



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101237882 B

(45) 授权公告日 2012.08.15

(21) 申请号 200680027117.2

(22) 申请日 2006.05.26

(30) 优先权数据

60/684,853 2005.05.26 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008.01.24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/020688 2006.05.26

(87) PCT申请的公布数据

W02006/128103 EN 2006.11.30

(73) 专利权人 西雅图基因公司

地址 美国华盛顿州

专利权人 吉宁特有限公司

(72) 发明人 L·G·普雷斯塔 L·Y·奥康奈尔

S·O·多罗尼娜

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 刘玥

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 97/31025 A1, 1997.08.28, 说明书 4-5、
11-13 页, 实施例 1-8.

CN 1369015 A, 2002.09.11, 说明书 4-38、
46-51 页.

Francisco Joseph A et al. Agonistic
Properties and in Vivo Antitumor Activity
of the Anti-CD40 Antibody SGN-14. 《Cancer
Research》. 2000, 第 60 卷 (第 12 期), 摘要.

Tai Yu-Tzu et al. Mechanisms by which
SGN-40, a Humanized Anti-CD40 Antibody,
Induces Cytotoxicity in Human Multiple
Myeloma Cells: Clinical Implications.
《Cancer Research》. 2004, 第 64 卷 (第 8 期),
摘要, 2846 页最后 1 段, 2850 页右栏第 2 段-2851
页右栏第 1 段.

审查员 李影

权利要求书 1 页 说明书 46 页
序列表 20 页 附图 5 页

(54) 发明名称

人源化的抗-CD40 抗体及其使用方法

(57) 摘要

提供了人源化的抗-CD40 抗体和抗原结合片
段, 和用于治疗特征在于 CD40 抗原表达的疾病的
方法。

1. 特异性地结合人 CD40 的抗体或抗原结合片段,其包含人源化的重链可变域和人源化的轻链可变域,其中所述重链可变域和轻链可变域的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:16 所示。

2. 权利要求 1 的抗体或抗原结合片段,还包含人 IgG 恒定区。

3. 权利要求 2 的抗体或抗原结合片段,其中 IgG 恒定区的同种型是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

4. 权利要求 3 的抗体或抗原结合片段,其中 IgG 恒定区的同种型是 IgG1。

5. 权利要求 1-4 中任一项的抗体或抗原结合片段,还包含轻链恒定域。

6. 权利要求 5 的抗体或抗原结合片段,其中轻链恒定域是 κ 恒定域。

7. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体还包含人免疫球蛋白恒定区。

8. 权利要求 7 的抗体,其包含分别如 SEQ ID NO:19 和 SEQ IDNO:22 所述的重链和轻链氨基酸序列。

9. 权利要求 1 的抗原结合片段,其中所述抗体片段是 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 片段,双特异抗体或 scFv 片段。

10. 权利要求 1-9 中任一项的抗体或抗原结合片段,还包含可检测标记。

11. 权利要求 1-10 中任一项的抗体或抗原结合片段,其是分离的。

12. 权利要求 1-11 中任一项的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段与具有 ATCC 保藏号 PTA-110 的杂交瘤分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合。

13. 试剂盒,其包含置于容器中的权利要求 1-12 中任一项的抗体或抗原结合片段,任选包含关于使用所述抗体检测生物样品中的 CD40 蛋白的说明书。

14. 用作药物的权利要求 1-12 中任一项抗体或抗原结合片段。

15. 权利要求 14 的抗体或抗原结合片段,其中所述药物用于治疗表达 CD40 的癌症或特征在于 CD40 表达的免疫障碍。

16. 药物组合物,其包含:

(i) 权利要求 1-12 中任一项的抗体或抗原结合片段;和

(ii) 药学可接受的赋形剂。

17. 分离的多核苷酸,其编码分别为 SEQ ID NO:10 和 SEQ IDNO:16 的重链可变域氨基酸序列和 / 或轻链可变域氨基酸序列。

人源化的抗-CD40 抗体及其使用方法

[0001] 连续性

[0002] 本申请要求享有 2005 年 5 月 26 日提交的美国临时申请号 60/684,853 的优先权,其内容在这里整体引作参考。

[0003] 背景

[0004] 本发明概括地涉及用于诊断和治疗用途的人源化的抗-CD40 抗体。更具体地,公开了用于治疗特征在于表达 CD40 的细胞的多种疾病或病症的人源化的抗-CD40 抗体和使用方法。也公开了药物组合物和制品,例如包含人源化的抗-CD40 抗体的试剂盒。

[0005] CD40 是 I 型完整膜糖蛋白和肿瘤坏死因子 (TNF) 受体超家族的成员。CD40 在许多细胞类型上表达,包括正常和肿瘤 B 细胞,交错突细胞,基底上皮细胞和癌。它也存在单核细胞、巨噬细胞、有些内皮细胞、和滤泡树突状细胞上。CD40 在 B 细胞个体发育的早期表达,在出现 CD10 和 CD19 之后,但是在表达 CD21、CD23、CD24 和出现表面免疫球蛋白 M(sIgM) 之前,出现在 B 细胞前体上 (Uckun 等,1990, Blood 15 :2449)。尽管以前的报道指出,CD40 会在 B 细胞终末分化成浆细胞后丧失,已经在扁桃体和骨髓-衍生的浆细胞上检测到 CD40 (Pellat-Decounynck 等,1994, Blood 84 :2597)。

[0006] CD40 与它的配体和反受体 CD40L (也称作 CD154, gp39, 和 TRAP) 的相互作用,会诱导体液和细胞-介导的免疫应答。CD40L 是主要在激活的淋巴细胞、CD4⁺T 细胞上表达的跨膜蛋白。象 TNF 家族的其它蛋白一样,CD40L 的结构是非共价三聚体的结构。CD40-介导的信号传递似乎是 T 细胞-依赖性抗原引起的 B 细胞增殖、免疫球蛋白 (Ig) 同种型转换、生发中心组成、和记忆 B 细胞定型所必需的。CD40L 与 CD40 的结合,会导致 CD40 多聚化、抗原呈递细胞 (例如树突细胞,单核细胞,和 B 细胞) 的活化信号的产生、和细胞因子-激活的成纤维细胞和上皮细胞的生长和分化信号的发生。尽管还没有完全阐明 CD40 分子在细胞分化中起作用的信号传递途径,CD40 信号通过招募一系列 TNF 受体相关因子 ("TRAFs"),从多聚化的受体转导 (Kehry, 1996, J. Immunol. 156 :2345-2348)。TRAFs 的亚型有差别地与 TNF 受体家族成员 (包括 CD40) 相互作用,提供对许多种下游途径的刺激。TRAF1 和 TRAF2 会参与细胞凋亡的调控 (Speiser 等,1997, J. Exp. Med. 185 :1777-1783; Yeh 等,1997, Immunity 7 :715-725)。TRAFs 2, 5, 和 6 会参与增殖和活化事件。在正常的 B 细胞中,CD40 与 CD40L 的结合,会募集 TRAF2 和 TRAF3 到受体复合物,并诱导其它 TRAF 的向下调节 (Kuhne 等,1997, J. Exp. Med. 186 :337-342)。

[0007] 在 B 细胞发育和分化过程中,细胞凋亡和 CD40-介导的信号传递密切相关。B 细胞中细胞凋亡的主要功能是未成熟的 B 细胞的克隆排除,认为这源自未成熟的 B 细胞中表面 Ig 的广泛交联。成熟 B 细胞的命运也受信号传递 (通过表面 Ig) 和源自激活的 T 细胞的信号 (推测是由 CD40L 分子介导) 的组的调控。来自表面 Ig 的信号和 CD40 的组合,可以克服细胞凋亡途径,并维持生发中心 B 细胞存活。生发中心中这样的从细胞凋亡的复苏,对于生产亲和抗体的记忆 B 细胞的发育是关键的。

[0008] 在 T 和 B 细胞恶性肿瘤中,当恶性细胞暴露于导致正常淋巴细胞激活的刺激时,经常发生抗肿瘤作用 (生长停止,有或没有细胞凋亡)。通过抗原受体或辅助刺激受体,已经

用信号观察到该活化-诱导的生长停止 (Ashwell 等,1987, Science 237 :61 ;Bridges 等, 1987, J. Immunol. 139 :4242 ;Page 和 Defranco,1988 J. Immunol. 140 :3717 ; 和 Beckwith 等,1990, J. Natl. Cancer Inst. 82 :501)。抗-CD40 抗体或可溶性 CD40L 的 CD40 刺激,会直接抑制 B 细胞淋巴瘤生长 (Funakoshi 等,1994, Blood 83 :2787-2784)。

[0009] 已经描述了针对 CD40 的几种鼠单克隆抗体 (mAbs) (Katira 等 1995, " CD40 Workshop Panel Report"; 见:Leukocyte Typing V, Schlossman et al., (eds)1995,1 : 547-550)。例如,证实了两种 mAb CD40.7 (M2) 和 CD40.8 (M3) 会抑制 CD40 向 CD40L 的结合 (Fanslow 等,1995, 见:Leukocyte Typing V, Schlossman 等, (eds)1995,1 :555-556)。mAbs M2 和 M3 的 CD40 刺激,会抑制几种人 B- 细胞淋巴瘤的生长,并体内诱导建立的肿瘤的消退 (Funakoshi 等,1994, Blood 83 :2787-2794 ;Funakoshi 等,1996, J. Immunol. 19 :93-101)。美国专利号 5,182,368 公开了抗-CD40 鼠 mAb, G28-5, 其可以增进 B 细胞增殖。基于 G28-5 的单链 Fv 区的单链免疫毒素,会在体外选择性地杀死表达人 CD40 的血液学恶性细胞系 (Francisco 等,1997, J Biol. Chem. 39 :24165-24169)。但是, G28-5 在没有 CD40L 的情况下不能增强 B 细胞的激活,也不会实现 CD40 和 CD40L 的结合。美国专利号 6,838,261 (和相关的美国专利号 6,946,129 和 6,843,989) 描述了抗-CD40 鼠 mAb 的一类变体形式 S2C6, 和它的治疗多种病症中的应用,包括癌症和免疫性和炎症性疾病。除了增强 CD40L- 介导的刺激以外,在美国专利号 6,838,261 中描述的抗-CD40 抗体表现出 CD40 和 CD40L 之间相互作用的增强和体内抗-肿瘤活性。尽管 S2C6 自身会以类似于 G28-5 的方式刺激 B 细胞增殖, S2C6 与 G28-5 的区别在于它的增强 CD40L 结合的能力和 CD40L- 介导的活化信号的随后放大。

[0010] 其它鼠抗-CD40 mAbs, 例如,在国际公开号 W095/17202 中描述的那些,会结合 CD40, 并表现出在治疗和预防特征在于表达 CD40 的肿瘤细胞的疾病中的效能。尽管鼠抗-CD40 抗体具有作为治疗人类 CD40 相关疾病的治疗剂的潜在用途,它们的免疫原性提出了中和抗体应答的可能性,例如,会限制它们的价值的人抗-小鼠抗体 (HAMA) 应答。

[0011] 因而,需要人源化的抗-CD40 抗体,其能特异性地结合定义的 CD40 表位,并表现出抗原结合特异性、亲和力和类似的非人抗-CD40 抗体的其它希望的功能特征。

[0012] 发明简述

[0013] 本发明包括人源化的抗-CD40 抗体和抗原结合片段,以及使用这样的人源化的抗-CD40 抗体和片段治疗特征在于表达 CD40 表面抗原的细胞的疾病和病症的方法。也包括包含人源化的抗-CD40 抗体的试剂盒和制品。

[0014] 在有些实施方案中,提供了特异性结合人 CD40 的分离的抗体或抗原结合片段。抗体或抗原结合片段包括重链可变域和/或轻链可变域。重链可变域可以包括具有与 SEQ ID NO :2 的人可变域重链亚型 III 共有氨基酸序列至少 90% 同一的氨基酸序列的构架区、和至少一个具有与 SEQ ID NO :3 的对应重链 CDR 至少 90% 同一的氨基酸序列的 CDR。轻链可变域可以包括具有与 SEQ ID NO :13 的人可变区轻链亚型 κ I 共有氨基酸序列至少 90% 同一的氨基酸序列的构架区、和至少一个具有与 SEQ ID NO :14 的对应轻链 CDR 至少 90% 同一的氨基酸序列的 CDR。

[0015] 在有些实施方案中,每个重链 CDR 与 SEQ ID NO :3 的对应重链 CDR 具有至少 90% 同一性。在有些实施方案中,重链 CDR 包括 SEQ ID NO :3 的重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基

酸序列。在有些实施方案中,每个轻链 CDR 与 SEQ ID NO:14 的对应轻链 CDR 具有至少 90% 同一性。在有些实施方案中,轻链 CDR 包括 SEQ ID NO:14 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列。

[0016] 在有些实施方案中,抗体或抗原结合片段包括具有 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列的重链可变域。在有些实施方案中,抗体或抗原结合片段包括具有 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的轻链可变域。在有些实施方案中,抗体或抗原结合片段具有 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 的重链可变域氨基酸序列,和 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 的轻链可变域氨基酸序列。

[0017] 在有些实施方案中,重链可变域和轻链可变域分别包括下述氨基酸序列:SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:15;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:16;或 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:16。

[0018] 抗体或抗原结合片段可以包括人 IgG 恒定区,例如,同种型 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 IgG 恒定区。抗体或抗原结合片段可以包括轻链恒定域,例如, κ 恒定域。

[0019] 在有些实施方案中,抗体是 hu sgn-0, hu sgn-1, hu sgn-2, hu sgn-4, hu sgn-14, hu sgn-15, hu sgn-16, hu sgn-17, hu sgn-18, hu sgn-19, hu sgn-22, hu sgn-23, hu sgn-26 或 hu sgn-27。在有些实施方案中,抗体或抗原结合片段与 ATCC 保藏号 PTA-110 杂交瘤分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合。

[0020] 抗体也可以是抗原结合片段,例如 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 片段,双特异抗体(diabody),单链抗体,scFv 片段或 scFv-Fc。抗体或抗原结合片段可以任选地被标记,或缀合到化疗剂上,例如 auristatin(例如, MMAE 或 MMAF)。

[0021] 也提供了试剂盒,其包含置于容器中的抗-CD40 抗体或抗原结合片段。试剂盒可以任选地包含其它组分,例如关于使用所述抗体检测生物样品中的 CD40 蛋白的说明书。

[0022] 也提供了药物组合物,其包含抗-CD40 抗体或其抗原结合片段和药学可接受的赋形剂。

[0023] 在有些实施方案中,提供了编码人源化的重链可变区和/或人源化的轻链可变区的分离的多核苷酸。多核苷酸可以,例如,编码 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 的重链可变域氨基酸序列。多核苷酸也可以,例如,编码 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 的轻链可变域氨基酸序列。

[0024] 在有些实施方案中,分离的多核苷酸分别编码下述重链可变域氨基酸序列和轻链可变域氨基酸序列:SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:15;

SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:16;或 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:16。

[0025] 在有些实施方案中,提供了抑制表达人 CD40 抗原的细胞的生长的方法。该方法包括,给细胞施用抗-CD40 抗体或抗原结合片段,且所述抗体或抗原结合片段结合人细胞表面 CD40 抗原。抗体或抗原结合片段与 CD40 抗原的结合抑制细胞的生长或分化。

[0026] 在有些实施方案中,提供了治疗具有 CD40 相关病症的受试者的方法。该方法包括,给受试者施用抗-CD40 抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段结合人 CD40。抗体或抗原结合片段与 CD40 的结合抑制 CD40 相关病症的细胞的生长或分化。CD40 相关病症可以是,例如,慢性淋巴细胞白血病,伯基特淋巴瘤,多发性骨髓瘤,T 细胞淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,霍奇金病,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症或卡波西肉瘤。

[0027] 在有些实施方案中,提供了诱导外周 B 细胞的缺失的方法。该方法包括,给细胞施用抗-CD40 抗体或抗原结合片段,所述抗体或抗原结合片段会结合人细胞表面 CD40 抗原。抗体或抗原结合片段与 CD40 抗原的结合,会诱导细胞的缺失。外周 B 细胞可以,例如,在受试者中表现出自身免疫反应性。

[0028] 参考下面的详述,包括优选实施方案,以及附图和序列表,可以最好地理解本发明。下面的讨论是描述性的、解释性的和示例性的,不应当用于限制所附权利要求书定义的范围。

[0029] 附图简述

[0030] 图 1A 和 1B 显示了人源化的抗-CD40 抗体重链的多肽 (SEQ ID NO:18) 和编码 (SEQ ID NO:17) 和互补 DNA 序列。多肽序列的注解指示了先导序列、可变区、和人 IgG₁ 恒定区的位置。图 1C 显示了人源化的抗-CD40 抗体轻链的多肽 (SEQ ID NO:21) 和编码 (SEQ ID NO:20) 和互补 DNA 序列。多肽序列的注解指示了先导序列、可变区、和人 κ 恒定区的位置。

[0031] 图 2 显示了在肿瘤移植后 13 天开始治疗,在 2 周后测量的对照抗体、鼠抗-CD40 抗体、和人源化的抗-CD40 抗体治疗对肿瘤体积的影响。

[0032] 图 3 显示了对照抗体、鼠抗-CD40 抗体、和人源化的抗-CD40 抗体治疗对携带肿瘤的小鼠的存活率的影响。

[0033] 发明详述

[0034] 为了公开清楚,且不作为限制,本发明的详述分成下面的小节。

[0035] 当在本文中使用商品名称时,商品名称也指商品名称产物制剂、仿制药物、和商品名称产物的活性药物成分,除非上下文另有说明。

[0036] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与所述方法和组合物所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。

[0037] 定义

[0038] 术语“CD40”和“CD40 表面抗原”指在正常和肿瘤 B 细胞的表面上表达的 50kD 糖蛋白,其起参与细胞增殖和分化的信号的受体的作用,有时称作 Bp50 (Ledbetter 等,1987, J. Immunol. 138:788-785)。已经从伯基特淋巴瘤细胞系 Raji 分离出编码 CD40 的 cDNA 分子 (Stamenkovic 等,1989, EMBO J. 8:1403)。表达 CD40 的细胞是特征在于 CD40 的表面表达的任意细胞,包括、但不限于,正常和肿瘤 B 细胞,交错突细胞,基底上皮细胞,癌细胞,巨

噬细胞,内皮细胞,滤泡树突状细胞,扁桃体细胞,和骨髓-衍生的浆细胞。在有些实施方案中,CD40 分子是人 CD40 分子。

[0039] 本文使用的术语“CD40 抗原表位”和“CD40 表位”指,能与抗-CD40 抗体发生免疫反应的分子(例如,肽)或分子片段,例如,包括由 S2C6 单克隆抗体识别的 CD40 抗原决定子。CD40 抗原表位可以包含在蛋白、蛋白片段、肽等内。表位是最常见的蛋白、短寡肽、寡肽模仿物(即,模仿 CD40 抗原的抗体结合性质的有机化合物)或其组合。

[0040] 如本文所述,“特异性结合”和“特异性地结合”指结合预定抗原的抗体。通常,抗体以至少约 $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ 的亲合力结合,并以比对除了预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如,BSA,酪蛋白)的结合亲合力大至少 2 倍的亲合力结合预定抗原。

[0041] “天然抗体”和“天然免疫球蛋白”在本文中定义为,由 2 个相同轻(L)链和 2 个相同重(H)链组成的异源四聚体糖蛋白,通常约 150,000 道尔顿。每个轻链通过一个二硫键共价连接到重链上,形成异源二聚体。通过这样的异源二聚体的 2 个相同重链之间的共价二硫键,形成异源四聚体。尽管轻链和重链通过一个二硫键连接到一起,2 个重链之间的二硫键的数目随免疫球蛋白同种型而异。每个重链和轻链也具有规则分布的链内二硫键。每个重链在氨基端具有一个可变域(V_H),随后是 3 或 4 个恒定域(C_H1 , C_H2 , C_H3 , 和 C_H4),以及在 C_H1 和 C_H2 之间的铰链区。每个轻链具有 2 个结构域,即 1 个氨基端可变域(V_L)和 1 个羧基端恒定域(C_L)。 V_L 结构域与 V_H 结构域非共价地结合,而 C_L 结构域通常通过二硫键共价连接到 C_H1 结构域上。认为特定氨基酸残基会在轻链和重链可变域之间形成界面(Chothia 等,1985, J. Mol. Biol. 186 :651-663)。

[0042] 术语“超变的”指下述事实,即可变域内的某些序列与抗体中的序列有很大不同,且含有直接参与每个特定抗体对它的特定抗原决定子的结合和特异性的残基。轻链和重链可变域内的超变性,集中在称作互补性决定区(CDR)或超变环(HVL)的 3 个区段内。在 Kabat 等,1991,见:Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 中,通过序列对比定义了 CDR,而 HVL 则根据可变域的三维结构在结构上定义,如 Chothia 和 Lesk,1987, J. Mol. Biol. 196 :901-917 所述。当这 2 种方法导致略有不同的 CDR 鉴别时,结构定义是优选的。如 Kabat 所定义的,CDR-L1 位于轻链可变域的残基 24-34 附近,CDR-L2 位于残基 50-56 附近,且 CDR-L3 位于残基 89-97 附近;CDR-H1 位于重链可变域的残基 31-35 附近,CDR-H2 位于残基 50-65 附近,且 CDR-H3 位于残基 95-102 附近。

[0043] 每个重链和轻链内的 3 个 CDR 由构架区(FR)隔开,该构架区含有倾向于更低可变性的序列。从重链和轻链可变域的氨基端至羧基端,FR 和 CDR 的排列次序是:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 和 FR4。FR 的大量 β -折叠构型,使得每个链内的 CDR 彼此接近,也使每个链内的 CDR 接近其它链的 CDR。得到的构象促成抗原结合位点(参见 Kabat 等,1991, NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, 第 647-669 页),尽管并非所有 CDR 残基都一定直接参与抗原结合。

[0044] FR 残基和 Ig 恒定域不直接参与抗原结合,但是有助于抗原结合和/或介导抗体效应功能。有些 FR 残基可以以至少 3 种方式对抗原结合起显著作用:通过非共价地直接结合表位,通过与一个或多个 CDR 残基相互作用,或通过影响重链和轻链之间的界面。恒定域不直接参与抗原结合,但是介导多种 Ig 效应功能,例如抗体在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、

补体依赖性细胞毒性 (CDC) 和抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP) 中的参与。

[0045] 基于恒定域的氨基酸序列,可以将脊椎动物免疫球蛋白的轻链归为 2 种明显不同的类型之一: κ (κ) 和 λ (λ)。根据恒定域的序列,通过对比,可以将哺乳动物免疫球蛋白的重链归为 5 种主要类型之一: IgA、IgD、IgE、IgG, 和 IgM。IgG 和 IgA 进一步分成亚型(同种型),例如, IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁, 和 IgA₂。与不同类型的免疫球蛋白相对应的重链恒定域分别称作 α , δ , ϵ , γ , 和 μ 。天然免疫球蛋白的类型的亚基结构和三维构型是众所周知的。

[0046] 术语“抗体”、“抗-CD40 抗体”、“人源化的抗-CD40 抗体”、和“变体人源化的抗-CD40 抗体”在本文中以最广义使用,具体地包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体),多克隆抗体,多特异性抗体(例如,双特异性抗体),和抗体片段,例如可变域和表现出希望的生物活性的(例如,CD40 结合)其它抗体部分。

[0047] 术语“单克隆抗体”(mAb) 指从基本上同源的抗体的群体得到的抗体;也就是说,构成该群体的单个抗体是相同的,例外是,可能存在微量的天然存在的突变。单克隆抗体是高度特异性的,其针对单个抗原决定子(也称作表位)。修饰词“单克隆的”表示针对相同表位的基本上同源的抗体的群体,不应理解为需要通过任何特殊方法生产抗体。单克隆抗体可以通过本领域已知的任意技术或方法来制备;例如, Kö hler 等,1975, Nature 256:495 首次描述的杂交瘤方法,或本领域已知的重组 DNA 方法(参见,例如,美国专利号 4,816,567)。在另一个实例中,也可以使用 Clackson 等,1991, Nature 352:624-628, 和 Marks 等,1991, J. Mol. Biol. 222:581-597 所述的技术,从噬菌体抗体文库分离单克隆抗体。

