



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116063481 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 05

(21) 申请号 202211072946.X

(22) 申请日 2016.09.02

(30) 优先权数据

62/214,411 2015.09.04 US

(62) 分案原申请数据

201680064574.2 2016.09.02

(71) 申请人 普里玛托普医疗股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 余波 王日健 K.赖曼

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 张文辉

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

权利要求书4页 说明书49页

序列表 (电子公布) 附图27页

(54) 发明名称

人源化抗-CD40抗体及其用途

(57) 摘要

本公开内容涉及抗-CD40抗体,如人源化抗-CD40抗体,可以将所述抗体用于各种治疗、预防和诊断方法。所述抗体通常阻断CD40结合CD154的能力,并且在不活化表达CD40的细胞(例如,B细胞)的情况下进行。可以将本发明的抗体或其片段用于减少与器官或组织移植相关的并发症。

描述: 小鼠抗-CD40克隆2C10

重链 (信号肽+V-区)

ATGGAAAGGCACTGGATCTTTCTCTTCTGTTGTAGTAACTGCAGGTGTCCAC
TCCAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGGGCTGAACCTGGCAAACTGGGGCT
CAGTGAAGATGTCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAACTACTGGATG
ACTGGGTAAACAGAGGCTGGACAGGCTGGAATGGATTGGATACATTAAT
CCTAGCAATGATTATACTAAGTACAATCAAAAGTTCAAGGACAGCCACATTG
ACTGCAGACAAATCCTCAACACAGCCTACATGCAACTGGTAGCCTGACATCT
GAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGACAGGGGTTTCTTACTGGGGCA
AGGGACTCTGGTCACTGTCTCT

蛋白

MERHWIFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELAKPGASVKMSKASGYFTNHW
MHVVKORPGGLEWIGYINPSNDYTKYNQKFKDKATLTADKSSNTAYMQLGSL
TSEDSAVYYCARQGFYWGQGLVTVS

轻链 (信号肽+V-区)

DNA

ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATA
TATCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCC
AGGGGAGAGGTCAACATGACCTGCAGTGCAGCTCAAGTGAAGTTACATGC
ACTGGTACCACAGAGGTCAAGCACCTCCCCAAAGATGGATTATGACACA
TCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
CTCTTACTCTCTCAACATCAGCAGCATGGAGCTGAAGATGCTGCCATTATTAC
TGCCACCAAGTTGAGTAGTGACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGA
AATAAAA

蛋白

MDFOVQIFSELLTSASVLSRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVYMHW
YHQRSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSTSYSLTISMEAEADATYYCHQL
SSDPFTFGSGTKLEIK

1. 人源化抗-CD40抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含与SEQ ID NO:19、20、21、24、25和26中任意一项所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,所述轻链可变区包含与SEQ ID NO:22、23、27、28和29中任意一项所示的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区包含三个互补性决定区(CDR)CDR1、CDR2和CDR3,其分别包含与SEQ ID NO:13、14和15中所示的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列,并且其中所述轻链可变区包含三个CDR,CDR1、CDR2和CDR3,其分别包含与SEQ ID NO:16、17和18中所示的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%或100%序列同一性的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:19、20、21、24、25和26中任意一项所示的氨基酸序列具有至少85%、90%或95%的序列同一性,并且所述轻链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO:22、23、27、28和29中任意一项所示的氨基酸序列具有至少85%、90%或95%的序列同一性。

4. 根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区的氨基酸序列包含SEQ ID NO:19、20、24、25和26中任意一项所示的氨基酸序列,并且所述轻链可变区的氨基酸序列包含SEQ ID NO:22、27、28和29中任意一项所示的氨基酸序列。

5. 根据权利要求1中任意一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中:

(a) 所述抗体或其抗原结合片段的解离常数(KD)小于约 1×10^{-9} M;

(b) 所述抗体或其抗原结合片段选自下组:(a)全免疫球蛋白分子;

(b) scFv; (c) Fab片段; (d) F(ab')₂; 和(e)二硫键连接的Fv;

(c) 所述抗体或其抗原结合片段包含至少一个选自下组的恒定结构域:(a) IgG恒定结构域;和(b) IgA恒定结构域;

(d) 所述抗体或其抗原结合片段包含至少一个人恒定结构域;

(e) 所述抗体或其抗原结合片段结合至CD40胞外域;

(f) 所述CD40是人或恒河猴CD40;

(g) 所述抗体或其抗原结合片段在体外阻止表达CD154的Jurkat细胞对B淋巴细胞的活化;和/或

(h) 所述抗体或其抗原结合片段抑制B淋巴细胞CD23、CD80或CD86表达。

6. 组合物,所述组合物包含根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,以及药学上可接受的运载体。

7. 多核苷酸,所述多核苷酸编码根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段。

8. 载体,所述载体包含权利要求7所述的多核苷酸。

9. 细胞,所述细胞包含权利要求8所述的载体。

10. 根据权利要求6所述的组合物,其用于在需要其的对象中抑制免疫系统、在需要其的对象中治疗或预防性治疗移植排斥,或在需要其的对象中延长移植排斥发生前持续时间。

11. 根据权利要求10所述供使用的组合物,其中所述对象已经接受或需要器官或组织移植。

12. 根据权利要求11所述供使用的组合物,其中:

(a)所述器官选自下组：心脏、肾、肺、肝、胰腺、肠和胸腺或其一部分；或

(b)所述组织是骨、肌腱、角膜、皮肤、心脏瓣膜、静脉或骨髓。

13.根据权利要求10所述供使用的组合物，其中所述抗体或其抗原结合片段经配制用于在所述移植前施用。

14.根据权利要求10所述供使用的组合物，其中所述抗体或其抗原结合片段经配制用于在所述移植后施用至少一个月或六个月。

15.根据权利要求6所述的组合物，其用于在需要其的对象中治疗或预防性治疗移植物抗宿主病。

16.根据权利要求6所述的组合物，其用于在需要其的对象中治疗或预防性治疗自身免疫性病症。

17.根据权利要求16所述供使用的组合物，其中所述自身免疫性病症与自身抗体的存在相关或由自身抗体的存在引起。

18.根据权利要求16所述供使用的组合物，其中所述自身免疫性病症选自下组：系统性红斑狼疮(SLE)、CREST综合征(钙质沉着、雷诺氏综合征、食管运动功能障碍、指端硬化和毛细血管扩张症)、斜视性眼阵挛、炎性肌病、系统性硬皮病、原发性胆汁性肝硬化、乳糜泻、皮肤疱疹样皮炎、米勒-费歇尔综合征、急性运动轴索神经病变(AMAN)、传导阻滞的多灶性运动神经病、自身免疫性肝炎、抗磷脂综合征、韦格纳肉芽肿病、显微镜下多血管炎、Churg-Strauss综合征、类风湿性关节炎、慢性自身免疫性肝炎、硬化性肌炎、重症肌无力、Lambert-Eaton肌无力综合征、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、副肿瘤性小脑变性、僵人综合征、边缘性脑炎、艾萨克综合征、西德纳姆舞蹈病、与链球菌相关的儿科自身免疫性神经精神病(PANDAS)、脑炎、I型糖尿病、视神经脊髓炎、恶性贫血、艾迪生氏病、牛皮癣、炎性肠病、牛皮癣性关节炎、舍格伦综合征、红斑狼疮、多发性硬化症、反应性关节炎、多肌炎、皮肌炎、多发性内分泌衰竭、施密特综合征、自身免疫性葡萄膜炎、肾上腺炎、甲状腺炎、自身免疫性甲状腺病、胃萎缩症、慢性肝炎、狼疮性肝炎、动脉粥样硬化、早老性痴呆、脱髓鞘疾病、亚急性性皮肤红斑狼疮、甲状旁腺功能减退症、德雷斯勒综合征、自身免疫血小板减少症、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、寻常天疱疮、天疱疮、斑秃、类天疱疮、硬皮病、进行性系统性硬化症、成人发病的糖尿病、男性和女性自身免疫性不孕症、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、混合性结缔组织病、结节性多动脉炎、系统性坏死性血管炎、幼年发病的类风湿性关节炎、肾小球性肾炎、特应性皮炎、特应性鼻炎、古德帕斯彻综合征、查加斯病、结节病、风湿热、哮喘、复发性流产、抗磷脂综合征、农民肺、多形性红斑、心脏切开后综合征、库欣综合征、自身免疫慢性活动性肝炎、饲鸟者肺、过敏性疾病、过敏性脑脊髓炎、中毒性表皮坏死松解症、脱发、阿尔波特氏综合征、肺泡炎、变应性肺泡炎、纤维化性肺泡炎、间质性肺病、结节性红斑、坏疽性脓皮病、输血反应、麻风病、疟疾、利什曼病、锥虫病、高安氏动脉炎、风湿性多肌痛、颞动脉炎、血吸虫病、巨细胞动脉炎、蛔虫病、曲霉病、Sampter综合征、湿疹、淋巴瘤样肉芽肿病、白塞氏病、卡普兰综合征、川崎病、登革热、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑、胎儿成红细胞增多症、嗜酸细胞性筋膜炎、舒尔曼综合征、菲尔蒂综合征、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异色性睫状体炎、富克斯氏睫状体炎、IgA肾炎、亨-舍二氏紫癜、移植物抗宿主病、移植排斥、人类免疫缺陷病毒感染、埃可病毒感染、心脏病、阿尔茨海默病、细小病毒感染、风疹病毒感染、接种后综合征、先天性风疹感染、

霍奇金和非霍奇金淋巴瘤、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、伊顿-兰伯特综合征、复发性多软骨炎、恶性黑色素瘤、冷球蛋白血症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、埃-巴二氏病毒感染、腮腺炎、伊文氏综合征和自身免疫性性腺衰竭。

19. 根据权利要求10所述供使用的组合物,其中所述对象是人。

20. 根据权利要求10所述供使用的组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段经配制用于胃肠外、静脉内、皮下、肌内、透皮、口服、局部、鞘内或局部施用。

21. 根据权利要求10所述供使用的组合物,其中所述使用还包括在所述抗体或其抗原结合片段施用六个月内施用免疫抑制剂。

22. 根据权利要求21所述供使用的组合物,其中所述免疫抑制剂选自下组:钙调神经磷酸酶抑制剂、他克莫司、mTor抑制剂、芬戈莫德、多球蛋白、阿仑单抗、利妥昔单抗、抗-CD4单克隆抗体、抗-LFA1单克隆抗体、抗-LFA3单克隆抗体、抗-CD45抗体、抗-CD19抗体、monabatacept、贝拉西普、吲哚基-ASC、硫唑嘌呤、淋巴细胞免疫球蛋白和抗胸腺细胞球蛋白、霉酚酸酯、霉酚酸钠、达利珠单抗、巴利昔单抗、环磷酰胺、泼尼松、泼尼松龙、来氟米特、FK778、FK779、15-脱氧精脒菌素、白消安、氟达拉滨、甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、15-脱氧精脒菌素、LF15-0195、布雷迪宁、布喹那和鼠源CD3单克隆抗体。

23. 根据权利要求22所述供使用的组合物,其中:

(a) 所述钙调神经磷酸酶抑制剂是环孢菌素A或环孢素G;

(b) 所述mTor抑制剂是西罗莫司、替西罗莫司、佐他莫司或依维莫司;

(c) 所述抗-CD45抗体是抗-CD45RB抗体;或

(d) 所述免疫抑制剂是贝拉西普。

24. 根据权利要求21所述供使用的组合物,其中所述组合物和所述免疫抑制剂用于彼此之间在一个月或一周内施用。

25. 根据权利要求15所述供使用的组合物,其中所述对象是人。

26. 根据权利要求15所述供使用的组合物,其中所述组合物经配制用于胃肠外、静脉内、皮下、肌内、透皮、口服、局部、鞘内或局部施用。

27. 根据权利要求15所述供使用的组合物,其中所述使用还包括在所述抗体或其抗原结合片段施用六个月内施用免疫抑制剂。

28. 根据权利要求27所述供使用的组合物,其中所述免疫抑制剂选自下组:钙调神经磷酸酶抑制剂、他克莫司、mTor抑制剂、芬戈莫德、多球蛋白、阿仑单抗、利妥昔单抗、抗-CD4单克隆抗体、抗-LFA1单克隆抗体、抗-LFA3单克隆抗体、抗-CD45抗体、抗-CD19抗体、monabatacept、贝拉西普、吲哚基-ASC、硫唑嘌呤、淋巴细胞免疫球蛋白和抗胸腺细胞球蛋白、霉酚酸酯、霉酚酸钠、达利珠单抗、巴利昔单抗、环磷酰胺、泼尼松、泼尼松龙、来氟米特、FK778、FK779、15-脱氧精脒菌素、白消安、氟达拉滨、甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、15-脱氧精脒菌素、LF15-0195、布雷迪宁、布喹那和鼠源CD3单克隆抗体。

29. 根据权利要求28所述供使用的组合物,其中:

(a) 所述钙调神经磷酸酶抑制剂是环孢菌素A或环孢素G;

(b) 所述mTor抑制剂是西罗莫司、替西罗莫司、佐他莫司或依维莫司;

(c) 所述抗-CD45抗体是抗-CD45RB抗体;或

(d) 所述免疫抑制剂是贝拉西普。

30. 根据权利要求27所述供使用的组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段和所述免疫抑制剂彼此之间在一个月或一周内施用。

31. 根据权利要求16所述供使用的组合物,其中所述对象是人。

32. 根据权利要求16所述供使用的组合物,其中所述组合物经配制用于胃肠外、静脉内、皮下、肌内、透皮、口服、局部、鞘内或局部施用。

33. 根据权利要求16所述供使用的组合物,其中所述使用还包括在所述抗体或其抗原结合片段施用六个月内施用免疫抑制剂。

34. 根据权利要求33所述供使用的组合物,其中所述免疫抑制剂选自下组:钙调神经磷酸酶抑制剂、他克莫司、mTor抑制剂、芬戈莫德、多球蛋白、阿仑单抗、利妥昔单抗、抗-CD4单克隆抗体、抗-LFA1单克隆抗体、抗-LFA3单克隆抗体、抗-CD45抗体、抗-CD19抗体、monabatacept、贝拉西普、吲哚基-ASC、硫唑嘌呤、淋巴细胞免疫球蛋白和抗胸腺细胞球蛋白、霉酚酸酯、霉酚酸钠、达利珠单抗、巴利昔单抗、环磷酰胺、泼尼松、泼尼松龙、来氟米特、FK778、FK779、15-脱氧精脒菌素、白消安、氟达拉滨、甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、15-脱氧精脒菌素、LF15-0195、布雷迪宁、布喹那和鼠源CD3单克隆抗体。

35. 根据权利要求34所述供使用的组合物,其中:

(a) 所述钙调神经磷酸酶抑制剂是环孢菌素A或环孢素G;

(b) 所述mTor抑制剂是西罗莫司、替西罗莫司、佐他莫司或依维莫司;

(c) 所述抗-CD45抗体是抗-CD45RB抗体;或

(d) 所述免疫抑制剂是贝拉西普。

36. 根据权利要求33所述供使用的组合物,其中所述抗体或其抗原结合片段和所述免疫抑制剂彼此之间在一个月或一周内施用。

37. 分离的多肽,所述分离的多肽包含根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段。

38. 生产权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括以下步骤:

(a) 在其中表达所述多核苷酸的条件在培养基中培养用编码权利要求1的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸转化的细胞;以及

(b) 从所述细胞或培养基中回收所述多肽。

人源化抗-CD40抗体及其用途

[0001] 本申请是基于申请日为2016年9月2日,优先权日为2015年9月4日,申请号为201680064574.2,发明名称为:“人源化抗-CD40抗体及其用途”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2015年9月4日提交的美国临时申请号62/214,411的优先权,其所公开的全部内容通过引用并入本申请。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含了已经以ASCII格式电子提交的序列表,并且其全部内容通过引用在此并入。在2016年9月1日创建的所述ASCII副本的名称为11212-005211-W00_SL.txt,并且大小为33,948字节。

技术领域

[0006] 本发明涉及人源化抗-CD40抗体和此类抗体的用途,例如用于降低移植排斥的可能性或治疗移植排斥,用于诱导免疫抑制或用于治疗自身免疫性病症。

背景技术

[0007] 抑制免疫系统,特别是体液免疫系统,在器官移植和自身免疫性病症的治疗中是有益的。器官移植已成为许多涉及器官损伤的致命疾病的首选治疗方法。然而,当接受移植细胞或组织的生物体对该组织发生了不希望的免疫应答时,可能发生移植排斥。可以通过组织配型将移植排斥最小化,但是即使匹配的组织也可能被供体排斥。因此,现在将免疫抑制疗法几乎用于所有的组织移植病例。

[0008] 主要通过开发越来越有效的非特异性免疫抑制药物来抑制排斥反应已经实现了改善临床移植的结果。尽管短期结果有所改善,但是长期结果仍是不足的。可能需要终生免疫抑制剂来对抗移植器官的慢性排斥反应,使用这些药物会大大增加心血管疾病、感染和恶性肿瘤的风险。

[0009] 用于减少移植排斥的一个潜在的靶点是CD40/CD154相互作用。CD40主要在B淋巴细胞和其他抗原提呈细胞(APC)如树突状细胞和巨噬细胞的表面上表达。CD154主要在T细胞表面上表达。这两种蛋白之间的相互作用与B细胞活化相关,其触发细胞因子表达以及包括CD23、CD80和CD86在内的细胞表面标记物表达。Kehry M.R., CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. J. Immunol. 1996; 156: 2345-2348. 已发现使用抗-CD154抗体阻断这种相互作用可减少或消除非人灵长类中移植组织的排斥反应。

[0010] 对于任何类型的免疫抑制(例如,在移植程序中),效能与毒性之间的平衡是其临床可接受性的关键因素。因此,需要特异性靶向参与例如移植排斥和自身免疫性病症的免疫学通路的疗法。

发明内容

[0011] 本公开内容提供了一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区,其中所述重链可变区含有分别与SEQ ID NO:13、14和15中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的三个CDR CDR1、CDR2和CDR3。

[0012] 本公开内容还提供了一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含轻链可变区,其中所述轻链可变区含有分别与SEQ ID NO:16、17和18中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的三个CDR CDR1、CDR2和CDR3。

[0013] 本公开内容还包括一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区含有分别与SEQ ID NO:13、14和15中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的三个互补性决定区(CDR) CDR1、CDR2和CDR3,以及其中所述轻链可变区含有分别与SEQ ID NO:16、17和18中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的三个CDR CDR1、CDR2和CDR3。

[0014] 本公开内容提供了一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:11、19、20、21、24、25和26中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0015] 本公开内容提供了一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:12、22、23、27、28和29中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0016] 本公开内容提供了一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:11、19、20、21、24、25和26中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列,以及其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:12、22、23、27、28和29中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0017] 本公开内容提供了一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:19、20和21中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列,以及其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:22和23中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0018] 本公开内容提供了一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:24、25和26中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列,以及其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:27、28和29中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0019] 本公开内容提供了一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列,以及其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0020] 抗体或其抗原结合部分的解离常数(K_D)可以小于约 1×10^{-9} M或小于约 1×10^{-8} M。

[0021] 本发明抗体或其抗原结合部分可以是：(a) 全免疫球蛋白分子；(b) scFv；(c) Fab片段；(d) F(ab')₂；和/或(e) 二硫键连接的Fv。

[0022] 本发明抗体或其抗原结合部分可以包含至少一个选自下组的恒定结构域：(a) IgG恒定结构域；和(b) IgA恒定结构域。

[0023] 本发明抗体或其抗原结合部分可以包含至少一个人恒定结构域。

[0024] 本发明抗体或其抗原结合部分可以结合至CD40胞外域。

[0025] CD40可以是人或恒河猴CD40。

[0026] 本发明抗体或其抗原结合部分可以在体外阻止表达CD154的Jurkat细胞对B淋巴细胞的活化。

[0027] 本发明抗体或其抗原结合部分可以抑制B淋巴细胞CD23、CD80或CD86表达。

[0028] 本公开内容还包括一种组合物，所述组合物包含本发明抗体或其抗原结合部分以及至少一种药学上可接受的运载体。

[0029] 本公开内容提供了一种编码本发明抗体或其抗原结合部分的多核苷酸。本公开内容提供了一种包含本发明的多核苷酸的载体，以及一种包含所述载体的细胞。

[0030] 本公开内容提供了一种分离的多肽，所述多肽包含本发明抗体或其抗原结合部分。

[0031] 本公开内容还包括一种制备本发明抗体或其抗原结合部分的方法。该方法包括下述步骤：(a) 在其中表达所述多核苷酸的条件下在培养基中培养本发明的细胞，从而生产至少一种包含本发明抗体或其抗原结合部分的多肽；以及(b) 从所述细胞或培养基中回收所述多肽。

[0032] 本公开内容还提供了一种在对象中抑制免疫系统的方法，所述方法包括向对象施用有效量的本发明抗体或其抗原结合部分的步骤。

[0033] 本公开内容提供了一种在需要其的对象中治疗或预防性治疗移植排斥或者延长移植排斥发生前持续时间的方法，该方法包括向对象施用有效量的本发明抗体或其抗原结合部分的步骤。

[0034] 本公开内容提供了一种在需要其的对象中治疗或预防性治疗移植抗宿主病的方法，该方法包括向对象施用有效量的本发明抗体或其抗原结合部分的步骤。

[0035] 本公开内容提供了一种在需要其的对象中治疗或预防性治疗自身免疫性病症的方法，该方法包括向对象施用有效量的本发明抗体或其抗原结合部分的步骤。

[0036] 对象可以是已经接受了或者需要器官移植和/或组织移植。器官可以是心脏、肾、肺、肝、胰腺、肠和胸腺或其一部分。组织可以是骨、肌腱、角膜、皮肤、心脏瓣膜、静脉或骨髓。

[0037] 对象可以是人或哺乳动物。

[0038] 施用可以从移植前开始。施用可以是在移植后持续至少一个月。施用可以是在移植后持续至少六个月。

[0039] 自身免疫性疾病可以是与自身抗体的存在相关或由自身抗体的存在引起。

[0040] 自身免疫性病症可以是系统性红斑狼疮(SLE)、CREST综合征(钙质沉着、雷诺氏综合征、食管运动功能障碍、指端硬化和毛细血管扩张症)、斜视性眼阵挛、炎性肌病(例如，多肌炎、皮肌炎和包涵体肌炎)、系统性硬皮病、原发性胆汁性肝硬化、乳糜泻(例如，谷蛋白过

敏性肠病)、皮肤疱疹样皮炎、米勒-费歇尔综合征、急性运动轴索神经病变(AMAN)、传导阻滞的多灶性运动神经病、自身免疫性肝炎、抗磷脂综合征、韦格纳肉芽肿病、显微镜下多血管炎、Churg-Strauss综合征、类风湿性关节炎、慢性自身免疫性肝炎、硬化性肌炎、重症肌无力、Lambert-Eaton肌无力综合征、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、副肿瘤性小脑变性、僵人综合征、边缘性脑炎、艾萨克综合征、西德纳姆舞蹈病、与链球菌相关的儿科自身免疫性神经精神病(PANDAS)、脑炎、I型糖尿病和/或视神经脊髓炎。

[0041] 自身免疫性病症可以是恶性贫血、艾迪生氏病、牛皮癣、炎性肠病、牛皮癣性关节炎、舍格伦综合征、红斑狼疮(例如,盘状红斑狼疮、药物诱导的红斑狼疮和新生儿红斑狼疮)、多发性硬化症和/或反应性关节炎。

[0042] 自身免疫性病症可以是多肌炎、皮肌炎、多发性内分泌衰竭、施密特综合征、自身免疫性葡萄膜炎、肾上腺炎、甲状腺炎、自身免疫性甲状腺病、胃萎缩症、慢性肝炎、狼疮性肝炎、动脉粥样硬化、早老性痴呆、脱髓鞘疾病、亚急性皮肤红斑狼疮、甲状旁腺功能减退症、德雷斯勒综合征、自身免疫血小板减少症、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、寻常天疱疮、天疱疮、斑秃、类天疱疮、硬皮病、进行性系统性硬化症、成人发病的糖尿病(例如,II型糖尿病)、男性和女性自身免疫性不孕症、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、混合性结缔组织病、结节性多动脉炎、系统性坏死性血管炎、幼年发病的类风湿性关节炎、肾小球性肾炎、特应性皮炎、特应性鼻炎、古德帕斯彻综合征、查加斯病、结节病、风湿热、哮喘、复发性流产、抗磷脂综合征、农民肺、多形性红斑、心脏切开后综合征、库欣综合征、自身免疫慢性活动性肝炎、饲鸟者肺、过敏性疾病、过敏性脑脊髓炎、中毒性表皮坏死松解症、脱发、阿尔波特氏综合征、肺泡炎、变应性肺泡炎、纤维化性肺泡炎、间质性肺病、结节性红斑、坏疽性脓皮病、输血反应、麻风病、疟疾、利什曼病、锥虫病、高安氏动脉炎、风湿性多肌痛、颞动脉炎、血吸虫病、巨细胞动脉炎、蛔虫病、曲霉病、Sampter综合征、湿疹、淋巴瘤样肉芽肿病、白塞氏病、卡普兰综合征、川崎病、登革热、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑、胎儿成红细胞增多症、嗜酸细胞性筋膜炎、舒尔曼综合征、菲尔蒂综合征、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异色性睫状体炎、富克斯氏睫状体炎、IgA肾炎、亨-舍二氏紫癜、移植物抗宿主病、移植排斥、人类免疫缺陷病毒感染、埃可病毒感染、心脏病、阿尔茨海默病、细小病毒感染、风疹病毒感染、接种后综合征、先天性风疹感染、霍奇金和非霍奇金淋巴瘤、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、伊顿-兰伯特综合征、复发性多软骨炎、恶性黑色素瘤、冷球蛋白血症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、埃-巴二氏病毒感染、腮腺炎、伊文氏综合征和/或自身免疫性性腺衰竭。

