



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103635488 B

(45)授权公告日 2016.12.14

(21)申请号 201280031910.5

(22)申请日 2012.04.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103635488 A

(43)申请公布日 2014.03.12

(30)优先权数据
61/480,863 2011.04.29 US
61/622,435 2012.04.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.12.27

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/035502 2012.04.27

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/149356 EN 2012.11.01

(73)专利权人 埃派斯进有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 张永克 余国良 朱伟民

(74)专利代理机构 北京商专永信知识产权代理
事务所(普通合伙) 11400
代理人 郭玥 葛强

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 1582165 A,2005.02.16,
WO 9942075 A2,1999.08.26,
Horton H.等."Fc-engineered anti-CD40
antibody enhances multiple effector
functions and exhibits potent in vitro
and in vivo antitumor activity against
hematologic malignancies".《BLOOD》.2010,

审查员 马静

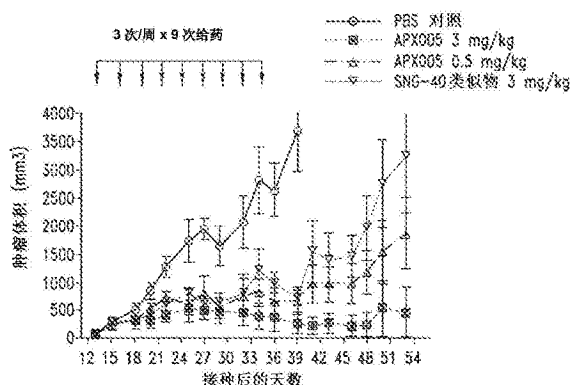
权利要求书2页 说明书44页
序列表69页 附图29页

(54)发明名称

抗-CD40抗体及其使用方法

(57)摘要

本发明提供了高亲和力抗-CD40单克隆抗体及相关的组合物,其可用于治疗癌症和其他疾病的多种治疗方法中的任何一种。



1. 一种与CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,包括(i)重链可变区,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:3所示的VHCDR1区、如SEQ ID NO:4所示的VHCDR2区、和如SEQ ID NO:5所示的VHCDR3区;以及(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:6所示的VLCDR1区、如SEQ ID NO:7所示的VLCDR2区、和如SEQ ID NO:8所示的VLCDR3区。

2. 根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包括如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

4. 一种与CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区由如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成,所述轻链可变区由如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成。

5. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体是人源化的。

6. 根据权利要求5所述的分离的抗体,其中所述VH区由如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列组成,并且所述VL区由如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列组成。

7. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体选自下组:ScFv、缺乏铰链区的单价抗体、和微抗体。

8. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体是Fab或Fab'片段。

9. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体是F(ab')₂片段。

10. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体是完整的抗体。

11. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其包括人IgG恒定结构域。

12. 根据权利要求11所述的分离的抗体,其中所述IgG恒定结构域包括IgG1CH1结构域。

13. 根据权利要求11所述的分离的抗体,其中所述IgG恒定结构域包括IgG1Fc区。

14. 根据权利要求1所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其与CD40结合的KD为0.96nM或更低。

15. 编码权利要求1所述的分离的抗体,或其抗原结合片段的分离的多核苷酸。

16. 一种表达载体,其包括如权利要求15所述的分离的多核苷酸。

17. 一种分离的宿主细胞,其包括如权利要求16所述的载体。

18. 一种组合物,其包括生理学上可接受的载体和治疗有效量的根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段。

19. 根据权利要求18所述的组合物在制备用于治疗或改善癌症患者的症状的药物中的用途。

20. 根据权利要求19所述的用途,其中所述癌症选自下组:非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑色素瘤和白血病。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中所述白血病选自下组:慢性淋巴细胞性白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病。

22. 根据权利要求20所述的用途,其中所述非霍奇金淋巴瘤是利妥昔单抗耐药性非霍奇金淋巴瘤。

23. 根据权利要求18所述的组合物在制备用于改善自身免疫性疾病患者的症状的药物

中的用途。

24. 根据权利要求18所述的组合物在制备用于改善炎症性疾病患者的症状的药物中的用途。

抗-CD40抗体及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求申请日为2012年4月10日的美国临时申请号61/622,435和申请日为2011年4月29日的美国临时申请号61/480,863的优先权,其全部内容通过引用并入本申请。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 本申请附带的序列表以文本格式代替纸质副本,其通过引用并入说明书。包含序列表的文本文件的名称为APEX_013_02US_ST25.txt。该文本文件于2012年4月27日创建,大小为86KB,通过EFS-Web以电子形式提交。

[0005] 背景

技术领域

[0006] 本发明总体涉及抗-CD40抗体及其组合物和使用方法。此类抗体可用于,例如,治疗多种肿瘤疾病的方法中。

[0007] 相关技术的描述

[0008] 大部分白血病和淋巴瘤源自B细胞系细胞的恶性转化。细胞表面B细胞系限制性抗原,如CD20的表达,使其成为抗体治疗有吸引力的靶点。抗体治疗已经极大地改变了非霍奇金淋巴瘤(NHL)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者的管理。自从利妥昔单抗批准以来,抗体单用或与化疗相结合已显著提高响应率、长期的结果、和生活质量(Chinn P, Braslawsky G, White C, 等。Antibody therapy of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. Cancer Immunol Immunother 2003;52:257-280.; Rastetter W, Molina A, White CA. Rituximab: Expanding role in therapy for lymphomas and autoimmune diseases. Annu Rev Med 2004;55:477-503)。然而,有相当多的患者表现出原发性或获得性利妥昔单抗耐药性,这表明目前靶向CD20的方法在临床结果方面有局限性,并需要通过开发新的针对B细胞淋巴瘤和白血病具有不同作用机制的免疫疗法来进行改进(Stolz C, Schuler M. Molecular mechanisms of resistance to Rituximab and pharmacologic strategies for its circumvention. Leukemia and lymphoma. 2009;50(6):873-885; Bello C, Sotomayor EM. Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: Rituximab and beyond. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2007;233-242; Dupire S, Coiffier B. Targeted treatment and new agents in diffuse large B cell lymphoma. Int J Hematol 2010; Jun 18(online)),如抗CD40单克隆抗体,APX005。

[0009] CD40在调节免疫应答中的作用

[0010] T细胞完全激活需要两个不同但协同的信号。由APC上的抗原-MHC复合物提供的第一信号,通过T细胞抗原受体传递,并负责免疫应答的特异性。第二或共刺激信号则是通过CD28与B7-1(CD80)/B7-2(CD86),以及CD40与CD40L相互作用来传递,这是达到完全T细胞应答所必需的。在缺乏共刺激信号时,T细胞可能发生无应答性(无反应力)或抗原刺激后的细胞程序性死亡(细胞凋亡)。

[0011] CD40是TNF受体(TNFR)超家族的成员,主要在B细胞和其他抗原呈递细胞(APC),如

树突状细胞和巨噬细胞上表达。CD40配体(CD40L)主要由活化的T细胞表达。

[0012] CD40和CD40L的相互作用是T细胞活化的共刺激信号。静息B细胞上的CD40-CD40L相互作用能诱导增殖、免疫球蛋白类别转变、抗体分泌,并且对生发中心的发展和记忆性B细胞的存活都有影响,所有这一切都是体液免疫应答必不可少的(Kehry MR.J Immunol 1996;156:2345-2348)。树突状细胞上的CD40L与CD40结合诱导DC的成熟,这表现在共刺激分子,如B7家族(CD80,CD86)的表达增加,以及促炎细胞因子,如白细胞介素12的产生。这将导致显著的T细胞应答(Stout,R.D.,J.Suttles.1996.Immunol.Today 17:487-492; Brendan O'Sullivan,Ranjeny Thomas.Critical Reviews in Immunology 2003;23:83-107;Cella,M.,D.Scheidegger,K.Palmer-Lehmann,P.Lane,A.Lanzavecchia,G.Alber.J.Exp.Med.1996;184:747-452)。

[0013] CD40信号转导激活多种通路,包括NF- κ B(核因子- κ B)、MAPK(裂原活化蛋白激酶)和STAT3(信号转导子和转录激活子-3)(Pype S,等.J Biol Chem.2000 Jun16;275(24):18586-93),其通过激活激活蛋白、c-Jun、ATF2(激活转录因子-2)和Rel转录因子(Dadgostar H,等.Proc Natl Acad Sci U S A.2002 Feb 5;99(3):1497-502)调节基因表达。TNFR受体相关因子接头(adaptor)蛋白(例如,TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF5和TRAF6)与这种受体相互作用并作为信号转导的介质。根据特定的细胞类型,CD40参与作用导致特定的基因表达模式。通过CD40信号应答而激活的基因包括各种细胞因子和趋化因子(IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、TNF- α ,和巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP1 α)。在某些细胞类型中,CD40激活可能会导致产生细胞毒性自由基(Dadgostar等,同上文)、COX-2(环氧合酶-2),并产生NO(一氧化氮)。

[0014] CD40在肿瘤中的作用

[0015] CD40不仅由正常的免疫细胞表达,同时也由许多恶性细胞表达。具体而言,CD40在以下疾病中过表达:B系NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、多毛细胞白血病(HCL)、霍奇金病(Uckun FM,Gajl-Peczalska K,Myers DE,等.Blood 1990;76:2449-2456;O'Grady JT, Stewart S,Lowrey J,等.Am J Pathol 1994;144:21-26)、多发性骨髓瘤(Pellat-Deceunynck C,Bataille R,Robillard N,Harousseau JL,Rapp MJ,Juge-Morineau N,wijdenes J,Amiot M.Blood.1994;84(8):2597-603),以及膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌,和恶性黑色素瘤(Young LS,Eliopoulos AG,Gallagher NJ,等.Immunol Today 1998;19:502-6;Ziebold JL,Hixon J,Boyd A,等.Arch Immunol Ther Exp(Warsz)2000;48:225-33;Gladue R,Cole S,Donovan C,等.J Clin Oncol 2006;24(18S):103s)。

[0016] 在许多情况下,肿瘤细胞表面上连接了CD40后,能介导直接的细胞毒作用,通过细胞凋亡和细胞坏死使肿瘤退缩(Grewal IS,Flavell RA.Annu Rev Immunol 1998;16:111-35;van Kooten C,Banchereau J.J Leukoc Biol 2000;67(1):2-17)。虽然CD40在肿瘤细胞中的确切功能还不清楚(Tong AW,Stone MJ.Cancer Gene Ther.2003 10(1):1-13),体外的CD40参与作用抑制实体瘤细胞和高级别B细胞淋巴瘤细胞的生长(Magi Khalil和RobertH.Vonderheide.Update Cancer Ther 2007;2(2):61-65;Young LS,Eliopoulos AG,Gallagher NJ,Dawson CW.Immunol Today 1998;19(11):502-6;Funakoshi S,Longo DL,Beckwith M,等.Blood 1994;83(10):2787-94;Hess S,Engelmann H.J Exp Med 1996;

183(1):159-67;Eliopoulos AG,Dawson CW,Mosialos G,等.Oncogene 1996;13(10):2243-54;von Leoprechting A,van der Bruggen P,Pahl HL,Aruffo A,Simon JC.Cancer Res1999;59(6):1287-94)。这些作用与非肿瘤性B细胞和树突状细胞上的CD40参与作用后诱导的增殖相反。

[0017] 除了直接的肿瘤抑制之外,CD40信号激活还解救了荷瘤宿主中抗原呈递细胞的功能,并触发或恢复了针对肿瘤相关抗原的活化的免疫应答。据报道,CD40激动剂能克服荷瘤小鼠内的T细胞耐受,激起针对肿瘤相关抗原的有效的细胞毒T细胞应答,并增强抗肿瘤疫苗的效力(Eliopoulos AG,Davies C,Knox PG,等.Mol Cell Biol 2000;20(15):5503-15;Tong AW,Papayoti MH,Netto G,等.Clin Cancer Res 2001;7(3):691-703)。

[0018] CD40作为分子靶点

[0019] CD40在较多恶性细胞中过表达。CD40在肿瘤抑制和免疫系统刺激中的作用使得CD40成为基于抗体的免疫疗法的具有吸引力的靶点(van Mierlo GJ,den Boer AT,Medema JP,等.Proc Natl Acad Sci U S A.2002;99(8):5561-5566;French RR,Chan HT,Tutt AL,Glennie MJ.Nat Med.1999;5(5):548-553)。抗-CD40抗体可通过多种机制对抗癌细胞:(i)抗体效应器功能,如ADCC,(ii)针对肿瘤细胞的直接细胞毒作用,以及(iii)抗肿瘤免疫应答的激活。

[0020] 开发中的抗CD40治疗性抗体

[0021] 已报道有几种抗-CD40抗体具有作为抗肿瘤治疗剂的潜力。CP-870,893是由辉瑞公司开发的完全人IgG2 CD40激动剂抗体。它以 3.48×10^{-10} M的 K_D 值与CD40结合,但不阻断与CD40L的结合(参见,例如,美国专利号7,338,660)。CP-870893已显示有ADCC作用;可能是由于其IgG2的同种型。因此,该抗体作为CD40激动剂(即,不影响CD40L结合),诱导凋亡信号,激活DC和免疫监视。然而,该抗体不介导ADCC。

[0022] HCD122是由诺华公司开发的完全人IgG1 CD40拮抗剂抗体。HCD122以 5.1×10^{-10} M的 K_D 值与CD40结合,阻断CD40与CD40L结合,抑制CD40配体诱导的信号和对B细胞和某些初级CLL和MM细胞的生物效应(Tai YT,等.Cancer Res.2005 Jul1;65(13):5898-906;Luqman M,Klabunde S,等:Blood 112:711-720,2008)。其在体内的抗肿瘤作用的主要作用机制是ADCC((Long L,等.2005 IMF Oral Presentation and Abstract No.3;Blood 2004,104(11,Part 1):Abst 3281)。由于其拮抗剂特性,这种抗体可能不直接诱导CD40介导的抗肿瘤免疫应答。

[0023] SGN-40是由西雅图遗传公司(Seattle Genetics)从小鼠抗体克隆S2C6开发的人源化的IgG1抗体,其通过人膀胱癌细胞系作免疫原而产生。SGN-40以 1.0×10^{-9} M的 K_D 值与CD40结合,并通过增强CD40和CD40L间的相互作用而起作用,从而表现出部分激动剂作用(Francisco JA,等.,Cancer Res,60:3225-31,2000)。SGN-40将增殖抑制和凋亡信号递送至一组源自高级别非-霍奇金氏淋巴瘤和MM细胞的B淋巴瘤细胞系(Tai YT,Catley LP,Mitsiades CS,等.Cancer Res 2004;64(8):2846-2852)。体外和体内研究表明,凋亡信号和通过ADCC的抗体效应器功能都有助于SGN-40的抗肿瘤活性(Law CL,Gordon KA,Collier J,等:Cancer Res 2005;65:8331-8338)。最近的研究表明,SGN-40的抗肿瘤活性显著依赖于Fc与效应细胞的相互作用,并且巨噬细胞是贡献于治疗活性的主要效应器(Oflazoglu E,等.Br J Cancer.2009 Jan 13;100(1):113-7.Epub 2008 Dec 9)。由于SGN-40是部分激

动剂,并需要T细胞上表达CD40L,SGN-40的能力可能有限,而不能充分提高抗肿瘤免疫应答。

[0024] 因此,本领域中仍然需要靶向CD40、并作为该靶点激动剂的新型免疫治疗剂,,激活树突状细胞和免疫监视,并且其激活ADCC,从而提供更好的抗癌特性。

[0025] 发明概述

[0026] 本申请一方面提供了一种与人CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,包括(i)重链可变区,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:3所示的VHCDR1区、如SEQ ID NO:4所示的VHCDR2区、和如SEQ ID NO:5所示的VHCDR3区;以及(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:6所示的VLCDR1区、如SEQ ID NO:7所示的VLCDR2区、和如SEQ ID NO:8所示的VLCDR3区;或者所述抗体的变体,或其抗原结合片段,其包括与(i)和(ii)所述重链和轻链可变区相同的重链和轻链可变区,但是在所述CDR区有至多8个氨基酸替换。在本申请公开的抗体的一个实施方式中,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在另一个实施方式中,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0027] 本申请另一方面提供了一种与人CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,包括重链可变区,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列。在该方面的一个实施方式中,所述分离的抗体,或其抗原结合片段,包括轻链可变区,所述轻链可变区包括与如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。在该方面的又一个实施方式中,所述分离的抗体,或其抗原结合片段,包括轻链可变区,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0028] 本申请的又一个方面提供了一种与人CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,包括轻链可变区,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。在该方面的一个实施方式中,所述分离的抗体,或其抗原结合片段,包括重链可变区,所述重链可变区包括与如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0029] 在一些实施方式中,本申请公开的所述分离的抗体是人源化的。示例性的人源化抗体的可变区为如SEQ ID NO:9所示的VH区氨基酸序列和如SEQ ID NO:10所示的VL区氨基酸序列。

[0030] 在一个实施方式中,本申请公开的所述分离的抗体可以是单链抗体、ScFv、缺乏铰链区的单价抗体、微抗体、Fab、Fab'片段、或F(ab')₂片段。在一些实施方式中,本申请中的抗体是完整的抗体。

[0031] 在另一个实施方式中,本申请所述的分离的抗体包括人IgG恒定结构域,例如但不限于,IgG1 CH1结构域或IgG1 Fc区域。

[0032] 本申请的又一个实施方式提供了一种分离的抗体,或其抗原结合片段,其与本申请所述的抗-CD40抗体竞争结合人CD40。

[0033] 在本申请的一个方面,结合CD40的所述分离的抗体,或其抗原结合片段,以0.96nM或更低的Kd值结合。在另一个实施方式中,结合CD40的分离的抗体或其抗原结合片段,以1.1nM到0.9nM间的Kd值结合。在另一个实施方式中,结合CD40的分离的抗体或其抗原结合片段,以约1.2、1.1、1.0、0.99、0.98、0.97、0.96、0.95、0.94、0.93、0.92、0.91、0.90、0.85,或约0.80nM的Kd值结合。在另一个实施方式中,抗体以约2.5、2.4、2.3、2.2、2.1、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4,或者1.3nM的Kd值结合CD40。

[0034] 在另一方面,本发明提供了如本文所述的分离的抗体,或其抗原结合片段,其中所述分离的抗体,或其抗原结合片段:阻断CD40与CD40L结合;是CD40激动剂;活化抗原呈递细胞;刺激抗原呈递细胞释放细胞因子;诱导肿瘤细胞凋亡;抑制肿瘤细胞增殖;通过效应器功能诱导杀死肿瘤细胞,所述效应器功能选自下组:抗体依赖性细胞毒性、补体依赖性细胞毒性,以及抗体依赖性细胞吞噬作用;刺激抗肿瘤T细胞应答;减少已形成的肿瘤;抑制利妥昔单抗耐药性肿瘤;或上述任何一种或多种的组合。

[0035] 本发明的另一方面提供了与CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,包含:(i)重链可变区,所述重链可变区包括如图16中所示的VH区中的任意一个的VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3;以及(ii)轻链可变区,所述轻链可变区包括如图16所示VL区中任意一个的相应VL区的VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3区;或者所述抗体的变体,或其抗原结合片段,其包括与(i)和(ii)所述重链和轻链可变区相同的重链和轻链可变区,但是在所述CDR区有至多8个氨基酸替换。

[0036] 本发明的另一方面还提供了与CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,包括重链可变区,所述重链可变区包含如图16中所示的VH区中的任何一个。在一个实施方式中,所述抗体还包含轻链可变区,所述轻链可变区包含与如图16所示的相应的VL区具有至少90%同一性的氨基酸序列。在另一个实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段还包括如图16所示的相应轻链可变区。

[0037] 本发明的另一方面还提供了与CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,包括轻链可变区,所述轻链可变区包含如图16中所示的VL区中的任何一个。在一个实施方式中,所述抗体还包含重链可变区,所述重链可变区包含与如图16所示的相应的VH区具有至少90%同一性的氨基酸序列。在另一个实施方式中,所述抗体或其抗原结合片段还包括如图16所示的相应重链可变区。

[0038] 本申请还提供了编码如本申请公开的所述分离的抗体,或其抗原结合片段的分离的多核苷酸。

[0039] 本申请还提供了组合物,所述组合物包含生理学上可接受的载剂,和治疗有效量的如本申请所述的抗-CD40的抗体或其抗原结合片段。

[0040] 本申请的另一个方面提供了用于治疗癌症患者的方法,所述方法包括给予患者组合物,所述组合物包括生理学上可接受的载剂和治疗有效量的如本申请所述的抗-CD40的抗体或其抗原结合片段,从而治疗癌症。在一些实施方式中,癌症与CD40表达异常相关。在一些实施方式中,癌症选自下组:非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病、多发性骨髓瘤、胰腺癌、结肠癌、胃肠道癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑色素瘤、以及利妥昔单抗耐药性非霍奇金淋巴瘤(NHL)和白血病。

[0041] 本申请的另一方面提供了用于治疗患有癌症和/或自身免疫性疾病,和/或炎症性疾病的患者的方法,所述方法包括给予患者组合物,所述组合物包括生理学上可接受的载剂和治疗有效量的如本申请所述的抗-CD40的抗体或其抗原结合片段,从而治疗所述患有自身免疫和炎症性疾病的患者。

[0042] 本申请的另一方面提供了用于在患有癌症、和/或自身免疫疾病和/或炎症性疾病的患者上减轻症状的方法,所述方法包括给予患者组合物,所述组合物包括生理学上可接受

的载剂和治疗有效量的如本申请所述的抗-CD40的抗体或其抗原结合片段,从而减轻患有癌症、和/或自身免疫性疾病和/或炎症疾病的患者的症状。

[0043] 本申请的另一方面提供了与人CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,包括重链可变区,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列。在一个实施方式中,与人CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:22所示氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,或包括如SEQ ID NO:22所示氨基酸序列的轻链。在一些实施方式中,本文所述分离的抗体包括如SEQ ID NO:22所示的轻链,并包括重链可变区,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0044] 本申请的另一方面提供了与人CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,并包括重链可变区,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述抗体包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:24所示氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述轻链包括如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。

[0045] 本申请的另一方面提供了与人CD40结合的分离的抗体或其抗原结合片段,并包括轻链可变区,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述抗体包括轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:13所示氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0046] 在某些方面,所述与CD40结合的分离的抗体或其抗原结合片段,包括重链可变区,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述与CD40结合的分离的抗体包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包与SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列。

[0047] 本申请的另一方面提供了与人CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,并包括轻链可变区,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述与人CD40结合的分离的抗体或其抗原结合片段,包括轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:17所示氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0048] 本申请的另一方面提供了与人CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,并包括重链可变区,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列。在一个实施方式中,所述与人CD40结合的分离的抗体或其抗原结合片段,包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列,所述轻链可变区包括与SEQ ID NO:30所示氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一个具体的实施方式中,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。

[0049] 本申请的另一方面还提供了与人CD40结合的分离的抗体,或其抗原结合片段,并包括轻链可变区,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列。在一个实施方

式中,所述与人CD40结合的分离的抗体或其抗原结合片段,包括轻链可变区和重链可变区,所述轻链可变区包括如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列,所述重链可变区包括与SEQ ID NO:19所示氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0050] 本申请的另一方面提供了与人CD40结合的分离的抗体或其抗原结合片段,包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括重链可变区CDR,所述轻链可变区包括相应的轻链可变区CDR,其中所述CDR如图16所示。

[0051] 序列的简要说明

[0052] SEQ ID NO:1是R-8家兔抗CD40抗体VH区的氨基酸序列。

[0053] SEQ ID NO:2是R-8家兔抗CD40抗体VL区的氨基酸序列。

[0054] SEQ ID NO:3是R-8家兔抗CD40抗体VHCDR1区的氨基酸序列。

[0055] SEQ ID NO:4是R-8家兔抗CD40抗体VHCDR2区的氨基酸序列。

[0056] SEQ ID NO:5是R-8家兔抗CD40抗体VHCDR3区的氨基酸序列。

[0057] SEQ ID NO:6是R-8家兔抗CD40抗体VLCDR1区的氨基酸序列。

[0058] SEQ ID NO:7是R-8家兔抗CD40抗体VLCDR2区的氨基酸序列。

[0059] SEQ ID NO:8是R-8家兔抗CD40抗体VLCDR3区的氨基酸序列。

[0060] SEQ ID NO:9是APX005的VH区的氨基酸序列,APX005是人源化的R-8家兔抗CD40抗体,其不含信号肽。

[0061] SEQ ID NO:10是APX005的VL区的氨基酸序列,APX005是人源化的R-8家兔抗CD40抗体,其不含信号肽。

[0062] SEQ ID NO:11-21和33-44是显示出功能活性的家兔抗CD40抗体候选物的重链氨基酸序列(参见图16)。

[0063] SEQ ID NO:22-32和45-56是显示出功能活性的家兔抗CD40抗体候选物的轻链氨基酸序列(参见图16)。

[0064] SEQ ID NO:57-79是图16中所示抗-CD40抗体的VHCDR1氨基酸序列。

[0065] SEQ ID NO:80-102是图16中所示抗-CD40抗体的VHCDR2氨基酸序列。

[0066] SEQ ID NO:103-125是图16中所示抗-CD40抗体的VHCDR3氨基酸序列。

[0067] SEQ ID NO:126-148是图16中所示抗-CD40抗体的VLCDR1氨基酸序列。

[0068] SEQ ID NO:149-171是图16中所示抗-CD40抗体的VLCDR2氨基酸序列。

[0069] SEQ ID NO:172-194是图16中所示抗-CD40抗体的VLCDR3氨基酸序列。

[0070] 附图简要说明

[0071] 图1A-1D显示了通过按实施例1所述的检测DC成熟和T细胞活化,筛选激动剂抗体的结果。1A:CD83表达;1B:CD80表达;1C:CD86表达;1D:在混合淋巴细胞反应中的T细胞增殖。

[0072] 图2比较了不同前导候选物对拉莫斯(Ramos)细胞增殖的抑制。

[0073] 图3的柱状图显示了ADCC试验的结果。效应器(人PBMC):靶细胞(Ramos细胞)的比值为40:1。

[0074] 图4A和图4B显示了抗-CD40候选物抗肿瘤活性的体内筛选结果。

[0075] 图5显示了ELISA检测的结果,其证明了APX005选择性地与CD40结果,而不是其他TNFR家庭成员。

[0076] 图6显示了ELISA的检测结果,其证明了APX005阻断CD40L与CD40结合。

[0077] 图7显示了APX005的内化并不依赖于与CD40阳性细胞结合。

[0078] 图8A和图8B显示了CD40阳性的Ramos细胞(A)和道迪(Daudi)肿瘤细胞(B)的APX005-介导的ADCC。

[0079] 图9A和图9B显示了APX005对Ramos肿瘤细胞增殖的体外抑制。A图:没有Fc交联;B图:有Fc交联。

[0080] 图10是显示APX005诱导DC活化的柱形图。

[0081] 图11A和11B显示了APX005与人和猴CD40结合,但不与鼠CD40结合。

[0082] 图12A显示了Ramos模型中APX005对肿瘤生长的抑制。图12B的柱形图显示了最后一次给药两天后,即第34天小鼠体内血清人IgG水平。

[0083] 图13A和图13B显示了在小鼠模型中,经利妥昔单抗预处理并具有耐药性的肿瘤的抑制。

[0084] 图14显示了Raji鼠模型中APX005对肿瘤生长的抑制。

[0085] 图15显示了在IM-9移植模型中APX005对人多发性骨髓瘤强力的抗肿瘤活性。

[0086] 图16A-16L是家兔抗-CD40重链(16A-16F)和轻链(16G-16L)抗体序列的序列比对。重链和轻链CDR1-3用下划线标出。SEQ ID NO如下:重链:R-3和R-6:SEQ ID NO:11,12;R-8:SEQ ID NO:1;R-9,-16,-18,-24,-33,-36,19-21,-45,-59:分别为SEQ ID NO:13-21;R-2,R-5,R-7,R-10,R-12,R-20,R-26,R-30,R-35,19-35,19-41,19-57:分别为SEQ ID No:33-44。轻链:R-3和R-6:SEQ ID NO:22和23;R-8:SEQ ID NO:2;R-9,-16,-18,-24,-33,-36,19-21,-45,-59:分别为SEQ ID NO:24-32;R-2,R-5,R-7,R-10,R-12,R-20,R-26,R-30,R-35,19-35,19-41,19-57:分别为SEQ ID No:45-56。上述氨基酸序列包括VH和VL信号肽。R-8 VHCDR和VLCDR氨基酸序列如SEQ ID NO:3-8所示。其余抗体的VHCDR氨基酸序列和VLCDR氨基酸序列分别如SEQ ID NO:57-125和SEQ ID NO:126-194所示。

[0087] 图17A和图17B显示了ramos模型中APX005对肿瘤生长的抑制,并与SGN-40和利妥昔单抗作对比。

[0088] 图18A和图18B显示了在利妥昔单抗耐药性人Namalwa淋巴瘤移植模型中,APX005对肿瘤生长的抑制。

[0089] 发明详述

[0090] 本申请涉及与CD40特异性结合的抗体及其抗原结合片段,特别是具有特异性表位专属性和功能性质的抗体。本发明的一个实施方式包括特异性人源化抗体及其片段,其能够与CD40结合,并通过诱导/增强CD40-介导的下游细胞信号和生物学效应发挥CD40激动剂的作用。在本发明更特定的实施方式中,本申请所述的抗体高亲和性地与CD40特异性结合,例如其亲和力至少在980至950皮摩尔之间,至少在970至950皮摩尔之间,并且在某些实施方式中,其亲和力为960皮摩尔。本发明所述的抗体,除了其他特性以外,还可以诱导肿瘤细胞中CD40信号,激活树突状细胞和免疫监视,激活针对肿瘤细胞的抗体依赖的细胞毒性(ADCC),阻断CD40与CD40L结合;具有CD40激发活性;激活抗原呈递细胞;刺激抗原呈递细胞中释放细胞因子;诱导肿瘤细胞凋亡;抑制肿瘤细胞增殖;通过诱导效应器功能杀死肿瘤细胞,效应器功能包括,但不限于,ADCC、CDC、和ADCP;刺激抗肿瘤T细胞反应;减少已形成的肿瘤;并抑制利妥昔单抗耐药性肿瘤。本发明所述抗体可具有或诱导上述特性或活性中任

意一种或多种的组合。

[0091] 本发明的实施方式涉及抗-CD40抗体或其抗原结合片段在诊断、评价和治疗与CD40相关或与CD40表达异常相关的疾病和病症中的用途。本发明的抗体用于治疗或预防癌症,所述癌症包括,但不限于,非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病、多发性骨髓瘤、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑色素瘤、和利妥昔单抗耐药性非霍奇金淋巴瘤(NHL)和白血病、自身免疫性疾病和炎症疾病,以及其他疾病。

[0092] 除了有明确的相反说明以外,本发明的方法涉及本领域技术人员公知的常规病毒学、免疫学、微生物学、和分子生物学方法以及DNA重组技术,出于说明目的,在下文中对其中的多数进行描述。在文献中对此类技术进行了详细的解释。参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2009); Ausubel等., Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995; Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第3版, 2001); Maniatis等., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) 和其他类似文献。

[0093] 如本说明书和所附权利要求中所使用的,除了另有明示以外,单数形式的“一个”、“一种”和“所述”包括复数形式。

[0094] 在本说明书中,除了另有要求以外,可以理解词语“包含”,或其变体如“包括”或“含有”是指包括所述的元素或整数,或者元素或整数的组,但不排除任意其他的元素或整数,或者元素或整数的组。

[0095] 除了另有明示以外,本说明书的各实施方式在细节上做必要的修改可适用于其他各实施方式。

[0096] 可以将标准技术用于DNA重组、寡核苷酸合成、以及组织培养和转化(例如,电穿孔,脂质转染)。可以根据生产厂商的说明书、或根据本领域的常规方法、或根据本申请中的描述进行酶反应和纯化技术。通常,可以根据本领域公知的常规方法和根据本说明书中引用和讨论的多种一般和更特定的文献中的描述执行这些以及相关的技术和程序。除了有特别的定义以外,本申请所描述的术语以及实验程序和分子生物学、分析化学、合成有机化学、以及医学和药物化学技术均是本领域公知和常用的那些。可以将标准技术用于重组技术、分子生物学、微生物学、化学分析、药物制备、制剂、和递送,以及患者治疗。

[0097] 本发明的实施方式涉及与CD40结合的抗体。特别地,本发明所述的抗体以意想不到的高亲和性与CD40特异性结合,增强CD40信号活性,激活免疫系统,激活ADCC并对于与CD40表达异常相关的疾病治疗具有治疗用途。

[0098] 示例性抗体,或其抗原结合片段或其互补决定区(CDR)的序列如SEQ ID NO: 1-194。

[0099] 如本领域公知的,抗体是一种免疫球蛋白分子,其能够通过位于免疫球蛋白分子

可变区的至少一个表位识别位点与靶点如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等特异性结合。如本申请所使用的,该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,还包括其片段(如dAb、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其合成变体、天然产生的变体、包括与特异性所需的抗原结合片段结合抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、以及包括抗原结合位点和特异性所需片段(表位识别位点)的免疫球蛋白分子的任意其他修饰构型。“双体”,通过基因融合构建的多价或多特异性片段(W094/13804;P.Holliger等., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 6444-6448,1993)也是本申请中抗体的特殊形式。包含连接至CH3结构域的scFv的微抗体也包括在本申请中(S.Hu等,Cancer Res.,56,3055-3061,1996)。参见,例如Ward,E.S.等,Nature 341,544-546(1989);Bird等.,Science,242,423-426,1988;Huston等,PNAS USA,85,5879-5883,1988;PCT/US92/09965;W094/13804;P.Holliger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 6444-6448,1993;Y.Reiter等,Nature Biotech,14,1239-1245,1996;S.Hu等,Cancer Res.,56,3055-3061,1996)。

[0100] 如本申请所使用的,术语“抗原结合片段”指多肽片段,其含有免疫球蛋白重链和/或轻链的至少一个CDR,所述免疫球蛋白与感兴趣的抗原特别是CD40结合。在这一点上,本申请所述抗体的抗原结合片段可以含有本申请所示与CD40结合抗体VH和VL序列的1、2、3、4、5、或全部6个CDR。本申请所述的CD40-特异性抗体的抗原结合片段能够与CD40结合。在一些实施方式中,抗原结合片段或包括抗原结合片段的抗体阻止或抑制CD40L与CD40结合。在一些实施方式中,抗原结合片段与人CD40特异性结合,和/或增强或调节人CD40的生物学活性。这些生物学活性包括,但不限于,细胞信号、树突状细胞的激活。

[0101] 术语“抗原”指能够与选择性结合剂(如抗体)结合的分子或分子的一部分,并且还能够将其用于动物来生产能够与该抗原表位结合的抗体。抗原可以具有一个或多个表位。

[0102] 术语“表位”包括任意决定簇,优选多肽决定簇,其能够与免疫球蛋白或T-细胞受体特异性结合。表位是与抗体结合的抗原区域。在一些实施方式中,表位决定簇包括分子的化学活性表面簇,如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,以及可能在一些实施方式中具有特异性的三维结构特性,和/或特异性的电荷特性。在一些实施方式中,当抗体在蛋白和/或大分子的复杂混合物中优选识别其靶抗原时,将抗体称为与抗原特异性结合。当平衡解离常数 $\leq 10^{-7}$ 或 10^{-8} M时,将抗体称为与抗原特异性结合。在某些实施方式中,平衡解离常数可以是 $\leq 10^{-9}$ M或 $\leq 10^{-10}$ M。

[0103] 在一些实施方式中,本申请所述的抗体及其抗原结合片段包括重链和轻链CDR集合,其分别嵌入重链和轻链框架区(FR)集合之间,框架区对CDR提供支持并决定CDR彼此之间的空间关系。如本申请所使用的,术语“CDR集合”指重链或轻链V区的三个高变区。从重链或轻链的N-末端开始,将这些区域分别表示为“CDR1”、“CDR2”、“和”CDR3”。因此,抗原结合位点包括六个CDR,其包括位于各重链和轻链V区的CDR。在本申请中将包括单一CDR(例如,CDR1、CDR2或CDR3)的多肽称为“分子识别单位”。对若干抗原-抗体复合物的结晶学分析证明,CDR的氨基酸残基与结合的抗原广泛接触,其中最广泛的抗原接触是与重链CDR3的接触。因此,分子识别单位主要负责抗原结合位点的特异性。