[0048] 相反地,在多克隆抗体的制备中的抗体通常是免疫球蛋白同种型和/或类型的异质群体,且也表现出许多表位特异性。

[0049] 本文使用的术语“嵌合的”抗体是一种单克隆抗体类型,其中在重链和/或轻链的一个或多个区域或结构域中的一部分或全部氨基酸序列,与来自另一个物种或属于另一个免疫球蛋白类型或同种型或来自共有序列的单克隆抗体中的对应序列相同、同源,或是其变体。嵌合的抗体包括这样的抗体的片段,条件是,抗体片段会表现出它的亲本抗体的希望的生物活性,例如结合相同表位(参见,例如,美国专利号 4,816,567;和 Morrison 等,1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855)。

[0050] 术语“抗体片段”、“抗-CD40 抗体片段”、“人源化的抗-CD40 抗体片段”、“变体人源化的抗-CD40 抗体片段”指全长抗-CD40 抗体的一部分,其中保留了可变区或功能能力,例如,特异性的 CD40 表位结合。抗体片段的实例包括、但不限于, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv 和 scFv-Fc 片段,双特异抗体,线性抗体,单链抗体,微抗体(minibody),由抗体片段形成的双特异抗体,和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0051] 通过全长抗体的酶处理,可以产生某些抗体片段类型。抗体的木瓜蛋白酶消化,会产生 2 个相同的抗原结合片段(称作“Fab”片段,各自含有一个抗原结合位点)和 1 个残余“Fc”片段(因为它易于结晶的能力而得名)。Fab 片段也含有轻链的恒定域和重链的 C_H1 结构域。胃蛋白酶处理会产生 F(ab')₂ 片段,其具有 2 个抗原结合位点,且仍然能交联抗原。

[0052] Fab' 片段与 Fab 片段的不同之处在于,在 C_H1 结构域的 C-末端存在几个额外的残

基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab-SH 在本文中是 Fab' 的命名,其中恒定域的半胱氨酸残基携带游离的巯基。F(ab')₂ 抗体片段是通过铰链区中的半胱氨酸残基相连接的一对 Fab' 片段。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0053] “Fv”是最小的抗体片段,其含有由紧密、非共价结合的一个重链和一个轻链可变域的二聚体组成的完整抗原-识别和结合位点。在该构型中,每个可变域的 3 个 CDR 相互作用,定义在 V_H-V_L 二聚体表面上的抗原-结合位点。6 个 CDR 共同赋予抗体抗原-结合特异性。

[0054] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段是包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域的单链 Fv 变体,其中所述结构域存在于单个多肽链中,且能识别和结合抗原。scFv 多肽任选地含有位于 V_H 和 V_L 结构域之间的多肽连接物,其能使 scFv 形成希望的用于抗原结合的三维结构(参见,例如,Pluckthun,1994, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315)。

[0055] 术语“双特异抗体”指具有 2 个抗原结合位点的小抗体片段。每个片段含有连接到一个轻链可变域 (V_L) 上的一个重链可变域 (V_H)。通过使用短得足以允许同一链上的 2 个结构域之间配对的连接物,迫使连接的 V_H-V_L 结构域与另一条链的互补结构域配对,建立 2 个抗原结合位点。双特异抗体更完整地描述在,例如,EP404,097 ;W093/11161 ;和 Hollinger 等,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448。

[0056] 术语“线性抗体”指包含一对串联的 Fd 区段 (V_H-C_H1-V_H-C_H1) 的抗体,所述 Fd 区段形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的,参见,例如,Zapata 等 1995, Protein Eng. 8(10) :1057-1062。

[0057] 人源化的抗体或人源化的抗体片段包括免疫球蛋白氨基酸序列变体或其片段,其能结合预定抗原,且其包含一个或多个基本上具有人免疫球蛋白氨基酸序列的 FR、和一个或多个基本上具有非人免疫球蛋白氨基酸序列的 CDR。该非人氨基酸序列在本文中称作“输入”序列,其通常取自“输入”抗体结构域,尤其是可变域。一般而言,人源化的抗体至少包括非人抗体的 CDR 或 HVL,其插入在人重链或轻链可变域的 FR 之间。在某些方面,人源化的抗-CD40 抗体含有源自鼠单克隆抗体 S2C6 的 CDR 和 / 或 HVL 残基或序列,其插入在人共有序列重链和轻链可变域的 FR 之间。

[0058] 在另一个方面,人源化的抗-CD40 抗体包含基本上全部的至少 1 个、且通常 2 个可变域(例如,包含在例如 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₂、和 Fv 片段中),其中全部或基本上全部的 CDR 对应非人免疫球蛋白的 CDR,且全部或基本上全部的 FR 是人免疫球蛋白共有序列的 FR。在另一个方面,人源化的抗-CD40 抗体也包括免疫球蛋白 Fc 区域(通常是人免疫球蛋白的)的至少一部分。通常,所述抗体会含有轻链以及重链的至少可变域。适当时,所述抗体也可以包含一个或多个重链 C_H1、铰链、C_H2、C_H3、和 / 或 C_H4 区域。

[0059] 人源化的抗-CD40 抗体可以选自任意类型的免疫球蛋白,包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE,和任意同种型,包括 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁ 和 IgA₂。例如,恒定域可以是固定恒定域的补体,其中希望人源化的抗体表现出细胞毒性活性,且同种型通常是 IgG₁。当不需要这样的细胞毒性活性时,恒定域可以是另一种同种型,例如 IgG₂。替代性的人源化的抗-CD40 抗体可以包含来自超过一种免疫球蛋白类型或同种型的序列,且选择特定恒定域来优化希望的效应功能属于本领域的普通技术。

[0060] 人源化的抗-CD40 抗体的 FR 和 CDR 或 HVL,不需要与亲本序列精确对应。例如,通过取代、插入或缺失,可以改变(例如,诱变)输入 CDR 或 HVL 或共有 FR 序列中的一个或多个残基,使得得到的氨基酸残基不再与任一个亲本序列中对应位置处的原始残基相同。但是,这样的改变通常不是广泛的。通常,至少 75%人源化的抗体残基与亲本共有 FR 和输入 CDR 序列的抗体残基相对应,更经常至少 90%,最经常大于 95%或大于 98%或大于 99%。

[0061] 影响重链和轻链可变区之间的界面(“ V_L - V_H 界面”)的免疫球蛋白残基是影响 2 条链相对彼此的接近或朝向的那些残基。可能参与链间相互作用的某些残基包括 V_L 残基 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96, 和 98 和 V_H 残基 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100, 和 103(使用 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1987) 所述的编号系统)。其它残基包括如这里整体引作参考的美国专利号 6, 407, 213 所公开的 V_L 残基 43 和 85, 和 V_H 残基 43 和 60。尽管这些残基仅仅为人 IgG 而指出,它们跨物种适用。选择合理地预期会参与链间相互作用的输入抗体残基,用于取代进共有序列。

[0062] 本文使用的术语“共有序列”和“共有抗体”指,在任意特定类型、同种型或亚基结构(例如,人免疫球蛋白可变域)的所有免疫球蛋白的每个位置处包含最经常出现的氨基酸残基的氨基酸序列。共有序列可以基于特定物种或许多物种的免疫球蛋白。“共有”序列、结构或抗体理解为包括在某些实施方案中描述的共有人序列,且指在任意特定类型、同种型或亚基结构的所有人免疫球蛋白的每个位置处包含最经常出现的氨基酸残基的氨基酸序列。提供了共有人结构和考虑了除人以外的其它物种的共有结构。因而,共有序列含有氨基酸序列,后者在每个位置处具有存在于一种或多种已知免疫球蛋白中的氨基酸,但是其可能不精确地复制任意单个免疫球蛋白的整个氨基酸序列。可变区共有序列不是从任意天然产生的抗体或免疫球蛋白获取。有用的共有序列包括人可变轻链 κ I 共有序列(SEQ ID NO:13) 和人可变重链亚型 III 共有序列(SEQ ID NO:2),它们源自在 Kabat 等, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 中提供的数据,和其变体。重链和轻链共有序列的 FR、和其变体,会提供对于制备人源化的抗-CD40 抗体有用的序列。参见,例如,美国专利号 6, 037, 454 和 6, 054, 297。在某些实施方案中,用于制备人源化的抗体的 FR 源自人可变轻链 κ I 共有序列和人可变重链亚型 III 共有序列。

[0063] 本文所述的“变体”、“抗-CD40 变体”、“人源化的抗-CD40 变体”或“变体人源化的抗-CD40”各自指,至少具有源自鼠单克隆抗体 S2C6 的重链可变 CDR 或 HVL 序列和源自人共有序列的 FR 序列的人源化的抗-CD40 抗体。变体包括在一个或 2 个轻链或重链可变域中具有一个或多个氨基酸变化的变体,条件是,所述氨基酸变化基本上不损害抗体与 CD40 的结合。人源化的抗-CD40 变体通常包括,通过实现改良的抗体分子折叠,提高抗体性能的氨基酸取代。

[0064] “分离的”抗体是已经从它的天然环境的组分中鉴别和分离和/或回收的抗体。抗体的天然环境的污染组分是可能妨碍抗体的诊断或治疗用途的那些材料,且可以是酶、激素或其它蛋白性的或非蛋白性的溶质。在一个方面,将抗体纯化至:

[0065] a) 通过 Lowry 方法测得,按抗体重量计,大于 95%分离,在另一个方面,按重量计,超过 99%分离,或

[0066] b) 使用旋转杯顺序分析仪, 足以得到 N- 末端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基的分离程度, 或

[0067] c) 使用考马斯蓝或优选的银染色剂观察到, 在还原或非还原条件下, 通过 SDS-PAGE 的同质性。

[0068] 分离的抗体包括在重组细胞内的原位抗体, 因为抗体的天然环境中的至少一种组分不存在。但是, 通常通过至少一个纯化步骤, 制备分离的抗体。

[0069] 术语“抗体性能”指有助于抗原的抗体识别或抗体体内有效性的因素。抗体氨基酸序列的变化, 可以影响抗体性质, 例如折叠, 且可以影响物理因素, 例如抗体结合抗原的起始速率 (v_0), 抗体与抗原的解离常数 (K_d), 抗体对抗原的亲和力常数, 抗体的构象, 蛋白稳定性, 和抗体的半衰期。

[0070] 在本文中使用的术语“表位标记的”指, 与“表位标记”融合的抗-CD40 抗体。“表位标记”是具有足够数目的氨基酸来提供抗体生产的表位的多肽, 并设计成不会妨碍希望的人源化的抗-CD40 抗体的活性。表位标记通常足够独特, 使得针对表位标记产生的抗体基本上不与其它表位交叉反应。合适的标记多肽通常含有至少 6 个氨基酸残基, 且通常含有约 8-50 个氨基酸残基或约 9-30 个残基。表位标记和结合该表位的抗体的实例包括 flu HA 标记多肽和它的抗体 12CA5 (Field 等, 1988 Mol. Cell. Biol. 8 : 2159-2165) ; c-myc 标记和它的 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 和 9E10 抗体 (Evan 等, 1985, Mol. Cell. Biol. 5(12) : 3610-3616) ; 和单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD) 标记和它的抗体 (Paborsky 等 1990, Protein Engineering 3(6) : 547-553)。在某些实施方案中, 表位标记是“补救受体结合表位”。本文所述的术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子 (例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或 IgG₄) 的 Fc 区的表位, 其负责增加 IgG 分子的体内血清半衰期。

[0071] 术语“细胞毒性剂”指会抑制或阻止细胞的功能和 / 或造成细胞的破坏的物质。该术语意在包括放射性同位素 (例如 I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, 和 Re¹⁸⁶), 化疗剂, 和毒素 (例如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素), 和其片段。使用已知的标准操作, 可以将这样的细胞毒性剂偶联到抗体 (例如, 人源化的抗-CD40 抗体) 上, 并用于例如治疗指示用该抗体治疗的患者。

[0072] “化疗剂”是用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括烷化剂, 例如塞替派和环磷酰胺 (CYTOXANTM) ; 烷基磺酸酯例如白消安, 英丙舒凡, 和哌泊舒凡 ; 氮丙啶例如 benzodopa, 卡波醌, meturedopa, 和 uredopa ; 氮丙啶和甲基氨基吡啶包括六甲蜜胺, 三亚胺嗪, triethylenephosphoramidate, triethylenethiophosphoramidate, 和 trimethylolomelamine ; acetogenins (尤其 bullatacin 和 bullatacinone) ; 喜树碱 (包括合成类似物托泊替康) ; 苔藓抑素 ; callystatin ; CC-1065 (包括它的阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物) ; cryptophycines (尤其 cryptophycin 1 和 cryptophycin 8) ; 多拉司他汀, auristatins (包括类似物单甲基-auristatin E 和单甲基-auristatin F) ; duocarmycin (包括合成类似物, KW-2189 和 CBI-TMI) ; eleutherobin ; pancratiastatin ; sarcodictyin ; spongistatin ; 氮芥例如苯丁酸氮芥, 萘氮芥, cholophosphamide, 雌莫司汀, 异环磷酰胺, 氮芥, 氧氮芥盐酸盐, 美法仑, 新氮芥, 苯乙酸氮芥胆甾醇酯, 泼尼莫司汀 ; 曲磷胺, 乌拉莫司汀 ; 硝基脲例如卡莫司汀, 氯脲菌素, 福莫司汀, 洛莫司汀, 尼莫司汀, 雷莫司汀 ; 抗生素例如 enediyne 抗生素 (例如, 刺孢霉素, 尤其 calicheamicin γ II 和

刺孢霉素 phiI1, 参见例如, Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186; dynemicin, 包括 dynemicin A; 二膦酸盐, 例如氯膦酸盐; esperamicin; 以及新制癌菌素生色团和相关的色蛋白 enediyne 抗生素生色团), aclacinomysins, 放线菌素, authramycin, 偶氮丝氨酸, 博来霉素, 放线菌素 C, carabycin, 洋红霉素, 嗜癌霉素, 色霉素, 更生霉素, 柔红霉素, 地托比星, 6-重氮基-5-氧-L-正亮氨酸, 多柔比星 (多柔比星TM) (包括吗啉代-多柔比星, 氰基吗啉代-多柔比星, 2-吡咯吗啉代-多柔比星, 和去氧多柔比星), epirubicin, 依索比星, 伊达比星, 麻西罗霉素, 丝裂霉素例如丝裂霉素 C, 麦考酚酸, 诺拉霉素, 橄榄霉素, 培洛霉素, potfiromycin, 嘌呤霉素, 三铁阿霉素, 罗多比星, 链黑霉素, 链佐星, 杀结核菌素, 乌苯美司, 净司他丁, 佐柔比星; 抗代谢物例如甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物例如二甲叶酸, 甲氨蝶呤, 蝶罗呤, 三甲曲沙; 嘌呤类似物例如氟达拉滨, 6-巯嘌呤, 硫咪唑, 硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物例如安西他滨, 氮杂胞苷, 6-氮尿苷, 卡莫氟, 阿糖胞苷, 二去氧尿苷, 去氧氟尿苷, 依诺他滨, 氮尿苷; 雄激素例如卡普睾酮, 屈他雄酮丙酸盐, 环硫雄醇, 美雄烷, 睾内酯; 抗肾上腺素类例如氨鲁米特, 米托坦, 曲洛司坦; 叶酸补充剂例如亚叶酸; 醋葡萄糖内酯; 醛磷酸胺糖苷; 氨基乙酰丙酸; 恩尿嘧啶; 安吡啶; bestabucil; 比生群; 依达曲沙; defofsmine; 地美可辛; 地吡酮; 依氟鸟氨酸; 依利醋铵; epothilone; 依托格鲁; 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明; maytansinoids 例如美登素和柄型菌素; 米托蒽醌, 米托蒽醌; 莫派达醇; 二胺硝吡啶; 喷司他丁; 蛋氨酸; 吡柔比星; 洛索蒽醌; 鬼臼酸; 2-乙基酰胺; 丙卡巴肼; PSK[®]; 雷佐生; 根霉素; 西佐喃; 锗螺胺; 细格孢氮杂酸; 三亚胺醌; 2, 2', 2''-三氯三乙胺; 单端孢霉烯族毒素类 (尤其 T-2 毒素, verracurin A, 杆孢菌素 A 和 anguidine); 乌拉坦; 长春地辛; 达卡巴嗪; 甘露莫司汀; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷; gacytosine; 阿拉伯糖苷 ("Ara-C"); 环磷酸胺; 塞替派; 紫杉烷, 例如, 紫杉醇 (TAXOL[®], Bristol-MyersSquibb Oncology, Princeton, NJ) 和紫杉萜 (TAXOTERE[®], Rh[®] ne-PoulencRorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨 (GemzarTM); 6-巯鸟嘌呤; 巯嘌呤; 甲氨蝶呤; 铂类似物例如顺铂和卡铂; 长春碱; 铂; 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酸胺; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞滨 (NavelbineTM); 诺消灵; 替尼泊苷; 依达曲沙; 柔红霉素; 氨基蝶呤; 希罗达; 伊班膦酸盐; CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类视黄醇例如视黄酸; 卡培他滨; 和上述任一种的药学可接受的盐、酸或衍生物。该定义也包括用来调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂, 如抗雌激素, 和选择性雌激素受体调控剂 (SERMs), 包括例如他莫昔芬 (包括 NolvadexTM), 雷洛昔芬, 屈洛昔芬, 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬, keoxifene, LY117018, 奥那司酮, 和托瑞米芬 (FarestonTM); 抑制芳香酶的芳香酶抑制剂, 其调节肾上腺中的雌激素生产, 例如, 4(5)-咪唑, 氨鲁米特, 甲地孕酮醋酸盐 (MegaceTM), 依西美坦, 福美坦, 法倔唑, 伏氯唑 (RivisorTM), 来曲唑 (FemaraTM), 和阿那曲唑 (ArimidexTM); 和抗-雄激素例如氟他胺, 尼鲁米特, 比卡鲁胺, 亮丙瑞林, 和戈舍瑞林; 和上述任一种的药学可接受的盐、酸或衍生物。

[0073] 本文使用的术语“前药”指药学活性物质的前体或衍生形式, 与亲本药物相比, 它对肿瘤细胞的细胞毒性较低, 并且能被酶促激活或者转化为更有活性的形式。参见, 例如, Wilman, 1986, " Prodrugs in CancerChemtherapy ", 见 Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast 和 Stella 等, 1985, " Prodrugs :

A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, 见: " Directed Drug Delivery, Borchardt 等, (编), pp. 247-267, Humana Press。有用的前药包括、但不限于, 含磷酸盐的前药、含硫代磷酸盐的前药、含硫酸盐的前药、含肽的前药、D- 氨基酸修饰的前药、糖基化前药、含 p- 内酰胺的前药、任选地取代的含苯氧基乙酰胺的前药、和任选地取代的含苯基乙酰胺的前药、5- 氟胞嘧啶和其它 5- 氟尿苷前药, 它们能转化为更有活性的无细胞毒性的药物。能衍生为前药的细胞毒性药物的实例包括但不限于上述化疗剂。

[0074] 术语“标记”指直接或间接缀合到抗体上的可检测的化合物或组合物。标记可以自身是可检测的(例如, 放射性同位素标记或荧光标记), 或在酶标记的情况下, 可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。可以制备标记的人源化的抗 -CD40 抗体, 并用于多种用途, 包括体外和体内诊断。

[0075] “脂质体”是由多种类型的脂类、磷脂和 / 或表面活性剂组成的小囊泡。脂质体可用于向哺乳动物输送化合物或制剂, 例如此处公开的人源化的抗 -CD40 抗体, 其任选地与一种或多种药学活性试剂相偶联或组合。脂质体的成分通常以双层结构排列, 类似于生物膜的脂类排列。

[0076] “分离的”核酸分子是从至少一种在抗体核酸的天然来源中通常伴随的污染核酸分子中鉴别和分离出的核酸分子。分离的核酸分子不同于在自然界发现的形式或环境。分离的核酸分子因此与在天然细胞中存在的核酸分子相区分。但是, 分离的核酸分子包括细胞中包含的通常表达抗体的核酸分子, 例如, 其中核酸分子是在不同于天然细胞中的染色体位置。

[0077] 术语“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作地连接的编码序列所需的多核苷酸序列。适用于原核细胞中的控制序列包括, 例如, 启动子, 操纵基因, 和核糖体结合位点序列。真核控制序列包括、但不限于, 启动子, 多腺苷酸化信号, 和增强子。这些控制序列可以用于在原核和真核宿主细胞中表达和生产人源化的抗 -CD40 抗体。

[0078] 当处于与另一个核酸序列的功能关系中时, 核酸序列是“可操作地连接的”。例如, 如果核酸前序列或分泌先导物表达为参与多肽分泌的前蛋白, 则它是可操作地连接到编码多肽的核酸上; 如果启动子或增强子会影响序列的转录, 则它是可操作地连接到编码序列上; 或者如果核糖体结合位点的位置有利于翻译, 则它是可操作地连接到编码序列上。一般而言, “可操作地连接地”指, 连接的 DNA 序列是邻接的, 在分泌先导物的情况下, 是邻接的且在读码框中。但是, 增强子任选地是邻接的。通过在方便的限制位点处的连接, 可以实现连接。如果不存在这样的位点, 可以使用合成的寡核苷酸接头或连接物。

[0079] 如本文所述, 表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换地使用, 且所有这样的命名包括其后代。因而, “转化体”和“转化的细胞”包括最初的主题细胞和从其衍生的培养物, 无论传代的次数。也应当理解, 由于故意的或天然存在的突变, 所有后代的 DNA 含量可能不精确地相同。包括在原始转化的细胞中筛选出的具有相同功能或生物活性的突变后代。当使用不同的命名时, 从上下文中可以知晓。

[0080] 用于治疗目的的术语“哺乳动物”指被归类为哺乳动物的任何动物, 包括人、家畜和农畜、动物园动物、运动动物或宠物, 如狗、马、猫、牛等。优选地, 哺乳动物是人。

[0081] 本文使用的“病症”是能从本文所述人源化的抗 -CD40 抗体的治疗获益的任意状况。这包括慢性和急性病症或疾病, 包括使哺乳动物易感所讨论的病症的那些病理学状况。

本文要治疗的非限制性实例或病症包括癌症,血液恶性肿瘤,良性和恶性肿瘤,白血病和淋巴恶性肿瘤,和炎性的、生产血管的和免疫学的病症。

[0082] 术语“癌症”和“癌性的”是指或描述,特征通常在于失调的细胞生长的哺乳动物生理状况。癌症的实例包括、但不限于,癌,淋巴瘤,母细胞瘤,肉瘤,和白血病。

[0083] 如本文所述,术语“CD40 相关病症”或“CD40 相关疾病”指,其中指示表达 CD40 的细胞的改变或消除的状况。它们包括,表现出异常增殖的表达 CD40 的细胞,或与癌性或恶性生长相关的表达 CD40 的细胞。表现出 CD40 抗原的异常表达的癌症的更具体的实例包括, B 类淋巴母细胞,伯基特淋巴瘤,多发性骨髓瘤, T 细胞淋巴瘤,卡波西肉瘤,骨肉瘤,表皮和内皮肿瘤,胰腺、肺、乳腺、卵巢、结肠、前列腺、头和颈、皮肤(黑素瘤)、膀胱和肾癌。这样的病症包括、但不限于,白血病,淋巴瘤,包括 B 细胞淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤,多发性骨髓瘤,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;实体瘤,包括肉瘤,例如骨肉瘤,尤因肉瘤,恶性黑素瘤,腺癌,包括卵巢腺癌,卡波西肉瘤 / 卡波西肿瘤和鳞状细胞癌。