[0043] 施用可以是胃肠外、静脉内、皮下、肌内、透皮、口服、局部、鞘内或局部施用。

[0044] 本发明还可以包括在本发明抗体或其抗原结合部分施用六个月内使用免疫抑制剂。

[0045] 免疫抑制剂可以是钙调神经磷酸酶抑制剂、他克莫司、mTor抑制剂、芬戈莫德、多球蛋白、阿仑单抗、利妥昔单抗、抗-CD4单克隆抗体、抗-LFA1单克隆抗体、抗-LFA3单克隆抗体、抗-CD45抗体、抗-CD19抗体、monabatacept、贝拉西普、吡啶基-ASC、硫唑嘌呤、淋巴细胞免疫球蛋白和抗胸腺细胞球蛋白[马]、霉酚酸酯、霉酚酸钠、达利珠单抗、巴利昔单抗、环磷酰胺、泼尼松、泼尼松龙、来氟米特、FK778、FK779、15-脱氧精脒菌素、白消安、氟达拉滨、甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、15-脱氧精脒菌素、LF15-0195、布雷迪宁、布喹那和/或鼠源CD3单克隆

抗体。钙调神经磷酸酶抑制剂可以是环孢菌素A或环孢素G。mTor抑制剂可以是西罗莫司、替西罗莫司、佐他莫司或依维莫司。抗-CD45抗体可以是抗-CD45RB抗体。在一个实施方式中，免疫抑制剂是贝拉西普。

[0046] 本发明抗体或其抗原结合部分和免疫抑制剂彼此之间在一个月內施用。

[0047] 本发明进一步包括以下实施方案：

[0048] 1. 一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区含有分别与SEQ ID NO:13、14和15中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的三个互补性决定区(CDR) CDR1、CDR2和CDR3，以及其中所述轻链可变区含有分别与SEQ ID NO:16、17和18中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的三个CDR CDR1、CDR2和CDR3。

[0049] 2. 一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区，其中所述重链可变区含有分别与SEQ ID NO:13、14和15中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的三个CDR CDR1、CDR2和CDR3。

[0050] 3. 一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分，所述抗体或其抗原结合部分包含轻链可变区，其中所述轻链可变区含有分别与SEQ ID NO:16、17和18中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的三个CDR CDR1、CDR2和CDR3。

[0051] 4. 根据实施方案1-3中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分，其中所述抗体或其抗原结合部分的解离常数(K_D)小于约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 。

[0052] 5. 根据实施方案1-3中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分，其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:11、19、20、21、24、25和26中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列，以及其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:12、22、23、27、28和29中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0053] 6. 根据实施方案1-3中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分，其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列，以及其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0054] 7. 根据实施方案1-3中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分，其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:11、19、20、21、24、25和26中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0055] 8. 根据实施方案1-3中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分，其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:12、22、23、27、28和29中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0056] 9. 根据实施方案1-3中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分，其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:19、20和21中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列，以及其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:22和23中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0057] 10. 根据实施方案1-3中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分，其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:24、25和26中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列，以及其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:27、28和29中所示的任意

一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0058] 11. 根据实施方案1-3中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分选自下组:(a) 全免疫球蛋白分子;(b) scFv;(c) Fab片段;(d) F(ab')₂;和(e) 二硫键连接的Fv。

[0059] 12. 根据实施方案1-3中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含至少一个选自下组的恒定结构域:(a) IgG恒定结构域;和(b) IgA恒定结构域。

[0060] 13. 根据实施方案1-3中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分包含至少一个人恒定结构域。

[0061] 14. 根据实施方案1-3中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分结合至CD40胞外域。

[0062] 15. 一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区,其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:11、19、20、21、24、25或26中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0063] 16. 一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含轻链可变区,其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:12、22、23、27、28或29中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0064] 17. 一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:11、19、20、21、24、25和26中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列,以及其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:12、22、23、27、28和29中所示的任意一条氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0065] 18. 一种人源化抗-CD40抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分包含重链可变区和轻链可变区,其中所述重链可变区含有与SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列,以及其中所述轻链可变区含有与SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列具有约80%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0066] 19. 根据实施方案1-18中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述CD40是人或恒河猴CD40。

[0067] 20. 根据实施方案1-18中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分在体外阻止表达CD154的Jurkat细胞对B淋巴细胞的活化。

[0068] 21. 根据实施方案1-18中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分抑制B淋巴细胞CD23、CD80或CD86表达。

[0069] 22. 一种组合物,所述组合物包含根据实施方案1-21中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分,以及至少一种药学上可接受的运载体。

[0070] 23. 一种多核苷酸,所述多核苷酸编码根据实施方案1-21中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分。

[0071] 24. 一种载体,所述载体包含实施方案23所述的多核苷酸。

[0072] 25. 一种细胞,所述细胞包含实施方案24所述的载体。

[0073] 26. 一种在对象中抑制免疫系统的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的

根据实施方案1-21中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分的步骤。

[0074] 27. 一种在需要其的对象中治疗或预防性治疗移植排斥或者延长移植排斥发生前持续时间的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的根据实施方案1-21中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分的步骤。

[0075] 28. 根据实施方案26或27所述的方法,其中所述对象已经接受或需要器官移植。

[0076] 29. 根据实施方案28所述的方法,其中所述器官选自下组:心脏、肾、肺、肝、胰腺、肠和胸腺或其一部分。

[0077] 30. 根据实施方案26或27所述的方法,其中所述对象已经接受或需要组织移植。

[0078] 31. 根据实施方案30所述的方法,其中所述组织是骨、肌腱、角膜、皮肤、心脏瓣膜、静脉或骨髓。

[0079] 32. 根据实施方案26-31中任意一项所述的方法,其中在所述移植前开始所述施用。

[0080] 33. 根据实施方案26-31中任意一项所述的方法,其中所述施用在所述移植后持续至少一个月。

[0081] 34. 根据实施方案33所述的方法,其中所述施用在所述移植物的所述移植后持续至少六个月。

[0082] 35. 一种在需要其的对象中治疗或预防性治疗移植抗宿主病的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的根据实施方案1-21中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分的步骤。

[0083] 36. 一种在需要其的对象中治疗或预防性治疗自身免疫性病症的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的根据实施方案1-21中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分的步骤。

[0084] 37. 根据实施方案36所述的方法,其中所述自身免疫性病症与自身抗体的存在相关或由自身抗体的存在引起。

[0085] 38. 根据实施方案36所述的方法,其中所述自身免疫性病症选自下组:系统性红斑狼疮(SLE)、CREST综合征(钙质沉着、雷诺氏综合征、食管运动功能障碍、指端硬化和毛细血管扩张症)、斜视性眼阵挛、炎性肌病(例如,多肌炎、皮肌炎和包涵体肌炎)、系统性硬皮病、原发性胆汁性肝硬化、乳糜泻(例如,谷蛋白过敏性肠病)、皮肤疱疹样皮炎、米勒-费歇尔综合征、急性运动轴索神经病变(AMAN)、传导阻滞的多灶性运动神经病、自身免疫性肝炎、抗磷脂综合征、韦格纳肉芽肿病、显微镜下多血管炎、Churg-Strauss综合征、类风湿性关节炎、慢性自身免疫性肝炎、硬化性肌炎、重症肌无力、Lambert-Eaton肌无力综合征、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、副肿瘤性小脑变性、僵人综合征、边缘性脑炎、艾萨克综合征、西德纳姆舞蹈病、与链球菌相关的儿科自身免疫性神经精神病(PANDAS)、脑炎、I型糖尿病和视神经脊髓炎。

[0086] 39. 根据实施方案36所述的方法,其中所述自身免疫性病症选自下组:恶性贫血、艾迪生氏病、牛皮癣、炎性肠病、牛皮癣性关节炎、舍格伦综合征、红斑狼疮(例如,盘状红斑狼疮、药物诱导的红斑狼疮和新生儿红斑狼疮)、多发性硬化症和反应性关节炎。

[0087] 40. 根据实施方案36所述的方法,其中所述自身免疫性病症选自下组:多肌炎、皮肌炎、多发性内分泌衰竭、施密特综合征、自身免疫性葡萄膜炎、肾上腺炎、甲状腺炎、自身

免疫性甲状腺病、胃萎缩症、慢性肝炎、狼疮性肝炎、动脉粥样硬化、老年性痴呆、脱髓鞘疾病、亚急性皮肤红斑狼疮、甲状旁腺功能减退症、德雷斯勒综合征、自身免疫血小板减少症、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、寻常天疱疮、天疱疮、斑秃、类天疱疮、硬皮病、进行性系统性硬化症、成人发病的糖尿病(例如,II型糖尿病)、男性和女性自身免疫性不孕症、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、混合性结缔组织病、结节性多动脉炎、系统性坏死性血管炎、幼年发病的类风湿性关节炎、肾小球性肾炎、特应性皮炎、特应性鼻炎、古德帕斯彻综合征、查加斯病、结节病、风湿热、哮喘、复发性流产、抗磷脂综合征、农民肺、多形性红斑、心脏切开术后综合征、库欣综合征、自身免疫慢性活动性肝炎、饲鸟者肺、过敏性疾病、过敏性脑脊髓炎、中毒性表皮坏死松解症、脱发、阿尔波特氏综合征、肺炎、变应性肺炎、纤维化性肺炎、间质性肺病、结节性红斑、坏疽性脓皮病、输血反应、麻风病、疟疾、利什曼病、锥虫病、高安氏动脉炎、风湿性多肌痛、颞动脉炎、血吸虫病、巨细胞动脉炎、蛔虫病、曲霉病、Sampter综合征、湿疹、淋巴瘤样肉芽肿病、白塞氏病、卡普兰综合征、川崎病、登革热、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑、胎儿成红细胞增多症、嗜酸细胞性筋膜炎、舒尔曼综合征、菲尔蒂综合征、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异色性睫状体炎、富克斯氏睫状体炎、IgA肾炎、亨-舍二氏紫癜、移植物抗宿主病、移植排斥、人类免疫缺陷病毒感染、埃可病毒感染、心脏病、阿尔茨海默病、细小病毒感染、风疹病毒感染、接种后综合征、先天性风疹感染、霍奇金和非霍奇金淋巴瘤、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、伊顿-兰伯特综合征、复发性多软骨炎、恶性黑色素瘤、冷球蛋白血症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、埃-巴二氏病毒感染、腮腺炎、伊文氏综合征和自身免疫性性腺衰竭。

[0088] 41. 根据实施方案26-40中任意一项所述的方法,其中所述对象是人。

[0089] 42. 根据实施方案26-40中任意一项所述的方法,其中所述施用是胃肠外、静脉内、皮下、肌内、透皮、口服、局部、鞘内或局部施用。

[0090] 43. 根据实施方案26-40中任意一项所述的方法,其中所述方法还包括在所述抗体或其抗原结合部分施用六个月内施用免疫抑制剂。

[0091] 44. 根据实施方案43所述的方法,其中所述免疫抑制剂选自下组:钙调神经磷酸酶抑制剂、他克莫司、mTor抑制剂、芬戈莫德、多球蛋白、阿仑单抗、利妥昔单抗、抗-CD4单克隆抗体、抗-LFA1单克隆抗体、抗-LFA3单克隆抗体、抗-CD45抗体、抗-CD19抗体、monabatacept、贝拉西普、吲哚基-ASC、硫唑嘌呤、淋巴细胞免疫球蛋白和抗胸腺细胞球蛋白[马]、霉酚酸酯、霉酚酸钠、达利珠单抗、巴利昔单抗、环磷酰胺、泼尼松、泼尼松龙、来氟米特、FK778、FK779、15-脱氧精脒菌素、白消安、氟达拉滨、甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、15-脱氧精脒菌素、LF15-0195、布雷迪宁、布喹那和鼠源CD3单克隆抗体。

[0092] 45. 根据实施方案44所述的方法,其中所述钙调神经磷酸酶抑制剂是环孢菌素A或环孢素G。

[0093] 46. 根据实施方案44所述的方法,其中所述mTor抑制剂是西罗莫司、替西罗莫司、佐他莫司或依维莫司。

[0094] 47. 根据实施方案44所述的方法,其中所述抗-CD45抗体是抗-CD45RB抗体。

[0095] 48. 根据实施方案44所述的方法,其中所述免疫抑制剂是贝拉西普。

[0096] 49. 根据实施方案44所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合部分和所述免疫抑制剂彼此之间在一个月內施用。

[0097] 50. 根据实施方案49所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合部分和所述免疫抑制剂彼此之间在一周内施用。

[0098] 51. 一种分离的多肽, 所述分离的多肽包含根据实施方案1-21中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分。

[0099] 52. 一种制备实施方案1-21中任意一项所述的抗体或其抗原结合部分的方法, 所述方法包括步骤:

[0100] (a) 在其中表达所述多核苷酸的条件在培养基中培养实施方案25所述的细胞, 从而生产至少一种包含所述抗体或其抗原结合部分的多肽; 以及

[0101] (b) 从所述细胞或培养基中回收所述多肽。

附图说明

[0102] 图1显示了2C10抗体重链和轻链的可变区。所显示的重链(SEQ ID NO:1)核苷酸序列包括信号肽(核苷酸1-57: 下划线)和重链可变序列(核苷酸58-396)。相应的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)如下所示, 其中氨基酸1-19对应于信号序列(下划线)和氨基酸20-132对应于重链可变区。

[0103] 所显示的轻链(SEQ ID NO:3)核苷酸序列包括信号肽(核苷酸1-66: 下划线)和轻链可变序列(核苷酸67-384)。相应的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)如下所示, 其中氨基酸1-22对应于信号序列(下划线)和氨基酸23-128对应于轻链可变区。

[0104] 图2a是显示证实2C10与人和恒河猴CD20+B细胞结合的流式细胞术数据的图。

[0105] 图2b是显示来自使用不同浓度2C10的ELISA测定的CD40吸附数据的曲线图, 以确认使用山羊抗小鼠IgG-HRP检测的2C10与人和恒河猴CD40的结合。

[0106] 图3是显示2C10对CD154与人B细胞结合的剂量依赖性抑制的图。通过与组氨酸标记的可溶性CD154孵育并分析组氨酸表达来分析B细胞的CD154结合。结果是多次实验重复的典型结果。

[0107] 图4是显示涉及恒河猴或人外周血单核细胞(PBMC)和Jurkat细胞的测定原理的示意图和图。

[0108] 图5是显示取自在可变浓度的3A8、5C8或2C10抗体存在条件下恒河猴PBMC和Jurkat细胞共培养物的CD20⁺细胞中CD23表达情况的一组图。

[0109] 图6是显示取自在可变浓度的3A8、5C8或2C10抗体存在条件下人PBMC和Jurkat细胞共培养物的CD20⁺细胞中CD86表达情况的一组图。

[0110] 图7是显示来自在3A8或2C10抗体存在条件下未使用Jurkat细胞培养的人或恒河猴PBMC的表达CD23的CD20⁺细胞的一组图。

[0111] 图8是显示使用含有恒河猴IgG1 (2C10R1) 或IgG4 (2C10R4) 重链恒定区的工程化改造的2C10小鼠-恒河猴嵌合形式, 以及抗-CD40 3A8 (3A8R1) 或抗-CD40 Chi220 (Chi220) 的嵌合IgG1形式处理的恒河猴外周B细胞计数的图。

[0112] 图9是显示在给予2C10R1、2C10R4或3A8R1抗体的猕猴中T细胞依赖性抗体应答的图。在首次给予抗体后, 使用4-羟基-3-硝基苯基乙酰基缀合的钥孔戚血蓝蛋白(KLH) 对所有动物进行免疫。

[0113] 图10是显示同种异体胰岛移植的标准猕猴模型的图。使用链脲菌素在猕猴中诱导

糖尿病。向糖尿病猴移植同种异体胰岛并使用巴利昔单抗和西罗莫司引起免疫抑制。在移植后第0天和第7天实验动物接受2C10R4治疗。

[0114] 图11A是显示在胰岛移植、背景免疫抑制和用2C10R4治疗后,在4只猕猴中的游离血糖水平(FBG)的曲线。曲线中的实线代表血浆中2C10的水平。

[0115] 图11B是显示在仅接受背景免疫抑制的猕猴中FBG的曲线。

[0116] 图12是显示使用同增加浓度的2C10、3A8或Chi220抗体孵育人PBMC以及使用APC缀合的2C10对其进行染色进行的竞争性阻断测定以评估每种抗体交联阻断2C10能力的结果的图。

[0117] 图13A和13B显示了人源化2C10可变区的序列比对。图13A:将鼠2C10VH序列与人种系VH1-3和三个人源化序列2C10_h1、2C10_h2和2C10_h3的比对。图13B:将鼠2C10 VL序列与人种系VH3-11和两个人源化序列2C10_11和2C10_12的比对。2C10 CDR以粗体显示。在人源化序列中的鼠残基用下划线表示。

[0118] 图14显示了在2C10HP和2C10HB1,以及2C10HB2构建体之间,在框架3中的氨基酸变化。

[0119] 图15显示了人源化2C10抗体重链和轻链可变区的序列。重链和轻链可变区包含2C10HP、2C10HB1、2C10HB2、2C10KP、2C10KB1和2C10KB2。

[0120] 图16显示了人源化2C10抗体对不同灵长类物种的CD40的结合亲和性。通过胺偶联将人源化2C10抗体(h2C10)固化到CM5芯片表面上。在BIAcore3000上分析了不同浓度的人、恒河猴和狒狒CD40-MBP融合物的亲和性。使用BIAevaluation软件4.1.1版计算结合亲和性。

[0121] 图17显示了在接受盐水、10或25mg/kg h2C10后使用KLH免疫3hr的猴中确定的抗-KLH抗体应答(IgM和IgG)的诱导情况。所有对照动物显示出对KLH抗原的IgG或IgM抗体应答。给予10mg/kg 2C10的每只猴,而非给予25mg/kg 2C10的动物产生了对KLH的IgG或IgM抗体应答。

[0122] 图18。将给予25mg/kg h2C10(上面一行)或10mg/kg h2C10(中间一行)或对照动物(下面一行)的全血用于B和T淋巴细胞亚群的表型分析。两种剂量的h2C10对淋巴细胞群均没有任何明显影响。

[0123] 在对灵长类嵌合形式进行的早期、剂量应答评估中也证实了不存在明显的B细胞耗竭,该评估包括了对成熟和未成熟B细胞群的详细分析。

[0124] 图19。第28天时人源化2C10完全饱和了B细胞上的CD40结合位点。在体内施用的H2C10完全阻断了荧光标记的2C10与B细胞的结合。数据显示了单次给予25mg/kg(上面一行)、10mg/kg(中间一行)或0mg/kg(对照;下面一行)28天后给予人源化2C10和对照猴的结果。在输注后第3、7、14和21天获得了类似结果。

[0125] 图20。给予猴10或25mg/kg后达28天的h2C10平均血清浓度。2C10的浓度随着时间缓慢降低,并且在整个研究期间均检测到其水平。

[0126] 图21a和21b显示了稳定化IgG4形式的人源化2C10(h2C10)的DNA和氨基酸序列。图21a显示了重链的氨基酸序列。图21b显示了轻链的氨基酸序列。SEQ ID NO:32:重链的DNA序列;SEQ ID NO:33:重链的氨基酸序列;SEQ ID NO:34:轻链的DNA序列;SEQ ID NO:35:轻链的氨基酸序列。

具体实施方式

[0127] 本公开内容涉及抗-CD40抗体和抗体片段(例如,抗体的抗原结合部分),可以将其用于各种治疗、预防、诊断和其他方法。抗体能够阻断CD40结合CD154的能力,并且在不活化表达CD40的细胞(例如,B细胞)的情况下进行。可以将本发明抗体或其片段用于减少与器官或组织移植相关的并发症。

[0128] 抗体或其抗原结合部分包括但不限于人源化抗体、人抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、多克隆抗体、重组表达抗体以及前述的抗原结合部分。抗体的抗原结合部分可以包括特异性结合至CD40的抗体的部分。

[0129] 本公开内容还提供了用于降低移植排斥可能性、治疗移植排斥、诱导免疫抑制和/或治疗自身免疫性病症的组合物和方法。组合物含有特异性结合CD40的抗体或其片段。

[0130] 在一个实施方式中,本公开内容提供了在对象中治疗或减轻移植物抗宿主病和/或移植排斥的方法,所述方法包括以足以在对象中减少移植物抗宿主病和/或移植排斥的一种或多种症状的剂量向哺乳动物施用包含本发明抗体(或其片段)的组合物。

[0131] 在另一个实施方式中,向患有炎性疾病或免疫病症(如自身免疫性疾病)的对象施用抗体或抗原结合片段。炎性疾病或自身免疫性疾病可能与表达CD40的细胞相关。

[0132] 本发明涉及通过以有效量向对象施用本发明抗体或其抗原结合部分在对象中降低移植排斥可能性、治疗移植排斥、诱导免疫抑制和/或治疗自身免疫性病症的方法。

[0133] 本公开内容还包括一种在哺乳动物中阻断CD40功能的方法,该方法包括以足以在哺乳动物中阻断CD40介导的免疫应答的量向哺乳动物施用包含本发明抗体或其抗原结合部分的组合物。

[0134] 本公开内容的另一种方法涉及抑制表达CD40的细胞的生长和/或分化,该方法包括向细胞施用本发明抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段与CD40的结合抑制细胞的生长和/或分化。

[0135] 本公开内容提供了一种治疗患有与CD40相关病症的对象的方法,该方法包括向对象施用本发明抗体或抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段与CD40的结合抑制与CD40相关病症细胞的生长和/或分化。细胞可以是但不限于B类淋巴母细胞、胰腺细胞、肺细胞、乳腺细胞、卵巢细胞、结肠细胞、前列腺细胞、皮肤细胞、头颈细胞、膀胱细胞、骨细胞或肾细胞。

[0136] 还可以将本发明方法用于治疗慢性淋巴细胞性白血病、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤、T细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症或卡波西氏肉瘤。

[0137] 本公开内容的其他方法包括通过在对象中的B细胞抑制抗体产生,该方法包括向对象施用有效量的本公开内容的抗-CD40抗体或其片段。在一个实施方式中,以在对象中有效抑制B细胞分化和抗体同种型转换的量施用抗体。在另一个实施方式中,以在对象中有效抑制T细胞和巨噬细胞中的细胞因子和趋化因子产生,和/或抑制粘附分子上调的量施用抗体。在又一个实施方式中,以在对象中有效抑制树突状细胞活化的量施用抗体。

[0138] 除了本发明抗体或其片段以外,本发明方法还可以包括施用第二种治疗剂,如免疫抑制剂、肿瘤坏死因子拮抗剂(TNF-拮抗剂)、CTLA4-拮抗剂、抗-IL-6受体的抗体或其组合。

[0139] 本发明抗体或其抗原结合部分可以与人CD40和/或恒河猴CD40(包括重组和天然人CD40)特异性结合。

[0140] 如在本申请中所使用的,表达CD40的细胞是特征为表面表达CD40的任何细胞,包括但不限于正常和肿瘤B细胞、交错突细胞、基底上皮细胞、癌细胞、巨噬细胞、内皮细胞、滤泡树突细胞、扁桃体细胞和骨髓来源的浆细胞。

[0141] 人源化抗体

[0142] 本公开内容的人源化抗体是来自非人物种的抗体,其中非抗原结合区域(和/或抗原结合区域)中的氨基酸序列已被改变,使得该抗体更接近人类抗体,并且仍保留其原始的结合能力。

[0143] 抗体轻链或重链可变区由三个称为互补性决定区(CDR)的高变区组成。通过框架区(FR)将CDR支持在可变区内。在一个实施方式中,重链可变区(或轻链可变区)含有3个CDR和4个框架区(FR),其按照下述顺序从氨基末端排列到羧基末端:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。Kabat,E.A.等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH出版号91-3242,1991。Chothia,C.等,J.Mol.Biol.196:901-917,1987。

[0144] 在某些实施方式中,人源化抗体是来自非人物种的抗体分子,其具有来自非人物种的一个、两个、三个或全部CDR以及来自人免疫球蛋白分子的一个、两个、三个、四个或全部框架区。

[0145] 本发明抗体或其抗原结合部分的CDR可以来自非人或人来源。本发明抗体或其抗原结合部分的框架可以是人的、人源化的、非人的(例如,修饰以降低在人中的抗原性的鼠源框架)或合成的框架(例如,共有序列)。

[0146] 在一个实施方式中,本发明抗体或其抗原结合部分含有至少一个重链可变区和/或至少一个轻链可变区。

[0147] 可以采用本领域公知的方法生产本公开内容的人源化抗体。例如,人源化抗体可以具有从非人来源引入的一个或多个氨基酸残基。通常将这些非人氨基酸残基称为“输入”残基,其通常来自“输入”可变结构域。可以按照Winter及其同事的方法(Jones等,Nature 321:522-5,1986;Riechmann等,Nature 332:323-7,1988;Verhoeyen等,Science 239:1534-6,1988)通过用高变区序列替换人抗体相应的序列进行人源化。因此,在这种人源化抗体中,基本上小于完整的人可变结构域被来自非人物种的相应序列替代。在某些实施方式中,人源化抗体是其中至少一些高变区残基以及其他可变区残基被来自非人抗体类似位点的残基替换的人抗体。

[0148] 对用于制备人源化抗体的人轻链和重链可变结构域的选择可以降低抗原性。根据“最佳拟合”方法,在整个已知的人可变结构域序列库中对非人(例如,啮齿类如小鼠)抗体可变结构域的序列进行筛选。然后,将最接近于非人序列的人序列作为人源化抗体的人框架。参见例如,Sims等,J.Immunol.151:2296-308,1993;Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-17,1987。另一种方法使用来自具有特定亚组的轻链或重链的所有人抗体的共有序列的特定框架。可以将相同框架用于几种不同的人源化抗体。参见例如,Carter等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-9,1992;Presta等,J.Immunol.151:2623-32,1993。

[0149] 可以通过使用来自人可变区的等效序列替代不直接参与抗原结合的可变区序列

产生人源化抗体。这些方法包括分离、操作和表达编码至少一条重链或轻链的全部或部分可变区的核酸序列。这种核酸的来源是本领域技术人员熟知的,并且例如可以从生产针对CD40抗体的杂交瘤获得。然后可以将编码人源化抗体或其片段的重组DNA克隆入适宜的表达载体中。