[0104] 如本申请所使用的,术语“FR集合”指四个翼侧氨基酸序列,其构成重链或轻链V区的CDR集合中CDR的框架。某些FR残基可以与结合的抗原接触;但是,FR主要负责将V区折叠成抗原结合位点,特别是那些与CDR直接相邻的FR残基。在FR内,一些氨基残基和一些结构

特征是高度保守的。在这一点上,所有V区序列均含有约90个氨基酸残基的内部二硫键环。当V区折叠成结合位点时,CDR展示出为突出的环基序,其形成抗原结合表位。普遍认为,FR的保守结构区将CDR环的折叠形状引导成某些“规范”的结构——不管CDR具有何种精确的氨基酸序列。而且,已知一些FR残基参与非共价的结构域内接触,从而稳定抗体重链和轻链的相互作用。

[0105] 可以通过参考Kabat,E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest.4th Edition.US Department of Health and Human Services.1987以及即时从网上(immuno.bme.nwu.edu)获得的更新版本确定免疫球蛋白可变结构域的结构和位置。

[0106] “单克隆抗体”指同质性的抗体群,其中单克隆抗体包括与表位选择性结合有关的氨基酸(天然存在的或非天然存在的)。单克隆抗体具有较高的特异性,其直接针对单一表位。术语“单克隆抗体”不仅包括完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体,还包括其片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其变体、包括抗原结合部分的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体、以及包括具有所需特异性和与表位结合能力的抗原结合片段(表位识别位点)的免疫球蛋白分子的任意其他修饰构型。本申请并非旨在对抗体的来源或其制备方法(例如,杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等等)进行限定。本术语包括上文在“抗体”的定义下所述的完整免疫球蛋白及其片段等。

[0107] 木瓜蛋白酶优选地裂解IgG分子以产生若干片段,其中(F(ab)片段)的两个均包含含有完整的抗原结合位点的共价异源二聚体。胃蛋白酶能够裂解IgG分子,以提供若干片段,其包括包含两个抗原结合位点的F(ab')₂片段。根据本发明的一些实施方式,可以优选通过蛋白裂解IgM,以及在少数情况下通过裂解IgG或IgA免疫球蛋白分子生产供使用的Fv片段。但是,更通常地使用本领域公知的重组技术制备Fv片段。Fv片段包括非共价的V_H:V_L异源二聚体,其包含抗原识别位点,这些抗原识别位点保留了天然抗体分子的大部分抗原识别和结合能力。Inbar等,(1972)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69:2659-2662;Hochman等,(1976)Biochem 15:2706-2710;和Ehrlich等,(1980)Biochem19:4091-4096。

[0108] 在一些实施方式中,涉及单链Fv或scFv抗体。例如,κ体(Ill等,Prot.Eng.10:949-57(1997));微抗体(Martin等,EMBO J 13:5305-9(1994));双体(Holliger等,PNAS 90:6444-8(1993));或Janusin抗体(Traunecker等,EMBO J 10:3655-59(1991)和Traunecker等,Int.J. Cancer Suppl.7:51-52(1992)),其可以在本申请关于选择具有所需特异性的抗体的教导下采用标准分子生物学技术制备。在又一个实施方式中,可以制备包括本申请所述配体的双特异性或嵌合抗体。例如,嵌合抗体可以包括来自不同抗体的CDR和框架区,而双特异性抗体可以通过一个结合结构域与CD40特异性结合,并通过另一个结合结构域与第二个分子结合。可以通过重组分子生物学技术制备这些抗体,或者可以将这些抗体物理偶联在一起。

[0109] 单链Fv(sFv)多肽是共价连接的V_H:V_L异源二聚体,其由融合基因表达,融合基因包括V_H-和V_L-编码基因,通过编码肽的连接子连接。Huston等,(1988)Proc.Nat.Acad.Sci.USA 85(16):5879-5883。已有多种方法描述了化学结构的识别方法,用于从抗体V区将天然聚集的(但化学分离的)轻链和重链多肽链转化成sFv分子,使其折叠成基本上与抗原结合位点的结构类似的三维结构。参见,例如美国专利号5,091,513和5,132,405,Huston等;和美国专利号4,946,778,Ladner等。

[0110] 在一些实施方式中,本申请所述的CD40结合抗体是双体形式。双体是多肽的多聚体,各多肽均包括包含免疫球蛋白轻链结合区的第一结构域和包含免疫球蛋白重链结合区的第二结构域,这两个结构域是连接的(例如,通过肽接头),但彼此间不能结合以形成抗原结合位点:通过使多聚体内的一个多肽的第一结构域与多聚体内的另一个多肽的第二结构域相结合以形成抗原结合位点(W094/13804)。

[0111] 抗体的dAb片段由VH结构域组成(Ward,E.S.等,Nature 341,544-546(1989))。

[0112] 当使用双特异性抗体时,可以是常规的双特异性抗体,其能够通过多种方法制备(Holliger,P.and Winter G.Current Opinion Biotechnol.4,446-449(1993)),例如,化学制备或来自杂交瘤,或可以是上文提及的任意双特异性抗体片段。双体和scFv的构建可以不用Fc区、而仅仅使用可变结构域,这样可以有助于降低抗独特型反应的效应。

[0113] 相对于双特异性完整抗体而言,双特异性双体还可能特别有用,因为其易于在大肠杆菌中构建和表达。使用噬菌体展示(W094/13804)能够容易地将具有适宜的结合特异性的双体(和多种其他的多肽如抗体片段)从文库中筛选出来。如果双体的一个臂保持恒定,例如,其对抗原X具有特异性,则可以制备另一臂变化的文库,并选择具有适宜特异性的抗体。可以通过凹凸匹配(knobs-into-holes)技术制备双特异性完整抗体(J.B.B.Ridgeway等,Protein Eng.,9,616-621,1996)。

[0114] 在一些实施方式中,本申请所述的抗体可以是UniBody®形式。UniBody®是除去铰链区的IgG4抗体(参见GenMab Utrecht,The Netherlands;亦可参见,例如US20090226421)。该专利抗体技术能够制备出稳定的、更小的抗体形式,其与目前的小抗体形式相比具有更长的治疗窗。认为IgG4抗体是惰性的,因而其不与免疫系统发生相互作用。可以通过除去抗体的铰链区对完整的人IgG4抗体进行修饰,以获得与相应的完整IgG4(GenMab,Utrecht)相比具有明显稳定性性质的半-分子片段。将IgG4分子一分为二仅在UniBody®上留下一个可以与同源抗原(例如,疾病靶点)结合的区域,因此UniBody®仅与靶细胞上的一个位点单价结合。对于某些癌细胞表面抗原而言,该单价结合可能不会刺激癌细胞生长,而在使用具有相同抗原特异性的二价抗体时可能出现这种情况,因此,UniBody®技术可能为常规抗体难以治疗的某些类型的癌症提供了治疗选择。当治疗某些类型的癌症时,UniBody®的小尺寸可能非常有益,其使得分子在更大的实体瘤上具有更好的分布,并且可能增加疗效。

[0115] 在一些实施方式中,本申请的抗体可以是纳米抗体形式。纳米抗体由单基因编码,其可以在几乎所有的原核和真核宿主中有效生产,例如大肠杆菌(参见,例如美国专利号6,765,087)、霉菌(例如曲霉属真菌(*Aspergillus*)或木霉属真菌(*Trichoderma*))和酵母(例如酵母菌属(*Saccharomyces*)、克鲁维酵母属(*Kluyvermyces*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)或毕赤酵母属(*Pichia*))(参见,例如美国专利号6,838,254)。生产工艺是可扩展的,已生产出几千克量级的纳米抗体。可以将纳米抗体制成具有较长有效期的即用型溶液。用于生产针对所需靶点的纳米抗体的纳米克隆方法是一种专利方法(参见,例如WO 06/079372),其基于B-细胞的自动化高通量筛选。

[0116] 在一些实施方式中,本申请所述的抗-CD40抗体或其抗原结合片段是人源化的。其指一般采用重组技术制备的嵌合分子,具有衍生自非人种属的免疫球蛋白的抗原结合位点,并且该分子的其余免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点

可以包括融合至恒定结构域的完整的可变结构域,或者仅是移植至可变结构域适宜框架区的CDR。表位结合位点可以是野生型的,或通过一个或多个氨基酸替换修饰。其消除了恒定区对在个体中的免疫原性,但是仍保留针对外源性可变区产生免疫应答的可能性(LoBuglio,A.F.等,(1989)Proc Natl Acad Sci USA 86:4220-4224;Queen等,PNAS(1988)86:10029-10033;Riechmann等,Nature(1988)332:323-327)。将本申请公开的抗-CD40抗体人源化的示例性方法包括美国专利号7,462,697中所描述的方法。根据本发明的一些实施方式的示例性人源化抗体包括SEQ ID NOs:9和10中的人源化序列。

[0117] 另一种方法不仅着重于提供来自于人的恒定区,还着重于修饰可变区,以便对其进行改造使其尽可能的接近于人的形式。已知重链和轻链可变区均含有三个互补决定区(CDR),其对关注的表位的应答有所不同,并决定结合能力。CDR侧接有四个框架区(FR),其在给定的种属中相对保守,并且推测其为CDR提供支架。当针对特定表位制备非人抗体时,可以通过将来自非人抗体的CDR移植到待修饰的人抗体的FR,从而对可变区进行“整形”或“人源化”。Sato,K.等,(1993)Cancer Res 53:851-856已报道了该方法在制备不同抗体中的应用。Riechmann,L.等,(1988)Nature 332:323-327;Verhoeyen,M.等,(1988)Science 239:1534-1536;Kettleborough,C.A.等,(1991)Protein Engineering4:773-3783;Maeda,H.等,(1991)Human Antibodies Hybridoma 2:124-134;Gorman,S.D.等,(1991)Proc Natl Acad Sci USA 88:4181-4185;Tempest,P.R.等,(1991)Bio/Technology9:266-271;Co,M.S.等,(1991)Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873;Carter,P.等,(1992)Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-4289;和Co,M.S.等,(1992)J Immunol 148:1149-1154。在某些实施方式中,人源化的抗体保留了所有的CDR序列(例如,人源化的小鼠抗体,其含有来自小鼠抗体的全部六个CDR)。在其他实施方式中,人源化抗体含有一个或多个(一个、两个、三个、四个、五个、六个)CDR与原始抗体相比进行过改造,也将其称为“衍生自”原始抗体一个或多个CDR的一个或多个CDR。

[0118] 在一些实施方式中,本申请的抗体可以是嵌合抗体。在这一点上,嵌合抗体包含抗-CD40抗体的抗原结合片段,其可操作地连接至或融合至不同抗体的异源性Fc部分。在一些实施方式中,异源性Fc结构域是人源的。在其他实施方式中,异源性Fc结构域可以来自母体抗体的不同Ig类型,包括IgA(包括IgA1和IgA2亚类)、IgD、IgE、IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3、和IgG4亚类)、和IgM。在进一步的实施方式中,异源性的Fc结构域可以包括来自一个或多个不同Ig类的CH2和CH3结构域。如上文所述的人源化的抗体,嵌合抗体的抗-CD40抗原结合片段可以仅包含本申请所述抗体的一个或多个CDR(例如,本申请所述抗体的1个、2个、3个、4个、5个、或6个CDR),或可以包括完整的可变结构域(VL、VH或二者)。

[0119] 在一些实施方式中,CD40结合抗体包括本申请所述抗体的一个或多个CDR。在这一点上,在某些例子中已显示,可以仅转移抗体的VHCDR3,同时仍保留所需的特异性结合(Barbas等,PNAS(1995)92:2529-2533)。还可参见,McLane等,PNAS(1995)92:5214-5218,Barbas等,J. Am.Chem.Soc.(1994)116:2161-2162。

[0120] Marks等(Bio/Technology,1992,10:779-783)描述了抗体可变结构域的储库的生产方法,其中将位于或邻近可变结构域区域5'末端的通用引物与人VH基因第三框架区的通用引物联合使用,以提供缺乏CDR3的VH可变结构域的储库。Marks等进一步描述了该储库是如何与特定抗体的CDR3组合的。使用类似技术,可以利用缺乏CDR3的VH或VL结构域的储库

与本申请所述抗体的CDR3衍生的序列重新排列,并将重新排列的完整的VH或VL结构域与同源的VL或VH结构域组合,以提供与CD40结合的抗体或其抗原结合片段。然后可以将储库在适宜的宿主系统中展示,如W092/01047中的噬菌体展示系统,这样可以选择出适宜的抗体或其抗原结合片段。储库可以由至少约 10^4 个成员以及若干数量级以上组成,例如,约从 10^6 至 10^8 或 10^{10} 或更多成员。Stemmer也公开了类似的重新排列或组合技术(Nature,1994,370:389-391),其描述了该技术与 β -内酰胺酶基因之间的关系,但观察到该方法可以用于产生抗体。

[0121] 亦或通过将一個或多个选定的VH和/或VL基因随机突变以使整个可变结构域内产生突变的方法产生新的VH或VL区,这些VH或VL区携带本发明实施方式中描述的一个或多个CDR衍生的序列。Gram等对此技术进行了描述(1992,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,89:3576-3580),其使用了易错配PCR。还可以使用另一种方法将VH或VL基因的CDR区直接诱变。Barbas等(1994,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,91:3809-3813)和Schier等(1996,J.Mol.Biol.263:551-567)公开了此技术。

[0122] 在一些实施方式中,可以使用本申请所述抗体的特定VH和/或VL筛选互补可变结构域文库,以鉴定具有所需性质的抗体,如对CD40亲和性增加的抗体。此类方法已在例如Portolano等,J.Immunol.(1993)150:880-887;Clarkson等,Nature(1991)352:624-628中进行了描述。

[0123] 还可以使用其他方法混合和匹配CDR,以鉴定具有所需结合活性的抗体,如与CD40结合的抗体。例如:Klimka等,British Journal of Cancer(2000)83:252-260,其描述的筛选方法使用小鼠VL和人VH文库,但CDR3和FR4仍然来自小鼠VH。获得抗体后,针对人VL文库对VH进行筛选以获得结合抗原的抗体。Beiboer等,J.Mol.Biol.(2000)296:833-849描述了使用完整小鼠重链和人轻链文库的筛选方法。获得抗体后,将一个VL与保留了小鼠CDR3的人VH文库组合。获得了能够与抗原结合的抗体。Rader等,PNAS(1998)95:8910-8915描述了一种与上述Beiboer等类似的方法。

[0124] 这些刚刚所述的技术均是本领域公知的。但是,本领域技术人员将能够使用此类技术,根据本申请所述的本发明的若干实施方式,通过本领域的常规方法获得抗体或其抗原结合片段。

[0125] 本申请还公开了一种获得对CD40抗原具有特异性的抗体抗原结合结构域的方法,该方法包括通过在本申请所示的VH结构域的氨基酸序列中增加、删除、替换或插入一个或多个氨基酸,形成VH结构域的氨基酸序列变体,任选地将由此得到的VH结构域与一个或多个VL结构域组合,并检测VH结构域或VH/VL的组合以识别特定的结合成员,或对CD40具有特异性的抗体抗原结合结构域,且任选地还具有一个或多个所需的性质。VL结构域可以具有基本上如本申请所列出的氨基酸序列。可以使用类似方法将本申请所公开的VL结构域的一个或多个序列变体与一个或多个VH结构域组合。

[0126] 与抗体或多肽“特异性结合”或“优先结合”(在本申请中可以互换使用)的表位是本领域公知的术语,并且确定此类特异性或优先结合的方法也是本领域公知的。如果与其他细胞或底物相比,所述分子与特定细胞或底物反应或结合时的频率更高、速度更快、持续时间更长和/或亲和性更高,则认为显示出“特异性结合”或“优先结合”。如果与同其他底物结合相比,抗体结合的亲和性、亲合力更高、更容易,和/或持续时间更长,则认为抗体“特异

性结合”或“优先结合”至靶点。例如,特异性或优先结合至CD40表位的抗体是指,与结合至其他CD40表位或非-CD40表位相比,与一个CD40表位结合的亲和性、亲合力更高、更容易,和/或持续时间更长的抗体。通过阅读该定义还可以理解,例如,与第一个靶点特异性或优先结合的抗体(或部分或表位)可以与或不与第二个靶点特异性或优先结合。正因如此,“特异性结合”或“优先结合”不是必然要求排他结合(虽然可以将其包括在内)。通常,但非必然地,提到结合时是指优先结合。

[0127] 免疫结合通常是指免疫球蛋白分子与对免疫球蛋白具有特异性的抗原之间发生非共价类型的相互作用,例如用于解释而非限制,其为静电、离子、亲水和/或疏水性吸引或排斥、空间力、氢键、范德华力、以及其他相互作用。可以用相互作用的解离常数(K_d)来表述免疫结合相互作用的力、或亲和性,其中 K_d 越小表示亲和性越高。可以使用本领域公知的方法对选定多肽的免疫结合性质进行定量。一个此类方法涉及测定抗原-结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中该速率依赖于复合物各部分的浓度、相互作用的亲和性、以及同样影响两个方向速率的几何参数。因此,可以通过计算浓度以及聚合和解离的实际速率确定“开速率常数”(K_{on})和“关速率常数”(K_{off})。 K_{off}/K_{on} 的比率能够删去与亲和性无关的所有参数,这样其相当于解离常数 K_d 。参见,一般地,Davies等,(1990)Annual Rev.Biochem.59:439-473。

[0128] 在一些实施方式中,本申请所述的抗-CD40抗体具有的亲和性为约100、150、155、160、170、175、180、185、190、191、192、193、194、195、196、197、198或199皮摩,以及在某些实施方式中,抗体对CD40可能具有甚至更高的亲和性。

[0129] 术语“免疫活性”,当用在具有或“保留免疫活性”的表位中时,指在不同条件下抗体(例如,抗-CD40抗体)与表位结合的能力,例如表位经还原或变性条件处理后。

[0130] 根据本申请的某些优选实施方式,抗体或其抗原结合片段可以是与本申请所述的任意抗体竞争结合的CD40,其(i)与抗原特异性结合,并且(ii)包含本申请所公开的VH和/或VL结构域,或包含本申请所公开的VH CDR3、或任意这些的变体。可以容易地在体外对抗体间的竞争进行检测,例如使用ELISA和/或在一个抗体上标记特异性的报告分子,其能够在存在其他非标记抗体时被检测到,以使得能够识别与相同表位或重叠表位结合的特异性抗体。因此,本申请提供了一种特异性抗体或其抗原结合片段,包括人抗体的抗原结合位点,其与本申请所述的抗体竞争结合CD40。

[0131] 在这一点上,如本申请所使用的,术语“与……竞争”、“抑制结合”和“阻止结合”(例如,指抑制/或阻断CD40L与CD40结合,或指抑制/阻断抗-CD40抗体与CD40结合)在本申请中可以互换使用,包括部分和完全抑制/阻断。抑制和阻断还旨在包括当与本申请所公开的抗-CD40抗体接触时,与配体不接触抗-CD40抗体相比,任意可检测的CD40L与CD40结合的降低,例如阻止CD40L与CD40结合至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%。

[0132] 与可变区相比,免疫球蛋白恒定区的序列多样性较低,其负责与多种天然蛋白结合以激发重要的生化事件。在人类中,有五种不同类型的抗体,包括IgA(包括IgA1和IgA2亚类)、IgD、IgE、IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3、和IgG4亚类)、和IgM。这些抗体类型之间的区别特征为其恒定区,尽管其V区可能存在细微差别。

[0133] 抗体的Fc区与多数Fc受体和配体之间发生相互作用,以传递一系列重要的功能性

能力,称为效应器功能。对于IgG而言,Fc区包括Ig结构域CH2和CH3,且N-末端铰链与CH2连接。针对IgG类型的Fc受体的重要家族为Fc γ 受体(Fc γ Rs)。这些受体介导抗体与免疫系统细胞臂之间的联系(Raghavan等,1996,Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220;Ravetch等,2001,Annu Rev Immunol 19:275-290)。在人类中,该蛋白家族包括Fc γ RI(CD64),其包括亚型Fc γ RIa、Fc γ RIb、和Fc γ RIc;Fc γ RII(CD32),其包括亚型Fc γ RIIa(包括同种异型H131和R131)、Fc γ RIIb(包括Fc γ RIIb-1和Fc γ RIIb-2)、和Fc γ RIIc;以及Fc γ RIII(CD16),包括亚型Fc γ RIIIa(包括同种异型V158和F158)和Fc γ RIIIb(包括同种异型Fc γ RIIIb-NA1和Fc γ RIIIb-NA2)(Jefferis等,2002,Immunol Lett 82:57-65)。典型地,这些受体具有介导结合至Fc的细胞外结构域、跨膜区、和可能介导某些细胞内信号事件的细胞内结构域。这些受体在多种免疫细胞中表达,包括单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、血小板、B细胞、大颗粒淋巴细胞、朗格罕氏细胞、自然杀伤(NK)细胞、和T细胞。Fc/Fc γ R复合物的形成将这些效应器细胞募集至结合抗原的位点,典型地导致细胞内的信号事件以及重要的随后免疫应答,如炎症介质释放、B细胞活化、胞吞作用、吞噬作用、和细胞毒攻击。

[0134] 介导细胞毒性和吞噬性效应器功能的能力是抗体破坏靶细胞的潜在机制。表达Fc γ R的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体,并且随后导致靶细胞裂解,这种细胞介导的反应被称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)(Raghavan等,1996,Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220;Ghetie等,2000,Annu Rev Immunol 18:739-766;Ravetch等,2001,Annu Rev Immunol 19:275-290)。表达Fc γ R的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体,并且随后导致靶细胞吞噬,这种细胞介导的反应被称为抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)。所有的Fc γ R结合Fc上的相同区域,在C γ 2(CH2)结构域和前面铰链的N-末端。该相互作用在结构上已被很好地鉴定(Sondermann等,2001,J Mol Biol 309:737-749),并且结合至人Fc γ RIIIb细胞外结构域的人Fc的若干结构已被解析(pdb登记代码1E4K)(Sondermann等,2000,Nature406:267-273.)(pdb登记代码1IIS和1IIX)(Radaev等,2001,J Biol Chem 276:16469-16477.)

[0135] 不同的IgG亚类对Fc γ R具有不同的亲和性,典型地IgG1和IgG3与受体的结合基本上优于IgG2和IgG4(Jefferis等,2002,Immunol Lett 82:57-65)。所有的Fc γ R与IgG Fc上的相同区域结合,但是其亲和性不同:高亲和性结合子Fc γ RI与IgG1的K_d为10⁻⁸M⁻¹,而低亲和性受体Fc γ RII和Fc γ RIII通常分别在10⁻⁶和10⁻⁵结合。Fc γ RIIIa和Fc γ RIIIb的细胞外结构域具有96%的同一性,而Fc γ RIIIb不具有细胞内信号结构域。而且,Fc γ RI、Fc γ RIIIa/c和Fc γ RIIIa反而是免疫复合物触发活化的正向调节子,其特征为具有细胞内结构域,其具有免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM),Fc γ RIIb具有免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM),因而其是抑制的。因此,将前者称为激活受体,将Fc γ RIIb称为抑制受体。受体在不同免疫细胞中的表达类型和水平也不同。还有另一层面的复杂性,即在人蛋白质组中存在多种Fc γ R的多态性。具有临床意义的特别相关的多态性为V158/F158Fc γ RIIIa。与F158同种异型相比,人IgG1与V158同种异型的结合亲和性更高。已表明,在亲和性上的这种差异,以及可能地其对ADCC和/或ADCP的影响,是抗-CD20抗体利妥昔单抗(Rituxan®, IDEC Pharmaceuticals Corporation的注册商标)效能的显著的决定因素。具有V158同种异型的患者对利妥昔单抗治疗的应答有利;然而,具有低亲和性F158同种异型的患者的应答较差

(Cartron等,2002,Blood 99:754-758)。约有10-20%的人是V158/V158纯合的,45%是V158/F158杂合的,以及35-45%的人是F158/F158纯合的(Lehrnbecher等,1999,Blood 94:4220-4232;Cartron等,2002,Blood 99:754-758)。因此,80-90%的人是较差的应答者,其具有至少一个F158 Fc γ RIIIa等位基因。

[0136] Fc区也与补体级联的活化相关。在经典的补体途径中,C1与其C1q亚基结合至IgG或IgM的Fc片段,其与抗原形成复合物。在本发明的一些实施方式中,对Fc区的修饰作用包括改变(增强或减弱)本申请所述的CD40-特异性抗体的能力以活化补体系统的修饰作用(参见,例如美国专利7,740,847)。为评估补体的活化,可以进行补体依赖性细胞毒性(CDC)检测(参见,例如Gazzano-Santoro等,J.Immunol.Methods,202:163(1996))。

[0137] 因此,在一些实施方式中,本发明提供了一种具有修饰的Fc区的抗-CD40抗体,其具有改变的功能性质,如CDC、ADCC、或ADCP活性减弱或增强,或对特定的Fc γ R的结合亲和性增强或血清半衰期增加。本申请中涉及的其他修饰的Fc区已在下述文献中描述,例如已授权的美国专利7,317,091;7,657,380;7,662,925;6,538,124;6,528,624;7,297,775;7,364,731;公开的美国专利申请US2009092599;US20080131435;US20080138344;和公开的国际申请W02006/105338;W02004/063351;W02006/088494;W02007/024249。

[0138] 因此,在一些实施方式中,将具有所需结合特异性的抗体可变结构域融合至免疫球蛋白恒定结构域序列。在一些实施方式中,与Ig重链恒定结构域融合,包括至少部分铰链、 C_H2 、和 C_H3 区。优选在至少一个融合中存在含有轻链结合必须位点的第一重链恒定区(C_H1)。在单独的表达载体中插入编码免疫球蛋白重链融合的DNA,以及如有需要的话,免疫球蛋白轻链,并共转染至适宜的宿主细胞。这样能够更灵活地调整三种多肽片段的各自比例,在某些实施方式中,需要在构建中使用比例不相等的三种多肽链以便为所需的双特异性抗体提供理想的收率。然而,当相等比例的至少两种多肽链表达的收率较高,或者当比例对所需链组合的收率不具有显著影响时,将两种或全部三种多肽链的编码序列插入一个表达载体也是有可能的。

[0139] 还可以对本发明的抗体(及其抗原结合片段和变体)进行修饰以包括表位标签或标记,例如,用于纯化或诊断应用。本领域公知有多种用于制备抗体偶联物的连接基团,包括例如美国专利号5,208,020或EP专利0 425 235 B1,以及Chari等,Cancer Research52:127-131(1992)中公开的那些。连接基团包括二硫键基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽酶不稳定基团、或酯酶不稳定基团,如上述的专利所公开的,优选二硫键和硫醚基团。

[0140] 在另一个实施方式中,本申请所述的CD40-特异性抗体可以偶联,或可操作地连接至另一个治疗化合物,在本申请中称为偶联物。偶联物可以是细胞毒剂、化疗剂、细胞因子、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、毒素、放射性同位素、或其他治疗活性剂。化疗剂、细胞因子、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、和上文所述的其他治疗剂、以及所有这些前述的治疗剂均可以用作抗体偶联剂。

[0141] 在一个替代实施方式中,抗体偶联或可操作地连接至毒素,包括但不限于细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素和酶活性毒素,包括其片段和/或变体。小分子毒素包括但不限于皂素(Kuroda K等,The Prostate 70:1286-1294(2010);Lip,WL等,2007Molecular Pharmaceutics 4:241-251;Quadros EV等,2010 Mol Cancer Ther;9

(11);3033-40;Polito L等,2009 British Journal of Haematology,147,710-718)、刺孢霉素、美登素(美国专利号5,208,020)、单端孢霉烯、和CC1065。毒素包括但不限于RNase、白树毒素、烯二炔、蓖麻毒素、相思豆毒素、白喉毒素、霍乱毒素、白树毒素、假单胞菌外毒素(PE40)、志贺杆菌毒素、产气荚膜梭状芽胞杆菌毒素、和商陆抗病毒蛋白。

[0142] 在一个实施方式中,本申请的抗体及其抗原结合片段偶联至一种或多种美登素分子。美登素是通过抑制微管蛋白聚合发挥作用的有丝分裂抑制剂。美登素首次从东非灌木齿叶美登木中分离得到(美国专利号3,896,111)。随后,发现某些微生物也产生美登素,如美登醇和C-3美登醇酯(美国专利号4,151,042)。合成的美登醇及其衍生物和类似物已在如下文献中公开:例如美国专利号4,137,230;4,248,870;4,256,746;4,260,608;4,265,814;4,294,757;4,307,016;4,308,268;4,308,269;4,309,428;4,313,946;4,315,929;4,317,821;4,322,348;4,331,598;4,361,650;4,364,866;4,424,219;4,450,254;4,362,663;和4,371,533。包含美登素的免疫偶联物及其治疗用途已在例如美国专利号5,208,020,5,416,064和欧洲专利EP 0 425 235 B1中公开。Liu等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:8618-8623(1996)中描述了免疫偶联物,其包含命名为DM1的美登素,DM1连接至针对人结直肠癌的单克隆抗体C242。已发现该偶联物对培养的结肠癌细胞具有较高的细胞毒性,且在体内肿瘤生长检测中显示出抗肿瘤活性。

[0143] 通过将抗体与美登素分子化学连接制备抗体-美登素偶联物,抗体或美登素分子的生物学活性均未出现显著降低。每个抗体分子偶联平均3-4个美登素分子显示出有效增加靶分子的细胞毒性,且不会对抗体的功能或溶解度带来负面影响,尽管与使用裸抗体相比,预计即使是一分子的毒素/抗体也将会增强细胞毒性。美登素是本领域公知的,其可以通过已知技术合成或从天然来源分离。适宜的美登素已在例如美国专利号5,208,020和上文所述的其他专利和非专利出版物中公开。优选的美登素是美登醇以及在美登醇分子的芳香环或其他位置修饰的美登醇类似物,如不同的美登醇酯。

[0144] 感兴趣的另一种偶联物包括偶联至一个或多个卡里奇霉素分子的抗体。卡里奇霉素家族的抗生素在皮摩尔以下的浓度下就能够使双链DNA断裂。也可以使用卡里奇霉素的结构类似物(Hinman等,1993,Cancer Research 53:3336-3342;Lode等,1998,Cancer Research 58:2925-2928)(美国专利号5,714,586;美国专利号5,712,374;美国专利号5,264,586;美国专利号5,773,001)。尾海兔素10类似物,如奥里斯他汀E(auristatin E(AE))和单甲基奥里斯他汀E(MMAE),可以用作本申请公开的抗体或其变体的偶联物(Doronina等,2003,Nat Biotechnol 21(7):778-84;Francisco等,2003 Blood102(4):1458-65)。有用的酶活性毒素包括但不限于白喉A链、白喉毒素无结合活性的片段、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、蒴藋素A链、 α -帚曲霉素、油桐蛋白、香石竹毒蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII、和PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草抑制剂、白树毒素、有丝分裂毒素(mitogellin)、局限曲霉素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯族化合物。参见例如PCT WO 93/21232。本申请进一步涉及这样的实施方式,在这些实施方式中,本申请所述的CD40-特异性抗体与具有核溶解活性的化合物,例如核糖核酸酶或DNA核酸内切酶如脱氧核糖核酸酶(DNase),之间形成偶联或融合。

[0145] 在一个替代实施方式中,本申请公开的抗体可以偶联或可操作地连接至放射性同位素以形成放射性偶联物。可以利用多种具有放射活性的同位素生产放射性偶联物抗体。

例子包括但不限于 ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、和 ^{212}Bi 。

[0146] 在某些其他实施方式中,本申请所述的抗体可以偶联至治疗性基团,如细胞毒素(例如,细胞抑制剂或杀细胞剂)、治疗剂或放射性元素(例如, α -发射体、 γ -发射体等)。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害的任意试剂。例子包括紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、和嘌呤霉素及其类似物或同源物。有个优选的示例性细胞毒素为皂草素(来自Advanced Targeting Systems, San Diego, CA)。治疗剂包括但不限于,抗代谢药(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷化剂(例如,氮芥、噻替派、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C、和顺二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类(例如,柔红霉素(曾用名道诺霉素)和阿霉素)、抗生素(例如,放线菌素(曾用名更生霉素)、博来霉素、光神霉素、和氨基葡萄糖(AMC))、和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春花碱)。

[0147] 此外,在一些实施方式中,CD40-特异性抗体(如本申请所述包括其功能片段,如抗原结合片段)可以偶联至治疗性基团,如放射性材料或大环螯合剂用于偶联放射金属离子。在一些实施方式中,大环螯合剂是1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA),可以通过接头分子将其连接至抗体。此类接头分子是本领域公知的,且在Denardo等,1998, Clin Cancer Res.4:2483-90; Peterson等,1999, Bioconjug. Chem.10:553; 和 Zimmerman等,1999, Nucl. Med. Biol.26:943-50中进行了描述。

[0148] 在又一个实施方式中,可以将抗体偶联至“受体”(如链霉素亲和素)用于在肿瘤中预定位,其中将抗体-受体偶联物给予患者,随后使用清除剂将未结合的偶联物从循环中除去,然后再给予“配体”(例如亲和素),其偶联至细胞毒剂(例如,放射性核苷酸)。在一个替代实施方式中,抗体偶联或可操作地连接至酶,以引入抗体依赖性酶介导的前药治疗(ADEPT)。可以通过将抗体偶联或可操作地连接至前药活化酶来使用ADEPT,前药活化酶可以将前药(例如,肽酰化疗剂,参见PCT WO 81/01145)转化为活性抗癌药物。参见,例如PCT WO 88/07378和美国专利号4,975,278。用于ADEPT的免疫偶联物的酶成分包括能够以使其转化为活性更高的细胞毒形式的方式作用于前药的任意酶。用于这些方法和相关实施方式的酶包括但不限于,用于将含有磷酸盐的前药转化为游离药物的碱性磷酸酶;用于将含有硫酸盐的前药转化为游离药物的芳基硫酸酯酶;用于将无毒性的5-氟胞嘧啶转化为抗癌药5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;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),其用于将含有肽的前药转化为游离药物;D-丙氨酰羧肽酶,其用于转化含有D-氨基酸取代的前药;碳水化合物裂解酶,如半乳糖苷酶和胞嘧啶脱氨酶,其用于将糖基化的前药转化为游离药物; β -内酰胺酶,其用于将 β -内酰胺衍生化的药物转化为游离药物;以及青霉素酰胺酶,如青霉素V酰胺酶或青霉素G酰胺酶,其分别用于将胺基上的氮被苯氧乙酰基或苯乙酰基基团衍生化的药物转化为游离药物。或者,可以使用具有酶活性的抗体,在本领域亦称为“抗体酶”,将前药转化为游离的活性药物(参见,例如Massey, 1987, Nature 328:457-458)。可以制备用于将抗体酶递送至肿瘤细胞群的抗体-抗体酶偶联物。

[0149] 可以使用多种双功能蛋白偶联剂制备免疫偶联物,如N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸(SPDP)、琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺)环己烷-1-羧酸、亚胺基四氢噻吩(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如二甲基二亚酰胺盐酸盐)、活性酯(如二琥珀酰亚胺辛二酸)、醛(如戊二醛)、双-叠氮基化合物(如双(p-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(如双-(p-二重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)、以及双-活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。特定的偶联剂包括N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸(SPDP)(Carlsson等,Biochem.J.173:723-737[1978])和N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶硫代)戊酸(SPP)以提供二硫键。接头可以是易于释放一个或多个可裂解组分的“可裂解的接头”。例如,可以使用酸不稳定接头(Cancer Research 52:127-131(1992);美国专利号5,208,020)。

