗体及抗体部分可并入适用于非经肠投与的药物组合物中。抗体或抗体部分优选将制备为含有0.1-250mg/ml抗体的可注射溶液。可注射溶液可由液体或冻干剂型构成,于燧石或琥珀小瓶、安瓿或预填充注射器中。缓冲剂可为L-组氨酸(1-50mM),最优选地5-10mM,pH 5.0至7.0(最优选pH 6.0)。其他适合缓冲剂包括但不限于琥珀酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠或磷酸钾。可使用浓度为0-300mM(对于液体剂型,最优选为150mM)的氯化钠来修改溶液的毒性。对于冻干剂型,可包括低温保护剂,主要为0-10%蔗糖(最优选为0.5%-1.0%)。其他适合的低温保护剂包括海藻糖及乳糖。对于冻干剂型,可包括膨化剂,主要为1%-10%甘露糖醇(最优选为2%-4%)。液体及冻干剂型中均可使用稳定剂,主要为1-50mM L-甲硫胺酸(最优选为5-10mM)。其他适合的膨化剂包括甘氨酸、精氨酸,可以0-0.05%聚山梨醇酯80(最优选为0.005%-0.01%)形式包括。其他界面活性剂包括但不限于聚山梨醇酯20及BRIJ界面活性剂。按用于非经肠投与的可注射溶液制备的包含本发明的抗体及抗体部分的药物组合物可以进一步包含适用作佐剂的试剂,诸如用于增大治疗蛋白(例如抗体)的吸收或分散的试剂。特别适用的佐剂为玻尿酸酶,诸如HYLENEX(重组人类玻尿酸酶)。在可注射溶液中添加玻尿酸酶改良非经肠投药、尤其皮下投药后的人类生物可用性。其还允许伴随较少疼痛及不适的较大注射部位体积(即大于1ml),且注射部位反应的发生率极小。

(参见WO 2004078140、US 2006104968,其以引用的方式并入本文中)。

[0371] 在一个实施例中,本发明包括一种药物组合物,其包含本发明抗体(例如抗体Ab102)、组氨酸及聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80)。在一个实施例中,本发明包括一种药物组合物,其包含抗体、组氨酸及聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯80),该抗体包含有包含SEQ ID NO:41的氨基酸的重链及包含SEQ ID NO:40的氨基酸的轻链。在某些实施例中,药物组合物经冻干。

[0372] 本发明的组合物可呈多种形式。这些形式包括(例如)液体、半固体及固体剂型,诸如液体溶液(例如,可注射溶液及可输注溶液)、分散液或悬浮液、锭剂、丸剂、散剂、脂质体及栓剂。优选形式视预期投药模式及治疗应用而定。典型的优选组合物呈可注射或可输注溶液的形式,诸如与用于使人类经其他抗体被动免疫的组合物类似的组合物。优选投药模式为非经肠(例如,静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)。在一个优选实施例中,借由静脉内输注或注射投与抗体。在另一优选实施例中,借由肌肉内或皮下注射投与抗体。

[0373] 治疗组合物通常必须无菌且在制造及储存条件下稳定。组合物可调配为溶液、微乳液、分散液、脂质体或适合于高药物浓度的其他有序结构。无菌可注射溶液可借由将所需量的活性化合物(即,抗体或抗体部分)与以上所列成分中的一者或组合一起并入适当溶剂中、随后视需要过滤灭菌来制备。一般而言,分散液是通过将活性化合物并入含有基本分散介质及来自以上所列成分的所需其他成分的无菌媒剂中来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌冻干粉末的情况下,优选制备方法为真空干燥及喷雾干燥,其得到活性成分加上来自先前经无菌过滤的活性成分溶液的任何其他所需成分的粉末。溶液的适当流动性可例如借由使用诸如卵磷脂的包衣、在分散液的情况下借由维持所需粒度及借由使用界面活性剂来维持。可注射组合物的延长吸收可借由在组合物中包括例如单硬脂酸盐及明胶的延迟吸收剂来达成。

[0374] 本发明的抗体及抗体部分可借由本领域中已知的各种方法投与,但对于许多治疗应用,优选投药途径/模式为皮下注射、静脉内注射或输注。如本领域中的熟练技术人员应了解,投药途径和/或模式将视所需结果而变化。在某些实施例中,活性化合物可用将保护化合物不会快速释放的载体制备,诸如控制释放调配物,包括植入物、经皮贴片及微囊封传递系统。可使用生物可降解的生物兼容性聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚碳酸、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。许多用于制备此类调配物的方法已获得专利或为本领域中的熟练技术人员所熟知。参见例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson编,Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0375] 在某些实施例中,本发明的抗体或抗体部分可与例如惰性稀释剂或可同化的可食用载体一起经口投与。该化合物(及视需要选用的其他成分)还可密封于硬壳或软壳明胶胶囊中,压缩成锭剂,或直接并入受试者的饮食中。对于经口治疗性投药,可将化合物与赋形剂合并且以可摄取锭剂、经颊锭剂、糖衣锭、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、粉片及其类似者的形式使用。为借由除非经肠投与以外的形式投与本发明的化合物,可能需要将该化合物用防止其失活的材料包覆或与防止其失活的材料共投与。

[0376] 在其他实施例中,本发明的抗体或抗体部分可结合至基于聚合物的物质,使得该基于聚合物的物质可以赋予本发明的该抗体或抗体部分足够的大小,使得本发明的该抗体或抗体部分可得益于增强的渗透及滞留效应(EPR效应)(还参见PCT公开案第WO 2006/

042146 A2号及美国公开案第2004/0028687 A1号、第2009/0285757 A1号及第2011/0217363 A1号及美国专利第7,695,719号(其各自出于所有目的以全文引用的方式并入本文中)。

[0377] 还可将补充活性化合物并入组合物中。在某些实施例中,本发明的抗体或抗体部分是与一种或多种适用于治疗CD40活性有害的病症的额外治疗剂一起调配和/或共投与。举例而言,本发明的抗hCD40抗体或抗体部分可与一种或多种结合其他目标的额外抗体(例如,结合细胞因子或结合细胞表面分子的抗体)一起调配和/或共投与。此外,本发明的一种或多种抗体可与以上治疗剂中的两者或两者以上组合使用。此类组合疗法宜采用较低的治疗剂投与剂量,从而避免与各种单一疗法相关的可能毒性或并发症。

[0378] 在某些实施例中,针对CD40的抗体或其片段是与本领域中已知的延长半衰期的媒剂相关。此类媒剂包括但不限于Fc域、聚乙二醇及聚葡萄糖。此类媒剂描述于例如美国申请第09/428,082号及公开的PCT申请第WO 99/25044号中,其出于任何目的以引用的方式并入本文中。

[0379] 在一个特定实施例中,借助于基因疗法,投与包含编码本发明抗体或本发明的另一预防剂或治疗剂的核苷酸序列的核酸序列来治疗、预防、管理或改善病症或其一种或多种症状。基因疗法是指借由向受试者投与已表达或可表达核酸进行的疗法。在本发明的此实施例中,核酸产生其所编码的本发明抗体或介导预防或治疗作用的预防剂或治疗剂。

[0380] 可根据本发明使用本领域中可得的任一种用于基因疗法的方法。关于基因疗法之方法的一般综述,参见Goldspiel等人,1993,Clinical Pharmacy 12:488-505;Wu及Wu,1991,Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev,1993,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596;Mulligan,Science 260:926-932(1993);及Morgan及Anderson,1993,Ann.Rev.Biochem.62:191-217;1993年5月,TIBTECH 11(5):155-215。重组DNA技术领域通常已知的可用方法描述于Ausubel等人(编),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons, NY(1993);及Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY(1990)中。基因疗法的各种方法的详细说明提供于US 20050042664 A1中,其以引用的方式并入本文中。

[0381] 本领域中的熟练技术人员将易于了解,本文所述的本发明方法的其他适合修改及改编显而易见且可在不脱离本发明或其中所揭示的实施例的范畴的情况下使用适合的等效物进行。现已详细描述了本发明,参考以下实例将更清楚理解本发明,此类实例仅出于说明的目的包括在内且不意欲限制本发明。

[0382] 实例

[0383] 实例1:拮抗性抗人类CD40(hCD40)单克隆抗体

[0384] 为鉴别CD40特异性拮抗性抗体,使用杂交瘤技术分离鼠类单克隆抗CD40抗体。

[0385] 简言之,用人类CD40抗原及佐剂使小鼠免疫。在免疫(其包括历时数周投与若干次抗原)之后,自各经免疫动物收集血清。随后使用标准ELISA及流式细胞术分析测试血清,以鉴别具有能够检测CD40的抗体的血清。在基于结合分析检测到在小鼠血清中存在CD40特异性抗体之后,收集小鼠脾脏且根据标准技术分离产抗体细胞。随后借由已知技术融合脾细胞,形成产抗体的骨髓瘤细胞。在融合之后,借由ELISA及流式细胞术筛选杂交瘤,以确定各种抗体CD40阻断及中和特征。

[0386] 在筛选之后,虽然大多数抗体经鉴别具有激动活性,但三种鼠单克隆抗体(Ab1、Ab2及Ab3)经鉴别对CD40具有拮抗活性,且基本上无激动活性。这三个鼠抗体的重链及轻链氨基酸序列描述于下表7至9中。可变重链(VH)及可变轻链(VL)内的CDR由粗体显示(分别为CDR1、CDR2及CDR3)。

[0387] 表7:鼠抗体1(Ab1)的VH及VL氨基酸序列

SEQ ID NO.	克隆名称	抗体区	残基说明	氨基酸序列	
5	Ab1	VH		EVQLVESGGGLVKPGGS LKVS C AASGFTFSDYGM NWVRQAPEKGLEWIAYI SSGRSNIYYADTVKG RF TISRDNAKNTLFLQMTSL RSEDTAMYYCARSWGY FDVWGTGTTVTVSS	
6	Ab1	CDR-H1	SEQ ID NO:5 的残基 26-35	GFTFSDYGMN	
7	Ab1	CDR-H2	SEQ ID NO:5 的残基 50-66	YISSGRSNIYYADTVKG	
8	Ab1	CDR-H3	SEQ ID NO:5 的残基 99-105	SWGYZFDV	
[0388]	9	Ab1	VL	DIVMTQSPSSLTVTAGEM VTMSCKSSQSLLNSGNQ KNYLTWFQQKPGQPPKL LIYWASTRESGVPDFRA GSGSGTDFTLTISSVQAE DLAVYYC QNDYTYPLTF GAGTKLEIK	
	10	Ab1	CDR-L1	SEQ ID NO:9 的残基 24-40	KSSQSLLNSGNQKNYLT
	11	Ab1	CDR-L2	SEQ ID NO:9 的残基 56-62	WASTRES
	12	Ab1	CDR-L3	SEQ ID NO:9 的残基 95-103	QNDYTYPLT

[0389] 表8:鼠抗体3(Ab3)的VH及VL氨基酸序列

SEQ ID NO.	克隆名称	抗体区	残基说明	氨基酸序列
44	Ab3	VH		QVQLQQSGAELARPGAS VKMSCKAFGYTFTSYT MHWVKQRPGQGLEWIG YINPSSDYPNQNQKFKD KATLTADKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYCARWG YSFDYWGQGTTLVSS
45	Ab3	CDR-H1	SEQ ID NO:44 的残基 26-35	GYTFTSYTMH
46	Ab3	CDR-H2	SEQ ID NO:44 的残基 50-66	YINPSSDYPNQNQKFKD
47	Ab3	CDR-H3	SEQ ID NO:44 的残基 99-105	WGYSFDY
48	Ab3	VL		DIVMTQAAPSVSVIPGES VSISCRSSKSLHSNGNT YLYWFLQRPGQSPQYLI YRMSTLASGVVPDRFSGS GSGTAFTLRISRVEAEDV GVYYCMQHLEYPLTFG AGTKLELK
49	Ab3	CDR-L1	SEQ ID NO:48 的残基 24-39	RSSKSLHSNGNTLY
50	Ab3	CDR-L2	SEQ ID NO:48 的残基 55-61	RMSTLAS
51	Ab3	CDR-L3	SEQ ID NO:48 的残基 94-102	MQHLEYPLT

[0391] 表9:鼠抗体2 (Ab2) 的VH及VL氨基酸序列

SEQ ID NO.	克隆名称	抗体区	残基说明	氨基酸序列
[0392]				

SEQ ID NO.	克隆名称	抗体区	残基说明	氨基酸序列
[0393]	75	Ab2	VH	EVQLVESGGGLVKG SLKVSCAASGFTFS GMNWVRQSPEKGLEW IAYISSGRGNIYYADT VKGRFTISRDNAKNTL FLQMTSLRSEDTAMYY CARSWGYFDVWGTGT TVTVSS
	6	Ab2	CDR-H1	SEQ ID NO:75 的 残基 26-35
	42	Ab2	CDR-H2	SEQ ID NO:75 的 残基 50-66
	8	Ab2	CDR-H3	SEQ ID NO:75 的 残基 99-105
	76	Ab2	VL V	DIVMTQSPSSLTVTAGE KVTMSCKSSQSLLNSG NQKNYLTWFQQKPGQ PPKLLIYWASTRESGV PDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYYCQN DYTYPLTFGAGTKLELK
	10	Ab2	CDR-L1	SEQ ID NO:76 的 残基 24-40
	11	Ab2	CDR-L2	SEQ ID NO:76 的 残基 56-62
	12	Ab2	CDR-L3	SEQ ID NO:76 的 残基 95-103

[0394] 来自三种抗CD40拮抗性鼠单克隆抗体 (Ab1、Ab2及Ab3) 的CDR区的共有序列经鉴别且提供于上文表5中。这三种鼠抗体的可变区氨基酸序列的比对还提供于图4A(轻链) 及图4B(重链) 中。

[0395] 使用反转录酶-PCR (RT-PCR) 克隆三种抗体的鼠重链及轻链可变区 (VH及VL)。随后将这些VH及VL区 (上文表7至9中所述) 克隆至包含人类免疫球蛋白 (Ig) 恒定区的运载体中, 且随后在哺乳动物宿主细胞中表达为嵌合抗体。随后使用活体外分析表征这些人类嵌合抗体 (人类恒定区及鼠类可变区), 以各自判定其是否具有拮抗和/或激动作用。

[0396] 使用FACS分析判定三种嵌合抗CD40抗体是否可以结合人类胎肾 (HEK) 细胞上表达

的huCD40或cyno CD40。虽然三种嵌合抗体各自可结合HEK细胞上表达的人类CD40,但此类嵌合抗体中仅两者识别cyno,嵌合抗体3(chAb3)不结合至cyno CD40。FACS结合研究的结果概述于表10中。

[0397] FACS分析还用于判定三种嵌合抗体是否可抑制可溶性CD40配体(sCD40L)与CD40的结合。使用表达CD40的HEK细胞,量测IC50值。如表10中所述,嵌合抗体各自能够阻断CD40结合至其配体。

[0398] 除结合分析之外,还使用与NFkB介导的碱性磷酸酶(AP)相关的表达CD40的报导细胞系表达人类CD40来量测拮抗活性及激动活性。在表达CD40的报导细胞系分析中,当经由CD40接收到信号时,NFkB活化导致AP的分泌,其借由比色底物来量测。为测定拮抗活性,将CD40报导细胞系(HEK)与表达CD40L的Jurkat细胞系一起培养(以提供生理配体相互作用)或与可溶性CD40L(例如,表10中所提及的His-CD40L)一起培养。量测抗CD40抗体阻断NFkB信号的能力。为量测激动活性,直接用抗CD40抗体处理人类CD40报导细胞系且量测NFkB信号。三种嵌合抗体的代表性CD40拮抗性及激动性分析资料概述于表10及图1A及图1B中。

[0399] 表10:抗CD40嵌合抗体的功能特征的概述

	嵌合 CD40 抗体 (hCg1- LALA)	HEK huCD40 FACS 结合	HEK cyCD40 FACS 结合	HEK CD40 FACS 阻断 IC50 nM	激动性: HEK huCD40 报 道基因分析	拮抗性: His-CD40L 报道基因 分析 IC50 nM	拮抗性: Jurkat/报道 基因分析 IC50 nM
[0400]	嵌合 Ab1 (chAb1)	是	是	2.3	否	0.4	51
	嵌合 Ab3 (chAb3)	是	否	1.4	否	0.2	0.9
	嵌合 Ab2 (chAb2)	是	是	1.4	否	0.3	3.4

[0401] 如表10及图1中所述,抗CD40嵌合抗体显示出拮抗活性,且无可检测的激动活性。基于以上实验的结果,选择抗CD40拮抗性抗体Ab1及Ab3的重链及轻链可变区进行人源化。

[0402] 实例2:拮抗性抗CD40抗体Ab1及Ab3的人源化

[0403] 拮抗性抗CD40抗体Ab1的人源化

[0404] 基于Ab1的可变重链(VH)及可变轻链(VL)CDR序列产生人源化抗体。具体而言,选择人类种系序列来构建CDR移植的人源化Ab1抗体,其中Ab1的VH及VL链的CDR域被移植至不同的人类重链及轻链受体序列上。基于与单克隆抗体Ab1的VH及VL序列的比对,选择以下人类序列作为受体:

[0405] 1.IGHV3-21*01及IGHJ6*01,用于构建重链受体序列

[0406] 2.IGHV3-48*01及IGHJ6*01,作为用于构建重链的替代受体

[0407] 3.IGKV4-1*01及IGKJ2*01,用于构建轻链受体序列

[0408] 4.IGKV2-40*01及IGKJ2*01,作为用于构建轻链的替代受体

[0409] 随后借由将Ab1的相应VH及VL CDR移植至以上1-4中所述的受体序列中制备CDR移植抗体。

[0410] 为产生具有框架回复突变的人源化抗体,鉴别框架突变且将其引入CDR移植抗体中。这些突变使用标准技术引入,包括在聚合酶链反应中从头合成含回复突变及突变诱发寡核苷酸引物的可变域。针对CDR移植抗体(含有抗体Ab1的CDR)中的每一者,如下构建回复突变与其他突变的不同组合。(注意:下文所提及的突变的残基编号是基于Kabat编号系统。)

[0411] 关于CDR移植抗体的重链,使以下游标残基及VH/VL介接残基中的一个或多个发生回复突变:V48I和/或S49A。

[0412] 关于CDR移植抗体的轻链,使以下游标残基及VH/VL介接残基发生回复突变:Y36F。

[0413] 衍生自鼠单克隆Ab1的人源化抗体的可变区的说明提供如下:

[0414] • 人源化Ab1 (huAb1VH.1) 为含有IGHV3-21*01及IGHJ6*01框架序列的CDR移植的Ab1VH;

[0415] • 人源化Ab1VH.1a (huAb1VH.1A) 为包含huAb1VH.1的氨基酸序列与以下两个框架回复突变的人源化重链:V48I、S49A;

[0416] • 人源化Ab1VL.1 (huAb1VL.1) 为含有IGKV4-1*01及IGKJ2*01框架序列的CDR移植的Ab1VL;

[0417] • 人源化Ab1VL.1a (huAb1VL.1A) 为基于huAb1VL.1的人源化轻链且含有1个所提出的框架回复突变:Y36F。

[0418] 注意:IGHV3-21_IGHJ6是指包含对应于IGHV3-21*01及IGHJ6*01的可变序列的抗体。

[0419] 随后将人源化可变区克隆至IgG表达运载体中以便基于以下重链及轻链可变区组合对四种不同人源化抗体进行功能表征:

[0420] A.huAb1VH.1/VL.1

[0421] B.huAb1VH.1A/VL.1

[0422] C.huAb1VH.1/VL.1A

[0423] D.huAb1VH.1A/VL.1A

[0424] 以上人源化抗体的可变区及CDR氨基酸序列描述于下表11中。

[0425] 表11:人源化版本的抗体1(huAb1)的VH及VL序列

SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列
[0426]	13 huAb1VH.1/VL.1	VH		EVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAASGFT FSDYGMNWVRQAP GKGLEWVSY ISSGR SNIYYADTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCA RSGYFDVGQGT TTVSS
	6 huAb1VH.1/VL.1	CDR-H1	SEQ ID NO:13 的 残基 26-35	GFTFSDYGMN
	7 huAb1VH.1/VL.1	CDR-H2	SEQ ID NO:13 的 残基 50-66	YISSGRSNIYYADT VKG
	8 huAb1VH.1/VL.1	CDR-H3	SEQ ID NO:13 的 残基 99-105	SWGYZFDV
	14 huAb1VH.1/VL .1 VL	VL		DIVMTQSPDSLAVS LGERATINCKSSQSL LNSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYW ASTRESGPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYC QNDY TYPLTFGQGTKLEI K
	10 huAb1VH.1/VL.1	CDR-L1	SEQ ID NO:14 的 残基 24-40	KSSQSLLNSGNQK NYLT
	11 huAb1VH.1/VL.1	CDR-L2	SEQ ID NO:14 的 残基 56-62	WASTRES

SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列
[0427]	12	huAb1VH.1/VL.1	CDR-L3	SEQ ID NO:14 的 QNDYTYPLT 残基 95-103
	15	huAb1VH.1A/V L.1VH	VH	EVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAASGFT FSDYGMNWVRQAP GKGLEWIAYISSGR SNIYYADTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCA RSGYFDVGQGT TTVSS
	6	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-H1	SEQ ID NO:15 的 残基 26-35
	7	huAb1VH.1A/VL. 1	CDR-H2	SEQ ID NO:15 的 残基 50-66
	8	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-H3	SEQ ID NO:15 的 残基 99-105
	14	huAb1VH.1A/V L.1 VL	VL	DIVMTQSPDSLAVS LGERATINCKSSQSL LNSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDFRFS SGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYC QNDY TYPLTFGQGTKLEIK
	10	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L1	SEQ ID NO:14 的 残基 24-40
	11	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L2	SEQ ID NO:14 的 残基 56-62
	12	huAb1VH.1A/VL.1	CDR-L3	SEQ ID NO:14 的 QNDYTYPLT 残基 95-103

SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列
13	huAb1VH.1/VL.1A VH	VH		EVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAASGFT FSDYGMNWVRQAP GKGLEWVSYISSGR SNIYYADTVKGRFT ISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCA RSGYFDVGQGT TVTVSS
6	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H1	SEQ ID NO:13 的 残基 26-35	GFTFSDYGMN
7	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H2	SEQ ID NO:13 的 残基 50-66	YISSGRSNIYYADTVKG
[0428]	8 huAb1VH.1/VL.1A	CDR-H3	SEQ ID NO:13 的 残基 99-105	SWGYFDV
16	huAb1VH.1/VL.1A VL	VL		DIVMTQSPDSLAVS LGERATINCKSSQSL LNSGNQKNYLTWF QQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDFRFS SGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQNDY TYPLTFGQGTKLEIK
10	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L1	SEQ ID NO:16 的 残基 24-40	KSSQSLLNSGNQKNYLT
11	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L2	SEQ ID NO:16 的 残基 56-62	WASTRES
12	huAb1VH.1/VL.1A	CDR-L3	SEQ ID NO:16 的 残基 95-103	QNDYTYPLT

SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列
15	huAb1VH.1A/VL.1 A VH	VH		EVQLVESGGGLVKP GGSLRLSCAASGFT FSDYGMNWVRQAP GKGLEWIAVISSGR SNIYYADTVKGRTF ISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCA RSWGYFDVWGQGT TVTVSS
6	huAb1VH.1A/VL.1 A	CDR-H1	SEQ ID NO:15 的 残基 26-35	GFTFSDYGMN
7	huAb1VH.1A/VL.1 A	CDR-H2	SEQ ID NO:15 的 残基 50-66	YISSLGRSNIYYADTVKG
[0429]	8 huAb1VH.1A/VL.1 A	CDR-H3	SEQ ID NO:15 的 残基 99-105	SWGYFDV
16	huAb1VH.1A/VL.1 A VL	VL		DIVMTQSPDSLAVS LGERATINCKSSQSL LNSGNQKNYLTWF QQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDFRSG SGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQNDY TYPLTFGQGTKLEIK
10	huAb1VH.1A/VL.1 A	CDR-L1	SEQ ID NO:16 的 残基 24-40	KSSQSLLNSGNQKNYLT
11	huAb1VH.1A/VL.1 A	CDR-L2	SEQ ID NO:16 的 残基 56-62	WASTRES
12	huAb1VH.1A/VL.1 A	CDR-L3	SEQ ID NO:16 的 残基 95-103	QNDYTYPLT

[0430] 如上所述,Ab1的VH及VL区的人源化版本的CDR与鼠Ab1抗体相同。

[0431] 拮抗性抗CD40抗体3 (Ab3) 的人源化

[0432] 还基于Ab3的可变重链(VH) 及可变轻链(VL) CDR序列产生人源化抗体。选择人类种系序列来构建CDR移植的人源化Ab3抗体,其中Ab3的VH及VL链的CDR域被移植至不同的人类重链及轻链受体序列上。基于与单克隆抗体Ab3的VH及VL序列的比对,选择以下人类序列作为受体:

[0433] 1.IGHV3-69*01及IGHJ6*06,用于构建重链受体序列

- [0434] 2. IGHV1-18*01及IGHJ6*01,作为用于构建重链的替代受体
- [0435] 3. IGKV2-29*02及IGKJ2*01,用于构建轻链受体序列
- [0436] 4. IGKV2-28*01及IGKJ2*01,作为用于构建轻链的替代受体
- [0437] 随后借由将Ab3的相应VH及VL CDR移植至以上1-4中所述的受体序列中制备CDR移植抗体。
- [0438] 为产生含框架回复突变的人源化抗体,鉴别多种框架突变且将其引入CDR移植抗体中。这些突变使用标准技术引入,包括在聚合酶链反应中从头合成含回复突变及突变诱发寡核苷酸引物的可变域。针对CDR移植抗体(含有抗体Ab3的CDR)中的每一者,构建突变(包括回复突变)的不同组合。(注意:下文所提及的突变的残基编号是基于Kabat编号系统。)
- [0439] 关于重链Ab3,使以下游标残基及VH/VL介接残基中的一个或多个发生回复突变:M48I、V67A、I69L。此外,考虑变为Q1E。引入Q1E突变是为防止形成焦谷氨酸盐。
- [0440] 关于轻链Ab3,使以下游标残基及VH/VL介接残基中的一个或多个发生回复突变:Y36F、L46Y。
- [0441] 衍生自鼠单克隆Ab3的人源化抗体的可变区的说明提供如下:
- [0442] • huAb3VH.1z为含有IGHV1-69*06及IGHJ6*01框架序列的CDR移植的人源化Ab3VH。
- [0443] • huAb3VH.1是基于huAb3VH.1z,含Q1E改变以防止形成焦谷氨酸盐。
- [0444] • huAb3VH.1A为基于huAb3VH.1的人源化设计且含有3个额外的构架回复突变:M48I、V67A、I69L。
- [0445] • huAb3VH.1b为介于huAb3VH.1与huAb3VH.1A之间的中间设计且含有1个所提出的框架回复突变:I69L。
- [0446] • huAb3VL.1为含有IGKV2-28*01及IGKJ2*01框架序列的CDR移植的人源化Ab3VL。
- [0447] • huAb3VL.1A为基于huAb3VL.1的人源化设计且含有2个框架回复突变:Y36F、L46Y。
- [0448] • huAb3VL.1B为介于huAb3VL.1与huAb3VL.1A之间的中间设计。其含有1个所提出的框架回复突变:L46Y。
- [0449] 还应注意:IGHV1-69_IGHJ6由IGHV1-69*06及IGHJ6*01种系序列组成。
- [0450] 随后将人源化可变区克隆至IgG表达运载体中以便基于以下重链及轻链可变区组合对九种不同人源化抗体进行功能表征:
- [0451] A.huAb3VH.1/VL.1
- [0452] B.huAb3VH.1B/VL.1
- [0453] C.huAb3VH.1A/VL.1
- [0454] D.huAb3VH.1/VL.1A
- [0455] E.huAb3VH.1B/VL.1A
- [0456] F.huAb3VH.1A/VL.1A
- [0457] G.huAb3VH.1/VL.1B
- [0458] H.huAb3VH.1B/VL.1B