[0150] 在另一个实例中,一旦获得非人(例如,鼠源)抗体,可以对可变区测序,并确定CDR和框架残基的位置。Kabat,E.A.等,(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,第5版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH出版号91-3242。Chothia,C.等,(1987) *J.Mol.Biol.*,196:901-917。可以任选地将轻链和重链可变区与相应恒定区连接。可以通过CDR移植或CDR替代生产CDR-移植抗体分子。可以替换免疫球蛋白链的一个、两个、三个或全部CDR。例如,特定抗体的全部CDR可以来自非人动物(例如,小鼠如表1中所示的CDR)的至少一部分,或者可以是仅一些CDR被替换。仅需要保留抗体与预定抗原(例如,CD40)结合所需的CDR。Morrison,S.L.,1985,*Science*,229:1202-1207。Oi等,1986,*BioTechniques*,4:214。美国专利号5,585,089;5,225,539;5,693,761和5,693,762。EP 519596。Jones等,1986,*Nature*,321:552-525。Verhoeyan等,1988,*Science*,239:1534。Beidler等,1988,*J.Immunol.*,141:4053-4060。

[0151] 可能需要的是,将抗体人源化的同时保留对抗原的高亲和性和其他有利的生物学特性。为了实现这一目标,根据一种方法,通过使用亲代和人源化序列的三维模型对亲代序列和各种概念性人源化产物进行分析的方法制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是本领域技术人员常用和熟知的。可以使用计算机程序说明和展示所选择的候选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构。对这些展示的检验能够分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能的作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原能力的残基。以这种方法,可以从受体和输入序列中选择和组合FR残基,从而实现所需的抗体特征,如对一种或多种靶抗原的亲亲和性增加。

[0152] 在一些实施方式中,人源化抗-CD40抗体还包含免疫球蛋白恒定区(通常是人免疫球蛋白恒定区)的至少一部分。在一个实施方式中,抗体将含有轻链以及至少重链的可变结构域。抗体还可以含有重链的恒定结构域CH1、铰链、CH2、CH3和/或CH4的一个或多个,视情况而定。

[0153] 在本公开内容的一些方面中,将重组表达人源化抗体的一个或多个结构域。这种重组表达可以使用一个或多个控制序列,即在特定宿主生物体中表达可操作地连接的编码序列所必需的多核苷酸序列。适于在原核细胞中使用的控制序列包括例如启动子、操纵子和核糖体结合位点序列。真核控制序列包括但不限于启动子、多聚腺苷酸化信号和增强子。可以将这些控制序列用于在原核和真核宿主细胞中表达和生产人源化抗-CD40抗体。

[0154] 本公开内容还包括抗体或其抗原结合部分,所述抗体或其抗原结合部分含有如本申请所公开的一个、两个或全部CDR,以及其他区域被来自至少一个不同物种的序列替代,所述不同物种包括但不限于人、家兔、绵羊、犬、猫、奶牛、马、山羊、猪、猴、猿、大猩猩、黑猩猩、鸭、鹅、鸡、两栖类、爬行类和其他动物。

[0155] 人抗体

[0156] 本公开的人抗体可以通过将一条或多条选自人来源的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列与一条或多条已知的人恒定结构域序列组合构建(Hoogenboom等,

J.Mol.Biol.227:381-8,1992;Marks等,J.Mol.Biol.222:581-97,1991)。或者,可以通过杂交瘤方法制备人抗体。已在例如Kozbor,J.Immunol.133:3001-5,1984;Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner等,J.Immunol.147:86-95,1991中描述了用于生产人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤。

[0157] 生产在免疫后在无内源性免疫球蛋白产生的条件下能够生产全人抗体库的转基因动物(例如,小鼠)是可能的。例如,已经描述了在嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合缺失导致完全抑制内源性抗体产生。人种系免疫球蛋白基因阵列在这种种系突变小鼠中的转移将导致抗原攻击后产生人抗体。参见例如,Jakobovits等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551-5,1993;Jakobovits等,Nature 362:255-8,1993;Brüggemann等,Year Immunol.7:33-40,1993。

[0158] 还可以将基因改组用于从非人(例如,啮齿动物)抗体中衍生人抗体,其中人抗体与初始非人抗体具有相似的亲和性和特异性。根据这种方法(还将其称为“表位印迹”),从如本申请所述的噬菌体展示技术中获得的非人抗体片段的重链或轻链可变区替换人V结构域基因库,以形成非人链/人链scFv或Fab嵌合体群。使用抗原选择导致非人链/人链嵌合scFv或Fab的分离,其中人链恢复了在初始噬菌体展示克隆中除去相应非人链后被破坏的抗原结合位点,即控制人链伴侣选择的表位(印迹)。当重复该过程以替换剩余非人链时,获得了人抗体(参见PCT公开号WO 93/06213)。与传统的通过CDR移植的非人抗体人源化不同的时,这种技术提供了完全的人抗体,其不具有非人来源的FR或CDR残基。

[0159] 嵌合抗体

[0160] 嵌合抗体是其中的不同部分来源于不同动物物种的分子。例如,抗体可以含有来自鼠源抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区。可以通过重组DNA技术生产嵌合抗体。Morrison等,ProcNatlAcadSci,81:6851-6855(1984)。例如,使用限制性内切酶消化编码鼠源(或其他物种)单克隆抗体分子的基因以除去编码鼠源Fc的区域,并且替代编码人Fc恒定区基因的等效部分。还可以通过重组DNA技术制备嵌合抗体,其中可以将编码鼠源V区的DNA与编码人恒定区的DNA连接。Better等,Science,1988,240:1041-1043。Liu等,PNAS,1987,84:3439-3443。Liu等,J.Immunol.,1987,139:3521-3526。Sun等,PNAS,1987,84:214-218。Nishimura等,Canc.Res.,1987,47:999-1005。Wood等,Nature,1985,314:446-449。Shaw等,J.Natl.Cancer Inst.,1988,80:1553-1559。国际专利公开号W01987002671和W0 86/01533。欧洲专利申请号184,187;171,496;125,023和173,494。U.S专利号4,816,567。

[0161] 可变区和CDR

[0162] 鼠源2C10抗体和某些人源化抗-CD40抗体的重链可变区、轻链可变区和CDR如表1中所示。

[0163] 表1:SEQ ID No:11-31

[0164]

名称	链, 区域	序列	SEQ ID NO.
2C10 (鼠源抗体)	重链, 可变区	QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFT <u>NYWMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSNDYTKY</u> <u>NQKFKDKATLTADKSSNTAYMQLGSLTSEDS</u> AVYYCAR <u>QGFPYWGQGTLVTVSA</u>	11
2C10	轻链, 可变区	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYM <u>HWYHQRSGTSPKRWIYDTSK</u> <u>LASGVPARFSG</u> SGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCH <u>QLSSDPF</u> <u>TFGSGTKLEIK</u>	12
2C10	重链, CDR1	YTFTNYWMH	13
2C10	重链, CDR2	YINPSNDYTKYNQKFKD	14
2C10	重链, CDR3	QGFPY	15
2C10	轻链, CDR1	SASSSVSYMH	16
2C10	轻链, CDR2	DTSKLAS	17
2C10	轻链, CDR3	HQLSSDPFT	18
2C10_h1	重链, 可变区	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYTFT <u>NYWMHWVRQAPGQRLEWMGYINPSNDYTK</u> <u>YNQKFKDRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED</u> AVYYCAR <u>QGFPYWGQGTLVTVSS</u>	19
2C10_h2	重链, 可变区	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASG <u>YTFTNYWMH</u> <u>WVRQAPGQRLEWMG</u> <u>YINPSNDYTKYNQKFKD</u>	20

[0165]

		RVTITADKSASTAYMELSSLRSED ~~T~~ AVYYCAR <u>QGFPY</u> WGQGT ~~L~~ TVSS	
2C10_h3	重链, 可变区	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG <u>YTFTNYWMH</u> WVRQAPGQRLEWIG <u>YINPSNDYTKYNQKFKD</u> RATLTADKSANTAYM ELSSLRSED ~~T~~ AVYYCAR <u>QGFPY</u> WGQGT ~~L~~ TVSS	21
2C10_l1	轻链, 可变区	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>SASSVS</u> <u>YMH</u> WYQQKPGQAPRLIY <u>DTSKLAS</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC <u>HQLSSDPFT</u> FGGGTKVEIK	22
2C10_l2	轻链, 可变区	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>SASSVS</u> <u>YMH</u> WYQQKPGQAPRRWIY <u>DTSKLAS</u> GVPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYC <u>HQLSSDPFT</u> FGGGTKVEIK	23
2C10HP	重链, 可变区	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>NYWMH</u> WVRQAPGQRLEWIG <u>YINPSNDYTKY</u> <u>NQKFKDRATLTADKS</u> ANTAYMELSSLRSED ~~T~~ AVYYCAR <u>QGFPY</u> WGQGT ~~L~~ TVSS	24
2C10HB1	重链, 可变区	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>NYWMH</u> WVRQAPGQRLEWIG <u>YINPSNDYTKY</u> <u>NQKFKDRATLTADTST</u> NTAYMELSSLRSED ~~T~~ AVYYCAR <u>QGFPY</u> WGQGT ~~L~~ TVSS	25
2C10HB2	重链, 可变区	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTN <u>YWMH</u> WVRQAPGQGLEWIG <u>YINPSNDYTKYN</u> <u>QKFKDKATITADEST</u> NTAYMELSSLRSED ~~T~~ A VYYCAR <u>QGFPY</u> WGQGT ~~L~~ TVSS	26
2C10KP	轻链, 可变区	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>SASSVS</u> <u>YMH</u> WYQQKPGQAPRRWIY <u>DTSKLAS</u> GVPARFSGS SGSTDYTLTISSELPEDFAVYYC <u>HQLSSDPFT</u> F GGGTKVEIK	27
2C10KB1	轻链, 可变区	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC <u>SASSVS</u> <u>SYM</u>	28

[0166]			<u>H</u> WYQQKPGKAPKLLIYDTSK <u>L</u> ASGVPARFSG SGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCH <u>Q</u> LSSDPFT FGQGTKVEVK	
	2C10KB2	轻链, 可变区	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS <u>A</u> SSSVSYM <u>H</u> WYQQKPGQAPRLLIYDTSK <u>L</u> ASGIPARFSGSG SGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCH <u>Q</u> LSSDPFTFG QGTKLEIK	29
	VH1-3	重链, 可变区	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS YAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTK YSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARWGQGTLVTVSS	30
	VK3-11	轻链, 可变区	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRSQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSG SGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCFGGGKVEI K	31

[0167] 在某些实施方式中, 抗体或其抗原结合部分包含重链可变区, 所述重链可变区含有与SEQ ID NO: 11、19、20、21、24、25和26中任意一项所示的重链可变区氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%同一性的氨基酸序列。

[0168] 在某些实施方式中, 抗体或其抗原结合部分包含轻链可变区, 所述轻链可变区含有与SEQ ID NO: 12、22、23、27、28和29中任意一项所示的轻链可变区氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%同一性的氨基酸序列。

[0169] 在某些实施方式中, 抗体或其抗原结合部分均包含重链可变区和轻链可变区两者, 所述重链可变区含有与SEQ ID NO: 11、19、20、21、24、25和26中任意一项所示的重链可变区氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%同一性的氨基酸序列, 以及所述轻链可变区含有与SEQ ID NO: 12、22、23、27、28和29中任意一项所示的轻链可变区氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%同一性的氨基酸序列。

[0170] 抗体或其抗原结合部分的重链可变区可以含有一个、两个、三个或更多个互补性决定区 (CDR)，所述CDR与2C10抗体的重链可变区CDR (CDR1、CDR2和CDR3，分别如SEQ ID NO: 13、14、15中所示) 具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%的同一性。

[0171] 抗体或其抗原结合部分的轻链可变区可以含有一个、两个、三个或更多个CDR，所述CDR与2C10抗体的轻链可变区CDR (CDR1、CDR2和CDR3，分别如SEQ ID NO: 16、17、18中所示) 具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%的同一性。

[0172] 本发明抗体或其抗原结合部分的重链可变区可以含有一个、两个、三个或更多个互补性决定区 (CDR)，所述CDR与2C10抗体的重链可变区CDR (CDR1、CDR2和CDR3，分别如SEQ ID NO: 13、14、15中所示) 具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%的同一性，以及抗体或其抗原结合部分的轻链可变区可以含有一个、两个、三个或更多个CDR，所述CDR与2C10抗体的轻链可变区CDR (CDR1、CDR2和CDR3，分别如SEQ ID NO: 16、17、18中所示) 具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%的同一性。

[0173] 抗体或其抗原结合部分的重链可变区可以含有三个CDR，所述CDR与2C10抗体的重链可变区CDR (CDR1、CDR2和CDR3，分别如SEQ ID NO: 13、14、15中所示) 具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%的同一性。

[0174] 在一个实施方式中，抗体或其抗原结合部分的轻链可变区可以含有三个CDR，所述CDR与2C10抗体的轻链可变区CDR (CDR1、CDR2和CDR3，分别如SEQ ID NO: 16、17、18中所示) 具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%的同一性。

[0175] 在一个实施方式中，抗体或其抗原结合部分的重链可变区含有三个CDR，所述CDR与2C10抗体的重链可变区CDR (CDR1、CDR2和CDR3，分别如SEQ ID NO: 13、14、15中所示) 具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、

约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%的同一性,以及抗体或其抗原结合部分的轻链可变区含有三个CDR,所述CDR与2C10抗体的轻链可变区CDR(CDR1、CDR2和CDR3,分别如SEQ ID NO:16、17、18中所示)具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%的同一性。

[0176] 在某些实施方式中,抗体或其抗原结合部分的重链可变区含有三个CDR,所述CDR与2C10抗体的重链可变区CDR(CDR1、CDR2和CDR3,分别如SEQ ID NO:13、14、15中所示)相同,以及抗体或其抗原结合部分的轻链可变区含有三个CDR,所述CDR与2C10抗体的轻链可变区CDR(CDR1、CDR2和CDR3,分别如SEQ ID NO:16、17、18中所示)相同。

[0177] 本公开内容包括具有重链可变区和轻链可变区的抗体,所述重链可变区和轻链可变区具有分别与抗体2C10的重链可变区(SEQ ID NO:11)和轻链可变区(SEQ ID NO:12)具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%,或者约100%同一性的氨基酸序列。

[0178] 在相关的实施方式中,抗-CD40抗体或其抗原结合部分包含例如2C10的重链可变区和/或轻链可变区的CDR。

[0179] 在一个实施方式中,抗体或其抗原结合部分包含与2C10抗体的重链可变区和轻链可变区(分别为SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12)相同的重链可变区和轻链可变区。

[0180] 在不同的实施方式中,抗体或其抗原结合部分与同2C10抗体所结合的表位重叠或者至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%相同的表位特异性结合。表位可以存在于SEQ ID NO:6所示的序列中,或者可以存在于SEQ ID NO:6的氨基酸8-40所示的序列中。

[0181] 在某些实施方式中,与表1中的CDR对应的CDR具有序列变体。例如,在结合CD40的抗体(或其抗原结合部分)中可以存在其中1、2、3、4、5、6、7或8个残基或者CDR中总残基的少于20%、少于30%或少于约40%被取代或缺失的CDR。

[0182] 其中特定氨基酸被取代、缺失或加入的抗体或其抗原结合部分也在本公开内容的范围内。这种改变对肽的生物学性质(如结合活性)没有实质性的影响。例如,抗体可以在框架区具有氨基酸取代,以改善与抗原的结合。在另一个实例中,可以使用相应的供体残基酸替换选定的、少量受体框架残基。供体框架可以是成熟的或种系人抗体框架序列或共有序列。下面提供了对关于如何制备表型沉默的氨基酸取代的指导原则:Bowie等,Science, 247:1306-1310(1990)。Cunningham等,Science,244:1081-1085(1989)。Ausubel(ed.), Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,Inc.(1994)。T.Maniatis,E.F.Fritsch和J.Sambrook,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)。Pearson,Methods

Mol.Biol.243:307-31(1994)。Gonnet等,Science 256:1443-45(1992)。

[0183] 本发明的肽可以是本申请公开的抗体或其抗原结合部分的功能活性变体,例如少于约30%、约25%、约20%、约15%、约10%、约5%或者约1%的氨基酸残基被取代或缺失,但是基本上保持了相同的免疫学性质,包括但不限于与CD40结合。

[0184] 抗体或其抗原结合部分还可以含有肽的变体、类似物、直系同源物、同源物和衍生物,其显示出生物活性,例如与抗原(如CD40)结合。肽可以含有一种或多种氨基酸类似物(包括例如非天然存在的氨基酸,仅在无关生物系统中天然存在的氨基酸,来自哺乳动物系统的经修饰的氨基酸等),具有取代连接的肽以及本领域公知的其他修饰。

[0185] 可以将抗体或其抗原结合部分衍生化或连接至另一功能性分子。例如,可以将抗体功能性连接(通过化学偶联、基因融合、非共价相互作用等)至一种或多种其他分子实体,如另一种抗体、可检测试剂、免疫抑制剂、细胞毒剂、药剂、能够介导与另一种分子结合的蛋白或肽(如抗生物素蛋白链菌素核心区域或多聚组氨酸标签)、氨基酸接头、信号序列、免疫源性运载体或者在蛋白纯化中使用的配体(如谷胱甘肽-S-转移酶、组氨酸标签和葡萄球菌蛋白A)。细胞毒剂可以包括放射性同位素、化学治疗剂和毒素(如细菌、真菌、植物或动物来源的具有酶促活性的毒素)及其片段。可以使用标准程序将此类细胞毒剂与本公开的人源化抗体偶联,并且例如用于治疗适于使用抗体治疗的患者。

[0186] 一种类型的衍生化蛋白是通过将(相同或不同类型的)两种或更多种蛋白交联生产的。适宜的连接剂包括具有被适宜的间隔区所分隔的两个不同反应性基团的异双功能性(例如,间马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯)或同双功能性(例如,双琥珀酰亚胺辛二酸酯)的那些。使用其可以将蛋白衍生化(或标记)的有用的可检测试剂包括荧光剂、各种酶、辅基、发光材料、生物发光材料和放射性材料。非限制性、示例性的荧光可检测试剂包括荧光素、荧光素异硫氰酸酯、罗丹明和藻红蛋白。还可以使用可检测的酶将蛋白或抗体衍生化,如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖氧化酶等。还可以使用辅基(例如,抗生物素蛋白链菌素/生物素和亲和素/生物素)将蛋白衍生化。

[0187] 在另一个实施方式中,使用未标记的人源化抗-CD40抗体或其片段并使用与人源化抗-CD40抗体或其片段结合的标记抗体对其进行检测。

[0188] 抗体片段

[0189] 抗体可以是全长的或者可以包括具有抗原结合部分的抗体的片段(或若干片段),其包括但不限于Fab、F(ab')₂、Fab'、F(ab)'、Fv、单链Fv(scFv)、二价scFv(bi-scFv)、三价scFv(tri-scFv)、Fd、dAb片段(例如,Ward等,Nature,341:544-546(1989))、分离的CDR、二体、三体、四体、线形抗体、单链抗体分子以及由抗体片段形成的多特异性抗体。通过使用重组方法或合成的接头将抗体片段连接生产的单链抗体也包括在本公开内容中。Bird等,Science,1988,242:423-426。Huston等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1988,85:5879-5883。

[0190] 使用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,将其称为“Fab”片段,每个片段均具有单一的抗原结合位点和残余“Fc”片段,该片段的名称反映了其易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点并仍能够交联抗原的F(ab')₂片段。

[0191] Fv是含有完整抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施方式中,双链Fv种类由紧密的、非共价结合的一个重链和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在单链Fv(scFv)种类中,一个重链和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽接头共价连接,使得轻链和重链可

以类似于双链Fv种类中的“二聚体”结构结合。正是在这种构造中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以定义 V_H - V_L 二聚体表面上的抗原结合位点。六个CDR共同赋予了抗体的抗原结合特异性。然而,尽管其亲和性低于整个结合位点,但是甚至单一可变结构域(或仅包含三个抗原特异性CDR的Fv的一半)就具有识别和结合抗原的能力。

[0192] Fab片段含有重链和轻链可变结构域并且还含有轻链恒定结构域和重链第一个恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在重链CH1结构域的羧基末端添加了几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基携带有游离巯基的Fab'的名称。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为在其间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对产生的。抗体片段的其他化学偶联也是公知的。

[0193] 单链Fv或scFv抗体片段含有抗体的 V_H 和 V_L 结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。在通常情况下,scFv多肽还包含在 V_H 和 V_L 结构域之间的多肽接头,其能够使scFv形成抗原结合所需的结构。scFv的综述,参见例如Pluckthün, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315。

[0194] 双体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,该片段含有在同一多肽链中(V_H - V_L)与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H)。通过使用过短以至于不能使同一链上的两个结构域之间配对的接头,迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并形成两个抗原结合位点。双体可以是二价的或双特异性的。在下文中更完整的对双体进行了描述,例如欧洲专利号404,097;PCT公开号W0 1993/01161;Hudson等, *Nat. Med.* 9:129-34, 2003;和Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-8, 1993。在Hudson等, *Nat. Med.* 9:129-34, 2003中也对三体和四体进行了描述。

[0195] 可以通过传统方法(如酶促消化)或通过重组技术产生抗体片段。在某些情况下,使用抗体片段比完整抗体更有好处。片段的更小尺寸使其迅速清除,并且可能导致进入实体肿瘤的情况得到改善。对于某些抗体片段的综述,参见Hudson等, *Nat. Med.* 9:129-134, 2003。

[0196] 已开发了各种用于生产抗体片段的技术。传统上,这些片段是通过完整抗体的蛋白水解消化产生的(参见例如,Morimoto等, *J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-17, 1992;和Brennan等, *Science* 229:81-3, 1985)。然而,这些片段现在可以直接由重组宿主细胞生产。Fab、Fv和ScFv抗体片段都可以在大肠杆菌中表达和分泌,从而容易产生大量这些片段。可以从抗体噬菌体文库中分离抗体片段。或者,可以直接从大肠杆菌中回收Fab'-SH片段并且化学偶联以形成 $F(ab')_2$ 片段(Carter等, *Bio/Technology* 10:163-7, 1992)。在另一种方法中,直接从重组宿主细胞培养物中分离 $F(ab')_2$ 片段。在美国专利号5,869,046中描述了包含挽救受体结合表位残基的具有延长的半衰期的Fab和 $F(ab')_2$ 片段。用于生产抗体片段的其他技术对本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0197] 本发明抗体或其抗原结合部分可以包含至少一个恒定结构域,如(a) IgG恒定结构域; (b) IgA恒定结构域等。

[0198] 本公开内容包括所有抗体同种型,包括IgG(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(IgA1、IgA2)、IgD或IgE。抗体或其抗原结合部分可以是哺乳动物(例如,小鼠、人)抗体或其抗原结合部分。抗体的轻链可以是 κ 或 λ 型。替代的人源化抗-CD40抗体可以包含一个以

上免疫球蛋白类别或同种型的序列,并且选择特定的恒定结构域以优化所需的效应器功能在本领域普通技术人员能力范围内。

[0199] 本公开内容的抗体或其抗原结合部分可以是单特异性的、双特异性的或多特异性的。多特异性或双特异性抗体或其片段可以对一个靶多肽(例如,CD40)上的不同表位是特异性的或者可以含有对一个以上靶多肽(例如,对CD40和与移植排斥或自身免疫性疾病相关的其他抗原具有特异性的抗原结合结构域)具有特异性的抗原结合结构域。在一个实施方式中,多特异性抗体或其抗原结合部分包含至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域能够与单独的抗原或与相同抗原上的不同表位特异性结合。Tutt等,1991, J. Immunol. 147:60-69。Kufer等,2004, Trends Biotechnol. 22:238-244。本发明抗体可以连接至或与另一种功能性分子(例如,另一种肽或蛋白)共表达。例如,抗体或其片段可以功能性连接至(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他方式)一个或多个其他分子实体,如另一种抗体或抗体片段以产生具有第二结合特异性的双特异性或多特异性抗体。例如,本公开内容包括双特异性抗体,其中免疫球蛋白的一个臂对CD40具有特异性,以及免疫球蛋白的另一个臂对第二治疗靶点具有特异性或者与第二治疗部分(如免疫抑制剂)缀合。

[0200] 抗体的生产

[0201] 本公开内容提供了用于制备与CD40特异性结合的抗体或其抗原结合部分的方法。

[0202] 例如,使用包含CD40的组合物免疫非人动物,然后从动物中分离特异性抗体。该方法还可以包括评估抗体与CD40的结合。

[0203] 在一个实施方式中,本公开内容提供了一种用于制备表达与CD40特异性结合的抗体的杂交瘤的方法。该方法包括下述步骤:使用包含CD40或其片段的组合物免疫动物;从动物中分离脾细胞;从脾细胞产生杂交瘤;以及选择生产与CD40特异性结合的抗体的杂交瘤。Kohler和Milstein, Nature, 256:495, 1975。Harlow, E. 和 Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988。

[0204] 在一个实施方式中,腹腔内或静脉内使用CD40免疫小鼠。可以给予或不给予一次或多次强化免疫。可以通过例如ELISA(酶联免疫吸附测定)或流式细胞术监测血浆中的抗体滴度。将具有足够抗-CD40抗体滴度的小鼠用于融合。可以或可以不在处死并取脾脏前3天使用抗原对小鼠进行强化免疫。将小鼠脾细胞分离并使用PEG与小鼠骨髓瘤细胞系融合。然后,针对抗原特异性抗体的产生情况对所得到的杂交瘤进行筛选。将细胞铺板,然后在选择性培养基中培养。然后通过ELISA针对人抗-CD40单克隆抗体对每个孔的上清液进行筛选。将分泌抗体的杂交瘤重新铺板,再次筛选,如果抗-CD40单克隆抗体仍为阳性,则可以通过有限稀释进行亚克隆。

[0205] 可用于增加CD40免疫原性的佐剂包括发挥作用以增加对肽或肽组合的免疫应答的任何一种或多种试剂。佐剂的非限制性实例包括铝佐剂、磷酸铝、氢氧化铝、MF59(4.3% w/v角鲨烯、0.5% w/v聚山梨醇酯80(吐温80)、0.5% w/v脱水山梨糖醇三油酸酯(司盘85))、含CpG的核酸、QS21(皂苷佐剂)、MPL(单磷酸脂质A)、3DMPL(3-O-脱酰基MPL)、Aquila提取物、ISCOMS(参见例如, Sjolander等, (1998) J. Leukocyte Biol. 64:713; W090/03184; W096/11711; W000/48630; W098/36772; W000/41720; W006/134423和W007/026190)、LT/CT突变