[0150] 本申请还涉及本发明抗体(和多肽)的其他修饰。例如,抗体可以连接至多种非蛋白性聚合物之一,例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙烯、或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。还可以通过例如凝聚技术或通过界面聚合(例如,分别为羟甲基纤维素或明胶微囊和聚-(甲基甲基丙烯酸酯)微囊)将抗体包埋于微囊、胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米粒子和纳米胶囊)、或粗乳。此类技术已在Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Oslo,A.,Ed.,(1980)中公开。

[0151] 本申请所使用的“载剂”包括药学上可接受的载剂、赋形剂、或稳定剂,其在所使用的剂量和浓度下,对暴露于其中的细胞或哺乳动物无毒性。通常生理学上可接受的载剂是水性pH缓冲溶液。生理学上可接受载剂的例子包括缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐、和其他有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸;低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白,如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖、和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露醇或山梨醇;成盐的抗衡离子,如钠;和/或非离子表面活性剂,如聚山梨醇酯20(吐温™)、聚乙二醇(PEG)、和泊洛沙姆(PLURONICS™)等。

[0152] 如本发明中其他地方所提到的,本公开的抗体诱导肿瘤细胞中的CD40信号,激活树突状细胞和免疫监视,激活针对肿瘤细胞的抗体依赖的细胞毒性(ADCC),阻断CD40与CD40L结合;具有CD40激发活性;激活抗原呈递细胞;刺激抗原呈递细胞中释放细胞因子;诱导肿瘤细胞凋亡;抑制肿瘤细胞增殖;通过诱导效应器功能杀死肿瘤细胞,效应器功能包括,但不限于,ADCC,CDC和ADCP;刺激抗肿瘤T细胞反应;减少已形成的肿瘤;并抑制利妥昔单抗耐药性肿瘤。本发明所述的抗体可以具有或诱导上述特性或活性中任意一种或多种的组合。可以采用多种本领域技术人员公知的方法评估抗-CD40抗体所需的功能性性质,如亲和性/结合检测(例如,表面等离子体共振,竞争性抑制检测);细胞毒性检测、细胞活力检测、细胞增殖或分化检测,ADCC和CDC检测,由CD40细胞信号事件引起的其他细胞活性(例如,STAT3磷酸化,细胞因子的产生,细胞因子包括:IL-1,IL-6,IL-8,IL-10,IL-12,TNF- α ,和MIP1a),以及使用体外或体内模型的癌细胞和/或肿瘤生长抑制。通过其他检测可以测定本申请所述的抗体阻断正常CD40L与CD40结合或CD40-介导的反应的能力,CD40-介导的反应如细胞信号,细胞激活(例如,免疫细胞激活,增殖;抗原呈递细胞激活(例如,树突状细胞,B细胞,巨噬细胞)和成熟检测),免疫反应(包括细胞介导的和体液反应),等。还可以检测本申请所述的抗体对CD40内化的作用,体外和体内效能等。可以采用本领域技术人员公

知的已建立的方案(参见,例如Current Protocols in Molecular Biology(Greene Publ.Assoc.Inc.&John Wiley&Sons,Inc.,NY,NY);Current Protocols in Immunology (Edited by:John E.Coligan,Ada M.Kruisbeek,David H.Margulies,Ethan M.Shevach,Warren Strober 2001John Wiley&Sons,NY,NY)或商品化的试剂盒进行此类检测。

[0153] 在一些实施方式中,本发明进一步包括分离的核酸,其编码本申请所述的抗体或其抗原结合片段,例如编码本申请所述的CDR或VH或VL结构域的核酸。核酸包括DNA和RNA。如本申请所述的这些和相关实施方式可以包括多核苷酸,其编码与CD40结合的抗体。如本申请所使用的,术语“分离的多核苷酸”指基因组、cDNA、或合成来源的多核苷酸或其组合,凭借其来源分离的多核苷酸(1)与在自然界中发现的分离的多核苷酸中的全部或部分多核苷酸无关,(2)连接至在自然界中并不与之连接的多核苷酸,或(3)在自然界中并未作为更长序列的一部分存在。

[0154] 术语“可操作地连接”指应用该术语的组分所处的关系,即允许其在适宜条件下实施其固有功能。例如,转录控制序列“可操作地连接”至蛋白编码序列,这样在与控制序列的转录活性兼容的条件下实现蛋白编码序列的表达。

[0155] 如本申请所使用的,术语“控制序列”指能够影响与之连接或可操作地连接的编码序列表达、加工或细胞内定位的多核苷酸序列。这样的控制序列的性质可能取决于宿主生物体。在特定实施方式中,原核生物的转录控制序列可以包括启动子、核糖体结合位点、和转录终止序列。在其他特定实施方式中,真核生物的转录控制序列可以包括包含一个或多个转录因子识别位点的启动子、转录增强子序列、转录终止序列和多聚腺苷酸化序列。在一些实施方式中,“控制序列”可以包括前导序列和/或融合伴侣序列。

[0156] 如本申请所使用的,术语“多核苷酸”指单链或双链核酸聚合物。在一些实施方式中,包含多核苷酸的核苷酸可以是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸或者这两种核苷酸类型之一的修饰形式。所述修饰包括碱基修饰如溴尿核苷,核糖修饰如阿糖胞苷和2',3'-二脱氧核糖以及核苷酸间键修饰如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、缩苯胺硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、缩苯胺磷酸酯(phosphoraniladate)和氨基磷酸酯。术语“多核苷酸”特别地包括单链和双链形式的DNA。

[0157] 术语“天然存在的核苷酸”包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸。术语“修饰的核苷酸”包括糖基等被修饰或取代的核苷酸。术语“寡核苷酸键”包括例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、缩苯胺硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、缩苯胺磷酸酯(phosphoraniladate)、氨基磷酸酯等寡核苷酸键。参见,例如LaPlanche等,1986,Nucl.Acids Res.,14:9081;Stec等,1984,J.Am.Chem.Soc.,106:6077;Stein等,1988,Nucl.Acids Res.,16:3209;Zon等,1991,Anti-Cancer Drug Design,6:539;Zon等,1991,OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES:A PRACTICAL APPROACH,pp.87-108(F.Eckstein,Ed.),Oxford University Press,Oxford England;Stec等,美国专利号5,151,510;Uhlmann and Peyman,1990,Chemical Reviews,90:543,出于任何目的公开的内容在此通过引用并入。寡核苷酸可以包括能够检测寡核苷酸或其杂交的可检测标记。

[0158] 使用的术语“载体”指用于将编码信息转移至宿主细胞的任意分子(例如,核酸、质

粒、或病毒)。术语“表达载体”指适宜宿主细胞的转化并且含有指引和/或控制插入异源核酸序列表达的核酸序列的载体。表达包括但不限于,方法如转录、翻译、和RNA剪接,如果存在内含子。

[0159] 本领域技术人员应当理解,多核苷酸可以包括表达或可能适于表达蛋白、多肽、肽等的基因组序列、额外的基因组和质粒编码序列以及较小的设计基因片段。此类片段可以是天然分离的,或由本领域技术人员合成修饰的。

[0160] 本领域技术人员还知晓,多核苷酸可以是单链(编码或反义)或双链的,并可以是DNA(基因组、cDNA或合成的)或RNA分子。RNA分子可以包括HnRNA分子,其含有内含子且以一对对应的方式对应于DNA分子,以及不含内含子的mRNA分子。本申请的多核苷酸中可以含有,但不是必须含有,附加的编码或非编码序列,以及多核苷酸可以,但不是必须,连接至其他分子和/或支持材料。多核苷酸可以包括天然序列,或可以包括编码此类序列的变体或衍生物的序列。

[0161] 因此,根据这些和相关的实施方式,本申请还提供了编码本申请所述的抗-CD40抗体的多核苷酸。在一些实施方式中,所提供的多核苷酸包括编码本申请所述的抗体和此类多核苷酸补体的某些或全部多核苷酸序列。

[0162] 在其他相关实施方式中,多核苷酸变体可能与编码本申请所述的抗-CD40抗体的多核苷酸序列基本上具有同一性。例如,使用本申请所述的方法(例如,使用标准参数的BLAST分析,如下文所述),与参比多核苷酸序列如编码本申请所述抗体的序列相比,多核苷酸可以是包含至少70%序列同一性,优选至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、或99%或更高的序列同一性的多核苷酸。本领域技术人员将认识到,考虑到密码子的简并性、氨基酸的相似性、阅读框架位置等,可以对这些值进行适当调整,以确定由两个核苷酸序列编码的蛋白相应的同一性。

[0163] 通常,多核苷酸变体将含有一个或多个替换、添加、删除和/或插入,优选地变体多核苷酸编码的抗体的结合亲和性基本上不低于本申请所示的特定多核苷酸序列编码的抗体。

[0164] 在一些其他相关实施方式中,多核苷酸片段可以包含或基本上由不同长度连续的序列组成,所述序列与本申请所述的编码抗体的序列相同或互补。例如,所提供的多核苷酸包含或基本上由至少约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、200、300、400、500或1000个或更多连续的核苷酸序列组成,所述序列编码本申请所公开的抗体或其抗原结合片段以及其间的所有中间长度。容易理解,“中间长度”在本申请中指所述值之间的任意长度,如50、51、52、53等;100、101、102、103等;150、151、152、153等;包括200-500、500-1,000等之间的所有整数。可以在一个或两个末端通过加入天然序列中不存在的核苷酸对本申请所述的核苷酸序列延长。该附加序列可能由编码本申请所述抗体的多核苷酸一个末端或编码本申请所述抗体多核苷酸两个末端的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个核苷酸组成。

[0165] 在另一个实施方式中,所提供的多核苷酸序列能够在中度至高度严格条件下与本申请提供的编码抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列、或其片段、或其互补序列杂交。杂交技术是分子生物学领域所公知的。出于说明的目的,用于检测本申请所提供的多核苷酸

与其他多核苷酸杂交的适宜中度严格条件包括,在5X SSC、0.5% SDS、1.0mMEDTA(pH 8.0)溶液中预洗;在50℃-60℃、5X SSC杂交过夜;随后使用含0.1% SDS的2X、0.5X和0.2X SSC,在65℃下洗涤两次,每次20分钟。本领域技术人员将理解,杂交的严格性可以很容易地操作,如通过改变杂交溶液的盐含量和/或杂交进行的温度。例如,在另一个实施方式中,适宜的高度严格杂交条件包括上文所描述的那些条件,但是杂交温度增至例如60℃-65℃或65℃-70℃。

[0166] 在一些实施方式中,上文所描述的多核苷酸,例如多核苷酸变体、片段和杂交序列,编码结合CD40的抗体或其抗原结合片段。在其他实施方式中,此类多核苷酸编码抗体或其抗原结合片段,或其CDR,其与CD40的结合能力与本申请所示特定的抗体序列至少约50%、至少约70%,和在一些实施方式中,至少约90%相同。在进一步的实施方式中,此类多核苷酸编码的抗体或其抗原结合片段或其CDR结合至CD40的亲合性高于本申请所示的抗体,例如其结合力在数量上是本申请所示特定的抗体序列的至少约105%、106%、107%、108%、109%、或110%。

[0167] 如本申请其他地方描述的,可以通过常规方法,例如用选定的天然或非天然氨基酸替换、添加、删除或插入一种或多种氨基酸,制得示例多肽(例如,如本申请所提供的变体CD40-特异性抗体,如具有本申请所提供的抗原结合片段的抗体蛋白),其三维结构可以通过计算机模拟进行测定,以确定这样衍生的结构变体保留了在此公开的种类的空间填充性质。本领域技术人员公知有多种计算机程序,可用于确定在抗体内适宜的氨基酸取代(或编码氨基酸序列的适宜多核苷酸),从而例如维持亲和性或获得更好的亲和性。

[0168] 本申请所描述的多核苷酸,或其片段,无论其编码序列自身的长度如何,均可以与其他DNA序列组合,如启动子、多腺苷酸化信号、附加限制性酶位点、多克隆位点、其他编码片段等等,这样其全长可能有很大变化。因此,预计可以采用几乎任意长度的核酸片段,优选将其总长度限制在易于在计划的重组DNA方案中制备和使用。例如,预计使用的示例性多核苷酸片段的总长度为约10,000、约5000、约3000、约2,000、约1,000、约500、约200、约100、约50个碱基对等(包括所有中间长度)。

[0169] 当对多核苷酸序列进行比较时,当两个序列按下文所述进行比对以达到最大对应时,如果核苷酸序列相同,则将两个序列称为是“同一的”。一般通过比较窗口内比较序列,以识别和比较序列的局部区域的相似性,从而进行两个序列之间的比较。如本申请所使用,“比较窗口”指至少约20个连续位置的片段,通常为30至约75、40至约50,在这个片段中,在两个序列优化比对后,将一个序列与具有相同数量连续位置的参比序列进行比较。

[0170] 可以使用Lasergene生物信息学软件套装(DNASTAR, Inc., Madison, WI)中的Megalign程序,采用默认参数进行用于比较的序列优化比对。该程序体现了下述参考文献中描述的几个比对方案:Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins -Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J., Unified Approach to Alignment and Phylogenesis, pp. 626-645 (1990); Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. 和 Sharp, P.M., CABIOS 5:151-153 (1989); Myers, E.W. 和 Muller W., CABIOS 4:11-17 (1988); Robinson, E.D., Comb. Theor

11:105(1971);Santou,N.Nes,M.,Mol.Biol.Evol.4:406-425(1987);Sneath,P.H.A.和 Sokal,R.R.,Numerical Taxonomy-the Principles and Practice of Numerical Taxonomy,Freeman Press,San Francisco,CA(1973);Wilbur,W.J.and Lipman,D.J., Proc.Natl.Acad.,Sci.USA 80:726-730(1983)。

[0171] 或者,可以通过Smith and Waterman,Add.APL.Math 2:482(1981)的局部同一性算法、通过Needleman and Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同一性比对算法、通过 Pearson and Lipman,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444(1988)的相似性方法探索、通过这些算法(威斯康辛遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、和TFASTA,Genetics Computer Group(GCG),575 Science Dr.,Madison,WI)的计算机执行、或通过检视进行用于比较的序列优化比对。

[0172] 适于确定序列同一性和序列相似性百分率的算法的一个优选的例子为BLAST和 BLAST 2.0算法,已分别在Altschul等,Nucl.Acids Res.25:3389-3402(1977),和Altschul 等,J.Mol.Biol.215:403-410(1990)中对其进行了描述。BLAST和BLAST 2.0可以使用例如本申请所描述的参数,以确定两个或多个多核苷酸之间的序列同一性百分率。美国国家生物技术信息中心公开提供了用于进行BLAST分析的软件。在一个说明性的例子中,可以使用参数M(匹配残基对的奖励分数;始终>0)和N(错配残基的罚分;始终<0)计算核苷酸序列的累积得分。在下列情况下停止在各方向上对字码采样的延伸:累积比对得分从其达到的最大值下降数量X;由于一个或多个负分残基比对的累积,使累积得分达到零或以下;或到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)使用的缺省值为:字长(W)11,和期望(E)10,以及BLOSUM62评分矩阵(参见 Henikoff and Henikoff,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915(1989))算法(B)50,期望(E) 10,M=5,N=-4和对两条链进行比较。

[0173] 在一些实施方式中,通过在至少20个位置的比较窗内对两个优化比对的序列进行比较,以确定“序列同一性百分率”,其中为达到两个序列的优化比对,多核苷酸序列在比较窗中的部分与参比序列(不包含添加或删除)相比,可以包括20%或以下的添加或删除(即,间隙),通常5至15%,或10至12%。所述百分率如下计算,确定在两个序列中均出现相同核酸的位置数,得到匹配的位置数,将匹配位置数除以在参比序列中的总位置数(即,窗尺寸),并将得到的结果乘以100,从而得到序列同一性百分率。

[0174] 本领域的普通技术人员将理解,由于遗传密码简并性,有多个编码本申请所述抗体的核苷酸序列。这些多核苷酸中的某些与编码结合CD40的抗体的天然或原始多核苷酸序列具有最小的序列同一性。尽管如此,因使用不同密码子导致的多核苷酸改变是本公开可以明确预期的。在一些实施方式中,特别关注了已经过密码子优化的用于哺乳动物表达的序列。

[0175] 因此,在本发明的另一个实施方式中,可以使用诱变方法如位点特异性诱变制备本申请所述抗体的变体和/或衍生物。通过该方法,可以通过对编码其的多核苷酸诱变,以制备在多肽序列中的特异性修饰。这些技术提供了制备和检测序列变体的直接方法,例如通过多核苷酸中引入一个或多个核苷酸序列的改变,从而引入一个或多个前述考虑因素。

[0176] 位点特异性诱变通过使用编码所需突变的DNA序列的特异性寡核苷酸序列,以及

足够数量的邻近核苷酸,以提供具有足够大小和序列复杂性的引物序列,以便越过被删除的接点在其两侧形成稳定双螺旋,从而产生突变体。可以在选定的多核苷酸序列中引入突变,以使多核苷酸本身改善、改变、减少、修饰或改变其性质,和/或改变编码的多肽的性质、活性、组分、稳定性、或主要序列。

[0177] 在一些实施方式中,发明人关注了编码本申请公开的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸序列的诱变,以改变所编码的多肽的一种或多种性质,如抗体或其抗原结合片段的结合亲和性,或特定Fc区的功能,或针对特定Fc γ R的Fc区的亲和性。位点特异性诱变技术是本领域公知的,已广泛用于产生多肽和多核苷酸的变体。例如,位点特异性诱变经常用于改变DNA分子的特定部分。在此类实施方式中,一般使用含有约14至约25个核苷酸或其左右的长度的引物,在被改变序列的接点处的两侧具有约5至约10个残基。

[0178] 本领域技术人员将理解,位点特异性诱变技术经常采用以单链和双链形式存在的噬菌体载体。在位点定向诱变中使用的典型载体包括如M13噬菌体的载体。这些噬菌体易于购买获得,并且其使用是本领域技术人员所公知的。双链噬菌体也常规地用于位点定向诱变,其减少了将感兴趣的基因从质粒转移至噬菌体的步骤。

[0179] 在通常情况下,按照本申请进行的位点定向诱变通过首先获得单链载体或两条链熔化分开的双链载体进行,所述载体的序列包括编码所需肽的DNA序列。一般通过合成制备产生具有所需突变序列的寡核苷酸引物。然后用单链载体对该引物进行退火,并加入DNA聚合酶如大肠杆菌聚合酶I Klenow片段,以完成突变链的合成。因此,形成异源双链,其中一条链编码原始非突变的序列,另一条链带有所需突变。然后使用该异源双链载体转化适宜细胞,如大肠杆菌细胞,并选择包括携带突变序列排布的重载体的克隆。

[0180] 使用位点定向突变制备选定肽编码DNA片段的序列变体提供了一种生产可能有用的种类的方法,但并不意味着限制,因为还有其它方法可以获得肽序列变体和编码其的DNA序列。例如,可以使用诱变剂,如羟胺,处理编码所需肽序列的重组载体以获得序列变体。关于这些方法和方案的具体细节参见Maloy等,1994;Segal,1976;Prokop and Bajpai,1991;Kuby,1994;以及Maniatis等,1982的教导,其均通过引用并入本申请,用于该目的。

[0181] 如本申请所使用的,术语“寡核苷酸定向诱变操作”指模板依赖性过程和载体介导的繁殖,其导致特定核酸分子的浓度相对于其初始浓度增加,或可检测信号的浓度增加,如扩增。如本申请所使用的,术语“寡核苷酸定向诱变操作”是用来指涉及引物分子的模板依赖性延伸的过程。术语模板依赖性过程指RNA或DNA分子的核酸合成,其中新合成核酸链的序列是由公知的碱基互补配对规则决定的(参见,例如Watson,1987)。通常,载体介导的方法涉及将核酸片段引入DNA或RNA载体、载体的克隆扩增、和扩增核酸片段的恢复。这种方法例子参见美国专利号4,237,224,其全部内容通过引用特别地并入本申请。

[0182] 在用于生产多肽变体的另一种方法中,可以采用如美国专利号5,837,458中所描述的递归序列重组。在该方法中,进行重组和筛选或选择的迭代循环,以“进化”出例如结合亲和性增加的个体多核苷酸变体。一些实施方式还以质粒、载体、转录或表达盒的形式提供了构建体,其包括至少一个如本申请所述的多核苷酸。

[0183] 在多个实施方式中,将编码对象单克隆抗体的核酸直接引入宿主细胞,并在足以诱导编码抗体表达的条件下孵育所述细胞。结合本申请所提供的多肽和核酸序列,使用本领域技术人员公知的标准技术制备本申请的抗体。可以使用多肽序列确定编码所公开的特

定抗体的适宜核酸序列。根据本领域技术人员公知的方法,可以对核酸序列进行优化以反映针对不同表达系统的特定密码子“偏好”。

[0184] 根据一些相关的实施方式,提供了一种重组的宿主细胞,其包括一种或多种本申请所描述的构建体;一种核酸,其编码任意抗体、CDR、VH或VL结构域,或其抗原结合片段;以及编码产物的生产方法,该方法包括从编码的核酸表达。通过在适宜条件下培养含有核酸的重组宿主细胞方便地实现表达。通过表达生产后,可以采用任意适宜的技术分离和/或纯化抗体或其抗原结合片段,然后根据需要使用。

[0185] 如本申请提供的抗体或其抗原结合片段,以及编码核酸分子和载体,可以是基本上纯净或均质的形式,例如从其自然环境中被分离和/或纯化,或者就核酸而言,不含或基本不含除编码具有所需功能多肽的序列以外来源的核酸或基因。核酸可以包括DNA或RNA,并且可以是全部或部分合成的。除非上下文另有要求,否则本申请所示的核苷酸序列包括具有特定序列的DNA分子,并且包括具有特定序列的RNA分子,所述特定序列中U被替换为T。

[0186] 在多种不同的宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是公知的。适宜的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、酵母和杆状病毒系统。本领域用于表达异源性多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、NSO小鼠黑色素瘤细胞和多种其他细胞。通常优选的细菌宿主是大肠杆菌。

[0187] 抗体和抗原结合片段在原核细胞如大肠杆菌中的表达已在本领域中成功建立。综述参见,例如Pluckthun, A. *Bio/Technology* 9:545-551(1991)。本领域技术人员也可以利用在培养的真核细胞中的表达作为生产抗体或其抗原结合片段的选择,参见最新综述,例如Ref, M. E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4:573-576; Trill J. J. 等, (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6:553-560。

[0188] 可以选择或构建含有适当调节序列的适宜载体,包括启动子序列、终止子序列、多聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记物基因和其他适当的序列。载体可以是质粒、病毒例如噬菌体、或嗜菌粒,视情况而定。有关进一步的详细情况,参见例如Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook等, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press。针对核酸的操作有多种已知的技术和方法,例如核酸构建体的制备、诱变、测序、将DNA引入细胞和基因的表达、以及蛋白分析,其在Current Protocols in Molecular Biology, 第二版, Ausubel等编著, John Wiley & Sons, 1992, 或随后的更新版中对其进行了详细的描述。

[0189] 术语“宿主细胞”用于指被引入,或能够引入编码本申请所述的一种或多种抗体的核酸序列的细胞,并且其进一步表达或能够表达感兴趣的选定基因,如编码任意本申请所述抗体的基因。该术语包括亲代细胞的子代,无论其在形态学或遗传组成上是否与亲代相同,只要存在选定基因即可。因此,还涉及一种包括将此类核酸引入宿主细胞的方法。该引入可以使用任何可用的技术。对于真核细胞而言,适宜的技术可以包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染以及使用逆转录病毒或其他病毒的转导,例如牛痘,对于昆虫细胞,使用杆状病毒。对于细菌细胞而言,适宜的技术包括氯化钙转染、电穿孔和使用细菌噬菌体的转染。例如通过在使基因表达的条件下培养宿主细胞,在引入之后引起或允许核酸的表达。在一个实施方式中,将核酸整合至宿主细胞的基因组(例如,染色体)。按照标准技术,通过包含促进与基因组重组的序列可以促进整合。

[0190] 在一些实施方式中,本发明还提供了一种方法,其包括在表达系统中使用上文所述的构建体以表达特定多肽,如本申请所描述的CD40-特异性抗体。术语“转导”用于指将基因从一个细菌中传递至另一个,通常使用噬菌体。“转导”也指通过逆转录病毒获得和转移真核细胞序列。术语“转染”用于指细胞携带外来的或外源性DNA,当外源性DNA被引入细胞膜内时,细胞被“转染”。多种转染技术均是本领域所公知的,并且在本申请中公开。参见例如,Graham等,1973,Virology 52:456;Sambrook等,2001,MOLECULAR CLONING,A LABORATORY MANUAL,Cold Spring Harbor Laboratories;Davis等,1986,BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Elsevier;和Chu等,1981,Gene13:197。可以使用此类技术将一种或多种外源性的DNA部分引入适宜的宿主细胞。

[0191] 如本申请所使用的,术语“转化”指细胞遗传特性的改变,当其被修饰以含有新的DNA时细胞被转化。例如,当从其天然状态被遗传修饰后,细胞被转化。转染或转导后,转化DNA可以通过物理地整合至细胞的染色体与细胞重组,或者可以作为不复制的附加体元件瞬时保持,或者可以作为质粒独立地复制。当DNA随着细胞的分裂而复制时,则认为细胞已被稳定转化。当术语“天然存在的”或“天然的”与生物学材料如核酸分子、多肽、宿主细胞等联用时,指在自然界中发现且未经过人为处理的材料。类似地,如本申请所使用的“非天然存在的”或“非天然的”指在自然界中不存在或已被人为地进行结构修饰或合成的材料。

[0192] 术语“多肽”、“蛋白”、“肽”和“糖蛋白”可以互换使用,指并不限定任何特定长度的氨基酸的聚合物。该术语并未排除修饰,如十四烷基化、硫酸化、糖基化、磷酸化和信号序列的添加或删除。术语“多肽”或“蛋白”指一条或多条氨基酸链,其中每条链均包含通过肽键共价连接的氨基酸,并且其中所述多肽或蛋白可以包括非共价和/或通过肽键共价连接在一起的多条链,具有天然蛋白的序列,即蛋白是通过天然存在的且特别是非重组的细胞生产的,或通过遗传工程化或重组的细胞生产的序列,并且包括具有天然蛋白氨基酸序列的分子,或者天然序列的一个或多个氨基酸被删除、添加和/或替换的分子。术语“多肽”和“蛋白”特别地包括本申请的与CD40结合的抗体,或抗CD40抗体的一个或多个氨基酸被删除、添加、和/或替换的序列。因此,“多肽”或“蛋白”可以包括一条(称为“单体”)或多条(称为“多聚体”)氨基酸链。

[0193] 术语“分离的蛋白”在本申请中指对象蛋白(1)不含至少某些在自然界中常见的其他蛋白,(2)基本不含其他来自相同来源的蛋白,例如来自相同物种,(3)被来自不同物种的细胞表达,(4)已从至少约50%的多核苷酸、脂质、碳水化合物、或在自然界与其相关的其他材料中分离,(5)与同“分离的蛋白”在自然界相关联的蛋白的部分不相关联(通过共价或非共价相关作用),(6)与在自然界同其不相关联的多肽可操作地相关联(通过共价或非共价相关作用),或者(7)在自然界中不存在。此类分离的蛋白可以由基因组DNA、cDNA、mRNA或其他RNA编码,可以是合成来源的,或其任意组合。在一些实施方式中,分离的蛋白基本上不含存在于自然环境中干扰其使用(治疗、诊断、预防、研究或其他用途)的蛋白或多肽或其他污染物。

[0194] 术语“多肽片段”指多肽,可以是单体或多聚体,其具有天然存在的或重组生产的多肽的氨基末端删除、羧基末端删除、和/或内部删除或替换。在一些实施方式中,多肽片段可以包括至少5至约500个氨基酸长度的氨基酸链。将理解在一些实施方式中,片段为至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、

32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400、或450个氨基酸长度。特别有用的多肽片段包括功能性结构域,包括抗体的抗原结合结构域或片段。在抗-CD40抗体中,有用的片段包括,但不限于:CDR区,特别是重链或轻链的CDR3区;重链或轻链的可变区;抗体链的一部分或仅仅是其包括两个CDR的可变区;等等。

[0195] 多肽可以包含位于蛋白N-末端的信号(或前导)序列,其为共翻译或翻译后蛋白的转移定向。包括信号肽的本发明所提供的任何多肽氨基酸序列,同样也考虑可用于本发明所述的没有这样的信号或前导肽的任意用途。本领域技术人员将可知道,所述信号肽通常在加工过程中被切除,并且不包含于有活性的抗体蛋白中。多肽还可以融合于框架或与接头或其他序列偶联,以使多肽(例如,聚-His)易于合成、纯化或鉴定,或者增强多肽与固体支持物的结合。

[0196] 如有必要,还可以引入肽接头/间隔区序列以通过足够的距离分隔多种多肽组分,以确保将各多肽折叠成其二级和/或三级结构。使用本领域公知的标准技术,可以将此类肽接头序列整合至融合多肽。

[0197] 可以基于例如下述标准选择一些肽间隔区序列:(1)其能够采用柔性伸展构象;(2)其不能采用能够与第一和第二多肽上的功能性表位相互作用的二级结构;和/或(3)缺乏可能与多肽功能性表位反应的疏水性或带电荷的残基。

[0198] 在一个说明性实施方式中,肽间隔区序列含有例如Gly、Asn和Ser残基。也可以将其其他近似的中性氨基酸如Thr和Ala包括在间隔区序列中。

[0199] 可以将可能有用的其他氨基酸序列引入作为间隔区,包括那些在Maratea等, Gene 40:39-46(1985);Murphy等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262(1986);美国专利号4,935,233和美国专利号4,751,180中描述的氨基酸序列。

[0200] 其他示例性的间隔区可以包括,例如Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp(Chaudhary等,1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070)和Lys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp(Bird等,1988, Science 242:423-426)。

[0201] 在某些实施方式中,当第一和第二多肽具有能够用于分隔功能性结构域和阻止立体干扰的非必需的N-末端氨基酸区域时,不需要间隔区序列。可以将两个编码序列直接融合,不需要任何间隔区,或通过使用例如由五聚体Gly-Gly-Gly-Gly-Ser重复1至3次组成的柔性聚合接头。通过将此类间隔区插入VH和VL之间构建单链抗体(scFv)(Bird等,1988, Science 242:423-426;Huston等,1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5979-5883)。

[0202] 在一些实施方式中,设计肽间隔区以便能够在形成单链抗体可变区的两个 β 片层之间发生正确的相互作用。

[0203] 在一些示例性的实施方式中,肽间隔区在1至5个氨基酸之间、在5至10个氨基酸之间、在5至25个氨基酸之间、在5至50个氨基酸之间、在10至25个氨基酸之间、在10至50个氨基酸之间、在10至100个氨基酸之间,或者氨基酸的任意插入范围。

[0204] 在其他示例性的实施方式中,肽间隔区的长度包括约1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50或更多个氨基酸。

[0205] 涉及本申请所描述抗体的氨基酸序列的修饰。例如,其可能是改善抗体的结合亲

和性和/或其他生物学性质所需的。例如,可以通过将适宜的核苷酸改变引入编码抗体、或其链的多核苷酸,或通过肽合成制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括,例如在抗体的氨基酸序列内删除、和/或插入和/或替换残基。在最终的抗体中可以引入删除、插入、和替换的任意组合,只要最终的构建体具有所需特性(例如,与CD40的高结合亲和性)。氨基酸改变还可以改变抗体的翻译后过程,如改变糖基化位点的数量或位置。上文所描述的针对本发明多肽的任意变体和修饰均可以包括在本发明的抗体中。

[0206] 本申请提供了本申请的抗体的变体。在一些实施方式中,此类变体抗体或抗原结合片段,或其CDR结合至CD40至少约50%、至少约70%,以及在一些实施方式中,至少约90%以及与本申请所示特定的抗体序列相同。在进一步的实施方式中,此类抗体变体或其抗原结合片段,或其CDR,与本申请所示的抗体相比,其以更高的亲和性结合至CD40,例如在数量上结合至少约105%、106%、107%、108%、109%、或110%以及与本申请所示特定的抗体序列相同。

[0207] 在特定实施方式中,对象抗体可以具有:a)重链可变区,其具有的氨基酸序列与本申请所描述的抗-CD40抗体的重链可变区具有至少80%的同一性、至少95%的同一性、至少90%、至少95%或者至少98%或99%的同一性;和b)轻链可变区,其具有的氨基酸序列与本申请所描述的抗-CD40抗体的轻链可变区具有至少80%的同一性、至少85%、至少90%、至少95%或者至少98%或99%的同一性。示例性重链和轻链区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1-56所示。

[0208] 在特定实施方式中,抗体可以包括:a)重链可变区,其包含:i.CDR1区,其与本申请所描述的选定抗体的重链CDR1区的氨基酸序列具有同一性;ii.CDR2区,其与选定抗体的重链CDR2区的氨基酸序列具有同一性;和iii.CDR3区,其与选定抗体的重链CDR3区的氨基酸序列具有同一性;以及b)轻链可变结构域,其包含:i.CDR1区,其与选定抗体的轻链CDR1区的氨基酸序列具有同一性;ii.CDR2区,其与选定抗体的轻链CDR2区的氨基酸序列具有同一性;和iii.CDR3区,其与选定抗体的轻链CDR3区的氨基酸序列具有同一性;其中抗体与选定靶点(例如,CD40)特异性结合。在进一步的实施方式中,抗体或其抗原结合片段是变体抗体,其中变体包含与选定抗体具有同一性的重链和轻链,除了在VH和VL区的CDR区有至多8、9、10、11、12、13、14、15个、或更多的氨基酸替换以外。在这一点上,在选定抗体的CDR区可能有1、2、3、4、5、6、7、8个,或者在一些实施方式中,有9、10、11、12、13、14、15个、或更多的氨基酸替换。替换可以在VH和/或VL区的CDR(参见例如Muller,1998,Structure 6:1153-1167)。

[0209] 可以通过常规方法,例如用选定的天然或非天然氨基酸替换、添加、删除或插入一种或多种氨基酸,制得示例多肽(例如,如本申请所提供的变体CD40-特异性抗体,如具有本申请所提供的抗原结合片段的抗体蛋白),其三维结构可以通过计算机模拟进行测定,以确定这样衍生的结构变体保留了在此公开的种类的空间填充性质。参见,例如Donate等,1994 Prot.Sci.3:2378;Bradley等,Science 309:1868-1871(2005);Schueler-Furman等,Science 310:638(2005);Dietz等,Proc.Nat.Acad.Sci.USA 103:1244(2006);Dodson等,Nature 450:176(2007);Qian等,Nature 450:259(2007);Raman等,Science327:1014-1018(2010)。可以用于这些和相关的实施方式的计算机算法的一些附加的非限制性例子,如针对本申请提供的CD40-特异性抗体及其抗原结合结构域的合理设计,包括VMD,这是一个使用3-D图形和内置脚本用于显示、动画和分析较大的分子生物系统的分子可视化程序(参见

Theoretical and Computational Biophysics Group的网站,University of Illinois at Urbana-Champaign,at ks.uiuc.edu/Research/vmd/)。多种其他计算机程序均是本领域技术人员公知的和可用的,其可以用于通过能量最小化构象的空间填充模型(范德华半径)确定原子的尺寸;GRID,其用于确定不同化学基团的高亲和性区域,以增强结合,Monte Carlo检索,用于数学比对,以及CHARMM(Brooks等,(1983)J.Comput.Chem.4:187-217)和AMBER(Weiner等,(1981)J.Comput.Chem.106:765),其评估力场计算结果和分析(亦参见,Eisenfield等,(1991)Am.J.Physiol.261:C376-386;Lybrand(1991)J.Pharm.Belg.46:49-54;Froimowitz(1990)Biotechniques 8:640-644;Burbam等,(1990)Proteins 7:99-111;Pedersen(1985)Environ.Health Perspect.61:185-190;和Kini等,(1991)J.Biomol.Struct.Dyn.9:475-488)。多种适宜的计算用计算机程序也可购买获得,如从Schrödinger(Munich,Germany)购买。