[0084] CD40 相关病症也包括免疫系统的疾病和病症,例如自身免疫障碍和炎症。这样的病症包括、但不限于,类风湿性关节炎(RA),系统性红斑狼疮(SLE),硬皮病,舍格伦综合征,多发性硬化,炎性肠病(例如,溃疡性结肠炎和克罗恩病),肺炎,哮喘,和特发性血小板减少性紫癜(ITP)。

[0085] 短语“阻止.....的生长”或“生长抑制性的”在本文中用于指抑制细胞(尤其表达 CD40 抗原的肿瘤细胞类型)的生长或增殖。因而,生长抑制,例如,会显著减少 S 期的肿瘤细胞的百分比。

[0086] 术语“静脉内输注”指经大于约 15 分钟的时间段、通常约 30-90 分钟,将试剂导入动物或人患者的静脉。

[0087] 术语“静脉内推注”或“静脉内推进”指向动物或人的静脉中施用药物,以便身体在约 15 分钟或更少的时间段、通常 5 分钟或更少的时间段内接受药物。

[0088] 术语“皮下给药”指,通过从药物容器的相对缓慢的、持续的输送,将试剂导入动物或人患者的皮肤下,优选地在皮肤和基底组织之间的袋内。挤捏或拉扯在基底组织上面且远离基底组织的皮肤,可以建立袋。

[0089] 术语“皮下输注”指,通过从药物容器的相对缓慢的、持续的输送,经包括但不限于 30 分钟或更少或 90 分钟或更少的时间段,将药物导入动物或人患者的皮肤下,优选地在皮肤和基底组织之间的袋内。任选地,通过植在动物或人患者皮肤下的药物输送泵的皮下植入,可以进行输注,其中所述泵会输送预定量的药物预定的时间段,例如 30 分钟,90 分钟或跨治疗方案长度的时间段。

[0090] 术语“皮下推注”指在动物或人患者的皮肤下面施用药物,其中推注药物输送小于约 15 分钟;在另一个方面,小于 5 分钟,在另一个方面,小于 60 秒。在另一个方面,在皮肤和基底组织之间的袋内给药,其中通过挤捏或拉扯在基底组织上面且远离基底组织的皮肤,可以建立袋。

[0091] 术语“治疗有效量”用于指具有有益的患者结果(例如,生长停止效应或造成细胞的缺失)的活性试剂的量。在一个方面,治疗有效量具有细胞凋亡活性,或能诱导细胞死亡。在另一个方面,治疗有效量指已经证实会例如有效地减慢疾病发展的靶血清浓度。根据待治疗的病症,可以以常规方式测量效能。例如,在特征在于表达 CD40 的细胞的肿瘤性

疾病或病症中,通过评估达到疾病发展的时间(TTP)或确定响应速率(RR),可以测量效能。

[0092] 本文使用的术语“治疗”和“疗法”等意在包括,导致任何临床上希望的或有益的效果的疾病或病症的治疗以及预防或抑制措施,所述效果包括但不限于一种或多种症状的缓解或解除,疾病或病症发展的消退、减慢或停止。因而,例如,术语治疗包括,在疾病或病症的症状发生之前或之后施用试剂,从而预防或去除疾病或病症的一种或多种迹象。作为另一个实例,该术语包括,在疾病的临床显现之后施用试剂,以战胜疾病的症状。此外,在发生临床症状后和临床症状已经发展之后施用试剂,也包含本文使用的“治疗”或“疗法”,其中施用会影响疾病或病症的临床参数,例如组织损伤的程度,或转移的量或范围,无论治疗是否会导致疾病的改善。

[0093] 术语“包装插页”用来指治疗产物的商品包装中通常包含的说明书,其含有关于适应症、用法、施用、禁忌症的信息和/或关于使用这些治疗产物的警告。

[0094] 缩写“AFP”指二甲基缬氨酸-缬氨酸-dolaisoleuine-dolaproine-苯丙氨酸-对苯二胺。

[0095] 缩写“MMAE”指单甲基 auristatin E。

[0096] 缩写“AEB”指通过使 auristatin E 与对乙酰基苯甲酸反应生成的酯。

[0097] 缩写“AEVB”指通过使 auristatin E 与苯甲酰基戊酸反应生成的酯。

[0098] 缩写“MMAF”指 dovaline-缬氨酸-dolaisoleuine-dolaproine-苯丙氨酸。

[0099] 抗体

[0100] 本文描述和公开了人源化的抗-CD40 抗体,和包含人源化的抗-CD40 抗体的组合物和制品。也描述了结合剂,其包含人源化的抗-CD40 抗体的抗原结合片段。人源化的抗-CD40 抗体和结合剂可以阻止细胞的生长,造成表达 CD40 的细胞的缺失,或对靶细胞诱导或造成细胞毒性的或细胞抑制的效应。人源化的抗-CD40 抗体和结合剂可以用于治疗特征在于表达 CD40 表面抗原的细胞的增殖的多种疾病或病症。

[0101] 人源化的抗-CD40 抗体和 CD40 结合剂各自至少包含特异性识别 CD40 表位的一部分(即,抗原结合片段)。在有些实施方案中,人源化的抗-CD40 抗体或 CD40 结合剂包含与抗体 S2C6 竞争结合的抗原结合片段。

[0102] 在有些实施方案中,抗原结合片段可以,例如,阻断增殖或阻止细胞的生长,或造成它的耗尽、死亡或它的缺失,例如,通过结合 CD40 表面抗原。例如,在 T 和 B 细胞恶性肿瘤中,当恶性细胞暴露于导致正常淋巴细胞的激活的刺激时,经常产生抗-肿瘤作用(例如,生长停止,有或没有细胞缺失或细胞凋亡)。通过抗原受体或辅助刺激受体的信号,已经观察了该活化-诱导的生长停止(参见,例如, Ashwell 等,1987, Science 237 :61; Bridges 等,1987, J. Immunol. 139 :4242; Page 和 Defranco, 1988, J. Immunol. 140 :3717; 和 Beckwith 等,1990, J. Natl. Cancer Inst. 82 :501)。作为抗体或可溶性配体的特异性结合的结果,CD40 刺激会抑制 B 细胞淋巴瘤生长(参见,例如, Funakoshi 等,1994, Blood 83 :2787-2794)。以此方式抑制恶性细胞生长且针对 CD40 表面抗原的试剂,是适当试剂的实例。

[0103] CD40 特异性试剂包括结合 CD40 的人源化的抗-CD40 抗体的抗原结合片段(例如,人 CD40 或其变体)。CD40 特异性试剂和抗体可以任选地缀合或融合到细胞毒性剂或化疗剂上。在其中人源化的抗体结合 CD40 表面抗原并造成表达 CD40 的细胞类型的缺失的方面,

结合通常特征在于体内寻靶 CD40 表面抗原细胞。合适的结合剂会以足够的亲和力和 / 或亲合力结合 CD40 抗原,从而通过特异性地靶向表达该抗原的细胞,CD40 特异性试剂可以用作治疗剂。

[0104] 在一个方面,试剂是含有鼠单克隆抗体 S2C6 的 CDR 的人源化的抗体 (S2C6 抗体记载在,例如,Paulie 等,1984, *Cancer Immunol. Immunother.* 17 :165-179)。已经证实 S2C6 抗体会对人外周 B 细胞发挥激动剂活性,如通过抗体的以剂量依赖性的方式刺激初期 B 细胞增殖的能力 (参见,例如,Paulie 等,1989, *J. Immunol.* 142 :590-595)、以及体内抗 - 肿瘤的活性 (参见,例如,美国专利号 6, 838, 261) 所证实的。

[0105] 在有些方面,人源化的抗体会使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45 %、至少 50 %、至少 60 %或至少 75 %。测定 CD40 配体与 CD40 的结合的增加的方法,公开在美国专利号 6, 838, 261 (其公开内容在本文中引作参考)。

[0106] 在有些实施方案中,人源化的抗 -CD40 抗体 (包括其抗原结合片段,例如重链和轻链可变域) 包含源自 S2C6 鼠抗体的 CDR 或 HVL 的残基的氨基酸序列 (参见,例如,美国专利号 6, 838, 261) 和源自人免疫球蛋白构架区的氨基酸残基。在一个方面,人构架区氨基酸源自如美国专利号 6, 037, 454 所述的重链亚型 III 可变域和 κ 轻链可变域的人共有序列。人源化的抗 -CD40 抗体任选地包含在共有构架区内的特异性的氨基酸取代。

[0107] 在这些框架位置中的特异性的氨基酸取代,可以提高不同方面的抗体性能,包括结合亲和力和 / 或稳定性,这优于通过将 CDR 或 HVL “直接交换”进入共有构架区内形成的人源化抗体所证实的,如下面的实施例所述。

[0108] 在有些实施方案中,本文公开的人源化的抗 -CD40 抗体至少包含具有鼠单克隆抗体 S2C6 的 CDR 或 HVL 的重链或轻链可变域和具有表 5 所述特异性取代的人共有重链和轻链可变域的 FR。在表 3 和 4 中,分别显示了具有取代的可变重链氨基酸序列和具有取代的可变轻链氨基酸序列的比对。这些序列包括具有 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的重链可变域和具有 SEQ ID NO :14 的氨基酸序列的轻链可变域。

[0109] 在某些实施方案中,人源化的抗 -CD40 抗体是抗体片段。已经开发了用于生产抗体片段的不同技术。通过完整抗体的蛋白水解消化,可以衍生出片段 (参见,例如, Morimoto 等,1992, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24 :107-117;和 Brennan 等,1985, *Science* 229 :81)。或者,片段可以在重组宿主细胞中直接生产。例如, Fab' -SH 片段可以从大肠杆菌直接回收,并化学地偶联,以形成 F(ab')₂ 片段 (参见,例如, Carter 等,1992, *Bio/Technology* 10 :163-167)。通过另一个方案, F(ab')₂ 片段可以从重组宿主细胞培养物中直接分离。用于生产抗体片段的其它技术,是熟练的从业人员显而易见的。

[0110] 某些实施方案包括人源化的抗 -CD40 抗体的 F(ab')₂ 片段,其分别包含下述序列的重链可变域氨基酸序列和轻链可变域氨基酸序列: SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :15; SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :16; SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :16; SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :16; 或 SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :16。这样的实施方案可以包括包含这样的

F(ab')₂ 的完整抗体。

[0111] 其它实施方案包括人源化的抗-CD40 抗体的 F(ab')₂ 片段,其分别包含下述序列的重链可变域氨基酸序列和轻链可变域氨基酸序列:SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:16;和 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:16。

[0112] 其它实施方案包括人源化的抗-CD40 抗体的 F(ab')₂ 片段,其分别包含下述序列的重链可变域氨基酸序列和轻链可变域氨基酸序列:SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:16;和 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:16。

[0113] 有些实施方案包括人源化的抗-CD40 抗体的 F(ab')₂ 片段,其含有具有 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列的重链可变域和具有 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的轻链可变域。

[0114] 在有些实施方案中,抗体或抗体片段包括介导效应物功能的恒定区。恒定区可以针对表达 CD40 的靶细胞提供抗体-依赖性的细胞毒性 (ADCC)、抗体-依赖性的细胞吞噬作用 (ADCP) 和 / 或补体-依赖性的细胞毒性 (CDC) 应答。效应结构域可以是,例如, Ig 分子的 Fc 区域。通常,CD40 结合剂会募集和 / 或活化细胞毒性的白细胞 (例如,自然杀伤 (NK) 细胞,吞噬作用细胞 (例如,巨噬细胞),和 / 或血清补体成分)。

[0115] 抗体的效应结构域可以来自任意合适的脊椎动物物种和同种型。来自不同动物物种的同种型的介导效应功能的能力不同。例如,人免疫球蛋白的介导 CDC 和 ADCC/ADCP 的能力的次序通常分别是: IgM ≈ IgG₁ ≈ IgG₃ > IgG₂ > IgG₄ 和 IgG₁ ≈ IgG₃ > IgG₂/IgM/IgG₄。鼠免疫球蛋白通常会分别以下述次序介导 CDC 和 ADCC/ADCP: 鼠 IgM ≈ IgG₃ >> IgG_{2b} > IgG_{2a} >> IgG₁ 和 IgG_{2b} > IgG_{2a} > IgG₁ >> IgG₃。在另一个实施例中,鼠 IgG_{2a} 介导 ADCC, 而鼠 IgG_{2a} 和 IgM 介导 CDC。

[0116] 抗体修饰

[0117] 人源化的抗-CD40 抗体和试剂可以包括人源化的抗-CD40 抗体或其抗原结合片段的修饰。例如,可能希望修饰抗体的效应功能,以便例如增强抗体在治疗癌症中的有效性。一种这样的修饰是,将半胱氨酸残基导入 Fc 区域,从而在该区域形成链间二硫键。这样产生的同型二聚体抗体可以具有提高的内化能力和 / 或增强的补体-介导的细胞杀伤和 / 或抗体-依赖性的细胞毒性 (ADCC)。参见,例如,Caron 等,1992, J. Exp. Med. 176:1191-1195; 和 Shopes, 1992, J. Immunol. 148:2918-2922。使用 Wolff 等,1993, Cancer Research 53:2560-2565 所述的异双功能交联剂,也可以制备具有增强的抗-肿瘤活性的同型二聚体抗体。或者,可以构建含有双 Fc 区域的抗体,增强补体裂解和抗体的 ADCC 能力。参见 Stevenson 等,1989, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230。

[0118] 通过修饰它们的 Fc 区域的糖基化模式,已经制备了具有提高的支持 ADCC 的能力的抗体。这是可行的,因为 C_H2 结构域中天冬酰胺残基 N297 处的抗体糖基化会参与 ADCC 所必需的 IgG 和 Fc 受体之间的相互作用。已经构建了宿主细胞系来表达具有改变的糖基化的抗体,例如增加的二等分 N-乙酰基葡萄糖胺或还原的岩藻糖。岩藻糖还原会提供比增加存在的二等分 N-乙酰基葡萄糖胺更大的对 ADCC 活性的增强。此外,低岩藻糖抗体对 ADCC 的增强,独立于 Fc RIIIa V/F 多态性。

[0119] 修饰抗体 Fc 区域的氨基酸序列,是增强 ADCC 的糖基化工程的替代方案。通过广泛的突变分析,已经测定了人 IgG₁ 上的 Fc 受体的结合位点。这导致具有 Fc 突变的人源化的 IgG₁ 抗体的产生,所述 Fc 突变会增加对 Fc RIIIa 的结合亲和力,并体外增强 ADCC。另外,用结合性质的许多不同排列,例如,提高的对特定 Fc R 受体的结合、且对其它 Fc R 受体的结合保持不变或减少,已经得到了 Fc 变体。

[0120] 在有些实施方案中,可以如其公开内容在这里引作参考的美国专利申请公开号 2006-0003412 和 2006-0008883 所述,修饰 Fc 区域。

[0121] 另一个方面包括免疫缀合物,其包含人源化的抗体或其片段,后者缀合到细胞毒性剂(例如化疗剂)、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素,或其片段)或放射性同位素(即,放射性缀合物)上。

[0122] 上面已经描述了用于制备这样的免疫缀合物的化疗剂。可以用于形成有用的免疫缀合物的酶活性毒素和其片段包括:白喉 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -八叠球菌、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒素、巴豆毒素、*Saponaire officinalis* 抑制剂、白树毒素、米托洁林、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢霉烯(tricothecene)等。许多种放射性核素可用于生产放射性缀合的人源化的抗-CD40 抗体。实例包括 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, 和 ¹⁸⁶Re。

[0123] 人源化的抗-CD40 抗体和细胞毒性剂或化疗剂的缀合物,可以通过已知方法,使用下述试剂制备:双功能蛋白偶联剂例如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)-丙酸酯(SPDP)、iminothiolane(IT)、亚氨酯的双功能衍生物(如二甲基己二酰二胺 HCL)、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类(如戊二醛)、双叠氮化合物(如双(对叠氮苯甲酰)己二胺)、双重氮衍生物(如双(重氮对苯甲酰)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯-2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒素免疫毒素能如 Vitetta 等,1987, Science 238:1098 所述制备。碳-14-标记的 1-异硫氰酸根合苄基-3-甲基二乙烯三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸缀合到抗体上的一种示例性螯合剂。参见,例如,国际公开 W094/11026。也可以用可切割的连接物形成缀合物,例如在公开的欧洲专利申请 0 624 377 中公开的那些;其公开内容在本文中引作参考。

[0124] 在另一个实施方案中,抗体可以缀合到用于肿瘤预导向的“受体”(如抗生物素蛋白链菌素)上。在该方法中,对患者施用抗体-受体缀合物,随后利用清除剂从循环中除去未结合的缀合物,然后施用选择性地结合受体(例如,抗生物素蛋白)的“配体”,所述配体缀合在细胞毒性剂(如放射性核素)上。

[0125] 本文公开的人源化的抗-CD40 抗体也可以配制成免疫脂质体。含有抗体的脂质体可以通过本领域已知的方法制备,例如在 Epstein 等,1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688;Hwang 等,1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030;和美国专利号 4,485,045 和 4,544,545 中描述的方法。具有增强的循环时间的脂质体,公开在例如美国专利号 5,013,556 中。

[0126] 特别有用的脂质体可以用反相蒸发法产生,其中使用含有磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂类组合物。脂质体通过规定孔径的滤器喷出,产生具有希望的直径的脂质体。本文公开的抗体的 Fab' 片段可以通过二硫化物交换反应,与如

Martin 等,1982, J. Biol. Chem. 257 :286-288 所述的脂质体缀合。脂质体中任选地含有化疗剂(例如多柔比星)。参见,例如, Gabizon 等,1989, J. National Cancer Inst. 81(19) : 1484。

[0127] 本文描述和公开的抗体也可以用于 ADEPT (抗体-导向的酶前药治疗) 方法中, 其中将抗体缀合到前药-激活酶上, 后者可以将前药(例如, 肽基化疗剂) 转化成有活性的抗癌药物。参见, 例如, WO 81/01145, WO88/07378, 和美国专利号 4, 975, 278。用于 ADEPT 的免疫缀合物的酶组分, 是能以将它转化成更有活性的、细胞毒性形式的方式作用于前药的酶。用于 ADEPT 的具体酶包括、但不限于, 可用于将含磷酸盐的前药转化为游离药物的碱性磷酸酶; 可用于将含硫酸盐的前药转化为游离药物的芳基硫酸酯酶; 可用于将无毒 5- 氟胞嘧啶转化为抗癌药 5- 氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨基酶; 可用于将含肽前药转化为游离药物的蛋白酶, 如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶 B 和 L); 可用于转化含 D- 氨基酸取代基的前药的 D- 丙氨酰羧肽酶; 可用于将糖基化前药转化为游离药物的碳水化合物裂解酶, 如 α - 半乳糖苷酶和神经氨酸酶; 可用于将 α - 内酰胺衍生的药物转化为游离药物的 α - 内酰胺酶; 和可用于将在它们的胺氮处分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基衍化的药物转化为游离药物的青霉素酰胺酶, 如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者, 具有酶活性的抗体(“抗体酶”) 可以用于将前药转化为游离活性药物(参见, 例如, Massey, 1987, Nature 328 :457-458)。抗体- 抗体酶缀合物可以通过已知方法制备, 用于对肿瘤细胞群输送抗体酶, 例如, 通过使酶共价结合上面讨论的人源化的抗-CD40 抗体/ 异双功能交联剂。或者, 也可以使用重组 DNA 技术构建融合蛋白, 其至少包含本文公开的抗体的抗原结合区, 后者至少与上述酶的功能活性部分相连接(参见, 例如, Neuberger 等, 1984, Nature 312 :604-608)。

[0128] 在某些实施方案中, 可能希望使用人源化的抗-CD40 抗体片段(而不是完整抗体) 来例如增强肿瘤穿透。可能希望修饰抗体片段, 以便增加它的血清半衰期。这可以通过例如将补救受体结合表位掺入抗体片段中来实现。在一种方法中, 可以改变(例如, 突变) 抗体片段的适当区域, 或者可以将表位掺入肽标记中, 然后将后者与抗体片段在任一端或在中间融合, 例如, 通过 DNA 或肽合成。参见, 例如, WO 96/32478。

[0129] 在其它实施方案中, 也包括人源化的抗-CD40 抗体的共价修饰。在适当时, 它们可以通过化学合成或通过抗体的酶或化学切割来制备。通过使抗体的靶向氨基酸残基与有机衍生剂反应(其能与选择的侧链或氨基- 或羧基- 端残基反应), 可以将其它类型的抗体共价修饰导入分子中。

[0130] 共价修饰包括下述基团的修饰: 半胱氨酰残基, 组氨酰残基, 赖氨酰和氨基端残基, 精氨酰残基, 酪氨酰残基, 羧基侧基(天冬氨酰基或谷氨酰基), 谷氨酰基和天冬酰胺酰残基, 或丝氨酰基或苏氨酰基残基。另一类共价修饰包含糖苷与抗体的化学或酶促偶联。

[0131] 可以化学地或酶促地实现抗体上存在的任意碳水化合物部分的去除。化学去糖基化描述在 Hakimuddin 等, 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259 :52 和 Edge 等, 1981, Anal. Biochem., 118 :131。通过使用 Thotakura 等, 1987, Meth. Enzymol. 138 :350 所述的许多种内- 和外- 糖苷酶, 可以实现抗体上碳水化合物部分的酶促切割。

[0132] 另一类有用的共价修饰包含, 以美国专利号 4, 640, 835、美国专利号 4, 496, 689、美国专利号 4, 301, 144、美国专利号 4, 670, 417、美国专利号 4, 791, 192 和美国专利号

4, 179, 337 中的一个或多个所述的方式, 将抗体连接到许多种非蛋白聚合物之一上, 例如, 聚乙二醇, 聚丙二醇或聚氧烯烃。

[0133] 人源化和氨基酸序列变体

[0134] 下面的实施例 1 描述了人源化抗 -CD40 抗体的方法, 实施例 2 描述了变体。在某些实施方案中, 可能希望产生这些人源化的抗体的氨基酸序列变体, 尤其其中它们会提高人源化的抗体的结合亲和力或其它生物学性质。

[0135] 通过将适当核苷酸变化导入抗 -CD40 抗体 DNA, 或通过肽合成, 可以制备抗 -CD40 抗体的氨基酸序列变体。这样的变体包括, 例如, 本文实施例的抗 -CD40 抗体的氨基酸序列内残基的缺失和 / 或插入和 / 或取代。进行缺失、插入和取代的任意组合, 以获得最终构建体, 只要最终构建体具有希望的特性。氨基酸改变也可改变人源化的或变体抗 -CD40 抗体的翻译后加工, 例如改变糖基化位点的数量或位置。

[0136] 一种方法可用于鉴别抗 -CD40 抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域, 它称作“丙氨酸扫描诱变法”, 如 Cunningham 和 Wells (Science, 244 :1081-1085 (1989)) 所述。在此确定了一个残基或一组靶残基 (例如, 带电残基, 如 arg、asp、his、lys 和 glu), 并替换为中性或带负电的氨基酸 (通常丙氨酸), 以影响氨基酸与 CD40 抗原的相互作用。然后通过取代位点引入其它变异, 确定证实对取代功能敏感的氨基酸位置。因此, 预先确定用于引入氨基酸序列变异的位点, 而不需预先确定突变本身的性质。例如, 为了分析特定位点突变的表现, 在靶密码子或区域处进行丙氨酸扫描或随机诱变, 并筛选表达的抗 -CD40 抗体变体的希望的活性。

[0137] 氨基酸序列插入包括氨基端和 / 或羧基端融合, 其长度从一个残基到含有一百个或以上残基的多肽, 以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括, 与表位标记融合的抗 -CD40 抗体。抗 -CD40 抗体分子的其它插入变体包括与酶的抗 -CD40 抗体的 N 端或 C 端的融合体, 或延长抗体的血清半衰期的多肽。