体、聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PLG)微粒、Quil A、白介素、弗氏佐剂、N-乙酰基-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-正-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺(CGP 11637,称为正-MDP)、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺酰-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油-3-羟基磷酸氧基)-乙胺(CGP 19835A,称为MTP-PE)以及RIBI,其含有从细菌中提取的三种成分单磷酸脂质A、海藻糖二霉菌酸酯和细胞壁骨架(MPL+TDM+CWS),其是在2%角鲨烯/吐温80中的乳剂。

[0206] 免疫的动物可以是当施用免疫原时能够产生可恢复的抗体的任意动物,例如但不限于家兔、小鼠、大鼠、仓鼠、山羊、马、猴、狒狒和人。在一个方面中,宿主是转基因的并且产生人抗体,例如表达人免疫球蛋白基因区段的小鼠。美国专利号8,236,311;7,625,559和5,770,429,其中的每一个公开的内容均通过引用整体并入本申请。Lonberg等,Nature 368(6474):856-859,1994。Lonberg,N.,Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101,1994。Lonberg,N.和Huszar,D.,Intern.Rev.Immunol.,13:65-93,1995。Harding,F.和Lonberg,N.,Ann.N.Y.Acad.Sci.,764:536-546,1995。

[0207] 本发明抗体或其部分可以由使用编码所需抗体的轻链和重链(或其部分)的DNA转化的宿主细胞生产。可以使用标准技术从这些培养基上清液和/或细胞中分离和纯化抗体(或其部分)。例如,可以使用编码抗体的轻链、重链或者这两者的DNA转化宿主细胞。还可以将重组DNA技术用于除去编码不是结合所必需的轻链和重链的任意一个或两者的至少一部分(例如,恒定区)的一些或全部DNA。

[0208] 本发明还包括编码至少一个与CD40特异性结合的本发明抗体或其抗原结合部分的核酸或多核苷酸。可以在细胞中表达核酸以生产本发明抗体或其抗原结合部分。本公开的分离的核酸或多核苷酸包含至少一条编码与SEQ ID NO:11-29的任意一个具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%同一性的肽的序列。

[0209] 本发明还涉及包含至少一个核酸或多核苷酸的表达载体,所述核酸或多核苷酸编码与SEQ ID NO:11-29的任意一个具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%、约70%、约75%、约80%、约81%、约82%、约83%、约84%、约85%、约86%、约87%、约88%、约89%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或者约100%同一性的肽。

[0210] 编码本发明抗体或其抗原结合部分的功能活性变体的核酸分子也包括在本公开内容中。这些核酸分子可以在中度严谨、高度严谨或非常严谨的条件下与编码任何本发明抗体或其抗原结合部分的核酸杂交。进行杂交反应的指导原则可以参见Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,N.Y.6.3.1-6.3.6,1989,其通过引用并入本申请。在本申请中提及的特定杂交条件如下:(1)中度严谨杂交条件:在约45℃下6XSSC,然后在0.2XSSC中进行一次或多次洗涤,在60℃下0.1%SDS;(2)高度严谨杂交条件:在约45℃下6XSSC,然后在0.2XSSC中进行一次或多次洗涤,在65℃下0.1%SDS;以及(3)非常严谨的杂交条件:0.5M磷酸钠,在65℃下7%SDS,然后在0.2XSSC中进行一次或多次洗涤,在65℃下1%SDS。

[0211] 可以将编码本发明抗体或其抗原结合部分的核酸或多核苷酸引入能够在适宜表达系统中表达的表达载体,然后分离或纯化表达的抗体或其抗原结合部分。任选地,可以在无细胞翻译系统中翻译编码本发明抗体或其抗原结合部分的核酸。美国专利号4,816,567。Queen等,Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-10033(1989)。

[0212] 可以在各种适宜的细胞中表达本发明的核酸,包括原核细胞和真核细胞,例如细菌细胞(例如,大肠杆菌)、酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。多种哺乳动物细胞系是本领域公知的,并且包括可以从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生化细胞系。细胞的非限制性实例包括哺乳动物来源或具有哺乳动物样特征的所有细胞系,包括但不限于猴肾细胞(COS,例如COS-1、COS-7)、HEK293、幼仓鼠肾细胞(BHK,例如BHK21)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、NS0、PerC6、BSC-1、人肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)、SP2/0、HeLa、Madin-Darby牛肾细胞(MDBK)、骨髓瘤细胞和淋巴瘤细胞的亲代细胞、衍生物和/或经工程化改造的变体。经工程化改造的变体包括例如聚糖性质修饰和/或位点特异性整合位点变体。

[0213] 本公开内容还提供了包含本申请所述核酸的细胞。细胞可以是杂交瘤或转染子。可以在多种细胞中表达本发明抗体或其抗原结合部分。在本申请中对细胞类型进行讨论。

[0214] 当使用重组技术生产(例如,人源化抗体或其抗原结合部分)时,抗体或其部分可以在细胞内、周质间隙中产生或直接分泌到培养基中。如果抗体在细胞内产生,则可以将破坏细胞以释放蛋白作为第一步。可以通过例如离心或超滤除去颗粒碎片(宿主细胞或裂解片段)。Carter等,1992,Bio/Technology 10:163-167描述了一种用于分离分泌进入大肠杆菌周质间隙的抗体的程序。简言之,在存在醋酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯基甲基磺酰氟(PMSF)的条件下将细胞糊解冻约30分钟。通过离心除去细胞碎片。当抗体分泌到培养基中时,可以首先使用市售的蛋白浓缩滤器(例如,Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)浓缩来自这种表达系统的上清液。可以使用各种方法从宿主细胞中分离抗体。

[0215] 可以使用例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析纯化从细胞中制备的抗体或其部分,其中亲和层析是典型的纯化技术。蛋白A作为亲和配体的适宜性取决于存在于抗体中的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。可以将蛋白A用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(参见例如,Lindmark等,1983J. Immunol. Meth. 62:1-13)。蛋白G推荐用于所有小鼠同种型和用于人 $\gamma 3$ (参见例如,Guss等,1986EMBO J. 5:1567-1575)。亲和配体所连接的基质通常是琼脂糖,但其他基质是可用的。机械稳定的基质如可控多孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯能够比琼脂糖具有更快流速和更短处理时间。当抗体包含C.sub.H3结构域时,可以将Bakerbond ABX.TM.树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)用于纯化。用于蛋白纯化的其他技术如在离子交换柱上分级、乙醇沉淀、反相HPLC、在二氧化硅上层析、在肝素SEPHAROSE.TM.上层析、在阴离子或阳离子交换树脂上层析(如聚天冬氨酸柱)、层析聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀也是可用的,其取决于所回收的抗体。

[0216] 在任何初步纯化步骤之后,可以对包含所关注抗体和污染物的混合物进行低pH疏水性相互作用的,其使用pH约2.5-4.5之间的洗脱缓冲剂,其通常在低盐浓度下进行(例如,从约0-0.25M的盐)。

[0217] 然后可以对生产与CD40结合(优选地以高亲和性)的抗体的杂交瘤或其他细胞进行亚克隆和进一步表征。然后可以从每个杂交瘤或细胞中选出保留了亲代细胞反应性(通过ELISA)的一个克隆,用于制备细胞库和用于抗体纯化。

[0218] 或者,可以通过本领域熟知的固相方法合成本发明抗体或其抗原结合部分。Solid Phase Peptide Synthesis:A Practical Approach by E.Atherton and R.C.Sheppard, published by IRL at Oxford University Press(1989)。Methods in Molecular Biology,Vol.35:Peptide Synthesis Protocols(ed.M.W.Pennington and B.M.Dunn)第7章。Solid Phase Peptide Synthesis,2nd Ed.,Pierce Chemical Co.,Rockford,IL (1984)。G.Barany and R.B.Merrifield,The Peptides:Analysis,Synthesis,Biology, editors E.Gross and J.Meienhofer,Vol.1和Vol.2,Academic Press,New York,(1980), pp.3-254。M.Bodansky,Principles of Peptide Synthesis,Springer-Verlag,Berlin (1984)。

[0219] 可以制备针对被2C10识别的CD40表位的其他抗体(例如,单克隆、多克隆、多特异性或单特异性抗体),例如使用用于制备抗体的适宜方法。在一个实例中,将被2C10抗体识别的表位编码序列表示为与谷胱甘肽S-转移酶(GST)的C端融合物(Smith等,Gene 67:31-40,1988)。将用于家兔免疫的融合蛋白在谷胱甘肽-琼脂糖珠上纯化,使用谷胱甘肽洗脱,使用凝血酶切割(在经工程改造的切割位点)以及纯化。使用完全弗氏佐剂进行初次免疫,以及使用不完全弗氏佐剂进行随后的免疫。使用DST融合蛋白的凝血酶裂解蛋白片段通过Western印迹和免疫沉淀分析监测抗体滴度。使用CNBr-琼脂糖偶联蛋白对免疫血清进行亲和纯化。可以使用一组无关GST蛋白确定抗血清的特异性。

[0220] 作为GST融合蛋白的替代或辅助免疫原,可以产生与本发明多肽相对独特的免疫原区域对应的肽并且通过引入的C-末端赖氨酸将其与钥孔戚血蓝蛋白(KLH)偶联。将这些肽的每一个的抗血清在与BSA缀合的肽上进行相似的亲和纯化,以及通过使用肽缀合物的ELISA或Western印迹或通过使用以GST融合蛋白形式表达的多肽的Western印迹或免疫沉淀对特异性进行检测。

[0221] 或者,可以使用标准杂交瘤技术制备特异性结合被2C10抗体所识别的CD40表位的单克隆抗体(参见例如,Kohler等,Nature 256:495-7,1975;Kohler等,Eur.J.Immunol.6:511-9,1976;Kohler等,Eur.J.Immunol.6:292-5,1976;Hammerling等,Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas,Elsevier,NY,1981)。一旦生产,还可以通过Western印迹或免疫沉淀分析检测单克隆抗体的特异性识别。或者,可以使用上文所述的本发明多肽和噬菌体展示文库制备单克隆抗体(Vaughan等,Nat.Biotechnol.14:309-14,1996)。

[0222] 可以通过标准技术(例如,使用PCR并将片段克隆进入pGEX表达载体)产生表位片段。在大肠杆菌中表达融合蛋白并使用谷胱甘肽琼脂糖亲和基质对其进行纯化。为了使抗血清的低亲和性或特异性的可能问题最小化,对于每个蛋白产生两个或三个此类融合,并将每个融合注射进入至少两只家兔。可以通过一系列注射产生抗血清,并且可以包括例如至少三次强化注射。

[0223] 为了大规模和低成本的产生多克隆抗体,可以选择适宜的动物种类。可以从例如经免疫奶牛的牛奶或初乳中分离多克隆抗体。每升牛初乳含有28g IgG,而每升牛奶含有1.5g IgG(Ontsouka等,J.Dairy Sci.86:2005-11,2003)。还可以从经免疫鸡的卵黄中分离多克隆抗体(Sarker等,J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.32:19-25,2001)。

[0224] 测定

[0225] 可以将各种方法用于测定抗体或其抗原结合部分以确证其对所关注的抗原具有

特异性和/或研究其性质。进行此类测定的一种方法是血清筛选测定,如美国专利公开号2004/0126829中所述。可以通过各种公知技术表征抗-CD40抗体与CD40的结合。例如,在ELISA中,使用在PBS中的CD40或CD40的片段包被没标板,然后使用在PBS中稀释的无关蛋白(如牛血清白蛋白(BSA))封闭。将CD40免疫小鼠的血清稀释物(或含有抗-CD40抗体的溶液)加入各孔中并进行孵育。洗板,然后使用与酶(例如,碱性磷酸酶)缀合的二抗孵育。洗涤后,使用酶的底物(例如,ABTS)将板显色,并在特定OD下分析。在其他实施方式中,为了确定所选择的单克隆抗体是否与独特的表位结合,将抗体生物素化,然后可以使用抗生物素蛋白链菌素标记的探针对其进行检测。可以通过Western印迹检测抗-CD40抗体与CD40的反应性。

[0226] 还可以根据其抗原的结合亲和性描述或说明本公开内容的抗体或抗原结合片段、其变体或衍生物。可以使用任何适宜的方法通过实验确定抗体对抗原的亲和性(参见例如,Berzofsky等,“Antibody-Antigen Interactions,”In Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992); 以及本申请所述的方法)。如果在不同条件下检测(例如,盐浓度、pH),所检测的特定抗体-抗原相互作用的亲和性可能改变。因此,优选使用标准化的抗体和抗原溶液以及标准化的缓冲液测量亲和性和其他抗原结合参数(例如, K_D 、 K_a 、 K_d)。

[0227] 本发明抗体或其抗原结合片段以小于约 10^{-7} M、小于约 10^{-8} M、小于约 10^{-9} M、小于约 10^{-10} M、小于约 10^{-11} M、小于约 10^{-12} M、从约 10^{-7} M至约 10^{-12} M、从约 10^{-8} M至约 10^{-11} M、从约 10^{-9} M至约 10^{-10} M或者从约 10^{-8} M至约 10^{-12} M的解离常数(K_D)与CD40特异性结合。

[0228] 还可以将测定用于检测抗体(或其片段)阻断CD40与CD154结合,或者抑制或减少CD40介导的应答的能力。

[0229] 如在本申请中所使用的,术语“抑制结合”和“阻断结合”(例如,CD154与CD40结合的抑制/阻断)可以互换使用,并且包括部分和完全抑制/阻断两部分。抑制和阻断还旨在包括与未同抗-CD40抗体接触的配体相比当与本申请公开的抗-CD40抗体或其部分接触后CD154与CD40结合的任何可检测的减少,例如,CD154与CD40的结合阻断了至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0230] 在一个实施方式中,可以通过测量选自CD23、CD80、CD86的一种或多种标记物或在CD20+细胞上的任意其他适宜标记物的表达可以确定B细胞的活化或其抑制。

[0231] 可以通过其对T细胞介导的抗体应答的作用表征本发明抗体或其片段。例如,当以从约1mg/kg体重至约50mg/kg体重、从约2mg/kg体重至约40mg/kg体重、从约3mg/kg体重至约30mg/kg体重、从约5mg/kg体重至约20mg/kg体重、从约8mg/kg体重至约13mg/kg体重、约1mg/kg body weight、约2mg/kg体重、约5mg/kg体重、约10mg/kg体重、约15mg/kg体重、约20mg/kg体重、约25mg/kg体重、约30mg/kg体重、约35mg/kg体重、约40mg/kg体重、约50mg/kg体重、约60mg/kg体重、约70mg/kg体重或者约80mg/kg体重的剂量范围向哺乳动物施用抗体或其抗原结合部分时,抗体或其片段在哺乳动物中可以抑制IgM和/或IgG产生。

[0232] 可以通过其对延长移植后移植植物存活的作用表征本发明抗体或其片段。本发明抗体或其片段单独或与一种或多种免疫抑制剂联用可以将移植植物存活延长约30%、约40%、

约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约2倍、约5倍、约10倍、约15倍、约20倍、约25倍、约30倍、约35倍、约40倍、约45倍、约50倍、约55倍、大于约40%、大于约50%、大于约60%、大于约70%、大于约80%或者大于约90%、大于约2倍、大于约5倍、大于约10倍、大于约20倍、大于约30倍或者大于约40倍。例如,本发明抗体或其片段可以延长胰岛同种异体移植物存活。

[0233] 在某些实施方式中,本发明抗体或其抗原结合片段:a)可以阻断CD40与CD154的结合;c)可以阻断抗原提呈细胞(例如,B细胞、树突状细胞、巨噬细胞等)活化;d)可以或可以不诱导B细胞耗竭;e)可以或可以不抑制或减少从抗原提呈细胞释放细胞因子;f)可以或可以不诱导肿瘤细胞凋亡;g)可以或可以不抑制肿瘤细胞增殖;h)可以或可以不杀死肿瘤细胞;i)可以或可以不刺激抗-肿瘤T细胞应答;和/或j)可以或可以不减小建立的肿瘤。本申请所述的抗体可以具有或诱导这些贡献或活性的任意一个或多个的组合。Tai等,Cancer Res.2005,1;65(13):5898-906;Luqman等,Blood 112:711-720,2008。还可以检测本申请所述抗体或其部分对CD40内化的作用、体外和体内效能等。可以使用本领域技术人员公知的已良好建立的方法(参见例如,Current Protocols in Molecular Biology(Greene Publ.Assoc.Inc.&John Wiley&Sons,Inc.,NY,N.Y.);Current Protocols in Immunology (Edited by:John E.Coligan,Ada M.Kruisbeek,David H.Margulies,Ethan M.Shevach,Warren Strober 2001John Wiley&Sons,NY,N.Y.);或市售试剂盒进行此类测定。

[0234] 待治疗的病况

[0235] 本发明抗体或其抗原结合部分具有体外和体内治疗、预防和/或诊断用途。例如,可以在培养基中体外培养细胞并将其与抗-CD40抗体或其片段接触。作为体内(例如,治疗或预防)方案的一部分,可以在对象中施用抗体或其抗原结合部分。对于体内实施方案,接触步骤在对象中进行并且包括在有效允许抗体或其部分与对象中的CD40结合的条件下向对象施用抗-CD40抗体或其部分。可以施用抗体或其抗原结合部分以降低移植排斥的可能性或增加移植排斥前的持续时间、诱导免疫抑制或治疗自身免疫性病症。

[0236] 可以将本申请所述的抗体或抗体片段用于需要免疫抑制(例如,移植排斥或自身免疫学病症)的任何情况下。这些抗体对于治疗移植排斥是特别有用的,例如降低特定移植物被宿主排斥的可能性或增加排斥发生前的持续时间。可以将本申请所述的抗体或抗体片段用于与适于移植的任何器官或任何组织的移植组合。非限制性的示例性器官包括心脏、肾、肺、肝、胰腺、肠和胸腺;非限制性的示例性组织包括骨、肌腱、角膜、皮肤、心脏瓣膜、静脉或骨髓。

[0237] 还可以将抗体和抗体片段用于治疗自身免疫性病症。在一个实施方式中,自身免疫性病症可能与存在自身抗体相关或由其引起。可以使用本发明抗体或其片段治疗的自身免疫性疾病包括但不限于系统性红斑狼疮(SLE)、CREST综合征(钙质沉着、雷诺氏综合征、食管运动功能障碍、指端硬化和毛细血管扩张症)、斜视性眼阵挛、炎性肌病(例如,多肌炎、皮肌炎和包涵体肌炎)、系统性硬皮病、原发性胆汁性肝硬化、乳糜泻(例如,谷蛋白过敏性肠病)、皮肤疱疹样皮炎、米勒-费歇尔综合征、急性运动轴索神经病变(AMAN)、传导阻滞的多灶性运动神经病、自身免疫性肝炎、抗磷脂综合征、韦格纳肉芽肿病、显微镜下多血管炎、Churg-Strauss综合征、类风湿性关节炎、慢性自身免疫性肝炎、硬化性肌炎、重症肌无力、Lambert-Eaton肌无力综合征、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、副肿瘤性小脑变性、僵人综合征、边缘性脑炎、艾萨克综合征、西德纳姆舞蹈病、与链球菌相关的儿科自身免疫性神经精

神病(PANDAS)、脑炎、I型糖尿病和视神经脊髓炎。

[0238] 其他自身免疫性病症包括恶性贫血、艾迪生氏病、牛皮癣、炎性肠病、牛皮癣性关节炎、舍格伦综合征、红斑狼疮(例如,盘状红斑狼疮、药物诱导的红斑狼疮和新生儿红斑狼疮)、多发性硬化症和反应性关节炎。

[0239] 可以使用本公开方法治疗的其他病症包括,例如,多肌炎、皮肌炎、多发性内分泌衰竭、施密特综合征、自身免疫性葡萄膜炎、肾上腺炎、甲状腺炎、自身免疫性甲状腺病、胃萎缩症、慢性肝炎、狼疮性肝炎、动脉粥样硬化、早老性痴呆、脱髓鞘疾病、亚急性皮肤红斑狼疮、甲状旁腺功能减退症、德雷斯勒综合征、自身免疫血小板减少症、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、寻常天疱疮、天疱疮、斑秃、类天疱疮、硬皮病、进行性系统性硬化症、成人发病的糖尿病(例如,II型糖尿病)、男性和女性自身免疫性不孕症、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、混合性结缔组织病、结节性多动脉炎、系统性坏死性血管炎、幼年发病的类风湿性关节炎、肾小球性肾炎、特应性皮炎、特应性鼻炎、古德帕斯彻综合征、查加斯病、结节病、风湿热、哮喘、复发性流产、抗磷脂综合征、农民肺、多形性红斑、心脏切开后综合征、库欣综合征、自身免疫慢性活动性肝炎、饲鸟者肺、过敏性疾病、过敏性脑脊髓炎、中毒性表皮坏死松解症、脱发、阿尔波特氏综合征、肺泡炎、变应性肺泡炎、纤维化性肺泡炎、间质性肺病、结节性红斑、坏疽性脓皮病、输血反应、麻风病、疟疾、利什曼病、锥虫病、高安氏动脉炎、风湿性多肌痛、颞动脉炎、血吸虫病、巨细胞动脉炎、蛔虫病、曲霉病、Sampter综合征、湿疹、淋巴瘤样肉芽肿病、白塞氏病、卡普兰综合征、川崎病、登革热、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑、胎儿成红细胞增多症、嗜酸细胞性筋膜炎、舒尔曼综合征、菲尔蒂综合征、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异色性睫状体炎、富克斯氏睫状体炎、IgA肾炎、亨-舍二氏紫癜、移植物抗宿主病、移植排斥、人类免疫缺陷病毒感染、埃可病毒感染、心脏病、阿尔茨海默病、细小病毒感染、风疹病毒感染、接种后综合征、先天性风疹感染、霍奇金和非霍奇金淋巴瘤、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、伊顿-兰伯特综合征、复发性多软骨炎、恶性黑色素瘤、冷球蛋白血症、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、埃-巴二氏病毒感染、腮腺炎、伊文氏综合征和自身免疫性性腺衰竭。

[0240] 在另一个实施方式中,可以将本发明抗体或其片段用于与CD40的表达相关的各种病症的治疗。

[0241] 病症可以是将从使用本发明抗体或其片段的治疗中获益的任何病况。这包括慢性和急性病症或疾病,包括使哺乳动物易患有该病症的那些病理状况。本申请待治疗病症的非限制性实例包括自身免疫性疾病、免疫学病症、炎性病症、癌症、血液系统恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、白血病、淋巴系统恶性肿瘤和血管生成性病症。

[0242] 如在本申请中所使用的,术语“CD40相关病症”或“CD40相关疾病”指其中指征为表达CD40的细胞修饰或消除的病况。这些包括显示出异常增殖的表达CD40的细胞或与癌性或恶性生长相关的表达CD40的细胞。CD40相关病症包括但不限于免疫系统的疾病和病症,如自身免疫性病症和炎性病症。这种病况包括但不限于类风湿性关节炎(RA)、系统性红斑狼疮(SLE)、硬皮病、干燥综合征、多发性硬化症、牛皮癣、炎性肠病(例如,溃疡性结肠炎和克罗恩病)、肺部炎症、哮喘和特发性血小板减少性紫癜(ITP)。显示出CD40抗原异常表达的癌症的更具体实例包括B类淋巴母细胞、伯基特氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、T细胞淋巴瘤、卡波西氏肉瘤、骨肉瘤、表皮和内皮瘤、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、头颈部

癌症、皮肤癌(黑色素瘤)、膀胱癌和肾癌。此类病症还包括但不限于白血病、淋巴瘤,包括B细胞淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;包括肉瘤如骨肉瘤、尤因氏肉瘤、恶性黑色素瘤、腺癌,包括卵巢腺癌、卡波西氏肉瘤/卡波西氏瘤和鳞状细胞癌。美国专利号9,090,696。

[0243] 能够被本发明抗体或其片段治疗或预防的表达CD40的癌症还包括例如白血病,如急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病(例如,成髓细胞、早幼粒细胞、骨髓单核细胞、单核细胞或红白血病)、慢性白血病、慢性髓细胞(粒细胞)白血病或慢性淋巴细胞白血病;真性红细胞增多症;淋巴瘤(例如,霍奇金氏病或非霍奇金氏病);多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;重链病;实体瘤如肉瘤和癌(例如,纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜肉瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、子宫癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤,星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、血管瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤、鼻咽癌或食管癌)。

[0244] 还包括治疗B淋巴细胞病症(例如,系统性红斑狼疮、古德帕斯彻综合征、类风湿性关节炎和I型糖尿病)、Th1淋巴细胞病症(例如,类风湿性关节炎、多发性硬化症、牛皮癣、Sjorgren综合征、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、肺结核或移植物抗宿主病)或Th2淋巴细胞病症(例如,特应性皮炎、系统性红斑狼疮、特应性哮喘、鼻结膜炎、变应性鼻炎、Omenn综合征、系统性硬化症或慢性移植物抗宿主病)。

[0245] 在一些实施方式中,免疫学病症是T细胞介导的免疫学病症,如其中活化的T细胞与表达CD40的病症相关的T细胞病症。可以施用抗-CD40抗体或药剂以耗竭此类表达CD40的活化的T细胞。在一个特定的实施方式中,施用抗-CD40抗体或药剂能够耗竭表达CD40的活化的T细胞,而静息T细胞基本上不被抗-CD40抗体或药剂耗竭。在这一背景下,“基本上不被耗竭”指少于约60%、或少于约70%、或少于约80%的静息T细胞不被耗竭。

[0246] 联合疗法

[0247] 可以单独或与一种或多种其他治疗剂(例如,第二治疗剂)联合施用本发明抗体或其抗原结合部分。在一些实施方式中,包含抗-CD40抗体或其片段的药物组合物还可以包含与抗体或其片段缀合或未缀合的第二治疗剂。在一个实施方式中,第二药剂是另一种单克隆或多克隆抗体或其抗原结合部分。在另一个实施方式中,第二药剂是免疫抑制剂。在又一个实施方式中,第二药剂是细胞毒剂或细胞抑制剂。在第四个实施方式中,第二药剂可以靶向活化的淋巴细胞、树突状细胞或表达CD40的癌细胞表面上CD40以外的受体或受体复合物。