[0210] 在本发明的另一个实施方式中,抗-CD40抗体及其人源化形式是衍生自家兔单克隆抗体,并且特别地使用RabMAb®技术产生。这些抗体是有利的,因为其需要最小的序列修饰,以利于在使用突变谱系引导(MLG)人源化技术(参见,例如美国专利号7,462,697)进行人源化后保留功能性质。因此,用于制备本申请的抗-CD40抗体的示例性方法包括,例如在美国专利5,675,063和7,429,487中已描述的RabMab®家兔单克隆抗体技术。在这一点上,在一些实施方式中,本公开的抗-CD40抗体在家兔中生产。在特定实施方式中,将能够与家兔脾细胞融合的家兔来源的永生化B-淋巴细胞用于生产产生抗体的杂交细胞。永生化的B-淋巴细胞并不会可检测地表达内源性的免疫球蛋白重链,并且在某些实施方式中可能含有改变的免疫球蛋白重链编码基因。

[0211] 组合物和使用方法

[0212] 本申请提供了包含CD40-特异性抗体及其抗原结合片段的组合物,以及在多种治疗设置中给予此类组合物。

[0213] 以纯化形式或适宜的药物组合物形式给予本申请所述的CD40-特异性抗体可以通过类似用途试剂的任意可接受给药模式实现。药物组合物可以通过将抗体或含有抗体的组合物与适宜的生理学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂组合制备,可以被制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,如片剂、胶囊、粉剂、颗粒、软膏、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶、微球、和气雾剂。此外,其他药物活性成分(包括如本申请其他地方所描述的其他抗癌剂)和/或适宜的赋形剂如盐、缓冲剂和稳定剂可以,但并非必须,存在于组合物中。可以通过多种不同途径实现给药,包括口服、胃肠外、鼻内、静脉、皮内、皮下或局部。优选的给药方式取决于待治疗或预防状况的性质。给药后,将降低、抑制、阻止或延迟癌症的进展和/或转移的量认为是有效的。

[0214] 在一些实施方式中,给药量足以使肿瘤退缩,这可通过存活肿瘤数量统计学上显著减少来指示,例如,肿瘤质量至少减少50%,或通过扫描尺寸的改变(例如,统计学显著减少)。在其他实施方式中,给药量足以使医师已知的特定疾病适应证的症状在临床上相对减轻。

[0215] 精确的剂量和治疗持续时间是所治疗疾病的函数,可以根据经验使用本领域公知的检测方法确定,或通过在本领域已知的模型系统中测试组合物外推确定。也可以进行受控的临床试验。可以依据待缓解状况的严重程度改变剂量。通常将药物组合物制成制剂并

给药,以发挥有用的治疗效果,同时使不需要的副作用最小化。组合物可以一次给予,或者可以分成多个更小的剂量在时间间隔下给予。对于任何特定对象而言,可以根据个体的需要随时间调整特定给药方案。

[0216] 含有CD40-特异性抗体的组合物可以单独给药,或与其他已知的癌症疗法联合给药,如放疗、化疗、移植、免疫疗法、激素疗法、光动力学疗法等。组合物还可以与抗生素联合给药。

[0217] 因而,这些和相关的药物组合物的典型给药途径包括,但不限于,口服、局部、经皮、吸入、胃肠外、舌下、直肠、阴道、和鼻内。如本申请所使用的,术语胃肠外包括皮下注射、静脉、肌内、胸骨内注射或输注技术。根据本发明的一些实施方式,将药物组合物制成制剂,以使得将药物组合物给予患者后,其中含有的活性成分成为生物可利用的。将给予对象或患者的组合物可以是具有一种或多种剂量单位的形式,其中例如片剂可以是单一剂量单位,和本申请所描述的CD40-特异性抗体以气雾剂形式在其中的容器,其可以具有多个剂量单位。制备此类剂型的实际方法是已知的,或对于本领域技术人员而言是显而易见的;例如参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版(Philadelphia College of Pharmacy and Science,2000)。在任何情况下,待给予的组合物将含有本申请的治疗有效量的抗体,在本申请的教导下用于治疗感兴趣的疾病或状况。

[0218] 药物组合物可以是固体或液体形式。在一个实施方式中,载剂是颗粒,以使得组合物是,例如,片剂或粉剂形式。载剂可以是液体,组合物是例如口服油、可注射液体或气雾剂,其用于例如吸入给药。当用于口服给药时,药物组合物优选固体或液体形式,半固体、半液体、混悬剂和凝胶形式包括在本申请所述的固体或液体形式内。

[0219] 作为用于口服给药的固体组合物,可以将药物组合物制成粉剂、颗粒、压制片、丸剂、胶囊、口香糖、或薄片等。此类固体组合物将典型地含有一种或多种惰性稀释剂或可食用载剂。此外,可以存在下述中的一种或多种:粘合剂如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、西黄耆胶或明胶;赋形剂如淀粉、乳糖或糊精;崩解剂如海藻酸、海藻酸钠、羧甲基淀粉钠(Primogel)、玉米淀粉等;润滑剂如硬脂酸镁或氢化植物油(Sterotex);助流剂如胶体二氧化硅;甜味剂如蔗糖或糖精;调味剂如薄荷油、水杨酸甲酯或桔子调味剂;和着色剂。当药物组合物是胶囊形式时,例如明胶胶囊,除上述类型的材料以外,其还可能含有液体载剂,如聚乙烯乙二醇或油。

[0220] 药物组合物可以是液体形式,例如酏剂、糖浆、溶液、乳剂或混悬剂。作为两个例子,液体可以用于口服给药或用于通过注射递送。当用于口服给药时,除了本化合物以外,优选的组合物还含有一种或多种甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和增香剂。在用于注射给药的组合物中,可以包括一种或多种表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、混悬剂、缓冲剂、稳定剂和等张剂。

[0221] 液体药物组合物,无论其是溶液、混悬液或其他形式,其可以包括一种或多种下述辅剂:无菌稀释剂如注射用水、盐溶液,优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、不挥发性油如合成甘油单酯或二酯,其可以作为溶剂或混悬基质、聚乙烯乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂如苯甲醇或尼泊金甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲剂如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和调节张力的试剂,如氯化钠或右旋糖。可以将胃肠外制剂密封于由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量药瓶中。生理盐

水是优选的辅剂。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0222] 用于胃肠外或口服给药的液体药物组合物应含有一定量的本申请公开的CD40-特异性抗体,以获得适宜的剂量。通常,该剂量为组合物中至少0.01%的抗体。当用于口服给药时,该剂量可以在组合物重量的0.1至约70%之间变化。一些口服药物组合物含有约4%至约75%的抗体。在一些实施方式中,根据本发明制备药物组合物和制备物,使得在稀释前胃肠外剂量单位中含有以重量计0.01至10%的抗体。

[0223] 药物组合物可以用于局部给药,在这种情况下适宜的载剂可以包括溶液、乳剂、软膏或凝胶基质。基质,例如,可以包括下述中的一种或多种:凡士林油、羊毛脂、聚乙烯乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂,如水和醇、以及乳化剂和稳定剂。在用于局部给药的药物组合物中可以存在增稠剂。如果用于经皮给药,组合物可以包括经皮贴片或离子电渗疗法设备。药物组合物可以用于直肠给药,例如栓剂形式,其将在直肠内融化并释放药物。用于直肠给药的组合物可以含有油状基质作为适宜的非刺激性赋形剂。此类基质包括,但不限于,羊毛脂、可可豆脂和聚乙烯乙二醇。

[0224] 药物组合物可以包括多种材料,其修饰固体或液体剂量单位的物理形式。例如,组合物可以包括在活性成分外形成衣壳的材料。形成衣壳的材料一般是惰性的,可以选自,例如糖、虫胶、和其他肠溶性包衣剂。或者,可以将活性成分包装在明胶胶囊中。固体或液体形式的药物组合物可以包括与本发明抗体结合的试剂,从而辅助化合物的递送。可以发挥该作用的适宜试剂包括其他单克隆或多克隆抗体,一种或多种蛋白或脂质体。药物组合物可以基本上由能够作为气雾剂给予的剂量单元组成。术语气雾剂用于表示多种系统,其范围为具有胶体性质的系统至由加压包装组成的系统。可以通过液化或压缩气体或通过使活性成分分散的适宜的泵系统递送。气雾剂可以在单相、二相、或三相系统中递送,以递送活性成分。气雾剂的递送包括必须的容器、活性剂、阀、内部容器等,其在一起可以形成试剂盒。在不需要过度实验的情况下,本领域普通技术人员就可以确定优选的气雾剂。

[0225] 可以通过药物领域公知的方法制备药物组合物。例如,用于注射给药的药物组合物可以通过将包含本申请所述的CD40-特异性抗体的组合物与任选地一种或多种盐、缓冲剂和/或稳定剂组合,加入无菌蒸馏水以形成溶液。可以加入表面活性剂以便于形成均一的溶液或混悬液。表面活性剂是与抗体组合物发生非共价相互作用以便于抗体在水性递送系统中溶解或均匀混悬的化合物。

[0226] 可以以治疗有效量给予组合物,治疗有效量取决于多种因素,包括所使用的特定化合物(例如,CD40-特异性抗体)的活性;化合物的代谢稳定性和作用长度;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别、和饮食;给药方式和时间;排泄速率;药物合用;特定疾病或状况的严重程度;以及接受治疗的对象。一般情况下,每日治疗有效量(针对70kg的哺乳动物)为约0.001mg/kg(即,0.07mg)至约100mg/kg(即,7.0g);优选地治疗有效量(针对70kg的哺乳动物)为约0.01mg/kg(即,0.7mg)至约50mg/kg(即,3.5g);更优选地,治疗有效量(针对70kg的哺乳动物)为约1mg/kg(即,70mg)至约25mg/kg(即,1.75g)。

[0227] 包含本申请的CD40-特异性抗体的组合物还可以与一种或多种其他治疗剂同时、在其之前或之后给药。此类联合治疗可以包括给予单一药物剂型,其含有本发明的化合物和一种或多种附加活性剂,以及给予组合物,其包含本发明的抗体,并且各活性剂分别在其各自药物剂型中。例如,本申请所描述的抗体和另一种活性剂可以在单一口服剂型组合物

如片剂或胶囊中一并给予患者,或各试剂分别在单独的口服剂型中给予。类似地,本申请所描述的抗体和另一种活性剂可以在单一胃肠外剂型组合物如溶液或其他生理学可接受的溶液中一并给予患者,或各试剂分别在单独的胃肠外剂型中给予。当使用单独剂型时,包含抗体和一种或多种附加活性剂的组合物可以基本上同时给予,即同时地,或在单独的交错时间,即连续地和以任何顺序给予;将联合治疗理解为包括所有这些方案。

[0228] 因此,在一些实施方式中,还涉及将本公开的抗-CD40抗体组合物与一种或多种其他治疗剂联合给予。本领域可以接受此类治疗剂作为本申请所描述的特定疾病状态的标准治疗,如类风湿性关节炎、炎症或癌症。示例性的治疗剂包括细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DMARD、抗炎剂、化疗剂、放疗剂、或其他活性和辅助试剂。

[0229] 在一些实施方式中,本申请公开的抗-CD40抗体可以与任意量的放疗剂联合给予。放疗剂的例子包括:烷化剂,如噻替派和环磷酰胺(CYTOXAN™);烷基磺酸盐,如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,如苯多巴(benzodopa)、卡巴醌、偏尿多巴(meturedopa)、和尿多巴(uredopa);乙撑亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、曲他胺、三亚乙基膦酰胺、三亚乙基硫化膦酰胺和三羟甲基蜜胺;氮芥类,如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、乌拉莫司汀;亚硝基脲,如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素,如阿克拉霉素、放线菌素、蒽霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡里奇霉素、卡柔比星、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-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、紫菜霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢类,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,如氟达拉滨、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、脱氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU;雄激素,如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素剂,如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,如亚叶酸;醋葡萄糖内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;阿莫斯汀(bestrabucil);比生群;依达曲沙;地磷酰胺;地美可辛;地吡醌;艾弗咪辛(elformithine);依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;蘑菇多糖;氯尼达明;米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇;硝基可润;喷司他丁;苯来美特;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK.RTM.;雷佐生;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;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;伽胞嘧啶(gacytosine);阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;塞替派;紫杉烷类,例如紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)和多西他赛(TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France);苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;巯嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺维本;诺安托;替尼泊苷;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);维甲酸衍生物,如蓓萨罗汀™(贝沙罗汀)、Panretin™(阿利维甲酸);ONTAK™(地尼白介素-毒素连接物);埃斯培拉霉素;卡培他滨;以及任意上述药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在该定义中还包括抗激素剂,其在肿瘤中调节或抑制激素的作用,如抗

雌激素,其包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制剂4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛西芬、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬(法乐通);和抗雄激素,如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、醋酸亮丙瑞林、和戈舍瑞林;以及任意上述药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0230] 多种其他治疗剂可以用于与本申请所描述的抗-CD40抗体联用。在一个实施方式中,抗体与抗炎剂联合给药。抗炎剂或药物包括,但不限于,甾体激素和糖皮质激素(包括倍他米松、布地奈德、地塞米松、醋酸氢化可的松、氢化可的松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松龙、泼尼松、曲安西龙)、非甾体抗炎药(NSAIDs),其包括阿司匹林、布洛芬、萘普生、甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶、来氟米特,抗-TNF药物、环磷酰胺,和霉酚酸酯。

[0231] 示例性的NSAID选自下组:布洛芬、萘普生、萘普生钠、Cox-2抑制剂如万络®(罗非考昔)和西乐葆®(塞来考昔)、以及水杨酸盐。示例性的镇痛药选自下组:扑热息痛、羟考酮、曲马多、和盐酸丙氧芬。示例性的糖皮质激素选自下组:可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松龙、或泼尼松。示例性的生物应答调节剂包括针对细胞表面标记物的分子(例如,CD4、CD5等),细胞因子抑制剂如TNF拮抗剂(例如,依那西普(恩利®)、阿达木单抗(修美乐®)和英夫利昔单抗(类克®)),趋化因子抑制剂和粘附分子抑制剂。生物应答调节剂包括单克隆抗体和分子的重组形式。示例性的DMARD包括硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢素、甲氨蝶呤、青霉胺、来氟米特、柳氮磺胺吡啶、羟氯喹、金(口服(金诺芬)和肌内)和米诺环素。

[0232] 在一些实施方式中,本申请所描述的抗体与细胞因子联合给药。如本申请所使用的,“细胞因子”指针对一个细胞群释放作为细胞内调节剂作用于另一个细胞的蛋白的通用术语。此类细胞因子的例子为淋巴因子、单核因子、和传统的多肽激素。包括在细胞因子内的为生长激素,如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素、和牛生长激素;甲状旁腺激素;甲状旁腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素如卵泡刺激激素(FSH)、甲状腺刺激激素(TSH)、和促黄体激素(LH);肝生长因子;成纤维细胞生长因子;催乳素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子- α 和- β ;苗勒抑制物质;小鼠促性腺素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整合素;血小板生成素(TPO);神经生长因子如NGF- β ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF)如TGF- α 和TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;红细胞生成素(EPO);骨诱导性因子;干扰素,如干扰素- α 、 β 、和- γ ;集落刺激因子(CSF),如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);和粒细胞-CSF(G-CSF);白介素(IL),如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12;IL-15,肿瘤坏死因子,如TNF- α 或TNF- β ;以及其他多肽因子,包括LIF和试剂盒配体(KL)。如本申请所使用的,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白,以及天然序列细胞因子的生物活性等效物。

[0233] 可以将包括本申请所描述的CD40-特异性抗体的组合物给予罹患本申请所描述的疾病的个体,包括但不限于,非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病、多发性骨髓瘤、胰腺癌、结肠癌、胃肠癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑色素瘤,和利妥昔单抗耐药性非霍奇金淋巴瘤(NHL)和白血病、自身免疫和炎性疾病。自身免疫疾病包括,但不限于,关节炎(包括类风湿性关节炎,反应性关节炎)、系统性红斑狼疮(SLE)、牛皮癣和炎性肠病(IBD)、脑脊髓炎、葡萄膜炎、重症肌无力、多发性硬化症、胰岛素依赖性糖尿病、爱迪生氏

病、乳糜泻、慢性疲劳综合症、自身免疫性肝炎、自身免疫性脱发、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、克隆病、纤维肌痛、寻常型天疱疮、干燥综合症、川崎病、甲状腺功能亢进症/格雷夫斯病、甲状腺功能减退症/桥本氏病、子宫内膜异位症、硬皮病、恶性贫血、肺出血肾炎综合症、格林-巴利综合症、韦格纳氏症、肾小球肾炎、再生障碍性贫血(包括多次输血再生障碍性贫血患者)、阵发性睡眠性血红蛋白尿、骨髓增生异常综合症、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血、埃文氏综合症、因子VIII抑制剂综合症、系统性血管炎、皮炎、多发性肌炎和风湿热、自身免疫性淋巴增生综合症(ALPS)、自身免疫性大疱性类天疱疮、帕金森氏症、结节病、白癜风、原发性胆汁性肝硬化、和自身免疫性心肌炎。

[0234] 炎性疾病包括,但不限于,克隆氏病、结肠炎、皮炎、牛皮癣、憩室炎、肝炎、肠易激综合症(IRS)、红斑狼疮、肾炎、帕金森氏病、溃疡性结肠炎、多发性硬化症(MS)、阿尔茨海默氏症、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、和多种心血管疾病,如动脉粥样硬化和血管炎。在一些实施方式中,所述炎性疾病选自类风湿性关节炎、糖尿病、痛风、隐热蛋白相关周期综合症和慢性阻塞性肺病。在这一方面,一个实施方式提供了一种方法,其通过给予所需患者治疗有效量的本申请组合物来治疗、减轻严重程度或预防炎症或炎性疾病,所述组合物包含抗-CD40抗体。

[0235] 在体内使用用于治疗人类疾病时,一般在给药前将本申请所描述的抗体混入药物组合物。药物组合物包含本申请所描述的一种或多种抗体联合本申请其他地方描述的生理学上可接受的载剂或赋形剂。为制备药物组合物,将有效量的一种或多种化合物与本领域技术人员公知的适于特定给药形式的任意药物载剂或赋形剂混合。药物载剂可以是液体、半液体或固体。用于胃肠外、皮内、皮下或局部应用的溶液或混悬液可以包括,例如无菌稀释剂(如水)、盐水溶液、不挥发性油、聚乙烯乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗微生物剂(如苯甲醇和尼泊金甲酯);抗氧剂(如抗坏血酸和酸性亚硫酸钠)和螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));缓冲剂(如醋酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐)。如果静脉给药,适宜的载剂包括生理盐水或磷酸缓冲盐(PBS),以及含有增稠剂和增溶剂的溶液,如葡萄糖、聚乙烯乙二醇、丙二醇及其混合物。

[0236] 包含本申请所描述的CD40-特异性抗体的组合物可以由载剂制备,其保护抗体不从机体迅速消除,如缓释制剂和包衣。此类载剂包括控释制剂,例如但不限于,植入剂和微囊递送系统,以及生物可降解的、生物相容性的聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、聚乙二醇、聚原酸酯、聚乳酸和本领域普通技术人员公知的那些聚合物。

[0237] 本申请提供了使用与CD40结合的抗体治疗的方法。在一个实施方式中,本发明的抗体给予患有与CD40的不适宜表达有关的疾病的患者,在本申请的上下文中的意思中包括,以CD40的表达或活化异常为特征的疾病和病症,由于例如蛋白存在量的改变(例如,统计学显著增加或减少)、或存在突变蛋白、或二者兼有导致。过量可能由任何原因导致,包括但不限于,分子水平的过表达、在作用位点的延迟或蓄积出现、或相对于正常可检测的CD40的活性增加(例如,以具有统计学意义的方法)。可以相对于正常表达、外观、或CD40信号事件的活性对此类CD40的过表达进行检测,并且所述检测在本申请所描述的抗体的开发和/或临床检测中发挥重要作用。

[0238] 本发明的抗体对于治疗多种癌症是有用的。在一些实施方式中,本发明所述抗体通过激活抗肿瘤免疫应答来展现出抗肿瘤活性。在一些实施方式中,本发明的抗体对于治

疗多种与CD40表达异常相关的癌症是有用的。本发明的一个实施方式提供了通过将治疗有效量的本发明所公开的CD40-特异性抗体给予癌症患者,治疗癌症的方法,癌症包括,但不限于,非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病、多发性骨髓瘤、胰腺癌、结肠癌,胃肠癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑色素瘤,和利妥昔单抗耐药性非霍奇金淋巴瘤(NHL)和白血病。有效量是指,在给予后,能统计学显著地(即,相对于本领域技术人员所知的适当的对照)抑制、阻止或延迟癌症的发展和/或转移。

[0239] 另一个实施方式提供了预防癌症转移的方法,所述方法通过将治疗有效量的本发明所公开的CD40-特异性抗体(例如,这样的量,即,在给予后,能统计学显著地(即,相对于本领域技术人员所知的适当的对照)抑制、阻止或延迟癌症的发展和/或转移)给予癌症患者,癌症包括,但不限于,非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病、多发性骨髓瘤、胰腺癌、结肠癌,胃肠癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑色素瘤,和利妥昔单抗耐药性非霍奇金淋巴瘤(NHL)和白血病。

[0240] 另一个实施方式提供了预防癌症的方法,所述方法通过将治疗有效量的本发明所公开的CD40-特异性抗体给予癌症患者,癌症包括,但不限于,非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病、多发性骨髓瘤、胰腺癌、结肠癌,胃肠癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑色素瘤,和利妥昔单抗耐药性非霍奇金淋巴瘤(NHL)和白血病。

[0241] 另一个实施方式提供了治疗、缓解疾病的症状,抑制疾病的进程,或预防疾病的方法,所述方法通过将治疗有效量的本发明所公开的CD40-特异性抗体给予受上述一种或多种疾病影响的患者,所述疾病包括非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、多毛细胞白血病、急性淋巴母细胞性白血病、多发性骨髓瘤、胰腺癌、结肠癌,胃肠癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、恶性黑色素瘤,和利妥昔单抗耐药性非霍奇金淋巴瘤(NHL)和白血病。

[0242] 另一个实施方式提供了治疗、缓解自身免疫疾病的症状,抑制自身免疫疾病的进程,或预防自身免疫疾病的方法,所述方法通过将治疗有效量的本发明所公开的CD40-特异性抗体给予受一种或多种这些疾病影响的患者。在这一方面,自身免疫疾病包括,但不限于,关节炎(包括类风湿性关节炎,反应性关节炎)、系统性红斑狼疮(SLE)、牛皮癣和炎症性肠病(IBD)、脑脊髓炎、葡萄膜炎、重症肌无力、多发性硬化症、胰岛素依赖性糖尿病、爱迪生氏病、乳糜泻、慢性疲劳综合症、自身免疫性肝炎、自身免疫性脱发、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、克隆病、纤维肌痛、寻常型天疱疮、干燥综合征、川崎病、甲状腺功能亢进症/格雷夫斯病、甲状腺功能减退症/桥本氏病、子宫内膜异位症、硬皮病、恶性贫血、肺出血肾炎综合征、格林-巴利综合征、韦格纳氏症、肾小球肾炎、再生障碍性贫血(包括多次输血再生障碍性贫血患者)、阵发性睡眠性血红蛋白尿、骨髓增生异常综合征、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血、埃文氏综合征、因子VIII抑制剂综合征、系统性血管炎、皮炎、多发性肌炎和风湿热、自身免疫性淋巴增生综合征(ALPS)、自身免疫性大疱性类天疱疮、帕金森氏症、结节病、白癜风、原发性胆汁性肝硬化、和自身免疫性心肌炎。

[0243] 另一个实施方式提供了治疗、缓解炎性疾病的症状,抑制炎性疾病的进程,或预防

炎性疾病的方法,所述方法通过将治疗有效量的本发明所公开的CD40-特异性抗体给予受一种或多种这些疾病影响的患者。炎性疾病包括,但不限于,克隆氏病、结肠炎、皮炎、牛皮癣、憩室炎、肝炎、肠易激综合征(IBS)、红斑狼疮、肾炎、帕金森氏病、溃疡性结肠炎、多发性硬化症(MS)、阿尔茨海默氏症、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、和多种心血管疾病,如动脉粥样硬化和血管炎。在一些实施方式中,所述炎性疾病选自类风湿性关节炎、糖尿病、痛风、隐热蛋白相关周期综合征和慢性阻塞性肺病。

[0244] 在另一个实施方式中,本发明的抗-CD40-抗体用于确定结合抗原的结构,例如构象表位,然后可以使用该结构通过例如化学建模和SAR方法开发具有或模拟该结构的化合物。

[0245] 本发明的多种其他实施方式部分涉及诊断应用,其用于检测是否存在表达CD40的细胞或组织。由此,本申请提供了一种在样品中检测CD40的方法,如检测表达CD40的细胞或组织。此类方法可以应用于多种已知的检测形式,包括但不限于,免疫组织化学(IHC)、免疫细胞化学(ICC)、原位杂交(ISH)、整体原位杂交(WISH)、荧光DNA原位杂交(FISH)、流式细胞术、酶免疫法(EIA)、和酶联免疫检测(ELISA)。

[0246] ISH是一种杂交类型,其使用标记的互补DNA或RNA链(即,第一结合剂),以便在细胞或组织(原位)的一部分或切片上定位特定的DNA或RNA序列,或者如果组织足够小,则可以在整个组织上定位(整体ISH)。本领域普通技术人员将理解其与免疫组织化学不同,后者使用抗体作为第一结合剂在组织切片上定位蛋白。DNA ISH可以用于基因组DNA以确定染色体的结构。荧光DNA ISH(FISH)可以,例如,用于医疗诊断以评估染色体的完整性。RNA ISH(杂交组织化学)用于在组织切片或全组织标本中检测和定位mRNA和其他转录物。

[0247] 在不同实施方式中,本申请所描述的抗体偶联至可以被直接或间接检测的可检测标记。在这一点上,抗体“偶联”指抗-CD40抗体共价连接至可检测标记。在本发明中,DNA探针、RNA探针、单克隆抗体、及其抗原结合片段和其抗体衍生物,如单链可变片段抗体或表位标签抗体,均可以共价连接至可检测标记。在“直接检测”中,仅使用一个可检测抗体,即第一可检测抗体。因此,直接检测指偶联至可检测标记的抗体本身可以被检测,而不需要加入另一个抗体(二抗)。

[0248] “可检测标记”是能够产生可检测(如可见地、电子地或其他)信号的分子或材料,所述信号指示样品中存在标记和/或其浓度。当偶联至抗体时,可检测标记可以用于定位和/或定量特异性抗体指示的靶点。因此,可以通过检测可检测标记产生的信号来检测样品中靶点的存在情况和/或其浓度。可以直接或间接地检测可检测标记,可以使用偶联至不同特异性抗体的若干不同可检测标记联合检测一种或多种靶点。

[0249] 可以被直接检测的可检测标记的例子包括,荧光染料和放射性物质以及金属粒子。而相反地,间接检测要求在使用一抗后使用一种或多种附加抗体,即二抗。因此,通过检测二抗或结合剂与第一检测抗体的结合进行该检测。需要加入第二结合剂或抗体的第一检测结合剂或抗体的例子包括,酶检测结合剂和半抗原检测结合剂或抗体。

[0250] 在某些实施方式中,可检测标记偶联至核酸聚合物,其包含第一结合剂(例如,在ISH、WISH、或FISH过程中)。在其他实施方式中,可检测标记偶联至抗体,其包含第一结合剂(例如,在IHC过程中)。

[0251] 可以偶联至本申请方法中使用的抗体的可检测标记的例子包括,荧光标记、酶标

记、放射性同位素、化学发光标记、电化学发光标记、生物发光标记、聚合物、聚合物粒子、金属粒子、半抗原、和染料。

[0252] 荧光标记的例子包括,5-(和6)-羧基荧光素、5-或6-羧基荧光素、6-(荧光素)-5-(和6)-羧酰胺基己酸、异硫氰酸酯荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、和染料,如Cy2、Cy3、和Cy5,任选取代的香豆素,包括AMCA、PerCP,藻胆蛋白包括R-藻红蛋白(RPE)和别藻红蛋白(APC)、得克萨斯红、普林斯顿红、绿色荧光蛋白(GFP)及其类似物、和R-藻红蛋白或别藻红蛋白的偶联物,无机荧光标记如基于半导体材料如涂层CdSe纳米晶的粒子。

[0253] 聚合物粒子标记的例子包括,聚苯乙烯微粒或胶乳粒子、PMMA或二氧化硅,其可以嵌入荧光染料,或者聚合物胶束或胶囊,其含有染料、酶或底物。

[0254] 金属粒子标记的例子包括金粒子和涂层金粒子,其可以通过银染被转化。半抗原的例子包括DNP、荧光素异硫氰酸酯(FITC)、生物素、和地高辛。酶标记的例子包括辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(ALP或AP)、 β -半乳糖苷酶(GAL)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸苷酶、蔗糖酶、黄嘌呤氧化酶、萤火虫荧光素酶和葡萄糖氧化酶(GO)。辣根过氧化物酶常用底物的例子包括,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、镍增强的二氨基联苯胺、3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)、联苯胺二盐酸盐(BDHC)、Hanker-Yates试剂(HYR)、靛酚蓝(IB)、四甲基联苯胺(TMB)、4-氯-1-萘酚(CN)、 α -萘酚派洛宁(α -NP)、邻联茴香胺(OD)、5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐(BCIP)、硝基四氮唑蓝(NBT)、2-(p-碘苯基)-3-p-硝基苯基-1-5-苯基氯化四氮唑(INT)、四硝基四氮唑蓝(TNBT)、5-溴-4-氯-3-吡啶酚- β -D-半乳糖苷/铁-铁氰化钾(BCIG/FF)。

[0255] 碱性磷酸酶常用底物的例子包括,萘酚-AS-B 1-磷酸盐/快速红TR(NABP/FR)、萘酚-AS-MX-磷酸盐/快速红TR(NAMP/FR)、萘酚-AS-B1-磷酸盐/-快速红TR(NABP/FR)、萘酚-AS-MX-磷酸盐/快速红TR(NAMP/FR)、萘酚-AS-B1-磷酸盐/新品红(NABP/NF)、溴氯吡啶磷酸盐/硝基四氮唑蓝(BCIP/NBT)、5-溴-4-氯-3-吡啶基-b--d-吡喃半乳糖苷(BCIG)。

[0256] 发光标记的例子包括鲁米诺、异鲁米诺、吖啶酯、1,2-二氧戊环和吡啶并哒嗪。电化学发光标记的例子包括钌衍生物。放射性标记的例子包括碘、钴、硒、氚、碳、硫和磷的同位素。

[0257] 可以将可检测标记连接至本申请所描述的抗体或与感兴趣的生物学标记物特异性结合的任意其他分子,例如抗体、核酸探针、或聚合物。而且,本领域的普通技术人员将理解,还能够将可检测标记偶联至第二、和/或第三、和/或第四、和/或第五结合剂或抗体等。此外,本领域技术人员将理解,用于表征感兴趣的生物学标记物的每个附加的结合剂或抗体可以用于信号放大步骤。当可检测底物是例如染料、胶体金粒子、发光剂时,可以使用例如光学显微镜、荧光显微镜、电子显微镜对生物学标记物进行目测检测。还可以使用质谱对连接至生物学标记物的目测检测底物进行检测。当可检测底物是放射性同位素时,可以通过放射自显影目测检测,或使用闪烁计数器非目测检测。参见例如,Larsson,1988,Immunocytochemistry:Theory and Practice,(CRC Press,Boca Raton,Fla.);Methods in Molecular Biology,vol.80 1998,John D.Pound(ed.)(Humana Press,Totowa,N.J.)。

[0258] 本发明进一步提供了用于检测样品中的CD40或者表达CD40的细胞或组织的试剂盒,其中所述试剂盒含有本申请所描述的至少一种抗体、多肽、多核苷酸、载体或宿主细胞。在一些实施方式中,试剂盒可以含有缓冲剂、酶、标记、底物、小珠或供本发明的抗体附着的

其他表面等等,以及使用说明。

实施例

[0259] 实施例1

[0260] 抗-CD40抗体的生产和人源化

[0261] 使用重组兔Fc-hCD40免疫四只新西兰白兔。选择具有最高血清滴度的能与CD40特异性结合的家兔用于细胞融合。总共鉴定出172个杂交瘤作为可溶性Fc-hCD40的阳性结合剂,发现其中44个克隆是细胞表面CD40的阳性结合剂。在表位簇检测后,选择出24个代表性的杂交瘤用于重组表达和进一步的表征。如下文进一步所述进行二级功能筛选并包括:1)诱导DC成熟,其可通过CD80,CD83,CD86上调(激动剂活性)来检测;2)诱导肿瘤生长直接抑制(激动剂活性);以及3)ADCC抗体效应器功能。候选物的选择基于双功能筛选,其包括两方面:1)结合亲和力,抗体内化,抗体依赖性细胞毒性(ADCC),补体依赖性细胞毒性(CDC),以及抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP);以及2)激动剂DC激活/成熟功能,受体-配体相互作用,混合淋巴细胞反应(MLR),细胞增殖和凋亡。

[0262] 通过树突状细胞成熟筛选激动剂抗体

[0263] 为了进一步确认最初一组抗-CD40抗体的激动剂或拮抗剂作用,使用DC成熟试验作为指示来筛选功能性抗体。将抗-CD40或对照抗体加入人单核细胞衍生的DC培养物溶液中,持续2天。CD83是人树突状细胞最著名的成熟标记之一,对CD83上调进行检测,以筛选激动剂抗体。5C11是能诱导树突状细胞成熟的鼠单克隆抗体,用5C11作为阳性对照。与Ig对照相比,抗体R-3,R-6,R-8,R-9,R-16,R-18,R-24,R-33,R-36,19-21,19-45和19-59增加了CD83的表达超过50%(图1A)。对于选出的抗体,通过测定抗体诱导的共刺激分子CD80和CD86的上调,进一步检测DC成熟。如图1B和图1C所示,抗体R-3,R-8,R-9,R-33和19-21使CD80和CD86均上调,而其他抗体则仅有适中的作用。这些结果与所述抗体对CD83的调节作用相一致。有意思的是,在能够诱导DC成熟的抗体中,仅克隆19-21表现出很强的增强T细胞在混合淋巴细胞反应中增殖的活性(图1D)。

[0264] 肿瘤生长直接抑制的筛选

[0265] 进一步评价激动剂抗-CD40的这组抗体诱导表达CD40的肿瘤细胞的肿瘤生长抑制的能力。检测所有抗-CD40抗体对肿瘤细胞增殖的抑制。抗体19-21表现了最高的效力。(图2)。

[0266] ADCC活性的筛选

[0267] 除了诱导APC活化和肿瘤生长抑制之外,还可以将抗体效应器功能ADCC作为筛选和排序抗体候选物的一个重要标准。为了进行使用人PBMC的ADCC试验,将所有选择的抗体从mAb转换为由兔Fab和人IgG1组成的嵌合mAb。如图3所示,与IgG1对照相比,所有选择的候选物显示出显著的ADCC活性。根据最大ADCC活性,先导mAb可以排序为cR-8>cR-3>cR-33>c19-21>c R-9>c19-59。

[0268] 根据体外功能筛选选出了四个候选物(c19-21,cR-8,cR-3,cR-33)。表1总结了这些候选物的体外特性。抗体c19-21能显著增强DC活化和肿瘤生长抑制,而抗体cR-8和cR-3显示出更强的ADCC活性。

[0269] 表1.4个候选抗-CD40抗体的特性

[0270]

抗体	c19-21	cR-8	cR3	cR33
阻断 CD40L 结合	能	能	能	能
增强 DC 成熟	强力	强力	强力	强力

[0271]

促凋亡活性 (IC50)	0.02 µg/ml	0.45 µg/ml	0.57 µg/ml	0.90 µg/ml
ADCC (在 1 µg/ml 水平时的 Ramos 细胞的% 细胞毒性)	26%	33%	30%	29%