[0459] I.huAb3VH.1A/VL.1B

[0460] 以上人源化抗体的可变区及CDR氨基酸序列描述于下表12中。

[0461] 表12. 人源化Ab3抗体的VH及VL区的氨基酸序列

SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列
[0462]	52 huAb3VH.1/VL.1	VH		EVQLVQSGAEVKPG SSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQG LEWMGYINPSSDYPN YNQKFKDRVTITADK STSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYSFD YWGQGTTVTVSS
	45 huAb3VH.1/VL.1	CDR-H1	SEQ ID NO:52 的 残基 26-35	GYTFTSYTMH
	46 huAb3VH.1/VL.1	CDR-H2	SEQ ID NO:52 的 残基 50-66	YINPSSDYPN Y NQKF KD
	47 huAb3VH.1/VL.1	CDR-H3	SEQ ID NO:52 的 残基 99-105	WGYSFDY
[0463]	53 huAb3VH.1/VL.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPG EPASISCRSSKSLLHS NGNTYLYWYLQKPG QSPQLLIYRMSTLAS GVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVY YCMQHLEYPLTFGQ GTKLEIK
	49 huAb3VH.1/VL.1	CDR-L1	SEQ ID NO:53 的 残基 24-39	RSSKSLLHSNGNTYL Y

SEQ ID NO:	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列
[0464]	50	huAb3VH.1/VL.1	CDR-L2 SEQ ID NO:53 的 残基 55-61	RMSTLAS
	51	huAb3VH.1/VL.1	CDR-L3 SEQ ID NO:53 的 残基 94-102	MQHLEYPLT
	54	huAb3VH.1B/VL.1	VH	EVQLVQSGAEVKPG SSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQG LEWMGYINPSSDYPN YNQKFKDRVTLTAD KSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARWGYSF DYWGQGTTVTVSS
	45	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-H1 SEQ ID NO:54 的 残基 26-35	GYTFTSYTMH
	46	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-H2 SEQ ID NO:54 的 残基 50-66	YINPSSDYPNQKF KD
	47	huAb3VH.1B/VL.1	CDR-H3 SEQ ID NO:54 的 残基 99-105	WGYSFDY
[0465]				

				DIVMTQSPLSLPVTPG EPASISCRSSKSLLHS NGNTYLYWYLQKPG QSPQLLIYRMSTLASG VPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPLTFGQGT KLEIK
53	huAb3VH.1B/VL. 1	VL		
49	huAb3VH.1B/V L.1	CDR-L1	SEQ ID NO:53 的 残基 24-39	RSSKSLLHSNGNTYL Y
50	huAb3VH.1B/V L.1	CDR-L2	SEQ ID NO:53 的 残基 55-61	RMSTLAS
51	huAb3VH.1B/V L.1	CDR-L3	SEQ ID NO:53 的 残基 94-102	MQHLEYPLT
[0466]	huAb3VH.1A/V L.1	VH		EVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQG LEWIGYINPSSDYPNY NQKFKDRATLTADKS TSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARWGYSFDY WGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1A/V L.1	CDR-H1	SEQ ID NO:55 的 残基 26-35	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1A/V L.1	CDR-H2	SEQ ID NO:55 的 残基 50-66	YINPSSDYPNYNQKF KD
47	huAb3VH.1A/V L.1	CDR-H3	SEQ ID NO:55 的 残基 99-105	WGYSFDY
53	huAb3VH.1A/V L.1	VL		DIVMTQSPLSLPVTPG EPASISCRSSKSLLHS NGNTYLYWYLQKPG QSPQLLIYRMSTLASG VPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYC MQHLEYPLTFGQGT KLEIK

SEQ ID NO:	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列
49	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-L1	SEQ ID NO:53 的 残基 24-39	RSSKSLLHSNGNTYL Y
50	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-L2	SEQ ID NO:53 的 残基 55-61	RMSTLAS
51	huAb3VH.1A/VL.1	CDR-L3	SEQ ID NO:53 的 残基 94-102	MQHLEYPLT
52	huAb3VH.1/VL.1A	VL		EVQLVQSGAEVKPG SSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQG LEWMGYINPSSDYPN YNQKFKDRVTTADK STSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYSFD YWGQGTTVTVSS
[0467]	45 huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H1	SEQ ID NO:52 的 残基 26-35	GYTFTSYTMH
	46 huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H2	SEQ ID NO:52 的 残基 50-66	YINPSSDYPNQNQKF KD
	47 huAb3VH.1/VL.1A	CDR-H3	SEQ ID NO:52 的 残基 99-105	WGYSFDY
	56 huAb3VH.1/VL.1A	VL		DIVMTQSPLSLPVTPG EPASISCRSSKSLLHS NGNTYLYWFLQKPG QSPQYLIYRMSTLAS GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPLTFGQG TKLEIK
	49 huAb3VH.1/VL.1A	CDR-L1	SEQ ID NO:56 的 残基 24-39	RSSKSLLHSNGNTYL Y
50	huAb3VH.1/VL.1A	CDR-L2	SEQ ID NO:56 的 残基 55-61	RMSTLAS

SEQ ID NO:	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列
51	huAb3VH.1/VL .1A	CDR-L3	SEQ ID NO:56 的 MQHLEYPLT 残基 94-102	
54	huAb3VH.1B/VL.1 A	VH		EVQLVQSGAEVKPG SSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQG LEWMGYINPSSDYPN YNQKFKDRVTLTAD KSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARWGYSF DYWGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1B/VL.1 A	CDR-H1	SEQ ID NO:54 的 GYTFTSYTMH 残基 26-35	
46	huAb3VH.1B/VL.1 A	CDR-H2	SEQ ID NO:54 的 YINPSSDYPN YQKF KD 残基 50-66	
47	huAb3VH.1B/VL.1 A	CDR-H3	SEQ ID NO:54 的 WGYSFDY 残基 99-105	
[0468]	56 huAb3VH.1B/VL.1 A	VL		DIVMTQSPLSLPVTPG EPASISC RSSKSLLHS NGNTYLYWFLQKPG QSPQYLIYRMSTLAS GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPLTFGQQG TKLEIK
49	huAb3VH.1B/VL.1 A	CDR-L1	SEQ ID NO:56 的 RSSKSLLHS NGNTYLY 残基 24-39	
50	huAb3VH.1B/VL.1 A	CDR-L2	SEQ ID NO:56 的 RMSTLAS 残基 55-61	
51	huAb3VH.1B/VL.1 A	CDR-L3	SEQ ID NO:56 的 MQHLEYPLT 残基 94-102	

	55	huAb3VH.1A/VL.1 A	VH	EVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQG LEWIGYINPSSDYPNY NQKFKDRATLTADKS TSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARWGYSFDY WGQGTTVTVSS
[0469]	45	huAb3VH.1A/VL.1 A	CDR-H1	SEQ ID NO:55 的 GYTFTSYTMH 残基 26-35
	46	huAb3VH.1A/VL.1 A	CDR-H2	SEQ ID NO:55 的 YINPSSDYPNYNQKF 残基 50-66
	47	huAb3VH.1A/VL.1 A	CDR-H3	SEQ ID NO:55 的 WGYSFDY 残基 99-105
	56	huAb3VH.1A/VL.1 A	VL	DIVMTQSPLSLPVTPG EPASISCRSSKSLLHS NGNTYLYWFLQKPG QSPQYLIYRMSTLAS GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPLTFGQG TKLEIK
	49	huAb3VH.1A/VL.1 A	CDR-L1	SEQ ID NO:56 的 RSSKSLLHSNGNTYL 残基 24-39
	50	huAb37VH.1A/VL. 1A	CDR-L2	SEQ ID NO:56 的 RMSTLAS 残基 55-61
	51	huAb3VH.1A/VL.1 A	CDR-L3	SEQ ID NO:56 的 MQHLEYPLT 残基 94-102
	52	huAb3VH.1/VL. .1B	VH	EVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQG LEWMGYINPSSDYPN YNQKFKDRVITADK STSTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGYSFD YWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列
45	huAb3VH.1/VL .1B	CDR-H1	SEQ ID NO:52 的 残基 26-35	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1/VL .1B	CDR-H2	SEQ ID NO:52 的 残基 50-66	YINPSSDYPNQNQKF KD
47	huAb3VH.1/VL .1B	CDR-H3	SEQ ID NO:52 的 残基 99-105	WGYSFDY
57	huAb3VH.1/VL .1B	VL		DIVMTQSPLSLPVTPG EPASISCRSSKSLLHS NGNTYLYWYLQKPG QSPQYLIYRMSTLAS GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPLTFGQG TKLEIK
49	huAb3VH.1/VL .1B	CDR-L1	SEQ ID NO:57 的 残基 24-39	RSSKSLLHSNGNTYL Y
[0470]	50 huAb3VH.1/VL .1B	CDR-L2	SEQ ID NO:57 的 残基 55-61	RMSTLAS
	51 huAb3VH.1/VL .1B	CDR-L3	SEQ ID NO:57 的 残基 94-102	MQHLEYPLT
	54 huAb3VH.1B/VL.1 B	VH		EVQLVQSGAEVKPG SSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQG LEWMGYINPSSDYPN YNQKFKDRVTLTAD KSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCAR WGYSF DYWGQGTTVTVSS
45	huAb3VH.1B/VL.1 B	CDR-H1	SEQ ID NO:54 的 残基 26-35	GYTFTSYTMH
46	huAb3VH.1B/VL.1 B	CDR-H2	SEQ ID NO:54 的 残基 50-66	YINPSSDYPNQNQKF KD

47	huAb3VH.1B/VL.1 B	CDR-H3	SEQ ID NO:54 的 WGYSFDY 残基 99-105	
57	huAb3VH.1B/VL.1 B	VL	DIVMTQSPLSLPVTPG EPASISCRSSKSLLHS NGNTYLYWYLQKPG QSPQYLIYRMSTLAS GVPDRFSGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPLTFGQG TKLEIK	
49	huAb3VH.1B/VL.1 B	CDR-L1	SEQ ID NO:57 的 RSSKSLLHSNGNTYL 残基 24-39	Y
50	huAb3VH.1B/VL.1 B	CDR-L2	SEQ ID NO:57 的 RMSTLAS 残基 55-61	
[0471]	huAb3VH.1B/VL.1 B	CDR-L3	SEQ ID NO:57 的 MQHLEYPLT 残基 94-102	
55	huAb3VH.1A/VL.1 B	VH	EVQLVQSGAEVKKPG SSVKVSCKASGYTFT SYTMHWVRQAPGQG LEWIGYINPSSDYPNY NQKFKDRAATLTADKS TSTA YMELSSLRSEDT AVYYCARWGYSFDY WGQGTTVTVSS	
45	huAb3VH.1A/VL.1 B	CDR-H1	SEQ ID NO:55 的 GYTFTSYTMH 残基 26-35	
46	huAb3VH.1A/VL.1 B	CDR-H2	SEQ ID NO:55 的 YINPSSDYPNQNQKF 残基 50-66	KD
47	huAb3VH.1A/VL.1 B	CDR-H3	SEQ ID NO:55 的 WGYSFDY 残基 99-105	

	57	huAb3VH.1A/VL.1 B	VL	DIVMTQSPLSLPVTPG EPASISCRSSKSLLHS NGNTYLYWYLQKPG QSPQYLIYRMSTLAS GVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYY CMQHLEYPLTFGQQ TKLEIK
[0472]	49	huAb3VH.1A/VL.1 B	CDR-L1	SEQ ID NO:57 的 RSSKSLLHSNGNTYL 残基 24-39
	50	huAb3VH.1A/VL. 1B	CDR-L2	SEQ ID NO:57 的 RMSTLAS 残基 55-61
	51	huAb3VH.1A/VL.1 B	CDR-L3	SEQ ID NO:57 的 MQHLEYPLT 残基 94-102

[0473] 如上所述,Ab3的VH及VL区的人源化版本的CDR与鼠Ab3抗体相同。

[0474] 因为Ab3不结合至cyno CD40(参见实例1),所以选择Ab1的人源化版本进行进一步分析。

[0475] 实例3:人源化Ab1抗体的VL CDR1的修饰

[0476] 检查上述人源化Ab1VH及VL抗体序列,鉴别暴露于轻链CDR1中的潜在脱酰胺序列基序(“NS”基序)。所鉴别的“NS”基序位点会引起脱酰胺及水解,且产生丁二酰亚胺中间体及天冬氨酰基-ASP或异ASP。因此,该序列基序是由人源化Ab1 VL CDR1序列工程改造所得。移除“NS”基序将促使抗体制造改良。

[0477] 进一步工程改造人源化Ab1,产生六种不同抗体。值得注意地是,四种保留拮抗活性,而两种变成激动性抗体(huAb1v4及huAb1v3)。如表14中所示,huAb1v4及huAb1v3显示激动活性,如借由huCD40报道基因分析所测定;同时不呈现拮抗活性,如在Jurkat/报道基因分析中所测定。变异的人源化Ab1抗体(huAb1v1至huAb1v6)的VH及VL氨基酸序列以及CDR描述于下表13中。

[0478] 表13. 人源化Ab1抗体变体(huAb1v#) VH及VL氨基酸序列

	SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列
[0479]					

SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列	
13	huAb1v3	VH		EVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFSYDG MNWVRQAPGKGLEWV SYISSGRSNIYYADTVK GRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVVGQGTTVT VSS	
6	huAb1v3	CDR-H1	SEQ ID NO:13 的 残基 26-35	GFTFSYGMN	
7	huAb1v3	CDR-H2	SEQ ID NO:13 的 残基 50-66	YISSLGRSNIYYADTVKG	
[0480]	8	huAb1v3	CDR-H3	SEQ ID NO:13 的 残基 99-105	SWGYFDV
43	huAb1v3	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSLLNLGN QKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYC QNDYTYP LTFGQGTKLEIK	
17	huAb1v3	CDR-L1	SEQ ID NO:43 的 残基 24-40	KSSQSLLNLGNQKNYL T	
11	huAb1v3	CDR-L2	SEQ ID NO:43 的 残基 56-62	WASTRES	
12	huAb1v3	CDR-L3	SEQ ID NO:43 的 残基 95-103	QNDYTYP PLT	

SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列	
15	huAb1v4	VH		EVQLVESGGGLVVKPGG SLRLSCAASGFTFSDYGMN MNWVRQAPGKGLEWI AYISSGRSNIYYADTVK GRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVVGQGTTVT VSS	
6	huAb1v4	CDR-H1	SEQ ID NO:15 的 残基 26-35	GFTFSDYGMN	
7	huAb1v4	CDR-H2	SEQ ID NO:15 的 残基 50-66	YISSGRSNIYYADTVKG	
[0481]	8	huAb1v4	CDR-H3	SEQ ID NO:15 的 残基 99-105	SWGYFDV
77	huAb1v4	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSLLNPGN QKNYLTFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDF FSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYCQNDYTYP LTFGQGTKLEIK	
74	huAb1v4	CDR-L1	SEQ ID NO:77 的 残基 24-40	KSSQSLLNPGNQKNYL T	
11	huAb1v4	CDR-L2	SEQ ID NO:77 的 残基 56-62	WASTRES	
12	huAb1v4	CDR-L3	SEQ ID NO:77 的 残基 95-103	QNDYTYPPLT	

SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列	
15	huAb1v5	VH		EVQLVESGGGLVKP G SLRLSCAASGFTFS DYG MNWVRQAPGKGLEWI AYISSGRSNIYYADTVK GRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVVGQGTTVT VSS	
6	huAb1v5	CDR-H1	SEQ ID NO:15 的 残基 26-35	GFTFSDYGMN	
7	huAb1v5	CDR-H2	SEQ ID NO:15 的 残基 50-66	YISSGRSNIYYADTVKG	
[0482]	8	huAb1v5	CDR-H3	SEQ ID NO:15 的 残基 99-105	SWGYFDV
18	huAb1v5	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSLLNTGN QKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGV PDR FSGSGSGTDFLT LISSLQ AEDVAVYYC QNDYTYP LTFGQGT KLEIK	
19	huAb1v5	CDR-L1	SEQ ID NO:18 的 残基 24-40	KSSQSLLNTGNQKNYL T	
11	huAb1v5	CDR-L2	SEQ ID NO:18 的 残基 56-62	WASTRES	
12	huAb1v5	CDR-L3	SEQ ID NO:18 的 残基 95-103	QNDYTYP LT	

SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列	
15	huAb1v6	VH		EVQLVESGGGLVKP G SLRLSCAASGFTFS DYG MNWVRQAPGKGLEWI AYISSGRSNIYYADTVK GRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVVGQGTTVT VSS	
6	huAb1v6	CDR-H1	SEQ ID NO:15 的 残基 26-35	GFTFSDYGMN	
7	huAb1v6	CDR-H2	SEQ ID NO:15 的 残基 50-66	YISSGRSNIYYADTVKG	
[0483]	8	huAb1v6	CDR-H3	SEQ ID NO:15 的 残基 99-105	SWGYFDV
43	huAb1v6	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSLLNLGN QKNYL TWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGV PDR FSGSGSGTDFLT TISSLQ AEDVA VYYCQNDYTYP LTFGQGT KLEIK	
17	huAb1v6	CDR-L1	SEQ ID NO:43 的 残基 24-40	KSSQSLLNLGNQKNYL T	
11	huAb1v6	CDR-L2	SEQ ID NO:43 的 残基 56-62	WASTRES	
12	huAb1v6	CDR-L3	SEQ ID NO:43 的 残基 95-103	QNDYTYP LT	

SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列	
15	huAb1v1	VH		EVQLVESGGGLVKP G SLRLSCAASGFTFS DYG MNWVRQAPGKGLEWI AYISSGRSNIYYADTVK GRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVVGQGTTVT VSS	
6	huAb1v1	CDR-H1	SEQ ID NO:15 的 残基 26-35	GFTFSDYGMN	
7	huAb1v1	CDR-H2	SEQ ID NO:15 的 残基 50-66	YISSGRSNIYYADTVKG	
[0484]	8	huAb1v1	CDR-H3	SEQ ID NO:15 的 残基 99-105	SWGYFDV
20	huAb1v1	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSLLNRGN QKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGV PDR FSGSGSGTDFTLT ISSSLQ AEDVAVYYC QNDYTYP LTFGQGT KLEIK	
21	huAb1v1	CDR-L1	SEQ ID NO:20 的 残基 24-40	KSSQSLLNRGNQKNYL T	
11	huAb1v1	CDR-L2	SEQ ID NO:20 的 残基 56-62	WASTRES	
12	huAb1v1	CDR-L3	SEQ ID NO:20 的 残基 95-103	QNDYTYP LT	

SEQ ID NO.	克隆	抗体区	残基	氨基酸序列	
13	huAb1v2	VH		EVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAAS GFTFS DYG MNWVRQAPGKGLEWV SYISSGRSNIYYADTVK GRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR SWGYFDVVGQGTTVT VSS	
6	huAb1v2	CDR-H1	SEQ ID NO:13 的 残基 26-35	GFTFS DYG MN	
7	huAb1v2	CDR-H2	SEQ ID NO:13 的 残基 50-66	YI SSGRSNIYYADTVKG	
[0485]	8	huAb1v2	CDR-H3	SEQ ID NO:13 的 残基 99-105	SWGYFDV
18	huAb1v2	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSLLNTGN QKNYL TWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVVPDR FSGSGSGTDFTLTISSLQ AEDVAVYYC QNDYTYP LTFGQGTKLEIK	
19	huAb1v2	CDR-L1	SEQ ID NO:18 的 残基 24-40	KSSQ SLLNTGNQ KNYL T	
11	huAb1v2	CDR-L2	SEQ ID NO:18 的 残基 56-62	WASTRES	
12	huAb1v2	CDR-L3	SEQ ID NO:18 的 残基 95-103	QNDYTYP LT	

[0486] 除 VL CDR1中的“NS”基序的修饰之外,上文在表13中所述的变异数体huAb1v2及huAb1v3在其VH域中也具有额外框架突变。

[0487] 下表14提供变异数体的结合活性、激动活性及拮抗活性的概述。此类分析的说明可见于上文实例2中。在下表14中,VL CDR1中突变的“NS”基序加下划线。如表14中所述,抗体huAb1v4(在VL CDR1域中含有“P”突变)及huAb1v3(在VL CDR1域中含有“L”突变且在VH区内含有框架突变)尽管衍生自具有拮抗活性的亲本抗体,仍展现出激动活性。

[0488] 表14:变异的人源化抗体的序列及功能概述

人源化 163-2.1F2.2B5 变异体	VL LCDR1 序列 (KSSQSLL <u>NSGNQ</u> KNYLT (SEQ ID NO:10))	sCD40L 的阻断	激动性 : huCD40 报道基因 分析 IC50 nM	拮抗性 : Jurkat/ 报道基因分析 IC50 nM
[0489]	huAb1v4	KSSQSLL <u>NPGNQKN</u> YLT (SEQ ID NO:74)	是	49
	huAb1v6	KSSQSLL <u>NLGNQKN</u> YLT (SEQ ID NO:17)	是	否 85.0
	huAb1v1	KSSQSLL <u>NRGNQKN</u> YLT (SEQ ID NO:21)	是	否 55
	huAb1v2*	KSSQSLL <u>NTGNQKN</u> YLT (SEQ ID NO:19)	是	否 > 100
	huAb1v5	KSSQSLL <u>NTGNQKN</u> YLT (SEQ ID NO:19)	是	否 > 100
	huAb1v3*	KSSQSLL <u>NLGNQKN</u> YLT (SEQ ID NO:17)	是	79 否

[0490] *VH中的额外框架差异

[0491] 选择人源化抗CD40抗体huAb1v1进行进一步研究及改良。

[0492] 实例4:抗CD40抗体huAb1v1的HC CDR2的工程改造

[0493] 自实例3中所述的变异数体,选择抗体huAb1v1进行进一步分析。为进一步改良此抗体的效能,产生在HC CDR2域内含有突变的huAb1v1重链(HC)变异数体。制得十七种额外变异数体(称为huAb1v1CDR2v1至v17)。使变异数体HC区与huAb1v1LC (SEQ ID NO:20)配对以进行活性研究,从而测定激动活性及拮抗活性。制得十七种变异数体重链,且活体外活性研究显示,一般而言,变异数体保留其拮抗活性且效能不同于huAb1v1。表15显示,虽然抗体变异数体维持拮抗活性,但各变异数体的效能不同。

[0494] 表15:huAb1v1 CDR2 HC变异数体的功能概述。

经工程改造的 huAb1v1CDR2 变异数体	拮抗性: Jurkat/ 报道基因分析 (IC50 nM)
huAb1v1CDR2v17	503.8
huAb1v1CDR2v16	30.15
huAb1v1CDR2v15	339.7
huAb1v1CDR2v14	21.86

[0496]	huAb1v1CDR2v13	62.44
	huAb1v1CDR2v12	236.1
	huAb1v1CDR2v11	> 1000
	huAb1v1CDR2v10	23.04
	huAb1v1CDR2v9	7.06
	huAb1v1CDR2v8	> 1000
	huAb1v1CDR2v7	2.69
	huAb1v1CDR2v6	> 1000
	huAb1v1CDR2v5	> 1000
	huAb1v1CDR2v4	563.4
	huAb1v1CDR2v3	218.7
	huAb1v1CDR2v2	> 1000
	huAb1v1CDR2v1	> 1000

[0497] 所有huAb1v1 HC变异数体在位置S55皆有突变,如下表16(位置55加下划线)中所述。

[0498] 表16:额外VH区的氨基酸序列(huAb1v1VH的变异数体)

SEQ ID NO:	克隆	VH
15	huAb1v1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI <u>SSGR<u>SNIYYADTVKGRFTISRDNAKN</u></u> SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
22	huAb1v1CDR2v1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI <u>SSGR<u>TNIYYADTVKGRFTISRDNAKN</u></u> SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
23	huAb1v1CDR2v2	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI <u>SSGR<u>DNIYYADTVKGRFTISRDNAKN</u></u> SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
24	huAb1v1CDR2v3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI <u>SSGR<u>ENIYYADTVKGRFTISRDNAKN</u></u> SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:	克隆	VH
[0500]	25 huAb1v1CDR2v4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGR<u>R</u>NIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
	26 huAb1v1CDR2v5	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGR<u>V</u>NIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
	27 huAb1v1CDR2v6	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGR<u>L</u>NIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
	28 huAb1v1CDR2v7	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGR<u>G</u>NIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
	29 huAb1v1CDR2v8	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGR<u>I</u>NIYYADTVKGRFTISRDNAKS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYF DVWGQGTTVTVSS
	30 huAb1v1CDR2v9	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGR<u>Q</u>NIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
	31 huAb1v1CDR2v10	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGR<u>W</u>NIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:	克隆	VH
[0501]	32	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRM NYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
	33	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRK NYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
	34	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRH NYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
	35	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRF NYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
	36	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRY NYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
	37	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRANI YYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
	38	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRPN IYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS

[0502] 下表17提供在S55残基(呈粗体/加下划线)的工程改造之后,上述huAb1v1变异体的HC CDR2区的比较。huAb1v1的VH CDR2区对应于SEQ ID NO:15的氨基酸残基50-66。

[0503] 表17:huAb1v1 HC CDR2变异体在位置55处的比对

变 异 体 VH CDR2	HC CDR2	5 0	5 1	5 2	5 2	5 3	5 4	<u>5</u> <u>5</u>	5 6	5 7	5 8	5 9	6 0	6 1	6 2	6 3	6 4	6 5
huAb1v1	7	Y	I	S	S	G	R	<u>S</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v1	58	Y	I	S	S	G	R	<u>T</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v2	59	Y	I	S	S	G	R	<u>D</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v3	60	Y	I	S	S	G	R	<u>E</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v4	61	Y	I	S	S	G	R	<u>R</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v5	62	Y	I	S	S	G	R	<u>V</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v6	63	Y	I	S	S	G	R	<u>L</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v7	42	Y	I	S	S	G	R	<u>G</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v8	64	Y	I	S	S	G	R	<u>I</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v9	65	Y	I	S	S	G	R	<u>Q</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v10	66	Y	I	S	S	G	R	<u>W</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v11	67	Y	I	S	S	G	R	<u>M</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v12	68	Y	I	S	S	G	R	<u>K</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v13	69	Y	I	S	S	G	R	<u>H</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v14	70	Y	I	S	S	G	R	<u>F</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v15	71	Y	I	S	S	G	R	<u>Y</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v16	72	Y	I	S	S	G	R	<u>A</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G
huAb1v1C DR2v17	73	Y	I	S	S	G	R	<u>P</u>	N	I	Y	Y	A	D	T	V	K	G

[0504]

[0505] 选择重链可变区huAb1v1CDR2v7,因为其具有优于上表15-17中所产生且所述的其他变异体的特别有利的特性。值得注意地,huAb1v1CDR2v7在其HC CDR2中具有突变,经鉴别为S55G。具体而言,含有抗体huAb1v1的VL (SEQ ID NO:20;参见表13) 及VH huAb1v1CDR2v7的抗体经测定具有相比于抗体huAb1v1增加20倍的拮抗活性。

[0506] 使huAbv1的VL及huAb1v1CDR2v7的VH在两种不同的人类IgG1恒定区的情况下表达。选择一个IgG1恒定区,因为其效应功能减弱(hCg1,z,non-a L234A、L235A或LALA);且选择其他IgG1恒定区,因为其效应功能减弱且其具有一组可增强FcRn结合的突变(hCg1,z,

non-a L234A、L235A-T250Q、M428L或LALA-QL)。下表18及19提供关于抗人类CD40抗体Ab101 (VL huAbv1/VH huAb1v1CDR2v7/hCg1/k-LALA) 及Ab102 (VL huAbv1/VH huAb1v1CDR2v7/hCg1/k-LALA-QL) 的重链及轻链的氨基酸序列信息。各VH或VL序列的各个CDR的氨基酸残基用粗体指出。在表19中,恒定区加下划线。

[0507] 表18. Ab101及Ab102抗hCD40抗体的VH及VL氨基酸序列

SEQ ID NO	蛋白质区			序列
28	Ab101	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSDYGMNWVRQAP GKGLEWIAYISSGRGNIYYAD TVKGRFTISRDNNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARSWGYF DVWGQGTTVTVSS
6		CDR-H1	SEQ ID NO.:28 的残基 26-35	GFTFSDYGMN
42		CDR-H2	SEQ ID NO.:28 的残基 50-66	YISSGRGNIYYADTVKG
8		CDR-H3	SEQ ID NO.:28 的残基 99-105	SWGYFDV
20	Ab101	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSLLNRGNQKNYLTwF QQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYC QNDYT TYPLTFG QGTKLEIK
21		CDR-L1	SEQ ID NO.:20 的残基 24-40	KSSQSLLNRGNQKNYL
11		CDR-L2	SEQ ID NO.:20 的残基 56-62	WASTRES