[0138] 另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体在抗 -CD40 抗体分子中的至少一个氨基酸残基被去除, 并在该位置插入不同的残基。最感兴趣的用于取代诱变的位点包括超变区, 但是也包括 FR 改变。表 1 在“优选取代”标题下列出了保守取代。如果这些取代导致生物活性改变, 可引入更多实质改变, 在表 1 中被命名为“示例性取代”, 或者如以下关于氨基酸类别所进一步描述, 并且筛选产物。

[0139] 表 1

[0140]	原始残基	示例性取代	优选取代
[0141]	Ala (A)	val ; leu ; ile	val
[0142]	Arg (R)	lys ; gln ; asn	lys
[0143]	Asn (N)	gln ; his ; asp, lys ;	gln
[0144]		arg	
[0145]	Asp (D)	glu ; asn	glu
[0146]	Cys (C)	ser ; ala	ser
[0147]	Gln (Q)	asn ; glu	asn
[0148]	Glu (E)	asp ; gln	asp
[0149]	Gly (G)	ala	ala

[0150]	His (H)	asn ;gln ;lys ;arg	arg
[0151]	Ile (I)	leu ;val ;met ;ala ;	leu
[0152]		phe ;正亮氨酸	
[0153]	Leu (L)	正亮氨酸 ;ile ;val ;	ile
[0154]		met ;ala ;phe	
[0155]	Lys (K)	arg ;gln ;asn	arg
[0156]	Met (M)	leu ;phe ;ile	leu
[0157]	Phe (F)	leu ;val ;ile ;ala ;tyr	tyr
[0158]	Pro (P)	ala	ala
[0159]	Ser (S)	thr	thr
[0160]	Thr (T)	ser	ser
[0161]	Trp (W)	tyr ;phe	tyr
[0162]	Tyr (Y)	trp ;phe ;thr ;ser	phe
[0163]	Val (V)	ile ;leu ;met ;phe ;	leu
[0164]		ala ;正亮氨酸	

[0165] 抗体生物学性质的本质改变通过选择取代实现,这些取代的下述作用显著不同:保持 (a) 取代区域中多肽主链的结构,如片层或螺旋构象,(b) 靶部位处分子的电荷或疏水性,或 (c) 侧链的大小。自然存在的残基根据共同的侧链性质分为以下几类:

[0166] (1) 疏水:正亮氨酸,met,ala,val,leu,ile;

[0167] (2) 中性亲水:cys, set, thr;

[0168] (3) 酸性:asp, glu;

[0169] (4) 碱性:asn, gin, his, lys, arg;

[0170] (5) 影响链方向的残基:gly, pro;和

[0171] (6) 芳族:trp, tyr, phe。

[0172] 非保守性取代需要将这些类别之一的成员换为另一类别。

[0173] 不参与保持人源化的或变体抗-CD40 抗体的适当构象的任何半胱氨酸残基一般也可以取代为丝氨酸,以提高分子的氧化稳定性,并防止异常交联,或提供与细胞毒性的或细胞抑制的化合物缀合的建立点。反之,也可以向抗体中加入半胱氨酸键,以提高其稳定性(特别是在抗体是抗体片段如 Fv 片段时)。

[0174] 一类取代变体包含,取代亲本抗体(例如,人源化的或人抗体)的一个或多个超变区残基。通常,产生的为进一步发展选择的变体具有比产生它们的亲本抗体提高的生物学性质。生产这些取代变体的一种适宜方法是利用噬菌体展示的亲和成熟法。简言之,突变几个超变区位点(例如 6-7 个位点),以产生每个位点的所有可能的氨基取代。这样产生的抗体变体由丝状噬菌体颗粒以单价方式展示,作为与包装于每个颗粒中的 M13 的基因 III 产物的融合体。然后筛选噬菌体展示的变体的生物活性(例如结合亲和力)。为了确定用于修饰的候选超变区位点,可以进行丙氨酸扫描诱变,以鉴别明显有助于抗原结合的超变区残基。或者或另外,为了鉴别抗体与人 CD40 之间的接触点,分析抗原-抗体复合物的晶体结构也是有利的。这些接触残基和邻近残基是按照此处详述的技术取代的候选残基。产生这些变体后,对全部变体进行此处所述的筛选,可以选择在一次或多次相关试验中具有

优越性质的抗体,用于进一步发展。

[0175] 抗体的另一类氨基酸变体会改变抗体的原始糖基化模式。“改变”是指,删除抗体中的一个或多个碳水化合物部分,和/或添加一个或多个抗体中没有的糖基化位点。

[0176] 抗体的糖基化一般是 N- 连接的或 O- 连接的。N- 连接的是指,碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链连接。三肽序列天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸(其中 X 是除脯氨酸之外的任一氨基酸)是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链的酶促连接的识别序列。因此,这些三肽序列中的任一种在多肽中的存在,都会产生可能的糖基化位点。O- 连接的糖基化是指 N- 乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟氨基酸(最常见的是丝氨酸或苏氨酸,尽管也可以使用 5- 羟脯氨酸或 5- 羟赖氨酸)的连接。通过改变氨基酸序列,使其含有一种或多种上述三肽序列(用于 N- 连接的糖基化位点),可以方便地向抗体中添加糖基化位点。也可以通过向原始抗体序列中添加或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基,进行这种改变(对于 O- 连接的糖基化位点)。

[0177] 通过本领域周知的多种方法,可以制备编码抗 -CD40 抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于:从天然来源分离(对于天然存在的氨基酸序列变体),或通过以前制备的变体或非变体形式的抗 -CD40 抗体的寡核苷酸介导的(或定点的)诱变、PCR 诱变和盒诱变来制备。

[0178] 人抗体

[0179] 作为人源化的替代方案,可以制备人抗体。例如,可以使用转基因动物(例如,小鼠),其在免疫接种后,能在没有生成内源免疫球蛋白的情况下,生产人抗体的所有组分。例如,已经描述,嵌合的和种系突变的小鼠中抗体重链连接区域(J_H)基因的纯合子缺失,会导致内源抗体生产的完全抑制。这样的种系突变的小鼠中人种系免疫球蛋白基因阵列的转移,会导致抗原挑战后人抗体的生产。作为人源化的替代方案,可以制备人抗体。例如,可以使用转基因动物(例如,小鼠),其在免疫接种后,能在没有生成内源免疫球蛋白的情况下,生产人抗体的所有组分。例如,已经描述,嵌合的和种系突变的小鼠中抗体重链连接区域(J_H)基因的纯合子缺失,会导致内源抗体生产的完全抑制。这样的种系突变的小鼠中人种系免疫球蛋白基因阵列的转移,会导致抗原挑战后人抗体的生产。参见,例如, Jakobovits 等,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :2551; Jakobovits 等,1993, Nature 362 :255-258; Bruggermann 等,1993, Year in Immuno. 7 :33; 和美国专利号 5,591,669; 5,589,369; 5,545,807; 6,075,181; 6,150,584; 6,657,103; 和 6,713,610。

[0180] 或者,噬菌体展示技术(参见,例如, McCafferty 等,1990, Nature 348 :552-553)可以用于从来自未免疫的供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库,体外生产人抗体和抗体片段。根据该技术,将抗体 V 结构域基因在框架内克隆进丝状噬菌体例如 M13 或 fd 的主要或次要壳蛋白基因中,并作为功能抗体片段显示在噬菌体颗粒的表面上。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,基于抗体的功能性质的选择,也会导致编码表现出这些性质的抗体的基因的选择。因而,噬菌体会模仿 B- 细胞的有些性质。噬菌体展示可以以多种形式进行;它们的综述参见,例如, Johnson 和 Chiswell,1993, Current Opinion in Structural Biology 3 :564-571。V- 基因区段的几种来源可以用于噬菌体展示。Clackson 等,1991, Nature 352 :624-628 从源自免疫小鼠的脾的 V 基因的小随机组合文库中,分离了抗 - 噁唑酮抗体的不同阵列。可以构建来自未免疫的人供体的 V 基因的所有组分,且可以

基本上按照 Marks 等, 1991, J. Mol. Biol. 222 :581-597 或 Griffith 等, 1993, EMBO J. 12 : 725-734 所述的技术, 分离抗原 (包括自身抗原) 的不同阵列的抗体。也参见美国专利号 5, 565, 332 和 5, 573, 905。如上面所讨论的, 也可以用体外激活的 B 细胞产生人抗体 (参见美国专利号 5, 567, 610 和 5, 229, 275)。

[0181] 多核苷酸, 载体, 宿主细胞, 和重组方法

[0182] 其它实施方案包括包含人源化的抗 -CD40 抗体的编码序列的分离的多核苷酸, 载体, 和包含该多核苷酸的宿主细胞, 和用于生产人源化的抗体的重组技术。分离的多核苷酸可以编码任意希望形式的抗 -CD40 抗体, 包括, 例如, 全长单克隆抗体, Fab, Fab', F(ab')₂, 和 Fv 片段, 双特异抗体, 线性抗体, 单链抗体分子, 和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0183] 有些实施方案包括分离的多核苷酸, 后者包含编码具有 SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :7、SEQ ID NO :8、SEQ ID NO :9、SEQ ID NO :10 或 SEQ ID NO :11 的重链可变区氨基酸序列的抗体或抗体片段的序列。有些实施方案包括分离的多核苷酸, 后者包含编码具有 SEQ ID NO :14、SEQ ID NO :15 或 SEQ ID NO :16 的轻链可变域氨基酸序列的抗体或抗体片段的序列。

[0184] 在一个方面, 所述分离的多核苷酸序列编码具有重链可变域和轻链可变域的抗体或抗体片段, 所述重链可变域和轻链可变域分别包含下述氨基酸序列: SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :15; SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :16; SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :16; SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :16; 或 SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :16。

[0185] 在另一个方面, 所述分离的多核苷酸序列编码具有重链可变域和轻链可变域的抗体或抗体片段, 所述重链可变域和轻链可变域分别包含下述氨基酸序列: SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :16; SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :16; SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :16; 和 SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :16。

[0186] 在另一个方面, 所述分离的多核苷酸序列编码具有重链可变域和轻链可变域的抗体或抗体片段, 所述重链可变域和轻链可变域分别包含下述氨基酸序列: SEQ ID NO :7 和 SEQ ID NO :14; SEQ ID NO :6 和 SEQ ID NO :16; SEQ ID NO :10 和 SEQ ID NO :16; 和 SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :16。

[0187] 在另一个方面, 所述分离的多核苷酸序列编码具有重链可变域和轻链可变域的抗体或抗体片段, 所述重链可变域包含 SEQ ID NO :10 的氨基酸序列, 所述轻链可变域包含 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列。

[0188] 包含人源化的抗 -CD40 抗体或其一个片段或链的编码序列的多核苷酸可以融合到一个或多个本领域已知的调节或控制序列上, 且可以包含在本领域已知的适当表达载体或宿主细胞中。编码重链或轻链可变域的每一个多核苷酸分子可以独立地融合到编码恒定域 (例如人恒定域) 的多核苷酸序列上, 以便生产完整抗体。或者, 可以将多核苷酸或其一部分融合到一起, 提供生产单链抗体的模板。

[0189] 为了重组生产,将编码抗体的多核苷酸插入用于克隆(DNA的扩增)或表达的复制载体中。可以得到许多适用于表达重组抗体的载体。载体组分通常包括、但不限于,下述的一种或多种:信号序列,复制起点,一个或多个标记基因,增强子元件,启动子,和转录终止序列。

[0190] 人源化的抗-CD40抗体也可以生产为融合多肽,其中抗体与异源多肽(例如信号序列或在成熟蛋白或多肽的氨基末端具有特异性切割位点的其它多肽)相融合。选择的异源信号序列通常是能被宿主细胞识别和加工(即,被信号肽酶切割)的序列。对于不能识别和加工人源化的抗-CD40抗体信号序列的原核宿主细胞,信号序列可以取代为原核信号序列。信号序列可以是,例如,碱性磷酸酶,青霉素酶,脂蛋白,热稳定的肠毒素II先导物,等。对于酵母分泌,天然信号序列可以取代为,例如,从酵母转化酶 α -因子(包括酵母和克鲁维氏酵母 α -因子先导物)、酸性磷酸酶、白色假丝酵母葡萄糖淀粉酶得到的先导序列,或W090/13646所述的信号。在哺乳动物细胞中,可以使用哺乳动物信号序列以及病毒分泌先导物,例如,单纯疱疹gD信号。将这样的前体区域的DNA在读码框内连接到编码人源化的抗-CD40抗体的DNA上。

[0191] 表达和克隆载体含有能使该载体在一种或多种选定的宿主细胞中复制的核酸序列。通常,在克隆载体中,该序列是能使载体独立于宿主染色体DNA复制的序列,且包括复制起点或自主复制序列。对于许多种细菌、酵母和病毒,这样的序列是众所周知的。来自质粒pBR322的复制起点适用于大多数革兰氏阴性细菌,2质粒起点适用于酵母,多种病毒起点(SV40,多瘤,腺病毒,VSV,和BPV)适用于哺乳动物细胞中的克隆载体。通常,哺乳动物表达载体不需要复制起点组分(通常只可以使用SV40起点,因为它含有早期启动子)。

[0192] 表达和选择载体可以含有选择基因,也称作选择标记。典型的选择基因编码的蛋白会:(a)赋予对抗生素或其它毒素(例如,氨基苄西林,新霉素,甲氨蝶呤或四环素)的抗性,(b)弥补营养缺陷型缺陷,或(c)供应从复合培养基不能得到的关键营养素,例如,编码芽孢杆菌的D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0193] 选择方案的一个实例采用药物来阻止宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞,会生产赋予药物抗性的蛋白,从而在选择方案中存活。这样的显性选择的实例使用药物新霉素,霉酚酸,和潮霉素。

[0194] 适用于哺乳动物细胞的选择标记的另一个实例是,能鉴别摄入编码人源化的抗-CD40抗体的核酸的感受态细胞的那些,例如DHFR(二氢叶酸还原酶)、胸苷激酶、金属硫蛋白-I和-II(例如灵长类动物金属硫蛋白基因)、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0195] 例如,通过在含有甲氨蝶呤(Mtx)(DHFR的一种竞争拮抗剂)的培养基中培养全部转化体,首先鉴别出用DHFR选择基因转化的细胞。当使用野生型DHFR时,适当的宿主细胞是DHFR活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系(例如,DG44)。

[0196] 或者,通过在含有选择标记的选择剂(例如氨基糖苷抗生素,例如,卡那霉素,新霉素,或G418)的培养基中培养细胞,可以选择用编码抗-CD40抗体、野生型DHFR蛋白的DNA序列和另一种选择标记(例如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH))转化或共转化的宿主细胞(更具体地,含有内源DHFR的野生型宿主)。参见,例如,美国专利号4,965,199。

[0197] 适用于酵母的选择基因是存在于酵母质粒YRp7中的TRP1基因(Stinchcomb等,1979,Nature 282:39)。TRP1基因会提供缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变株的选择

标记,例如, ATCC No. 44076 或 PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85 :12)。trp1 损伤在酵母宿主细胞基因组中的存在,又会提供通过在没有色氨酸的情况下的生长检测转化的有效环境。类似地,携带 LEU2 基因的已知质粒,会弥补 Leu2p⁻ 缺陷型酵母株 (例如 ATCC 20,622 和 38,626)。

[0198] 另外,源自 1.6 μ m 环状质粒 pKD1 的载体可以用于转化克鲁维氏酵母属酵母。或者,为 *K. lactis* 报道了用于大规模生产重组牛凝乳酶的表达系统 (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8 :135)。还已经公开了克鲁维氏酵母的工业菌株的分泌成熟重组人血清白蛋白的稳定多拷贝表达载体 (Fleer 等, 1991, Bio/Technology 9 :968-975)。

[0199] 表达和克隆载体通常含有能被宿主生物体识别、且可操作地连接到编码抗-CD40 抗体或其多肽链的核酸分子上的启动子。适合用于原核宿主的启动子包括 phoA 启动子, α -内酰胺酶和乳糖启动子系统,碱性磷酸酶,色氨酸 (trp) 启动子系统,和杂种启动子例如 tac 启动子。其它已知的细菌启动子也是适用的。用于细菌系统的启动子也含有可操作地连接到编码人源化的抗-CD40 抗体的 DNA 上的 Shine-Dalgarno (SD.) 序列。

[0200] 许多真核启动子序列是已知的。实际上,所有真核基因都具有富含 AT 的区域,其位于转录起始位点上游约 25-30 个碱基处。在许多基因的转录起点上游 70-80 个碱基处发现的另一个序列是 CNCAAT 区域,其中 N 可以是任意核苷酸。在大多数真核基因的 3' 末端是 AATAAA 序列,其可以是向编码序列的 3' 末端添加聚腺苷酸尾的信号。所有这些序列都适合插入真核表达载体。

[0201] 适合用于酵母宿主的启动序列的实例包括下述酶的启动子:3-磷酸甘油酸酯激酶或其它糖酵解酶,例如烯醇酶,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,己糖激酶,丙酮酸脱羧酶,磷酸果糖激酶,葡萄糖-6-磷酸异构酶,3-磷酸甘油酸酯变位酶,丙酮酸激酶,磷酸丙糖异构酶,磷酸葡萄糖异构酶,和葡萄糖激酶。

[0202] 诱导型启动子具有生长条件控制的转录的其它优点。它们包括下述酶的酵母启动子区域:醇脱氢酶 2,异细胞色素 C,酸性磷酸酶,与氮代谢有关的衍生酶,金属硫蛋白,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶。适用于酵母表达的载体和启动子进一步描述在 EP73,657 中。酵母增强子也可以有利地与酵母启动子一起使用。

[0203] 在哺乳动物宿主细胞中从载体转录人源化的抗-CD40 抗体,受例如从病毒 (例如多瘤病毒,鸡痘病毒,腺病毒 (例如腺病毒 2),牛乳头状瘤病毒,鸟类肉瘤病毒,巨细胞病毒,逆转录病毒,乙型肝炎病毒和猿猴病毒 40 (SV40)) 的基因组得到的启动子、异源哺乳动物启动子 (例如,肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子) 或热休克启动子的控制,只要这样的启动子与宿主细胞系统相容。

[0204] SV40 病毒的早期和晚期启动子,可以作为也含有 SV40 病毒复制起点的 SV40 限制片段方便地得到。人巨细胞病毒的立即早期启动子可以作为 HindIII E 限制片段方便地得到。使用牛乳头状瘤病毒作为载体,在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统,公开在美国专利号 4,419,446 中。该系统的改进,描述在美国专利号 4,601,978 中。也参见 Reyes 等, 1982, Nature 297 :598-601,其中公开了在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下,在小鼠细胞中表达人 α -干扰素 cDNA。或者,劳斯肉瘤病毒长末端重复序列可以用作启动子。

[0205] 通过在载体中插入增强子序列,经常会增强高级真核生物对编码本文公开的人源化的抗-CD40 抗体的 DNA 的转录。现在已知许多增强子序列来自哺乳动物基因 (例如,珠

蛋白,弹性蛋白酶,白蛋白,-胎儿球蛋白,和胰岛素)。但是,通常使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括在复制起点的晚侧上的SV40增强子(bp 100-270),巨细胞病毒早期启动子增强子,在复制起点的晚侧上的多瘤增强子,和腺病毒增强子。关于活化真核启动子的增强元件的描述,也参见Yaniv,1982,Nature297:17-18。增强子可以在人源化的抗-CD40抗体-编码序列的5'或3'位置拼接进载体,但是优选地位于启动子的5'位点。

[0206] 在真核宿主细胞(酵母,真菌,昆虫,植物,动物,人类,或来自其它多细胞生物体的有核细胞)中使用的表达载体也可以含有转录终止和稳定mRNA所需的序列。这样的序列通常来自真核或病毒DNA或cDNA的5'(和有时3')不翻译区。这些区域含有转录成编码抗-CD40抗体的mRNA的不翻译部分中的多腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止组分是牛生长激素多腺苷酸化区域。参见W094/11026和其中公开的表达载体。在有些实施方案中,人源化的抗-CD40抗体可以使用CHEF系统来表达。(参见,例如,美国专利号5,888,809;其公开内容在本文中引作参考)。

[0207] 适用于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞是原核生物、酵母或上述的高级真核生物细胞。适用于该目的的原核生物包括:真细菌,例如革兰氏阴性的或革兰氏阳性的生物体,例如,肠杆菌科例如埃希氏杆菌属,例如,大肠杆菌,肠杆菌属,欧文菌属,克雷伯氏菌属,变形菌属,沙门氏菌属,例如,鼠伤寒沙门氏杆菌,粘质沙雷氏菌属,例如,粘质沙雷氏杆菌,和志贺氏菌属,以及芽胞杆菌属例如枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌(例如,在1989年4月12日公开的DD 266,710中披露的地衣芽孢杆菌41P),假单胞菌属例如铜绿假单胞菌,和链霉菌属。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294(ATCC 31,446),尽管其它菌株例如大肠杆菌B,大肠杆菌X1776(ATCC 31,537),和大肠杆菌W3110(ATCC 27,325)也是适用的。这些实例是解释性的,而不是限制性的。

[0208] 除了原核生物外,真核微生物(例如丝状真菌或酵母)是适用于人源化的抗-CD40抗体-编码载体的克隆或表达宿主。酿酒酵母或常见的面包酵母,是低级真核宿主微生物中最常用的。但是,通常在本文中可以得到并使用许多其它的属、种和菌株,例如粟酒裂殖酵母,克鲁维氏酵母宿主例如,乳克鲁维氏酵母,脆壁克鲁维氏酵母(ATCC 12,424),保加利亚克鲁维氏酵母(ATCC 16,045),威克曼氏克鲁维氏酵母(ATCC24,178),K. waltii(ATCC 56,500),果蝇克鲁维氏酵母(ATCC 36,906),K. thermotolerans和马克斯克鲁维氏酵母;耶氏酵母(yarrowia)(EP402,226);巴斯德毕赤氏酵母(EP 183,070);假丝酵母属;Trichoderma reesei(EP 244,234);粗糙链孢霉;许旺氏酵母属例如Schwanniomyces occidentalis;和丝状真菌例如,链孢霉属,青霉属,Tolypocladium和曲霉属宿主例如构巢曲霉和黑曲霉。

[0209] 适用于表达糖基化的人源化抗-CD40抗体的宿主细胞源自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞,包括,例如,许多杆状病毒菌株和变体和对应的许可的来自宿主的昆虫宿主细胞,例如草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)(毛虫),埃及伊蚊(蚊子),白纹伊蚊(蚊子),黑腹果蝇(果蝇),和家蚕(蚕虫)。许多种用于转染的病毒株可以公开得到,例如,苜蓿丫纹夜蛾(Autographa californica)NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5菌株,这样的病毒可以用于,尤其是转染草地贪夜蛾细胞。

[0210] 棉花、玉米、马铃薯、大豆、牵牛花、西红柿和烟草的植物细胞培养物,也可以用作宿主。

[0211] 在另一个方面,在脊椎动物细胞中表达人源化的抗-CD40。脊椎动物细胞在培养物(组织培养物)中的繁殖,已经成为可广泛得到的常规操作和技术。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651),人胚胎肾系(为悬浮培养生长亚克隆的293或293细胞)(Graham等,1977, J. Gen. Virol. 36 :59),幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10),中国仓鼠卵巢细胞/—DHFR⁻(CHO, Urlaub等,1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4216 ;例如, DG44),小鼠sertoli细胞(TM4, Mather,1980, Biol. Reprod. 23 :243-251),猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70),非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-15 87),人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2),犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34),布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442),人肺细胞(W138, ATCC CCL75),人肝细胞(Hep G2, HB 8065),小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51),TRI细胞(Mather等,1982, Annals N. Y. Acad. Sci. 383 :44-68),MRC 5细胞,FS4细胞,和人肝癌系(Hep G2)。

[0212] 用人源化的抗-CD40抗体生产的上述表达或克隆载体转化宿主细胞,并在为诱导启动子、选择转化体或扩增编码目标序列的基因而适当改良的常规营养培养基中培养。