[0272] 体内抗肿瘤活性筛选

[0273] 由于排在前4的候选物在不同的体外试验中显示出了不同的效力,我们进行了体内研究以评价和比较这些候选物的抗肿瘤活性,从而选出前导。使用了Ramos肿瘤移植模型。向荷瘤鼠腹腔注射5mg/kg的嵌合抗体cR-3, cR-8, cR-33或c19-21,每周三次,总共给药9次(每组8只动物)。用同样治疗方案的利妥昔单抗的抗肿瘤活性作为参照。如图4A所示, cR-8和cR-3显示出最强的抗肿瘤作用。相反地, 19-21显示出较低的抗肿瘤作用及结束给药后最快的肿瘤反弹。cR-33的抗肿瘤作用则位于中间,但还是显示出比利妥昔单抗更好的体内效果。抗体cR-3和cR-8的体内效力进一步在剂量-效应研究中进行评价。如图4B所示, cR-8显示出比cR-3更强的抗肿瘤作用,并因此鉴定为前导抗-CD40抗体。

[0274] R-8克隆重链和轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:1和2所示。VH和VL的CDR的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:3-5和6-8所示。显示出功能活性的其他若干抗体候选物的重链和轻链序列的氨基酸序列如SEQ ID NO:11-56所示。这些抗体的VHCDR和VLCDR氨基酸序列如SEQ ID NO:57-194所示。图16显示了包括R-8克隆的这些序列的比对,其中CDR用下划线标出。

[0275] 用专利突变谱系指导的人源化技术(参见,例如,美国专利号7,462,697)对R-8进行人源化。人源化R-8(APX005)的轻链和重链骨架与人生殖系细胞序列95%相同。人源化VH和VL区的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:9和10所示。发现APX005与CD40的结合与其亲代克隆R-8相似。

[0276] 实施例2[0277] APX005人源化抗-CD40抗体的体外表征

[0278] 进行了各种不同的体外实验以进一步对APX005人源化抗体进行表征

[0279] APX005选择性结合CD40

[0280] 通过与TNFR家族蛋白组的直接ELISA,评价APX005的结合选择性。在ELISA板上包被共1µg/ml的兔Fc和CD40的融合蛋白、RANK、TweakR、OX40、DR5和4-1BB。用羊抗人HRP-偶联的IgG检测结合的APX005。如图5所示, APX005选择性与CD40结合,而并不与其他测试的TNFR家族蛋白结合。

[0281] APX005阻断CD40L与CD40结合

[0282] 用ELISA评价APX005对CD40L与CD40结合的作用。具体而言,用CD40L(4 μ g/ml的终浓度)与固定在ELISA板上的人CD40结合,在用APX005与固定化的CD40预孵育后,检测CD40L与CD40结合量的改变。用鼠抗-CD40L单克隆抗体检测CD40L与固定化CD40的结合。如图6所示,APX005阻断CD40L与CD40结合。相反地,SGN-40使所述结合增加。

[0283] APX005/CD40复合物并没有内化

[0284] 为了评价靶物介导的APX005内化,以用于评价其对ADCC活力的影响,用APX005与Ramos细胞在37 $^{\circ}$ C下孵育4h,37 $^{\circ}$ C为允许内化的温度,或在4 $^{\circ}$ C孵育30min,在4 $^{\circ}$ C时内化作用最小。用染色缓冲液清洗细胞,然后与Alexa488标记的羊抗-人IgG在4 $^{\circ}$ C下孵育30min。用FACS分析检测细胞表面APX005的水平。如图7所示,37 $^{\circ}$ C孵育后,细胞表面APX005的水平没有减少(略微增加)。上述数据提示在与CD40结合后的APX005/CD40复合物并没有被肿瘤细胞内化,因此为募集用于ADCC的效应细胞提供了最优的条件。

[0285] APX005介导ADCC

[0286] 为了评价APX005对表达CD40的肿瘤细胞的ADCC活性,使用表达CD40的Ramos和Daudi细胞作为靶细胞,并使用新鲜的人外周血单核细胞(PBMC)作为效应细胞。通过钙黄绿素-AM释放测试检测ADCC。用钙黄绿素-AM标记靶细胞(15 μ M/10⁶细胞),清洗细胞,并以每孔 5×10^3 的密度铺板于圆底96孔板中,设三复孔。用浓度渐增的(0.0001-10 μ g/mL)APX005或对照抗体在4 $^{\circ}$ C下预孵育30分钟,然后加入来自健康人供体的PBMC效应细胞,并达到在每孔终体积为200 μ L中,效应细胞:靶细胞最终比例为40:1。用来自至少三个不同供体的PBMC进行实验。孵育4小时后,将100 μ L培养物上清转移至黑色板-96孔板中,并且在VictorII酶标仪上读取任意荧光单位(AFU)(485nm激发光/535nm发射光)。百分特定溶解=(AFU平均实验释放-AFU平均自发释放)/(AFU平均最大释放-AFU平均自发释放)。如图8所示,APX005以剂量依赖的方式诱导ADCC。对于SGN-40也观察到了类似的作用。Ramos和Daudi细胞对ADCC的敏感度不同,可能归因于不同的CD40表达水平(Cancer Res 2005;65:8331-8338)。

[0287] APX005抑制肿瘤细胞增殖

[0288] 为了评价APX005抑制肿瘤细胞增殖的能力,将Ramos细胞以50,000细胞/孔的密度接种于96孔平底板,每孔中有200 μ L RPMI1640,其补充有10%FBS,10%FBS含不同浓度的APX005、SGN-40或对照人IgG。为了交联,将APX005、SGN-40或对照IgG与羊抗-人IgG Fc片段-特异性抗体的F(ab)'₂片段在培养基中于室温下预孵育30分钟,然后再加入细胞中。细胞处理总共72小时。然后每孔加入10%AlamarBlue[®](Serotec,Oxford,UK)并再孵育24小时。通过CytoFluor荧光读取器检测细胞存活,其中激发波长530nm,发射波长590nm。所有实验均进行两次,并对每个样品浓度重复三次。如图9所示,单体APX005抑制Ramos细胞的增殖(图9A)。当APX005与二抗交联时,它出现了增强的并且是剂量依赖性的增殖抑制作用(图9B)。可以通过表达Fc受体的细胞实现体内APX005交联。

[0289] APX005诱导DC活化

[0290] 为了评价APX005刺激DC细胞成熟的能力,用淋巴细胞分离溶液,通过梯度密度离心制备PBMC。在37 $^{\circ}$ C孵育2小时后收获附着的单核细胞。用100ng/ml重组人GM-CSF和100ng/ml重组人IL-4,在补充有10%FCS的RPMI1640培养基中在24孔板中培养分离的单核细胞。三天后换一半的培养基。培养的第5天,将1.3nM抗-CD40抗体、CD40L或对照抗体加入DC细胞,并在24孔板中再培养48小时。对于DC活化标记染色,使用偶联了PE的抗-CD83、抗-CD86抗

体、和抗-CD80抗体。用FACS进行分析。数据来自一个代表性的研究。如图10所示,APX005诱导显著的DC成熟,并且它的作用比SGN-40和CD40L更强。DC活化增加可能导致更强的抗肿瘤T细胞应答。

[0291] APX005与猴CD40交叉反应,而不与小鼠CD40交叉反应

[0292] 通过直接ELISA评价交叉反应。在ELISA板上包被共 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 人CD40、猴CD40或鼠CD40,然后与 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ APX005或对照IgG1孵育。用偶联了HRP的羊抗-人IgG检测结合至CD40的抗体。APX005明显地与猴CD40交叉反应,而不与鼠CD40交叉反应。(图11A)

[0293] 通过结合至表达鼠CD40的鼠A20细胞的FACS,进一步测定了APX005与鼠CD40的交叉反应。将 0.5×10^6 A20细胞分装加入96孔板中,并与 $100\mu\text{l}$ 稀释的偶联了PE的大鼠抗-小鼠CD40抗体、APX005或IgG1对照抗体孵育。清洗后,向样品中加入以1:200稀释的 $100\mu\text{l}$ 偶联了R-PE的羊抗人IgG(H+L)(Southern Biotech CAT#2040-09)PBS溶液,并孵育以检测APX005和对照人IgG1。使用偶联了PE的大鼠抗-小鼠CD40抗体作为阳性对照。样品用 0.5ml PBS重悬并且用FACS分析。FACS数据显示APX005与小鼠CD40并没有交叉反应(图11B)。

[0294] 总之,本实施例的实验显示,APX005是能与CD40结合的人源化IgG1抗体。APX005以 9.6×10^{-10} 的Kd值与CD40特异性结合,并阻断CD40L与CD40结合。这与SGN-40抗-CD40抗体增强CD40-CD40L的相互作用相反。这表明,这两种抗体结合至不同的表位。在体外,APX005对CD40阳性淋巴细胞(Ramos和Daudi)显示了很强的ADCC活性,以及基于交联的直接抑制肿瘤细胞(Ramos)增殖的能力。APX005还刺激树突状细胞成熟,以增强细胞免疫应答。此外,APX005还与猴CD40交叉反应。

[0295] 实施例3

[0296] APX005人源化抗-CD40抗体的体内表征

[0297] 进行不同的体内实验以进一步表征APX005人源化抗体。

[0298] Ramos模型中APX005对肿瘤生长的抑制

[0299] 为了评价APX005对人B细胞淋巴瘤的移植模型的作用,使用6-8周龄的雌性BALB/c nu/nu小鼠进行肿瘤细胞接种。通过对每只小鼠背部两侧皮下接种 1×10^7 的肿瘤细胞建立移植模型。当肿瘤达到平均体积为约 100mm^3 ($50 \sim 200\text{mm}^3$)时,将动物随机分组。从第13天起,将抗体以 $3\text{mg}/\text{kg}$ 进行腹腔注射(参见图12)。每周给药3次,共9次(每组8只动物)。用游标卡尺测量肿瘤的垂直尺寸。用下式计算肿瘤的体积:体积=(长 $\times$ 宽 2)/2。如图12A所示,APX005证实了强而持久的抗肿瘤活性。在第34天,即最后一次给药后两天,取血清,以通过检测人IgG浓度测定体内药物水平(参见图12B)。APX005介导的抗肿瘤作用比SGN-40的更强,并且在给药期后持续时间更长。单点PK分析显示,APX005更好的抗肿瘤活性并不是由于PK差异。

[0300] APX005抑制利妥昔单抗预处理并耐药的肿瘤

[0301] 本实验的目的是为了评价APX005对利妥昔单抗预处理并耐药的B细胞淋巴瘤的作用。首先用5次给予 $3\text{mg}/\text{kg}$ 的利妥昔单抗处理荷有已形成Ramos肿瘤的裸鼠。肿瘤生长部分地被利妥昔单抗抑制(图13A)。当这些肿瘤尺寸达到约 700mm^3 时,将其随机分为4组(每组7只动物)并腹腔注射APX005、利妥昔单抗、SGN40类似物 $3\text{mg}/\text{kg}$ 或生理盐水对照进行再处理3周(图13B)。如图13所示,利妥昔单抗预处理的肿瘤对利妥昔单抗再处理没有反应,这表明这些肿瘤已具有利妥昔单抗耐药性(图13B)。APX005显示出了抑制利妥昔单抗耐药肿瘤的

能力。

[0302] Raji模型中APX005对肿瘤生长的抑制

[0303] 本实验的目的是为了确定APX005在体内的剂量和效应关系。在第15天时,用APX005处理荷有已形成的CD40阳性Raji肿瘤的裸鼠。腹腔注射0.1mg/kg-10mg/kg剂量的APX005,每周三次,给予两周(每组8只动物)(参见图14)。生理盐水作为对照处理。在每个给药日测量肿瘤体积。最后一次给药后3天测量每组APX005的血清水平,以确定体内效应与循环中APX005水平的关系。观察到了明显的剂量依赖性抗肿瘤活性(参见图14)。在第29至33天,对照组和剂量水平 $\geq 1\text{mg/kg}$ 的抗体治疗组间肿瘤体积的差异十分显著($P \leq 0.05$)。最小有效剂量确定为1mg/kg,这对应于第36天的中位血清浓度 $0.49\mu\text{g/ml}$ 。3、5和10mg/kg剂量组间肿瘤体积并没有统计学显著差异。因此,当剂量 $\geq 3\text{mg/kg}$ 时可达到最大抗肿瘤活性,其中位血清浓度为 $\geq 1.6\mu\text{g/ml}$ 。

[0304] 人MMIM-9模型中APX005对肿瘤生长的抑制

[0305] 为了评价APX005在人多发性骨髓瘤模型中的抗肿瘤活性,从第15天起,通过腹腔注射APX005或SNG40来处理荷有已形成CD40阳性多发性骨髓瘤IM-9肿瘤的裸鼠。以3mg/kg给予APX005,每周三次,持续三周(每组5只动物)。在每个给药日测量肿瘤体积。

[0306] APX005在IM-9移植模型中证明了很强的抗人多发性骨髓瘤的抗肿瘤活性(参见图15)。由APX005介导的抗肿瘤作用比SGN-40介导的显著强得多($P < 0.05$)。

[0307] Ramos模型中与SGN-40和利妥昔单抗相比APX005对肿瘤生长的抑制

[0308] 本实验的目的是为了比较APX005、利妥昔单抗和SGN-40在人B细胞淋巴瘤Ramos移植模型中的抗肿瘤活性。通过对雌性SCID C.B-17小鼠背部两侧皮下接种Ramos细胞建立移植模型。当肿瘤达到平均体积为约 $200\text{--}300\text{mm}^3$ 时,将动物随机分为6组。如图17所示的剂量腹腔给予抗体。每周给药三次,共9次(每组10只动物)。用游标卡尺测量肿瘤的垂直尺寸。用下式计算肿瘤的体积:体积=(长 $\times$ 宽²)/2。同样测定并记录小鼠存活。

[0309] APX005证实了剂量依赖性的抗肿瘤活性。用高剂量(10mg/kg)APX005治疗导致完全肿瘤抑制,而相同剂量(10mg/kg)的利妥昔单抗仅延迟了肿瘤生长,这表明,在该模型中APX005比利妥昔单抗更有效。APX005也比SGN-40更强效(图17A)。APX005不仅抑制肿瘤生长,同时还改善了荷瘤动物的存活(图17B)。

[0310] 利妥昔单抗耐药性人Namalwa淋巴瘤移植模型中的肿瘤生长抑制

[0311] 本实验的目的是为了比较APX005、利妥昔单抗和SGN-40在利妥昔单抗耐药性人Namalwa淋巴瘤模型中的抗肿瘤活性。通过对雌性SCID C.B-17小鼠背部两侧皮下接种Namalwa细胞建立移植模型。当肿瘤达到平均体积为约 $200\text{--}300\text{mm}^3$ 时,将动物随机分为6组。如图18所示的剂量腹腔给予抗体。每周给药三次,共9次(每组10只动物)。用游标卡尺测量肿瘤的垂直尺寸。用下式计算肿瘤的体积:体积=(长 $\times$ 宽²)/2。同样测定并记录小鼠存活。

[0312] APX005证实了在利妥昔单抗耐药性Namalwa淋巴瘤模型中具有很强的抗肿瘤活性(图18A)。APX005还改善了荷利妥昔单抗耐药性肿瘤小鼠的存活(图18B)。

[0313] 总之,本实施例的实验显示,APX005的作用在多种移植肿瘤模型中得到验证。APX005显著抑制Ramos模型中的肿瘤生长。有趣的是,治疗作用持续的时间比给药期间长得多。APX005处理能导致对利妥昔单抗预处理和耐药性肿瘤的抑制。在Raji模型中进行剂量范围研究,并发现最小有效剂量测定为1mg/kg,并且观察到最大抗肿瘤活性为剂量 $\geq 3\text{mg/}$

kg。除了B细胞淋巴瘤之外,APX005还在人多发性淋巴瘤IM-9模型中显示了显著的很强的抗肿瘤活性。

[0314] 因此,上述实施例证明了APX005可以用于改善对患有NHL、CLL、多发性骨髓瘤和表达CD40靶点的某些实体瘤的患者的治疗。基于与CD40的结合,APX005通过ADCC募集细胞毒性细胞来杀死肿瘤细胞。APX005还可以直接抑制肿瘤细胞增殖,并通过其激动剂活性激活APC。在体内,APX005显著抑制多种表达CD40的人肿瘤移植的生长,并显示出长效抗肿瘤作用。APX005还能抑制人多发性骨髓瘤和利妥昔单抗预处理和耐药性肿瘤。

[0315] 可以对上文所描述的不同实施方式组合以提供进一步的实施方式。本说明书中涉及的和/或申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物其全部内容均通过引用并入本申请。如果有必要,采用不同专利、申请文件和公开文件的概念,可以对实施方式的方面进行修改,以提供进一步的实施方式。

[0316] 在上述详细描述的指导下,可以对实施方式进行这些和其他改变。一般而言,在下述权利要求中,使用的术语不应被解释为将权利要求限制为说明书和权利要求所公开的特定实施方式,而是应该被解释为包括所有可能的实施方式,以及此类权利要求等同物的全部范围。因此,权利要求并不受本申请的限定。

序列表

<110> 张永克
余国良
朱伟民

<120> 抗-CD40抗体及其使用方法

<130> APEX-013/02W0 315697-2028

<160> 194

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 137

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 1

Met Glu Thr Gly Leu Arg Gly Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
20 25 30

[0001]

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
35 40 45

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

Trp Ile Ala Cys Ile Tyr Thr Gly Asp Gly Thr Asn Tyr Ser Ala Ser
65 70 75 80

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Pro Ser Ser Thr Thr Val
85 90 95

Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
100 105 110

Cys Ala Arg Pro Asp Ile Thr Tyr Gly Phe Ala Ile Asn Phe Trp Gly
115 120 125

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 2
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 2

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

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

Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala
 35 40 45

Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly
 65 70 75 80

[0002] Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu
 85 90 95

Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

Cys Thr Gly Tyr Gly Ile Ser Trp Pro Ile Gly Gly Gly Thr Glu Val
 115 120 125

Val Val Lys
 130

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 3

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Thr Tyr Val Cys
 1 5 10

<210> 4

<211> 17
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 4

Cys Ile Tyr Thr Gly Asp Gly Thr Asn Tyr Ser Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 5

Pro Asp Ile Thr Tyr Gly Phe Ala Ile Asn Phe
1 5 10

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

[0003]

<400> 6

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 7

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 8

Gln Cys Thr Gly Tyr Gly Ile Ser Trp Pro
1 5 10

<210> 9
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> APX005的VH区, R-8兔抗-CD40抗体的人源化形式

<400> 9

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

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

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

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

[0004]

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

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

Ala Arg Pro Asp Ile Thr Tyr Gly Phe Ala Ile Asn Phe Trp Gly Pro
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> APX005的VL区, R-8兔抗-CD40抗体的人源化形式

<400> 10

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

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

Gln Ser Ile Ser Ser Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

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

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys
100 105 110

[0005]

Thr Gly Tyr Gly Ile Ser Trp Pro Ile Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
115 120 125

Ile Lys
130

<210> 11
<211> 144
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 11

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
35 40 45

Asp Ser Phe Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50	55	60
Glu Trp Ile Gly Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr 65 70 75 80		
Ala Asn Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr 85 90 95		
Thr Val Thr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr 100 105 110		
Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala 115 120 125		
Thr Gly Leu Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 130 135 140		
<210> 12 <211> 143 <212> PRT <213> 家兔		
[0006] <400> 12		
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly 1 5 10 15		
Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln 20 25 30		
Pro Gly Gly Ser Leu Thr Leu Thr Gly Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe 35 40 45		
Ser Ser Ser Tyr Ser Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly 50 55 60		
Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Asp Thr Gly Arg Gly Tyr Thr Tyr His 65 70 75 80		
Ala Ser Gly Ala Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Lys Thr Ser Ser Thr 85 90 95		
Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr 100 105 110		

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ser Tyr Val Arg Tyr Asp Asn Arg Asn Tyr
115 120 125

Gly Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 13
<211> 138
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 13

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Arg Phe Ser Phe Ser
35 40 45

[0007]

Ser Thr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Ala Cys Thr Tyr Thr Gly Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Thr Ser Ser Thr Thr
85 90 95

Val Thr Leu Gln Leu Thr Gly Leu Thr Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Arg Pro Asp Val Gly Phe Asp Phe Ala Ile Asn Phe Trp
115 120 125

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 14
<211> 137
<212> PRT

<213> 家兔

<400> 14

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Gly Thr Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn
35 40 45

Tyr Tyr Trp Pro Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Val Ala Cys Leu Asn Gly Gly Asp Ser Asp Thr Thr Val Tyr Ala
65 70 75 80

Arg Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr Thr
85 90 95

[0008]

Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Arg Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu Trp Gly
115 120 125

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 15

<211> 138

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 15

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ile Asp Phe Ser

Ser	Tyr 50	Tyr	Tyr	Met	Cys	Trp 55	Val	Arg	Gln	Ala	Pro 60	Gly	Lys	Gly	Leu	
Glu 65	Trp	Ile	Gly	Cys	Ile 70	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gly 75	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala 80	
Ser	Trp	Ala	Lys	Gly 85	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser 90	Lys	Thr	Ser	Ser	Thr 95	Thr	
Val	Thr	Leu	Gln 100	Met	Thr	Ser	Leu	Thr 105	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala 110	Thr	Tyr	
Phe	Cys 115	Ala	Arg	Ser	Gly	Tyr	Asn 120	Asp	Gly	Ser	Tyr	Tyr 125	Asn	Leu	Trp	
Gly 130	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr 135	Val	Ser	Ser							

[0009]	$\langle 210 \rangle$	16
	$\langle 211 \rangle$	141
	$\langle 212 \rangle$	PRT
	$\langle 213 \rangle$	家兔

<400> 16

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
35 40 45

Arg Gly Tyr Tyr Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ala Cys Ile Gly Ala Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Phe Ala
65 70 75 80

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Thr Ser Ser Thr Thr
85 90 95

Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Arg Glu Asp Ala Gly Asn Asp Asp Tyr Gly Tyr Ala Arg
115 120 125

Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 17
<211> 138
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 17

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
20 25 30

[0010]

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
35 40 45

Ser Ser Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ala Cys Ile Asn Thr Gly Ser Ser Val Thr Thr Val Tyr
65 70 75 80

Ala Arg Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr Asn Phe Asn Leu Trp
115 120 125

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 18
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 18

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe
35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Asn Ser Asp Asp Ser Gly Thr Asn Val
65 70 75 80

[0011] Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser
85 90 95

Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Pro Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu
115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 19
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 19

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro

	20	25	30
	Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Asp Leu Ser 35 40 45		
	Ser Asn Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu 50 55 60		
	Trp Ile Gly Tyr Ile Thr Ile Ser Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Ser Trp 65 70 75 80		
	Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu 85 90 95		
	Lys Ile Ser Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala 100 105 110		
	Arg Gly Tyr Asn Thr Met Ala Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr 115 120 125		
[0012]	Val Ser Ser 130		
<210>	20		
<211>	136		
<212>	PRT		
<213>	家兔		
<400>	20		
	Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly 1 5 10 15		
	Val Gln Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro 20 25 30		
	Gly Thr Pro Leu Thr Leu Asn Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser 35 40 45		
	Ser Tyr Asp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu 50 55 60		
	Trp Ile Gly Val Ile Trp Asn Asn Gly Glu Ile Phe Tyr Ala Ser Trp 65 70 75 80		

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
85 90 95

Lys Ile Thr Ser Pro Ser Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
100 105 110

Gly Asp Ala Asp Gly Gly Val Val Ser Tyr Phe His Val Trp Gly Pro
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 21

<211> 136

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 21

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

[0013]

Val Gln Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
20 25 30

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45

Asp Tyr Val Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Val Ile Ser Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp
65 70 75 80

Ala Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
85 90 95

Arg Ile Ala Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
100 105 110

Arg Ile Trp Arg Pro Asp Asp Pro Thr Asn Ser Asp Ile Trp Gly Pro
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 22
<211> 130
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 22

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
20 25 30

Ala Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Thr Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

[0014] Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
100 105 110

Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu
115 120 125

Ile Leu
130

<210> 23
<211> 134
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 23

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

	1				5					10						15
	Leu	Pro	Gly	Ala	Arg	Cys	Ala	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ala
				20					25						30	
	Ser	Val	Glu	Ala	Ala	Val	Gly	Gly	Thr	Ile	Thr	Ile	Asn	Cys	Gln	Ala
			35					40					45			
	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Ser	Trp	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
		50					55					60				
	Gln	Arg	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly
	65					70					75					80
	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Lys	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu
					85					90					95	
	Thr	Ile	Ser	Asp	Leu	Glu	Cys	Ala	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln
				100					105					110		
[0015]	Ser	Asn	Tyr	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Phe	Gly	Gly	Gly
			115					120					125			
	Thr	Glu	Val	Val	Val	Lys										
		130														
	<210>		24													
	<211>		131													
	<212>		PRT													
	<213>		家兔													
	<400>		24													
	Met	Asp	Thr	Arg	Ala	Pro	Thr	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp
	1				5					10					15	
	Leu	Pro	Gly	Ala	Arg	Cys	Ala	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser
				20					25					30		
	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Val	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Ile	Lys	Cys	Gln	Ala
			35					40					45			
	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Arg	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly
		50					55					60				

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly
65 70 75 80

Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

Cys Thr Gly Tyr Thr Ile Ser Trp Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val
115 120 125

Val Val Lys
130

<210> 25
<211> 132
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 25

[0016]

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile Phe Gly Gly Gly Phe Gln
 115 120 125

Val Val Val Lys
 130

<210> 26
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 26

Met Asp Thr Arg Ala Pro Pro Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser
 20 25 30

Ser Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala
 35 40 45

[0017] Ser Gln Ser Ile Tyr Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly
 65 70 75 80

Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
 85 90 95

Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

Arg Tyr Ser Trp Asn Gly Ser Tyr Gly Val Ser Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125

Glu Val Val Val Arg
 130

<210> 27
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 27

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala
20 25 30

Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala
35 40 45

Ser Glu Ser Ala Tyr Thr Leu Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

[0018]

Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

Ser His Tyr Phe Gly Ser Ser Ser Gly Tyr Ala Asn Thr Phe Gly Gly
115 120 125

Gly Thr Glu Val Val Val Lys
130 135

<210> 28

<211> 132

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 28

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

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

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Thr Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Val Val Val Lys
130

[0019] <210> 29
<211> 132
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 29

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Asn Ile Tyr Gly Tyr Leu Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

Pro Pro Asn Leu Leu Ile Ala Glu Ala Ser Lys Leu Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Ser Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu
 115 120 125

Val Val Val Lys
 130

<210> 30
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 30

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
 20 25 30

[0020]

Val Ser Ala Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser
 35 40 45

Gln Asn Val Leu Ile Asn Asn Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Gln Ala Gly Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr
 115 120 125

Glu Val Val Val Lys
 130

<210> 31
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 31

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
 20 25 30

Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
 35 40 45

Gln Thr Ile Tyr Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 50 55 60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
 65 70 75 80

[0021] Ser Ser Arg Phe Glu Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Gly Tyr Asn Ser Arg His Val Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu
 115 120 125

Val Val Val Lys
 130

<210> 32
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 32

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
 20 25 30

Thr Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Glu Ser Ile Ser Ser Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

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

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
100 105 110

Gly Tyr Ala Thr Ala Ala Tyr Arg Thr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Leu Glu Ile Leu
130

[0022]

<210> 33
<211> 138
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 33

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Gln Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Asn Gly Phe Ser Phe
35 40 45

Ser Ala Asn Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Leu Ile Ala Cys Ile Tyr Ala Ser Ser Gly Ser Thr Trp Tyr
65 70 75 80

Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ser Thr Ser Leu
85 90 95

Asn Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Val Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Gly Gly Tyr Ala Ala Tyr Asp Leu Trp
115 120 125

Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 34
<211> 139
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 34

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

[0023]

Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Leu
35 40 45

Ser Ser Thr Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Ala Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Pro Thr Thr
85 90 95

Val Thr Leu Gln Met Pro Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Arg Asp Ile Val Gly Asp Asn Ile Tyr Tyr Phe Asn Phe
115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 35
<211> 139
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 35

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
20 25 30

Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe
35 40 45

Gly Ser Gly Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

[0024]

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Gly Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Phe Ser Leu
115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 36
<211> 142
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 36

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Leu Ala Val Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe
35 40 45

Ser Arg Gly Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile Gly Ala Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Thr Trp Thr Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Lys Thr Ser Trp Thr
85 90 95

Thr Val Ser Leu Glu Met Thr Ser Leu Thr Gly Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Glu Asp Pro Gly Asn Asp Asp Tyr Gly Tyr Ala
115 120 125

[0025]

Asp Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 37
<211> 144
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 37

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
35 40 45

Asp Ser Phe Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Asn Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala
115 120 125

Thr Gly Leu Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 38
<211> 139
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 38

[0026]

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
20 25 30

Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe
35 40 45

Gly Ser Gly Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Gly Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ala Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Phe Ser Leu
115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 39

<211> 139

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 39

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln
20 25 30

Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Ser Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

[0027] Ser Ser Ser Tyr Phe Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile Ser Ala Gly Ser Ser Gly His Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Ser
85 90 95

Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ala Ser Ala Asp Val Gly Asp Tyr Ser Leu
115 120 125

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 40

<211> 144

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 40

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
35 40 45

Asp Ser Phe Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Asn Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr
85 90 95

[0028] Thr Val Thr Leu Gln Met Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala
115 120 125

Thr Gly Leu Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 41

<211> 144

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 41

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
35 40 45

Gly Thr Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gly Asn Ser Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Asn Trp Ala Gln Gly Arg Phe Ile Ile Ser Lys Arg Ser Ser Thr
85 90 95

Ala Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Tyr Thr Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala
115 120 125

Thr Gly Leu Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

[0029] <210> 42
<211> 134
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 42

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Ile Thr Pro
20 25 30

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45

Ser Tyr Ala Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Tyr Ile Gly Leu Ile Ala Thr Gly Gly Gly Thr Phe Tyr Thr Asn Trp
65 70 75 80

Ala Arg Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
85 90 95

Lys Met Pro Ser Pro Gln Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
100 105 110

Arg Gly Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 43

<211> 135

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 43

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
20 25 30

[0030] Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45

Thr Tyr Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Leu Gly Leu Ile Asn Thr Ile Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp
65 70 75 80

Ala Ser Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Ser Val Thr Leu
85 90 95

Lys Met Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
100 105 110

Arg Gly Val Pro Gly Tyr Ser Ser Ser Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 44

<211> 134
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 44

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Ile Thr Pro
 20 25 30

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ile Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Ser Tyr Ala Val Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Tyr Ile Gly Ile Ile Ala Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asn Trp
 65 70 75 80

[0031] Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Lys Met Thr Ser Pro Gln Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
 100 105 110

Arg Gly Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 45
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 45

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
 20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser
35 40 45

Lys Ser Val Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Val Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Ala Gly Tyr Glu Ser Val Asn Thr Asp Gly His Ala Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Glu Val Val Val Lys
130

[0032]

<210> 46
<211> 132
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 46

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Thr Ile Ser Asn Glu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

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

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Gly Tyr Thr Tyr Ser Ser Val Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu
115 120 125

Val Val Val Lys
130

<210> 47
<211> 131
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 47

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

[0033] Leu Pro Gly Val Thr Phe Ala Ile Glu Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser
20 25 30

Val Ser Glu Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Glu Asp Ile Phe Ser Asn Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Asn Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
100 105 110

Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val
115 120 125

Val Val Lys

130

<210> 48
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 48

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser
 20 25 30

Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala
 35 40 45

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

[0034] Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly
 65 70 75 80

Val Pro Ser Arg Phe Gln Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu
 85 90 95

Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

Ser His Tyr Phe Asp Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Asn Thr Phe Gly Gly
 115 120 125

Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 130 135

<210> 49
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 49

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
20 25 30

Ala Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
100 105 110

Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu
115 120 125

[0035]

Ile Leu
130

<210> 50
<211> 131
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 50

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Val Thr Phe Ala Ile Glu Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser
20 25 30

Val Ser Glu Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Glu Asp Ile Phe Ser Asn Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Asn Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
100 105 110

Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val
115 120 125

Val Val Lys
130

<210> 51
<211> 130
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 51

[0036]

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Met Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

Val Ser Ala Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

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

Ser Ser Arg Phe Glu Gly Ser Arg Ser Val Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
100 105 110

Thr Tyr Tyr Gly Asn Gly His Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val

	115	120	125
	Val Lys 130		
	<210> 52 <211> 130 <212> PRT <213> 家兔		
	<400> 52		
	Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp 1 5 10 15		
	Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser 20 25 30		
	Ala Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser 35 40 45		
[0037]	Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln 50 55 60		
	Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val 65 70 75 80		
	Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr 85 90 95		
	Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly 100 105 110		
	Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu 115 120 125		
	Ile Leu 130		
	<210> 53 <211> 130 <212> PRT <213> 家兔		
	<400> 53		

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
20 25 30

Thr Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

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

Pro Ser Arg Phe Ser Ala Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Val Gln Arg Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly
100 105 110

[0038]

Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu
115 120 125

Ile Leu
130

<210> 54
<211> 119
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 54

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

Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln
20 25 30

Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Lys His His Leu Ala Trp Leu Gln Gln
35 40 45

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu
50 55 60

Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln
65 70 75 80

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gly
100 105 110

Gly Thr Glu Val Val Val Glu
115

<210> 55
<211> 134
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 55

[0039]

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
20 25 30

Lys Ser Val Ala Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Glu Ser Val Asp Ser Asn Lys Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Val Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Ala Gly Tyr Lys Ala Thr Thr Thr Asp Ala Ser Ala Phe Gly Gly Gly

115

120

125

Thr Glu Val Val Val Lys
130

<210> 56
<211> 133
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 56

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser
35 40 45

[0040] Lys Ser Val Tyr Asn Lys Asn His Leu Ala Trp Leu Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Thr Pro Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Ala Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Glu Val Val Val Glu
130

<210> 57
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 57

Gly Phe Ser Phe Ser Ala Asn Tyr Tyr Met Cys
1 5 10

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 58

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser Phe Trp Ile Ala
1 5 10

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 59

Gly Phe Asp Leu Ser Ser Thr Tyr Tyr Met Cys
1 5 10

[0041]

<210> 60
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 60

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Ser Met Cys
1 5 10

<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 61

Gly Phe Ser Phe Gly Ser Gly Tyr Tyr Met Cys
1 5 10

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 62

Arg Phe Ser Phe Ser Ser Thr Tyr Met Cys
1 5 10

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 63

Gly Phe Ser Phe Ser Arg Gly Tyr Tyr Met Cys
1 5 10

<210> 64
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 64

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser Phe Trp Ile Ala
1 5 10

[0042]

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 65

Gly Phe Ser Leu Asn Tyr Tyr Trp Pro Cys
1 5 10

<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 66

Gly Ile Asp Phe Ser Ser Tyr Tyr Tyr Met Cys
1 5 10

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 67

Gly Phe Ser Phe Gly Ser Gly Tyr Tyr Met Cys

	1	5	10
	<210> 68 <211> 11 <212> PRT <213> 家兔 <400> 68		
	Gly Phe Ser Phe Ser Arg Gly Tyr Tyr Ile Cys 1 5 10		
	<210> 69 <211> 11 <212> PRT <213> 家兔 <400> 69		
	Gly Phe Ser Leu Ser Ser Ser Tyr Phe Met Cys 1 5 10		
[0043]	<210> 70 <211> 11 <212> PRT <213> 家兔 <400> 70		
	Gly Phe Ser Phe Ser Asp Ser Phe Trp Ile Ala 1 5 10		
	<210> 71 <211> 11 <212> PRT <213> 家兔 <400> 71		
	Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ser Tyr Trp Ile Cys 1 5 10		
	<210> 72 <211> 11 <212> PRT <213> 家兔 <400> 72		
	Gly Phe Ser Phe Ser Gly Thr Tyr Trp Ile Cys 1 5 10		

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 73

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Thr Tyr Trp Ile Cys
1 5 10

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 74

Gly Phe Asp Leu Ser Ser Asn Ala Met Asn
1 5 10

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

[0044]

<400> 75

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Val Asn
1 5 10

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 76

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Asp Met Thr
1 5 10

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 77

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Asp Met Asn
1 5 10

<210> 78
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 78

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala Val Asp
1 5 10

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 79

Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Val Met Arg
1 5 10

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> 家兔

[0045] <400> 80

Cys Ile Tyr Ala Ser Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 81
<211> 18
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 81

Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

Arg Gly

<210> 82
<211> 16
<212> PRT

<213> 家兔

<400> 82

Cys Ile Tyr Ala Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 83

<211> 17

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 83

Cys Ile Asp Thr Gly Arg Gly Tyr Thr Tyr His Ala Ser Gly Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> 家兔