[0508]

SEQ ID NO	蛋白质区			序列
12		CDR-L3	SEQ ID NO.:20 的残基 85-93	QNDYTYPLT
28	Ab102	VH		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSDYGMNWVRQAP GKGLEWIAVISSGRGNIYYAD TVKGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARSWGYF DVWGQGTTVTVSS
6		CDR-H1	SEQ ID NO.:28 的残基 26-35	GFTFSDYGMN
42		CDR-H2	SEQ ID NO.:28 的残基 50-66	YISSLGRGNIYYADTVKG
8		CDR-H3	SEQ ID NO.:28 的残基 99-105	SWGYFDV
20	Ab102	VL		DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSLLNRGNQKNYLTWF QQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYC QNDYTYPLTFG QGTKLEIK
21		CDR-L1	SEQ ID NO.:20 的残基 24-40	KSSQSLLNRGNQKNYLT
11		CDR-L2	SEQ ID NO.:20 的残基 56-62	WASTRES
12		CDR-L3	SEQ ID NO.:20 的残基 85-93	QNDYTYPLT

[0509] [0510] 表19. 重链(HC) 及轻链(LC) Ab101及Ab102抗hCD40抗体的氨基酸序列

克隆	SEQ ID NO:	VH
----	------------	----

克隆	SEQ ID NO:	VH
[0512]	39	EVQLVESGGGLVKPGGLSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>SWGYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAA <u>L</u> GCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS <u>HEDPEVFKFNWYVDGVEVHN</u> AKTKPREEQYNST <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI</u> EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT <u>CLVKGFYPSDIAVEWE</u> SNQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH <u>NHYTQKSLSLSPGK</u>
	40	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGN <u>QKNYL</u> TWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD <u>RFSGSGSGTDF</u> LT <u>TISSLQ</u> AEDVA <u>VYYCQNDY</u> TY <u>PLTFGQGT</u> KLEIK <u>R</u> TV <u>AAPS</u> VIFPPSDEQLKSGT <u>ASVV</u> C <u>LLNNF</u> YP <u>REAK</u> V <u>QW</u> K <u>VDN</u> ALQSGNSQE <u>SVTEQDSKDSTYSLS</u> ST <u>TLS</u> KADYEKHKVYACE <u>VTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
	41	EVQLVESGGGLVKPGGLSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR <u>SWGYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS</u> KSTSGGTAA <u>L</u> GCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVS <u>HEDPEVFKFNWYVDGVEVHN</u> AKTKPREEQYNST <u>YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI</u> EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT <u>CLVKGFYPSDIAVEWE</u> SNQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALH <u>NHYTQKSLSLSPGK</u>
	40	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGN <u>QKNYL</u> TWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPD <u>RFSGSGSGTDF</u> LT <u>TISSLQ</u> AEDVA <u>VYYCQNDY</u> TY <u>PLTFGQGT</u> KLEIK <u>R</u> TV <u>AAPS</u> VIFPPSDEQLKSGT <u>ASVV</u> C <u>LLNNF</u> YP <u>REAK</u> V <u>QW</u> K <u>VDN</u> ALQSGNSQE <u>SVTEQDSKDSTYSLS</u> ST <u>TLS</u> KADYEKHKVYACE <u>VTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>

- [0513] 实例5:人源化拮抗性抗hCD40抗体Ab101及Ab102的功能表征
 [0514] 活体外分析
 [0515] 人源化抗CD40抗体Ab101及Ab102均显示拮抗活性,类似于实例1中所述的报道基

因分析中的发现。因为残余激动活性与潜在风险有关,所以研发B细胞激动性分析。在此分析中,针对人类B细胞中CD86上调的抑制情况,评定抗体。人类B细胞组成性表达CD40且经由CD40进行信号传导,引起B细胞活化,如借由表面上的CD86的上调所量测。用低剂量抗IgM及IL4活化B细胞且添加CD40拮抗性抗体。按CD86的上调量测B细胞活化的增强,其是在激动性CD40而非拮抗性CD40 Ab存在下观察到的,表明前者候选物的活体外不可检测的激动活性。为量测拮抗活性,将初级人类B细胞与表达CD40L的人类T细胞系一起培养,其经由CD40/CD40L相互作用引起B细胞活化及CD86表达上调。量测拮抗性CD40抑制初级人类B细胞的CD86上调的能力且显示出抗CD40抗体Ab101的强拮抗活性,如图2B中所示。图2A显示抗体Ab101不具有激动活性。值得注意地,如图2B中所述,抗体Ab101的IC₅₀值为1.337,对比拮抗性抗体B1b(Boehringer Ingelheim)的IC₅₀值4.213及激动性抗体AD11(Astellas)的IC₅₀值0.1906。因此,抗体Ab101(及Ab102,鉴于相同的可变区)为CD40的强拮抗剂且基本上不显示活体外激动活性。

[0516] 活体内分析

[0517] 为测试抗体Ab101的活体内活性,建立人类抗体产生及B细胞存活的模型。简言之,当将自健康供体分离的人类PBMC转移至免疫功能不全的scid小鼠中时,响应于小鼠抗原产生人类IgG,其可在14天后量测。另外,来自这些小鼠的脾细胞的FACS分析指示人类B细胞移植及存活。借由包括用破伤风类毒素(TetTox)疫苗攻击及量测抗TetTox特异性IgG来量测抗原特异性反应(Naito, 2000; Jeurissen, 2004)。

[0518] 用周剂量的抗人类CD40(Ab101, 5mg/kg, 腹膜内)处理这些huscid小鼠引起人类IgG产生(图3A)及B细胞存活(图3B)的抑制>85%,清楚证明抗体在活体内具有活性。具体而言,图3A显示抗体Ab101相比于Ig对照能够抑制IgG产生,且图3B指出,在以上huscid模型中投与抗体Ab101抑制B细胞存活。

[0519] 实例6:Fab Ab102的表位分析

[0520] 使用Fab Ab102,进行晶体学研究来判定Fab Ab101所结合的表位。如上所述,抗体Ab101及Ab102的VH及VL序列相同,且因此,在以下晶体结构研究中Fab Ab102的使用代表抗体Ab101及Ab102两者的结合特征。

[0521] 测定单独的Ab102 Fab及与CD40抗原复合的Ab101 Fab的晶体结构。获得晶体且在IMCA-CAT 17ID光束线下收集资料。Ab102 Fab的晶体结构经解析为1.74 Å分辨率且Ab102 Fab/CD40复合物结构经解析为2.84 Å分辨率。晶体结构提供Ab102 Fab的3D构象表位的鉴别。

[0522] Ab102 Fab的3D构象表位的鉴别

[0523] Ab102 Fab与CD40之间的接触涉及关键的氢键及稳定界面的疏水相互作用。使用CCP4程序套中的程序NCONT产生分子接触列表(在4.0 Å下量测)。量测两个分离的结晶学CD40单体与Ab102 Fab的相应结合的轻链及重链之间的接触。在Ab102 Fab与结晶学CD40二聚体(由晶体接触产生的二聚体)之间观察到额外接触。基于此信息,Ab102 Fab结合的表位包含由CD40的Cys62-Phe67、Gln79-Cys83、Arg90-Thr99、Thr24-Cys37限定的拓扑区。

[0524] 材料及方法

[0525] CD40抗原的制备及纯化:

[0526] 将编码人类CD40细胞外域的DNA序列(氨基酸1-193)克隆至pHybE运载体中,随后

是同框C端Tev蛋白酶裂解位点及六组氨酸标签(SEQ ID NO:115)。使用转染试剂聚乙烯亚胺(PEI, Polysciences Inc),以4:1的PEI:DNA比,将质粒以 1×10^6 个细胞/毫升转染至HEK293 6e细胞(MRL)中。在转染后24小时,向经转染的细胞培养物中装入胰化蛋白-N1(至0.5%)。在转染后第7天,借由离心,随后经由0.2u PES过滤器(Corning)过滤,对经转染的细胞培养物进行清洁。使用配备有10kDa膜(GE Healthcare)的Kwick TFF系统,将经清洁的培养基的缓冲液更换为PBS,pH 7.4,且将其加载至经PBS(pH 7.4)平衡的5ml HisTrap FF柱(GE Healthcare)上。用PBS(pH 7.4)中的25mM咪唑洗涤管柱且用PBS(pH 7.4)中的250mM咪唑洗脱所结合的蛋白质。使用Amicon Ultra-15离心过滤装置(Millipore),以10kDa分子量截断浓缩经洗脱蛋白质,且借由SEC,于经PBS(pH 7.4)平衡且操作的26/60 Superdex 200柱(GE Healthcare)上进一步纯化。合并含有CD40的洗脱份,借由在280nm下的吸光度量测浓度,且借由SEC、SDS-PAGE及质谱法分析样品。将[CD40 (h) (21-193)]-Tev-His6("His6"揭示为SEQ ID NO:115)以等分试样储存在-80°C下。

[0527] CD40 Ab102 Fab片段的制备及纯化:

[0528] 借由木瓜酶裂解亲本mAb制备CD40 Ab102的Fab片段,如下详述。用PBS(pH 7.4)缓冲液中的50mM半胱氨酸活化木瓜酶。将PBS(pH 7.4)缓冲液中的mAb CD40 Ab102[hu IgG1/k]LALA QL与木瓜酶以1:100的木瓜酶:mAb重量比混合且在37°C下培育1h。用5mM碘乙酰胺淬灭反应。在10ml Mab SelectSure树脂(GE Healthcare)上纯化混合物,其中将Fab片段以流经物形式收集。使用Ultrafree-15 Biomax 10kDa分子量截断(MWCO)离心装置(Millipore)浓缩流经物。于在50mM HEPES、50mM NaCl缓冲液(pH 7.5)中预平衡的2.6cm×60cm Sephadryl 200 HiPrep柱(GE Healthcare)上纯化经浓缩的混合物。将含有Fab片段(借由在280nm下的UV吸光度监测)的部份合并且冷冻在-80°C下。借由分析型SEC、SDS-PAGE及质谱法评定样品纯度。

[0529] CD40/CD40 Ab102 Fab复合物制备:

[0530] 使重组人类CD40在哺乳动物表达系统中表达且随后使用本领域中熟知的技术纯化。将重组人类CD40及CD40 Ab102 Fab蛋白质以1.1:1摩尔比混合且在4°C下培育4h。将复合物样品以1ml/min加载至在50mM HEPES、50mM NaCl缓冲液(pH 7.5)中预平衡的2.6cm×60cm Sephadryl 200 HiPrep柱(GE Healthcare)上。将含有复合物(借由在280nm下的UV吸光度监测)的洗脱份合并且使用Ultrafree-15 Biomax 10kDa分子量截断(MWCO)离心装置(Millipore)浓缩至18mg/ml。借由分析型SEC及SDS-PAGE评定样品纯度。

[0531] Ab102 Fab结晶:

[0532] 以22.5mg/ml于50mM HEPES、50mM NaCl(pH 7.5)中提供单独的Fab。在23°C下借由蒸气扩散,晶体生长。储集器含有25% (w/v) PMME 550、0.1M MES pH 6.5、0.01M硫酸锌。借由添加相等体积的蛋白质及储集器溶液进行滴液。晶体生长为厚棱柱且使用添加有10% (v/v)丙二醇的储集器溶液进行低温保护。收集晶体,经由低温溶液洗涤且直接在液氮中低温冷却。在阿贡国家实验室(Argonne National Laboratories)(Argonne IL),在气态氮,100K下,在17ID光束线下于先进光子源下收集1.74 Å的衍射数据。

[0533] 与CD40抗原复合的Ab102 Fab的结晶:

[0534] 以18mg/ml于50mM HEPES、50mM NaCl(pH 7.5)中提供Fab复合物。所用抗原构建体为[CD40 (h) (21-193)]-TEV-6His("His6"揭示为SEQ ID NO:115)。在23°C下借由蒸气扩散,

晶体生长。储集器含有2M硫酸铵、0.1M磷酸盐-柠檬酸盐, pH 4.2。借由添加相等体积的蛋白质及储集器溶液进行滴液。晶体生长为细棒且使用2.5M硫酸锂低温保护。收集晶体, 经由低温溶液洗涤且直接在液氮中低温冷却。在阿贡国家实验室(Argonne IL), 在气态氮, 100K下, 在17ID光束线下于先进光子源下收集2.84 Å的衍射数据。

- [0535] Ab102 Fab及Ab102 Fab CD40复合物的结构测定
- [0536] 使用来自Global Phasing Ltd的程序autoPROC处理两种晶体结构的衍射数据。
- [0537] 在空间群C222₁中, 按以下单位晶胞尺寸处理Ab102 Fab数据集:a=64.65b=130.4c=132.6。使用程序PHASER, 使用先前已有报导的Fab搜索模型(蛋白质数据库(Protein Data Bank)条目3Q0S)确定最大可能分子置换解法。基于分子置换解法产生1个Fab分子的坐标。使用REFMAC及程序BUSTER初步优化所得解法。使用程序COOT且检查2Fo-Fc及Fo-Fc电子密度图来执行迭代蛋白质模型构建。优化以使用BUSTER添加水分子结束。最终优化统计资料报导为R_{自由}/R_{工作}(R_{free}/R_{work})值:0.23/0.19。
- [0538] 在空间群P2₁2₁2中, 按以下单位晶胞尺寸处理Ab102 Fab CD40复合物数据集:a=173.3b=76.0c=126.1。使用程序PHASER, 使用以上所报导的预先解析的Ab102 Fab确定最大可能分子置换解法。基于分子置换解法发现2个Fab分子的坐标。使用REFMAC及程序BUSTER初步优化所得解法。使用程序COOT且检查2Fo-Fc及Fo-Fc电子密度图手动构建CD40的模型。优化以使用BUSTER添加水分子结束。最终优化统计资料报导为R_{自由}/R_{工作}(R_{free}/R_{work})值:0.25/0.20。
- [0539] 实例7:Ab102在单核细胞活化分析中的中和效能及激动活性
- [0540] 在此实例中使用以下方法来检查Ab102的活体外拮抗及激动活性。
- [0541] 拮抗性分析:在拮抗性分析中评定Ab102阻断CD40介导的单核细胞活化的能力。在80ng/mL GM-CSF及80ng/mL IFN γ存在下, 将经纯化的单核细胞以2×10⁶/mL的浓度与1μg/mL MEGACD40L(Enzo)混合。在96孔U形底组织培养(TC)盘中, 每孔添加50μL。在培养基中制备测试材料的稀释液, 且向自供体获得的人类单核细胞中添加50μL稀释液。将细胞在37°C, 5%CO₂下培养两天, 随后收集上清液以便使用Meso Scale Discovery(MSD)免疫分析平台进行细胞因子(TNF)分析。
- [0542] 激动性分析:评定Ab102经由CD40诱导单核细胞活化的能力。使用MEGACD40L(Enzo)作为单核细胞活化的阳性对照。将经纯化的人类单核细胞在培养基中在80ng/mL GM-CSF及80ng/mL IFN γ存在下稀释至2×10⁶/mL, 且在96孔U形底TC盘中添加50μL/孔。在培养基中制备测试材料的稀释液, 且向单核细胞中添加50μL稀释液。将细胞在37°C, 5%CO₂下培养两天, 随后收集上清液以便使用Meso Scale Discovery(MSD)免疫分析平台进行细胞因子(TNF)分析。
- [0543] 因为骨髓细胞在克罗恩氏病的发病机制中起重要作用, 所以研发上文所提及的基于单核细胞的分析来评估Ab102的功能活性。CD40信号传导诱导单核细胞活化且从而产生发炎性细胞因子, 诸如TNF。Ab102的代表性单核细胞拮抗性及激动性分析分别显示于图5A及图5B中。如图5A中所示, Ab102以浓度依赖性方式阻断TNF的表达。在激动性分析形式中, 可溶性CD40L诱导以1.9nM的EC₅₀自单核细胞产生TNF, 而浓度高达200nM的Ab102不诱导TNF产生。如图5B中所述, Ab102对于TNF水平的影响类似于阴性对照(非相关IgG)的那些水平, 显示出少量至无可检测TNF产生。自三种不同供体获得一致的结果, 其中IC50值显示于下表

20中。

[0544] 表20.Ab102在单核细胞活化分析中的功能评定的概述

试剂	实验	拮抗性 IC ₅₀ (nM)
Ab102	1	0.06
	2	0.23
	3	0.11
平均值±SD		0.13 ± 0.08

[0546] 总而言之,Ab102在以上所述的拮抗性及激动性分析中的测试结果显示,Ab102为基本上不含激动活性且无可量测的激动活性的拮抗性抗CD40抗体。

[0547] 实例8:Ab102的交叉反应性

[0548] 测试Ab102与来自各种物种的CD40的交叉反应性。使用标准技术,经Alexa 647标记的Ab102对B细胞表面上的人类及食蟹猴CD40展现类似的结合动力学,其中于人类细胞上的EC₅₀值为0.89±0.17nM,且于食蟹猴细胞上的EC₅₀值为1.4±0.15nM,如下表21中所示。在高达30μg/mL(200nM)的浓度下,检测不到Ab102与小鼠、大鼠及兔CD40的结合。

[0549] 表21.Ab102与B细胞表面上的各种CD40的结合的概述

试剂	物种	EC ₅₀ (nM)
Ab102	人类	0.89 ± 0.17
	猴	1.4 + 0.15
	小鼠	ND
	大鼠	ND
	兔	ND

[0551] 总而言之,使用标准结合分析,Ab102结合至人类及食蟹猴CD40,但未显示出与小鼠、大鼠或兔CD40的可检测结合。

[0552] 实例9:使用小鼠抗CD40抗体138来治疗T细胞转移结肠炎

[0553] 使用以下方法在活体内研究中测定小鼠抗CD40抗体(抗体138)治疗结肠炎的能力。抗鼠类CD40抗体138具有与Ab102类似的特征,例如抗体138与Ab102一样,为基本上无激动活性的拮抗性抗体。因此,抗体138为实例9的小鼠模型中的Ab102活性的代表。下文描述结肠炎的活体内T细胞转移模型。

[0554] 分离及注射未处理的T细胞

[0555] 在第0天,自balb/c小鼠收集脾脏且将其置放于冰上补充有4%胎牛血清的RPMI培养基(完全培养基)中。借由机械破碎且通过100μm细胞过滤器进入补充有4%胎牛血清的RPMI培养基(完全培养基)中来获得单细胞悬浮液。借由离心(1250rpm,持续10分钟,在4°C下)收集细胞且使其再悬浮于Robosep缓冲液(Stem Cell Technologies)中。使用Moxi微型细胞计数器(Orflo)量测细胞浓度且于Robosep缓冲液中调整至1×10⁸个细胞/毫升。使用阴性选择磁珠套组(Stem Cell Technologies),根据制造商的说明书分离CD4+T细胞。借由FACS进一步纯化细胞,得到CD4⁺CD45RB^高及CD4⁺CD45RB^低的群体,将其分别按细胞的最亮42%及最暗12%收集。对细胞进行计数且将其调整至1×10⁶个细胞/毫升,且将0.5mL(1×10⁵个细胞)腹膜内(IP)注射至SCID小鼠中。

[0556] 治疗

[0557] 随后在细胞注射时(预防性治疗)或在借由内视镜检证实疾病之后(治疗性治疗)开始,以各种剂量于PBS中按两次/周向SCID小鼠(以上所述)腹膜内投与小鼠抗CD40抗体138。此外,包括多个对照组。此类组接受1) 15mg/kg腹膜内抗体951(非相关IgG),于PBS中,两次/周;或2) 抗体138(阻断CD40L的抗体),腹膜内,于PBS中,两次/周。另外,在T细胞转移(TCT)研究中,抗p40(IL-12/23)抗体或抗TNF单克隆抗体作为临幊上相关的对照比较而投与。

[0558] 内视镜检

[0559] 在细胞注射至小鼠中之后的不同时间,借由结肠镜检评定疾病。在用异氟烷麻醉之后,将可挠性管饲针缓慢地插入肛门中且缓慢地注射300μL PBS以移除粪粒。使动物自麻醉中恢复且走动以方便排出任何剩余粪粒(约五分钟)。再用异氟烷麻醉小鼠且将内视镜检探针(Karl Storz)插入肛门中至3cm的深度。捕捉距肛门边缘3、2及1cm处的像片影像。稍后使用下表22中详述的等级给影像评分。将三个距离中的每一者处的各参数的评分组合,产生鼠类内视镜检疾病活动性指数(MEDAI)总评分,显示于表22中。可使用MEDAI总评分获得的最大评分为24。

[0560] 在治疗性给药的情况下,使用细胞注射后三周的内视镜检评分证实疾病且给动物分组治疗。

[0561] 表22.MEDAI内视镜检评分

参数	评分	说明
渗出液	0	正常
	1	覆盖<50%的结肠周边
	2	覆盖>50%的结肠周边
血管分布	0	正常
	1	血管断开, 小血管不可见
	2	大血管不可见, 星爆流模式
	3	表面流血明显, 血管呈现渗漏
黏膜粒度	0	正常
	1	略微卵石外观
[0563]	2	显著且广泛的卵石外观
	3	黏膜突起, 腔减少

[0564] 组织学

[0565] 在盒中沿拉伸分段的整个结肠取向提交GI样品,其允许分析完整结肠长度且处理成福尔马林(formalin)固定石蜡包埋(FFPE)。将各区块切片5微米,且安装于玻璃载片上,随后使用抗IBA1抗体(目录号019-19741;Wako Pure Chemical Industries,Ltd.)执行免疫组织化学来检测离子化钙结合接附分子1(IBA1)。使用IBA1标志物鉴别组织切片中的巨噬细胞。用甲基绿给载片对比染色,使其脱水,且装上玻璃盖玻片。

[0566] 随后借由Vectra成像系统在4×下扫描载片且检查4×低功率马赛克影像(mosaic image),随后选择区域在20×下成像。

[0567] Vectra成像重新扫描载片且捕捉所选择的20×高功率高分辨率影像,随后在

inForm软件(Perkin Elmer)中对其进行影像分析算法。所用inForm算法集具有三种算法：第一种设定光谱成像档案中IBA1及CD3染色的阈值，以消除背景/外来染色。后续算法将组织分割成各相关组织(固有层、上皮细胞、肌层、黏膜下层及背景)，且对由第一算法产生的RGB影像中的CD3或IBA1进行定量。

[0568] 关于组织分割或细胞分割数据，将InForm数据导出为正文档案，将其合并成单一数据文件。

[0569] 基于急性模型中的拮抗活性的验证，使用慢性结肠炎的模型建立概念验证。执行三个研究来测试在未处理T细胞转移至免疫功能不全的宿主(SCID小鼠)中之后阻断结肠炎的影响。在预防性及治疗性治疗模式中研究单一剂量，同时在预防性模式中检查完全剂量反应。

[0570] 在细胞转移时投与的小鼠抗CD40抗体138的剂量反应

[0571] 使用结肠炎的T细胞转移模型测定预防性投与抗CD40抗体138的小鼠的剂量反应。治疗始于细胞转移时，涵盖一系列剂量(0.5、1.5、5及15mg/kg)。降至1.5mg/kg的剂量造成MEDAI总评分的最大抑制，而0.5mg/kg不具有显著影响。小鼠抗CD40抗体138的活性等效于用作阳性对照的抗p40IL-12/23治疗的标准剂量。结肠切片的组织学分析显示巨噬细胞(发炎的一般量度)减少，其与疾病的内视镜检评定密切相关，如图6及图7中所述。具体而言，图6描述在预防性投与小鼠抗CD40抗体138的情况下在第39天的内视镜检评分的剂量反应抑制(最终评分)。在图6中，RB低是指阴性对照组。CD45RB低细胞不介导疾病。在结肠炎的此模型中，疾病是通过转移至动物的CD45RBhi细胞介导。图7显示小鼠结肠中的IBA1+巨噬细胞的数目(以组织学方式测定)且描述在大于0.5mg/kg且低于p40阳性对照的剂量下巨噬细胞的较低水平。

[0572] 在最后一次给药后96小时量测循环小鼠抗CD40抗体138的水平(等于C_{低谷})且其显示具有剂量反应性，如图8中所述。在该组中除一只动物以外的所有动物中，最低剂量(0.5mg/kg)产生小于定量下限(LLQ)的浓度。在细胞转移后3周投与的小鼠抗CD40抗体138的剂量反应

[0573] 当在细胞注射后三周起始小鼠抗CD40抗体138治疗时，在证实内视镜检疾病之后，在最高剂量(15mg/kg)下观察到MEDAI总评分的剂量反应性抑制，达到统计显著性(图9A)。作为骨髓发炎的量度的结肠中的IBA1⁺巨噬细胞的组织学分析产生类似结果，如图9B中所述。在接受15mg/kg的动物中，在最后一次给药后72小时量测的抗体138的平均血清浓度为191.9μg/ml。

[0574] 实例10：食蟹猴中的T细胞依赖性抗体反应

[0575] 在食蟹猴中执行T细胞依赖性抗体反应(TDAR)分析。以0(仅媒剂)或10mg/kg的剂量给每组每种性别两只皮下(SC)投与Ab102，持续5周。在第8天，给所有动物投与钥孔血蓝蛋白(KLH)。在相对于KLH投与第-11天、第-7天、第0天、第4天、第7天、第10天、第14天及第21天(KLH天数)自各动物收集血清样品。在完成最后一次安排的血液收集之后，使所有动物返回测试设备动物群体(图10)。

[0576] 发现相比于仅经媒剂处理的动物，Ab102阻抑抗KLH IgM及IgG抗体T细胞依赖性抗体反应，如图10中所示。

[0577] 此研究中的发现与在非经肠投与原型外来蛋白质之后药理学阻抑CD40依赖性IgM

及IgG抗体产生一致。结果表明,Ab102的使用可能适合治疗狼疮,其中自体抗体产生为该疾病的一部分。这些发现还支持食蟹猴作为用于临床前毒理学研究的适当物种的生物相关性。此外,研究证实与食蟹猴CD40的交叉反应性,且显示Ab102在已知需要CD40的机制(T依赖性抗体反应)中的活体内活性。

[0578] 实例11:使用小鼠抗CD40抗体138治疗全身性红斑性狼疮症(SLE)

[0579] 由于小鼠抗CD40抗体138在以上急性模型及结肠炎模型中所示的拮抗活性(参见实例9),所以在全身性红斑性狼疮症(SLE)的小鼠模型中检查此小鼠抗CD40抗体的功效。使用两种SLE模型:MRL/lpr及NZB/W-F1(描述于Theofilopoulos及Kono.1999.Murine lupus models:gene-specific and genome-wide studies.Lahita R.G.编, Systemic Lupus Erythematosus,第3版,第145页中)。用于评定抗CD40治疗在MRL/lpr及NZB/W-F1小鼠中的功效的基本原理为两方面的。首先,此类模型在其SLE表现方面不同.NZB/W-F1小鼠自发地发展出狼疮性肾炎及涎腺炎,而MRL/lpr小鼠除肾炎及涎腺炎之外还发展出关节及皮肤表现(Andrews等人J.Exp.Med.148:1198-1215.1978)。因为患者的SLE表现不同,所以使用两种模型允许评定在大多数SLE患者中的潜在功效。其次,MRL/lpr及NZB/W-F1小鼠在其疾病的遗传基础方面不同(Perry等人J.Biomed.Biotech.2011,Article ID 271694),且因此,各模型的功效在翻译为遗传异质性人类方面的信赖度增加。

[0580] 11.1.SLE的MRL/lpr模型

[0581] 为测定功效,自10周龄开始,借由腹膜内注射(i.p.)按下表23中所指出的剂量向小鼠投与小鼠抗CD40抗体138。在该研究中,使用PBS注射作为阴性对照,且使用泼尼松龙作为阳性对照。

[0582] 表23.