[0213] 可以在多种培养基中培养用于生产本文所述人源化的抗-CD40抗体的宿主细胞。可商业得到的培养基例如Ham氏F10(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)、最低必需培养基((MEM)、(Sigma-Aldrich Co.)、RPMI-1640(Sigma-Aldrich Co.)、和Dulbecco氏改良的伊格尔培养基((DMEM), Sigma-Aldrich Co.),适用于培养宿主细胞。另外,在下述文献中的一篇或多篇中描述的任意培养基,可以用作宿主细胞的培养基:Ham等,1979, Meth. Enz. 58 :44, Barnes等,1980, Anal. Biochem. 102 :255, 美国专利号4,767,704,美国专利号4,657,866,美国专利号4,927,762,美国专利号4,560,655,美国专利号5,122,469, WO 90/103430,和WO 87/00195。这些培养基可以根据需要添加有激素和/或其它生长因子(例如胰岛素,转铁蛋白,或表皮生长因子),盐(例如氯化钠,钙,镁,和磷酸盐),缓冲剂(例如HEPES),核苷酸(例如腺苷和胸苷),抗生素(例如庆大霉素),微量元素(定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物),和葡萄糖或等效能源。也可以包含本领域技术人员已知的适当浓度的其它添加剂。培养条件,例如温度、pH等,是以前为选择用于表达的宿主细胞使用的条件,且是普通技术人员显而易见的。

[0214] 当使用重组技术时,抗体可以生产在细胞内、在周质空间中,或直接分泌进培养基中。如果在细胞内生成抗体,那么作为第一步,破碎细胞来释放蛋白。通过例如离心或超滤,可以清除宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。Carter等,1992, Bio/Technology 10 :163-167描述了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的方法。简单的说,在存在乙酸钠(pH3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)下,使细胞糊在约30分钟内融化。可以通过离心除去细胞碎片。如果抗体分泌到培养基中,那么通常首先使用商品化蛋白浓缩过滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元,浓缩来自这类表达系统的上清液。在任何上述步骤中,可以包括蛋白酶抑制剂例如PMSF来抑制蛋白水解,而且可以包括抗生素来防止外来污染物的生长。许多方法可以用于从宿主细胞分离抗体。

[0215] 可以使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析(亲和层析是典型的纯化技术)来纯化由细胞制备的抗体组合物。蛋白A作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2或 γ 4重链的抗体(参见,例如, Lindmark等,1983J. Immunol. Meth. 62 :1-13)。蛋白G推荐

用于所有小鼠同种型和人 γ 3 (参见,例如, Guss 等,1986 EMBO J. 5 :1567-1575)。亲和配体所附着的基质最常用的是琼脂糖,但是可以使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能够获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。对于包含 C_H3 结构域的抗体而言,可使用 Bakerbond ABXTM 树脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) 进行纯化。根据待回收的抗体,也可使用其它蛋白质纯化技术,诸如离子交换柱上的分离、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅土上的层析、肝素 SEPHAROSETM 上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀。

[0216] 在任何初步纯化步骤之后,可以将包含目的抗体和污染物的混合物进行低 pH 疏水相互作用层析,使用 pH 约 2.5-4.5 的洗脱缓冲液,通常在低盐浓度(如约 0-0.25M 盐)进行。

[0217] 杂交条件

[0218] 也包括在本文定义的低等、中等和高等严谨性条件下与由 SEQ ID NO :17 或其补体或 SEQ ID NO :20 或其补体代表的核苷酸序列的全部或一部分(例如,编码可变区的部分)杂交的核酸。杂交核酸的杂交部分的长度通常是至少 15(例如,20,25,30 或 50)个核苷酸。杂交核酸的杂交部分与编码抗-CD40 多肽(例如,重链或轻链可变区)的核酸或其补体的一部分或全部序列的同一性是至少 80%,例如,至少 90%、至少 95%或至少 98%。本文所述类型的杂交核酸可以用作,例如,克隆探针,引物,例如,PCR 引物或诊断探针。

[0219] 作为实例且非限制,使用低严格条件的操作如下(也参见 Shilo 和 Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 :6789-6792)。在一个实施方案中,将含有 DNA 的滤膜在 40℃ 的溶液中预处理 6 小时,所述溶液含有 35% 甲酰胺、5XSSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.1% PVP、0.1% 聚蔗糖 (Ficoll)、1% BSA 和 500 μ g/ml 变性鲑精 DNA。杂交在相同溶液中进行,并做了如下变动:0.02% PVP、0.02% 聚蔗糖、0.2% BSA、100 μ g/ml 变性鲑精 DNA、10% (重量/体积) 硫酸葡聚糖,并使用 5-20 $\times 10^6$ cpm ³²P 标记的探针。滤膜在杂交混合液中 40℃ 孵育 18-20 小时,然后在 55℃ 在含有 2XSSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTA 和 0.1% SDS 的溶液中洗涤 1.5 小时。用新的溶液更换洗液,在 60℃ 再孵育 1.5 小时。滤膜被吸干后进行放射自显影。如必要,滤膜在 65-68℃ 第三次洗涤,然后重新暴露于滤膜。在另一个实施方案中,低严格条件的实例包括,在含有 35% 甲酰胺、5X SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mMEDTA、0.02% PVP、0.02% 聚蔗糖、0.2% BSA、100 μ g/ml 变性鲑精 DNA 和 10% (重量/体积) 硫酸葡聚糖的缓冲液中,在 40℃ 杂交 18-20 小时,在由 2X SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTA,和 0.1% SDS 组成的缓冲液中,在 55℃ 洗涤 1.5 小时,和在由 2X SSC、25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA,和 0.1% SDS 组成的缓冲液中,在 60℃ 洗涤 1.5 小时。可以使用的其它低严格条件是本领域众所周知的(例如,用于跨物种杂交)。

[0220] 作为实例且非限制,使用高严格条件的操作如下。将含有 DNA 的滤膜在 65℃ 的缓冲液中预杂交 8 小时至过夜,所述缓冲液由 6X SSC、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% 聚蔗糖、0.02% BSA、和 500 μ g/ml 变性鲑精 DNA 组成。在含有 100 μ g/ml 变性鲑精 DNA 和 5-20 $\times 10^6$ cpm 的 ³²p- 标记的探针的预杂交混合物中,在 65℃ 杂交滤膜 48h。在含有 2X SSC、0.01% PVP、0.01% 聚蔗糖和 0.01% BSA 的溶液中,在 37℃ 洗涤滤膜 1 h。然后在 0.1 X SSC 中在 50℃ 洗涤 45min,随后放射自显影。可以使用的其它高严格条件是本领域众所周知的。

[0221] 作为实例且非限制,使用中等严格条件的操作如下:将含有 DNA 的滤膜在 55℃ 的溶液中预杂交 6 小时,所述溶液含有 6X SSC、5X Denhardt 氏溶液、0.5% SDS 和 100 μg/ml 变性鲑精 DNA。用 $5-20 \times 10^6 \text{cpm}^{32}\text{P}$ - 标记的探针,在相同溶液中进行杂交。在 55℃,在杂交混合物中温育滤膜 18-20 小时,然后在含有 1XSSC 和 0.1% SDS 的溶液中,在 60℃ 洗涤 2 次,各 30 分钟。滤膜被吸干后进行放射自显影。在含有 2XSSC、0.1% SDS 的溶液中,在 37℃ 洗涤滤膜 1 小时。可以使用的其它中等严格条件是本领域众所周知的(参见,例如, Sambrook 等,1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Sambrook 等, 2001; Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Publish., Cold Spring Harbor, N.Y.; 也参见 Ausubel 等, 编, in Current Protocols in Molecular Biology series of laboratory technique manuals, 1987-1999, 电流 Protocols, © 1994-199 John Wiley and Sons, Inc.)。

[0222] 有些实施方案包括分离的多核苷酸,其包含编码具有重链可变区氨基酸序列的抗体或抗体片段的序列,所述重链可变区氨基酸序列与 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列的同一性是至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99%。有些实施方案包括分离的多核苷酸,其包含编码具有轻链可变域氨基酸序列的抗体或抗体片段的序列,所述轻链可变域氨基酸序列与 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列的同一性是至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99%。

[0223] 在一个方面,分离的多核苷酸序列编码具有重链可变域和轻链可变区的抗体或抗体片段,所述重链可变域和轻链可变区各自包含分别与下述氨基酸序列具有至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:15;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:16;或 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:16。

[0224] 在一个方面,分离的多核苷酸序列编码具有重链可变域和轻链可变域的抗体或抗体片段,所述重链可变域和轻链可变域各自包含分别与下述氨基酸序列具有至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:16;和 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:16。

[0225] 在一个方面,分离的多核苷酸序列编码具有重链可变区和轻链可变区的抗体或抗体片段,所述重链可变区和轻链可变区各自包含分别与下述氨基酸序列具有至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 同一性的氨基酸序列:SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:16;和 SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:16。

[0226] 在另一个方面,分离的多核苷酸序列编码具有重链可变区和轻链可变区的抗体或

抗体片段,所述重链可变区和轻链可变区各自包含分别与 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列具有至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98%或至少 99%同一性的氨基酸序列。

[0227] 在 2 个或多个核酸或多肽序列的上下文中,本文所述的术语“同一”或“同一性百分比”指,2 个或多个序列或子序列在对比和比较最大同一性时,它们是相同的,或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基。为了确定同一性百分比,为了最佳对比的目的,比对序列(例如,可以将空位导入第一个氨基酸或核酸序列的序列中,用于与第二个氨基酸或核酸序列最佳比对)。然后对比在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一个序列中的位置被与第二个序列中的对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则所述分子在该位置是同一的。2 个序列之间的同一性百分比,随序列共有的同一位置的数目而变化(即, %同一性=同一位置的数目/位置的总数(例如,重叠位置)×100)。在有些实施方案中,在根据需要向序列内导入空位后,对比的 2 个序列是相同的长度(例如,不对比超出序列的额外序列)。例如,当对比可变区序列时,不考虑先导物和/或恒定域序列。对比 2 个序列之间的序列对比,“对应的”CDR 指在 2 个序列中的相同位置处的 CDR(例如,每个序列的 CDR-H1)。

[0228] 使用数学算法,可以确定 2 个序列之间的同一性百分比或相似性百分比。用于对比 2 个序列的数学算法的优选的、非限制性实例是 Karlin 和 Altschul,1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 的算法,如 Karlin 和 Altschul,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 所述进行改进。这样的算法整合在 Altschul 等,1990, J. Mol. Biol. 215:403-410 的 NBLAST 和 XBLAST 程序中。可以用 NBLAST 程序进行 BLAST 核苷酸搜索,评分=100,字长=12,以得到与编码目标蛋白的核酸同源的核苷酸序列。可以用 XBLAST 程序进行 BLAST 蛋白搜索,评分=50,字长=3,以得到与目标蛋白同源的氨基酸序列。为了得到用于对比目的的空位比对,可以使用如 Altschul 等,1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 所述的空位 BLAST。或者,PSI-Blast 可以用于实现重复搜索,这会检测分子之间的远离关系(同上文)。当使用 BLAST,空位 BLAST,和 PSI-Blast 程序时,可以使用各程序(例如,XBLAST 和 NBLAST)的缺省参数。用于序列对比的数学算法的另一个优选的、非限制性实例是 Myers 和 Miller, CABIOS(1989) 的算法。这样的算法整合在 ALIGN 程序(2.0 版)中,后者是 GCG 序列比对软件包的一部分。当使用 ALIGN 程序来对比氨基酸序列时,可以使用 PAM120 加权残基表,空位长度罚分为 12,空位罚分为 4。用于序列分析的其它算法是本领域已知的,包括如 Torellis 和 Robotti,1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5 所述的 ADVANCE 和 ADAM;和在 Pearson 和 Lipman,1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA85:2444-8 中所述的 FASTA。在 FASTA 内,ktup 是设定搜索的敏感性和速度的控制选项。如果 ktup = 2,通过寻找比对的残基对,可以发现对比的 2 个序列中的类似区域;如果 ktup = 1,则检查单个比对的氨基酸。ktup 可以设定为 2 或 1(对于蛋白序列),或 1-6(对于 DNA 序列)。如果没有指定 ktup,缺省值是 2(对于蛋白)和 6(对于 DNA)。或者,可以使用 Higgins 等,1996, Methods Enzymol. 266:383-402 所述的 CLUSTAL W 算法,进行蛋白序列比对。

[0229] 非治疗用途

[0230] 本文所述的抗体可以用作亲和纯化剂。在这种方法中,使用本领域众所周知的方法,将抗体固定在固相诸如 Sephadex 树脂或滤纸上。使固定化的抗体接触含有待纯化的

CD40 蛋白（其片段）的样品，并在此后用合适的溶剂洗涤支持物，所述溶剂将基本上去掉样品中除 CD40 蛋白（其结合在固定化的抗体上）以外的所有物质。最后，用另一种合适的溶剂洗涤支持物，诸如甘氨酸缓冲液 pH 5.0，其将使 CD40 蛋白从抗体中释放。

[0231] 人源化的抗-CD40 抗体还可以用于诊断测定中，以检测和 / 或定量 CD40 蛋白，例如特定细胞、组织或血清中的 CD40 蛋白表达。

[0232] 就诊断应用而言，一般用可检测部分标记抗体。可利用的许多标记一般可以分成如下几类：

[0233] (a) 放射性同位素，例如， ^{35}S ， ^{14}C ， ^{125}I ， ^3H ，和 ^{131}I 。可以使用例如在 *Current Protocols in Immunology*, Volumes 1 和 2, 1991, Coligen 等, Ed. Wiley-Interscience, New York, N. Y., Pubs 中描述的技术，用放射性同位素标记抗体。可以通过例如闪烁计数测定放射性。

[0234] (b) 荧光标记，例如可以利用稀土元素螯合物（铈螯合物）或荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、丹酰、丽丝胺、藻红蛋白和德克萨斯红。通过例如上面 *Current Protocols in Immunology* 中披露的已知技术，可以使荧光标记与抗体偶联。可以使用荧光计对荧光进行定量。

[0235] (c) 可以利用各种酶-底物标记（参见，例如，美国专利号 4, 275, 149 提供了有关它们中的一些的综述）。所述酶一般催化可以使用各种技术测定的显色底物的化学改变。例如，酶可以催化可通过分光光度法测定的底物的颜色改变。或者，酶可以改变底物的荧光或化学发光。用于对荧光改变进行定量的技术如上所述。化学发光底物被化学反应电子地激发，然后可以发射可测定（例如使用化学发光计）的或给荧光受体提供能量的光。酶标记的实例包括萤光素酶诸如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶（美国专利号 4, 737, 456）、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮类、苹果酸脱氢酶、尿素酶、过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶（HRPO）、碱性磷酸酶、 α -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶（例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶）、杂环氧化酶（诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶）、乳酸过氧化物酶、微过氧化物酶等。用于使酶与抗体偶联的技术，描述在例如，O' Sullivan 等，1981, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, in *Methods in Enzym.* (J. Langone & H. Van Vunakis, 编), Academic press, N. Y., 73 :147-166。

[0236] 酶-底物组合的实例包括，例如：

[0237] (a) 辣根过氧化物酶（HRPO）与作为底物的过氧化氢酶，其中所述过氧化氢酶会氧化染料前体，例如邻苯二胺（OPD）或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐（TMB）；

[0238] (b) 碱性磷酸酶（AP）与作为显色底物的对硝基苯磷酸酯；和

[0239] (c) α -D-半乳糖苷酶（ α -D-Gal）与显色底物（例如对硝基苯基- α -D-半乳糖苷酶）或荧光底物 4-甲基伞形基- α -D-半乳糖苷。

[0240] 本领域技术人员可以利用许多其它酶-底物组合。有关它们的一般性综述，参见美国专利号 4, 275, 149 和美国专利号 4, 318, 980。

[0241] 使用许多已知的技术，可以将标记与抗体间接偶联。例如，可以将抗体与生物素偶联，并且可以将上述三大类标记中的任意种与抗生物素蛋白偶联，或反之亦然。生物素选择性地结合抗生物素蛋白，标记由此以这种间接方式与抗体偶联。或者，为了实现标记与抗体

的间接偶联,将抗体与小半抗原(例如地高辛)偶联,并将上文所述不同类型的标记之一与抗半抗原抗体(例如抗地高辛抗体)偶联。由此,可以实现标记与抗体的间接偶联。

[0242] 在另一个实施方案中,人源化的抗-CD40 抗体不经标记地使用,并使用结合人源化的抗-CD40 抗体的经标记的抗体检测它。

[0243] 本文所述的抗体可以用于任何已知的测定方法,诸如竞争性结合测定、直接和间接夹心测定、和免疫沉淀测定。参见,例如, Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。

[0244] 诊断试剂盒

[0245] 人源化的抗-CD40 抗体可以用于诊断试剂盒中,即预定量的试剂与关于进行诊断测定的说明书的成套组合。如果用酶标记抗体,那么试剂盒可以包括酶所需的底物和辅因子,例如提供可检测发色团或荧光团的底物前体。此外,可以包括其它添加剂,诸如稳定剂、缓冲剂(例如封闭缓冲剂或裂解缓冲剂)等。各种试剂的相对量可以广泛改变,以便提供实质性优化测定灵敏度的试剂在溶液中的浓度。可以将这些试剂作为干粉提供,通常为冻干的,它们包括在溶解后会提供具有合适浓度的试剂溶液的赋形剂。

[0246] 治疗用途

[0247] 在另一个实施方案中,本文公开的人源化的抗-CD40 抗体可以用于治疗与本文所述的 CD40 表达有关的多种病症。

[0248] 人源化的抗-CD40 抗体或试剂通过任意合适的方式给药,包括根据需要用于局部免疫抑制性治疗的肠胃外的、皮下的、腹膜内的、肺内的、和鼻内的给药,病灶内给药(包括在移植前灌注或使移植植物接触抗体)。人源化的抗-CD40 抗体或试剂可以作为例如输注或推注来给药。肠胃外输注包括肌肉内的、静脉内的、动脉内的、腹膜内的或皮下的给药。另外,人源化的抗-CD40 抗体适合通过脉冲输注给药,尤其使用递减剂量的抗体。在一个方面,给药是通过注射进行,最优选静脉内的或皮下的注射,这部分地取决于给药是短暂的还是长期的。

[0249] 为了预防或治疗疾病,合适的抗体剂量取决于多种因素,例如如上所述的待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和过程、施用抗体是为了预防还是为了治疗的目的、先前的疗法、患者的临床病史和对抗体的反应、以及主治医师的判断。合适地对患者一次性或在一系列治疗中施用抗体。

[0250] 根据疾病的类型和严重程度,约 $1\mu\text{g/kg}$ to 20mg/kg (例如, $0.1\text{--}15\text{mg/kg}$) 的抗体是对患者施药的起始候选剂量,无论例如一次或多次分开的施药,还是连续输注。典型的日剂量可以在约 $1\mu\text{g/kg}$ – 100mg/kg 或更高的范围内,这取决于上述因素。根据状况,为了在几天或更长时间内反复施药,治疗可以持续至发生所希望的疾病症状抑制。但是,其它给药方案可能是有用的。通过常规技术和测定,可以容易地监视该治疗的进展。一种示例性的给药方案公开在 W094/04188 中。

[0251] 可以以符合良好医疗实践的方式,配制、定量和施用抗体组合物。在该背景下,考虑的因素包括包括待治疗的具体病症、待治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的原因、输送试剂的位点、给药方法、给药计划、和医学从业人员已知的其它因素。要施用的抗体的“治疗有效量”由这些考虑因素的决定,且是预防、改善或治疗与 CD40 表达有关的病症所需的最小量。

[0252] 抗体不需要、但是任选地与目前用于预防或治疗目标病症的一种和多种试剂一起配制。这样的其它试剂的有效量取决于制剂中存在的人源化的抗-CD40 抗体的量、病症和治疗类型、和上面讨论的其它因素。它们通常以与前文相同的剂量和给药途径使用，或是此前使用剂量的约 1-99%。

[0253] CD40 相关病症

[0254] 抗-CD40 抗体或试剂可以用于治疗或预防表达 CD40 的癌症或特征在于 CD40 表达的免疫障碍，例如，特征在于免疫细胞（例如，淋巴细胞或树突细胞）的不适当激活。这样的 CD40 表达可以是由于，例如，细胞表面上的高 CD40 蛋白水平和 / 或表达的 CD40 的改变的抗原性。根据本文所述方法对免疫障碍的治疗或预防，可以通过给需要这样的治疗和预防的对象施用有效量的抗-CD40 抗体或试剂来实现，其中所述抗体 (i) 会结合表达 CD40 且与疾病状态有关的激活的免疫细胞，和 (ii) 对激活的免疫细胞产生细胞毒性的、细胞抑制性的或免疫抑制性的作用。

[0255] 特征在于免疫细胞的不适当激活且可以通过本文所述方法治疗或预防的免疫疾病，可以根据例如作为病症基础的超敏反应的类型进行分类。这些反应通常分成 4 类：过敏反应，细胞毒性的（细胞溶解的）反应，免疫复合物反应，或细胞-介导的免疫（CMI）反应（也称作迟发型超敏（DTH）反应）。（参见，例如，Fundamental Immunology (William E. Paul ed., Raven Press, N. Y., 3rd ed. 1993)）

[0256] 这样的免疫疾病的具体实例包括下述的：类风湿性关节炎，自身免疫脱髓鞘疾病（例如，多发性硬化，变应性脑脊髓炎），内分泌眼病，葡萄膜视网膜炎，系统性红斑狼疮，重症肌无力，格雷夫斯病，肾小球肾炎，自身免疫性肝病，炎症肠病（例如，克罗恩病或溃疡性结肠炎），过敏反应，变应性反应，舍格伦综合征，I 型糖尿病，原发性胆汁性肝硬变，韦格纳氏肉芽肿病，纤维肌痛，多肌炎，皮肌炎，炎症肌炎，多内分泌故障，施密特综合征，自身免疫葡萄膜炎，艾迪生病，肾上腺炎，甲状腺炎，桥本甲状腺炎，自身免疫甲状腺疾病，恶性贫血，胃萎缩，慢性肝炎，类狼疮肝炎，动脉粥样硬化，亚急性皮肤红斑狼疮，甲状旁腺功能减退，心肌梗死后综合征，自身免疫血小板减少症，原发性血小板减少性紫癜，溶血性贫血，寻常型天疱疮，天疱疮，疱疹样皮炎，斑秃（alopecia areata），类天疱疮，硬皮病，渐进性全身硬化，CREST 综合征（钙质沉着症，雷诺现象，食道运动功能障碍，指端硬化，和毛细血管扩张），男性和女性自身免疫性不孕，强直性脊柱炎，溃疡性结肠炎，混合结缔组织病，结节性多动脉炎，系统性坏死性血管炎，特应性皮炎，特应性鼻炎，Goodpasture 氏综合征，查加斯病，结节病，风湿热，哮喘，习惯性流产，抗磷脂综合征，农民肺，多形红斑，心切开后综合征，柯兴综合征，自身免疫慢性活动性肝炎，养鸟人肺，中毒性表皮坏死松解症，Alport 氏综合征，肺泡炎，变应性肺泡炎，纤维化肺泡炎，间质性肺病，结节性红斑，坏疽性脓皮症，输血反应，大动脉炎，风湿性多肌痛，颞动脉炎，血吸虫病，巨细胞动脉炎，蛔虫病，曲霉病，Sampter 氏综合征，湿疹，淋巴瘤样肉芽肿病，眼-口-生殖器三联综合征，Caplan 氏综合征，川崎病，登革，脑脊髓炎，心内膜炎，心肌心内膜纤维化，眼内炎，持久隆起性红斑（erythema elevatum et diutinum），银屑病，胎儿溶血症，嗜酸细胞性筋膜炎，Shulman 氏综合征，Felty 氏综合征，丝虫病，睫状体炎，慢性睫状体炎，异时性睫状体炎，Fuch 氏睫状体炎，IgA 肾病，亨-舍二氏紫癜，移植物抗宿主病，移植排斥，心肌病，Eaton-Lambert 综合征，复发性多软骨炎，冷球蛋白血症，华氏巨球蛋白血症，Evan 氏综合征，急性呼吸窘迫综合征，肺炎，骨质疏松症，