[0046]

<400> 84

Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr Ala Gly Trp Ala Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 85

<211> 18

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 85

Cys Thr Tyr Thr Gly Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 86

<211> 17

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 86

Cys Ile Gly Ala Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Thr Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 87

<211> 18

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 87

Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

Arg Gly

[0047]

<210> 88

<211> 18

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 88

Cys Leu Asn Gly Gly Asp Ser Asp Thr Thr Val Tyr Ala Arg Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 89

Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 90
<211> 17
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 90

Cys Ile Tyr Val Gly His Asp Ser Leu Tyr Tyr Ala Gly Trp Ala Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 91
<211> 17
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 91

Cys Ile Gly Ala Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Phe Ala Ser Trp Ala Lys
1 5 10 15

[0048] Gly

<210> 92
<211> 18
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 92

Cys Ile Ser Ala Gly Ser Ser Gly His Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 93
<211> 18
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 93

Cys Ile His Ala Leu Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

Arg Gly

<210> 94
<211> 18
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 94

Cys Ile Asn Thr Gly Ser Ser Val Thr Thr Val Tyr Ala Arg Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 95
<211> 18
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 95

[0049] Cys Ile Tyr Ala Gly Ala Ser Gly Asn Ser Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

Gln Gly

<210> 96
<211> 18
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 96

Cys Ile Asn Ser Asp Asp Ser Gly Thr Asn Val Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 97
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 97

Tyr Ile Thr Ile Ser Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 98
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 98

Leu Ile Ala Thr Gly Gly Gly Thr Phe Tyr Thr Asn Trp Ala Arg Gly
1 5 10 15

<210> 99
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 99

Leu Ile Asn Thr Ile Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Ser Gly
1 5 10 15

[0050]

<210> 100
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 100

Val Ile Trp Asn Asn Gly Glu Ile Phe Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 101
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 101

Ile Ile Ala Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Thr Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 102
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 102

Val Ile Ser Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Asp
1 5 10 15

<210> 103
<211> 9
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 103

Ser Gly Gly Tyr Ala Ala Tyr Asp Leu
1 5

<210> 104
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 104

Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu
1 5 10 15

[0051]

<210> 105
<211> 12
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 105

Asp Ile Val Gly Asp Asn Ile Tyr Tyr Phe Asn Phe
1 5 10

<210> 106
<211> 15
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 106

Ser Ser Tyr Val Arg Tyr Asp Asn Arg Asn Tyr Gly Phe Asn Leu
1 5 10 15

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 107

Gly Ala Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Phe Ser Leu

	1	5	10
	<210>	108	
	<211>	11	
	<212>	PRT	
	<213>	家兔	
	<400>	108	
	Pro Asp Val Gly Phe Asp Phe Ala Ile Asn Phe		
	1	5	10
	<210>	109	
	<211>	14	
	<212>	PRT	
	<213>	家兔	
	<400>	109	
	Glu Asp Pro Gly Asn Asp Asp Tyr Gly Tyr Ala Asp Asn Leu		
	1	5	10
	<210>	110	
	<211>	16	
[0052]	<212>	PRT	
	<213>	家兔	
	<400>	110	
	Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu		
	1	5	10 15
	<210>	111	
	<211>	10	
	<212>	PRT	
	<213>	家兔	
	<400>	111	
	Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu		
	1	5	10
	<210>	112	
	<211>	11	
	<212>	PRT	
	<213>	家兔	
	<400>	112	
	Ser Gly Tyr Asn Asp Gly Ser Tyr Tyr Asn Leu		
	1	5	10

<210> 113
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 113

Gly Ala Ser Ile Thr Asn Ser Tyr Phe Ser Leu
1 5 10

<210> 114
<211> 14
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 114

Glu Asp Ala Gly Asn Asp Asp Tyr Gly Tyr Ala Arg Asn Leu
1 5 10

<210> 115
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

[0053]

<400> 115

Ala Ser Ala Asp Val Gly Asp Tyr Ser Leu
1 5 10

<210> 116
<211> 16
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 116

Ser Tyr Ala Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu
1 5 10 15

<210> 117
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 117

Tyr Ile Ile Pro Gly Tyr Asn Phe Asn Leu
1 5 10

<210> 118
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 118

Ser Tyr Thr Gly Tyr Ala Asp Tyr Asn Val Ala Thr Gly Leu Asn Leu
 1 5 10 15

<210> 119
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 119

Tyr Pro Ile Pro Gly Tyr His Phe Asn Leu
 1 5 10

<210> 120
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 家兔

[0054]

<400> 120

Gly Tyr Asn Thr Met Ala Ile
 1 5

<210> 121
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 121

Gly Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Phe Asn Ile
 1 5 10

<210> 122
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 122

Gly Val Pro Gly Tyr Ser Ser Ser Phe Asn Ile
 1 5 10

<210> 123
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 123

Asp Ala Asp Gly Gly Val Val Ser Tyr Phe His Val
 1 5 10

<210> 124
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 124

Gly Tyr Pro Gly Ser Ser Asp Phe Asn Ile
 1 5 10

<210> 125
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 家兔

[0055] <400> 125

Ile Trp Arg Pro Asp Asp Pro Thr Asn Ser Asp Ile
 1 5 10

<210> 126
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 126

Gln Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser
 1 5 10

<210> 127
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 127

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 128

<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 128

Gln Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Glu Leu Ser
1 5 10

<210> 129
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 129

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 130
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 130

[0056]

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Phe Ser Asn Leu Gly
1 5 10

<210> 131
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 131

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 132
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 132

Gln Ala Ser Glu Thr Ile Tyr Thr Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 133
<211> 11

<212> PRT
<213> 家兔

<400> 133

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 134
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 134

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10

<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 135

[0057] Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Thr Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 136
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 136

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Phe Ser Asn Leu Gly
1 5 10

<210> 137
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 137

Gln Ala Ser Glu Ser Ala Tyr Thr Leu Leu Ala
1 5 10

<210> 138
<211> 11
<212> PRT

<213> 家兔

<400> 138

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 139

<211> 11

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 139

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 140

[0058] Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Tyr
1 5 10

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 141

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 142

<211> 11

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 142

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Gly Tyr Leu Phe
1 5 10

<210> 143

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 143

Gln Ser Ser Gln Asn Val Leu Ile Asn Asn Arg Leu Ala
1 5 10

<210> 144

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 144

Gln Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Lys His His Leu Ala
1 5 10

<210> 145

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 145

Gln Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Asn Lys Arg Leu Ala
1 5 10

[0059]

<210> 146

<211> 11

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 146

Gln Ala Ser Gln Thr Ile Tyr Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 147

<211> 13

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 147

Gln Ser Ser Lys Ser Val Tyr Asn Lys Asn His Leu Ala
1 5 10

<210> 148

<211> 11

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 148

Gln Ala Ser Glu Ser Ile Ser Ser Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 149

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 150

<211> 7

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 150

Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

[0060]

<210> 151

<211> 7

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 151

Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 152

<211> 7

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 152

Tyr Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 153

<211> 7

<212> PRT

<213> 家兔

<400> 153

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 154
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 154

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 155

Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser
1 5

[0061] <210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 156

Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 157
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 157

Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 158
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 158

Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 159

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 160
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 160

Gly Ala Ser Ile Leu Glu Ser
1 5

[0062] <210> 161
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 161

Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 162
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 162

Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 163
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 163

Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser

	1	5
	<210> 164 <211> 7 <212> PRT <213> 家兔 <400> 164 Ala Ala Ser Asn Leu Ala Ser 1 5	
	<210> 165 <211> 7 <212> PRT <213> 家兔 <400> 165 Glu Ala Ser Lys Leu Pro Ser 1 5	
[0063]	<210> 166 <211> 7 <212> PRT <213> 家兔 <400> 166 Asp Ala Ser Lys Leu Ala Ser 1 5	
	<210> 167 <211> 7 <212> PRT <213> 家兔 <400> 167 Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser 1 5	
	<210> 168 <211> 7 <212> PRT <213> 家兔 <400> 168 Thr Ala Ser Thr Leu Ala Ser 1 5	

<210> 169
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 169

Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 170
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 170

Tyr Thr Ser Thr Pro Ala Ser
1 5

<210> 171
<211> 7
<212> PRT
<213> 家兔

[0064]

<400> 171

Tyr Ala Ser Asp Leu Ala Ser
1 5

<210> 172
<211> 12
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 172

Ala Gly Tyr Glu Ser Val Asn Thr Asp Gly His Ala
1 5 10

<210> 173
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 173

Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr
1 5 10

<210> 174
<211> 12
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 174

Gln Gln Gly Tyr Thr Tyr Ser Ser Val Asp Asn Val
1 5 10

<210> 175
<211> 13
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 175

Gln Ser Asn Tyr Gly Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Gly
1 5 10

<210> 176
<211> 11
<212> PRT
<213> 家兔

[0065]

<400> 176

Gln Ser Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 177
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 177

Gln Cys Thr Gly Tyr Thr Ile Ser Trp Pro
1 5 10

<210> 178
<211> 14
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 178

Gln Ser His Tyr Phe Asp Ser Ser Ser Gly Tyr Gly Asn Thr
1 5 10

<210> 179
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 179

Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr
 1 5 10

<210> 180
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 180

Gln Gln Gly Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile
 1 5 10

<210> 181
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 家兔

[0066] <400> 181

Gln Arg Tyr Ser Trp Asn Gly Ser Tyr Gly Val Ser
 1 5 10

<210> 182
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 182

Gln Ser Ala Tyr Tyr Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 183
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 家兔

<400> 183

Gln Ser His Tyr Phe Gly Ser Ser Ser Gly Tyr Ala Asn Thr
 1 5 10

<210> 184

<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 184

Gln Ser Thr Tyr Tyr Gly Asn Gly His Pro
1 5 10

<210> 185
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 185

Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr
1 5 10

<210> 186
<211> 12
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 186

[0067]

Gln Gln Gly Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile
1 5 10

<210> 187
<211> 10
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 187

Leu Gly Ser Phe Thr Gly Ser Asp Thr Thr
1 5 10

<210> 188
<211> 12
<212> PRT
<213> 家兔

<400> 188

Gln Gln Ser Tyr Ser His Ile Asn Val Asp Asn Ile
1 5 10

<210> 189
<211> 11

	<212>	PRT
	<213>	家兔
	<400>	189
	Gln Ala Gly Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Asn Ala	
	1	5 10
	<210>	190
	<211>	11
	<212>	PRT
	<213>	家兔
	<400>	190
	Ala Gly Gly Tyr Pro Ser Asp Ser Asp Asn Thr	
	1	5 10
	<210>	191
	<211>	12
	<212>	PRT
	<213>	家兔
	<400>	191
[0068]	Ala Gly Tyr Lys Ala Thr Thr Thr Asp Ala Ser Ala	
	1	5 10
	<210>	192
	<211>	12
	<212>	PRT
	<213>	家兔
	<400>	192
	Gln Gln Gly Tyr Asn Ser Arg His Val Asp Asn Val	
	1	5 10
	<210>	193
	<211>	11
	<212>	PRT
	<213>	家兔
	<400>	193
	Ala Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Ser Asp Asn Thr	
	1	5 10
	<210>	194
	<211>	12
	<212>	PRT