组别	n	治疗	剂量
1	18	PBS	2×/wk i.p.
2	18	抗体138	15mg/kg 2×/wk i.p.
3	18	抗体138	5mg/kg 2×/wk i.p.
4	18	抗体138	1.5mg/kg 2×/wk i.p.
5	18	抗体138	15mg/kg 1×/wk i.p.
6	18	泼尼松龙	10mg/kg P0 sid

[0584] 借由Albustix(用于测试尿蛋白的尿液试纸(urine dip stick)品牌)每周监测蛋白尿。在治疗开始之后立刻开始发展出定义为≥300mg/dL的高蛋白尿,如图11A中所示。如图11A中所述,截止第63天完成研究,50%-60%的未经处理的PBS对照小鼠及经1.5mg/kg抗CD40抗体处理的小鼠已发展出高蛋白尿。相比之下,其他处理组中的几乎所有小鼠在整个研究中维持低蛋白尿。15mg/kg 1×/周处理组显著不同于PBS对照。还监测存活情况且发现以15mg/kg 1×/周及5mg/kg 2×/周给药使得存活期优于未经处理的PBS对照动物显著延长,如图11B中所示。应注意,许多小鼠在其发展出肾炎之前因为由Fas1pr突变产生的淋巴腺病造成的痛苦而安乐死。因此,所观察到的存活率降低不能仅归因于肾炎。尽管如此,这些资料仍指出,抗CD40抗体剂量依赖性地预防蛋白尿且延长易生狼疮的MRL/lpr小鼠的存活期。

[0585] 还在来自各个处理组的小鼠的肾脏、唾液腺及踝关节的经苏木精及伊红(eosin)

(H&E) 染色染色的福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织切片中评估抗CD40抗体治疗SLE的功效。随着MRL小鼠的年龄自开始时的10周龄变为结束时的19周,在9周研究内,未经处理的PBS对照小鼠中所有测试器官的疾病的严重程度增加。

[0586] 在肾脏中,在治疗29天及63天时,当以15mg/kg投与时,抗CD40抗体治疗可有效减少肾小球疾病,如图12A中所示。随着不断变老的MRL小鼠中肾小球疾病严重程度加剧,5及15mg/kg抗CD40抗体治疗维持功效,使肾小球疾病降到最低。以15mg/kg的剂量一周一次给予的抗CD40抗体与一周两次给予一样有效。以5mg/kg的剂量一周两次给予的抗CD40抗体的有效性也接近相同。在29天及63天时,以5及15mg/kg的剂量给予的抗CD40抗体可有效减少肾脏中的血管周(PV)浸润,如图12B中所示,且具有在疾病早期减少小管间质性(TI)的趋势,如图12C中所示。

[0587] 在唾液腺中,在第29天,以1.5、5及15mg/kg的剂量给予的抗CD40抗体可有效减少唾液腺发炎,而在疗法的第63天,15mg/kg维持功效(图13A)。在未经处理的小鼠中在第29天后唾液腺浸润无显著改变。

[0588] 在跗关节组织中,在第29天,以1.5、5及15mg/kg的剂量投与的抗CD40抗体可有效减少关节周围发炎;而在疗法的第63天,15mg/kg维持功效(图13B)。在关节中,19周的小鼠相比于10周的小鼠,发炎倾向于减少。尽管如此,在疗法的63天,15mg/kg的抗CD40抗体治疗仍显著减少发炎至接近零。

[0589] 生发中心(GC)形成要求经由GC B细胞上的CD40与滤泡性辅助T细胞(Tfh)上的CD40L接合而使B细胞及T细胞相互作用。GC为产生浆细胞及记忆B细胞且发生亲和力成熟及Ig类别转换的解剖结构。其对于在SLE中发展出高亲和力及致病性自体抗体至关重要。

[0590] 小鼠抗CD40抗体138破坏B细胞与T细胞相互作用且防止形成GC。为评定GC形成的防止程度,借由流式细胞术测定脾脏中GC B细胞及Tfh细胞的数目(图14)。在第29天在所有经抗CD40抗体138处理(无论剂量如何)的小鼠中,Tfh细胞数目显著低于对照。在所测试的剂量中,5mg/kg剂量组在第63天仍然显著低于对照(图14,参见图(i)及图(ii))。在第29天在所有抗CD40抗体剂量下,GC B细胞还低于对照,且其在第63天在以5及15mg/kg的剂量接受抗CD40抗体的小鼠中仍然较低。然而,与未经处理的对照的这些差异在统计学上不显著。不管此类结果,数据中存在所有给药组都有治疗作用的整体趋势。此外,在这些实验中,鼠类抗CD40抗体展现少量至无激动活性。

[0591] 在鼠类及人类SLE中,除自体反应性抗体的水平之外,循环总IgG水平随时间推移增加。因此,为评定抗CD40抗体138对抗体产生的影响,检查总循环IgM及IgG水平。此外,还检查抗dsDNA抗体,其为常见的狼疮相关自体抗体。发现在第29天,经抗CD40抗体以15及1.5mg/kg的剂量处理的小鼠中的总IgG水平显著低于未经处理的对照中的总IgG水平,如图15A中所述。在经抗CD40抗体138以15mg/kg处理的小鼠中,显著较低的总IgG水平保持长达63天,如图15B中所述。此外,在此时间点,在经抗CD40抗体138以5mg/kg处理的小鼠中观察到显著较低水平。未发现循环IgM水平的差异。

[0592] 在第29天,在经抗CD40抗体138处理的小鼠及未经处理的对照小鼠中,抗dsDNA效价并无显著不同,如图16A中所述。然而,截止第63天,抗dsDNA效价在未经处理的对照小鼠中大幅增加,但在经15及5mg/kg抗CD40抗体138处理的小鼠中下降,但差异不明显,如图16B中所述。

[0593] 自以上研究(实例11.1)获得的结果指出,抗CD40抗体138可有效预防在易生狼疮的MRL/lpr小鼠中发展出肾炎。此外,抗CD40抗体138预防唾液腺及关节发炎的发展。此研究表明,与Ab102具有类似特性的拮抗性小鼠抗CD40抗体138可有效治疗人类SLE。

[0594] 11.2.SLE的NZB/W-F₁小鼠模型

[0595] 还测试SLE的第二小鼠模型以判定拮抗性小鼠抗CD40抗体138是否可有效治疗该疾病。具体而言,为测定抗CD40抗体138的功效,在NZB/W-F1小鼠中测试抗体,其中根据下表24中所述的给药时程使用预防方案及治疗方案两者。如在研究11.1中一样,PBS充当阴性对照且泼尼松龙为阳性对照。

[0596] 表24

预防			
组别	n	治疗	剂量
[0597]	1	PBS	i.p 2x/wk
	2	抗体 138	15 mg/kg i.p.2x/wk
	3	抗体 138	1.5 mg/kg i.p.2x/wk
	4	抗体 138	15 mg/kg i.p.1x/wk
	5	泼尼松龙	10 mg/kg PO sid
治疗			
6	13	PBS	i.p.2x/wk
7	12	抗体 138	15 mg/kg i.p.2x/wk
8	12	泼尼松龙	10 mg/kg PO sid

[0598] 关于预防方案,在小鼠26周龄时开始处理。所有小鼠经验证皆具有<300mg/dL蛋白尿。关于治疗方案,使用滚动登记;每周监测未经处理的小鼠的蛋白尿且当其产生≥300mg/dL蛋白尿时,将其登记至3组治疗方案中的一组中。

[0599] 预防性治疗

[0600] 每周监测蛋白尿且如图17A中所示,其中截止32周龄,约50%未经处理的对照小鼠具有蛋白尿。相比之下,经抗CD40抗体138处理的小鼠中仅1只且经泼尼松龙处理的小鼠中无一者产生高蛋白尿。这些结果相对于未经处理的对照为显著的。如图17B中所示的存活情况反映蛋白尿结果,且所有处理显著不同于PBS对照。因此,15及1.5mg/kg处理剂量均预防蛋白尿且延长存活期。

[0601] 治疗性治疗

[0602] 在此第二小鼠SLE模型中,用抗CD40抗体138进行治疗性治疗也是有效的。如图18A及图18B中所示,经抗CD40抗体138处理的小鼠随时间推移产生低蛋白尿,然而未经处理的对照小鼠及经泼尼松龙处理的小鼠均不产生低蛋白尿。基于自蛋白尿恢复的速率,如图18B中所示,据估算,自蛋白尿恢复的平均时间为23±7天。抗CD40抗体138处理还显著延长存活期,如图18C中所述。

[0603] 唾液输出

[0604] 量测经预防性及治疗性治疗的小鼠的唾液产量以评定唾液腺功能。向经麻醉小鼠投与硝酸匹鲁卡品(pilocarpine nitrate)且用棉拭子收集8分钟时段内的唾液。按棉拭子的净增重量测唾液输出。在预防性研究中,发现未经处理的对照小鼠的唾液产量高度可变,

但显著不同于NZBWF-1未患病的较年幼小鼠的唾液产量,如图19A及图19B中所述。变化性可能归因于疾病程度,因为大多数具有最低唾液产量的媒剂对照小鼠具有蛋白尿(图19A及图19B,媒剂组中紫色对比黑色)。然而,重要的是,经抗CD40抗体138处理的小鼠的唾液产量相对均匀(图19A)且显著大于未经处理的对照小鼠。虽然所有经抗CD40抗体138处理的群组都具有较高的唾液产量,但当随体重而变量测(图19B)时,仅经1.5mg/kg处理的群组保留显著性。尽管如此,这些数据仍指出,预防性抗CD40抗体138处理可以预防唾液腺功能的丢失。

[0605] 在经治疗性治疗的小鼠中,发现经抗CD40抗体138处理的小鼠的唾液产量显著高于未经处理的对照(图20A及图20B)。图20A及图20B显示,借由治疗性给予抗CD40抗体可保存唾液产量。无论考虑总唾液抑或针对体重标准化的唾液,这点均显而易见。值得注意地,未经处理的小鼠都具有蛋白尿,然而经抗CD40抗体处理的小鼠中无一者具有蛋白尿。因此可以推论得出,治疗性给予基本上不含激动活性的拮抗性抗CD40抗体可预防或逆转唾液腺功能的衰退。

[0606] 此研究指出,拮抗性抗CD40抗体138可有效预防在易生狼疮的NZB/W-F1小鼠中发展出肾炎且可有效挽救这些小鼠免受肾炎之苦。此外,抗CD40抗体预防唾液腺及关节发炎的发展。此研究支持以下假设:基本上不含激动活性的拮抗性抗CD40抗体在人类SLE中将为有效的。

[0607] 实例11.1及11.2中所用的方法包括以下:

[0608] MRL/lpr小鼠

[0609] MRL/lpr:按以下4个剂量中的一个,向10周龄MRL/lpr小鼠中腹膜内投与抗CD40抗体(抗体138):15mg/kg;5mg/kg;或1.5mg/kg,每周两次;或15mg/kg,每周一次。包括经PBS(媒剂)腹膜内每周两次处理的小鼠作为阴性对照,且包括经10mg/kg泼尼松龙PO sid处理的小鼠作为阳性对照。

[0610] NZB/W-F₁:在预防方案及治疗方案中,向NZB/W-F₁小鼠投与抗CD40抗体138。关于预防方案,在26周龄时开始,按两个剂量中的任一个,以15mg/kg或1.5mg/kg,每周两次,向小鼠腹膜内给予抗CD40。以10mg/kg PO sid给予泼尼松龙或给予PBS的小鼠分别充当阳性及阴性对照。自一开始测试小鼠的蛋白尿且自预防性研究中排除任何具有≥300mg/dL的小鼠。关于治疗方案,当小鼠产生≥300mg/dL的蛋白尿时,开始对其进行处理。小鼠以15mg/kg腹膜内接受抗CD40,每周两次。以10mg/kg PO sid给予泼尼松龙或PBS的小鼠分别充当阳性及阴性对照。

[0611] 蛋白尿

[0612] 使用Albustix试剂条(Siemens 2191,Pittsburgh,PA)每周测试尿液中的蛋白质水平。当至少2次连续测试或在死亡或安乐死之前,尿蛋白水平增加至≥300mg/dL时,小鼠视为具有蛋白尿。

[0613] 流式细胞术

[0614] 在含1%热灭活胎牛血清(Invitrogen)及1×青霉素/链霉素(Sigma,St Louis,MO)的Hanks缓冲盐溶液(Invitrogen)中制得脾单细胞悬浮液。借由离心移除红血球且将细胞再悬浮于染色缓冲液(PBS(Invitrogen),含1.5%热灭活胎牛血清及0.02%叠氮化钠(Sigma))中。用针对CD3(145-2011,BD)、CD4(GK1.5 eBioSciences)、ICOS(C398.4A,Biolegend)、CXCR5(L138D7,Biolegend)、PD-1(29F.1A12,Biolegend)、GL7(A488,

Biolegend)、CD19 (BUV395, BD)、CD95 (Jo2, Biolegend) 的抗体给细胞染色。使抗体直接偶联至异硫氰酸荧光素、藻红素、藻红素及花青5、别藻蓝蛋白、多甲藻素叶绿素及花青5.5或生物素。全部B细胞经鉴别为CD19+; GC B细胞经鉴别为CD19+、CD95+及GL7+; Tfh细胞经鉴别为CD3+、CD4+、ICOS+、CXCR5+及PD-1+。借由FACSCalibur (BD Biosciences) 流式细胞仪分析细胞且用FlowJo软件(版本8.5, Treestar Inc.)分析。

[0615] 组织学

[0616] 当媒剂对照小鼠垂死时,收集肾脏、踝及唾液腺组织且将其固定于10%中性缓冲福尔马林中。此外,在特定的中间时间点,自各组的代表性小鼠收集这些相同组织及血液。将组织固定于10%中性缓冲福尔马林中8小时,经处理及石蜡包埋以便H&E。基于对常规H&E染色经福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的切片的评估,评估肾脏、唾液腺及踝的发炎性浸润。关于肾脏,病理学家基于以下评分准则,针对肾小球疾病、血管周浸润及小管间质性浸润按0至4等级给3 μm H&E切片评分:肾小球疾病:0=无疾病;1=偶有肾小球的肾小球膜区段性增厚;2=大部分肾小球的肾小球膜区段性至弥漫性增厚;3=肾小球膜弥漫性增厚、细胞过多、增大的足细胞、无黏附;4=肾小球膜弥漫性增厚,且含有在以下中的一个或多个比其他区域糟糕的区域:凝聚的蛋白质、纤维化、细胞缺乏、增大的足细胞、黏附及鲍氏囊(Bowman's capsule)的新月体。血管周肾脏发炎:0=至多一些稀有淋巴细胞;1=一些淋巴细胞形成松散的聚集体;2=淋巴细胞形成离散的小聚集体;3=淋巴细胞极化聚集,膨胀至邻近静脉腔中,但未能完全包围弓形动脉;4=淋巴细胞完全聚集在弓形动脉周围,无极化。小管间质性(TI)浸润:0=无浸润;1=极少至轻度TI浸润;2=在20%小管之间的轻度浸润;3=在至多50%小管之间的轻度至中等浸润;4=在整个肾皮质中>50%小管之间及在其周围的中等浸润。唾液及关节发炎评分是基于相同原理,随着组织内浸润增加,用0-4评分。

[0617] 唾液输出

[0618] 为量测唾液腺输出,首先在小型隔离室中,用氧气/异氟烷使小鼠镇静。在镇静之后,向小鼠腹膜内投与30 μl (60 μg) 硝酸匹鲁卡品(Sigma)。在注射后两分钟,将预称重的儿童安全拭子(修整至约1.5cm,棉花加茎干)置放于动物口中门牙之后。将小鼠侧放以允许合并脸颊上的唾液及由棉拭子吸附。8分钟后,移出拭子且称重以计算净唾液重量。

[0619] ELISA

[0620] 总循环IgG及IgM水平是通过ELISA,使用eBioscience套组(目录号88-50400,88-50470),根据制造商的说明书测定。

[0621] 序列概述

[0622]

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO:1 [0622]	人类 CD40	MVRPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTA CREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDC TEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHC HQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTIC TCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGF GVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSS AFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNK TDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAIL LVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQE INFPDDLPGSNTAAPVQETLHGQCQPV TQEDGKESRISVQERQ

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO:2	人类 Ig γ-1 恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPDKT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:3	人类 Ig γ-1 恒定区突变体	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHPNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPDKT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:4	人类 Igκ 恒定区	TVAAPSVFIFPPSDEQLKGTSASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
SEQ ID NO:5	以下的可变重链： Ab1 (鼠类) (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVPGGSLKVSCAAS GFTFSDYGMNWVRQAPEKGLEWIA YISSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNA KNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSW GYFDVWGTGTTVTVSS

[0623]

[0624]

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO:6	以下的重链 CDR1: Ab1 (鼠类) Ab2 (鼠类) huAb1v1CDR2v1 至 huAb1v1CDR2v17 huAb1v1 huAb1v5 huAb1v6 huAb1v4 huAb1v3 Ab101 Ab102	GFTFSDYGMN
SEQ ID NO:7	以下的重链 CDR2: Ab1 (鼠类) huAb1VH.1/VL.1 huAb1v1 huAb1v5 huAb1v3 huAb1v4	YISSGRSNIYYADTVKG
SEQ ID NO:8	以下的重链 CDR3: Ab2 (鼠类) Ab1 (鼠类) huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1A huAb1v1 huAb1v1CDR2v1 至 huAb1v1CDR2v17 huAb1v5 huAb1v6 huAb1v2 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	SWGYZFDV
SEQ ID NO:9	以下的可变轻链: Ab1 (鼠类)	DIVMTQSPSSLTVTAGEMVTMSCKSS QSLLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDFAGSGSGTDF TLTISSVQAEDLAVYYC QNDYTYPLT FGAGTKLEIK

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO: 10	以下的轻链 CDR1: Ab2 (鼠类) Ab1 (鼠类) huAb1VH1/VL.1 huAb1VH1A/VL.1 huAb1VH1A/VL.1A	KSSQSLLNSGNQKNYLT
SEQ ID NO: 11	以下的轻链 CDR2: Ab1 (鼠类) Ab2 (鼠类) huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1v5 huAb1v2 huAb1v6 huAb1v1 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	WASTRES
SEQ ID NO: 12	以下的轻链 CDR3: Ab1 (鼠类) Ab2 (鼠类) huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1 huAb1v5 huAb1v2 huAb1v6 huAb1v1 huAb1v3 huAb1v4 Ab101 Ab102	QNDYTYPLT

[0625]

[0626]

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO: 13	以下的可变重链： huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1/VL.1A huAb1v2 huAb1v3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWVSYI SSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 14	以下的可变轻链： huAb1VH.1/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKL LIYWASTRESGPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFG QGTKLEIK
SEQ ID NO: 15	以下的可变重链： huAb1VH.1A/VL.1 huAb1VH.1A/VL.1A huAb1v1 huAb1v5 huAb1v4 huAb1v6	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFS DYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRSNIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGY FDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 16	以下的可变轻链： huAb1VH.1A/VL.1A huAb1VH.1/VL.1A	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SLLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLL IYWASTRESGPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQ GTKLEIK
SEQ ID NO: 17	以下的轻链 CDR1： huAb1v6 huAb1v3	KSSQSLLNLGNQKNYLT
SEQ ID NO: 18	VL huAb1v5 huAb1v2 (CDR 呈粗体)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSLLNTGNQKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGPDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVAVYYCQNDYTYPL TFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 19	以下的轻链 CDR1： huAb1v5 huAb1v2	KSSQSLLNTGNQKNYLT

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO: 20	以下的可变轻链 (VL)： huAb1v1 Ab101 Ab102 (CDR 呈粗体)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSLLNRGNQKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVAVYYC QNDYTYP L TFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 21	以下的可变轻链 CDR1： huAb1v1 Ab101 Ab102	KSSQSLLNRGNQKNYLT
SEQ ID NO: 22	以下的可变重链 (VH)： huAb1v1CDR2v1 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRRTNIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 23	以下的可变重链 (VH)： huAb1v1CDR2v2 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRDNIIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 24	以下的可变重链 (VH)： huAb1v1CDR2v3 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRENIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 25	以下的可变重链 (VH)： huAb1v1CDR2v4 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRRNIIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 26	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v5 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRVNIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVGQGTTVTVSS

[0627]

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO: 27	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v6 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRRLNIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 28	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v7 Ab101 Ab102 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSW GYFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 29	VH huAb1v1CDR2v8 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRINIYYADTVKGRFTISRDNAK SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 30	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v9 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRQNIYYADTVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSW GYFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 31	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v10 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRWNIIYYADTVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSW GYFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 32	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v11 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRMNIYYADTVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSW GYFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 33	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v12 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRKNIYYADTVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSW GYFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 34	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v13 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRHNIYYADTVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSW GYFDVGQGTTVTVSS

[0628]

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO: 35	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v14 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRFNIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 36	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v15 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRYNIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 37	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v16 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRANIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 38 [0629]	以下的可变重链 (VH) huAb1v1CDR2v17 (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRPNIYYADTVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWG YFDVGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 39	重链序列 Ab101 (恒定区加下划线; CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG FTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYI SSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSW GYFDVGQGTTVTVSS<u>A</u>STKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHP SNTKVDKKVEPKSCDKTHCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQP<u>R</u>PQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIA<u>V</u>EWE<u>S</u>NGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO: 40	轻链序列 Ab101 轻链序列 Ab102 人源化 (恒定区加下划线; CDR 呈粗体)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSLLNRGNQKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGPDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVAVYYC <u>QNDYTYPL</u> TFGQGTKLEIK<u>R</u>TVAA<u>P</u>SVF<u>I</u>FPPSDE QLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTL<u>S</u>KA<u>D</u>YE<u>E</u>HKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 41	重链序列 Ab102 人源化 (恒定区加下划线; CDR 呈粗体)	EVQLVESGGLVKPGGLRLSCAASG FTFS<u>DYGMN</u>WVRQAPGKGLEWIAYI SSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTA <u>VYYCARSW</u> GYFDVWGQGTTVSSA<u>STKGPSVFP</u> LAPSSKSTSGGTAA<u>LGCLVKDYFPEP</u> VTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSL YSLSSVVTV<u>PSSSLGTQTYICNVNHKP</u> SNTKVDKKVEPKSCDK<u>HTCPPCPAP</u> EAAGGPSVFL<u>FPPKPKDQLMISRTPEV</u> TCVVVDV<u>SHEDPEVKFNWYVDGVEV</u> HNAK<u>TKPREEQYNSTYRVVSVLTVL</u> HQDWLN<u>GKEYKCKVSNKALPAPIEK</u> TISKAKGQP<u>REPQVYTLPPSREEMTK</u> NQVSL<u>TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ</u> PENNYKTTPPVL<u>SDGSFFLYSKLT</u> DKSRWQQGNVFSCSVLHEALHNHYT QKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 42	以下的重链 CDR2: Ab2 huAb1v1CDR2v7 Ab101 Ab102	YISSGRGNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 43	以下的可变轻链: huAb1v6 huAb1v3 (CDR 呈粗体)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSS QSLLNLGNQKNYLTWFQQKPGQPP KLLIYWASTRESGPDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDVAVYYC <u>QNDYTYPL</u> TFGQGTKLEIK

序列识别符	蛋白质	序列	
SEQ ID NO: 44	以下的可变重链： Ab3 (鼠类) (CDR 呈粗体)	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAF GYTFTSYTMHWVKQRPGQGLEWIG YINPSSDYPNQNQKFKDKATLTADK SSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARW GYSFDYWGQGTTLVSS	
SEQ ID NO: 45	以下的重链 CDR1： Ab3 (鼠类) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	GYTFTSYTMH	
[0631]	SEQ ID NO: 46	以下的重链 CDR2： Ab3 (鼠类) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	YINPSSDYPNQNQKFD
	SEQ ID NO: 47	以下的重链 CDR3： Ab3 (鼠类) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B	WGYSFDY

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO: 48	以下的可变轻链： Ab3 (鼠类) (CDR 呈粗体)	DIVMTQAAPSVSVIPGESVSISCRSSK SLLHSNGNTYLYWFLQRPQSPQYLI YRMSTLASGVPDRFSGSGSGTAFTLR ISRVEAEDVGVYYCMQ HLEYPLT FG AGTKLELK
SEQ ID NO: 49	以下的轻链 CDR1： Ab3 (鼠类) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	RSSKSLLHSNGNTYLY
SEQ ID NO: 50 [0632]	以下的轻链 CDR2： Ab3 (鼠类) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	RMSTLAS
SEQ ID NO: 51	以下的轻链 CDR3： Ab3 (鼠类) huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B	MQHLEYPLT

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO: 52	以下的可变重链： huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1/VL.1B	EVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKAS GYTFTSYTMHWVRQAPGQGLEWMG YINPSSDYPNQNKFKDRVTTADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWG YSFDYWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 53	以下的可变轻链： huAb3VH.1/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1 (CDR 呈粗体)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKS LLHSNGNTYLYWYLQKPGQSPQLLI YRMSTLASGPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFG QGTKLEIK
SEQ ID NO: 54	以下的可变重链： huAb3VH.1B/VL.1 huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1B (CDR 呈粗体)	EVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKAS GYTFTSYTMHWVRQAPGQGLEWM GYINPSSDYPNQNKFKDRVTLTAD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR WGYSFDYWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 55	以下的可变重链： huAb3VH.1A/VL.1 huAb3VH.1A/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1B (CDR 呈粗体)	EVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKAS GYTFTSYTMHWVRQAPGQGLEWIG YINPSSDYPNQNKFKDRATLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARW GYSF D YWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 56	以下的可变轻链： huAb3VH.1/VL.1A huAb3VH.1B/VL.1A huAb3VH.1A/VL.1A (CDR 呈粗体)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKS LLHSNGNTYLYWFLQKPGQSPQYLI YRMSTLASGPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFG QGTKLEIK
SEQ ID NO: 57	以下的可变轻链： huAb3VH.1/VL.1B huAb3VH.1B/VL.1B huAb3VH.1A/VL.1B (CDR 呈粗体)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKS LLHSNGNTYLYWYLQKPGQSPQYLI YRMSTLASGPDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFG QGTKLEIK
SEQ ID NO: 58	以下的重链 CDR2： huAb1v1CDR2v1	YISSGRTNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 59	以下的重链 CDR2： huAb1v1CDR2v2	YISSGRDNIYYADTVKG

[0633]

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO: 60	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v3	YISSGRENIYYADTVKG
SEQ ID NO: 61	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v4	YISSGRRNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 62	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v5	YISSGRVNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 63	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v6	YISSGRLNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 64	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v8	YISSGRINIYYADTVKG
SEQ ID NO: 65	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v9	YISSGRQNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 66	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v10	YISSGRWNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 67	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v11	YISSGRMNIYYADTVKG
[0634] SEQ ID NO: 68	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v12	YISSGRKNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 69	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v13	YISSGRHNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 70	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v14	YISSGRFNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 71	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v15	YISSGRYNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 72	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v16	YISSGRANIYYADTVKG
SEQ ID NO: 73	以下的重链 CDR2: huAb1v1CDR2v17	YISSGRPNIYYADTVKG
SEQ ID NO: 74	以下的轻链 CDR1: huAb1v4	KSSQSLLNPGNQKNYLT
SEQ ID NO: 75	以下的可变重链: Ab2 (鼠类) (CDR 呈粗体)	EVQLVESGGGLVPGGSLKVSCAAS GFTFSDYGMNWVRQSPEKGLEWIAY ISSSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAK NTLFLQMTSLRSEDTAMYCARSWG YFDVWGTGTTVTVSS

序列识别符	蛋白质	序列
SEQ ID NO: 76	以下的可变轻链： Ab2 (鼠类) (CDR 呈粗体)	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSS QSLLNSGNQKNYLTWFQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDFRTGSGSGTDF TLTISSVQAEDLAVYYC QNDYTYPLT FGAGTKLELK
SEQ ID NO: 77	以下的可变轻链： huAb1v4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ SLLNPGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLL IYWASTRESGVPDFRSGSGSGTDFLT ISLQAEDVAVYYC QNDYTYPLTFGQ GTKLEIK
SEQ ID NO: 78	可变重链 CDR1 的共 有序列	G(F/Y)TF(S/T)(D/S)Y(G/T)M(N/H)
SEQ ID NO: 79	可变重链 CDR2 的共 有序列	YI(S/N)(S/P)(G/S)(R/S)(D/S/G)(N/Y)(I/P) (Y/N)Y(A/N)(D/Q)(T/K)(V/F)K (G/D)
SEQ ID NO: 80	可变重链 CDR3 的共 有序列	(S/W)(W/G)(G/Y)(Y/S)FDV
SEQ ID NO: 81	人类 Igλ 恒定区	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV ETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVEAPTEC S
SEQ ID NO: 82	人类重链受体序列 VH1-18&JH6 FR1 21/28&JH4 FR1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFT
SEQ ID NO: 83	人类重链受体序列 VH1-18&JH6 FR2	WVRQAPGQGLEWMG