迟发型超敏反应和自身免疫性腺生成障碍。

[0257] 因此,本文所述方法包括下述病症的治疗: B 淋巴细胞(例如,系统性红斑狼疮, Goodpasture 氏综合征,类风湿性关节炎,和 I 型糖尿病), Th₁- 淋巴细胞(例如,类风湿性关节炎,多发性硬化,银屑病, Sjorgren 氏综合征,桥本甲状腺炎,格雷夫斯病,原发性胆汁性肝硬变,韦格纳氏肉芽肿病,结核病,或移植物抗宿主病),或 Th₂- 淋巴细胞(例如,特应性皮炎,系统性红斑狼疮,特应性哮喘,鼻结膜炎,变应性鼻炎, Omenn 氏综合征,全身硬化或慢性移植物抗宿主病)。通常涉及树突细胞的病症包含 Th₁- 淋巴细胞或 Th₂- 淋巴细胞的病症。

[0258] 在有些实施方案中,免疫障碍是 T 细胞-介导的免疫障碍,例如其中激活的 T 细胞与表达 CD40 的障碍有关的 T 细胞障碍。可以施用抗 -CD40 抗体或试剂,以排除这样的表达 CD40 的激活的 T 细胞。在一个具体的实施方案中,抗 -CD40 抗体或试剂的施用,可以排除表达 CD40 的激活的 T 细胞,同时抗 -CD40 或试剂基本上不排除休眠 T 细胞。在该上下文中,“基本上不排除”是指,小于约 60% 或小于约 70% 或小于约 80% 的休眠 T 细胞未排除。

[0259] 本文所述的抗 -CD40 抗体和试剂也可以用于治疗或预防表达 CD40 的癌症。根据本文所述方法对表达 CD40 的癌症的治疗或预防,可以通过给需要这样的治疗或预防的对象施用有效量的抗 -CD40 抗体或试剂来实现,其中所述抗体或试剂 (i) 会结合表达 CD40 的癌细胞,和 (ii) 对表达 CD40 的癌细胞产生排除或抑制其增殖的细胞毒性的或细胞抑制性的作用。

[0260] 可以通过本文所述方法治疗或预防的表达 CD40 的癌症包括,例如,白血病,例如急性白血病,急性淋巴细胞白血病,急性髓细胞性白血病(例如,成髓细胞性白血病,前髓细胞性白血病,髓单核细胞性白血病,单核细胞性白血病,或红白血病),慢性白血病,慢性髓细胞性(粒细胞)白血病,或慢性淋巴细胞白血病;真性红细胞增多症;淋巴瘤(例如,霍奇金病或非霍奇金病);多发性骨髓瘤,特发性巨球蛋白血症;重链病;实体瘤如肉瘤和癌(例如,纤维肉瘤,粘液肉瘤,脂肪肉瘤,软骨肉瘤,骨源性肉瘤,骨肉瘤,脊索瘤,血管肉瘤,内皮肉瘤,淋巴管肉瘤,淋巴管内皮肉瘤,滑膜瘤,间皮瘤,尤因瘤,平滑肌肉瘤,横纹肌肉瘤,结肠癌,结肠直肠癌,胰腺癌,乳腺癌,卵巢癌,前列腺癌,鳞状细胞癌,基底细胞癌,腺癌,汗腺癌,皮脂腺癌,乳头状癌,乳头状腺癌,囊腺癌,髓样癌,支气管癌,肾细胞癌,肝癌,胆管癌,绒毛膜癌,精原细胞瘤,胚胎性癌,维尔姆斯氏肿瘤,子宫颈癌,子宫癌,睾丸肿瘤,肺癌,小细胞肺癌,非小细胞肺癌,膀胱癌,上皮癌,胶质瘤,星形细胞瘤,髓母细胞瘤,颅咽管瘤,室管膜瘤,松果体瘤,成血管细胞瘤,听神经瘤,少突神经胶质瘤, menangioma, 黑素瘤,神经母细胞瘤,视网膜母细胞瘤,鼻咽癌,或食管癌)。

[0261] 药物组合物及其施用

[0262] 包含 CD40 结合剂(例如,抗 -CD40 抗体)的组合物,可以施用给具有免疫障碍或表达 CD40 的癌症或处于该危险中的受试者。本发明还提供了 CD40 结合剂(例如,抗 -CD40 抗体)在药剂生产中的应用,所述药剂用于预防或治疗表达 CD40 的癌症或免疫障碍。本文使用的术语“受试者”是指可以施用 CD40- 结合剂的任意哺乳动物患者,包括,例如,人和非人哺乳动物,例如灵长类动物,啮齿类动物,和狗。特别适合用本文所述方法治疗的受试者包括人。在免疫障碍或表达 CD40 的癌症的预防或治疗中,抗体或试剂可以单独地或与其它组合物组合地施用。

[0263] 多种递送系统是已知的,且可以用于施用 CD40 结合剂。导入方法包括、但不限于真皮内的、肌肉内的、腹膜内的、静脉内的、皮下的、鼻内的、硬膜外的和经口的途径。CD40 结合剂可以通过例如输注、推注或注射施用,且可以与其它生物活性剂例如化疗剂一起施用。施用可以是全身的或局部的。

[0264] 在具体实施方案中,CD40 结合剂组合物通过注射、借助于导管、栓剂或植入物来施用,所述植入物是多孔的、无孔的或胶状的材料,包括膜,例如唾液酸膜或纤维。通常,当施用组合物时,使用抗-CD40 抗体或试剂不会粘附的材料。

[0265] 在其它实施方案中,在控释系统中递送抗-CD40 抗体或试剂。在一个实施方案中,可以使用泵(参见,例如, Langer, 1990, Science 249 :1527-1533 ;Sefton, 1989, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14 :201 ;Buchwald 等, 1980, Surgery 88 :507 ;Saudek 等, 1989, N. Engl. J. Med. 321 :574)。在另一个实施方案中,可以使用聚合材料。(参见,例如, Medical Applications of Controlled Release (Langer 和 Wise 编, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974) ;Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., Wiley, New York, 1984) ;Ranger and Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23 :61。也参见 Levy 等, 1985, Science 228 :190 ;During 等, 1989, Ann. Neurol. 25 :351 ;Howard 等, 1989, J. Neurosurg. 71 :105.)。在例如上面的 Langer 中,讨论了其它控释系统。

[0266] CD40 结合剂(例如,抗-CD40 抗体)可以作为包含治疗有效量的结合剂和一种或多种药学相容成分的药物组合物施用。例如,药物组合物通常包括一种或多种药物载体(例如,无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油,大豆油,矿物油,芝麻油等)。当静脉内施用药物组合物时,水是更典型的载体。盐水溶液和含水右旋糖和甘油溶液也可以用作液体载体,尤其对于注射溶液。合适的药物赋形剂包括,例如,淀粉,葡萄糖,乳糖,蔗糖,明胶,麦芽,大米,面粉,白垩,硅胶,硬脂酸钠,单硬脂酸甘油酯,滑石,氯化钠,脱脂奶粉,甘油,丙烯,乙二醇,水,乙醇等。其它合适的药物赋形剂包括氨基酸(例如,精氨酸,组氨酸,甘氨酸),表面活性剂(例如,聚山梨酯)和糖和糖醇(例如,蔗糖或山梨醇和其它多元醇(例如,海藻糖))。如果需要,组合物也可以含有小量润湿剂或乳化剂或 pH 缓冲剂。这些组合物的形式可以是溶液,悬浮液,乳剂,片剂,丸剂,胶囊,散剂,持续释放制剂等。组合物可以用常规粘合剂和载体例如甘油三酯配制成栓剂。经口制剂可以包括标准的载体,例如药用级的甘露醇,乳糖,淀粉,硬脂酸镁,糖精钠,纤维素,碳酸镁,等。合适的药物载体的实例,由 E. W. Martin 描述在“Remington's Pharmaceutical Sciences”。这样的组合物含有治疗有效量的核酸或蛋白,通常是纯化形式,以及适当量的载体,以便提供适合给患者施用的形式。制剂与给药模式相对应。

[0267] 在典型的实施方案中,根据常规操作,将药物组合物配制成适合静脉内施用给人类的药物组合物。通常,静脉内给药的组合物是在无菌等渗含水缓冲液中的溶液。当需要时,药物也可以包含增溶剂和局部麻醉剂(例如利多卡因),以缓解注射位点的疼痛。通常,所述成分在单位剂型中分开地或混合在一起地提供,例如,作为在标明活性剂的量的密封容器(例如安瓿或香囊)内的干燥冻干粉末或无水浓缩物。当通过输注施用药物时,可以用含有无菌药用级水或盐水的输注瓶来分散。当通过注射施用药物时,可以提供一安瓿无菌注射用水或盐水,以便在给药前混合成分。

[0268] 此外,药物组合物可以作为药物试剂盒来提供,所述药物试剂盒包含:(a)一个容器,其含有冻干形式的 CD40 结合剂(例如,抗-CD40 抗体),和(b)第二个容器,其含有药学可接受的注射用稀释剂(例如,无菌水)。药学可接受的稀释剂可以用于重配或稀释冻干的抗-CD40 抗体或试剂。任选地,这样的容器可以伴有管理药物或生物制品的生产、使用或销售的政府机构规定形式的通告,该通告反映了人类施用的生产、使用或销售的机构的批准。

[0269] 通过标准的临床技术,可以确定能有效地治疗或预防免疫障碍或表达 CD40 的癌症的 CD40 结合剂(例如,抗-CD40 抗体)的量。另外,体外测定可以任选地用于辅助鉴别最佳剂量范围。要在制剂中使用的精确剂量,也取决于给药途径、和免疫障碍或表达 CD40 的癌症的阶段,应当根据从业人员的判断和每位患者的情况来决定。可以从源自体外或动物模型实验系统的剂量-响应曲线,外推有效剂量。

[0270] 例如,通过测定 LD_{50} (使 50% 群体致死的剂量)和 ED_{50} (对 50% 群体治疗上有效的剂量)的标准药学规程,可以在细胞培养物或实验动物中测定抗-CD40 抗体或试剂的毒性和治疗效能。毒性和治疗作用之间的剂量比是治疗指数,它可以表达为比率 LD_{50}/ED_{50} 。优选会表现出大治疗指数的 CD40-结合剂(例如,抗-CD40 抗体)。当 CD40-结合剂表现出毒性副作用时,将 CD40-结合剂导向受影响组织的位点的递送系统,可以用于使对不表达 CD40 的细胞的潜在损伤最小化,从而减小副作用。

[0271] 从细胞培养测定和动物研究得到的数据,可以用于配制一定范围的人用剂量。CD40 结合剂的剂量通常在循环浓度(包括具有微小毒性或无毒性的 ED_{50})的范围内。根据使用的剂型和使用的给药途径,剂量可以在该范围内变化。对于在该方法中使用的任意 CD40 结合剂,可以从细胞培养测定中初步估计治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量,以达到包含在细胞培养中测定的 IC_{50} (即,达到症状的半数最大抑制的实验化合物浓度)的循环血浆浓度范围。这样的信息可以用于更精确地测定在人类中有用的剂量。可以测量在血浆中的水平,例如,通过高效液相色谱。

[0272] 通常,施用给具有免疫障碍或表达 CD40 的癌症的患者的抗-CD40 抗体或 CD40 结合剂的剂量,典型地是约 0.1mg/kg 至约 100mg/kg 受试者体重。施用给受试者的剂量是约 0.1mg/kg 至约 50mg/kg,约 1mg/kg 至约 30mg/kg,约 1mg/kg 至约 20mg/kg,约 1mg/kg 至约 15mg/kg 或约 1mg/kg 至约 10mg/kg 受试者体重。

[0273] 示例性的剂量包括、但不限于,1ng/kg 至 100mg/kg。在有些实施方案中,剂量是约 0.5mg/kg,约 1mg/kg,约 2mg/kg,约 3mg/kg,约 4mg/kg,约 5mg/kg,约 6mg/kg,约 7mg/kg,约 8mg/kg,约 9mg/kg,约 10mg/kg,约 11mg/kg,约 12mg/kg,约 13mg/kg,约 14mg/kg,约 15mg/kg 或约 16mg/kg。所述剂量可以例如每天、每周 1 次(每周)、每周 2 次、每周 3 次、每周 4 次、每周 5 次、每周 6 次、每 2 周或每月施用。在具体实施方案中,剂量是约 0.5mg/kg/周,约 1mg/kg/周,约 2mg/kg/周,约 3mg/kg/周,约 4mg/kg/周,约 5mg/kg/周,约 6mg/kg/周,约 7mg/kg/周,约 8mg/kg/周,约 9mg/kg/周,约 10mg/kg/周,约 11mg/kg/周,约 12mg/kg/周,约 13mg/kg/周,约 14mg/kg/周,约 15mg/kg/周或约 16mg/kg/周。在有些实施方案中,剂量范围是约 1mg/kg/周至约 15mg/kg/周。

[0274] 在有些实施方案中,包含 CD40 结合剂的药物组合物可以另外包含治疗剂,其缀合或未缀合到结合剂上。抗-CD40 抗体或 CD40 结合剂可以与一种或多种治疗剂相联合地共同施用,用于治疗或预防免疫障碍或表达 CD40 的癌症。例如,联合治疗可以包括细胞抑制

性的、细胞毒性的或免疫抑制性的试剂。联合治疗也可以包括,例如,施用靶向激活的淋巴细胞、树突细胞或表达 CD40 的癌细胞表面上的 CD40 以外的受体或受体复合物的试剂。这样的试剂的实例包括第二种非 -CD40 抗体,后者会结合激活的淋巴细胞、树突细胞或表达 CD40 的癌细胞表面上的分子。另一个实例包括靶向这样的受体或受体复合物的配体。通常,这样的抗体或配体会结合激活的淋巴细胞、树突细胞或表达 CD40 的癌细胞上的细胞表面受体,病通过向激活的淋巴细胞、树突细胞或表达 CD40 的癌细胞递送细胞抑制性的或细胞毒性的信号,增强抗 -CD40 抗体的细胞毒性的或细胞抑制性的作用。

[0275] 这样的组合施用可以对疾病参数(例如,症状的严重性,症状的数目,或复发的频率)具有累加或协同作用。

[0276] 关于组合施用的治疗方案,在一个具体的实施方案中,抗 -CD40 抗体或 CD40 结合剂与治疗剂同时施用。在另一个具体的实施方案中,在施用抗 -CD40 抗体或 CD40 结合剂之前或之后至少 1 小时且最高达几个月,例如在施用抗 -CD40 抗体或 CD40 结合剂之前或之后至少 1 小时、5 小时、12 小时、1 天、1 周、1 个月或 3 个月,施用治疗剂。

[0277] 细胞毒性的或免疫抑制性的试剂的有用类型包括,例如,抗微管蛋白剂,auristatins(例如, MMAE 或 MMAF), DNA 小沟结合剂, DNA 复制抑制剂,烷化剂(例如,铂复合物例如顺铂,单(铂),双(铂)和三核铂复合物和卡铂),蒽环类抗生素,抗生素,抗叶酸剂,抗代谢物,化疗敏化剂, duocarmycins, 依托泊苷,氟化嘧啶,离子载体, lexitropsins, 亚硝基脲,顺氯氨铂,预先形成的化合物,嘌呤抗代谢物,嘌呤霉素,辐射敏化剂,甾族化合物,紫杉烷类,拓扑异构酶抑制剂,长春花生物碱,等。

[0278] 单独的细胞毒性的或免疫抑制性的试剂包括,例如,雄激素,氨茴霉素(AMC),门冬酰胺酶,5-氮胞苷,硫唑嘌呤,博来霉素,白消安, buthionine sulfoximine, 喜树碱,卡铂,卡莫司汀(BSNU), CC-1065, 苯丁酸氮芥,顺铂,秋水仙素,环磷酰胺,阿糖胞苷,胞嘧啶阿糖胞苷,细胞松弛素 B,达卡巴嗪,更生霉素(以前的放线菌素),柔红霉素,氨烯咪胺,多西他赛,多柔比星,雌激素,5-氟脱氧尿苷,5-氟尿嘧啶,短杆菌肽 D,羟基脲,伊达比星,异环磷酰胺,伊立替康,洛莫司汀(CCNU),氮芥,美法仑,6-巯嘌呤,甲氨蝶呤,光辉霉素,丝裂霉素 C,米托蒽醌,硝基咪唑,紫杉醇,普卡霉素,丙卡巴肼,链唑霉素,替尼泊苷,6-巯鸟嘌呤,塞替派,托泊替康,长春碱,长春新碱,长春瑞滨, VP-16 和 VM-26。

[0279] 在有些典型的实施方案中,治疗剂是细胞毒性剂。合适的细胞毒性剂包括,例如,多拉司他汀(例如, auristatin E, AFP, MMAF, MMAE, AEB 或 AEVB), DNA 小沟结合剂(例如, enediyne 和 lexitropsins), duocarmycins, 紫杉烷类(例如, 紫杉醇和多西他赛), 嘌呤霉素, 长春花生物碱, CC-1065, SN-38, 托泊替康, 吗啉代-多柔比星, 根霉素, 氰基吗啉代-多柔比星, 棘霉素, 考布他汀, 纺锤菌素, epothilone A 和 B, 雌莫司汀, cryptophysins, 西马多丁, maytansinoids, discodermolide, eleutherobin, 或米托蒽醌。

[0280] 在有些实施方案中,细胞毒性剂是常规化疗剂,例如,多柔比星,紫杉醇,美法仑,长春花生物碱,甲氨蝶呤,丝裂霉素 C 或依托泊苷。另外,有效的试剂例如 CC-1065 类似物,刺孢霉素,美登素,多拉司他汀 10 的类似物,根霉素,和海葵毒素,可以连接到抗 -CD40 抗体或其试剂上。

[0281] 在具体实施方案中,细胞毒性的或细胞抑制性的试剂是 auristatin E(在本领域也称作多拉司他汀-10)或其衍生物。通常,auristatin E 衍生物是,例如,在 auristatin E

和酮酸之间形成的酯。例如,auristatin E 可以分别与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰基戊酸反应,生成 AEB 和 AEVB。其它典型的 auristatin 衍生物包括 AFP, MMAF, 和 MMAE。auristatin E 和它的衍生物的合成和结构,描述在,例如,美国专利申请公开号 2004-0157782 A1 和 2005-0238649 ; 国际专利申请号 PCT/US03/24209, 国际专利申请号 PCT/US02/13435, 和美国专利号 6,884,869 ;6,323,315 ;6,239,104 ;6,034,065 ;5,780,588 ;5,665,860 ;5,663,149 ;5,635,483 ;5,599,902 ;5,554,725 ;5,530,097 ;5,521,284 ;5,504,191 ;5,410,024 ;5,138,036 ;5,076,973 ;4,986,988 ;4,978,744 ;4,879,278 ;4,816,444 ; 和 4,486,414 ;其公开内容在这里引作参考。

[0282] 在具体实施方案中,细胞毒性剂是 DNA 小沟结合剂(参见,例如,美国专利号 6,130,237。)。例如,在有些实施方案中,所述小沟结合剂是 CBI 化合物。在其它实施方案中,所述小沟结合剂是 enediyne(例如,刺孢霉素)。

[0283] 抗微管蛋白剂的实例包括、但不限于,紫杉烷类(例如,Taxol[®](紫杉醇),Taxotere[®](多西他赛)),T67(Tularik),vinca alkyls(例如,长春新碱,长春碱,长春地辛,和长春瑞滨),和多拉司他汀(例如,auristatin E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB)。其它抗微管蛋白剂包括,例如,浆果赤霉素衍生物,紫杉烷类似物(例如,epothilone A 和 B),诺考达唑,秋水仙素和 colcemid,雌莫司汀,cryptophysins,西马多丁,maytansinoids,考布他汀,discodermolide,和 eleutherobin。

[0284] 在有些实施方案中,细胞毒性剂是 maytansinoid,即另一组抗微管蛋白剂。例如,在具体实施方案中,maytansinoid 是美登素或 DM-1(ImmunoGen, Inc. ;也参见 Chari 等,1992, Cancer Res. 52 :127-131)。

[0285] 在有些实施方案中,治疗剂不是放射性同位素。

[0286] 在有些实施方案中,细胞毒性的或免疫抑制性的试剂是抗代谢物。抗代谢物可以是,例如,嘌呤拮抗剂(例如,硫唑嘌呤或麦考酚酸莫酯),二氢叶酸还原酶抑制剂(例如,甲氨蝶呤),阿昔洛韦,更昔洛韦,齐多夫定,阿糖腺苷,利巴韦林,叠氮基胸苷,胞嘧啶阿糖胞苷,金刚烷胺,二去氧尿苷,碘苷,poscarnet,或三氟尿苷。

[0287] 在其它实施方案中,细胞毒性的或免疫抑制性的试剂是他克莫司,环孢霉素 A 或雷帕霉素。在其它实施方案中,细胞毒性剂是阿地白介素,阿仑单抗,阿利维 A 酸,别嘌醇,六甲蜜胺,氨磷汀,阿那曲唑,三氧化二砷,贝沙罗汀,贝沙罗汀,卡普睾酮,卡培他滨,塞来考昔,克拉屈滨,Darbepoetin alfa,地尼白介素-毒素连接物,右雷佐生,屈他雄酮丙酸盐,表柔比星,阿法依伯汀,雌莫司汀,依西美坦,非格司亭,氮尿苷,氟达拉滨,氟维司群,吉西他滨,吉姆单抗,奥佐米星,戈舍瑞林,伊达比星,异环磷酰胺,甲磺酸伊马替尼,干扰素 α -2a,伊立替康,来曲唑,亚叶酸,左旋咪唑,meclorothamine 或氮芥,甲地孕酮,美司钠,甲氨蝶呤,甲氧沙林,丝裂霉素 C,米托坦,苯丙酸诺龙,奥普瑞白介素,奥沙利铂,氨羟二磷酸二钠,培加酶,培门冬酶,pegfilgrastim,喷司他丁,哌泊溴烷,普卡霉素,吡吩姆钠,丙卡巴肼,米帕林,拉布立酶,revlimid,沙格司亭,链佐星,他莫昔芬,替莫唑胺,替尼泊苷,睾内酯,硫鸟嘌呤,托瑞米芬,托西莫单抗,曲妥单抗,维 A 酸,尿嘧啶氮芥,戊柔比星,长春碱,长春新碱,长春瑞滨和唑来磷酸。

[0288] 在其它实施方案中,药物是人源化的抗-HER2 单克隆抗体;RITUXAN(利妥昔单抗;Genentech, Inc., South San Francisco, CA);嵌合的抗-CD20 单克隆抗

体);OVAREX(AltaRex Corporation, MA);PANOREX(Glaxo Wellcome, NC; 鼠 IgG2a 抗体);Cetuximab Erbitux(Imclone Systems Inc., NY; 抗-EGFR IgG 嵌合的抗体);Vitaxin(MedImmune, Inc., MD);Campath I/H(Leukosite, MA; 人源化的 IgG1 抗体);Smart MI95(Protein Design Labs, Inc., CA; 人源化的抗-CD33 IgG 抗体);LymphoCide(Immunomedics, Inc., NJ; 人源化的抗-CD22 IgG 抗体);Smart ID10(Protein Design Labs, Inc., CA; 人源化的抗-HLA-DR 抗体);Oncolym(Techniclone, Inc., CA; 放射标记的鼠抗-HLA-Dr10 抗体);Allomune(BioTransplant, CA; 人源化的抗-CD2mAb);Avastin(Genentech, Inc., CA; 抗-VEGF 人源化的抗体);依帕珠单抗(Immunomedics, Inc., NJ 和 Amgen, CA; 抗-CD22 抗体);和 CEAcide(Immunomedics, NJ; 人源化的抗-CEA 抗体)。