<213> 家兔

[0069] <400> 194

Leu Gly Gly Tyr Ala Thr Ala Ala Tyr Arg Thr Ala
1 5 10

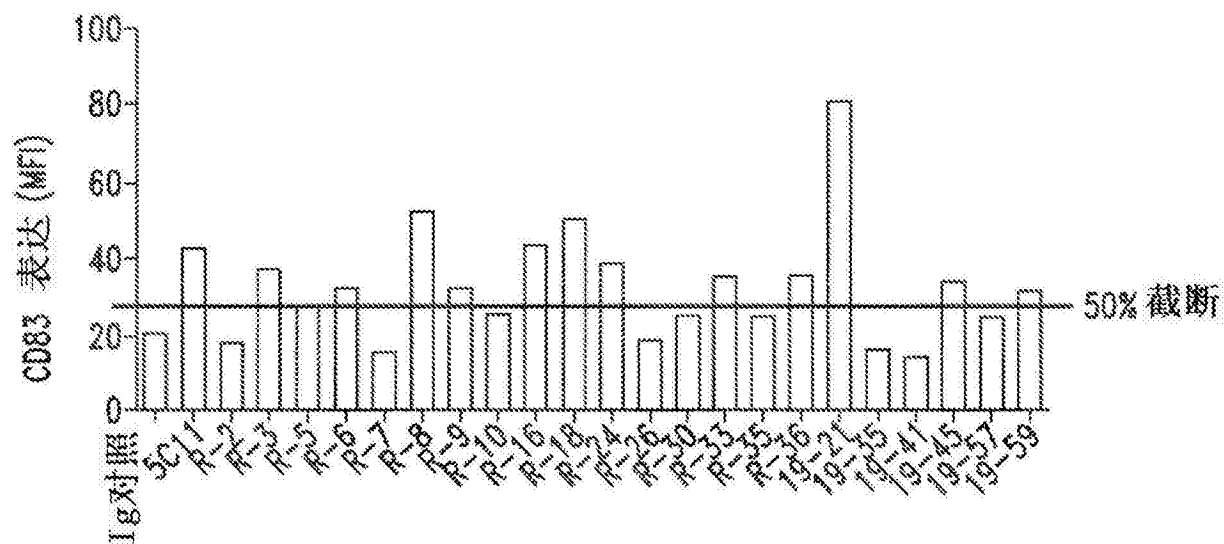


图1A

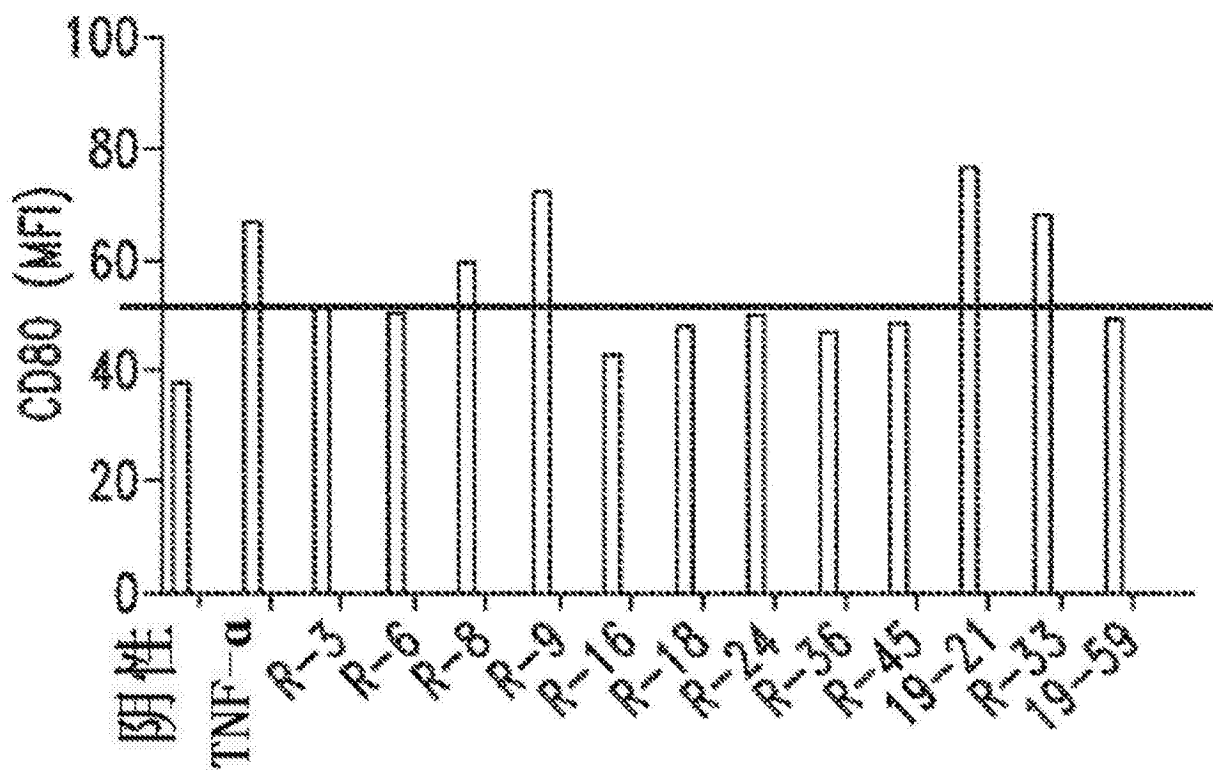


图1B

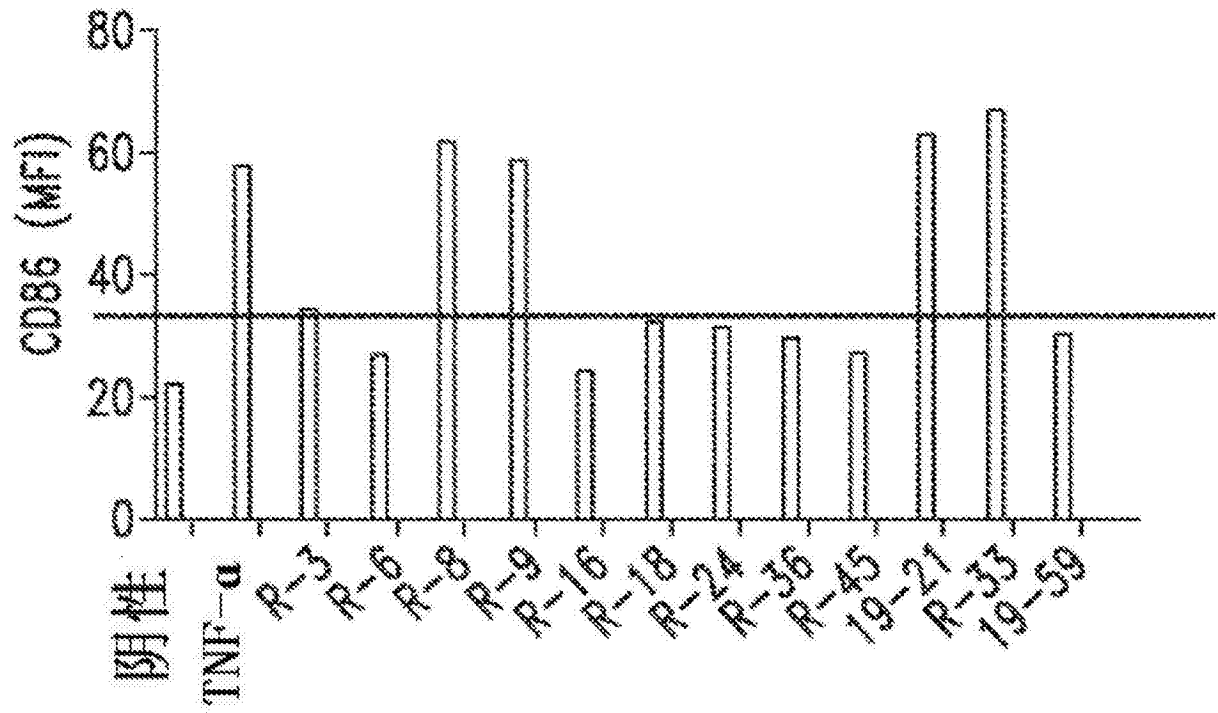


图1C

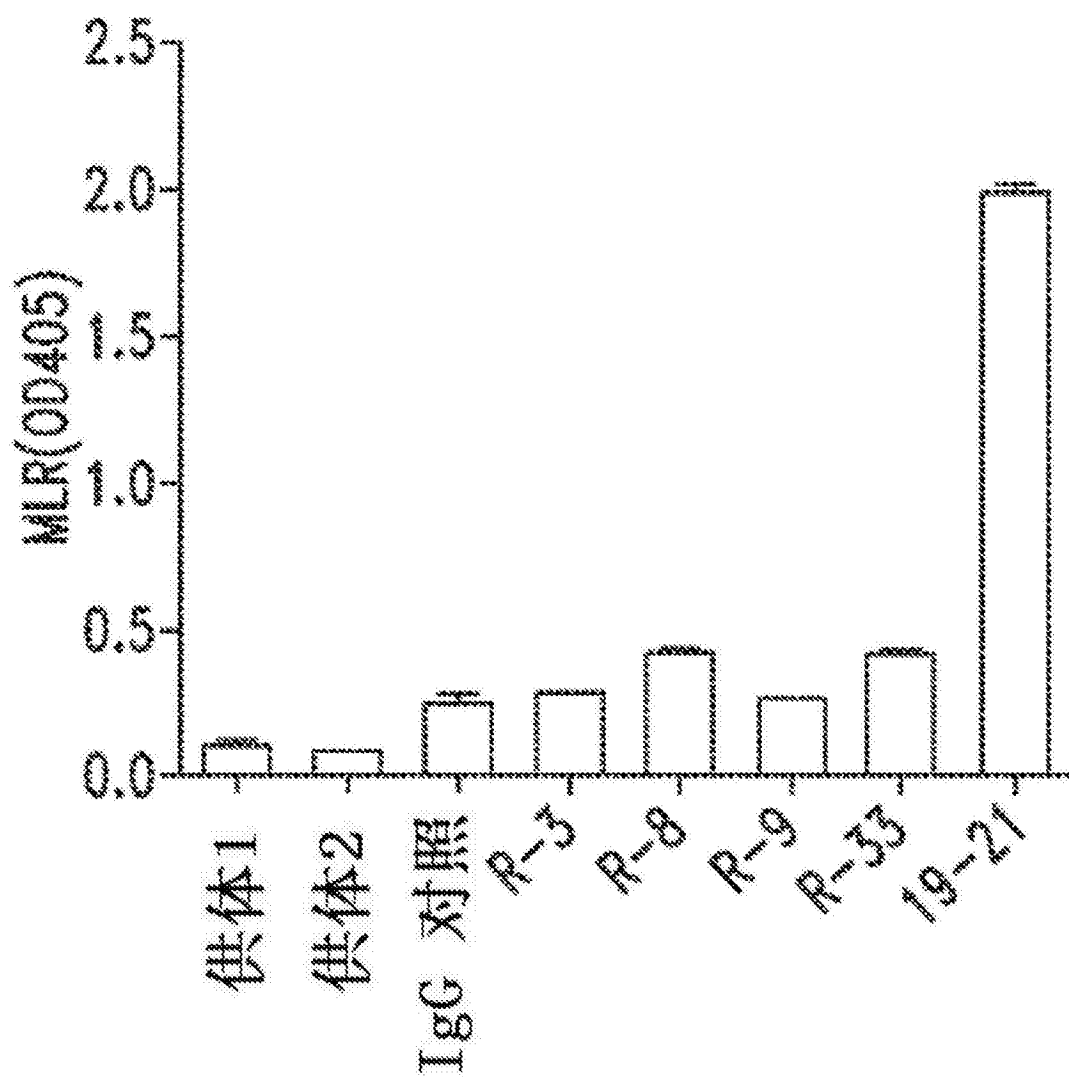


图1D

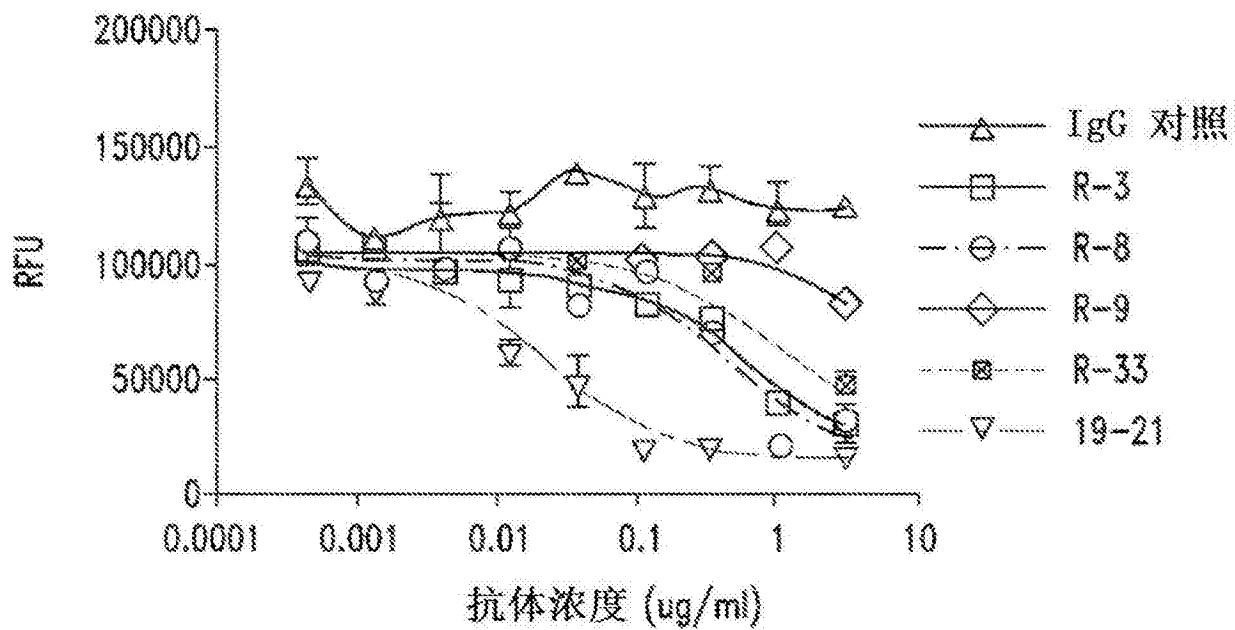


图2

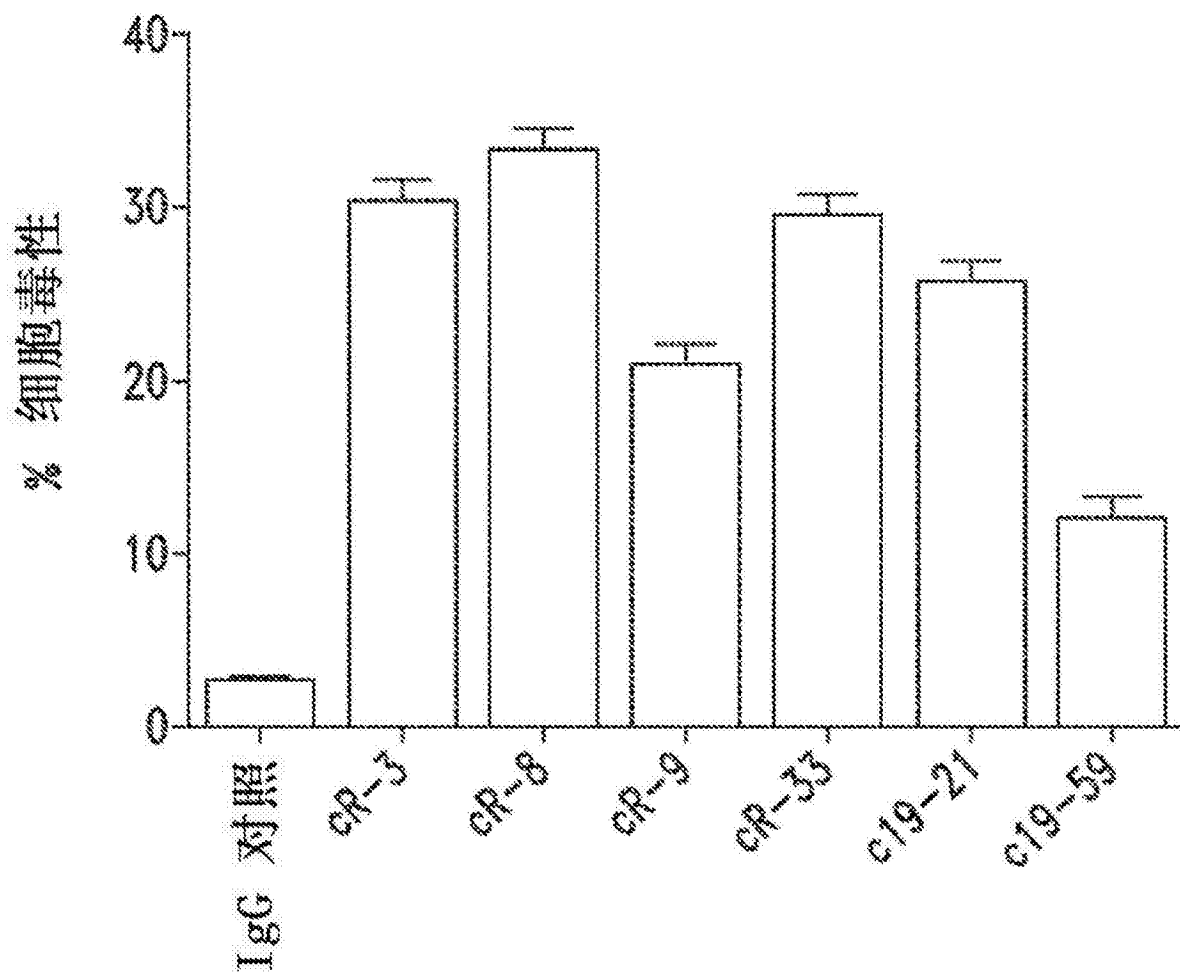


图3

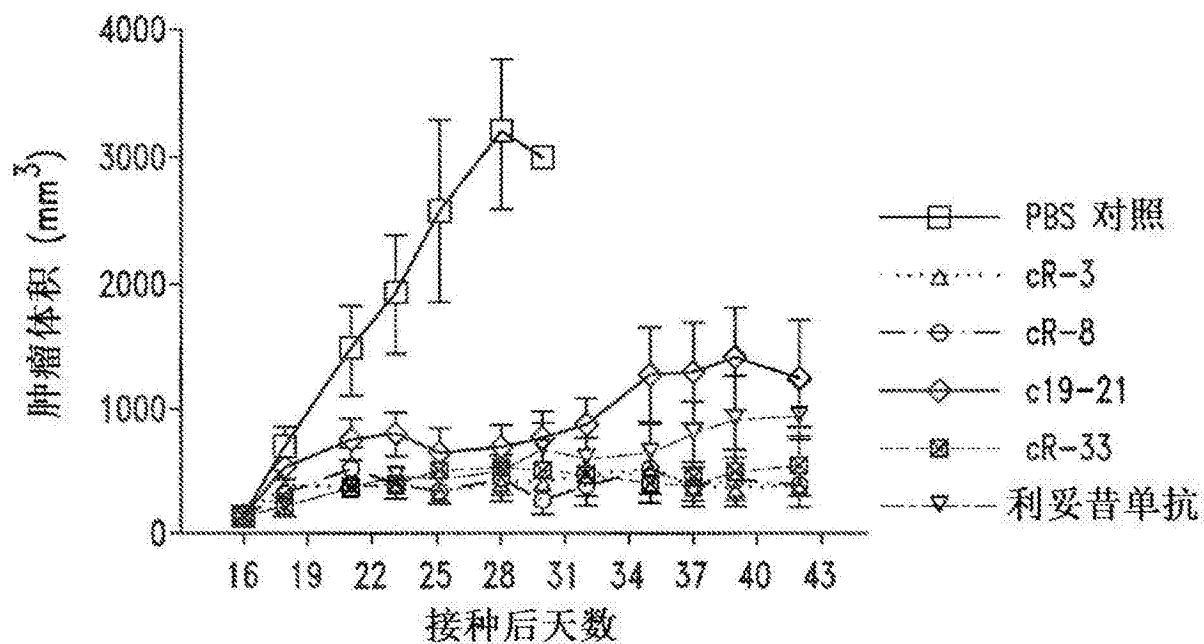


图4A

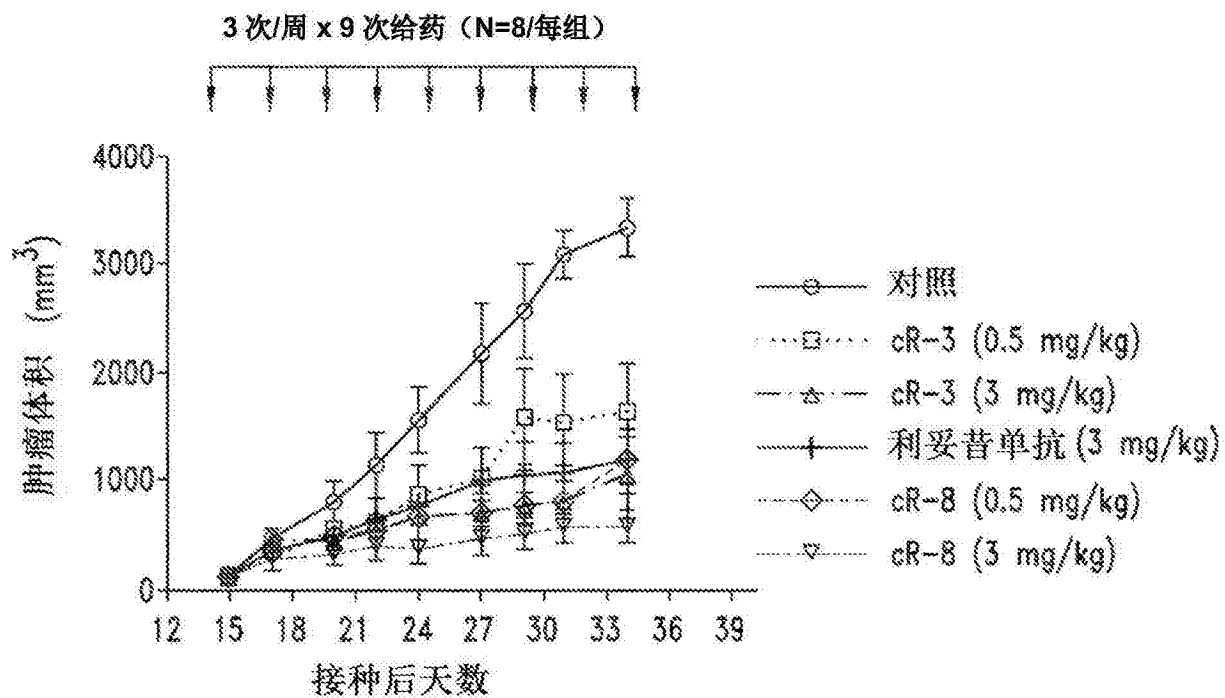


图4B

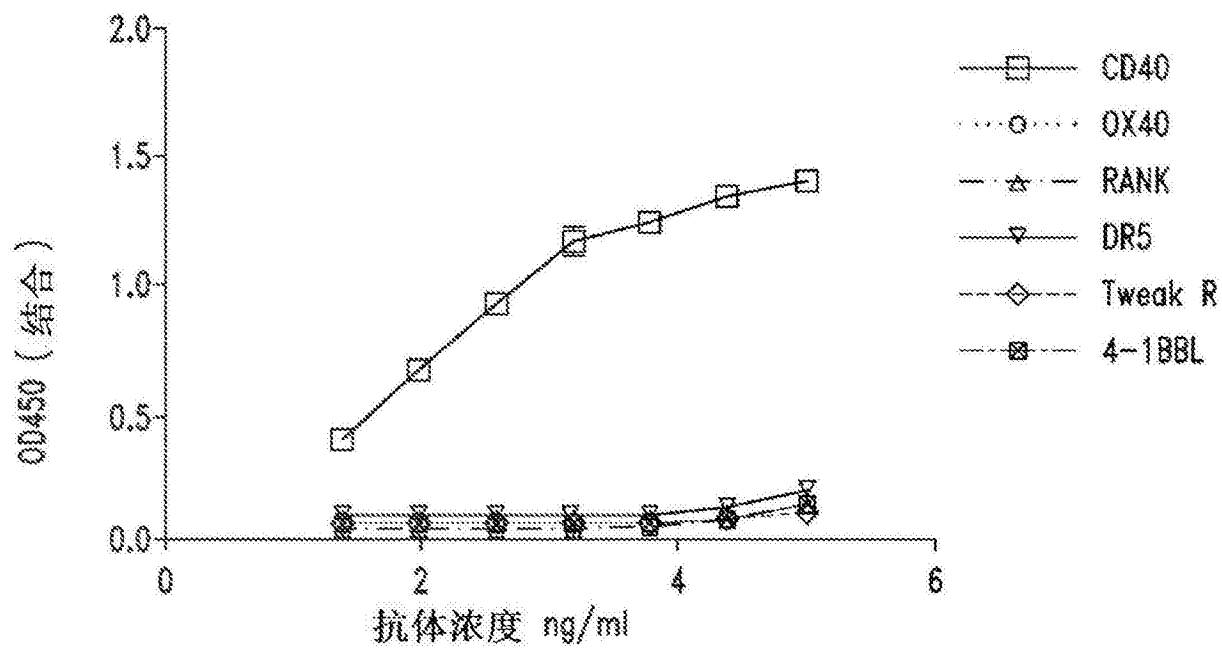


图5

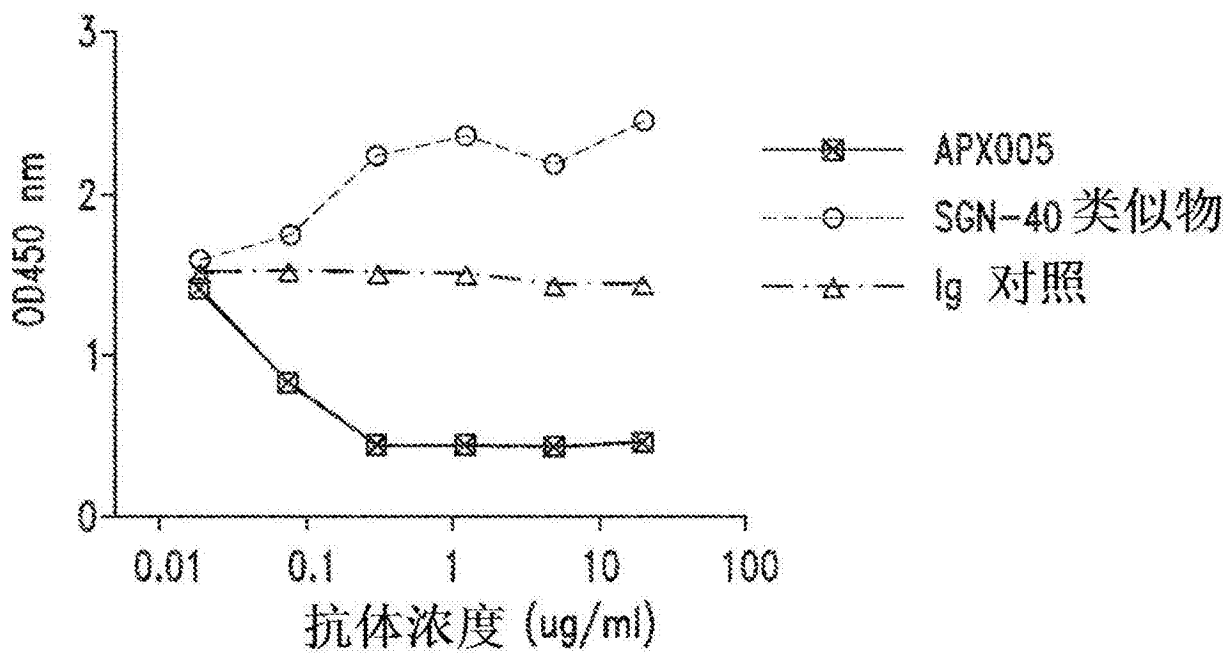


图6

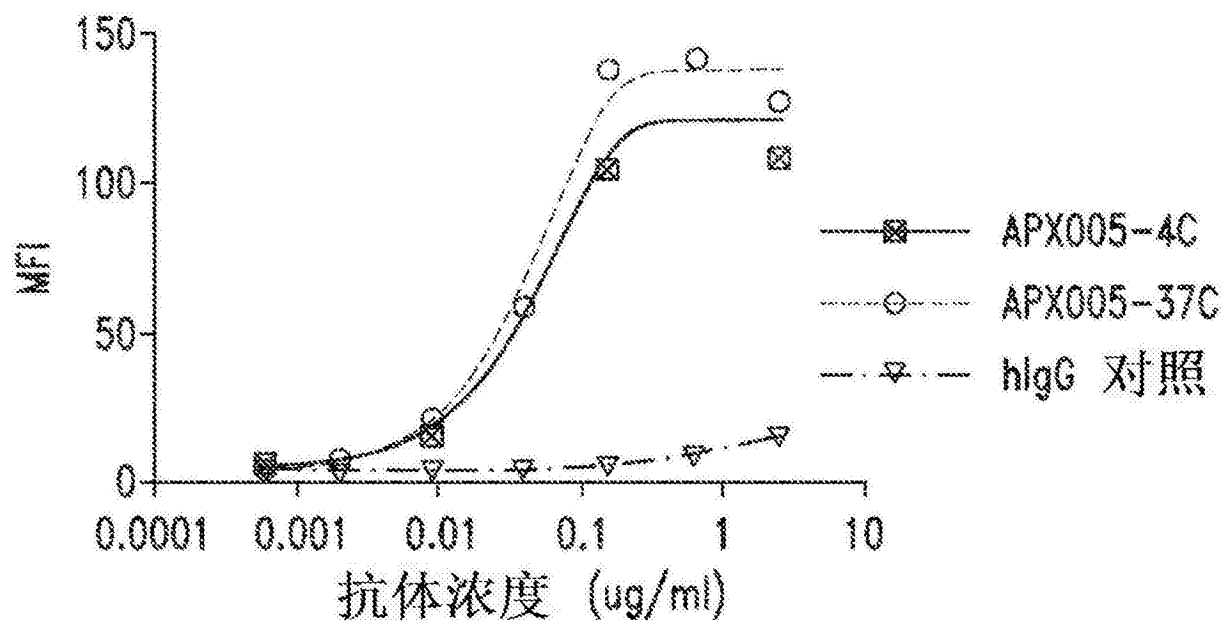


图7

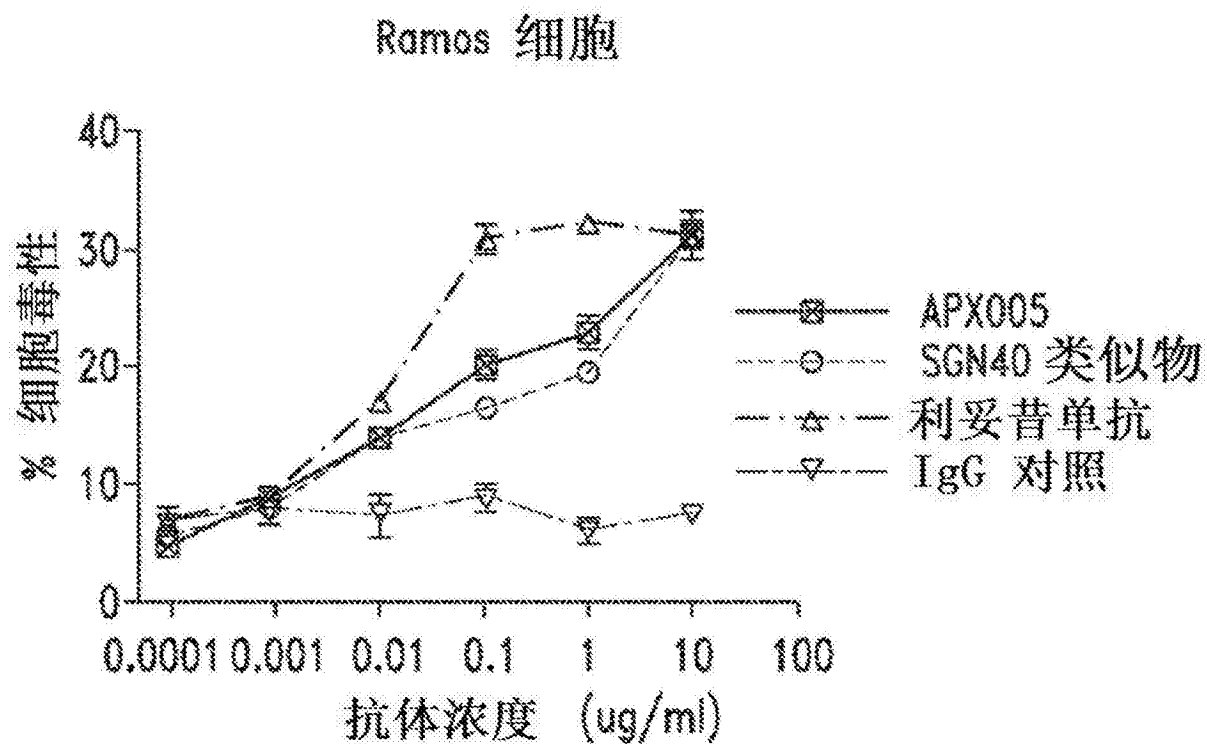


图8A

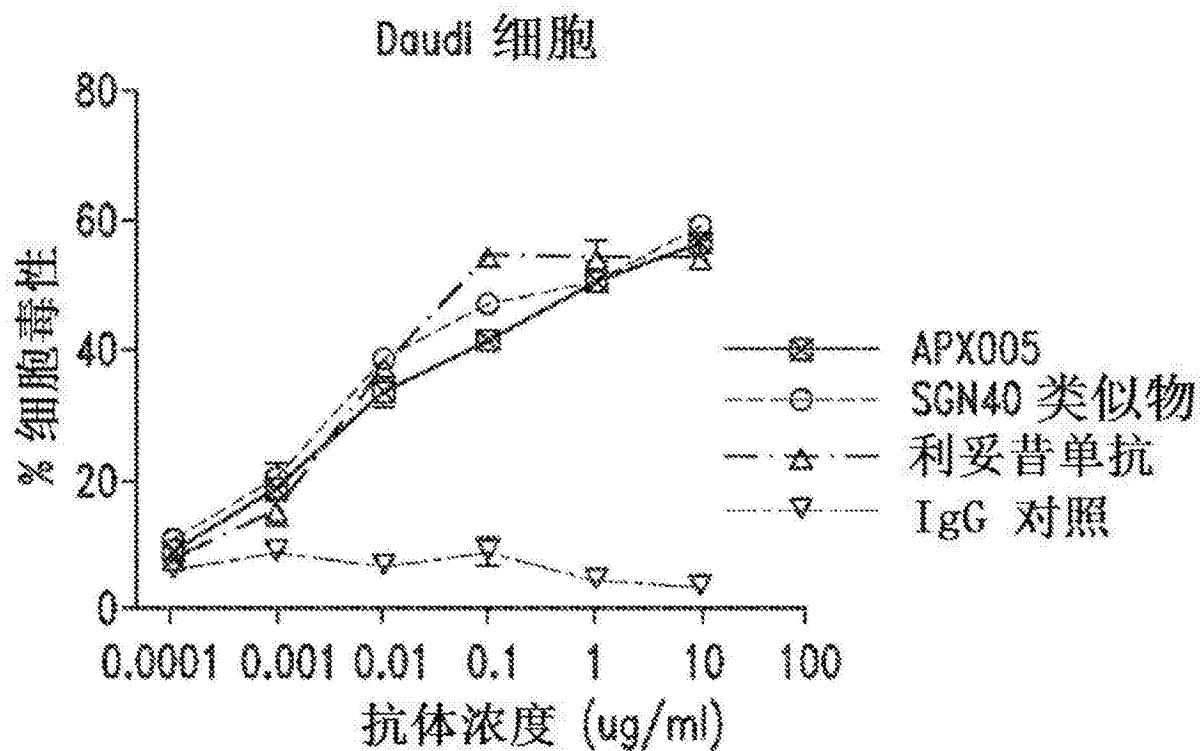


图8B

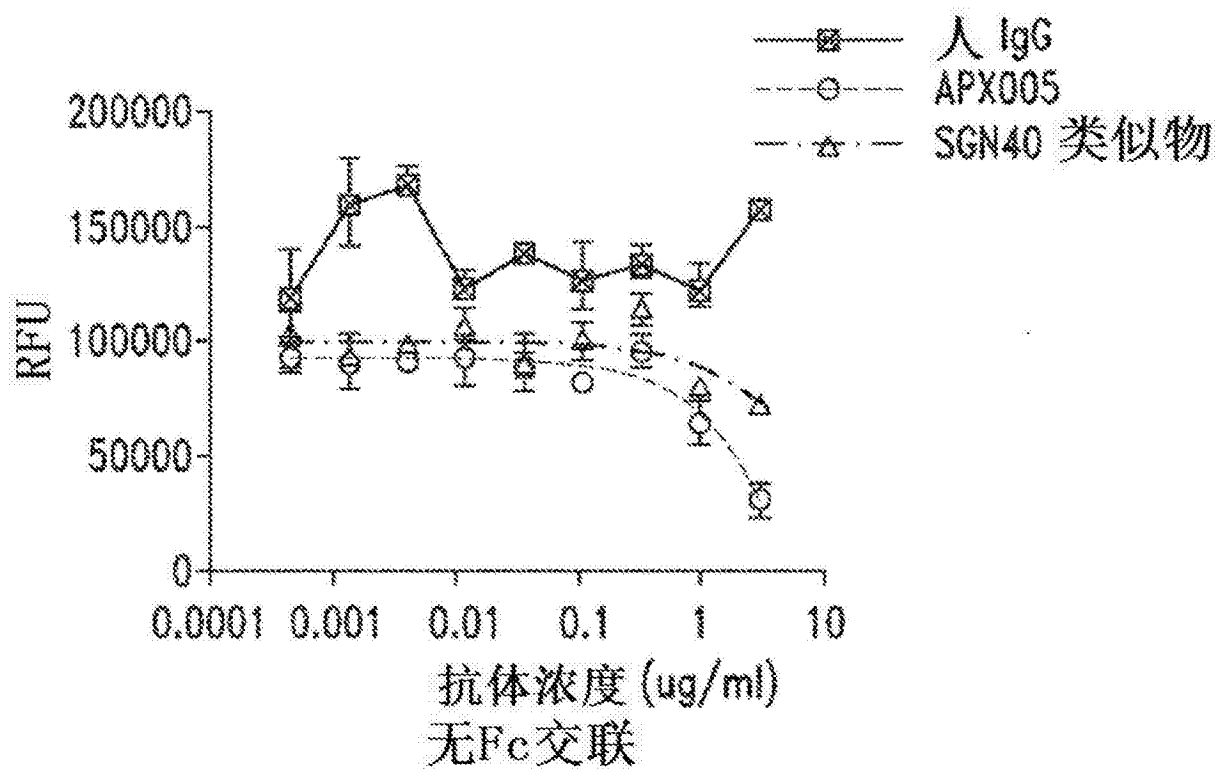


图9A

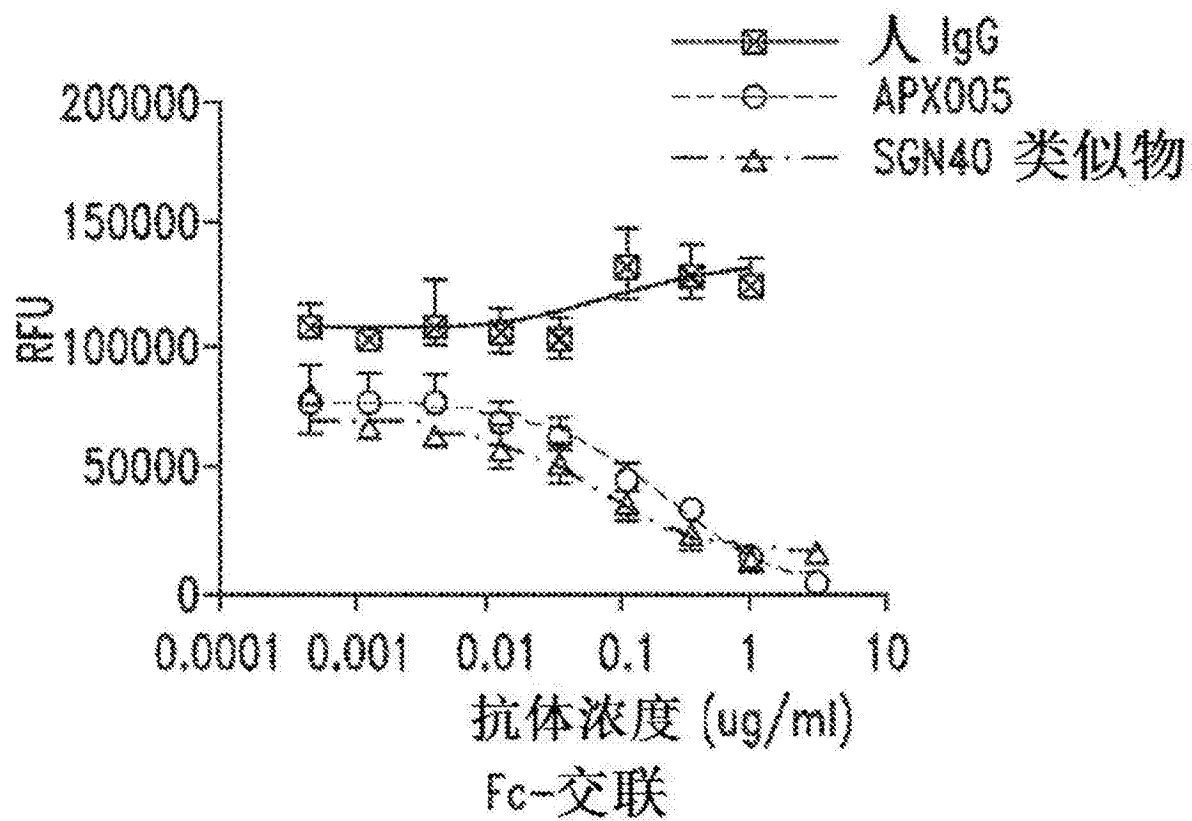


图9B

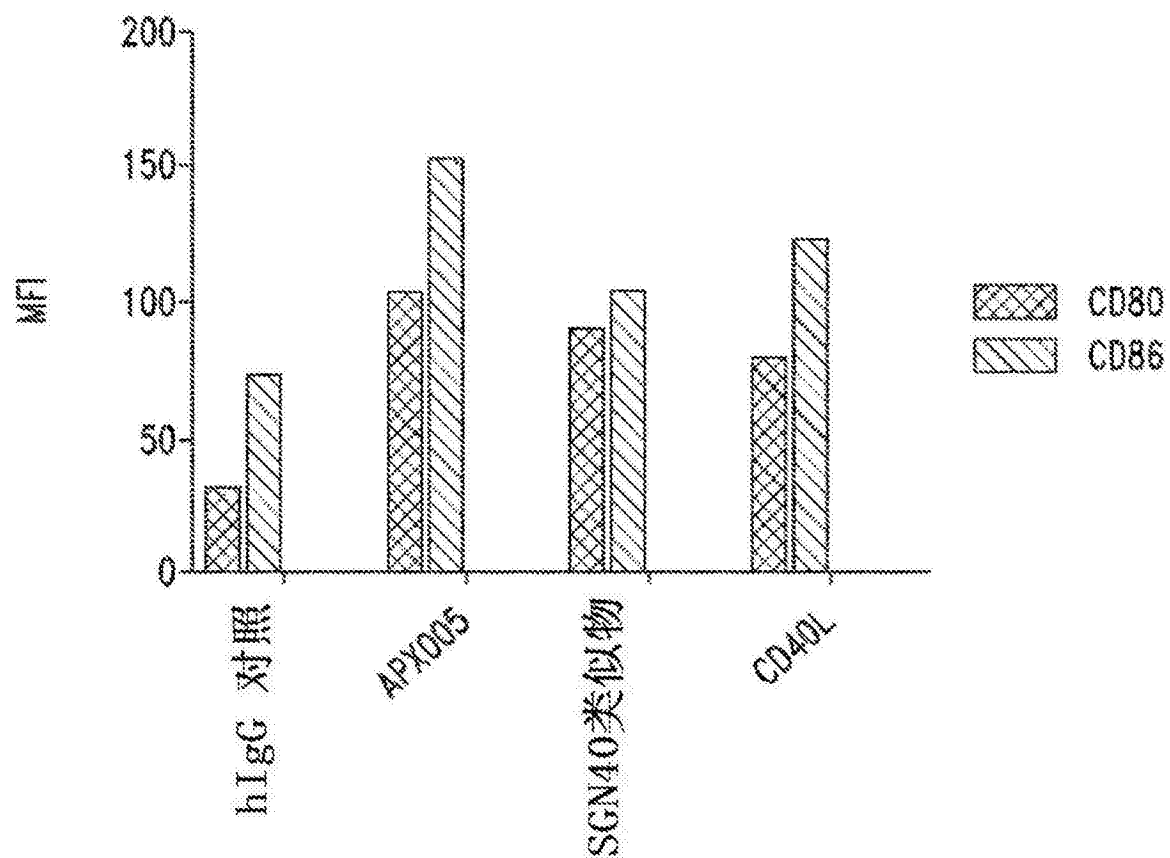


图10

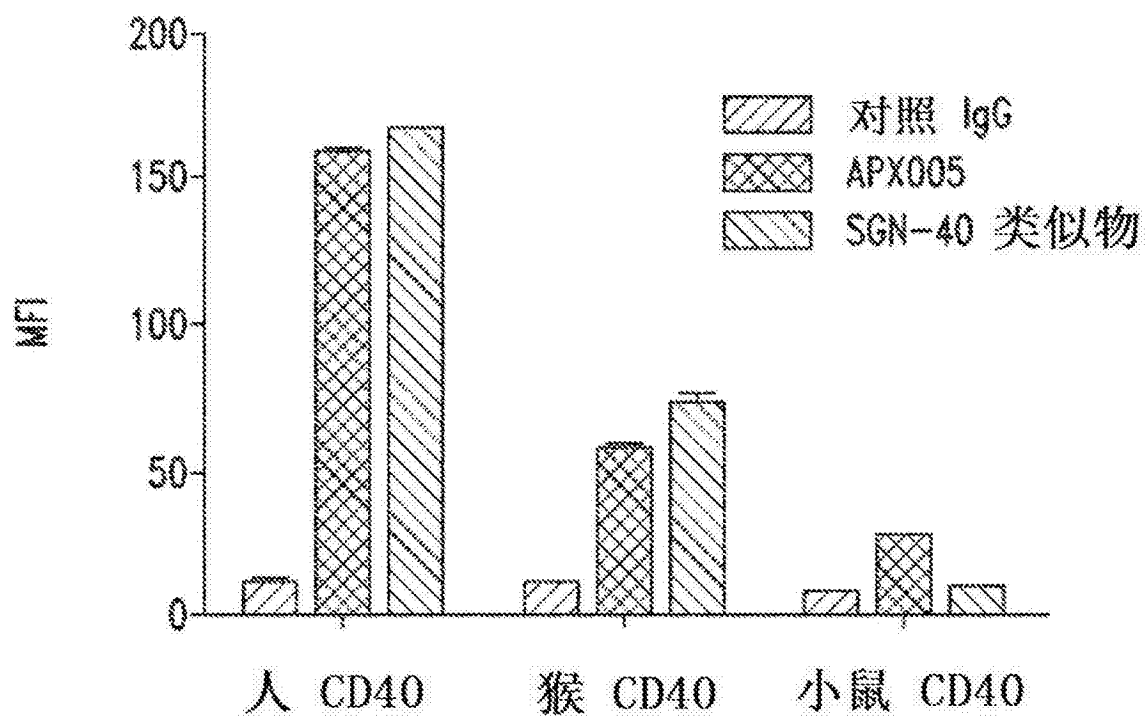


图11A

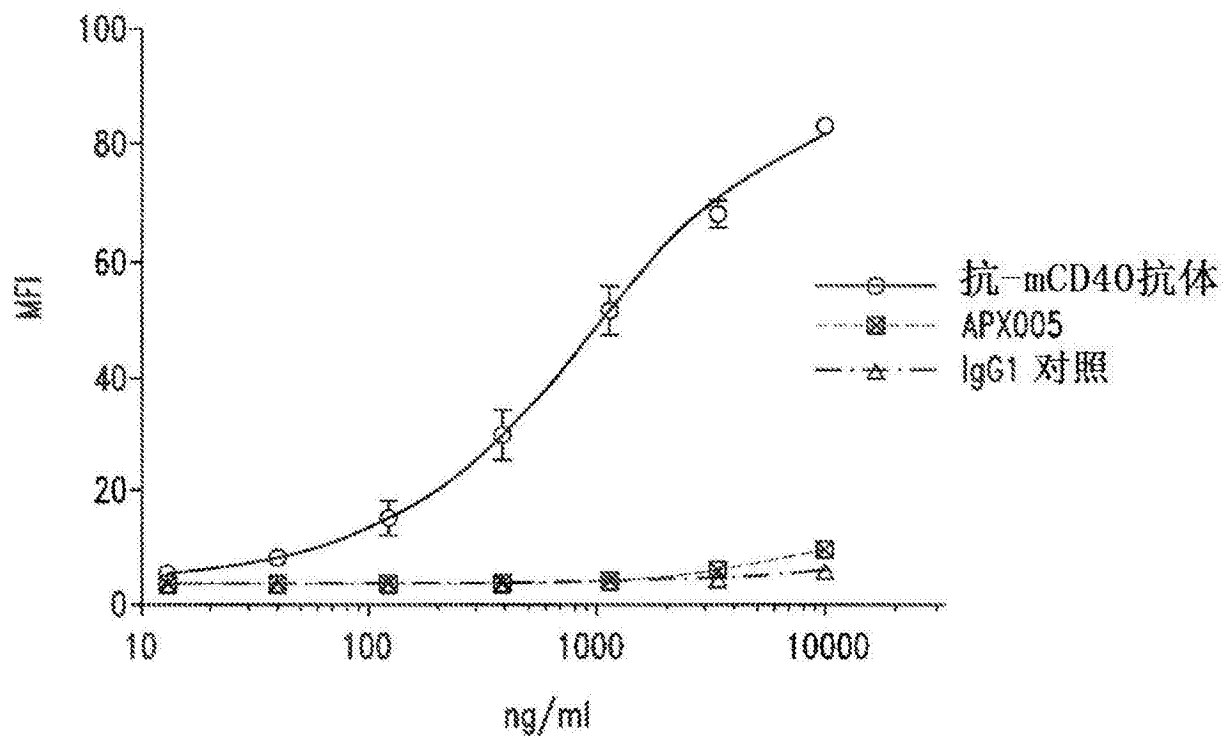


图11B

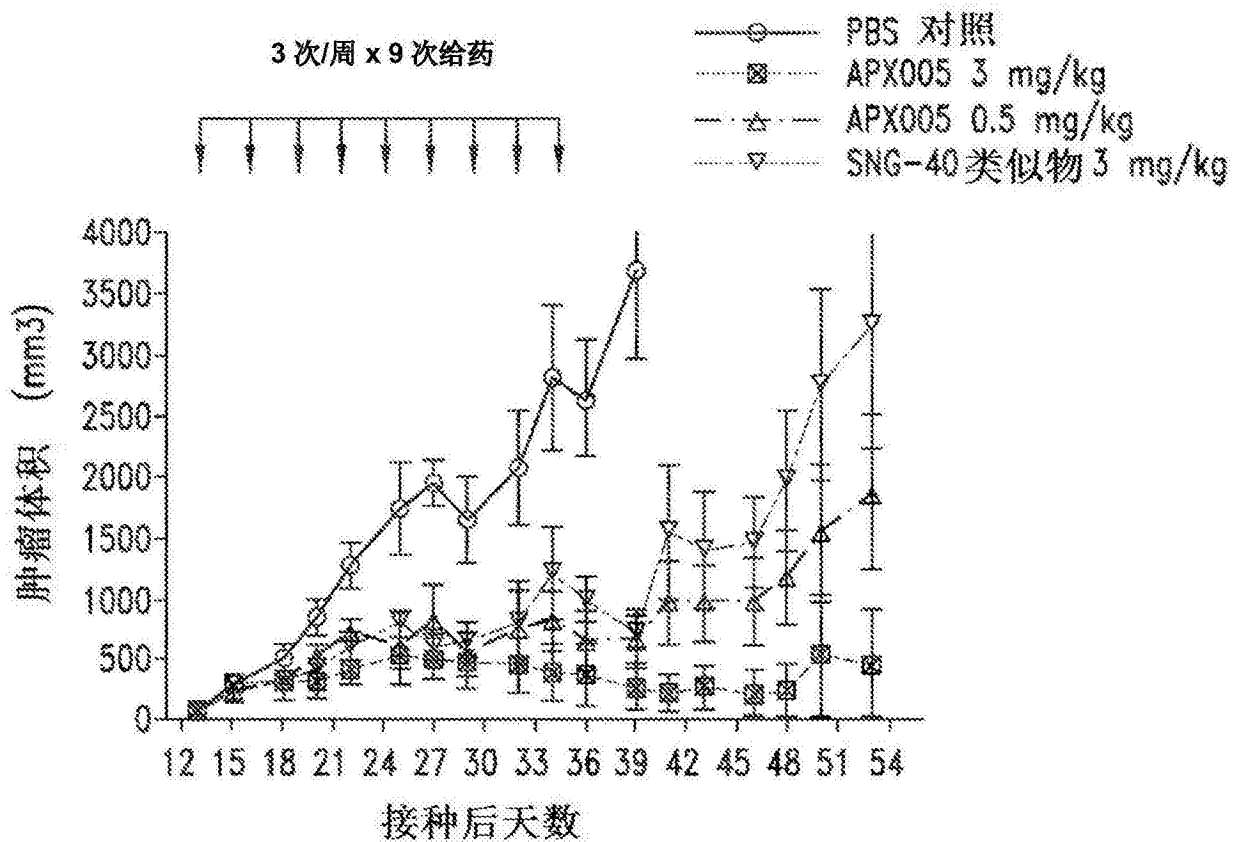


图12A

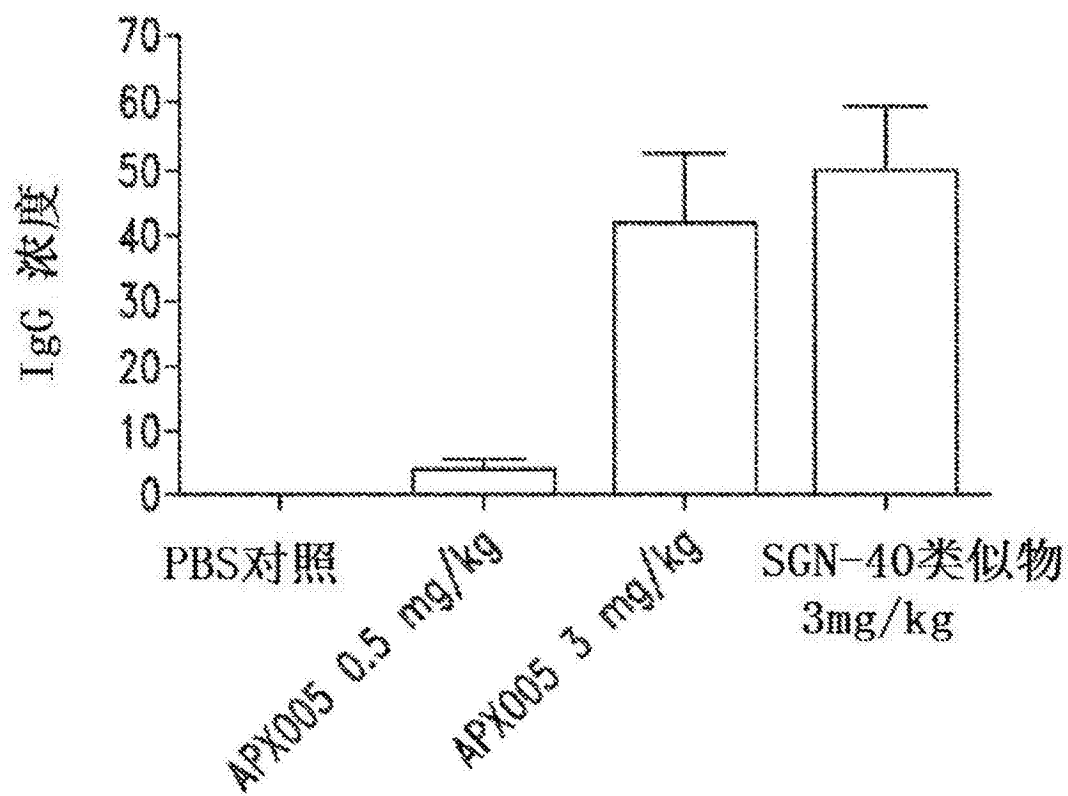


图12B

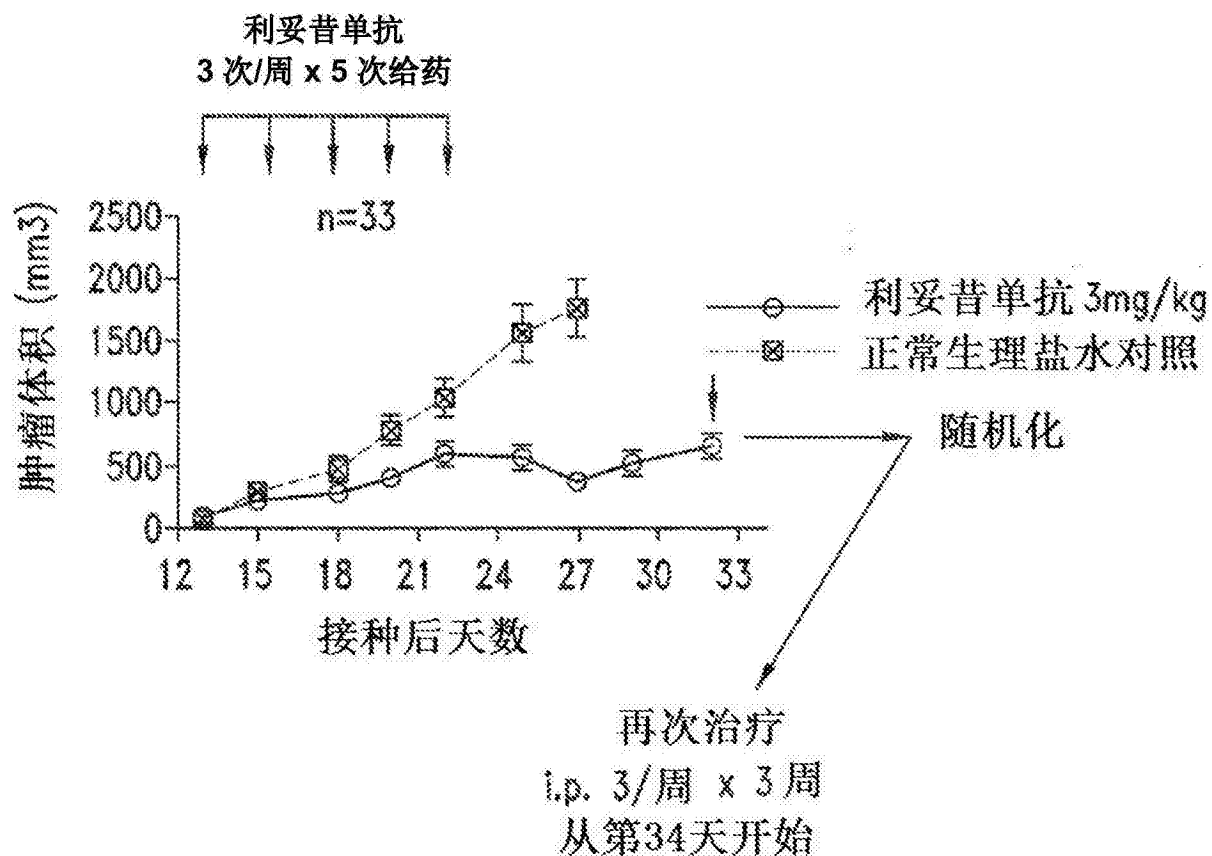


图13A

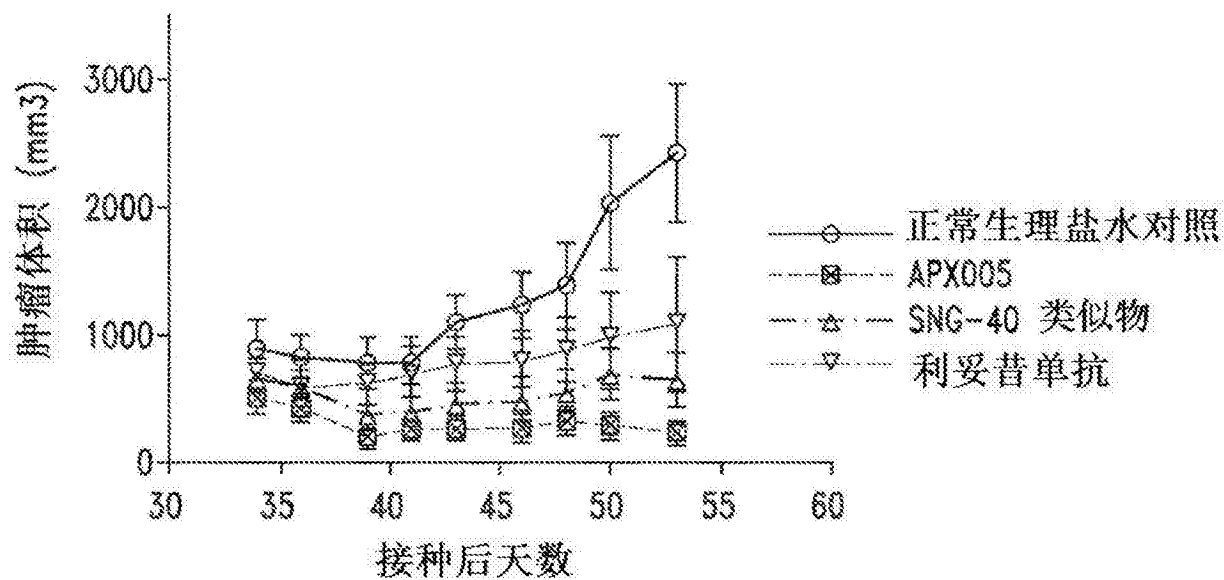


图13B

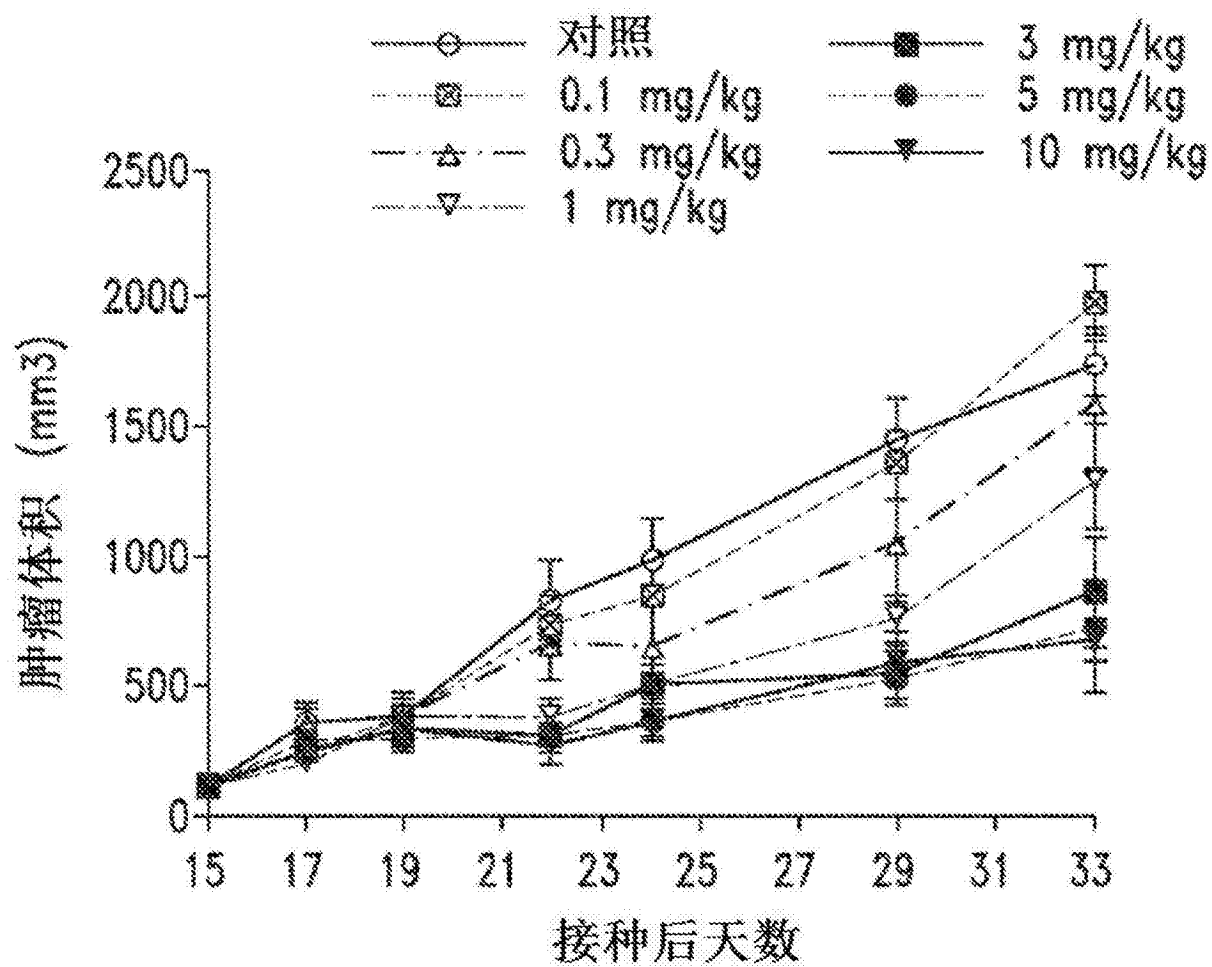


图14

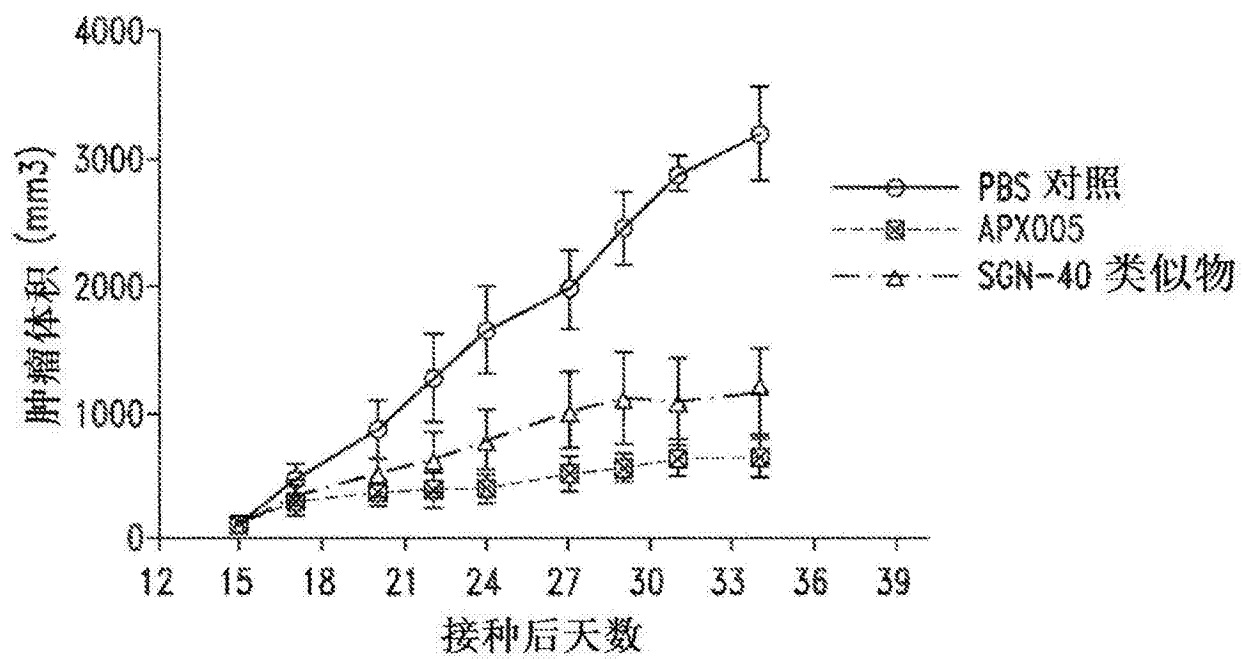


图15

抗-CD40 兔单克隆抗体重链

-----CDR1-----

R-2 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QQLEESGGGLVKPGASLTLTCKANGGFSPSAN-YYMC

R-3 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSPSDS-FWIA

R-5 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QEQLVESGGDLVKPGASLTLTCKASGFDLSST-YYMC

R-6 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QEQLVESGGGLVQPGGSLTLTGTASGFSFSSS-YSMC

R-7 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QEQLVESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSPGSG-YYMC

R-8 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSPSS--TYVC

R-9 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASRFSFSS--TYMC

R-10 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QEQLVESGGGLVKPGASLAVTCKASGFSFRG-YYMC

R-12 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSPSDS-FWIA

R-16 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGGLVKPGGTLTLTCKASGFSLNY--YWPC

R-18 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGIDFSY-YYMC

R-20 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QEQLVESGGDLVKPGASLTLTCTASGSPGSG-YYMC

R-24 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSPFRG-YYIC

R-26 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QEQLVESGGDLVQPGGSLTLTSTASGFSLSSS-YFMC

R-30 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSPSDS-FWIA

R-33 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSPSSS-YWIC

图16A

抗-CD40 兔单克隆抗体重链

=====CDR2=====

R-2 WVRQAPGKGLELIACIYA--SSGSTWYASWAKGRFTISKSTSLNTVTLQMTSLTVAD

R-3 WVRQAPGKGLEWIGCIHAL-SSGSTYYANWARGRFTISKTSST-TVTLQMNSLTAAD

R-5 WVRQAPGKGLEWIGCIY---ATGGTYIASWAKGRFTISKTSPT-TVTLQMPSLTAAD

R-6 WVRQAPGKGLEWIGCIDT---GRGYTYHASKAKGRFTFSKTSST-TVTLQMTSLTAAD

R-7 WVRQAPGKGLEWIGCIYV--GHDSLYYACWARGRFTISKTSST-TVTLQMTSLTAAD

R-8 WVRQAPGKGLEWIACIYT--GDGTNYASWAKGRFTISKPSST-TVTLQMTSLTPAD

R-9 WVRQAPGKGLEWIACTYTG-SSGGTYIASWAKGRFTISQTSST-TVTLQLTGLTPAD

R-10 WVRQAPGKGLEWIAACIGA--GSGNTYYATWTKGPATISKTSWT-TVSLEMTSLTGAD

R-12 WVRQAPGKGLEWIGCIHAL-SSGSTYYANWARGRFTISKTSST-TVTLQMNSLTAAD

R-16 WVRQAPGKGLEWVACLNGG-DSDTTVYARWAKGRFTISKASST-TVTLQMTSLTAAD

R-18 WVRQAPGKGLEWIGCIYA--GSGSTYYASWAKGRFTISKTSST-TVTLQMTSLTAAD

R-20 WVRQAPGKGLEWIGCIYV--GHDSLYYACWARGRFTISKTSST-TVTLQMTSLTAAD

R-24 WVRQAPGKGLEWIAACIGA--GSGGTYFACWAKGRFTISERTSST-TVTLQMTSLTAAD

R-26 WVRQAPGKGLEWIAACISAG-SEGHTYYASWAKGRFTVSKTSST-TVTLQMTSLTAAD

R-30 WVRQAPGKGLEWIGCIHAL-ESGSTYYANWARGRFTISKTSST-TVTLQMNSLTAAD

R-33 WVRQAPGKGLEWIAACINTG-SSVTTVYARWAKGRFTISKASST-TVTLQMTSLTAAD

图16B

抗-CD40 兔单克隆抗体重链

CDR3

R-2	TATYFCAR <u>SSGGYAAY</u> -----DLWGPGTLVTVSS
R-3	TATYFCAR <u>SYAGYADYNVATGL</u> ---NLWGPGTLVTVSS
R-5	TATYFCAR <u>DIVGDNIYYF</u> -----NFWGPGTLVTVSS
R-6	TATYFCAR <u>SSYVRYDNRNYGF</u> ----NLWGPGTLVTVSS
R-7	TATYFCAR <u>GASITNSYF</u> -----SLWGPGTLVTVSS
R-8	TATYFCAR <u>PDITYGFAL</u> -----NFWGPGTLVTVSS
R-9	TATYFCAR <u>PDVGEDFAI</u> -----NFWGPGTLVTVSS
R-10	TATYFCAR <u>EDPGNDDYGYAD</u> ----NLWGPGTLVTVSS
R-12	TATYFCAR <u>SYAGYADYNVATGL</u> ---NLWGPGTLVTVSS
R-16	TATYFCAR <u>YIIPGYHF</u> -----NLWGPGTLVTVSS
R-18	TATYFCAR <u>SGYNDGSYY</u> -----NLWGPGTLVTVSS
R-20	TATYFCAR <u>GASITNSYF</u> -----SLWGPGTLVTVSS
R-24	TATYFCAR <u>EDAGNDDYGYAR</u> ----NLWGPGTLVTVSS
R-26	TATYFCAR <u>ASADVGDY</u> -----SLWGPGTLVTVSS
R-30	TATYFCAR <u>SYAGYADYNVATGL</u> ---NLWGPGTLVTVSS
R-33	TATYFCAR <u>YIIPGYNF</u> -----NLWGPGTLVTVSS

图16C

抗-CD40 兔单克隆抗体重链

==CDR1==

R-35 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASSGFSFSGT--YWICR-36 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QQQLVESGGGLVKPGASLTLTCTASSGFSFSST--YWIC19-21 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFDLSS--NAMN19-35 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGRLITPGTPLTLTCTVSGFSLSS--YAVN19-41 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLST--YDMT19-45 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSVEESGGRLVTPGTPLTLNCTVSGFSLSS--YDMN19-57 METGLRWLLLVAVLKGVQS--QSVEESGGRLITPGTPLTLTCTISGFSLSS--YAVD19-59 METGLRWLLLVAVLKGVQC--QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLS--DYVMR

图16D

抗-CD40 兔单克隆抗体重链

=====CDR2=====

R-35 WVRQAPGKGLEWIACTYAG-ASGNSYYANWAQGRFTISKRSST-AVTLQMTSLTAAD

R-36 WVRQAPGKGLEWIGCINSD-DSGTNVYANWAKGRFTISKASST-TVTLQMTSLTAAD

19-21 WVRQAPGKGLEWIGYIFIS-GSAGYASWAKGRFTISKSTSTT--VDLKISSPTTED

19-35 WVRQAPGKGLEWIGLIATG-GGTFYTNWARGRLTISKSTSTT--VDLKMPSPQTED

19-41 WVRQAPGKGLEWLGLINTI-GSAYYASWASGRFTISKSTST--VTLKMTSPPTED

19-45 WVRQAPGKGLEWIGVIWNN-GEIFYASWAKGRFTISKSTSTT--VDLKITSPTTED

19-57 WVRQAPGKGLEWIGLIATG-GGTYTNNWAKGRFTISKSTSTT--VDLKMTSPQPED

19-59 WVRQAPGKGLEWIGVISSA-GNTYYATWAKGRFTISKSTSTT--VDLRIASPTTED