序列识别符	蛋白质	序列
-------	-----	----

SEQ ID NO:84	人类重链受体序列 VH1-18&JH6 FR3	RVTMTTDTSAYMELRSLRSDDT AVYYCAR
SEQ ID NO:85	人类重链受体序列 VH1-18&JH6 FR4 VH2-26&JH6 FR4 VH1-46&JH6 FR4	WGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:86	人类重链受体序列 21/28&JH4 FR2	WVRQAPGQRLEWMG
SEQ ID NO:87	人类重链受体序列 21/28&JH4 FR3	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDT AVYYCAR

SEQ ID NO:88	人类重链受体序列 21/28&JH4 FR4 M60&JH4 FR4	WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:89	人类重链受体序列 VH2-26&JH6 FR1	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVS GFSLS
SEQ ID NO:90	人类重链受体序列 VH2-26&JH6 FR2	WIRQPPGKALEWLAH
SEQ ID NO:91	人类重链受体序列 VH2-26&JH6 FR3	RLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVD TATYYCAR
SEQ ID NO:92	人类重链受体序列 M60&JH4 FR1	QVTLRESPALVKPTQTLTLTCTLY GFSLS
SEQ ID NO:93	人类重链受体序列 M60&JH4 FR2	WIRQPPGKALEWLA
SEQ ID NO:94	人类重链受体序列 M60&JH4 FR3	RLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVD TATYYCAR

序列识别符	蛋白质	序列
-------	-----	----

[0636]

SEQ ID NO:95	人类重链受体序列 VH1-46&JH6 FR3	RVTMTRDTSTVYMELOSSLRSED TAVYYCAR
SEQ ID NO:96	人类轻链受体序列 A20&JK4 FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC
SEQ ID NO:97	人类轻链受体序列 A20&JK4 FR2	WYQQKPGKVPKLLIY
SEQ ID NO:98	人类轻链受体序列 A20&JK4 FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED VATYYC
SEQ ID NO:99	人类轻链受体序列 A20&JK4 FR4 III-3R&JK4 FR4 A1&JK4 FR4	FGGGTKVEIKR
SEQ ID NO:100	人类轻链受体序列 III-3R&JK4 FR3	GVPSRISGSGSGTDFTFTISSLQPEDI ATYYC
SEQ ID NO:101	人类轻链受体序列 A1&JK4 FR1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC
SEQ ID NO:102	人类轻链受体序列 A1&JK4 FR2	WFQQRPGQSPRRLIY
SEQ ID NO:103	人类轻链受体序列 A1&JK4 FR3 01&JK2 FR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYC

SEQ ID NO:104	人类轻链受体序列 01&JK2 FR1	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISC
SEQ ID NO:105	人类轻链受体序列 01&JK2 FR2	WYLQKPGQSPQLLIY

序列识别符	蛋白质	序列
-------	-----	----

SEQ ID NO:106	人类轻链受体序列 01&JK2 FR4	FGQGTKLEIKR	
SEQ ID NO:107	人类 CD40 细胞外域	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPG QKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLD TWNRETHCHQHKYCDPNLGLRV QQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEA CESCV	
SEQ ID NO:108	可变轻链 CDR1 的共 有序列	(K/R)SS(Q/K)SLL(N/H)S(G/-)N(Q/G) (K/N)(N/T)YL(T/Y)	
[0637]	SEQ ID NO:109	可变轻链 CDR2 的共 有序列	(W/R)(A/M)ST(R/L)(E/A)S
SEQ ID NO:110	可变轻链 CDR3 的共 有序列	(Q/M)(N/Q)(D/H)(Y/L)(T/E)YPLT	
SEQ ID NO:111	重链 CDR2	YISSGRXNIYYADTVKG 其中 “X” 为除 T、D、V、L、I、 M 以外的任何氨基酸	
SEQ ID NO:112	重链 CDR2	YISSGRXNIYYADTVKG 其中 “X” 为任何氨基酸	
SEQ ID NO:113	轻链 CDR1	KSSQSLLNXGNQKNYLT 其中 “X” 不为氨基酸残基 Pro	
SEQ ID NO:114	人类轻链受体序列 III-3R&JK4 FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	
SEQ ID NO:115	组氨酸标签	His His His His His His	

序列表

<110> 艾伯维公司 (ABBVIE, INC.)

<120> 抗CD40抗体及其用途

<130> 117813-10420

<140>

<141>

<150> 62/168, 425

<151> 2015-05-29

<160> 117

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met	Val	Arg	Leu	Pro	Leu	Gln	Cys	Val	Leu	Trp	Gly	Cys	Leu	Leu	Thr
1					5				10					15	

[0001]

Ala	Val	His	Pro	Glu	Pro	Pro	Thr	Ala	Cys	Arg	Glu	Lys	Gln	Tyr	Leu
							20		25			30			

Ile	Asn	Ser	Gln	Cys	Cys	Ser	Leu	Cys	Gln	Pro	Gly	Gln	Lys	Leu	Val
						35		40				45			

Ser	Asp	Cys	Thr	Glu	Phe	Thr	Glu	Thr	Glu	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Glu
					50			55			60				

Ser	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Trp	Asn	Arg	Glu	Thr	His	Cys	His	Gln	His
65					70				75			80			

Lys	Tyr	Cys	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr
					85				90			95			

Ser	Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Cys	Thr	Cys	Glu	Glu	Gly	Trp	His	Cys	Thr
					100			105				110			

Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Cys	Val	Leu	His	Arg	Ser	Cys	Ser	Pro	Gly
						115		120			125				

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
 130 135 140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
 145 150 155 160

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
 165 170 175

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
 180 185 190

Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
 195 200 205

Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
 210 215 220

Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
 225 230 235 240

[0002] Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
 245 250 255

Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
 260 265 270

Val Gln Glu Arg Gln
 275

<210> 2
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 2
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Scr
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

[0003]

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 3
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

[0004] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

[0005] Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 [0006] 100 105

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

[0007] <400> 6
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 7
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 8

Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 9

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

[0008]

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

Lys

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 10

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Thr

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 11

[0009] Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 12

Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 13

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 13

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10				15		

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
								20		25		30			

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
					35			40			45				

Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Ser	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val
		50				55				60					

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70				75			80			

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85			90		95					

Ala	Arg	Ser	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
					100			105			110				

Thr	Val	Ser	Ser												
		115													

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 14

Asp	Ile	Val	Mct	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10				15		

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
					20			25			30				

Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
					35			40			45				

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 15

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

[0011] <223> /注释=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100

105

110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 16
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 16
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0012] 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 17
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 17

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Lcu	Leu	Asn	Leu	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu
1				5				10						15	

Thr

<210> 18

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 18

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		

[0013]

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Thr
					20			25				30			

Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
					35			40			45				

Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
					50			55			60				

Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr		
					65			70			75		80		

Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn
					85				90				95		

Asp	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
					100			105				110			

Lys

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 肽"

<400> 19

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Thr	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu
1				5				10						15	

Thr

<210> 20
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 多肽"

[0014]

<400> 20

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5				10					15		

Glu	Arg	Ala	Thr	Ile	Asn	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Arg
					20			25					30		

Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
				35			40				45				

Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
					50			55			60				

Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr		
	65			70				75			80				

Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn
					85			90					95		

Asp	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile
				100			105					110			

Lys

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

Thr

[0015] <210> 22
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Thr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 23
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0016] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

[0017] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 25

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 25

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

[0018]

<210> 26

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Val Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 27

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 27

[0019] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Leu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 28
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 多肽"

<400> 28

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5				10				15			

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
								20		25		30			

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
						35		40			45				

[0020]	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val
							50		55		60					

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65					70				75			80			

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
								85		90		95			

Ala	Arg	Ser	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
						100		105			110				

Thr	Val	Ser	Ser												
			115												

<210> 29
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 多肽"

<400> 29

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10			15		

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
								20		25		30			

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
					35			40			45				

Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Ile	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val
						50		55		60					

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
						65		70		75			80		

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
							85		90			95			

Ala	Arg	Ser	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
					100			105			110				

[0021]

Thr	Val	Ser	Ser
	115		

<210> 30

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 30

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5					10			15		

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
								20		25		30			

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
					35			40			45				

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gln Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

[0022] <223> /注释=“人工序列的描述：合成
 多肽”

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Trp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100

105

110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 32
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Met Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

220

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 33

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
				20				25				30			

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				35				40			45				

Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Lys	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val
					50			55			60				

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
				65			70		75				80		

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90				95		

Ala	Arg	Ser	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
					100			105					110		

Thr	Val	Ser	Ser												
			115												

<210> 34

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 34

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5				10				15			

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
				20				25				30			

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg His Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 35

<211> 116

<212> PRT

[0025] <213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Phe Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 36
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述：合成
 多肽”

<400> 36
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 [0026] 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 37
 <211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 37

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
				20				25				30			

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
					35			40			45				

Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Ala	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val
					50			55			60				

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
65				70					75				80		

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85			90				95			

Ala	Arg	Ser	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
					100			105					110		

Thr	Val	Ser	Ser												
			115												

<210> 38

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 38

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Pro Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

[0028]

<210> 39
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释=“人工序列的描述：合成
多肽”

<400> 39
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

	65	70	75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90		95
	Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val			
	100	105		110
	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
	115	120		125
	Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
	130	135		140
	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
	145	150	155	160
	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
	165	170		175
[0029]	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
	180	185		190
	Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
	195	200	205	
	Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
	210	215	220	
	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe			
	225	230	235	240
	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
	245	250		255
	Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
	260	265		270
	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
	275	280		285
	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			

290

295

300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

[0030] Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 40
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

- <220>
- <221> 来源
- <223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

[0031]

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 41

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 41

Glu	Val	Gln	Lcu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5				10				15			

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
				20				25				30			

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
				35				40				45			

Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val
				50				55				60			

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
				65				70			75			80	

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85				90				95		

[0032]

Ala	Arg	Ser	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
					100				105				110		

Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala
					115			120				125			

Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu
					130			135				140			

Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
					145			150			155			160	

Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
					165				170			175			

Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Leu	
					180			185				190			

Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
					195			200			205				

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Gln Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

[0033]

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 42
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gly Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 43
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

[0034]

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 43
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Leu
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn

85

90

95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 44

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 44

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Phe Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 [0035] 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45
 <211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 45

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Met His
1 5 10

<210> 46

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 46

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

[0036]

Asp

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 47

Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr
1 5

<210> 48

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 48

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ile	Pro	Gly
1				5					10				15		

Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
								25					30		

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
							40				45				

Pro	Gln	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
							50			55		60			

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Arg	Ile		
							65			70		75		80	

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
							85			90			95		

Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
							100			105		110			

[0037]

<210> 49

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 49

Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr
1					5				10				15		

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 50

Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 51
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 52
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

[0038]

<400> 52
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 53
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

[0039] Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 54
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 54

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

[0040] Thr Val Ser Ser
 115

<210> 55
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述：合成
 多肽”

<400> 55
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Asp Tyr Pro Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Gly Tyr Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 56

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成
多肽”

[0041]

<400> 56

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Tyr Leu Ile Tyr Arg Met Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 57

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 57

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1															15

Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
															30

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
															45

Pro	Gln	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
															60

[0042]

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65															80

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
															95

Leu	Glu	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
															110

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 58

Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Thr	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	Lys
1															15

Gly

<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 59
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 60
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

[0043]

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 60
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 61
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 62
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Val Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

[0044]

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 63
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Leu Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 64
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ile Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 65
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Gln Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

[0045] <210> 66
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 66
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Trp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 67
Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Met Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 68

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Lys Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

[0046]

<210> 69

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 69

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg His Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 70

Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Phe Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 肽"

<400> 71
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Tyr Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

[0047] <210> 72
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 肽"

<400> 72
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Ala Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 肽"

<400> 73

Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	Lys
1								10						15	

Gly

<210> 74

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
肽"

<400> 74

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Pro	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu
1					5				10				15		

Thr

[0048]

<210> 75

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

<400> 75

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5				10				15			

Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
						20		25				30			

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
						35		40			45				

Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Arg	Gly	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val
						50		55			60				

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe

Ala Arg Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 76
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成
多肽"

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

<210> 77
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 多肽"

<400> 77
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Pro
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

[0050]

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 78
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 共有序列"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (2)..(2)
 <223> /置换="Tyr"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (5)..(5)
 <223> /置换="Thr"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (6)..(6)
 <223> /置换="Ser"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (8)..(8)
 <223> /置换="Thr"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (10)..(10)
 <223> /置换="His"

<400> 78
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Met Asn
 [0051] 1 5 10

<210> 79
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 共有序列"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (3)..(3)
 <223> /置换="Asn"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (4)..(4)
 <223> /置换="Pro"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (5)..(6)
 <223> /置换="Ser"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (7)..(7)
 <223> /置换="Ser"或"Gly"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (8)..(8)
 <223> /置换="Tyr"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (9)..(9)
 <223> /置换="Pro"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (10)..(10)
 <223> /置换="Asn"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (12)..(12)
 <223> /置换="Asn"

[0052] <220>
 <221> 变异体
 <222> (13)..(13)
 <223> /置换="Gln"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (14)..(14)
 <223> /置换="Lys"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (15)..(15)
 <223> /置换="Phe"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (17)..(17)
 <223> /置换="Asp"

<400> 79
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 80
 <211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成
共有序列"

<220>

<221> 变异体

<222> (1)..(1)

<223> /置换="Trp"

<220>

<221> 变异体

<222> (2)..(2)

<223> /置换="Gly"

<220>

<221> 变异体

<222> (3)..(3)

<223> /置换="Tyr"

<220>

<221> 变异体

<222> (4)..(4)

[0053] <223> /置换="Ser"

<400> 80

Ser Trp Gly Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 81

<211> 105

<212> PRT

<213> 智人

<400> 81

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 82

<211> 30

<212> PRT

<213> 智人

<400> 82

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 83

[0054] <211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 83

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 84

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 84

Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 85

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 86
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 86
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 87
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 87
 Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

[0055] <210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 88
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 89
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 89
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

<210> 90
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 90
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala His
 1 5 10 15

<210> 91
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 91
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 92
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 92
 Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

[0056]

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Tyr Gly Phe Ser Leu Ser
 20 25 30

<210> 93
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 93
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 94
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 94
 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr
 1 5 10 15

Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 95
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 95
 Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 96
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 96
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

[0057]

<210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 97
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 98
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 98
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 99
 <211> 11

<212> PRT
 <213> 智人

<400> 99
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 100
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 100
 Gly Val Pro Ser Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 101
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 智人

[0058]

<400> 101
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Scr Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

<210> 102
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 102
 Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 103
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 103
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 104
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 104
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 105
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 105
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

[0059]

<210> 106
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 106
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 107
<211> 100
<212> PRT
<213> 智人

<400> 107
Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln
1 5 10 15

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr
20 25 30

Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu
35 40 45

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp
 50 55 60

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp
 65 70 75 80

Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys
 85 90 95

Glu Ser Cys Val
 100

<210> 108
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 共有序列"

[0060] <220>
 <221> 变异体
 <222> (1)..(1)
 <223> /置换="Arg"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (4)..(4)
 <223> /置换="Lys"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (8)..(8)
 <223> /置换="His"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (10)..(10)
 <223> /置换=""

<220>
 <221> 变异体
 <222> (12)..(12)
 <223> /置换="Gly"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (13)..(13)
 <223> /置换="Asn"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (14)..(14)
 <223> /置换="Thr"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (17)..(17)
 <223> /置换="Tyr"

<400> 108
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0061] <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述：合成
 共有序列"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (1)..(1)
 <223> /置换="Arg"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (2)..(2)
 <223> /置换="Met"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (5)..(5)
 <223> /置换="Leu"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (6)..(6)
 <223> /置换="Ala"

<400> 109
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 110
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 共有序列"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (1)..(1)
 <223> /置换="Met"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (2)..(2)
 <223> /置换="Gln"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (3)..(3)
 <223> /置换="His"

[0062] <220>
 <221> 变异体
 <222> (4)..(4)
 <223> /置换="Leu"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (5)..(5)
 <223> /置换="Glu"

<400> 110
 Gln Asn Asp Tyr Thr Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 111
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 肽"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> 除Thr、Asp、Val、Leu、Ile或Met以外的任何氨基酸

<400> 111
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Xaa Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 112
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 肽"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> 任何氨基酸

[0063] <400> 112
 Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Xaa Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成
 肽"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> 除Pro以外的任何氨基酸

<400> 113
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Xaa Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Thr

<210> 114
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 114
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 115
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成
6xHis标签"

<400> 115
His His His His His His
1 5

[0064]

<210> 116
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成
共有序列"

<220>
<221> 变异体
<222> (18)..(18)
<223> /置换="Met"或"Lys"

<220>
<221> 变异体
<222> (24)..(24)
<223> /置换="Arg"

<220>
<221> 变异体
<222> (27)..(27)
<223> /置换="Lys"

<220>

<221> 变异体
<222> (31)..(31)
<223> /置换="His"

<220>
<221> 变异体
<222> (33)..(33)
<223> /置换=""

<220>
<221> 变异体
<222> (35)..(35)
<223> /置换="Gly"

<220>
<221> 变异体
<222> (36)..(36)
<223> /置换="Asn"

<220>
<221> 变异体
<222> (37)..(37)
<223> /置换="Thr"

<220>
<221> 变异体
<222> (40)..(40)
<223> /置换="Tyr"

[0065]

<220>
<221> 变异体
<222> (56)..(56)
<223> /置换="Arg"

<220>
<221> 变异体
<222> (57)..(57)
<223> /置换="Met"

<220>
<221> 变异体
<222> (60)..(60)
<223> /置换="Leu"

<220>
<221> 变异体
<222> (61)..(61)
<223> /置换="Ala"

<220>
<221> 变异体
<222> (95)..(95)
<223> /置换="Met"

<220>
<221> 变异体

<222> (96)..(96)
 <223> /置换="Gln"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (97)..(97)
 <223> /置换="His"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (98)..(98)
 <223> /置换="Leu"

<220>
 <221> 变异体
 <222> (99)..(99)
 <223> /置换="Glu"

<400> 116

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Thr	Ala	Gly
1															15

Glu	Ser	Val	Thr	Met	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser
															30

[0066]	Gly	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Thr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln
																45

Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
50															

Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65															80

Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Asn
															95

Asp	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu
															110

Lys

<210> 117
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成
共有序列"

<220>
<221> 变异体
<222> (27)..(27)
<223> /置换="Tyr"

<220>
<221> 变异体
<222> (30)..(30)
<223> /置换="Thr"

<220>
<221> 变异体
<222> (31)..(31)
<223> /置换="Ser"

<220>
<221> 变异体
<222> (33)..(33)
<223> /置换="Thr"

[0067] <220>
<221> 变异体
<222> (35)..(35)
<223> /置换="His"

<220>
<221> 变异体
<222> (52)..(52)
<223> /置换="Asn"

<220>
<221> 变异体
<222> (53)..(53)
<223> /置换="Pro"

<220>
<221> 变异体
<222> (54)..(54)
<223> /置换="Scr"

<220>
<221> 变异体
<222> (55)..(55)
<223> /置换="Ser"

<220>
<221> 变异体
<222> (56)..(56)
<223> /置换="Ser"或"Gly"

<220>
<221> 变异体
<222> (57)..(57)
<223> /置换="Tyr"

<220>
<221> 变异体
<222> (58)..(58)
<223> /置换="Pro"

<220>
<221> 变异体
<222> (59)..(59)
<223> /置换="Asn"

<220>
<221> 变异体
<222> (61)..(61)
<223> /置换="Asn"

<220>
<221> 变异体
<222> (62)..(62)
<223> /置换="Gln"

[0068] <220>
<221> 变异体
<222> (63)..(63)
<223> /置换="Lys"

<220>
<221> 变异体
<222> (64)..(64)
<223> /置换="Phe"

<220>
<221> 变异体
<222> (66)..(66)
<223> /置换="Asp"

<220>
<221> 变异体
<222> (99)..(99)
<223> /置换="Trp"

<220>
<221> 变异体
<222> (100)..(100)
<223> /置换="Gly"

<220>
<221> 变异体
<222> (101)..(101)
<223> /置换="Tyr"

<220>

<221> 变异体

<222> (102)..(102)

<223> /置換="Ser"

<400> 117

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		

Ser	Leu	Lys	Val	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
								25				30			

Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
					35			40				45			

[0069] Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Arg Asp Asn Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe
65					70				75				80		

Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
					85			90				95			

Ala	Arg	Ser	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Thr	Gly	Thr	Thr	Val
					100			105				110			