[0248] 此类联合疗法可以对病况参数(例如,症状的严重程度、症状的数量或复发频率)具有相加或协同作用。

[0249] 本发明抗-CD40抗体或其片段可以与第二治疗剂同时施用。在另一个特定实施方式中,在抗-CD40抗体或其片段施用之前或之后施用第二治疗剂。

[0250] 可以将本申请所述的抗体和抗体片段与免疫抑制剂联合制剂或施用。免疫抑制剂的实例包括但不限于钙调神经磷酸酶抑制剂(例如,环孢菌素A(山地明®)、环孢素G、他克莫司(普乐可复®、普特皮®))、mTor抑制剂(例如,西罗莫司(雷帕鸣®、山新地明®)、替西罗莫司(馱瑞塞尔®)、佐他莫司和依维莫司(Certican®)、芬戈莫德(Gilenya™)、多球壳菌素、阿仑单抗(Campath®、MabCampath®、Campath-1H®)、利妥昔单抗(美罗华®、MabThera®)、抗-CD4单克隆抗体(例如,HuMax-CD4)、抗-LFA1单克隆抗体(例如,CD11a)、抗-LFA3单克隆抗体、抗-CD45抗体(例如,抗-CD45RB抗体)、抗-CD19抗体(参见例如,美国专利公开号2006/0280738)、monabatacept(Orencia®)、贝拉西普、吡啶基-ASC(他克莫司和子囊霉素的32-吡啶醚衍生物)、硫唑嘌呤(Azasan®、依木兰®)、淋巴细胞免疫球蛋白和抗-胸腺细胞球蛋白[马](Atgam®)、霉酚酸酯(骁悉®)、霉酚酸钠(myfortic®)、达利珠单抗(赛尼哌®)、巴利昔单抗(舒莱®)、环磷酰胺(癌得星®、Cytosan®、Neosar™、Procytox™、Revimmune™)、泼尼松、泼尼松龙、来氟米特(爱若华®)、FK778、FK779、15-脱氧精脒菌素(DSG)、白消安(马利兰®、白舒非®)、氟达拉滨(福达华®)、甲氨蝶呤(Rheumatrex®、Trexall®)、依那西普(Enbrel®)、阿达木单抗(修美乐®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、15-脱氧精脒菌素(胍立莫司)、LF15-0195、布雷迪宁、布喹那和鼠源CD3单克隆抗体(Orthoclone®)。

[0251] 评估药剂免疫抑制活性的方法是本领域公知的。例如,将在具有和不具有药理干预的情况下移植器官在体内存活时间的长度作为免疫应答抑制的定量指标。还可以使用体外测定,例如混合淋巴细胞反应(MLR)测定(参见例如,Fathman等,J.Immunol.118:1232-8,1977);CD3测定(通过抗-CD3抗体(例如,OKT3)对免疫细胞的特异性活化)(参见例如,Khanna等,Transplantation 67:882-9,1999;Khanna等,(1999)Transplantation 67:S58);以及IL-2R测定(用外源性添加的细胞因子IL-2特异性活化免疫细胞)(参见例如,Farrar等,J.Immunol.126:1120-5,1981)。

[0252] 可以将环孢菌素A(CsA;CAS No.59865-13-3;美国专利号3,737,433)及其类似物作为免疫抑制剂。已知多种显示出免疫抑制活性的其他环孢菌素及其衍生物和类似物。在下述中描述了环孢菌素及其制剂,例如2004Physicians' DeskReference® (2003) Thomson Healthcare,第58版和U.S专利号5,766,629;5,827,822;4,220,641;4,639,434;4,289,851;4,384,996;5,047,396;4,388,307;4,970,076;4,990,337;4,822,618;4,576,284;5,120,710;和4,894,235。

[0253] 他克莫司(FK506)是一种大环内酯类药物,其作用在分子作用模式和临床疗效方面均在很大程度上与CsA相似(Liu,Immunol.Today 14:290-5,1993;Schreiber等,Immunol.Today,13:136-42,1992);然而,其在CsA 20至100分之一的剂量下就显示出这些作用(Peters等,Drugs 46:746-94,1993)。在下述中描述了他克莫司及其制剂,例如2004Physicians' DeskReference® (2003) Thomson Healthcare,第58版,和U.S专利号4,894,366;4,929,611;和5,164,495。

[0254] 西罗莫司(雷帕霉素)是一种可以由例如吸水链霉菌(*Streptomyces*

hygroscopicus)产生的免疫抑制性内酰胺大环内酯。西罗莫司及其类似物的多种衍生物和制剂是已知的并且在下述中对其进行了描述,例如2004Physicians' Desk Reference® (2003) Thomson Healthcare,第58版,欧洲专利EP 0467606;PCT公开号WO 94/02136,WO 94/09010,WO 92/05179,WO 93/11130,WO 94/02385,WO 95/14023和WO 94/02136,以及美国专利号5,023,262;5,120,725;5,120,727;5,177,203;5,258,389;5,118,677;5,118,678;5,100,883;5,151,413;5,120,842和5,256,790。

[0255] 在一些实施方式中,第二药剂是细胞毒剂,其可以是常规化疗剂,如多柔比星、紫杉醇、美法仑、长春花生物碱、甲氨蝶呤、丝裂霉素C或依托泊苷。此外,可以将诸如CC-1065类似物、加利车霉素、美登素、多拉司他汀10类似物、利索新和海葵毒素的强效剂与抗-CD40抗体或其药剂连接。

[0256] 在其他实施方式中,第二药剂是人源化抗-HER2单克隆抗体;RITUXAN(利妥昔单抗;Genentech,Inc.,South San Francisco,Calif.);嵌合抗-CD20单克隆抗体;OVAREX(AltaRex Corporation,MA);PANOREX(GlaxoWellcome,NC;鼠源IgG2a抗体);ERBITUX(西妥昔单抗)(Imclone Systems Inc.,NY;抗-EGFR IgG嵌合抗体);VITAXIN(MedImmune,Inc.,MD);CAMPATH 1/H(Leukosite,MA;人源化IgG1抗体);Smart MI95(Protein Design Labs,Inc.,CA;人源化抗-CD33 IgG抗体);LymphoCide(Immunomedics,Inc.,NJ;人源化抗-CD22 IgG抗体);Smart ID10(Protein Design Labs,Inc.,CA;人源化抗-HLA-DR抗体);Oncolym(Techniclone,Inc.,CA;放射性标记的鼠抗-HLA-Dr10抗体);ALLOMUNE(BioTransplant,CA;人源化抗-CD2 mAb);AVASTIN(Genentech,Inc.,CA;抗-VEGF人源化抗体);Epratuzamab(Immunomedics,Inc.,NJ and Amgen,CA;抗-CD22抗体);和CEAcide(Immunomedics,NJ;人源化抗-CEA抗体)。

[0257] 可以作为第二药剂的其他适宜抗体包括但不限于:针对下述抗原的抗体:CA125、CA15-3、CA19-9、L6、Lewis Y、Lewis X、甲胎蛋白、CA 242、胎盘碱性磷酸酶、前列腺特异性抗原、前列腺酸性磷酸酶、表皮生长因子、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-4、抗转铁蛋白受体、p97、MUC1-KLH、CEA、gp100、MART1、前列腺特异性抗原、IL-2受体、CD20、CD52、CD33、CD22、人绒毛膜促性腺激素、CD38、粘蛋白、P21、MPG和Neu癌基因产物。

[0258] 非治疗用途

[0259] 本申请所述的抗体可用作亲和纯化剂。在该过程中,使用本领域熟知的方法将抗体或其片段固化在固相(如蛋白A树脂)上。将待纯化的含有CD40蛋白(或其片段)的样品与固化的抗体或其片段接触,然后使用适宜溶剂洗涤支持物,该溶剂将基本上除去样品中除与固化抗体结合的CD40蛋白以外的所有物质。最后,使用使CD40蛋白从抗体上释放的另一种适宜溶剂洗涤支持物。

[0260] 本发明抗-CD40抗体还用于诊断测定,以检测和/或纯化CD40蛋白,例如检测在特定细胞、组织或血清中CD40的表达。

[0261] 可以在任意公知的测定方法中使用本申请所述的抗体,如竞争性结合测定、直接和间接夹心测定以及免疫沉淀测定。参见例如,Zola,Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques,pp.147-158(CRC Press,Inc.1987)。

[0262] 药物组合物

[0263] 本公开内容提供了一种组合物(例如药物组合物),所述组合物含有与药学上可接

受的运载体一起制剂的本公开的抗体或其一个或多个抗原结合部分。在另一个实施方式中,组合物可以含有编码本发明抗体或其抗原结合部分的分离的核酸和药学上可接受的运载体。组合物可以在对象中有效降低移植排斥的可能性或延长移植排斥前持续时间、降低免疫抑制或治疗自身免疫性病症。本发明组合物可以在本申请所述的任何方法中有效。

[0264] 药学上可接受的运载体包括生理上相容的任何和所有适宜的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。取决于施用途,可以使用保护抗体(或其一个或多个抗原结合部分)不受酸和可能使抗体(或其一个或多个抗原结合部分)失活的其他自然条件作用的材料将本发明抗体(或其一个或多个抗原结合部分)包衣。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其适宜混合物的溶剂或分散介质。例如,可以通过使用诸如卵磷脂的包衣,通过在分散的情况下维持所需的粒径和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在某些实施方式中,本发明组合物可以在组合物中含有等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂导致可注射组合物的吸收延长,例如单硬脂酸盐和明胶。

[0265] 本发明的药物组合物可以含有本发明抗体或其部分以及本申请所述的第二治疗剂(例如,一种或多种免疫抑制剂)。

[0266] 组合物可以是溶液、混悬液、乳剂、输注装置或用于植入的递送装置,或者其可以以固体形式(例如,干粉)存在,使用前用水或另一种适宜载剂复溶。组合物可以是油乳剂、有包水乳剂、水包油包水乳剂、位点特异性乳剂、长效乳剂、粘性乳剂、微乳、纳米乳、脂质体、微粒、微球、纳米球、纳米颗粒和各种天然的或合成的聚合物(如不可吸收的不渗透聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯共聚物和 Hytrel® 共聚物,可溶胀聚合物,如水凝胶,或可吸收聚合物,如胶原以及某些多元酸或聚酯,如用于制备可吸收缝线,能够使疫苗持续释放的那些)形式。

[0267] 组合物可以是用于口服施用的丸剂、片剂、胶凝、液体或持续释放片;或者用于静脉内、鞘内、皮下或胃肠外施用的液体;或者用于局部施用的聚合物或其他持续释放载剂形式。

[0268] 在一个方面中,如果组合物是水溶性的,则将组合物的溶液溶解在药学上可接受的运载体中(例如水性运载体)中。水溶液的实例包括例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、Hank's 溶液、林格氏溶液、右旋糖/盐水、葡萄糖溶液等。根据需要,制剂可以含有药学上可接受的辅助物质以接近生理条件,如缓冲剂、张力调节剂、润湿剂、去垢剂等。添加剂还可以包括其他活性成分,如杀菌剂或稳定剂。例如,该溶液可以含有醋酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、失水山梨糖醇单月桂酸酯或三乙醇胺油酸酯。可以将固体制剂用于本公开内容中。可以将其制成例如丸剂、片剂、粉剂或胶囊。对于固体组合物,可使用常规的固体运载体,其包括例如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石粉、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。适宜的药物赋形剂包括例如淀粉、纤维素、滑石、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇。

[0269] 本领域熟知的用于制备制剂的方法参见例如“Remington: The Science and Practice of Pharmacy”(第20版, A.R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。

[0270] 在一个方面中,将包含本发明的组合物或核酸、多肽或抗体的药物制剂嵌入脂质单层或双层(例如,脂质体)中。美国专利号6,110,490;6,096,716;5,283,185和5,279,833。本发明的方面还提供了其中本发明的水溶性核酸、肽或多肽连接至单层或双层表面的制剂。例如,可以将肽连接至含酰肼-PEG-(二硬脂酰基磷脂酰)乙醇胺的脂质体(参见例如,Zalipsky,Bioconj.Chem.6:705-708,1995)。可以使用脂质体或任意形式的脂质膜,如平面脂质膜或完整细胞(例如,红细胞)的细胞膜。脂质体制剂可以通过任何方式,包括静脉内、透皮(参见例如,Vutla,J.Pharm.Sci.85:5-8,1996)、经粘膜或口服施用。本发明还提供了其中本发明的核酸、肽和/或多肽掺入胶束和/或脂质体中的药物制剂(参见例如,Suntres,J.Pharm.Pharmacol.46:23-28,1994;Woodle,Pharm.Res.9:260-265,1992)。可以根据标准方法制备脂质体和脂质体制剂并且其也是本领域熟知的。Akimaru,Cytokines Mol.Ther.1:197-210,1995。Alving,Immunol.Rev.145:5-31,1995。Szoka,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467,1980。美国专利号4,235,871;4,501,728和4,837,028。

[0271] 在一个方面中,使用保护肽免于从身体快速消除的运载体制备组合物,

[0272] 如控释制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备此类制剂的方法对本领域技术人员而言是显而易见的。还可以将脂质体混悬剂作为药学上可接受的运载体。美国专利号4,522,811。

[0273] 可以通过本领域公知的多种方法施用本公开内容的组合物。如本领域技术人员将意识到的是,施用途和/或模式将取决于所需结果的不同而变化。施用可以是肠胃外、静脉内、鞘内、皮下、口服、局部(topical)、局部(local)、肌内、真皮内、透皮、皮下、直肠、脊柱或表皮。通过连续输注静脉内递送是施用本发明抗体的一个示例性方法。

[0274] 为了通过某些施用途来施用本发明药剂,可能有必要给药剂包衣或将药剂与防止其失活的材料共同施用。例如,可以在适宜运载体中向对象施用药剂,例如脂质体或稀释剂。药学上可接受的稀释剂包括盐水和缓冲水溶液。脂质体包括水包油包水CGF乳剂以及常规脂质体(Strejan等,J.Neuroimmunol.7:27-41,1984)。

[0275] 胃肠外施用可以包括肠内和局部施用以外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。可以在本发明药物组合物中使用的适宜的水性和非水性运载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油如橄榄油和可注射的有机酯如油酸乙酯。例如,可以通过使用诸如卵磷脂的包衣材料,通过在分散的情况下维持所需的粒径和通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0276] 用于制备肠胃外施用组合物的方法对于本领域技术人员而言是公知的或显而易见的并且已详细描述。Bai,J.Neuroimmunol.80:65-75,1997。Warren,J.Neurol.Sci.152:31-38,1997。Tonegawa,J.Exp.Med.186:507-515,1997。例如,用于肠胃外施用的制剂可以含有赋形剂、无菌水、盐水、聚亚烷基二醇如聚乙二醇、植物来源的油或氢化萘。可以将生物相容性、可生物降解的丙交酯聚合物、丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物用于控制本发明药剂的释放。可以将纳米颗粒制剂(例如,可生物降解的纳米颗粒、固体脂质纳米颗粒、脂质体)用于控制本发明药剂的生物分布。其他可能有用

的递送系统包括乙烯-醋酸乙烯酯共聚物颗粒、渗透泵、鞘内泵、可植入输注系统和脂质体。制剂中药剂浓度的改变取决于多个因素,包括待施用的药物剂量和施用途径。

[0277] 无菌可注射溶液可以通过将本发明药剂以需要的量与上面列举的一种成分或成分的组合(如果需要)一起掺入适宜溶剂中,然后进行无菌微滤来制备。在通常情况下,通过将本发明药剂掺入含有基础分散介质和来自上面列举的那些所需的其他成分的无菌载剂中来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法包括真空干燥和冷冻干燥(冻干),从其先前无菌过滤的溶液中产生活性成分加任何其他所需成分的粉末。对剂量方案进行调整以提供最佳所需应答(例如,治疗应答)。例如,可以施用单次推注,可以随着时间的推移施用几个分开的剂量,或者如治疗情况的紧急情况所指示的,可以按比例减少或增加剂量。例如,可以通过皮下注射每周施用一次或两次或者通过皮下注射每月施用一次或两次本发明的抗体。肠胃外组合物可以以剂量单位形式配制以便于施用和保持剂量的均匀性。如在本申请中所使用的剂量单位形式指适合作为待治疗对象的单位剂量的物理离散单位;每个单位含有经计算以产生所需治疗作用的预定量的活性剂,以及所需的药物运载体。本发明剂量单位形式的规格决定于和直接取决于(a)活性剂的独特特征和所需达到的特定治疗作用,以及(b)用于治疗 of 此类活性剂在个体中的敏感性在制剂领域中固有的限制。

[0278] 当口服施用时,可以对本发明组合物进行保护使其免于被消化。这可以通过将抗体或其抗原结合部分与使其抵抗酸和酶水解的组合物复合或通过将抗体或其抗原结合部分包装在适宜的抗性运载体(如脂质体)中实现。保护药剂使其免于被消化的方法是本领域熟知的。Fix, Pharm Res. 13:1760-1764, 1996. Samanen, J. Pharm. Pharmacol. 48:119-135, 1996. 美国专利号5,391,377.

[0279] 对于经粘膜或透皮施用,可以在制剂中使用适于待渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域公知的,并且包括例如对于经粘膜施用而言,使用胆盐和夫西地酸衍生物。此外,可以将去垢剂用于促进渗透。可以通过鼻喷雾剂或使用栓剂进行经粘膜施用。Sayani, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 13:85-184, 1996. 对于局部、透皮施用,将药剂制成软膏、乳膏、涂油膏,粉剂和凝胶。透皮递送系统还可以包括例如贴片。

[0280] 还可以以持续递送或持续释放机制施用本发明组合物。例如,可以将能够持续递送肽的可生物降解微球或胶囊或其他可生物降解聚合物构造包括在本发明制剂中(参见例如, Putney, Nat. Biotechnol. 16:153-157, 1998)。

[0281] 对于吸入剂,可以使用本领域公知的任意系统递送本发明组合物,包括干粉气雾剂、液体递送系统、喷气式喷雾器、抛射剂系统等。Patton, Biotechniques 16:141-143, 1998. 还可以在本公开内容中使用用于多肽大分子的产品和吸入递送系统,例如Dura Pharmaceuticals (San Diego, Calif.)、Aradigrn (Hayward, Calif.)、Aerogen (Santa Clara, Calif.)、吸入治疗系统 (San Carlos, Calif. 等,例如,可以以气溶胶或薄雾形式施用药物制剂。对于气溶胶的施用,可以将制剂以精确分离的形式与表面活性剂和抛射剂一起提供。在另一个方面中,向呼吸组织递送制剂的装置是制剂在其中蒸发的吸入器。其他液体递送系统包括例如喷气式喷雾器。

[0282] 可以以单剂量治疗或按照时间表和在适于对象的年龄、体重和病况,所使用的特定组合物和施用途径的一段时间内多剂量治疗施用组合物。施用频率可以根据多种因素中

的任意一种而改变,例如症状的严重程度、所需的免疫保护的程度、组合物是否用于预防或治疗目的等。例如,在一个实施方式中,将根据本发明的组合物每月一次、每月两次、每月三次、隔周一次(qow)、每周一次(qw)、每周两次(biw)、每周三次(tiw)、每周四次、每周五次、每周六次、隔日一次(qod)、每日(qd)、每日两次(qid)或每日三次(tid)施用。

[0283] 根据本发明多肽的施用持续时间(例如,施用组合物的时间段)可以根据多种因素中的任意一种而改变,例如,受试者应答等。例如,可以在范围从约一天至约一周、从约两周至约四周、从约一个月至约两个月、从约两个月至约四个月、从约四个月至约六个月、从约六个月至约八个月、从约八个月至约一年、从约一年至约两年或者从约两年至约四年或更长的一段时间内施用组合物。

[0284] 以剂量单位形式配制口服或胃肠外组合物以便于给药和保持剂量均匀是有利的。在本申请中使用的剂量单位形式指适合作为待治疗对象的单位剂量的物理离散单位;每个单位含有经计算以产生所需治疗作用的预定量的活性剂,以及所需的药物运载体。

[0285] 本公开内容的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以变化,以获得有效实现针对特定患者、组合物和给药模式的所需治疗应答且对患者无毒性的活性成分的量。所选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括本公开内容所使用的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性,施用途径,施用时间,所使用的特定药剂的排泄速率,治疗持续时间,与所使用的特定组合物联用的其他药物、药剂和/或材料,所治疗患者的年龄、性别、体重、病况、一般健康状况和既往病史以及医疗领域公知的类似因素。具有本领域普通技能的医师或兽医能够容易地确定和开具所需药物组合物的有效量。例如,医师或兽医可以以低于达到所需治疗作用所需的剂量开始给予在本发明药物组合物中使用的药剂并且逐渐增加剂量直至达到所需效果。在通常情况下,本发明组合物适宜的日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的药剂剂量。这种有效剂量将通常取决于上文所述的因素。如果需要,治疗组合物的有效日剂量可以在一天中任选以单位剂量形式以适当的间隔分开施用2、3、4、5、6个或更多个亚剂量。

[0286] 可以将从细胞培养测定和动物研究中获得的数据用于调配在人体内使用的剂量范围。在一个实施方式中,此类药剂的剂量在包含 ED_{50} 且几乎没有或没有毒性的循环浓度范围内。剂量可以在该范围内改变,其取决于所使用的剂型和所使用的施用途径。在另一个实施方式中,可以从细胞培养测定中初步估计治疗有效剂量。可以在动物模型中调配剂量,以达到包括在细胞培养中确定的 IC_{50} (即,达到症状半数最大抑制的待测药剂的浓度)的循环血浆浓度范围。Sonderstrup, Springer, Sem. Immunopathol. 25:35-45, 2003. Nikula等, Inhal. Toxicol. 4(12):123-53, 2000。

[0287] 本发明抗体或其抗原结合部分的治疗或预防有效量的示例性、非限制性范围是从约0.001至约100mg/kg体重或更高剂量、约0.1至约100mg/kg体重、约0.01至约80mg/kg体重、约0.001至约60mg/kg体重、约0.01至约30mg/kg体重、约0.01至约25mg/kg体重、约0.5至约25mg/kg体重、约0.1至约15mg/kg体重、约0.1至约20mg/kg体重、约10至约20mg/kg体重、约0.75至约10mg/kg体重、约1至约10mg/kg体重、约2至约9mg/kg体重、约1至约2mg/kg体重、about 3至约8mg/kg体重、约4至约7mg/kg体重、约5至约6mg/kg体重、约8至约13mg/kg体重、约8.3至约12.5mg/kg体重、约4至约6mg/kg体重、约4.2至约6.3mg/kg体重、约1.6至约2.5mg/kg体重、约2至约3mg/kg体重或者约10mg/kg体重。向对象施用的剂量还可以是约

0.1mg/kg至约50mg/kg、约1mg/kg至约30mg/kg、约1mg/kg至约20mg/kg、约1mg/kg至约15mg/kg,或者约1mg/kg至约10mg/kg对象体重。示例性的剂量包括但不限于从1ng/kg至100mg/kg。在一些实施方式中,剂量是约0.5mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg、约11mg/kg、约12mg/kg、约13mg/kg、约14mg/kg、约15mg/kg或者约16mg/kg对象体重。WO 94/04188。

[0288] 对组合物进行调配以含有有效量的本发明抗体或其抗原结合部分,其中该量取决于所治疗的动物和所治疗的病况。在一个实施方式中,以从约0.01mg至约10g、从约0.1mg至约9g、从约1mg至约8g、从约1mg至约7g、从约5mg至约6g、从约10mg至约5g、从约20mg至约1g、从约50mg至约800mg、从约100mg至约500mg、从约0.01mg至约10g、从约0.05μg至约1.5mg、从约10μg至约1mg protein、从约30μg至约500μg、从约40pg至约300pg、从约0.1μg至约200mg、从约0.1μg至约5μg、从约5μg至约10μg、从约10μg至约25μg、从约25μg至约50μg、从约50μg至约100μg、从约100μg至约500μg、从约500μg至约1mg、从约1mg至约2mg的剂量范围施用本发明抗体或其抗原结合部分。针对任意特定对象的特异性剂量水平取决于多种因素,包括特定肽的活性、年龄、体重、健康状况、性别、饮食、施用时间、施用途径、排泄速率、药物联用以及所治疗的特定疾病的严重程度。

[0289] 制品

[0290] 在另一个方面中,包括了含有用于治疗本申请所述的病况或病症的材料的制备。制品包括容器和标签。适宜的容器包括例如瓶、药瓶、注射器和试管。容器可以由多种材料制成,如玻璃或塑料。容器容纳有效治疗病况的组合物并且可以具有无菌入口。例如,容器可以是静脉溶液袋或者具有可以被皮下注射针刺穿的塞子的药瓶。组合物中的活性剂可以是人源化抗-CD40抗体或其片段,或者本申请所述的任意其他抗体或其片段。在容器上或与容器相关的标签表明该组合物是用于治疗所选择的病况的。制品还可以包括另一容器,所述容器含有药学上可接受的缓冲剂,如磷酸缓冲盐、林格氏溶液和右旋糖溶液。其还可以包括从商业和用户角度所需的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、滤器、针头、注射器以及带有使用说明书的包装插页。

[0291] 在一个实施方式中,本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒包含抗-CD40抗体或其抗原结合部分。试剂盒的其他组分可以包括下述中的一个或多个:使用说明;其他试剂;治疗剂,或用于将抗体与标签或其他治疗剂偶联的药剂,或用于制备供施用的抗体的其他材料;药学上可接受的运载体;以及用于向对象施用的装置或其他材料。

[0292] 试剂盒可以含有或可以不含如本申请所述的第二治疗剂。在试剂盒中的药剂可以混合在一起或单独包装。

[0293] 试剂盒可以含有或可以不含至少一个编码抗-CD40抗体或其片段的核酸,以及用于表达核酸的说明书。试剂盒其他可能的组分包括表达载体和细胞。

[0294] 可以将本发明抗体或其片段用于诊断试剂盒中,即预定量的试剂与用于进行诊断测定的说明书的打包组合。当使用酶标记抗体时,试剂盒可以包括酶所需的底物和辅因子,如提供可检测发色团或荧光团的底物前体。此外,可以包括其他添加剂,如稳定剂、缓冲剂(例如,封闭缓冲剂或裂解缓冲剂)等。可以广泛改变各种试剂的相对量以提供实质上优化测定灵敏度的试剂在溶液中的浓度。试剂可以以干粉形式提供,通常是冻干的,包含在溶解时将提供具有适当浓度的试剂溶液的赋形剂。