图16E

抗-CD40 兔单克隆抗体重链

=====CDR3=====

R-35	TATYFCARSYTGYADYNVATGL---NLWGPGTLVTVSS
R-36	TATYFCARYPIPGYHF-----NLWGPGTLVTVSS
19-21	TATYFCARGYNTMA-----IWGPGTLVTVSS
19-35	TATYFCVRGYPGSSDF-----NIWGPGTLVTVSS
19-41	TATYFCVRGVPGYSSSF-----NINWGPGTLVTVSS
19-45	TATYFCAGDADGGVVSIF-----HVGPGTLVTVSS
19-57	TATYFCVRGYPGSSDF-----NIWGPGTLVTVSS
19-59	TATYFCARIWRPDDPTNS-----DIWGPGTLVTVSS

图16F

抗-CD40 兔单克隆抗体轻链

R-2	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGATE-AAVLTQTPSPVSAAVGGTVSISC
R-3	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-DVVMTPQTPSSASAAGGGTVTTKC
R-5	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-ALVMTQTPSSVSAAGGGTVTINC
R-6	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARCADIVMTQTPASVEAAGGGTITINC
R-7	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGVTF-AIEMTQTPFSVSEPVGGTVTIKC
R-8	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGAPADIVMTQTPSSASEPVGGTVTIKC
R-9	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARCADIVMTQTPSSASEPVGGTVTIKC
R-10	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARCADIVMTQTPSSVSAAGGGTVTIKC
R-12	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-DVVMTPQTPSSASAAGGGTVTIKC
R-16	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-AYDMTQTPASVSAAGGDTVTIKC
R-18	MDTRAPPQLLGLLLLLWLPGARCADIVMTQTPSSVEAAGGGTVTIKC
R-20	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGVTF-AIEMTQTPFSVSEPVGGTVTIKC
R-24	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARCADIVMTQTPASVSAAGGGTVTINC
R-26	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-DVMMTPQTPASVSAPVGGTVTIKC
R-30	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-DVVMTPQTPSSASAAGGGTVTIKC
R-33	MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-AYDMTQTPASVEVAVGGTVTINC

图16G

抗-CD40 兔单克隆抗体轻链

-----CDR1----- CDR2-----

R-2 QSSKSVYNN----NNLSWYQQKPGQPPKLLIYRASTLASGVPSRFKGSSGSGTEFTLT

R-3 QASQSIG-----SYLAWYQQKPGQRPKLLIYAASNLASGVPSRFKGSRS~~SG~~TEYTLT

R-5 QASQTIS-----NELSWYQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFKGSSGSGTQFTLT

R-6 QASESIS-----SWLSWYQQKPGQRPKLLIYYTSNLASGVPSRFKGS~~SG~~ACTDFTLT

R-7 QASEDIF-----SNLGWYQQKPGQPPKLLIYAASNLES~~GV~~PSRFKGS~~SG~~SGTDFTLT

R-8 QASQSIG-----SRLAWYQQKPGQPPKLLIYRASTLASGVPSRFKGSSGSGTEFTLT

R-9 QASQSIG-----SRLAWYQQKPGQPPKLLIYRASTLASGVSSRFKGSSGSGTQFTLT

R-10 QASETIY-----TLLAWYQQKPGQPPKLLIYRASTLESGVPSRFQ~~GS~~SGSGTEFTLT

R-12 QASQSIG-----SYLAWYQQKPGQRPKLLIYAASNLASGVPSRFKGSRS~~SG~~TEYTLT

R-16 QASQSIG-----SYLYWYQQKPGQPPKLLIYQASKLASGVPSRFKGS~~SG~~SGTEYTLT

R-18 QASQSIY-----TNLAWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVPSRFKGSSGSGTDYTLT

R-20 QASEDIF-----SNLGWYQQKPGQPPKLLIYAASNLES~~GV~~PSRFKGS~~SG~~SGTDFTLT

R-24 QASESAY-----TLLAWYQQKPGQPPKLLIYGASILESGVPSRFKGS~~SG~~SGTDFTLT

R-26 QASQSIG-----TYLAWYQQKPGQPPKLLIYASTLASGVSSRFEGSR~~SV~~TEYTLT

R-30 QASQSIG-----SYLAWYQQKPGQRPKLLIYAASNLASGVPSRFKGSRS~~SG~~TEYTLT

R-33 QASQSIG-----SYLYWYQQKPGQPPKLLIYDASKLASGVPSRFKGS~~SG~~SGTQFTLT

图16H

抗-CD40 兔单克隆抗体轻链

-----CDR3-----

R-2 ISDVVCDDAATYYCAGYESVNTDG---HAFGGGTEVVVK

R-3 ISGVQREDAATYYCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL

R-5 ISDLECADAATYYCQQGYTYSSVD---NVFGGGTEVVVK

R-6 ISDLECADAATYYCQSNYGSSSSTY--YGFGGGTEVVVK

R-7 INDLECDDAATYYCQSAYYSSSY----LAFGGGTEVVVK

R-8 ISDLECADAATYYCQCTGYGIS-----WPIGGGTEVVVK

R-9 ISDLECADAATYYCQCTGYTIS-----WPFGGGTEVVVK

R-10 ISDLECADAATYYCQSHYFDSSSGYG-NTFGGGTEVVVK

R-12 ISGVQREDAATYYCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL

R-16 ISDLECADVATYYCQQGYSHINVD---NIFGGGFQVVVK

R-18 ISDLECDDAATYYCQRYSWNGSYG---VSFGGGTEVVVK

R-20 INDLECDDAATYYCQSAYYSSSY----LAFGGGTEVVVK

R-24 ISDLECADAATYYCQSNYFGSSSGYA-NTFGGGTEVVVK

R-26 ISDLECADAATYYCQSTYYGNIG-----HPFGGGTEVVVK

R-30 ISGVQREDAATYYCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL

R-33 ITGVECADAAATYYCQQGYSHINVD---NIFGGGTEVVVK

图16I

抗-CD40 兔单克隆抗体轻链

R-35 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-ALVMTQTPTSSTSAAVGGTVTIKC

R-36 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC

19-21 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGATF-AQVLTQTPSPVSAPVGGTVTINC

19-35 ALAPGARC-AVVLTQTPASVSAAVGGTVSISC

19-41 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGATF-AIVMTQTPSSKSVAVGDTVINC

19-45 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKC

19-57 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-AVVLTQTPASVSAAVGGTVSISC

19-59 MDTRAPTQLLGLLLLLWLPGARC-DVVMTQTPSSTSAAVGGTVTIKC

图16J

抗-CD40 兔单克隆抗体轻链

	=====CDR1=====	=====CDR2=====
R-35	<u>QASQSIG</u> ----- <u>SYLAWYQOKPGQPFKLLIYAASN</u> <u>LASGDFSRFSASRSGTEY</u>	
R-36	<u>QASQNIY</u> ----- <u>GYLEFWYQOKPGQPPNLLIAEAS</u> <u>KLPSCGVPSRFKSGSGSGTEY</u>	
19-21	<u>QSSQNVLIN</u> ---- <u>NRLAWYQOKPGQPFKLLIYDASK</u> <u>KLASGVPSRFKSGSGSGTQF</u>	
19-35	<u>QSSKSVYNK</u> ---- <u>HHLAWLQOKPGQPPKLLIYYAST</u> <u>LASGVPSRFKSGSGSGTQF</u>	
19-41	<u>QASESVDSN</u> ---- <u>KELAWYQOKPGQPPKLLIYTAST</u> <u>LASGVPSRFKSGSGSGTEF</u>	
19-45	<u>QASQTIY</u> ----- <u>TYLAWYLQKPGQPPKLLIYEAS</u> <u>KLASGVSSRFKSGSGSGTQF</u>	
19-57	<u>QSSKSVYNK</u> ---- <u>NHLAWLQOKPGQPPKLLIYYTST</u> <u>PASGVPSRFKSGSGSGTQL</u>	
19-59	<u>QASESIS</u> ----- <u>SSLAWYQOKPGQPFKLLIYYASD</u> <u>LASGVPSRFKSGSRSGTEY</u>	

图16K

抗-CD40 兔单克隆抗体轻链

=====CDR3=====

R-35 TLTISGVQREDAATYYCLGSFTGSD-----TTFGGGTELEIL
R-36 SLTISGVECADEAATYYCQOSYSHINVD---NIFGGGTEVVVK
19-21 TLTISGVQCDDAATYYCQAGYSSGDG-----NAFGGGTEVVVK
19-35 TLTISDVQCDDAATYYCAGGYPSDSD-----NTFGGGTEVVVE
19-41 TLTISDVVCDDAATYYCAGYKATTTDA---SAFGGGTEVVVK
19-45 TLTISGVQCDDAATYYCQQGYNSRHVD---NVFGGGTEVVVK
19-57 TLTISDVQCDDAATYYCAGGYNSDSD-----NTFGGGTEVVVE
19-59 TLTISGVQREDAATYYCLGGYATAAYR---TAFGGGTELEILC

图16L

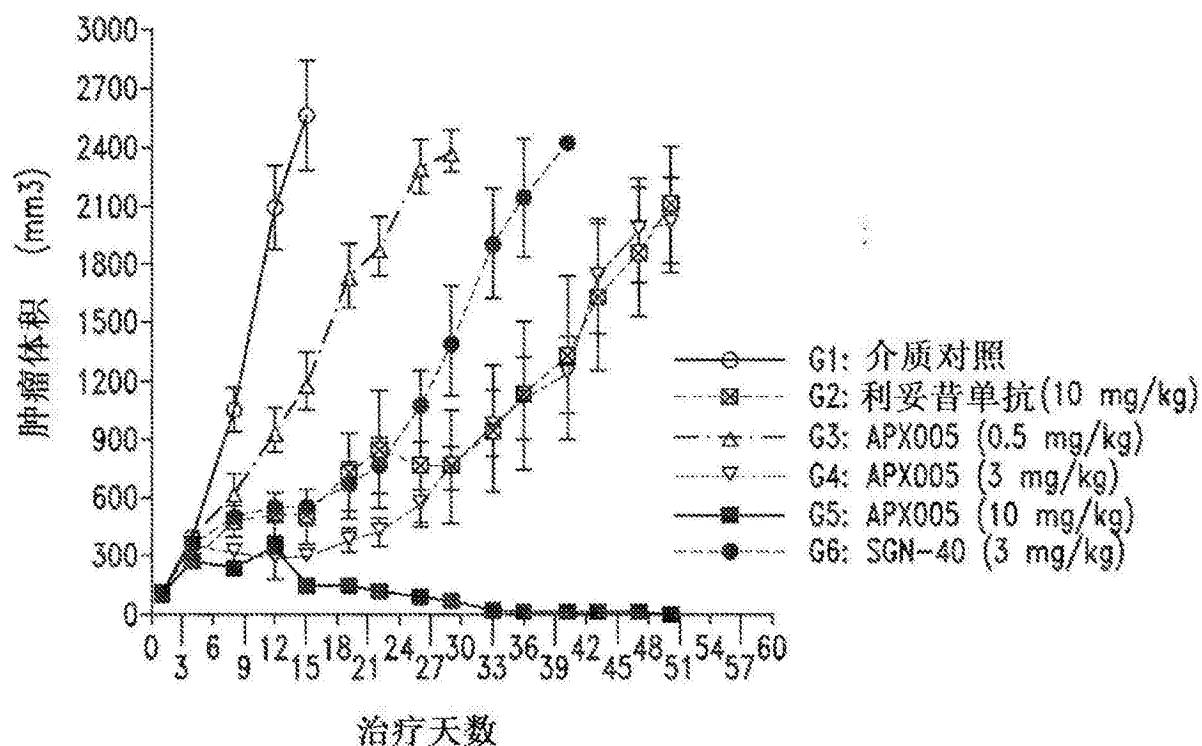


图17A

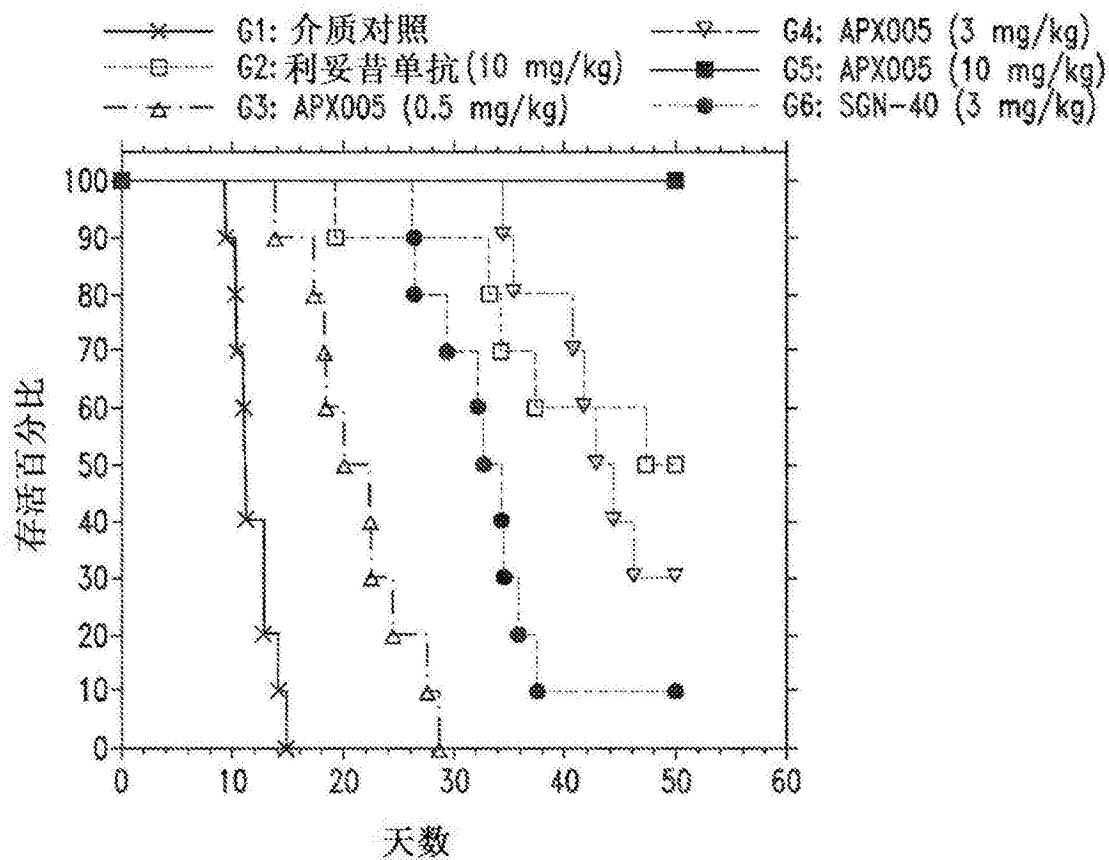


图17B

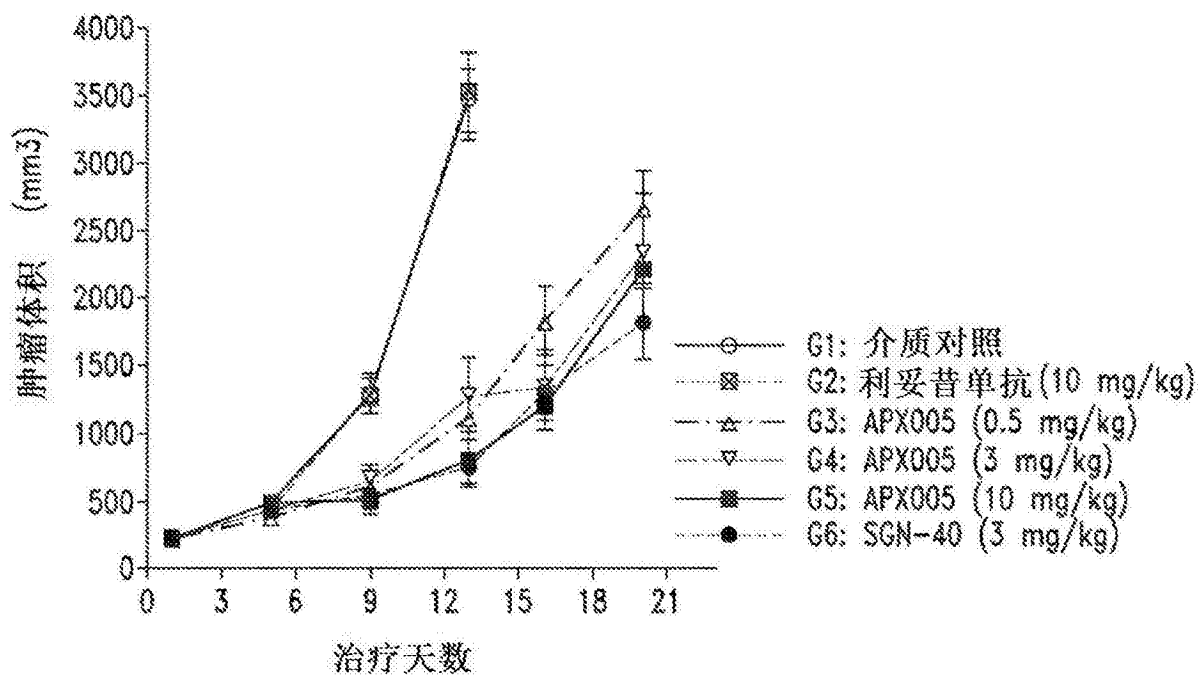


图18A

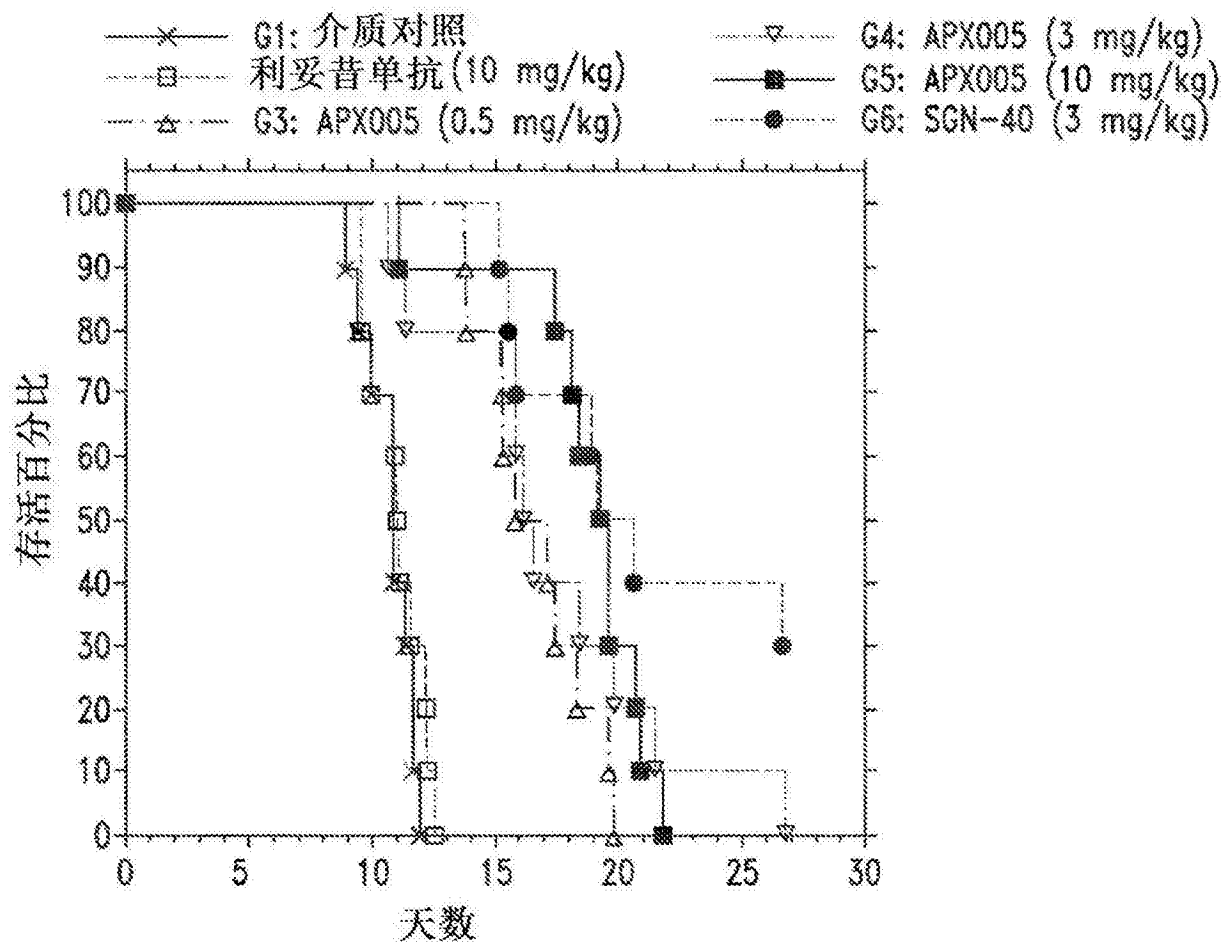


图18B