Thr	Val	Ser	Ser
		115	

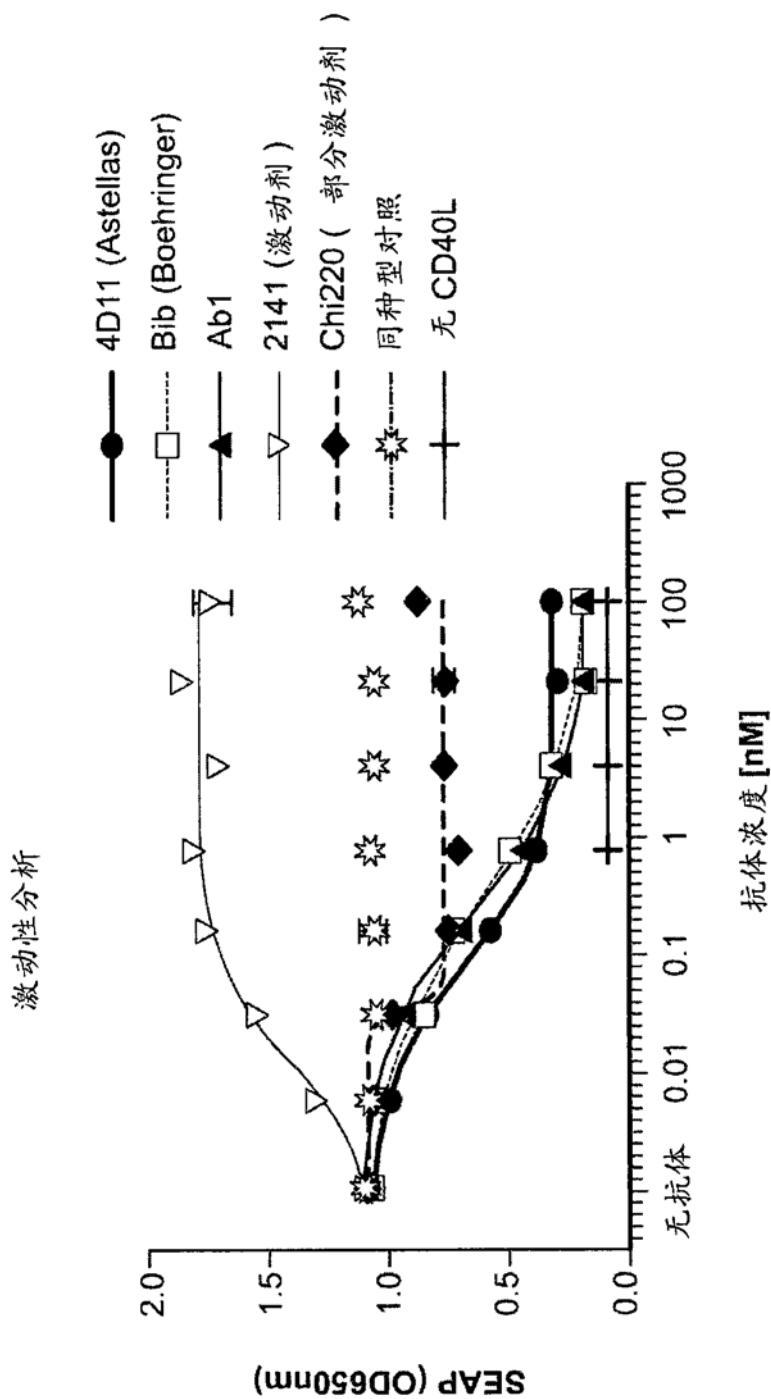


图1A

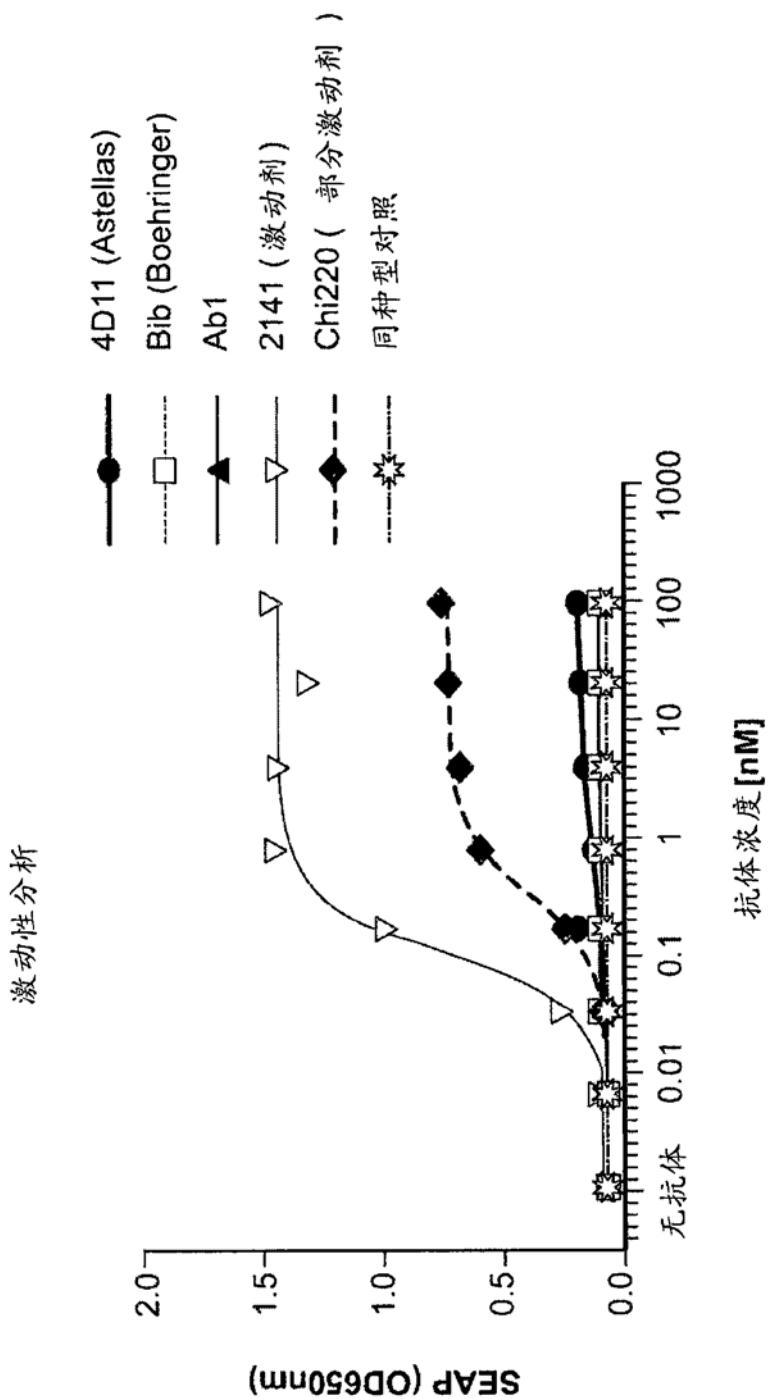


图1B

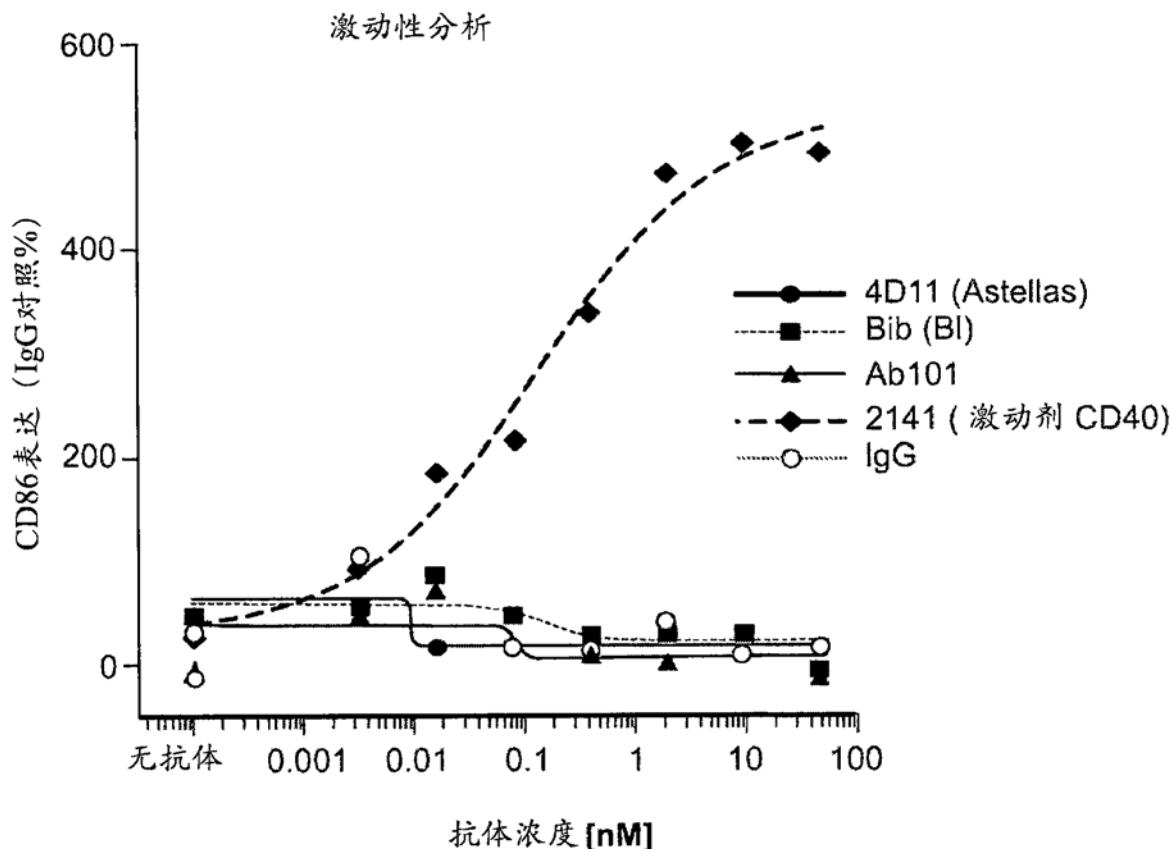


图2A

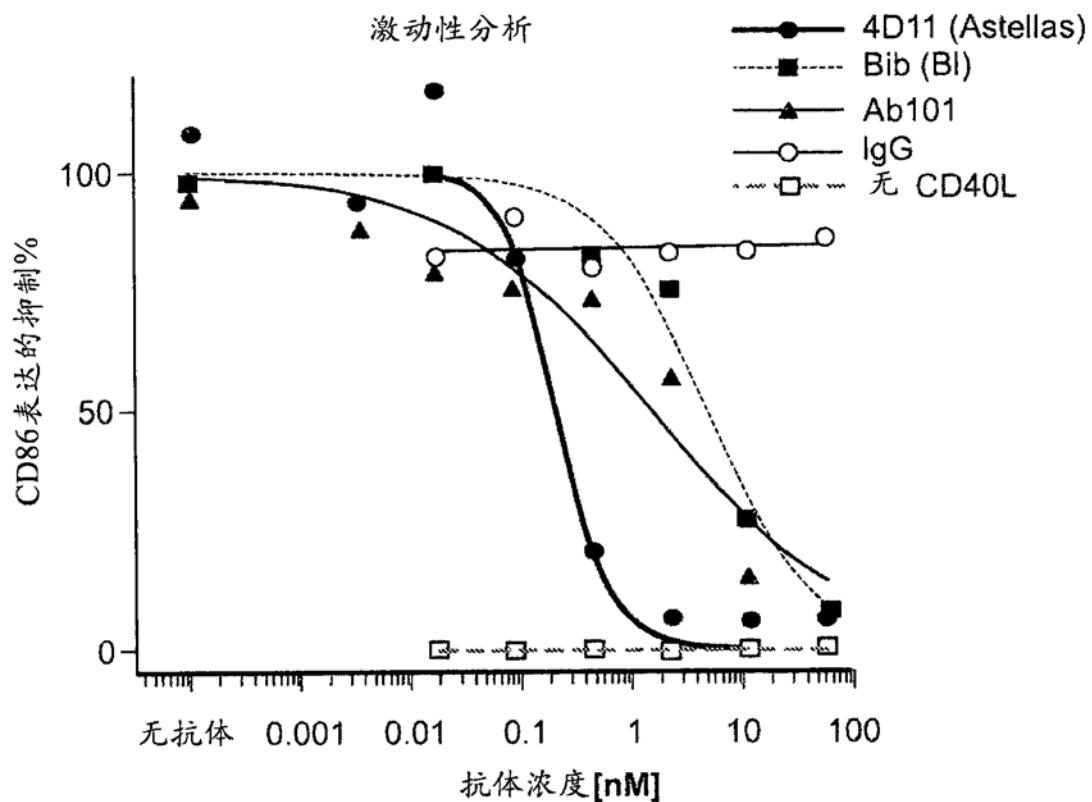


图2B

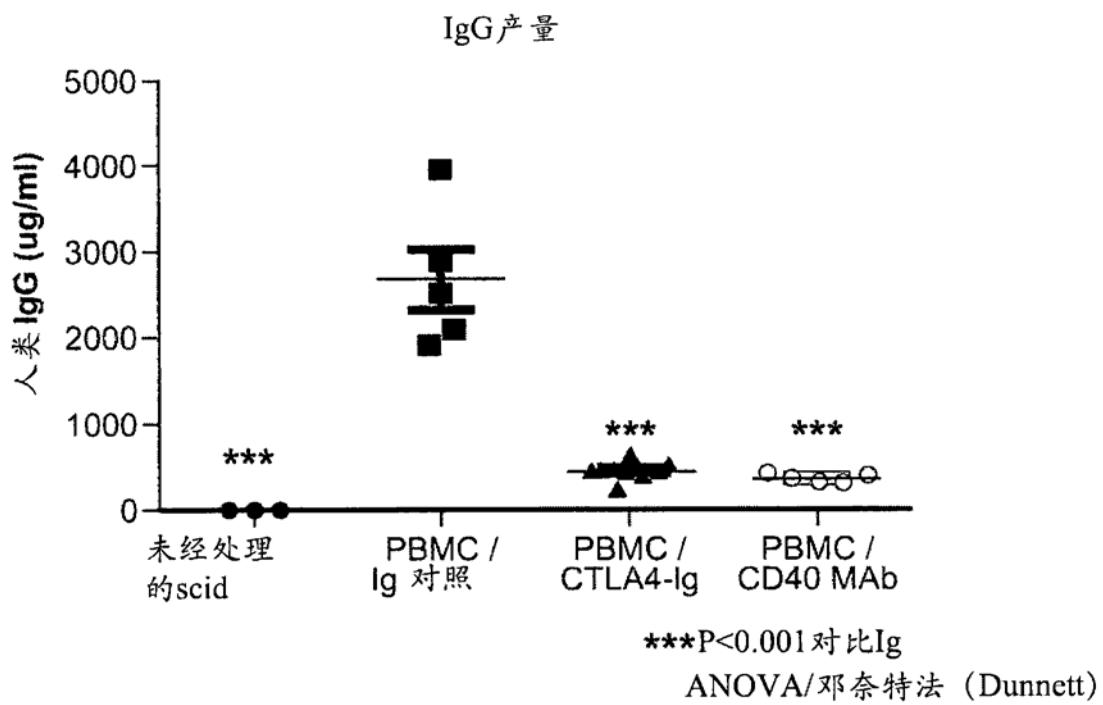


图3A

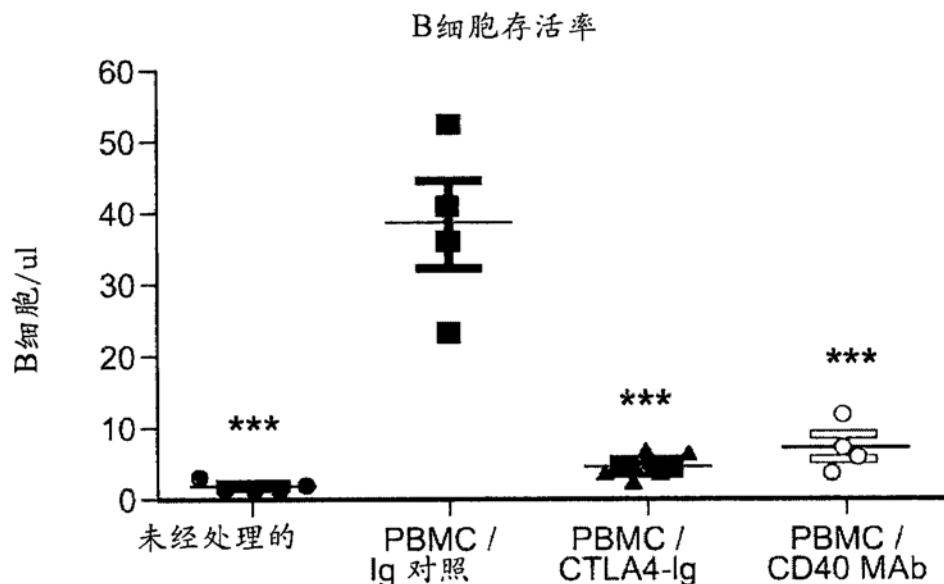


图3B

Ab3 SEQ ID NO: 48 Ab1 SEQ ID NO: 9 Ab2 SEQ ID NO: 76 共有序列	1 (1) DIVMTQAAAPSVISVIPGESVSIISCRSSSKSLLHS-NGNTYLYWFLQRPGQSP (1) DIVMTQSPSSLTVTAGEMVTMSCKSSSQSLLNSGNQKNYLTLWFQQKPGQPP (1) DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSSQSLLNSGNQKNYLTLWFQQKPGQPP (1) DIVMTQSPSSLTVTAGE VTMSCKSSSQSLLNSGNQKNYLTLWFQQKPGQPP	50 R K H - GNT Y	100
		51	
		(50) QYLIYR MSTLAS GVPDRFSGSGTAAFTLRI SRVEAEDVGYYC MQHLEY (51) KLLIY WASTRES GVPDRFAGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC QNDYTY (51) KLLIY WASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC QNDYTY (51) KLLIY WASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC QNDYTY MQHLE	
		RM LA	
		101	
		(100) PLTF GAG TKLELK (101) PLTF GAG TKLELK (101) PLTF GAG TKLELK (101) PLTF GAG TKLELK	
		Ab3 Ab1 Ab2 共有序列	

图4A

				Y	T	S	T	H	
1									100
Ab3	SEQ ID NO: 44 (100)	QVQLQQSGAELARPGASVRM SCKAF GYTFTSYTMHWWVKQRPGQGLEWIGY							
Ab1	SEQ ID NO: 5 (101)	EVQLVESEGGGLVKPG GSLKVS CAAS GFTFSYDGMN WVRQAPEK GLEWIA							
Ab2	SEQ ID NO: 75 (101)	EVQLVESEGGGLVKPG GSLKVS CAAS GFTFSYDGMN WVRQSPEK GLEWIA							
共有序列	(101)	EVQLVESEGGGLVKPG GSLKVS CAAS GFTFSYDGMN WVRQAPEK GLEWIA							
									50
1									
Ab3	(150)	INPSSDYPNYNQKFKD KATILTADKSSSTAYMQQLSSLTSEDSAVYYCAR WG							
Ab1	(151)	ISSGRSNIYYADTVKG RFTISRDNAKNTLFLQM TSLRSEDTAMYYCAR SW							
Ab2	(151)	ISSGRGNIYYADTVKG RFTISRDNAKNTLFLQM TSLRSEDTAMYYCAR SW							
共有序列	(151)	ISSGR NIYYADTVKG RFTISRDNAKNTLFLQM TSLRSEDTAMYYCAR SW							
									51
Ab3	(200)	YSFEDYNGQGTTLV SS							
Ab1	(201)	GYFDVWGTGTTV SS							
Ab2	(201)	GYFDVWGTGTTV SS							
共有序列	(201)	GYFDVWGTGTTV SS							
									101
Ab3									
Ab1									
Ab2									
共有序列									

图4B

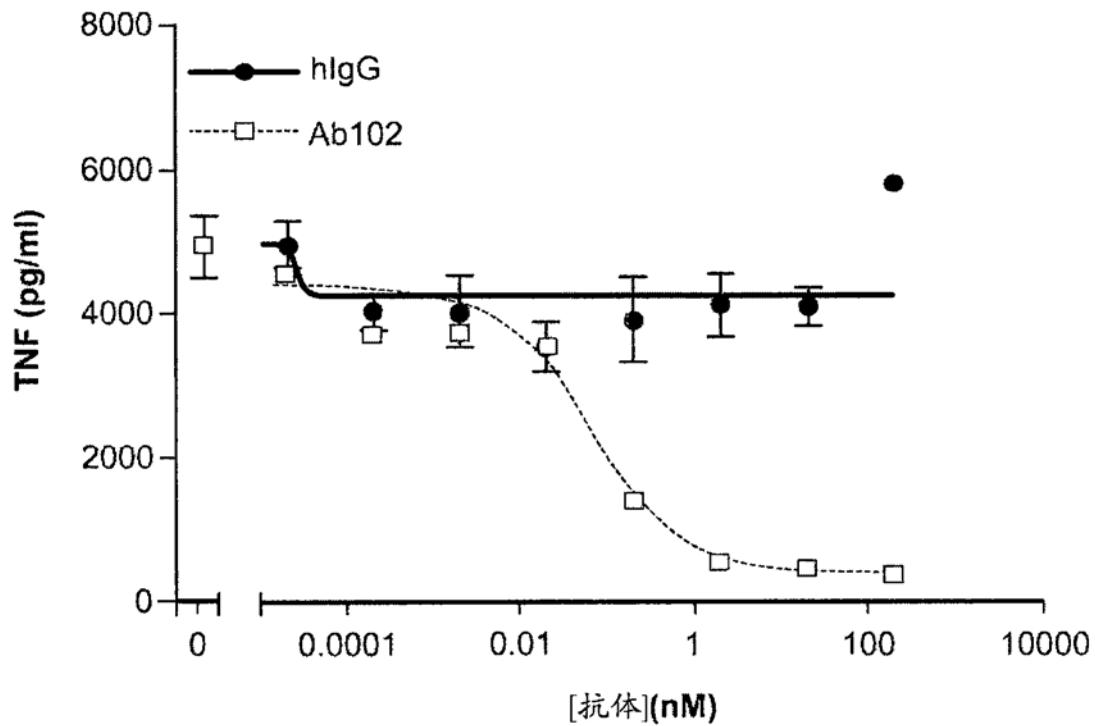


图5A

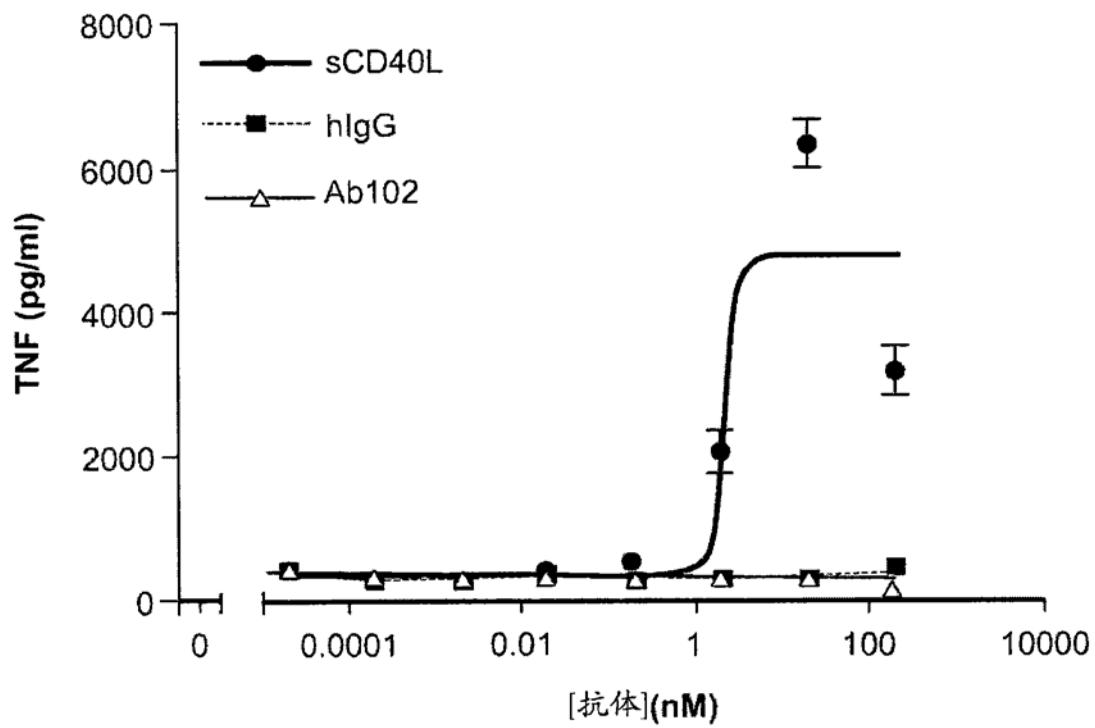


图5B

在TCT中，CD40 MAb的预防性剂量反应

第39天，最终评分

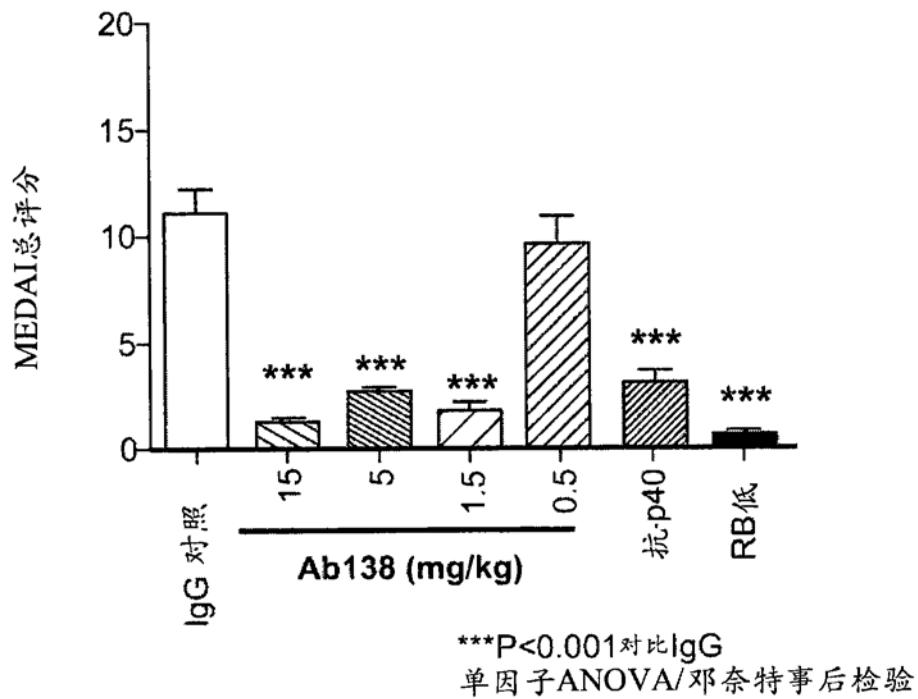


图6

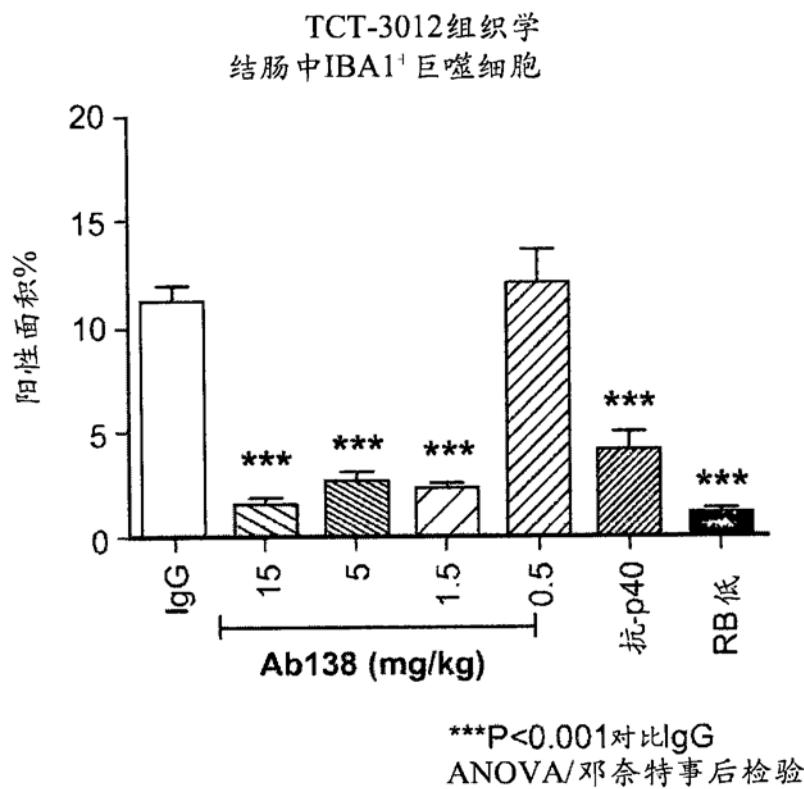
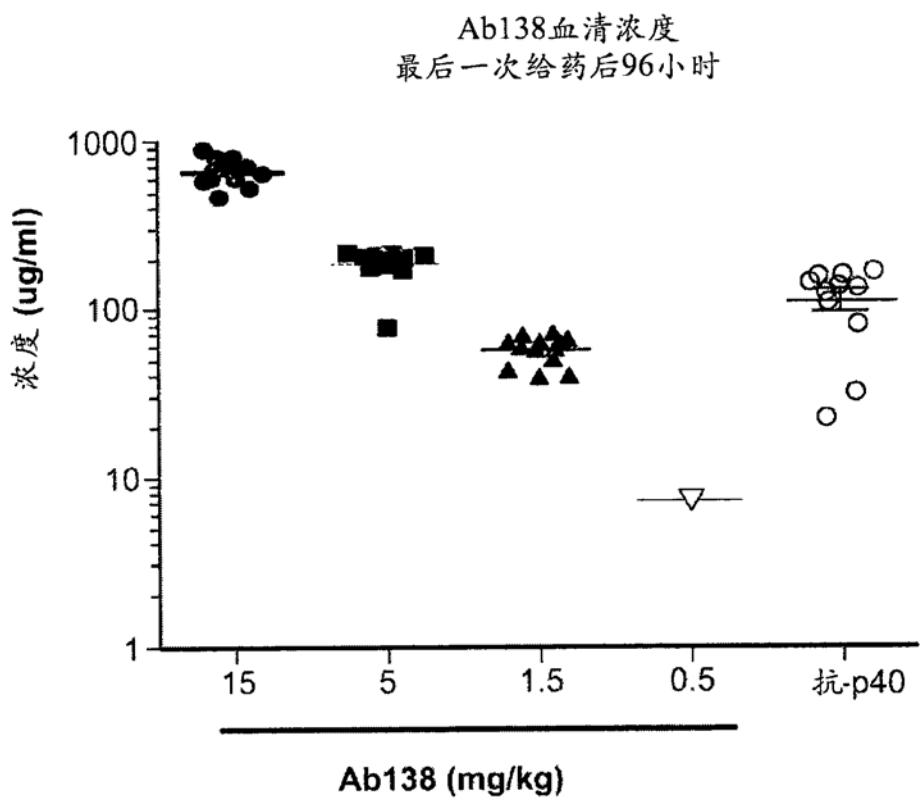


图7



在0.5mg/kg组中仅一只动物具有可检测的
Ab138水平

图8

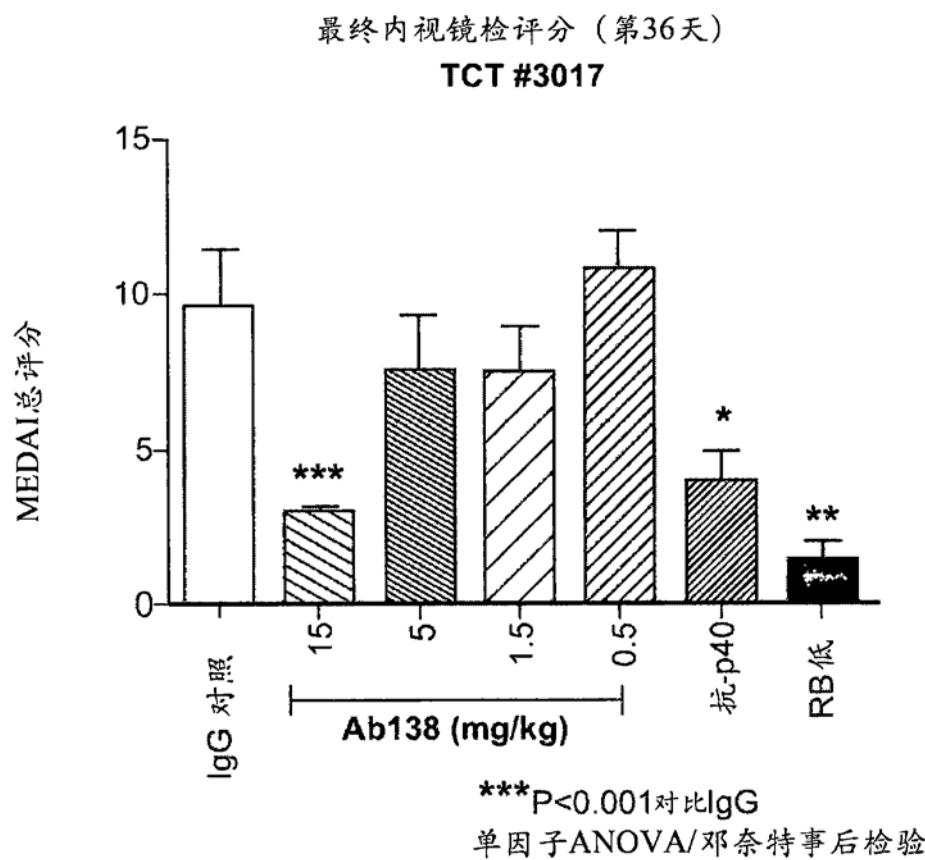
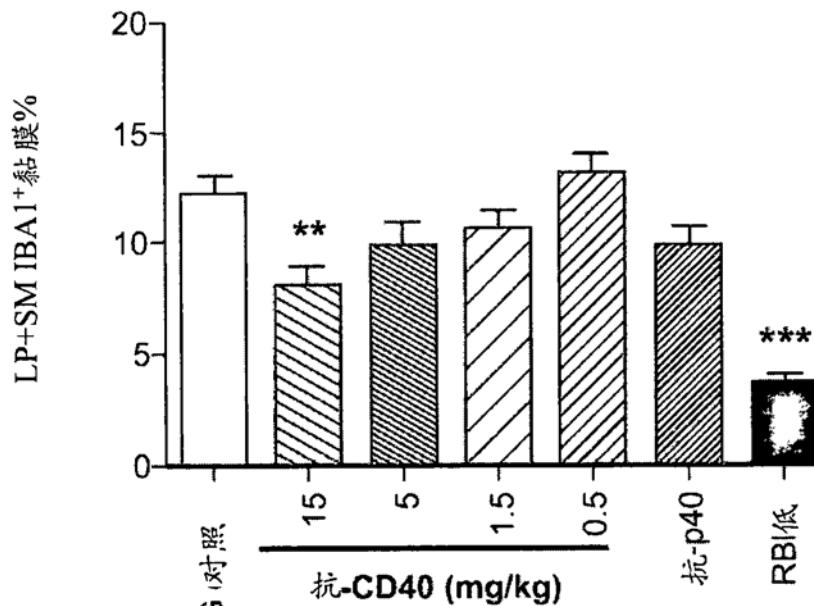