[0295] 表位作图

[0296] 用于鉴定抗体结合的特定表位的方法是本领域技术人员公知的。标准技术包括肽扫描,其中单独检测来自全长蛋白的与抗体结合的重叠的、短肽(例如,长度为10-30个氨基酸,例如20个)与抗体结合的能力。然后,可以从此类实验中确定与抗体结合的蛋白区域。

[0297] 还可以使用位点定向诱变鉴定特定蛋白的抗原性区域。在这种方法中,将点突变系统地引入靶多肽中,并使用抗体与在不同位点具有突变的肽结合的能力以确定是否蛋白的特定区域含有与抗体结合的表位。

[0298] 还可以使用高通量诱变技术(如Shotgun Mutagenesis(Integral Molecular, Inc., Philadelphia, Pa.))鉴定抗体的表位,可以将其用于在靶蛋白内产生大量突变。这种方法能够有效鉴定蛋白内的表位。

[0299] 为了确定与CD40结合的不同抗体是否具有相似的表位,可以进行体外竞争性阻断测定。在一个实施方式中,在测定中使用抗体2C10、3A8和Chi220(嵌合IgG1 CD40特异性抗体)。使用Lightning Link抗体标记试剂盒(Novus Biologics, Littleton, CO)将2C10与别藻蓝蛋白(APC)偶联。将人PBMC与渐增浓度的2C10、3A8和Chi220孵育,然后使用与APC缀合的2C10染色,以评估每个抗体交联-阻断2C10的能力。如图12所示,随着2C10而非Chi220和3A8浓度的增加与APC缀合的2C10的结合减少。结果表明2C10结合与Chi220或3A8不同的独特表位。

[0300] CD40片段

[0301] 本发明还涉及CD40的片段,所述片段包含与2C10抗体特异性结合的表位。2C10抗体针对CD40多肽的胞外部分产生。2C10抗体与该序列(SEQ ID NO:5和6)的一部分反应。

[0302] 因此本公开涉及与2C10抗体特异性结合的CD40片段(例如,长度上少于150、120、100、80、70、60、50、40、30、20、18、15、12、11、10、9、8或7个氨基酸)。在某些实施方式中,片段的长度为8-10、8-12、8-15、8-20、8-30、8-40、8-50、8-60、8-70、8-80或8-100个氨基酸。在其他实施方式中,片段的长度为7-10、7-12、7-15、7-20、7-30、7-40、7-50、7-60、7-70、7-80或7-100个。

[0303] 2C10抗体与SEQ ID NO:6中8-10、8-12、8-15、8-20、8-30、8-40、8-50、8-60、8-70、8-80、8-100、7-10、7-12、7-15、7-20、7-30、7-40、7-50、7-60、7-70、7-80或7-100个氨基酸的序列中存在的表位结合。

[0304] 本发明还涉及包含本申请所述的片段和异源序列的融合蛋白。在某些实施方式中,融合伴侣的一个是Fc蛋白(例如,小鼠Fc或人Fc)。融合也可以是用于抗体生产的序列,如麦芽糖结合蛋白或GST。在其他实施方式中,融合蛋白是纯化或检测标签,例如可以被直接或间接检测的蛋白,如绿色荧光蛋白、血凝素或碱性磷酸酶、DNA结合结构域(例如,GAL4或LexA)、基因活化结构域(例如,GAL4或VP16)、纯化标签或分泌信号肽(例如,前原胰蛋白酶信号序列)。在其他实施方式中,融合伴侣可以是标签,如c-myc、多聚组氨酸或FLAG。每个融合伴侣可以含有一个或多个结构域,例如前原胰蛋白酶信号序列和FLAG标签。

[0305] 本申请所述的CD40片段和融合蛋白可以通过在适宜的表达载体中用编码多肽片段或融合蛋白的多核苷酸分子转化适宜的宿主细胞来生产。

[0306] 可以使用各种表达系统中的任何一种。示例性的表达系统包括原核宿主(例如,大肠杆菌)和真核宿主(例如,酿酒酵母、昆虫细胞(例如,sf21细胞)或哺乳动物细胞(例如,

NIH 3T3、HeLa或优选地COS细胞))。此类细胞可以从各种来源获得(例如,美国典型培养物保藏中心,Manassas,VA)。转化或转染的方法以及表达载体的选择将取决于所选择的宿主细胞。在下述中对转化和转染方法进行了描述:例如Kucherlapati等(CRC Crit.Rev.Biochem.16:349-379,1982)和DNA Transfer to Cultured Cells(eds.,Ravid and Freshney,Wiley-Liss,1998);以及可以从例如Vectors:Expression Systems:Essential Techniques(ed.,Jones,Wiley&Sons Ltd.,1998)中提供的那些选择表达载体。

[0307] 一旦表达了重组CD40多肽片段或融合蛋白,可以例如使用亲和层析对其进行分离。在一个实例中,可以将对CD40具有特异性的抗体(例如,如本申请所述的抗体或其片段)连接到柱上并用于分离多肽片段或融合蛋白。在进行亲和层析之前,可以通过标准方法(参见例如,Methods in Enzymology,volume 182,eds.,Abelson,Simon和Deutscher,Elsevier,1990)进行含片段或融合蛋白的细胞的裂解和分级。一旦分离,如有需要,可以对CD40多肽片段或融合蛋白进行进一步纯化,例如通过高效液相色谱(参见例如,Fisher,Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,eds.,Work和Burdon,Elsevier,1980;以及Scopes,Protein Purification:Principles and Practice,Third Edition,ed.,Cantor,Springer,1994)。

[0308] 还可以通过化学合成生产CD40多肽片段或融合蛋白(例如,通过下述所述的方法 Solid Phase Peptide Synthesis,2nd ed.,1984,The Pierce Chemical Co.,Rockford,IL;以及Solid-Phase Synthesis:A Practical Guide,ed.,Kates and Albericio,Marcel Dekker Inc.,2000)。

[0309] 可以将本发明抗体、其抗原结合部分、组合物和方法用于所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,包括人、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、犬、猫、奶牛、马、山羊、绵羊、猪、猴、猿、大猩猩、黑猩猩、家兔、鸭、鹅、鸡、两栖类、爬行类和其他动物。

[0310] 提供用于实施本公开内容的具体方面的下述实施例仅用于说明性目的,并且其并非旨在以任何方式限制本公开内容的范围。

[0311] 实施例1:抗-CD40鼠源抗体的生产和鉴定

[0312] 用与麦芽糖结合蛋白融合的恒河猴(M.mulatta)CD40胞外域(氨基酸序列:

[0313] EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETETCLPCSESEFLDTWNRETRCHQHKYCDPNLG LRVQQKGTSETDTICTCEEGLHCMSESCESC V;SEQ ID NO:5)组成的融合蛋白(CD40-MBP)免疫小鼠(品系AJ)。恒河猴CD40蛋白在该区域中的氨基酸序列在五个氨基酸位置与人CD40蛋白不同(人氨基酸序列:

[0314] EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETETCLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLG LRVQQKGTSETD TICTCEEGLHCTSEACESCV;SEQ ID NO:6)。将CD40-MBP与完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂一起向小鼠多次施用。将来自免疫小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系SP2/0融合并使用标准杂交瘤技术进行杂交选择。

[0315] 针对与第二融合蛋白的反应性对抗体进行选择,第二融合蛋白由与谷氨酰胺合成酶融合的同恒河猴CD40结构域组成(CD40-GST)。对通过ELISA确定与CD40-GST具有反应性的抗体,通过流式细胞术进一步检测其与恒河猴血液B细胞、人血液B细胞和恒河猴B类淋巴母细胞系上表达的天然CD40的反应性。作为最终的选择水平,在一项体外测定中检测了与表达CD154的Jurkat D1.1细胞共培养后抗体抑制人或恒河猴B细胞活化的能力。通过有

限稀释获得抗-CD40抗体2C10的稳定亚克隆。该抗体是小鼠IgG1- κ 。

[0316] Lowe等, A novel monoclonal antibody to CD40 prolongs islet allograft survival, *Am. J. Transplant* (2012) 12 (8):2079-87。

[0317] 抗体克隆

[0318] 可以使用本领域公知的任何方法克隆单克隆抗体的可变区。在下述中描述了针对杂交瘤细胞的用于获得抗体可变区序列的基于PCR的方法, 例如Larrick等, *Nat. Biotechnol.* 7:934-8, 1989和Orlandi等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-7, 1989。使用这些技术或类似技术, 可以克隆单克隆抗体的可变区并对其进行进一步操作。在目前的情况下, 将来自2C10抗体重链和轻链的可变序列克隆并测序。通过使用下述DNA引物的5' RACE PCR将来自2C10杂交瘤的免疫球蛋白重链和轻链可变区的DNA克隆:

[0319] 小鼠 κ 反向: 5'-CTA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GCT CTTGAC (SEQ ID NO:7);

[0320] 小鼠 κ 正向: 5'-GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC-3' (SEQ ID NO:8)

[0321] 小鼠IgG1反向: 5'-GGC AAC GTT GCA GGT CTC GC-3' (SEQ ID NO:9)

[0322] 小鼠IgG1正向: 5'-CTG GAT CTG CTG CCC AAA CTA ACT CC-3' (SEQ ID NO:10)

[0323] 将PCR产物克隆进入市售克隆载体并使用标准测序技术测序。在图1中提供了得到的序列。

[0324] 使用5'快速扩增cDNA末端聚合酶链反应从杂交瘤分泌的抗-CD40抗体克隆2C10和从抗-人CD40克隆3A8 (Kwekkeboom等, *Immunology* 79:439-44, 1993) (来自美国典型培养物保藏中心, ATCC, Vienna, VA) 中克隆免疫球蛋白可变区基因。将免疫球蛋白重链和轻链可变区亚克隆进入含有恒河猴IgG1或恒河猴IgG4重链以及恒河猴 κ 轻链恒定区序列的表达载体中。

[0325] 将重组重链和轻链亚克隆进入表达载体并使用GPEXTM表达技术 (Catalent Pharma Solutions, Middleton, WI) 将其包装在用于转导中国仓鼠卵巢细胞的逆转录病毒载体中。在无血清培养基中培养转导细胞的混合物并使用蛋白A亲和层析对所分泌的抗体进行纯化。将经纯化的嵌合恒河猴IgG1 (2C10R1, 3A8R1) 和IgG4 (2C10R4) 抗体渗滤到磷酸盐缓冲液中; 确定内毒素水平低于1内毒素单位/。

[0326] 抗体表征

[0327] 2C10结合至CD40并阻止CD154的结合

[0328] 为评估2C10与恒河猴和人CD40结合的能力, 将重组表达的人或恒河猴CD40吸附在ELISA板上并与不同浓度的2C10反应。在ELISA中, 使用山羊抗-小鼠IgG-HRP检测2C10与CD40的结合情况。图2B中的结果表明2C10与恒河猴和人CD40具有相似的结合亲和性, 这对于2C10的临床转化是重要的。为了证实2C10阻断其同源配体CD154结合的能力, 将恒河猴和人B细胞与渐增浓度的2C10或同种型对照一同孵育, 然后使用组氨酸标记的可溶性CD154 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 孵育并分析组氨酸表达情况。2C10以剂量依赖的方式阻断CD154的结合 (图3), 表明2C10能够有效阻断T细胞-结合CD154与B细胞和抗原提呈细胞上的CD40的相互作用。

[0329] 表2: 2C10的CD40受体结合动力学

	抗-CD40 抗体	2C10	3A8	5D12	4D11	Chi220
[0330]	$K_{on}(M^{-1} s^{-1})$	2.73×10^3	0.223×10^3	1.51×10^3	1.25×10^3	0.413×10^3
	$K_{off}(s^{-1})$	1.86×10^{-6}	4.15×10^{-6}	1.54×10^{-5}	1.58×10^{-6}	2.5×10^{-5}
	$K_D(M)$	2.73×10^{-10}	1.86×10^{-8}	1.02×10^{-8}	2.28×10^{-9}	6.07×10^{-8}

[0331] 在恒河猴和人外周血单核细胞中2C10阻断B细胞活化

[0332] 抗-CD40抗体2C10的特征为使用恒河猴和人外周血单核细胞(PBMC)两者其均能够影响B细胞活化。选择CD20表达作为B细胞的指示剂,并且CD23、CD80和CD86的表达与B细胞活化相关。首先评估2C10与CD20结合的能力。使用与荧光染料缀合的2C10和抗-CD20抗体与恒河猴或人PBMC共同孵育。将流式细胞分析用于证实2C10与人和恒河猴CD20+B细胞的结合(图2A)。在另一组实验中,在存在或不存在CD154⁺Jurkat D1.1细胞(一种永生化的T淋巴细胞系)的条件下,培养来自恒河猴或人的PBMC。通过测量在PBMC中存在的CD20+细胞中三种标记物(CD23、CD80和CD86)的表达情况确定B细胞的活化情况。该测定的总体方案如图4中所示。如图4中所示,在Jurkat细胞存在的条件下培养PBMC导致全部三种标记物的表达增加,表明B细胞被CD154⁺Jurkat细胞活化。

[0333] 为了检测抗体阻断B细胞活化的能力,在存在或不存在三种抗体(3A8、5C8和2C10)之一的条件下,将PBMC与Jurkat细胞共培养。3A8抗体是小鼠抗人CD40抗体(ATCC保藏号HB-12024),以及5C8是抗-CD154抗体(ATCC保藏号CRL-10915)。其均作为阳性对照。在5个数量级的抗体浓度(0.001μg至10μg)范围内进行共培养。如图5中所示,通过测量CD23的表达,3A8在恒河猴PBMC中不阻断B细胞活化,而2C10和5C8两者能够以相似的效能阻断活化。使用CD80和CD86的表达也观察到了相应变化。这些结果表明2C10而非3A8结合CD40上的不同表位。这些结果还表明2C10主要作为CD40拮抗剂起作用,而相反的是3A8此前已显示出其作用是具有较弱刺激电位的部分激动剂(Adams等,J. Immunol. 174:542-50, 2005, Badell等, Am. J. Transplant. 接收发表2011)。当使用人PBMC而非恒河猴进行类似实验时,通过测量CD86的表达,再次观察到2C10和5C8两者以相似效能阻断B细胞活化。这里,3A8抗体不可能与恒河猴PBMC阻断B细胞活化(图6)。

[0334] 还使用恒河猴或人PBMC在不存在Jurkat细胞的条件下检测了2C10和3A8抗体活化B细胞的能力。这里,在存在或不存在2C10或3A8的条件下培养PBMC。任何测量在CD20⁺细胞中CD23、CD80和CD86的表达。如图7中所示,在存在3A8而非2C10抗体的条件下,在恒河猴细胞中CD23的表达增加。而相反的是,3A8和2C10均不活化人B细胞。在3A8和2C10抗体之间观察到的活性差异表明2C10抗体与3A8抗体结合不同的表位。

[0335] 2C10阻止T-细胞依赖性抗体应答

[0336] 已确定2C10结合至CD40上的独特表位,抑制B细胞活化,这与抗-CD154抗体类似,并且其缺乏激动性质,然后我们表征了2C10在体内的作用。使用恒河猴IgG1(2C10R1)或IgG4(2C10R4)重链和恒河猴κ轻链恒定区序列产生2C10的重组小鼠-恒河猴嵌合形式。还产生了3A8(3A8R1)的嵌合恒河猴IgG1形式作为对照。

[0337] 在第0天使用4-羟基-3-硝基苯基乙酰基-缀合的钥孔戚血蓝蛋白(KLH, 10mg IM)抗原(Biosearch Technologies, Novato, CA)对恒河猴进行免疫。在免疫之前和在第1周时,向三个动物队列静脉内给予(50mg/kg)2C10R1、2C10R4、3A8R1或盐水。对所有动物均观察70天,并且每周进行一次流式细胞术。与此前报道的在接受3A8R1(Badell等,

Am.J.Transplant.10:214,2010)或Chi220(Adams等,J.Immunol.174:542-50,2005)的动物中发生的外周B细胞显着和长期耗竭相比,用重组2C10同种型处理导致外周B细胞计数的适度变化(图8)。

[0338] 通过ELISA检测对KLH-NP的T细胞依赖性抗原应答。使用KLH(0.01mg/ml,Sigma, St.Louis,MO)包被培养板并使用Super Block封闭(Thermo Scientific,Woodstock,GA)。对治疗前后的血浆样品进行系列稀释,加入板中1hr并使用磷酸缓冲盐/0.05%吐温洗涤。通过与单克隆的抗-恒河猴IgG-辣根过氧化物酶(克隆1B3,NHP Reagent Resource, Boston,MA)孵育1hr检测抗-KLH抗体。然后使用过氧化物酶底物溶液(KPL)孵育培养板。之后加入终止溶液(KPL),并在ELISA酶标仪上在450nm处读取光密度。如果给药后血浆的光密度读数在相同稀释度下超过给药前血浆光密度的2倍,则将在给定稀释度下的样品被认为是阳性的。使用KLH免疫后,对照动物出现了高滴度KLH-特异性IgG(图9)。给予3A8R1的动物也出现了抗-KLH应答,但是尽管显著耗竭了B细胞其滴度是对照的约十分之一。而相反的是,在接受2C10R1或2C10R4的所有动物中直到第56天,IgG抗KLH抗体的产生几乎完全被阻断。

[0339] 在同种异体胰岛移植猕猴模型中2C10显著延长胰岛同种异体移植物的存活

[0340] 我们在非人灵长类同种异体胰岛移植模型中对2C10R4(CD4纯化的嵌合恒河猴IgG4抗体)进行了进一步检测(图10)。通过中线剖腹术在移植前1天对体重为10-20kg的恒河猴进行供体胰腺切除术。将动物最终放血后,分离胰腺并放置在冰上。使用胶原酶/中性蛋白酶(分别为950Wunsch单位和63单位;Serva,Heidelberg,Germany)进行胰岛分离。在四层、不连续Euroficoll梯度(Mediatech,Manassas,VA)和Cobe 2991血细胞处理器(CaridianBCT,Lakewood,CO)上对经消化的胰腺进行纯化。对最终胰岛制备物样品计数并以胰岛当量(TEQ)表示。对分离的胰岛培养过夜、计数以及混悬在移植培养基(Mediatech)中。

[0341] 在移植前4周,使用链脲菌素($1250\text{mg}/\text{m}^2$ IV;Zanosar,Teva Parenteral Medicines,Irvine,CA)使体重为3-5kg的恒河猴患有糖尿病。通过推注500mg/kg右旋糖进行静脉内葡萄糖耐量测试(IVGTT)和检测灵长类C-肽证实糖尿病。在基线时以及注射右旋糖后10、30、60和90监测葡萄糖水平和检测C-肽。在不存在可检测的血清C肽的情况下通过测量血糖升高来确认糖尿病。对糖尿病受体进行MHC不匹配胰岛同种异体移植。通过小型中线剖腹手术和肠系膜静脉插管输注平均 $15,745(\pm 4,063)$ IEQ。

[0342] 在移植前和移植物排斥后,每日两次从耳部测量血糖水平;给予NPH(Novolin; Novo Nordisk,Princeton,NJ)和甘精(Lantus;Sanofi-Aventis,Bridgewater,NJ)胰岛素以便将空腹血糖(FBG)维持在小于300mg/dL。移植后定期进行IVGTT以监测移植物功能。每周对移植受体进行流式细胞术分析以监测T细胞(CD3 V450、CD4 PerCP-Cy5.5、CD8 PerCp; BD Bioscience)和B细胞(CD20 PE,BD Bioscience)群。将胰岛移植排斥反应定义为连续两天FBG大于130mg/dL。主要终点为无排斥胰岛移植物存活。

[0343] 移植受体接受2C10R4、巴利昔单抗(Simulect,Novartis,Basel,Switzerland)和西罗莫司之一,或单独的巴利昔单抗和西罗莫司。在手术后日(POD)0和7静脉内给予2C10R4(50mg/kg)。在POD 0和3静脉内给予巴利昔单抗(0.3mg/kg)。每天肌肉注射西罗莫司以便到POD 120时达到5-15ng/ml的谷浓度水平。仅接受巴利昔单抗和西罗莫司的所有三只动物为

历史对照 (Badell等, J.Clin. Invest. 120:4520-312, 2010)。这些历史对照中的两只 (RQz6和RIb7)通过胰腺切除术诱导糖尿病并接受口服西罗莫司。

[0344] 与仅接受巴利昔单抗诱导和西罗莫司维持疗法的对照相比 (图11B),使用上文所述的方法进行治疗导致显著延长胰岛移植物存活 (图11A)。接受2C10R4动物的中位无排斥移植物存活时间为280天,而相比之下对照动物为8天 ($p=0.010$,表3)。药代动力学数据预测,POD100时血浆2C10R4水平将低于1 $\mu\text{g/ml}$ 。由于在POD120时西罗莫司停药,因而具有最长存活的受体 (304天) 在出现排斥前未使用免疫抑制剂的时间为约24周。使用2C10R4治疗的动物均未出现临床相关的感染并发症或体重减轻。这些结果是接受2C10 IgG4同种型的动物表现出来的。接受2C10 IgG1同种型 (2C10R1) 以及联合巴利昔单抗和西罗莫司的另外两只动物到达了相似的延长移植物存活220天和162天。鉴于使用2C10作为诱导疗法得到了阳性结果,下一步将评估施用2C10作为维持疗法对移植物存活的影响。

[0345] 表3

[0346]	受体	疗法	IEQ/kg	移植物存活 (天数)	意见
	DP4A	2C10R4/巴利昔单抗/西罗莫司	21,973	296	排斥
	RAo13	2C10R4/巴利昔单抗/西罗莫司	14,388	304	排斥
	Rzq13	2C10R4/巴利昔单抗/西罗莫司	15,881	265	排斥
	RRq13	2C10R4/巴利昔单抗/西罗莫司	20,596	163	排斥
	RQz6	巴利昔单抗/西罗莫司	12,980	8	排斥
	Rib7	巴利昔单抗/西罗莫司	10,903	8	排斥
	RMc11	巴利昔单抗/西罗莫司	13,796	10	排斥

[0347] CD40/CD154通路结合CD28/B7通路的阻断

[0348] 可以证明与其他共刺激阻断剂结合对CD40/CD154通路的阻断是有用的。用于阻断CD28/B7共刺激通路的CTLA4-Ig高亲和性版本贝拉西普已经在肾和胰岛移植的非人灵长类模型中以及在肾移植的II期和III期临床试验中显示出效能 (Larsen等, Transplantation 90:1528-35, 2010, Vincenti等, Am. J. Transplant. 10:535-46, 2010, Adams等, J. Immunol. 174:542-50, 2005, Adams等, Diabetes 51:265-70, 2002, Larsen等, Am. J. Transplant. 5:443-53, 2005, Vincenti等, N. Engl. J. Med. 358:770-81, 2005)。BENEFIT试验显示用贝拉西普治疗的患者具有优越的肾功能;然而,这些患者的活检证实急性排斥反应的发生率和严重程度更高 (Larsen等, Transplantation 90:1528-35, 2010, Vincenti等, Am. J. Transplant. 10:535-46, 2010)。鉴于急性排斥率的这种增加以及CD40与B7阻断之间的协同 (Larsen等, Nature 381:434-8, 1996),我们接下来将在非人灵长类肾移植模型中检测2C10和贝拉西普联用疗法的效能。

[0349] 实施例2:人源化抗-CD40抗体

[0350] 我们开发并表征了一种新型人源化抗CD40抗体,称为h2C10 (人源化2C10抗体),将抗体选择作为CD40的全功能拮抗剂。对结合表位进行精心设计使其具有独特的结合性质,这将其与活化或耗竭B细胞或充当部分激动剂的竞争分子区分开来。在相关的临床前体外和体内研究中已经研究了早期小鼠灵长类嵌合形式的抗体,包括在非人类灵长类中进行的多项研究,其显示出对预防移植排斥和延长同种异体和异体移植物存活方面增加的效能以

及良好的非临床安全性性质。我们还完成了2C10的人源化(h2C10)，其显示出优异的性能。

[0351] 为了生产人源化抗-CD40抗体，将鼠抗体2C10的可变区序列用于检索人抗体数据库。发现VH与种系抗体序列VH1-46、VH1-69和VH1-3(SEQ ID NO:30)最相关，而VL与种系抗体序列VK3-11(SEQ ID NO:31)、VK1-39和VK6-21最相关。选择人VH1-3和VK3-11作为CDR移植的受体框架，因为其在人类库中使用相对较高，并且在关键构架位置具有良好保守性。在将鼠2C10抗体的CDR移植进入人受体框架后，使用这两个可变区构建3D模型。鉴定出可能与CDR接触的与人对应物不同的六个鼠VH框架残基：M48、A67、L69、A71、K73和N76。建模后，将三个人源化VH序列2C10_h1, 2C10_h2, and 2C10_h3设计为分别含有0、2和6个鼠框架残基(图13A)。类似地，鉴定出可能与CDR接触的五个人源VK框架残基：Q1、R46、W47、V58和Y71。建模后，将两个人源化VL序列2C10_11和2C10_12设计为分别含有0和4个鼠框架残基(图13B)。

[0352] 通过CDR移植将亲代鼠2C10抗体人源化。选择人抗体VH1-3和VK3-11种系框架作为受体。设计了三个VH和两个VL序列并生产了全部六个人源化抗体，以及检测了其与人CD40的结合。

[0353] 发现2C10-重链-3(2C10_h3)和2C10-轻链2(2C10_12)构建体产生最佳抗体，其CD40结合亲和性为0.39nM，是鼠2C10的两倍(0.22nM)(表2)。使用人源化可变区构建临床候选人源化抗体IgG4或稳定化IgG4，将其克隆进入SwiMR表达系统。

[0354] 通过FACS分离高产稳定CHO细胞系，通过ELISA进行三轮筛选和进行一轮补料分批培养。分离了7个在补料分批培养中产生大于0.8g/L人源化2C10的克隆。最佳克隆3C9-I6在未经优化条件下产生~1.2g/L。