[0289] 其它合适的抗体包括、但不限于, 针对下述抗原的抗体: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, α 胎儿球蛋白, CA 242, 胎盘碱性磷酸酶, 前列腺特异性抗原, 前列腺酸性磷酸酶, 表皮生长因子, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, 抗转铁蛋白受体, p97, MUC1-KLH, CEA, gp100, MART1, 前列腺特异性抗原, IL-2 受体, CD20, CD52, CD33, CD22, 人绒毛膜促性腺激素, CD38, 粘蛋白, P21, MPG, 和 Neu 癌基因产物。

[0290] 在有些实施方案中, 治疗剂是免疫抑制性的试剂。免疫抑制性的试剂可以是, 例如, 更昔洛韦, 依那西普, 他克莫司, 环孢霉素 A, 雷帕霉素, 环磷酰胺, 硫唑嘌呤, 麦考酚酸莫酯或甲氨蝶呤。或者, 免疫抑制性的试剂可以是, 例如, 糖皮质激素(例如, 考的松或醛固酮)或糖皮质激素类似物(例如, 泼尼松或地塞米松)。

[0291] 合适的环氧合酶抑制剂包括甲氯芬那酸, 甲芬那酸, 卡洛芬, 双氯芬酸, 二氟尼柳, 芬布芬, 非诺洛芬, 布洛芬, 吲哚美辛, 酮洛芬, 萘丁美酮, 萘普生, 舒林酸, 替诺昔康, 托美丁, 和乙酰基水杨酸。

[0292] 合适的脂肪氧合酶抑制剂包括氧化还原抑制剂(例如, 儿茶酚丁烷衍生物, 去甲二氢愈创木酸(NDGA), 马索罗酚, 菲尼酮, Ianopalen, 吲唑酮, naphazatrom, benzofuranol, 烷基羟胺), 和非氧化还原抑制剂(例如, 羟基噻唑, 甲氧基烷基噻唑, 苯并吡喃和其衍生物, 甲氧基四氢吡喃, 乳香酸和乳香酸的乙酰基化衍生物, 和被环烷基基团取代的喹啉甲氧基苯基醋酸), 和氧化还原抑制剂的前体。

[0293] 其它合适的脂肪氧合酶抑制剂包括抗氧化剂(例如, 苯酚, 没食子酸丙酯, 黄酮类化合物和/或天然存在的含有黄酮类化合物的底物, 黄酮的羟基化衍生物, 黄酮醇, 二氢槲皮素, 四羟黄酮, 高良姜黄素, 奥洛波尔, 查耳酮衍生物, 4, 2', 4'-三羟基查耳酮, 邻氨基苯酚, N-羟基脲, benzofuranols, 依布硒和增加还原性硒代酶的活性的物质), 铁螯合剂(例如, 异羟肟酸和其衍生物, N-羟基脲, 2-苄基-1-萘酚, 儿茶酚, 羟胺, 鼠尾草酚 trolox C, 儿茶酚, 萘酚, 柳氮磺吡啶, zyleuton, 5-羟基邻氨基苯甲酸和 4-(ω -芳基烷基)苯基链烷酸), 含有咪唑的化合物(例如, 酮康唑和伊曲康唑), 吩噻嗪, 和苯并吡喃衍生物。

[0294] 其它合适的脂肪氧合酶抑制剂包括类花生酸(例如, 十八碳四烯酸, 二十碳四烯酸, 二十二碳五烯酸, 二十碳六烯酸和二十二碳六烯酸和其酯)的抑制剂, PGE1(前列地尔), PGA2(前列腺素 A2), 维前列醇, 15-单羟基二十碳四烯酸, 15-单羟基-二十碳三烯酸和 15-单羟基二十碳五烯酸, 和白细胞三烯 B5, C5 和 D5), 干扰钙流的化合物, 吩噻嗪, 二苯基丁基胺, 维拉帕米, fuscocide, 姜黄, 氯原酸, 咖啡酸, 5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸(ETYA),

羟基苯基维酰胺, Ionapalen, 七叶灵, 二乙基乙胺嗪, 菲咯啉, 黄芩苷元, 普昔罗米, 硫醚, 二烯丙基硫化物和二-(1-丙烯基)硫化物。

[0295] 白细胞三烯受体拮抗剂包括骨化三醇, 昂唑司特, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, 依布硒, Leo Denmark ETH-615, LillyLY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer IngleheimBI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, OnoONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-PoulencRorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-20 1146, SmithKline BeechamSB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, SumitamoSM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, LillyLY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck 和 Co. MK-591, Merck 和 Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionoogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline BeechamSKandF-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 和 Teijin TEI-1338。

[0296] 制品

[0297] 在另一个方面, 包括含有用于治疗上述病症的材料的制品。所述制品包含容器和标记。合适的容器包括, 例如, 瓶子, 管形瓶, 注射器, 和试管。容器可以由许多种材料(例如玻璃或塑料)制成。容器装有能有效治疗病症的组合物, 且可以具有无菌存取口。例如, 所述容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针穿透塞子的管形瓶。组合物中的活性剂是人源化的抗-CD40 抗体。在容器上或容器伴随的标记表明, 组合物可以用于治疗选择的病症。制品还可以包含第二个容器, 后者含有药学可接受的缓冲液, 例如磷酸盐缓冲盐水, 林格溶液, 和右旋糖溶液。还可以包含从商业和用户观点看需要的其它材料, 包括其它缓冲剂, 稀释剂, 滤膜, 针, 注射器, 和具有使用说明的包装说明书。

[0298] ATCC 保藏

[0299] 根据国际承认的用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约的期限, 在 1999 年 5 月 25 日进行单克隆抗体 S2C6 的 ATCC 保藏。ATCC 位于 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA。该 ATCC 保藏物得到登记号 PTA-110。ATCC 位于 10801 UniversityBoulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, USA。保藏是为了给本领域技术人员提供方便, 而不是承认在 35U. S. C. 112 部分规定下需要保藏物。本文所述的范围不限于保藏的抗体的范围, 因为保藏的实施方式意在作为本发明某些方面的单纯解释, 功能上等同的任意抗体是在本发明范围内。本文材料的保藏不构成对下述内容的承认: 本文包含的书面描述不足以实现本发明的任意方面、包括其最佳方式, 也不应解释为将权利要求的范围限制为它代表的具体解释。实际上, 除了本文所示和描述的那些以外, 本发明的各种变化是本领域技术人员从前面描述显而易见的, 且落入所附权利要求书的范围内。

[0300] 在下面的实施例中, 进一步解释了本发明, 这些实施例无意限制本发明的范围。根据美国典型培养物中心(ATCC)或德意志微生物保藏中心(DMSZ)指定的条件, 维持培养在下面实施例中描述的细胞系。从 Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA) 得到细胞培养试剂。

[0301] 实施例

[0302] 实施例 1 :人源化的抗 -CD40 抗体的生产

[0303] 通过将鼠抗 -CD40 供体抗体的 CDR 输入受体人抗体,构建人源化的抗 -CD40 抗体。供体抗体是美国专利号 6,838,261 中所述的鼠单克隆抗体 S2C6,且被证实会为 B- 淋巴细胞提供强烈的、生长促进信号。参见,例如,Paulie 等,2000, J. Immunol. 142 :590。如 Carter 等,1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :4285 ;美国专利号 6,037,454,和美国专利号 6,054,297 一般所述,得到人亚型 III 重链可变域 (SEQ ID NO :2) 和人 κ 亚型 I 轻链可变域 (SEQ ID NO :13) 的共有序列,用作人受体重链和轻链结构域。

[0304] 在 Cunningham 等 (1989, Science 243 :1330-1336) 中描述的噬菌粒 pEMX1,含有编码人共有 K- 亚型 I 轻链可变域和共有人亚型 III 重链可变域的 DNA 片段,且是对于诱变以及 F(ab)s 在大肠杆菌中的表达有用的载体。如 Carter 等,1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :4285 所述,将编码共有可变域的 DNA 可操作地连接到源自基于 pUC119 的质粒 pAK2 的碱性磷酸酶启动子和 Shine-dalgarno 序列上。在编码 F(ab) 轻链和重链可变域的多核苷酸之间,构建独特的 SpeI 限制位点。构建 pEMX1,并用于制备本文公开的人源化的抗体。

[0305] 通过定位诱变,将鼠抗体的 CDR 输入人共有序列构架区,构建第一个人源化的 mAb S2C6 F(ab),它称作 sgn-0。通常根据 Kunkel,1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :488 所述的方法,进行诱变。在表 2 中显示了得到的人源化的 F(ab) 分子 (sgn-0) 重链和轻链可变域的氨基酸序列 (分别是 SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :14),并与供体抗体、鼠单克隆抗体 S2C6 (mAb S2C6,在本文中也称作 SGN-14 ;分别是 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :12)、和人共有序列受体抗体 HuV_H III 和 HuV_L I (分别是 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :13) 的序列进行对比。

[0306] 将质粒转化进大肠杆菌株 XL-1 Blue (Strataene, San Diego, CA),用于制备双链和单链 DNA。使用双脱氧核苷酸方法 (测序酶, U. S Biochemical Corp.),对每个轻链和重链可变域完全测序。将质粒转化进大肠杆菌株 16C9,即 MM294 的一种衍生物,涂布在含有 5 μ g/ml 羧苄西林的 LB 平板上,选择单个菌落的蛋白表达。将 5ml 培养物加入 500ml AP5-100 μ g/ml 羧苄西林,在 37°C、在 4L 带有挡板的摇瓶中生长 16 小时。APS 培养基包含 1.5g 葡萄糖、11.0g Hycase SF、0.6g 酵母提取物 (合格品)、0.19g MgSO₄ (无水)、1.07g NH₄Cl、3.73g KCl、1.2g NaCl、120ml 1M tri 乙醇胺、pH7.4,水调至 1L,然后经 0.1 μ m Sealkeen 过滤器无菌过滤。

[0307] 通过在 3000X g、在 1L 离心瓶 (Nalgene) 中离心,收获细胞,并去除上清液。冷冻 1 小时后,将沉淀重新悬浮于 25ml 冷 10mM MES,10mM EDTA,pH5.0 (缓冲液 A)。加入 250 μ l 0.1M PMSF (Sigma) 来抑制蛋白酶解,并加入 3.5ml 原液 10mg/ml 鸡蛋清溶菌酶 (Sigma) 来辅助裂解细菌细胞壁。在冰上轻轻摇动 1 小时后,在 40,000Xg 离心样品 15 分钟。用缓冲液 A,将上清液调至 50ml,并装载上用缓冲液 A 平衡的 2ml DEAE 柱。然后流过用缓冲液 A 平衡的蛋白 G- 琼脂糖 CL-4B 柱 (Pharmacia) (0.5ml 床体积)。用 10ml 缓冲液 A 洗涤柱,并用 3ml 0.3M 甘氨酸、pH3.0 洗脱进 1.25ml 1M TRIS,pH8.0。然后使用 Centricon-30 过滤器 (Amicon),将 F(ab) 缓冲交换进 PBS,并浓缩至终体积 0.5ml。进行 F(ab) 的 SDS PAGE 凝胶,以确认纯度,并通过电雾化质谱法验证分子量。

[0308] 与亲本鼠抗体相比,人源化的抗体 sgn-0 表现出对固定化在微量滴定板上的 CD40 显著减小的结合亲和力。

[0309]	表 2					
[0310]	重链可变域					
[0311]		10	20	30	40	50
[0312]	SGN-14	EVQLQQSGPD	LVKPGASVKI	SCKASGYSFT	GY ^Y IHWVKQS	HGKSLEWIGR
[0313]	sgn-0	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ^Y IHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0314]	HumVHIII	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYAMS ^W VRQA	PGKGLEWVAV
[0315]				CDR-H1		
[0316]		60	70	80	90	100
[0317]	SGN-14	VIPNNGGTSY	NOKFKGKAIL	TVDKSSSTAY	MELRSLTSED	SAVYYCAREG
[0318]	sgn-0	VIPNNGGTSY	NOKFKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0319]	HumVHIII	ISGDGGSTYY	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGR
[0320]		CDR-H2				
[0321]		110				
[0322]	SGN-14	I---YWWGHG	TTLTVS			
[0323]	sgn-0	I---YWWGQG	TLTVS			
[0324]	HumVHIII	GGGSDYWGQG	TLTVS			
[0325]		CDR-H3				
[0326]	轻链可变域					
[0327]		10	20	30	40	50
[0328]	SGN-14	DVVVTQTPLS	LPVSLGAQAS	ISCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YLQKPGQSPK
[0329]	sgn-0	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK
[0330]	HumKI	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQ ^S IS	NYL-----AW	YQQKPGKAPK
[0331]				CDR-L1		
[0332]		60	70	80	90	100
[0333]	SGN-14	LLIYTVSNRF	SGVPDRFSGS	GSGTDFTLKI	SRVEAEDLGV	YFCSQTTHVP
[0334]	sgn-0	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	GSGTDFTLTI	SSLQPEDFAT	YYCSQTTHVP
[0335]	HumKI	LLIYAASSLE	SGVPSRFSGS	GSGTDFTLTI	SSLQPEDFAT	YYCQQYNSLP
[0336]		CDR-L2			CDR-L3	
[0337]		110				
[0338]	SGN-14	WTFGGGTKLE	IQR			
[0339]	sgn-0	WTFGQGTKVE	IKR			
[0340]	HumKI	WTFGQGTKVE	IKR			

[0341] 实施例 2 :人源化的抗 -CD40 变体抗体的制备

[0342] 对如实施例 1 所述制备的模板人源化抗体 sgn-0, 进行一系列突变。通过定位诱变, 对编码 sgn-0 的轻链和重链可变域的 DNA 进行特异性突变, 在下面的表 3 和 4 中, 列出了从该模板分子生成的变体的序列。

[0343] 分析使用这些变体轻链和重链可变域构建的抗体的结合活性。将每种抗体稀释至等同浓度, 然后系列稀释。测定稀释的抗体对固定化在微量滴定板上的 CD40 的结合。在下面的表 5 中, 显示了变体抗体的亲和力结合数据。表现出接近亲本鼠抗体的结合活性

的抗体是 sgn-14, sgn-18, sgn-19, sgn-22, sgn-23, sgn-26, 和 sgn-27, 其中变体 sgn-14, sgn-18, sgn-26, 和 sgn-27 更接近亲本鼠抗体的结合活性, SGN-14 和变体 sgn-26 在这些测定中表现出最佳性能。

[0344] 表 3

[0345] 重链可变域

[0346]	Ab/SEQ ID NO	10	20	30	40	50
[0347]	sgn-0/3	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0348]	sgn-1/4	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0349]	sgn-2/5	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0350]	sgn-4/6	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0351]	sgn-14/7	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0352]	sgn-15/8	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0353]	sgn-16/9	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0354]	sgn-17/6	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0355]	sgn-18/6	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0356]	sgn-19/7	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0357]	sgn-22/10	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0358]	sgn-23/11	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0359]	sgn-26/10	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0360]	sgn-27/11	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GY ¹ YIHWVRQA	PGKGLEWVAR
[0361]		CDR-H1				
[0362]		60	70	80	90	100
[0363]	sgn-0/3	VIPNNGGTSY	NQKF ¹ KGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0364]	sgn-1/4	VIPNNGGTSY	NQKF ¹ KGRFTI	SVDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0365]	sgn-2/5	VIPNNGGTSY	NQKF ¹ KGRFTI	SRDKSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0366]	sgn-4/6	VIPNNGGTSY	NQKF ¹ KGRATL	SVDNSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0367]	sgn-14/7	VIPNNGGTSY	NQKF ¹ KGRFTL	SVDNSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0368]	sgn-15/8	VIPNNGGTSY	NQKF ¹ KGRATI	SVDNSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0369]	sgn-16/9	VIPNNGGTSY	NQKF ¹ KGRATL	SVDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0370]	sgn-17/6	VIPNNGGTSY	NQKF ¹ KGRATL	SVDNSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0371]	sgn-18/6	VIPNNGGTSY	NQKF ¹ KGRATL	SVDNSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0372]	sgn-19/7	VIPNNGGTSY	NQKF ¹ KGRFTL	SVDNSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0373]	sgn-22/10	VIPNAGGTSY	NQKF ¹ KGRFTL	SVDNSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0374]	sgn-23/11	VIPNQGGTSY	NQKF ¹ KGRFTL	SVDNSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0375]	sgn-26/10	VIPNAGGTSY	NQKF ¹ KGRFTL	SVDNSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0376]	sgn-27/11	VIPNQGGTSY	NQKF ¹ KGRFTL	SVDNSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG
[0377]		CDR-H2				
[0378]		110				
[0379]	sgn-0/3	I---	YWWGQGT	LV	TVS	

[0380]	sgn-1/4	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0381]	sgn-2/5	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0382]	sgn-4/6	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0383]	sgn-14/7	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0384]	sgn-15/8	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0385]	sgn-16/9	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0386]	sgn-17/6	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0387]	sgn-18/6	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0388]	sgn-19/7	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0389]	sgn-22/10	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0390]	sgn-23/11	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0391]	sgn-26/10	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0392]	sgn-27/11	<u>I---YWWGQGTLV</u> TVS
[0393]		CDR-H3

[0394] 表 4

[0395] 轻链可变域

[0396]	Ab/SEQ ID NO	10	20	30	40	50
[0397]	sgn-0/14	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0398]	sgn-1/14	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0399]	sgn-2/14	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0400]	sgn-4/14	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0401]	sgn-14/14	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0402]	sgn-15/14	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0403]	sgn-16/14	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0404]	sgn-17/15	DVQVTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0405]	sgn-18/16	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0406]	sgn-19/16	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0407]	sgn-22/14	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0408]	sgn-23/14	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0409]	sgn-26/16	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0410]	sgn-27/16	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	
[0411]		CDR-L1				

[0412]		60	70	80	90	100
[0413]	sgn-0/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	GS GTDFTLTI	SSLQPEDFAT	YYCSQTTHVP
[0414]	sgn-1/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	GS GTDFTLTI	SSLQPEDFAT	YYCSQTTHVP
[0415]	sgn-2/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	GS GTDFTLTI	SSLQPEDFAT	YYCSQTTHVP
[0416]	sgn-4/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	GS GTDFTLTI	SSLQPEDFAT	YYCSQTTHVP
[0417]	sgn-14/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	GS GTDFTLTI	SSLQPEDFAT	YYCSQTTHVP
[0418]	sgn-15/14	LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	GS GTDFTLTI	SSLQPEDFAT	YYCSQTTHVP

[0419] sgn-16/14 LLIYTVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP

[0420] sgn-17/15 LLIYTVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP

[0421] sgn-18/16 LLIYTVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YFCSQTTHVP

[0422] sgn-19/16 LLIYTVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YFCSQTTHVP

[0423] sgn-22/14 LLIYTVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP

[0424] sgn-23/14 LLIYTVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCSQTTHVP

[0425] sgn-26/16 LLIYTVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YFCSQTTHVP

[0426] sgn-27/16 LLIYTVSNRF SGVPSRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YFCSQTTHVP

[0427] CDR-L2 CDR-L3

[0428] 110

[0429] sgn-0/14 WTFGQGTKVE IKR

[0430] sgn-1/14 WTFGQGTKVE IKR

[0431] sgn-2/14 WTFGQGTKVE IKR

[0432] sgn-4/14 WTFGQGTKVE IKR

[0433] sgn-14/14 WTFGQGTKVE IKR

[0434] sgn-15/14 WTFGQGTKVE IKR

[0435] sgn-16/14 WTFGQGTKVE IKR

[0436] sgn-17/15 WTFGQGTKVE IKR

[0437] sgn-18/16 WTFGQGTKVE IKR

[0438] sgn-19/16 WTFGQGTKVE IKR

[0439] sgn-22/14 WTFGQGTKVE IKR

[0440] sgn-23/14 WTFGQGTKVE IKR

[0441] sgn-26/16 WTFGQGTKVE IKR

[0442] sgn-27/16 WTFGQGTKVE IKR

[0443] 表 5

[0444]

抗体	重链可变域	轻链可变域	结合数据 1	结合数据 2	结合数据 3
SGN-14	SEQ ID NO :1 供体	SEQ ID NO :12 供体	1.00	1.33	1.16
hu sgn-0	SEQ ID NO :3 模板	SEQ ID NO :14 模板	75.31	75.31	—
hu sgn-1	SEQ ID NO :4 R72V	SEQ ID NO :14 模板	23.63	19.31	—
hu sgn-2	SEQ ID NO :5 N74K	SEQ ID NO :14 模板	471.37	370.87	—

hu sgn-4	SEQ ID NO :6 F68A I70L R72V L79A	SEQ ID NO :14 模板	2.23 1.83 3.12 1.41	2.46	—
hu sgn-14	SEQ ID NO :7 I70L R72V L79A	SEQ ID NO :14 模板	1/11 0.86 0.77	0.69 0.77	—
hu sgn-15	SEQ ID NO :8 F68A R72V L79A	SEQ ID NO :14 模板	10.54 4.67	2.71	—
hu sgn-16	SEQ ID NO :9 F68A I69L R72V	SEQ ID NO :14 模板	44.00 9.78 7.99	1.82 1.83	—
hu sgn-17	SEQ ID NO :6 F68A I70L R72V L79A	SEQ ID NO :15 I2V M4V	3.60 1.76	3.56	—
hu sgn-18	SEQ ID NO :6 F68A I70L R72V L79A	SEQ ID NO :16 Y92F	0.96 0.67	1.03	—
hu sgn-19	SEQ ID NO :7 I70L R72V L79A	SEQ ID NO :16 Y92F	0.481 1.06	0.501 0.98 0.92 1.14	—
hu sgn-22	SEQ ID NO :10 N55A I70L R72V L79A	SEQ ID NO :14 模板	1.44 1.41 1.80 0.93	0.84	—
hu sgn-23	SEQ ID NO :11 N55Q I70L R72V L79A	SEQ ID NO :14 模板	2.11 1.58 2.38 0.72	0.90	—
hu sgn-26	SEQ ID NO :10 N55A I70L R72V L79A	SEQ ID NO :16 Y92F	0.92 1.02 1.02 1.06	0.92	—

hu sgn-27	SEQ ID NO :11 N55Q I70L R72V L79A	SEQ ID NO :16 Y92F	1.04	1.40	—
			1.03		
			0.94		
			0.83		

[0445] 实施例 3 :人源化的抗 -CD40 抗体的体外细胞毒性活性

[0446] 用递增浓度 (0-100 μ g/ml) 的人源化的 S2C6 抗体处理 CD40⁺ 和 CD138⁺⁺ 人多发性骨髓瘤细胞系 MM. 1S(它是地塞米松敏感的) 和 MM. 1R(它是地塞米松抗性的) 以及从 2 个多发性骨髓瘤患者新分离的肿瘤细胞 (CD40⁺, CD138⁺⁺) 48 小时。通过 ³[H]- 胸苷摄入, 测量 DNA 合成。结果表明, 人源化的 S2C6 抗体没有刺激 MM. 1S、MM. 1R 或来自 2 位患者的细胞的增殖 (p > 0.1)。

[0447] 为了进一步确定人源化的 S2C6 抗体对这些细胞的细胞毒性作用, 用人源化的 S2C6 抗体 (10 μ g/ml) 处理 MM. 1S 和 MM. 1R 的培养物 6 小时, 然后与新合成的蛋白合成抑制剂环己酰亚胺 (0.2 μ g/ml) 共培养另外 48 小时。使用还原 3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-2,5- 二苯基四唑溴化物 (MTT) 作为指示剂, 测定细胞生存力。人源化的 S2C6 抗体和环己酰亚胺处理在 2 种细胞系中触发了 50-60% 细胞杀伤, 而单独的同种型对照 Ig(有或没有环己酰亚胺) 处理没有诱发细胞毒性。人源化的 S2C6 抗体在 2 种患者肿瘤细胞培养物中触发了 20-30% 细胞的细胞毒性, 在有无毒剂量 (0.2 μ g/ml) 的环己酰亚胺存在下, 这会显著提高。