图9A

黏膜中的IBA1⁺巨噬细胞

***P<0.001对比IgG

单因子ANOVA/邓奈特事后检验

图9B

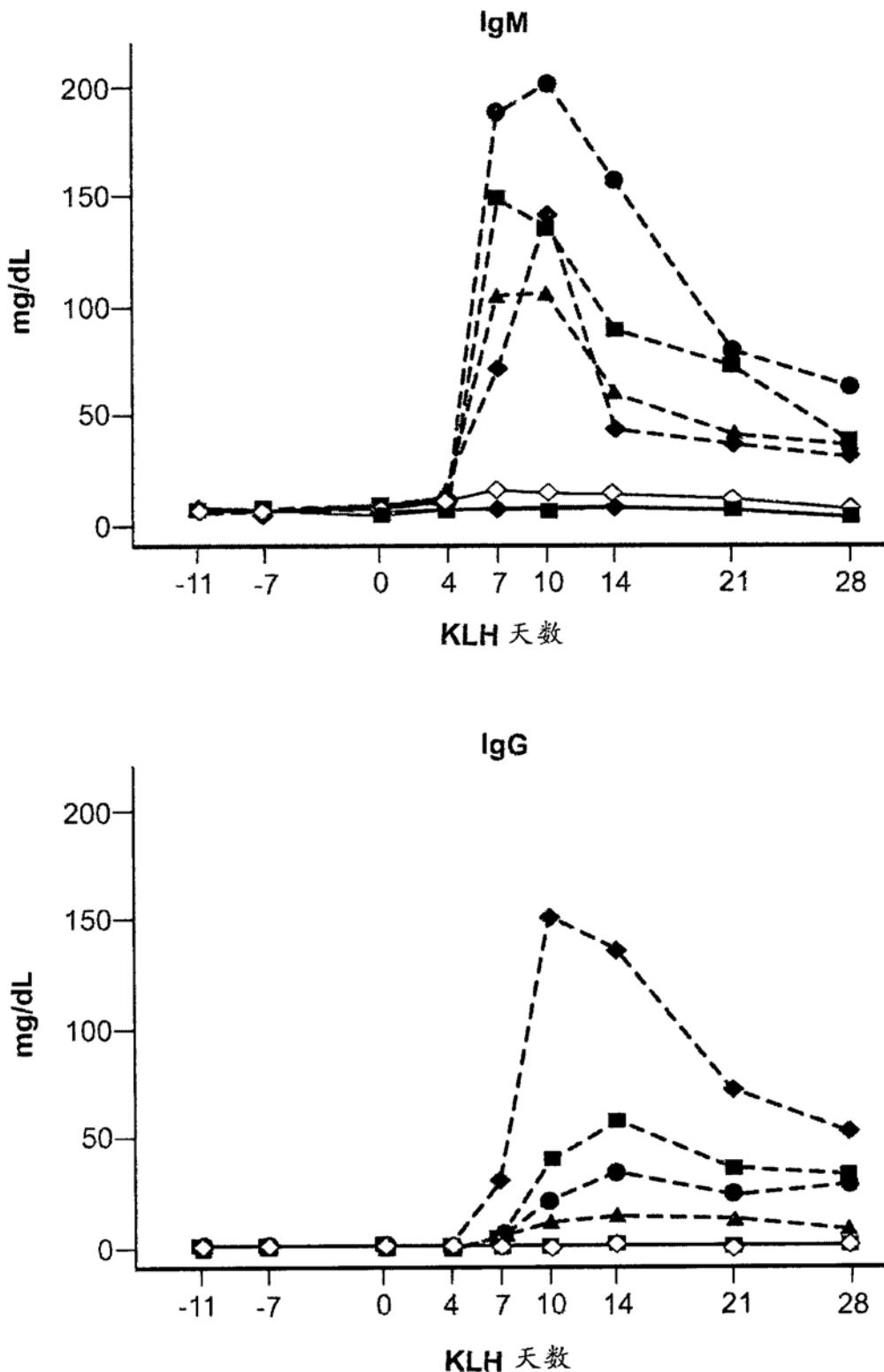


图10

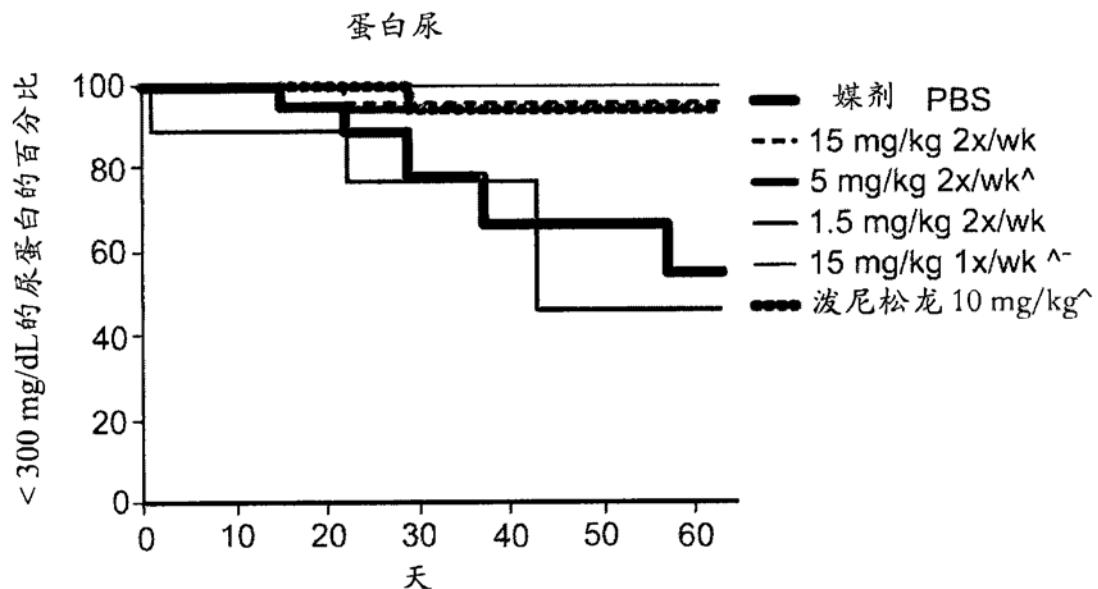
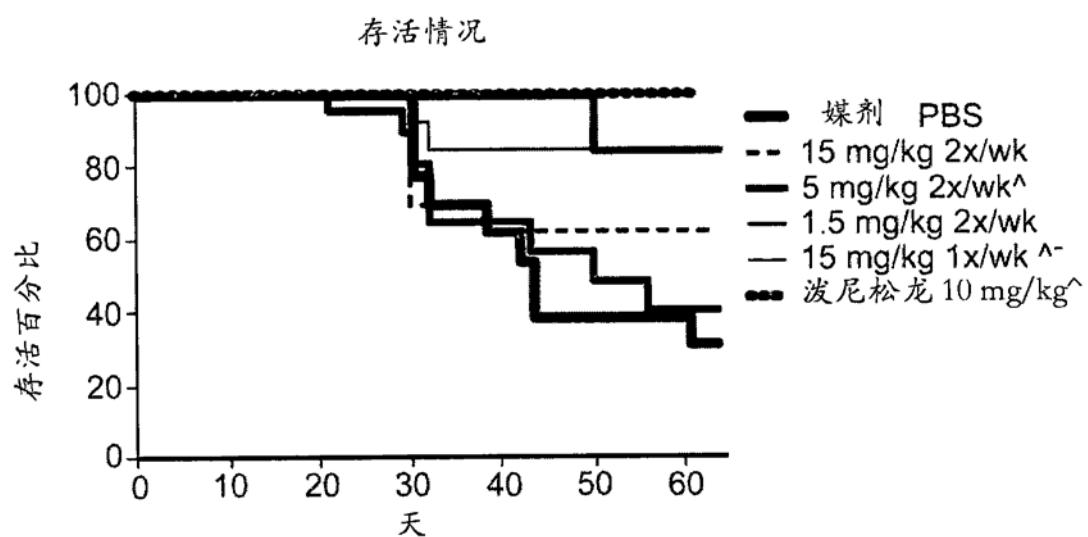


图11A



^存活率 p 值<0.05对数秩曼德尔-考克斯 (Mandel Cox) 检验
-蛋白尿对比各个媒剂对照

图11B

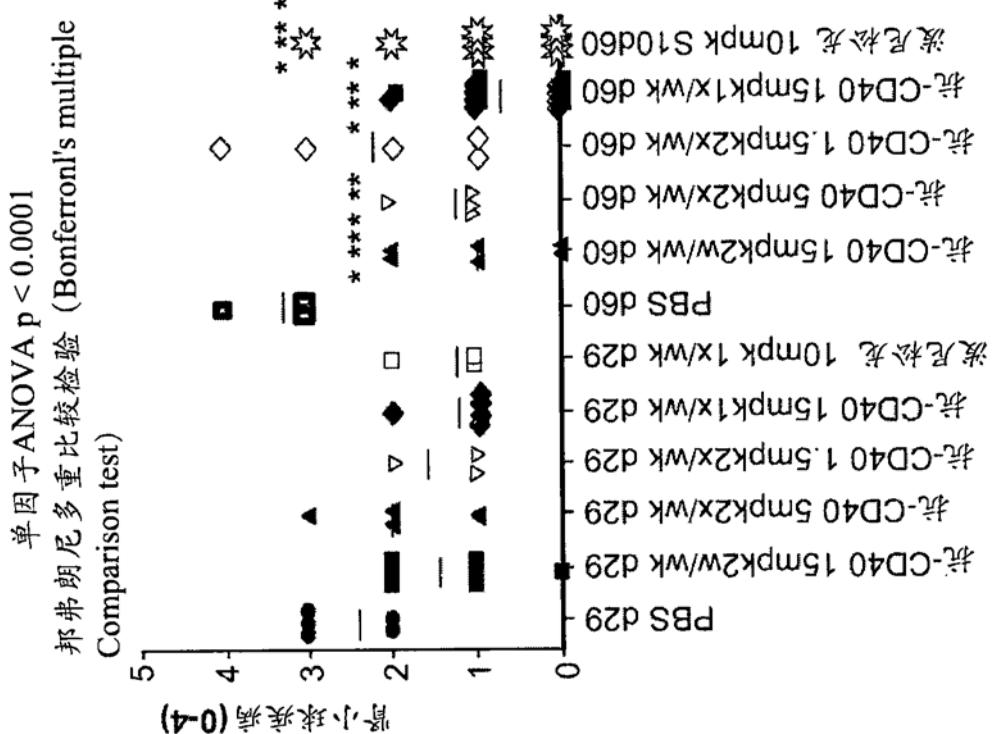


图12A

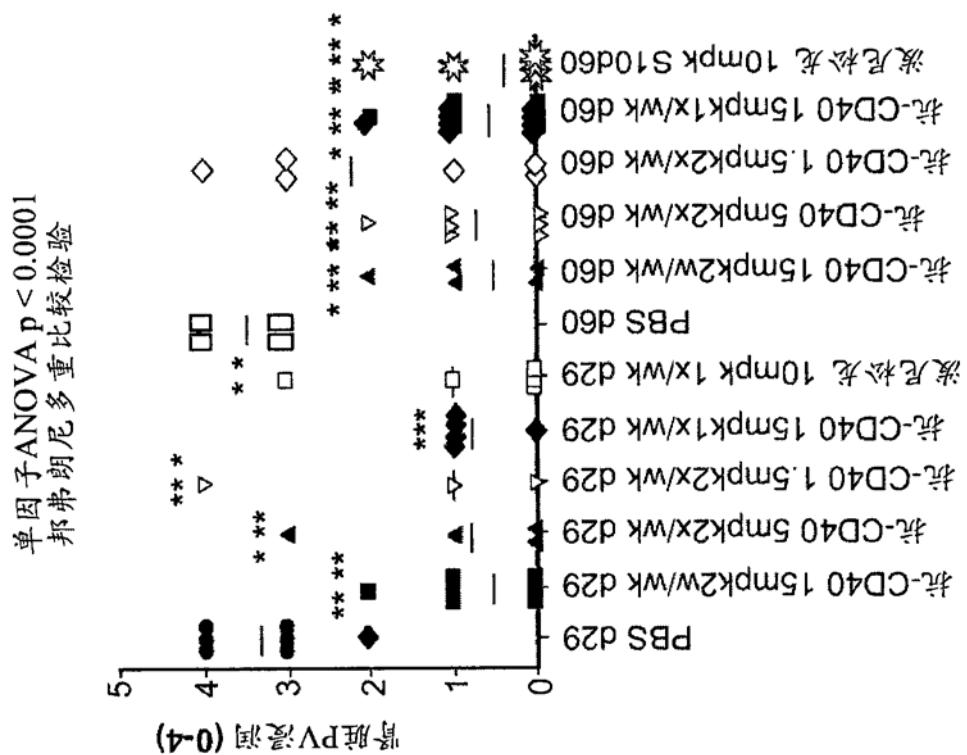


图12B

单因子ANOVA $p < 0.0009$
邦弗朗尼多重比较检验

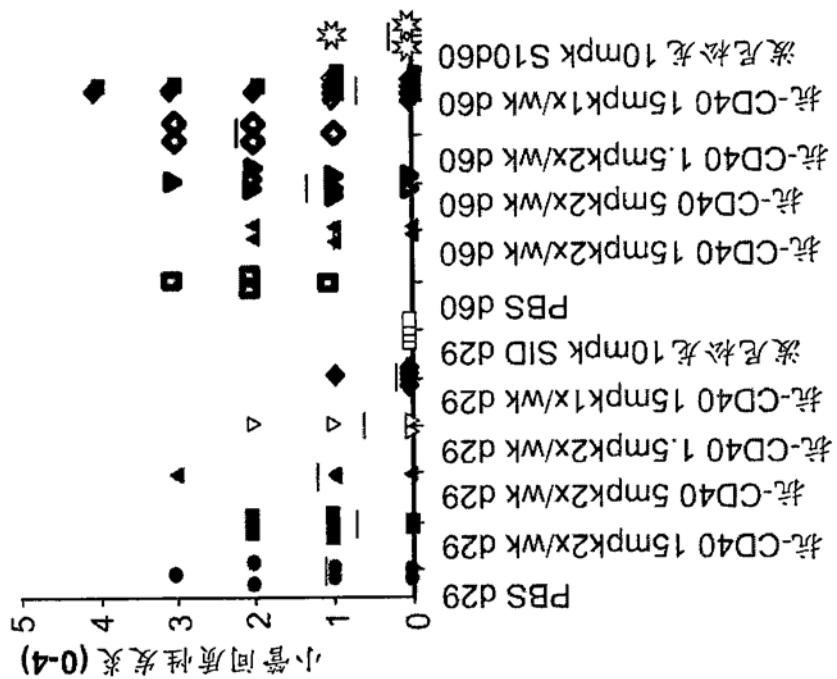


图12C

单因子ANOVA $p < 0.0001$
邦弗朗尼多重比较检验

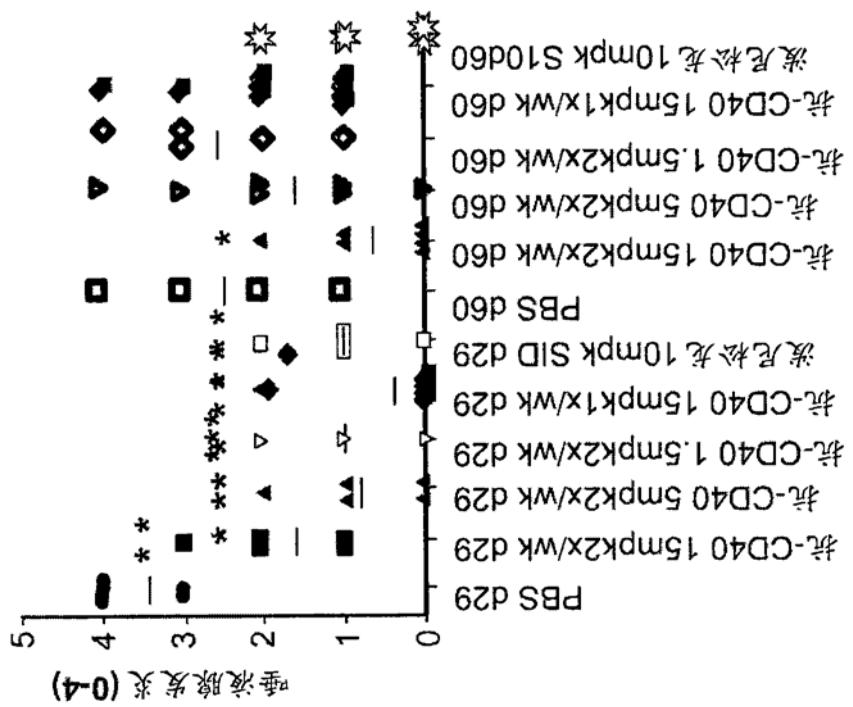


图13A

ANOVA p = 0.0143
邓奈特多重比较检验

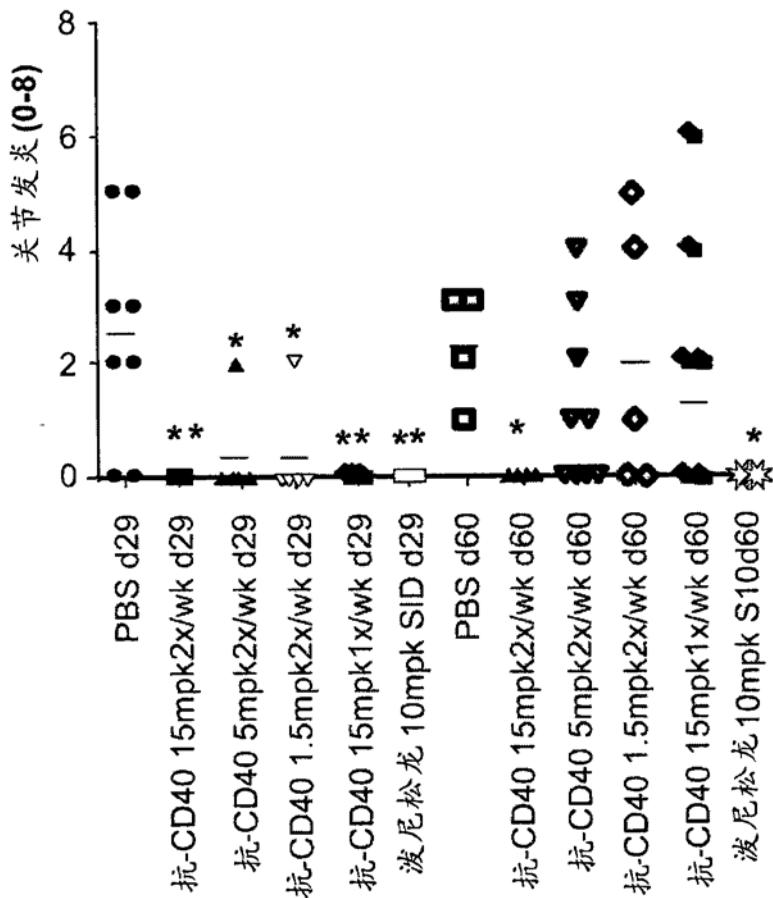


图13B

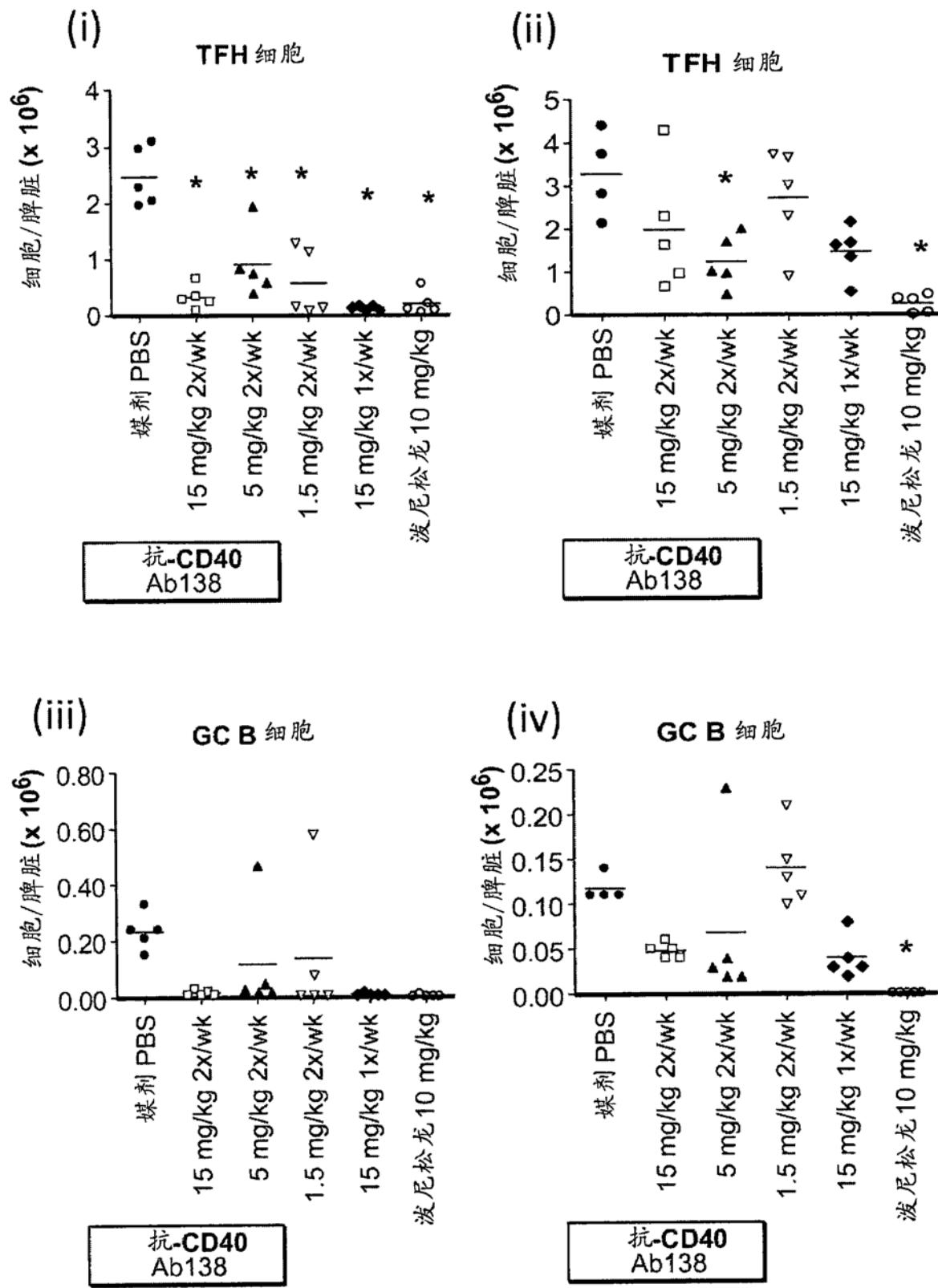


图14

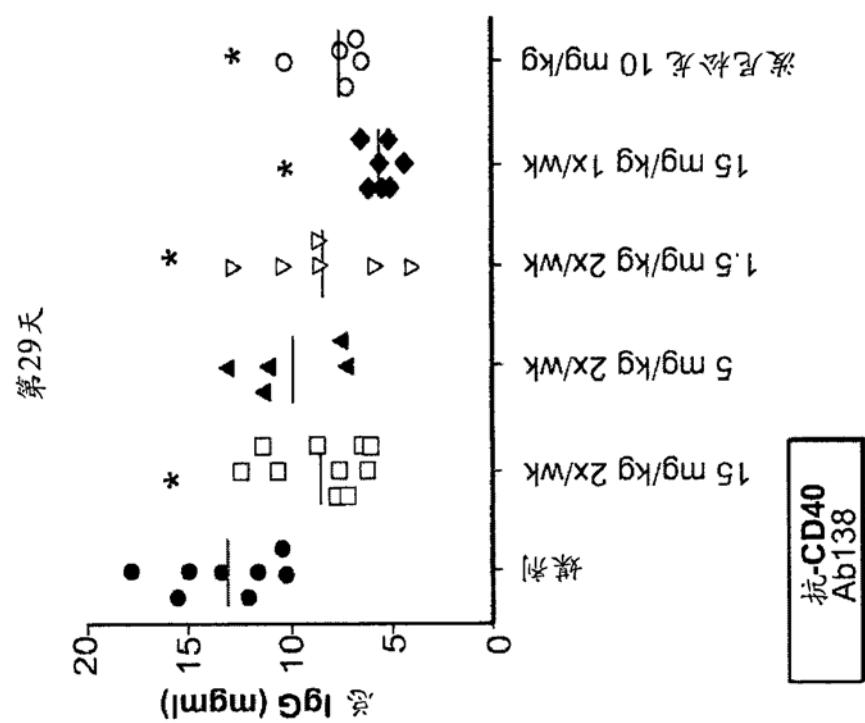


图15A

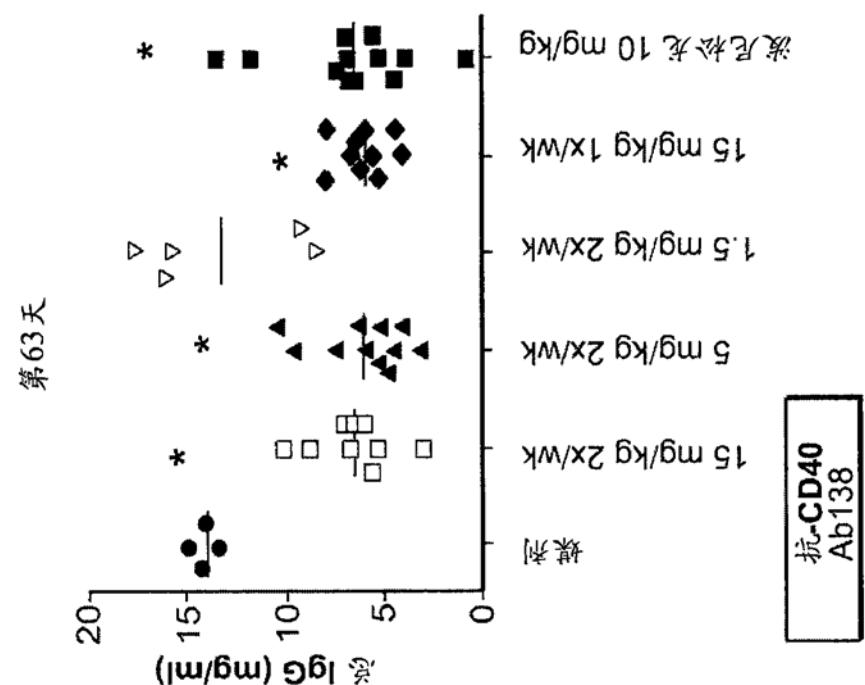


图15B

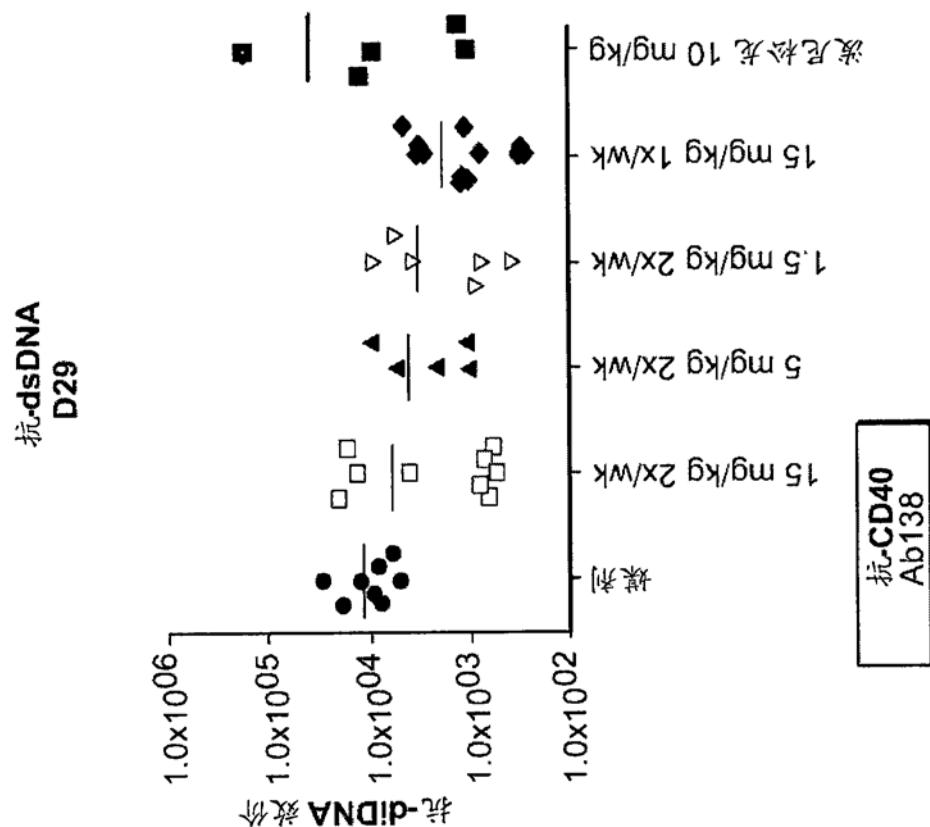


图16A

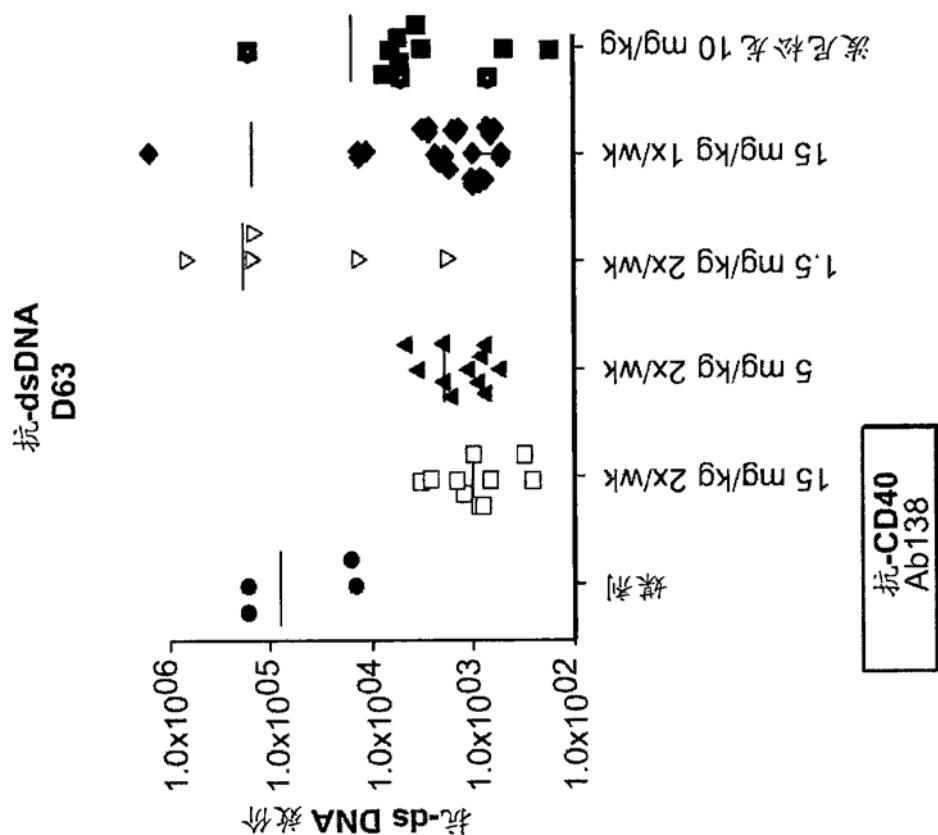


图16B

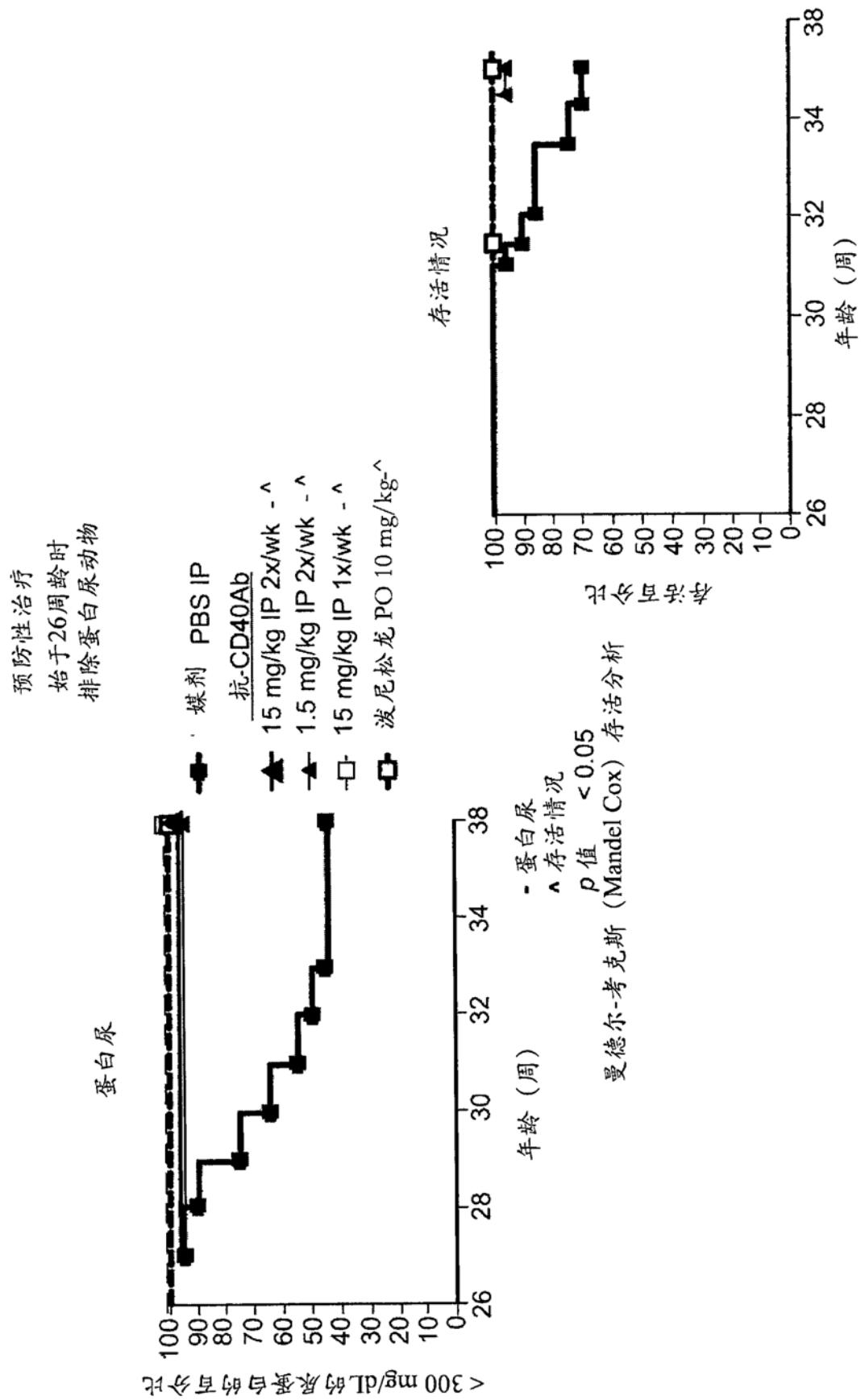


图17A

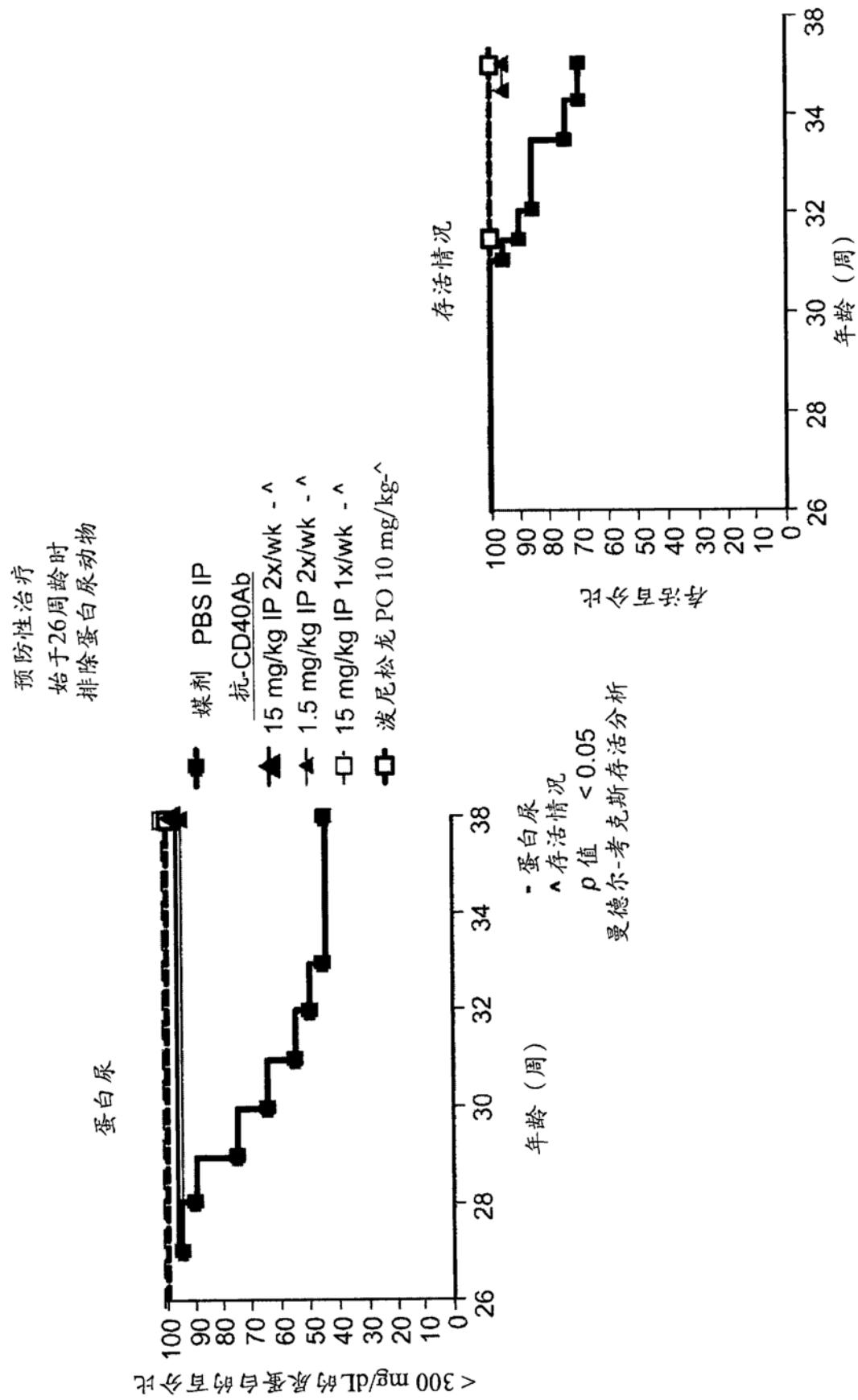
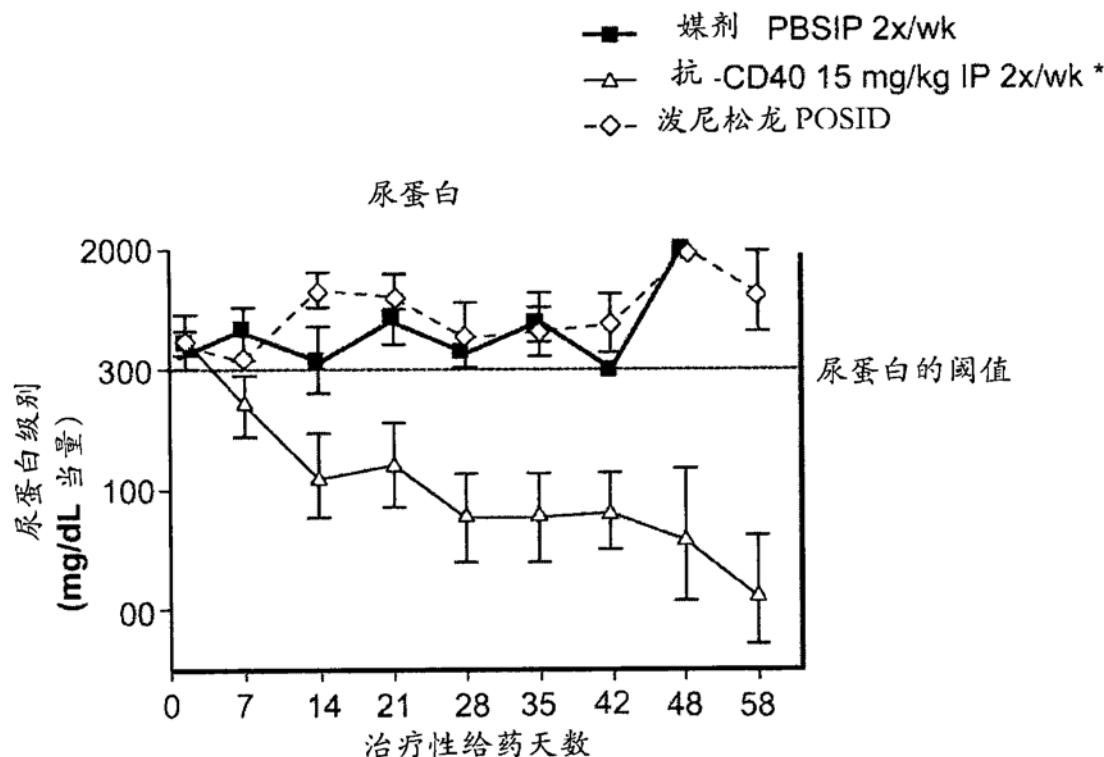


图17B



* $p < 0.05$ 单因子 ANOVA
克努斯凯沃尔 (Knuskai Wall) 及邓恩 (Dunns) 多重比较检验

图18A

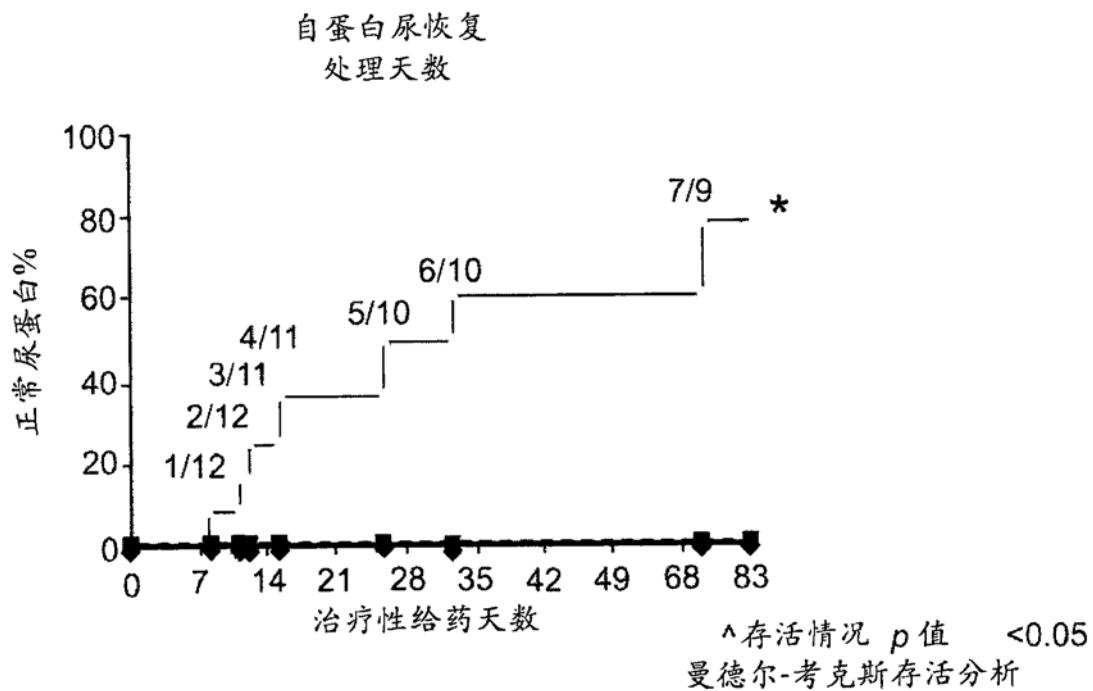


图18B

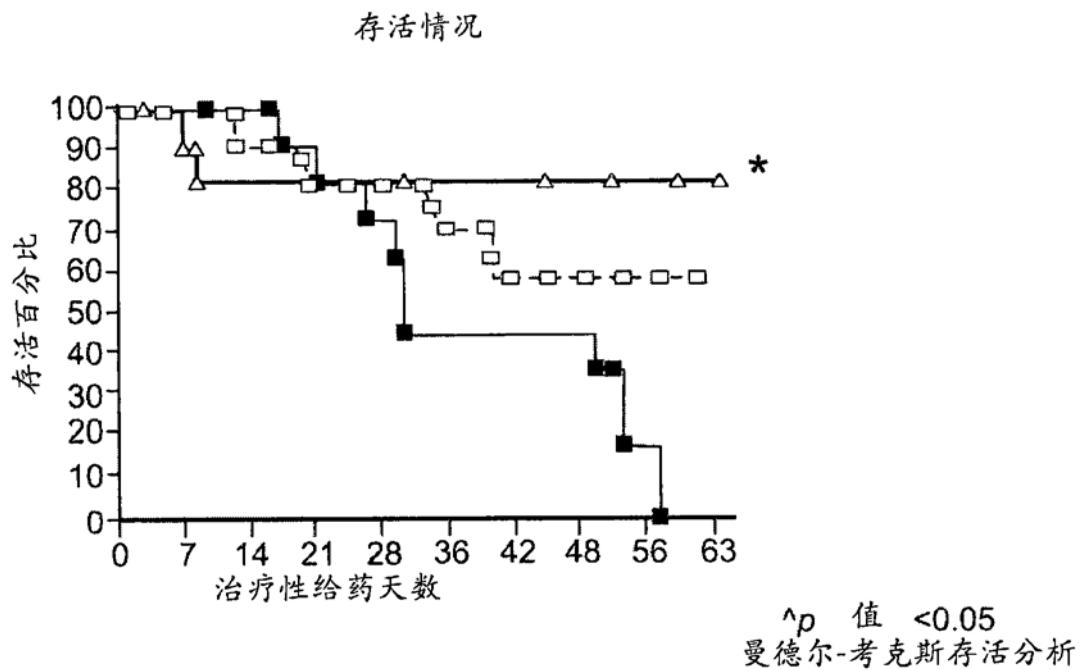


图18C

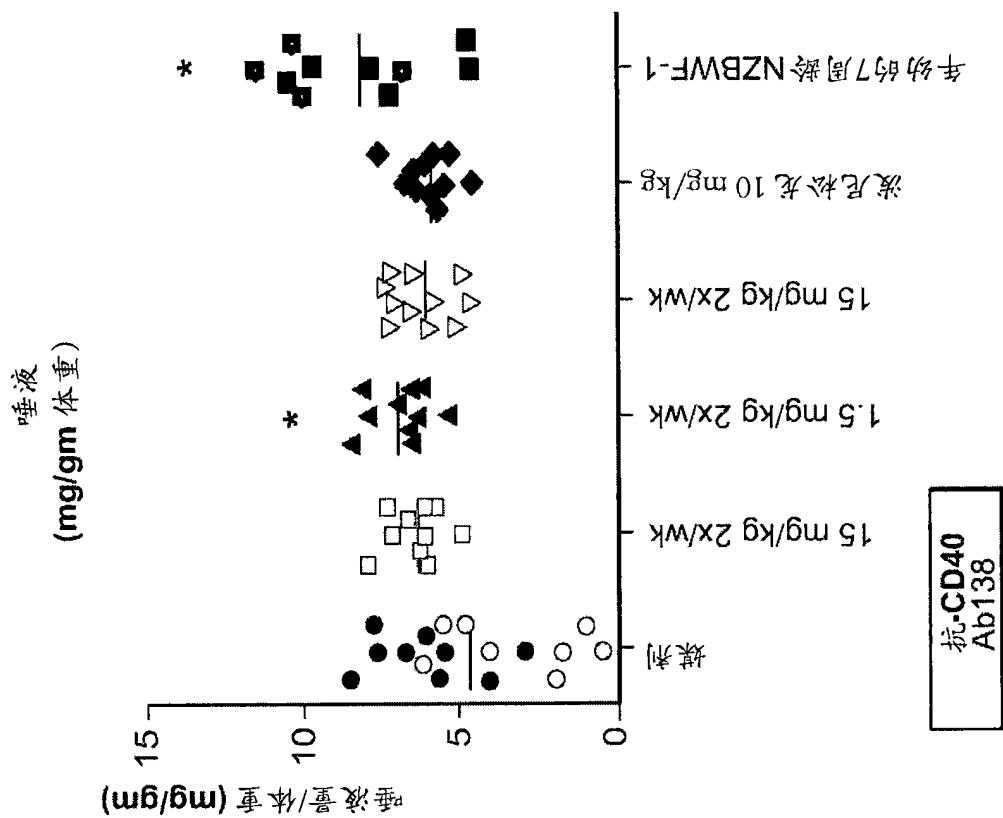


图 19B

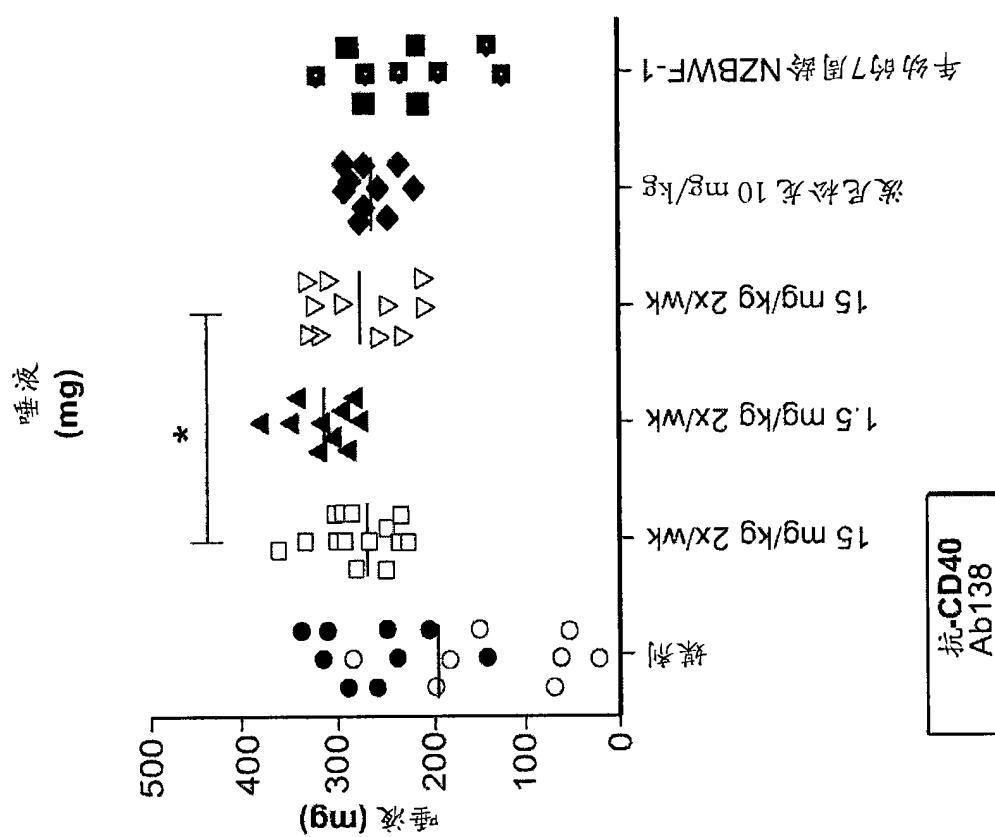


图 19A

白色制剂圆圈=蛋白尿小鼠

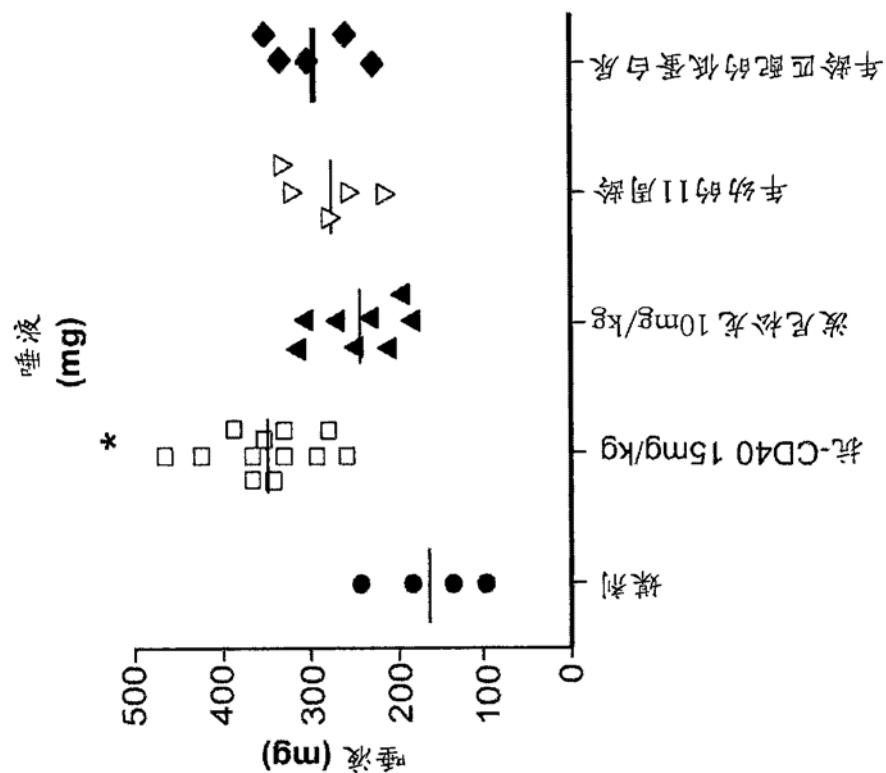


图20A

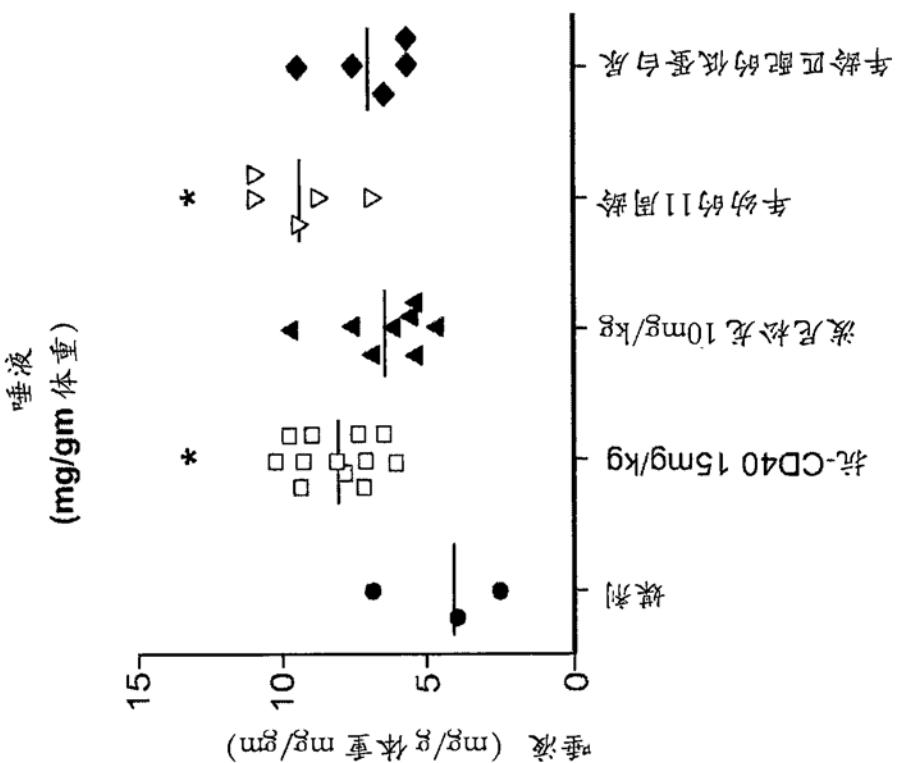


图20B