[0448] 实施例 4 :人源化的抗 -CD40 抗体的抗肿瘤活性

[0449] 在 SCID 小鼠淋巴瘤异种嫁接模型中, 测定人源化的抗 -CD40 抗体的抗肿瘤活性。在开始药物治疗前 13 天, 将 500 万 Ramos 肿瘤细胞皮下注射进 SCID 小鼠 (10 只 / 组)。每周腹膜内施用鼠抗 -CD40 抗体或人源化的 S2C6 3 次 (4mg/kg/ 次), 施用 8 或 5 次。检查小鼠的肿瘤生长, 在 14 天研究期间, 每周测量肿瘤体积。图 2 中的结果证实了对照小鼠中肿瘤生长增加了近 9- 倍, 而在相同的时间段内, 用鼠抗 -CD40 抗体或人源化的 S2C6 处理的小鼠中的肿瘤生长是可忽略的。数据表明, 人源化的抗体能与鼠抗 -CD40 抗体一样有效地抑制该 B 淋巴瘤异种嫁接模型中的肿瘤生长。

[0450] 实施例 5 :人源化的抗 -CD40 抗体的延长存活率

[0451] 在 SCID 小鼠淋巴瘤异种嫁接模型中, 测定人源化的抗 -CD40 抗体对携带肿瘤的小鼠的存活率的效能。在抗体治疗前 3 天, 给 SCID 小鼠 (10 只 / 组) 静脉内接种 100 万 Ramos 肿瘤细胞。用鼠或人源化的抗 -CD40 抗体或 Ig 对照处理小鼠, 每周腹膜内施用 2 次 (4mg/kg/ 次), 共 5 次。每天检查小鼠笼的死亡率。图 3 所示的结果表明, 用对照抗体治疗的小鼠都没有存活至超过肿瘤接种后 34 天, 而用鼠抗 -CD40 抗体治疗的 10 只小鼠中的 8 只、和用人源化的抗 -CD40 抗体治疗的所有 10 只小鼠, 在肿瘤植入后甚至 90 天仍然存活。数据表明, 人源化的抗体能与鼠抗 -CD40 抗体一样有效地延长 SCID 小鼠在该 B 淋巴瘤异种嫁接模型中的存活率。

[0452] 本文引用了各种参考文献, 包括专利申请、专利和科学出版物, 它们的公开内容在本文中整体引作参考。本文对任何参考文献的引用或确认, 不应当解释为承认这些参考文献可以作为本发明的背景技术来得到。

[0453] 本文公开的教导的应用范围,不受本文所述具体实施方案的限制。实际上,本领域普通技术人员考虑本文包含的教导和所附实施例,能够作出多种改进。这样的改进应当属于所附权利要求书的范围内。

[0001]

序列表

<110> Genentech, Inc.
Seattle Genetics, Inc.
Presta, Leonard
O'Connell, Lori
Doronina, Svetlana

<120> 人源化的抗-CD40 抗体及其使用方法

<130> Hu CD40

<150> US 60/684,853

<151> 2005-05-26

<160> 22

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

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

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

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly His Gly Thr Thr Leu Thr Val
100 105 110

Ser

[0002]

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成构建体

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser
115

<210> 3
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成构建体

<400> 3

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

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

[0003]

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser

<210> 4
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成构建体

<400> 4

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

[0004]

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser

<210> 5
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成构建体

<400> 5

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser

<210> 6
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

[0005]

<223> 合成构建体

<400> 6

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala 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 Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0006]

Ala Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala 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 Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser

<210> 8
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成构建体

<400> 8

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala 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 Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

[0007]

Ser

<210> 9
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成构建体

<400> 9

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser

<210> 10
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成构建体

<400> 10

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

[0008]

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala 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 Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser

<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成构建体

<400> 11

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Val Ile Pro Asn Gln Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

[0009]

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

Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser

<210> 12
<211> 113
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 12

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

Ala Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln
100 105 110

Arg

<210> 13
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工的

[0010]

<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

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	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asn	Tyr
			20					25					30		

Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			

Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Leu	Pro	Trp
				85					90					95	

Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Gln	Arg
			100					105			

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

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	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
			20					25					30		

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

Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

[0011]

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 15
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 合成构建体

<400> 15

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

[0012]

<210> 16
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 16

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 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
 85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 17
 <211> 1392
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 17

atgggatggt catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caactggagt acattcagaa 60
 gttcagctgg tggagtctgg cgggtggcctg gtgcagccag ggggctcaact ccgtttgtcc 120
 tgtgcagctt ctggtacag cttcaccggt tattacatcc actgggtccg tcaggccccc 180

[0013]

```

ggttaagggcc tggaaatgggt tgcaagggtt attcctaacg cggcggtac cagttataac 240
cagaagttca agggcgggtt cacattgagc gtgcacaatt ccaaaaacac agcatacctg 300
cagatgaaca gcctgcgtgc tgaggacact gccgtctatt attgtgctcg agagggtatc 360
tactgggtggg gtcaaggaac cctggtcacc gtctcctcgg cctccaccaa gggcccatcg 420
gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 480
ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acgggtgtcgt ggaactcagg cgcctgacc 540
agcggcgtgc acaccttccc ggtgttecta cagtctcag gactctactc cctcagcagc 600
gtgggtgactg tgccctctag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 660
aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 720
acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 780
ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtgggtgtg 840
gaogtgagcc acgaagacct tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
cataatgcc agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 960
gtctctaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
aacaagccc tccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagcccccga 1080
gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaagaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
ctgacctgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgctg tggactccga cggctccttc 1260
ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
tgctcgtga tgcatgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctcctgtct 1380
ccgggtaaat ga 1392

```

<210> 18
 <211> 463
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 18

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

[0014]

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

[0015]

Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	
			260					265					270			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	
		275						280				285				
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	
		290						295				300				
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
305						310				315					320	
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
				325					330					335		
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
			340					345					350			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
		355					360					365				
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
		370					375				380					
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
385						390				395					400	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
				405					410					415		
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
			420					425					430			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
		435					440					445				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
	450					455					460					

<210> 19

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工的

[0016]

<220>

<223> 合成构建体

<400> 19

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Arg Val Ile Pro Asn Ala Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala 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 Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
115 120 125

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
130 135 140

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

[0017]

210	215	220
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe 225 230 235 240		
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val 245 250 255		
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe 260 265 270		
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 275 280 285		
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr 290 295 300		
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 305 310 315 320		
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 325 330 335		
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 340 345 350		
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 355 360 365		
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 370 375 380		
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser 385 390 395 400		
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 405 410 415		
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 420 425 430		
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 435 440		

[0018]

<210> 20
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 20
 atgggatggg catgtatcat cctttttcta gtagcaactg caaccgggtg acattcagat 60
 atccagatga cccagtcccc gagctccctg tccgcctctg tgggcgatag ggtcaccatc 120
 acctgcagat ccagtc aaag cttagtacat agcaatggta acactttcct ccactgggat 180
 caacagaaac caggaaaagc tccgaaacta ctgatttaca ctgttagcaa ccggtttctct 240
 ggagtccctt ctgccttctc tggatccggg tctgggaagg atttcaactct gaccatcagc 300
 agtctgcagc cagaagactt cgctacgtat ttctgtagtc agactactca tgttccatgg 360
 acatttggac aggggtaccaa ggtggagatc aaacgaactg tggetgcacc atctgtcttc 420
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctgggaactg cttctgttgt gtgcctgctg 480
 aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
 agcacccctga cgtgtagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
 acccatcagg gctgagetc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttaa 717

<210> 21
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 21

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

[0019]

50	55	60
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser 65	70	75 80
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr 85	90	95
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys 100	105	110
Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val 115	120	125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro 130	135	140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu 145	150	155 160
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn 165	170	175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser 180	185	190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala 195	200	205
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly 210	215	220
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225	230	235
<210> 22		
<211> 219		
<212> PRT		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 22		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		

[0020]

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser	20	25	30
Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala	35	40	45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	50	55	60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	65	70	75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Gln Thr	85	90	95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105	110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	115	120	125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	130	135	140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	145	150	155
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	165	170	175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	195	200	205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210	215	

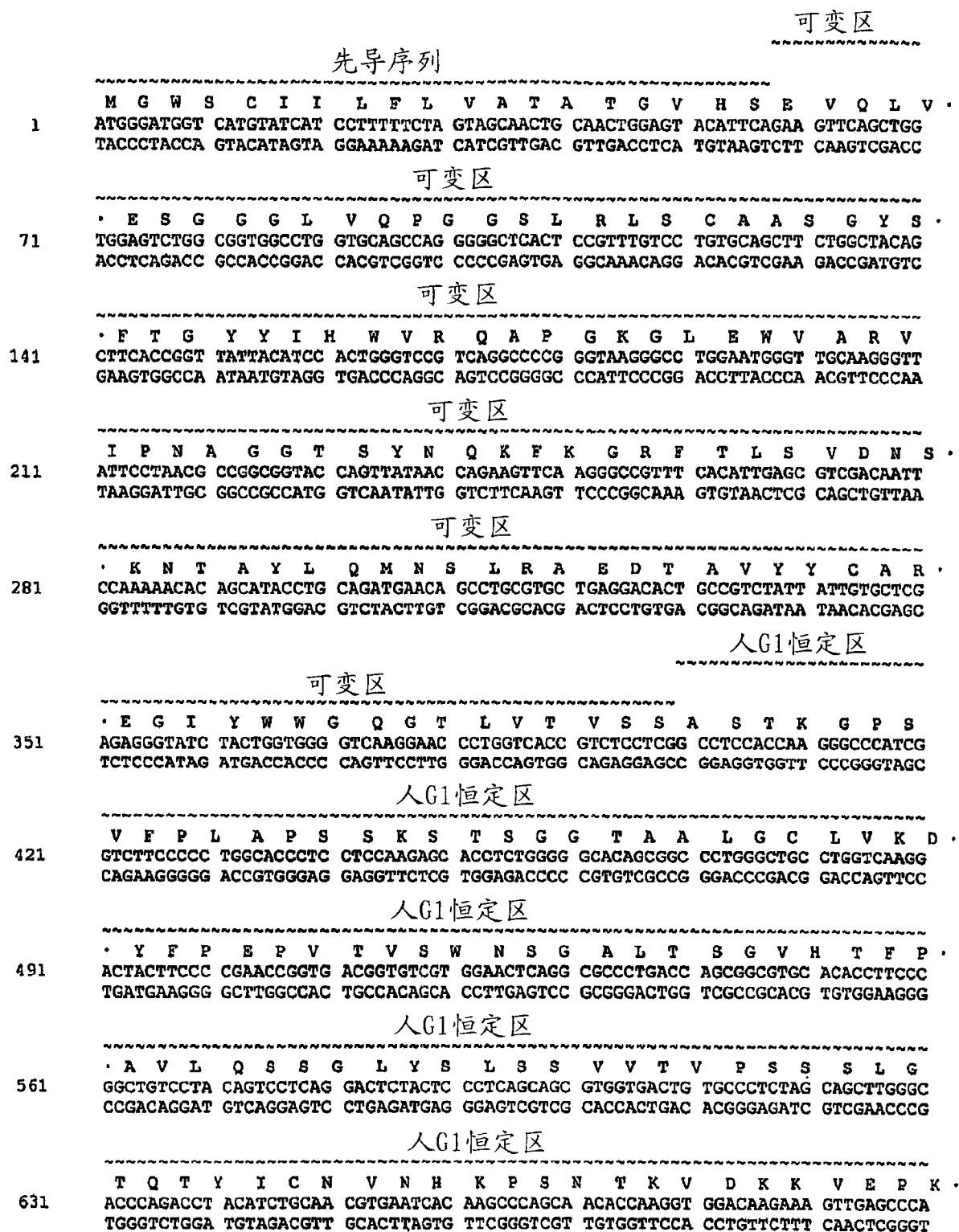


图 1A

人G1恒定区

701
• S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F •
AATCTTGTGA CAAACTCAC ACATGCCCAC CGTGCCCAGC ACCTGAATC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT
TTAGAACACT GTTTTGAGTG TGTACGGGTG GCACGGGTG TGGACTTGAG GACCCCTG GCAGTCAGAA

人G1恒定区

771
• L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V
CCTCTTCCCC CAAAACCCA AGGACACCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGGTG
GGAGAAGGGG GGTTTTGGGT TCCTGTGGGA GTACTAGAGG GCCTGGGGAC TCCAGTGAC GCACCACCAC

人G1恒定区

841
D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K •
GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA
CTGCACTCGG TGCTTCTGGG ACTCCAGTTC AAGTTGACCA TGCACCTGCC GCACCTCCAC GTATTACGGT

人G1恒定区

911
• T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q •
AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA
TCTGTTTCGG CGCCCTCCTC GTCATGTTGT CGTGCATGGC ACACCACTCG CAGGAGTGGC AGGACGTGGT

人G1恒定区

981
• D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K
GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA
CCTGACCGAC TTACCGTTCC TCATGTTTAC GTTCCAGAGG TTGTTTCGGG AGGGTCGGGG GTAGCTCTTT

人G1恒定区

1051
T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M •
ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT GCGCCCATCC CGGGAAGAGA
TGGTAGAGGT TTCGGTTTCC CGTCGGGGCT CTTGTGTGCC ACATGTGGGA CGGGGGTAGG GCCCTTCTCT

人G1恒定区

1121
• T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W •
TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG
ACTGGTTCTT GGTCCAGTCG GACTGGACGG ACCAGTTTCC GAAGATAGGG TCGCTGTAGC GGCACCTCAC

人G1恒定区

1191
• E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F
GGAGAGCAAT GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCAGC CCTCCCGTGC TGGACTCCGA CGGCTCCTTC
CCTCTCGTTA CCCGTCGGCC TCTTGTGAT GTTCTGGTGC GGAGGGCAGC ACCTGAGGCT GCCGAGGAAG

人G1恒定区

1261
F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M •
TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA
AAGGAGATCT CGTTCGAGTG GCACCTGTTT TCGTCCACCG TCGTCCCTT GCAGAAGAGT ACGAGGCACT

人G1恒定区

1331
• H E A L R N H Y T Q K S L S L S P G K •
TGCATGAGGC TCTGCACAAC CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCTGTCT CCGGGTAAAT GA
ACGTACTCCG AGACGTGTTG GTGATGTGCG TCTTCTCGGA GAGGGACAGA GGCCCATTTA CT

图 1B

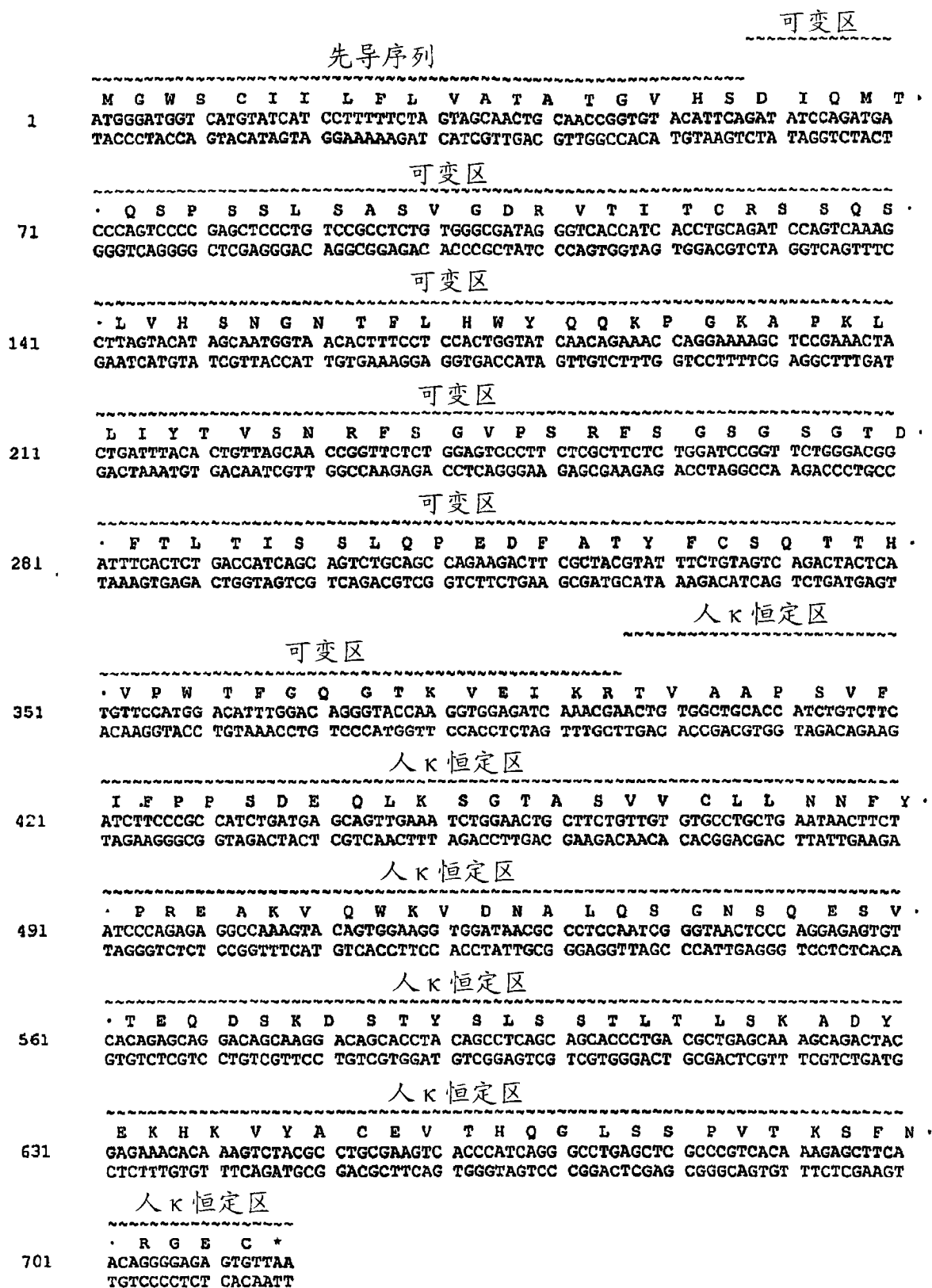


图 10

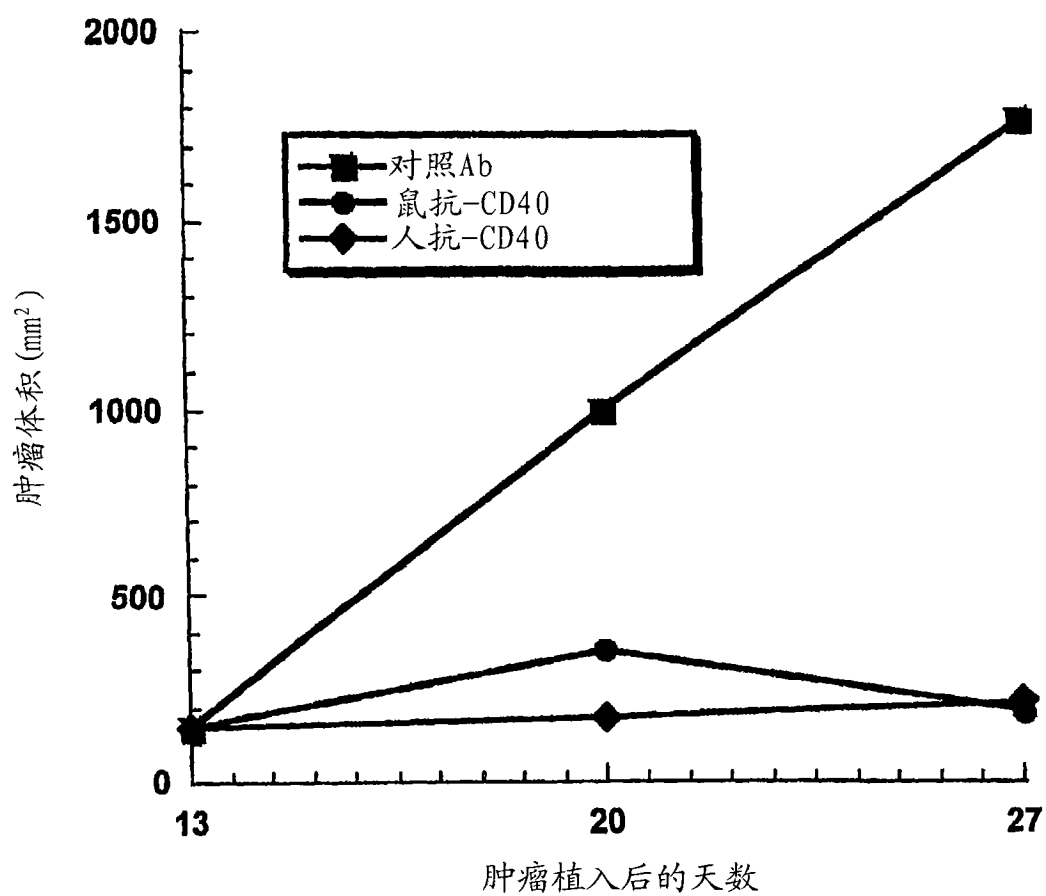


图 2

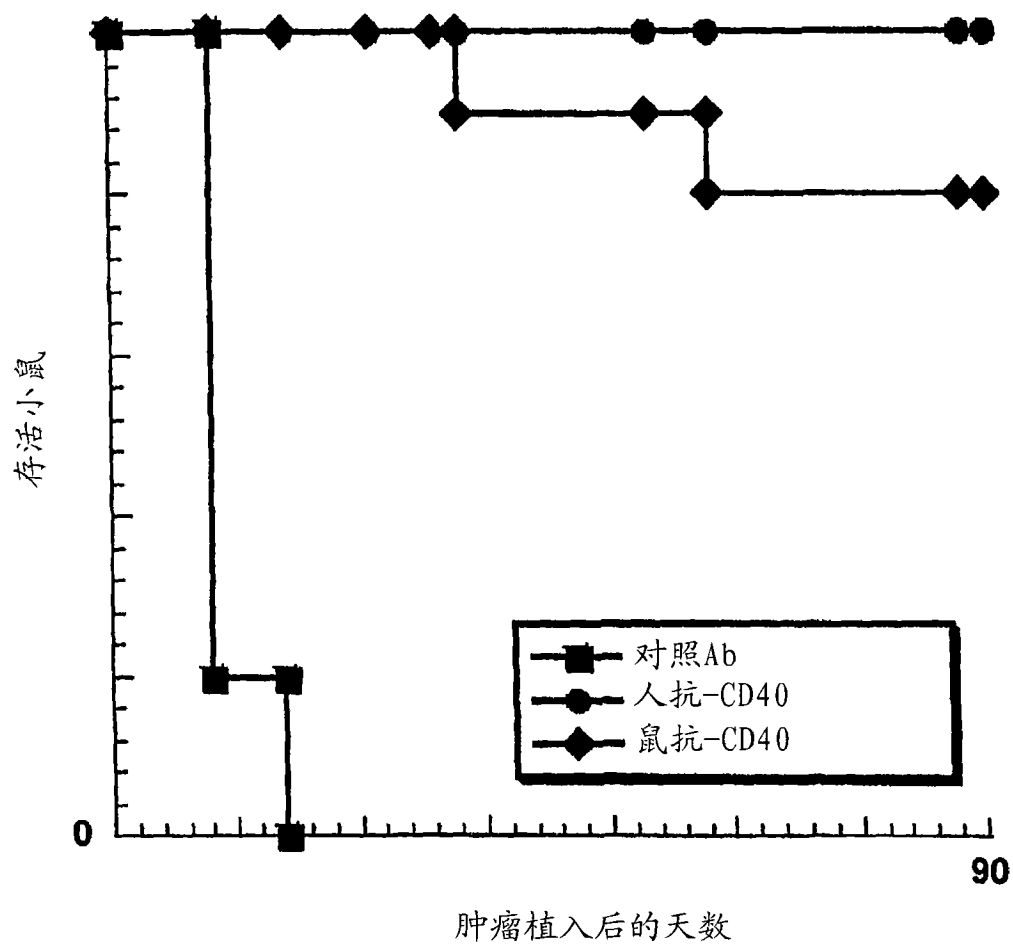


图 3