[0355] 抗体表达载体的构建

[0356] 基因合成人源化VH序列并将其克隆进入含有人IgG2重链恒定区的载体pFUSE-CHIg-hG2a(Invivogen)以制备表达载体LB300-302。基因合成人源化VK序列并将其克隆进入含有人κ轻链恒定区的表达载体以制备表达载体LB303-304。重链和轻链位于人EF1α启动子的下游，该启动子用于强烈的和组成型哺乳动物细胞表达。通过分别使用鼠VH和VL制备表达载体LB305和LB306也类似地构建了嵌合2C10抗体。抗体表达载体总结在表4中。

[0357] 表4: 抗体表达载体

[0358]

质粒	VH/VK	CH/CK	启动子	选择
----	-------	-------	-----	----

[0359]

LB300	2C10_h1	hIgG2 CH	hEF1 α	博来霉素
LB301	2C10_h2	hIgG2 CH	hEF1 α	博来霉素
LB302	2C10_h3	hIgG2 CH	hEF1 α	博来霉素
LB303	2C10_l1	hCK	hEF1 α	新霉素
LB304	2C10_l2	hCK	hEF1 α	新霉素
LB305	2C10_VH	hIgG2 CH	hEF1 α	博来霉素
LB306	2C10_VK	hCK	hEF1 α	新霉素
LB308	2C10_h3	hIgG4 CH	hEF1 α	博来霉素
LB309	2C10_h3	hIgG4 CH (S241P)	hEF1 α	博来霉素

[0360] 表4中的每个载体含有在人EF1 α 启动子控制下的重链或轻链表达盒。载体LB300-302, LB305含有人IgG2重链恒定区。载体LB308-309含有人IgG4重链恒定区。载体LB303-304, LB306含有人 κ 轻链恒定区。

[0361] 人IgG4抗体的生产

[0362] 为了进一步最小化潜在的效应器功能, 将具有最佳结合活性的人源化抗体(2C10_h3和2C10_l2)转化成人IgG4或稳定化人IgG4(S241P)。先将重链可变区2C10_h3克隆进入含有人IgG4重链恒定区的载体pFUSE-CHIg-hG4(Invivogen), 然后引入稳定突变S241P(表4)。瞬时转染后, 从293F细胞中纯化人源化IgG4和IgG4(S241P)。产率为25-35mg/L, 是IgG2抗体的两倍。IgG4抗体似乎具有少量半分子, 这在稳定化IgG4抗体中显著减少。稳定化IgG4抗体的DNA和氨基酸序列如图21中所示。

[0363] 人源化IgG4(S241P)抗体在SwiMR表达载体中的克隆

[0364] 为了易于开发抗体生产细胞系研发了SwiMR表达, 利用可转换的膜报告子以促进通过荧光活化细胞分选(FACS)分离高产率细胞。将IRES介导的膜锚定GFP的双顺反子表达盒置于所关注基因(GOI)下游。IRES-GFP盒的侧翼为LoxP位点, 以便随后从染色体上除去。将GFP的表达水平用于标记GOI的表达水平。通过FACS分离高产细胞, 然后用Cre重组酶去除GFP盒。将稳定化IgG4形式的人源化2C10克隆进入SwiMR表达系统以制备载体LB312。在人EF1 α 启动子控制下将重链和轻链克隆进入两个单独的表达盒。IRES-GFP盒位于重链序列下游并且其翼侧为两个LoxP位点。质粒携带嘌呤霉素抗性基因用于哺乳动物细胞选择和 β -内酰胺酶基因用于细菌增殖。

[0365] CHO细胞的稳定选择和高产细胞的分离

[0366] 使用通过Asc I限制性内切酶线性化和120ul Freestyle Max试剂(Invitrogen)将120ug LB213转染进入100ml CHO细胞(1×10^6 个细胞/ml, Invitrogen)。使用10-20ug/ml嘌呤霉素对细胞进行2周选择。通过流式细胞术鉴定稳定混合物的GFP表达性质。将具有最高GFP信号的前1%细胞分类为含100,000个细胞的池#1。培养2周后, 针对GFP表达情况通过流式细胞术对池#1再次进行分析。将具有最高GFP信号的前1%细胞分类为含100,000个细胞的池#2。培养2天后, 使用2uM重组膜可穿透的DNA重组酶Cre(TAT-NLS-Cre, Excellgen)对池#2进行处理。培养1周后, 分析GFP表达性质。~10%的细胞完全失去GFP表达表明从染色

体中成功除去GFP表达盒。在384孔板中将GFP阴性细胞分选为单个细胞。2周后,从10x 384-w板中生长出~800个集落。

[0367] 其他人源化抗体

[0368] 还使用克隆进入VH1-69和VL1-39人种系框架的两个CDR移植VH和两个CDR移植VL序列生产人源化抗体。

[0369] 在这些附加实验中,我们制备了两条重链(HB1&HB2)和两条轻链(KB1&KB2)。将重链序列和轻链序列HP+KP作为阳性对照。将这些构建体的组合在HEK293细胞中瞬时表达,通过蛋白A层析纯化抗体并检测hCD40结合。

[0370] 图14显示了在2C10HP与2C10HB1之间的框架3以及2C10HB2构建体中的氨基酸改变。图15显示了人源化2C10抗体的重链和轻链可变区序列。重链和轻链可变区包括2C10HP、2C10HB1、2C10HB2、2C10KP、2C10KB1和2C10KB2。因此,在某些实施方式中,抗-CD40抗体可以包括下述2C10H-K组合的任意一个:

[0371] 1.2C10HP+2C10KP

[0372] 2.2C10HB1+2C10KB1

[0373] 3.2C10HB1+2C10KB2

[0374] 4.2C10HB1+2C10KP

[0375] 5.2C10HB2+2C10KB2

[0376] 6.2C10HB2+2C10KB1

[0377] 7.2C10HB2+2C10KP

[0378] 8.2C10HP+2C10KB1

[0379] 9.2C10HP+2C10KB2

[0380] CD40与纯化抗体的体外结合

[0381] 在瞬时转染100或200ml 293F细胞后,对人源化抗体和嵌合抗体进行纯化。使用蛋白A柱从转染后4天收集的条件培养基中纯化抗体。

[0382] CD40结合动力学的确定

[0383] 在Forte Bio(Aragen Bioscience)上确定CD40的结合动力学。将纯化的CD40生物素化并固化在抗生物素蛋白链菌素生物传感器上。

[0384] 用于体内研究的生物生产

[0385] 在转染CHO细胞并选择稳定转染的细胞后,通过蛋白A柱纯化抗体,然后进行缓冲液交换(20mM柠檬酸钠,50mM NaCl,5%麦芽糖,pH6.0)和0.2μm过滤。将池#1用于建立在CD FortiCHO培养基(Invitrogen)中的25L波包培养。在第3、5和7天使用10%CD高效饲料C(Invitrogen)对培养物喂饲三次。纯化抗体的最终产量为共计1.6g。通过SDS-PAGE和SEC-HPLC分析对抗体进行鉴定,单体抗体的纯度为99.4%。

[0386] 细胞系的开发

[0387] 通过3轮ELISA和1轮补料分批生产对单细胞集落进行筛选。在整个筛选过程中将细胞保持在CD FortiCHO培养基中。将来自384孔板的所有集落挑入96孔板。从各孔中取1.2 μl培养基用于在包被了抗-人Fc抗体的ELISA板中筛选抗体。在10x24-孔板中克隆前240个克隆。培养5天后,使用1.2μl培养基对抗体水平进行再次筛选,在10x 6-孔板中扩增前60个克隆并在振荡培养箱中培养。培养5天后,通过按照1:10的比例将细胞传代进入新的6-孔板

中复制6-孔板。使得6-孔板原始组中的培养物生长至消亡,随后通过ELISA确定抗体水平。将6-孔板复制组中的前24个克隆扩增至125ml摇瓶中的30ml培养基中。对克隆进行30ml补料分批生产。喂饲策略为在第3、5、7、9和11天投喂7.5%Ex-Cell Advanced CHO饲料1 (Sigma)。第1位的克隆3C9-I6显示出~1.2g/L的生产滴度。

[0388] 灵长类嵌合2C10和人源化2C10的体外药理学

[0389] 对于我们的主要候选物,我们坚定了下述重要的体外药理学特性:

[0390] • 抑制由CD154-CD40结合诱导的B-细胞活化

[0391] • 对B细胞无直接活化作用

[0392] • CD40的高亲和性拮抗剂(例如, K_d 为约 10^{-10} M或更低、约 10^{-10} M至约 10^{-9} M或如本申请所述)

[0393] 通过一种新的免疫方法和广泛的体外筛选方法,我们已经鉴定了一种抗-CD40抗体,其符合这些标准并代表了对人CD40的非耗竭性/非活化性拮抗性抗体。

[0394] 体外和体内研究已证实,人源化形式保持了优异的性质。

[0395] 如此前的章节中所述,通过将CDR移植进入人重链和轻链框架将2C10mAb人源化。为了维持原始2C10 mAb的性质,通过Biacore针对对人CD40的亲和对人源化2C10构建体进行筛选。相对于亲代2C10mAb,前三位的人源化2C10抗体均仅表现出亲和性仅略微降低约两倍(表5)。最重要的是,其均保持了亲代2C10 mAb非常缓慢的解离速率。在这些抗体中,将显示出最高亲和性390pM的克隆2.189.2作为主要人源化mAb(h2C10)。

[0396] 表5:2C10人源化版本的CD40受体结合动力学

[0397]

mAb	K_d (M)	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	Rmax	全部 X^2	全部 R^2
2C10	2.22E-10	1.48E+05	6.01E-05	0.3124	0.284838	0.993451
2.189.1	5.11E-10	1.98E+05	1.85E-04	0.3917	0.490659	0.991111
2.189.2	3.90E-10	1.79E+05	1.28E-04	0.3946	0.401784	0.991697
2.191.1	5.61E-10	1.84E+05	1.88E-04	0.3924	0.402934	0.992955

[0398] 将人源化2C10与竞争者的结合动力学进行比较,h2C10的总体亲和性保持远远优于竞争者,其亲和性在纳摩范围。我们还对h2C10与人CD40和在临床前评估中使用的那些非人灵长类CD40之间的结合亲和性进行了比较。如图16中所示,在这些灵长类物种中,h2C10对CD40具有可比的亲和力。

[0399] 灵长类嵌合和人源化2C10的体内表征

[0400] 使用2C10的灵长类嵌合构建体和临床候选人源化h2C10抗体在恒河猴中对2C10进行了体内药效学、药代动力学和探索性安全性评估。在基于体外结合动力学选择了2C10的主要人源化版本(mAb 2.189.2;h2C10)后,我们进一步在恒河猴中对h2C10进行了PK/PD研究以表征其附加的性质。在这些研究中产生的数据覆盖了关键实验终点的广泛范围,其清楚地确定了h2C10具有极好的性质。

[0401] 在恒河猴中考察PD、PK和安全性终点的研究已完成。研究设计的要素包括表6中汇总的关键终点和目标(在短尾猴中对2C10的药效学(PD)、药代动力学(PK)和安全性研究)。对关键终点的结局和相关比较评估包括:

[0402] • 对血液中B和T淋巴细胞数量的影响

[0403] • 对针对T细胞依赖性抗原钥孔戚血蓝蛋白(KLH)体液免疫应答的影响

- [0404] • CD40受体占据血液中的B细胞(PD)
- [0405] • 药代动力学(PK)
- [0406] • 通过抗药抗体(ADA)的形成评估免疫原性
- [0407] • 探索性毒理学包括CBC、血清生化和完整解剖
- [0408] 表6:在恒河猴中2C10的PD、PK和安全性研究

[0409]

编号 #	关键目的	检测版本	组规模	检测给药/ 方案	随访期	关键终点
1	对IgG1和IgG4形式以及阳性对照3A8进行比较	灵长类嵌合2C10	3	两次给药; 50 mk/kg, 在第0天和第7天; 盐水对照	56天	CBC 淋巴细胞子集 主要TDAR (抗-KLH)
2	剂量应答评估	灵长类嵌合2C10 IgG4	3	一次给药 5, 10, 25, 50 mg/kg, IV; 无关IgG对照	56天	CBC 淋巴细胞子集 详细的B细胞子集 TDAR (对KLH的主要和回忆应答)
3	安全性评估/ 探索性毒理学	灵长类嵌合2C10 IgG4	2	两次给药; 25 mg/kg, 在第0天和第14天IV; 历史对照	第2次给药 后14天 (共计28天)	CBC 血清生化 淋巴细胞子集 大体解剖&显微病理学
4	PK、PD、安全性	人源化2C10 IgG4	3	一次给药; 10, 25 mg/kg, IV; 盐水对照	28天	受体占据CBC 血清生化 淋巴细胞亚群 主要TDAR (抗-KLH) PK ADA

[0410] 在下面的章节中对研究结果进行了总结。可以将h2C10用于治疗在不将B细胞耗竭的条件下选择性阻断CD40受体活性预期将提供治疗益处的病况。

[0411] 对T细胞介导免疫的影响

[0412] 为了在体内证实h2C10在体内阻断T-细胞依赖性抗体应答(TDAR),在给予h2C10 6小时后使用KLH免疫猴。随后每周检测针对KLH的抗体滴度。

[0413] 给予猴10和25mg/kg h2C10,随后使用KLH攻击。每周测定IgG和IgM抗-KLH滴度直到给药后第28天。图17显示了在最高检测剂量下以及大部分情况下在10mg/kg剂量水平下

2C10的人源化版本达到对KLH抗体应答的完全抑制。IgM和IgG应答被阻止。

[0414] 对B细胞无耗竭作用

[0415] 作为开发拮抗性CD40抗体所包括的目标使所靶向的CD40+细胞耗竭最小化,我们分析了对淋巴细胞亚群的影响,特别是对B细胞的影响。

[0416] 即使在这些浓度下时CD40靶点已被抗体完全饱和,使用10或25mg/kg 2C10的人源化形式(h2C10)对猴进行治疗对B细胞也不具有显著的耗竭作用(参见下文的受体占据章节)。

[0417] 尽管B细胞上2C10结合位点的饱和持续到最后1天检测时(第28天),但是接受h2C10每个剂量的所有猴保持正常的B淋巴细胞和T淋巴细胞子集(图18)。这些结果表明注射低至10mg/kg的2C10能够持续结合CD40,其在B细胞(以及可能的单核细胞和其他抗原提呈细胞)上的治疗靶点不会导致在猴中不利的B细胞耗竭。

[0418] 结果表明2C10不会耗竭B细胞,提示这是其优于3A8和Chi220以及其他竞争物的一个显著优点。

[0419] 药效学

[0420] CD40受体占据

[0421] 使用荧光标记的2C10和标记的、非竞争性抗-CD40抗体通过流式细胞术测量2C10对CD20+B细胞上CD40的可用结合位点确定灵长类嵌合2C10和2C10的人源化版本对CD40靶点的结合和占据情况。在多个日期从对照猴和给予灵长类嵌合IgG4或人源化2C10的猴中收集血液并通过FACS对其进行分析。直接从平均荧光强度记录计算靶点结合度(受体占据%)。

[0422] 单次静脉内给予10和25mg/kg人源化2C10抗体。在接受h2C10这两个剂量的所有猴中,到第3天时B细胞上的表面CD40完全饱和,并且该作用持续至最后一天(第28天)测量时。给予人源化2C10 28天后,对从猴中收集的血液进行流式细胞术分析的典型数据如图19所示。

[0423] 这些结果表明单次注射h2C10在剂量低至10mg/kg时能够至少持续28天完全饱和B细胞上的CD40受体。

[0424] 药代动力学和抗药抗体应答

[0425] 为了在基于CD40受体占据的2C10药效学作用与2C10的药代动力学之间建立明确的联系,对血浆中2C10的血浆浓度进行了测量,血浆来自己确定了受体占据情况的同一血样。血浆浓度分析还能够表征2C10的药代动力学性质,最重要的是通过确定其半衰期可以知晓其在血浆中的持续存在时间。该测定结果为给药频率提供了指导,给药频率将是维持有效治疗浓度所需要的。

[0426] 图20中描绘了在使用10或25mg/kg人源化2C10治疗的猴中确定的平均血清浓度。这些数据表明动物在整个研究期间暴露于2C10下,以及人源化2C10在猴中的半衰期为约15天(范围从9-20天)。该半衰期在治疗性抗体在灵长类中的预期范围内,并且支持在临床研究中采用相对不频繁的给药时间表(例如,不超过每两周一次)。对完整数据集的进一步建模将能够耐用地评估在h2C10的初始临床研究中提供持续有效的抗体浓度所需的剂量和频率。

[0427] 对人源化2C10的另一项评估是出现针对h2C10的抗体(ADA)的可能性。当将一个物

种的表位生物学向不同物种施用(例如,向灵长类施用人源化mAb)能够出现这一情况,其导致药物从血浆中迅速清除。在该研究中,从时程曲线上看没有产生针对h2C10的抗体的证据,因为在研究过程中没有动物显示出可检测的抗-2C10滴度。

[0428] 初步安全性评估

[0429] 进行本章节描述的实验以确定h2C10对免疫系统的潜在不良后果及其脱靶作用。对于生物疗法而言,这些评估是在人体内暴露药物之前对安全性进行评估以及开发针对临床检测的降低风险的计划所需要的最关键的评估。在猴的免疫功能或病理学上没有任何预料不到的或不希望的结果对于h2C10的总体安全性评估被认为是有利的。此外,在给药后若干天在给予2C10的猴中进行了针对血常规参数(包括血小板计数和血清生化参数)改变的常规检测,并且结果表明使用嵌合的和人源化2C10治疗对其无影响。对给予25mg/kg灵长类嵌合2C10两次的两只动物针对治疗相关病理学的大体和显微镜下证据进行了评估;未观察到治疗相关的病理学改变。此外,为了排除血栓栓塞并发症,通过针对纤维蛋白沉积的特定染色对所有组织均进行了检查。未发现亚临床凝血异常的证据。重要的是,在研究中检测了相对较高的剂量,其明显超出了占据全部CD40受体所需的剂量,因此其接近在IND实施阶段进行的关键毒理学研究将要测试的剂量水平。这些初步安全性评估表明h2C10不存在任何安全性问题。

[0430] 这些组合数据表明在相关的灵长类模型中h2C10具有拟用于治疗患者的单克隆抗体所需的药效学、药代动力学和安全性性质,其中具有对CD40活化的特异性抑制且不会导致对CD40+靶细胞不希望的活化或耗竭且无脱靶毒性的证据是所希望的。

[0431] 尽管已经描述和说明了本发明的具体方面,但是应将这些方面仅仅认为是对本发明的说明,而不是对根据所附权利要求解释的本发明的限制。出于所有目的,本说明书中引用的所有出版物和专利申请都通过引用整体并入本申请,就好像每个单独的出版物或专利申请被具体和单独地指出通过引用并入本申请一样。尽管为了清楚理解的目的已经通过说明和实施例详细描述了前述发明,但是根据本发明的教导,本领域普通技术人员将易于理解的是,可以在不脱离所附权利要求的精神或范围的前提下进行某些改变和修饰。

描述: 小鼠抗-CD40克隆2C10

重链 (信号肽+V-区)

ATGGAAAGGCACTGGATCTTTCTCTTCCTGTTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCAC
TCCCAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAAACCTGGGGCCT
CAGTGAAGATGTCCTGTAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAACTACTGGATGC
ACTGGGTAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAAT
CCTAGCAATGATTATACTAAGTACAATCAAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTG
ACTGCAGACAAATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTGGGTAGCCTGACATCT
GAGGACTCTGCAGTCTATTATTGTGCAAGACAGGGGTTTCCTTACTGGGGCCA
AGGACTCTGGTCACTGTCTCT

蛋白

MERHWIFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTNYW
MHWVKQRPQGQLEWIGYINPSNDYTKYNQKFKDKATLTADKSSNTAYMQLGSL
TSEDSAVYYCARQGFYPYWGQGTLVTVS

轻链 (信号肽+V-区)

DNA

ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAA
TATCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCC
AGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGC
ACTGGTACCACCAGAGGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACA
TCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC
CTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC
TGCCACCAGTTGAGTAGTGACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGA
AATAAAA

蛋白

MDFQVQIFSFLLISASVIISRGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHW
YHQRSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSEMEADAATYYCHQL
SSDPFTFGSGTKLEIK

图1

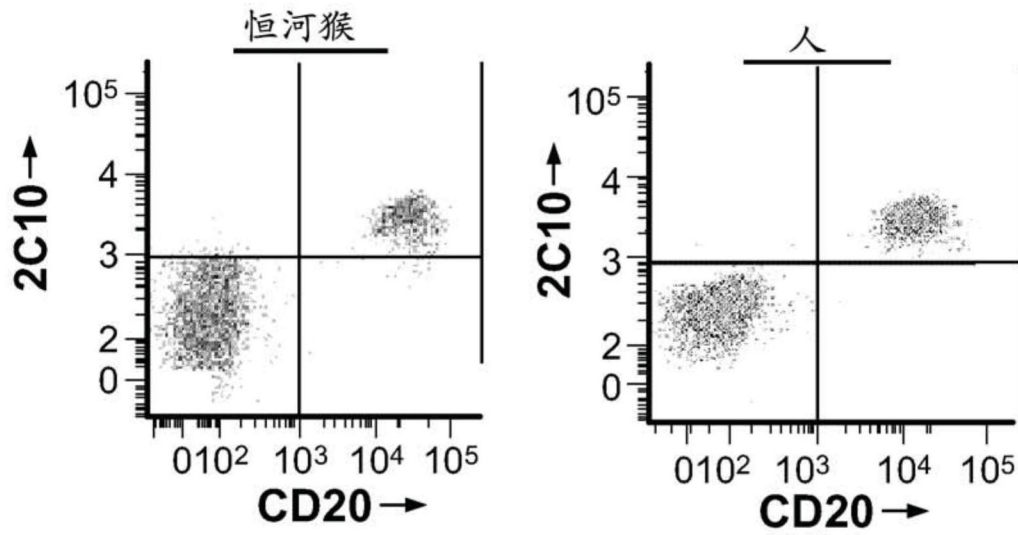


图2a

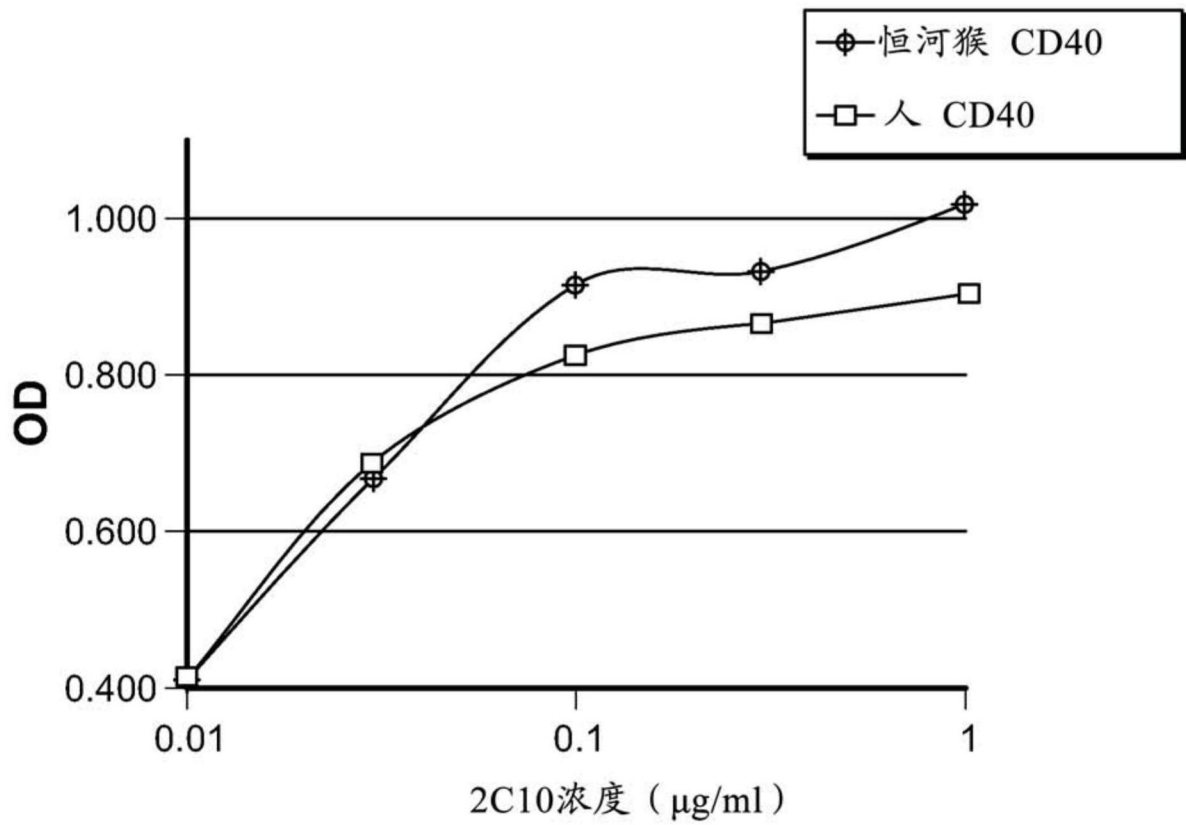


图2b

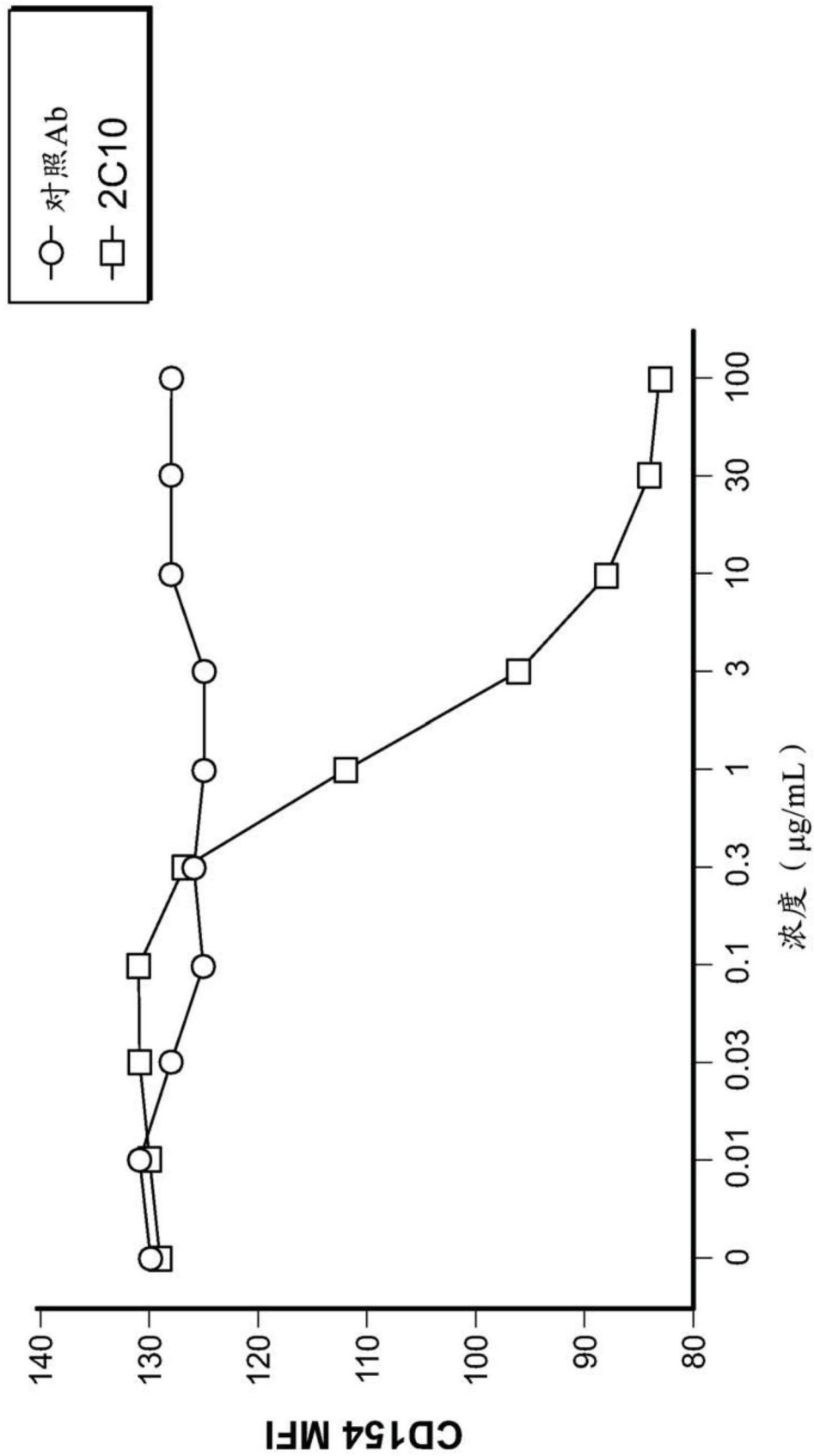


图3

测定原理:

- 将恒河猴或人PBMC与CD154+ Jurkat D1.1细胞共培养
- CD154在PBMC中通过CD40活化B细胞
- 读取是在B细胞上CD23、CD80和CD86表达的变化

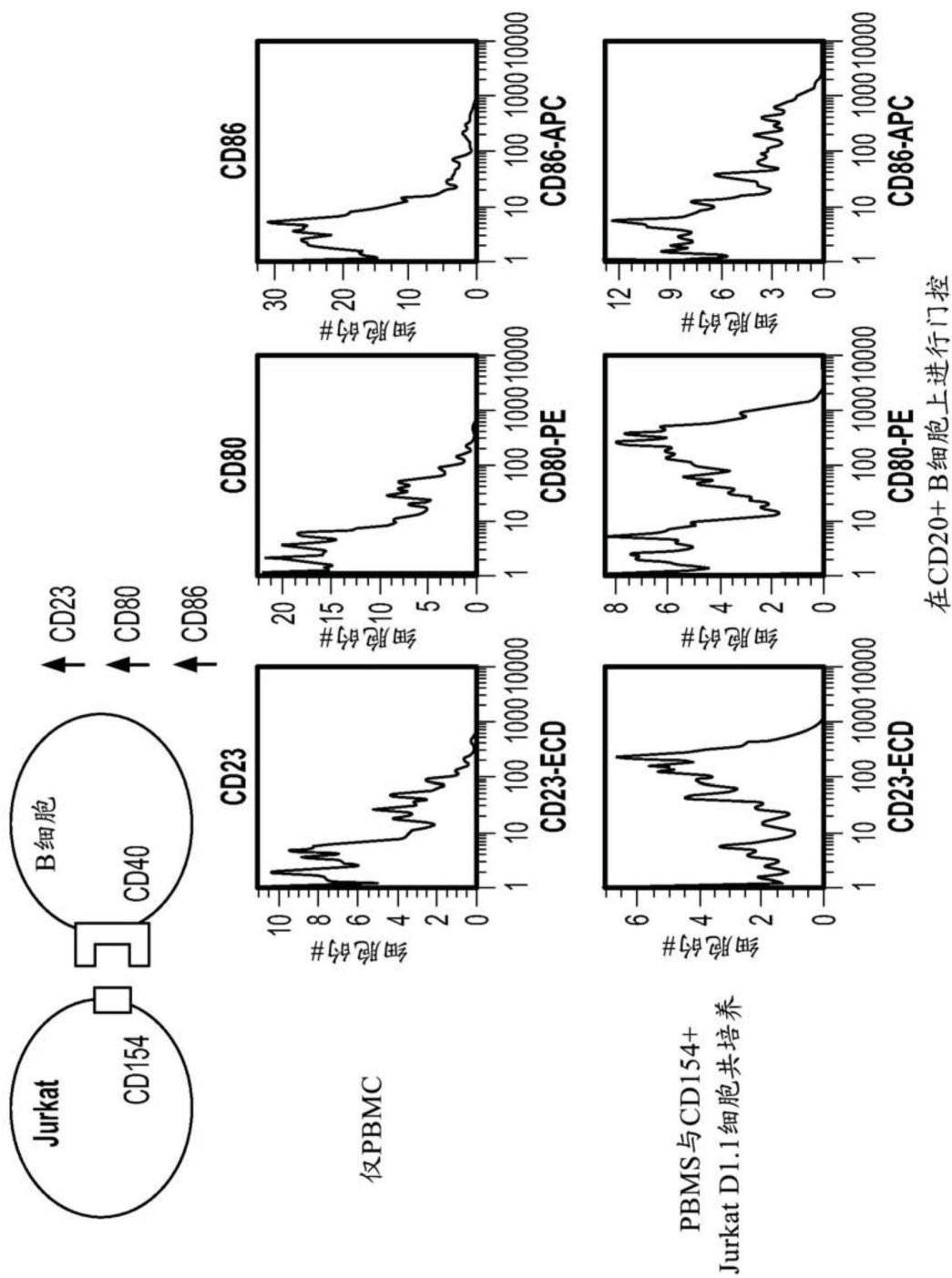


图4

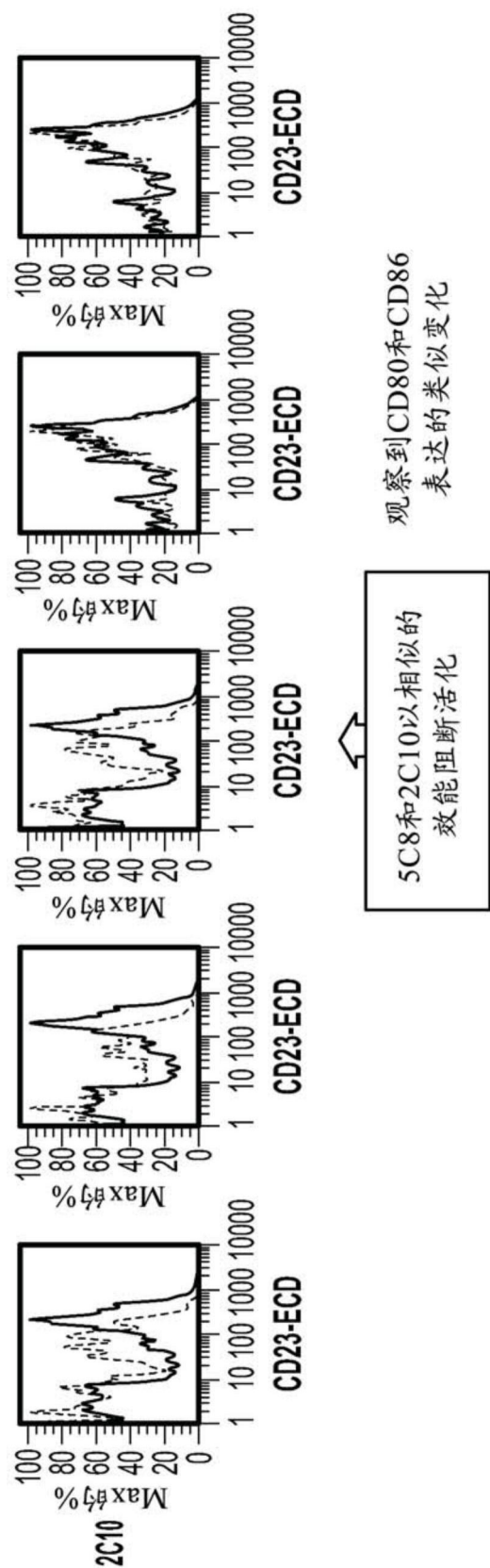


图5(续)

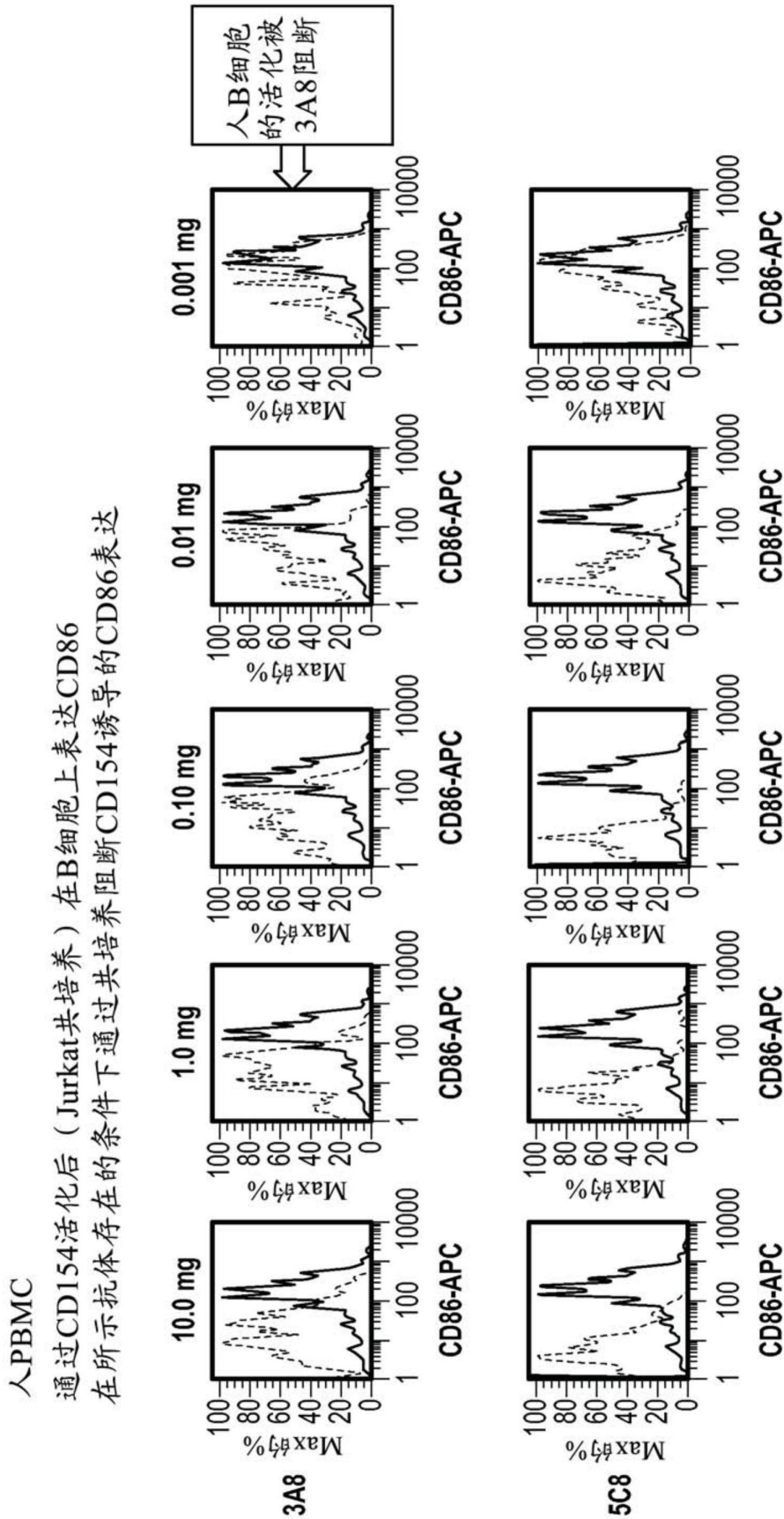


图6

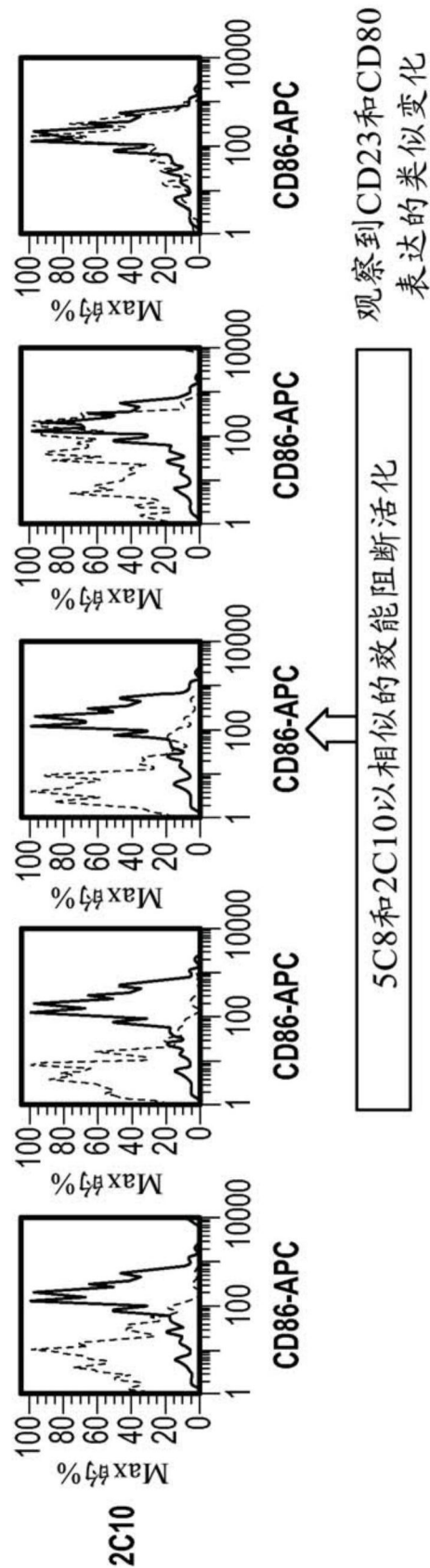


图6(续)

在B细胞上CD23的表达（未与Jurkat共培养）
在与所示抗体孵育的B细胞上CD23的表达（无Jurkat）
恒河猴B细胞

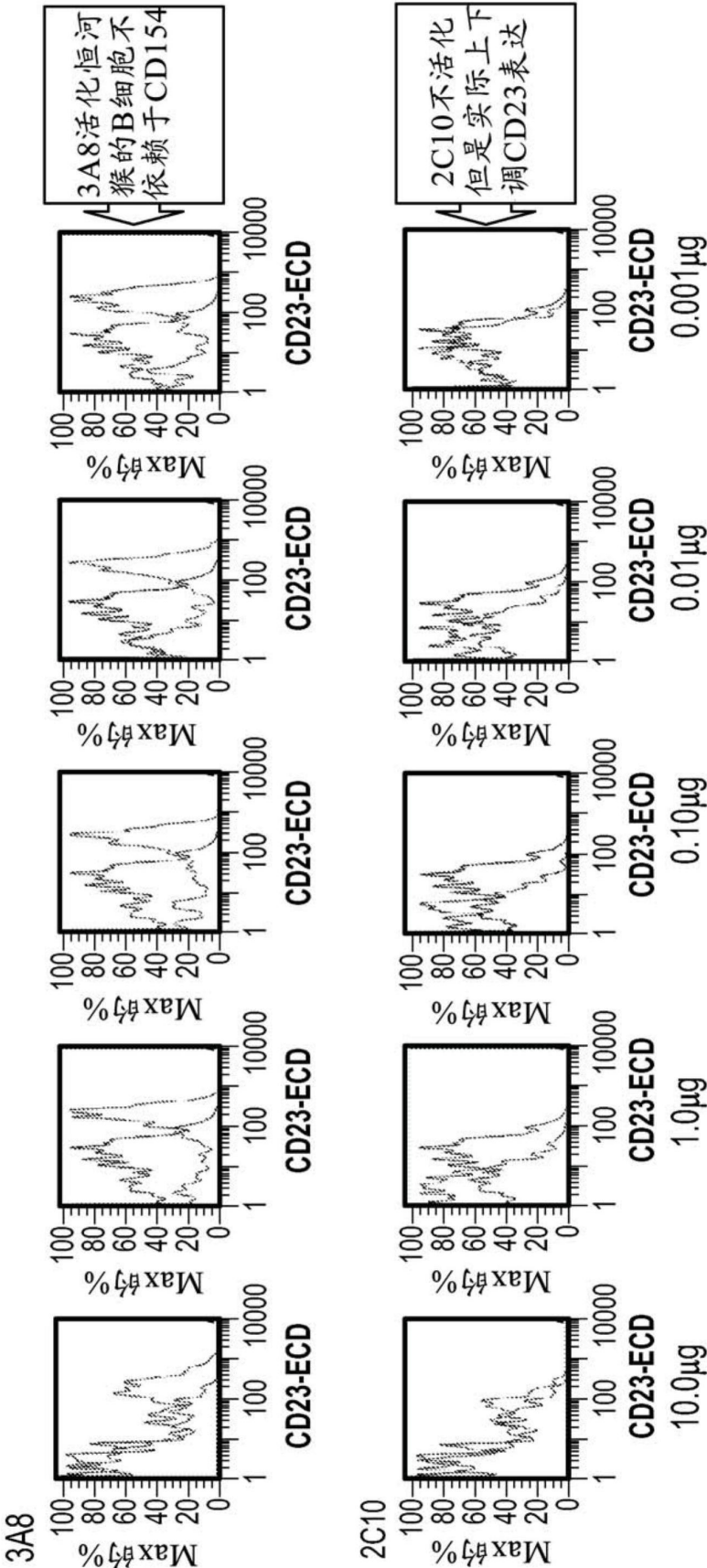


图7

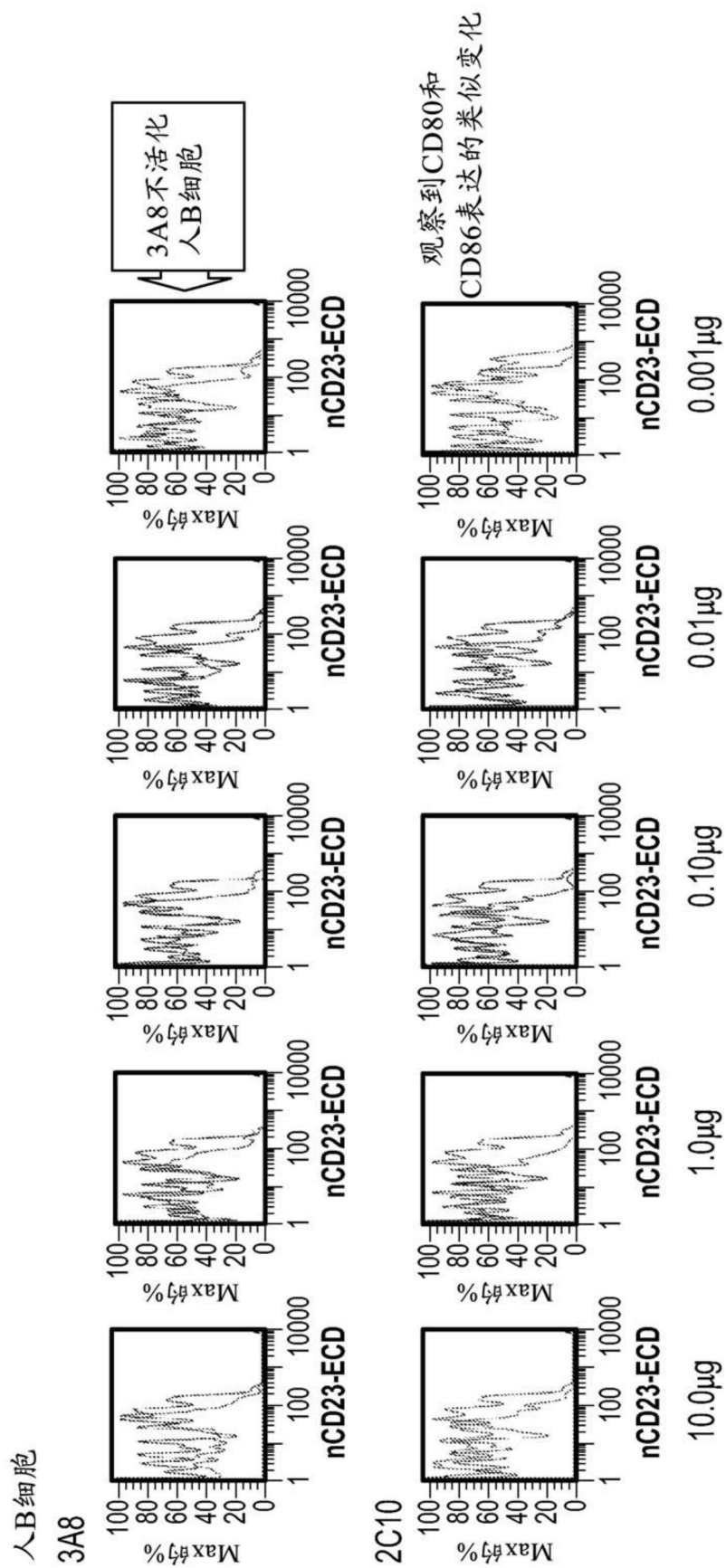


图7(续)

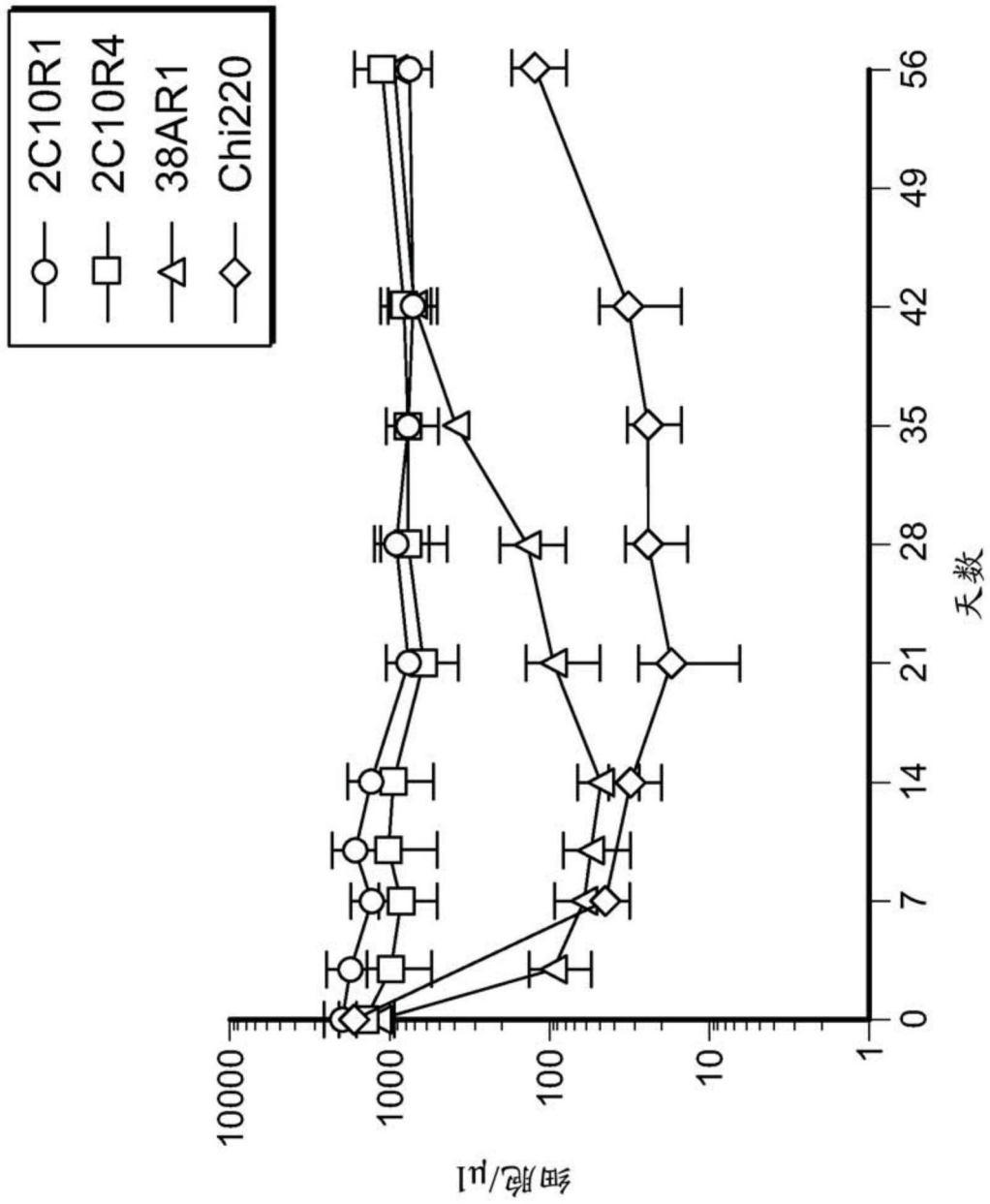


图8

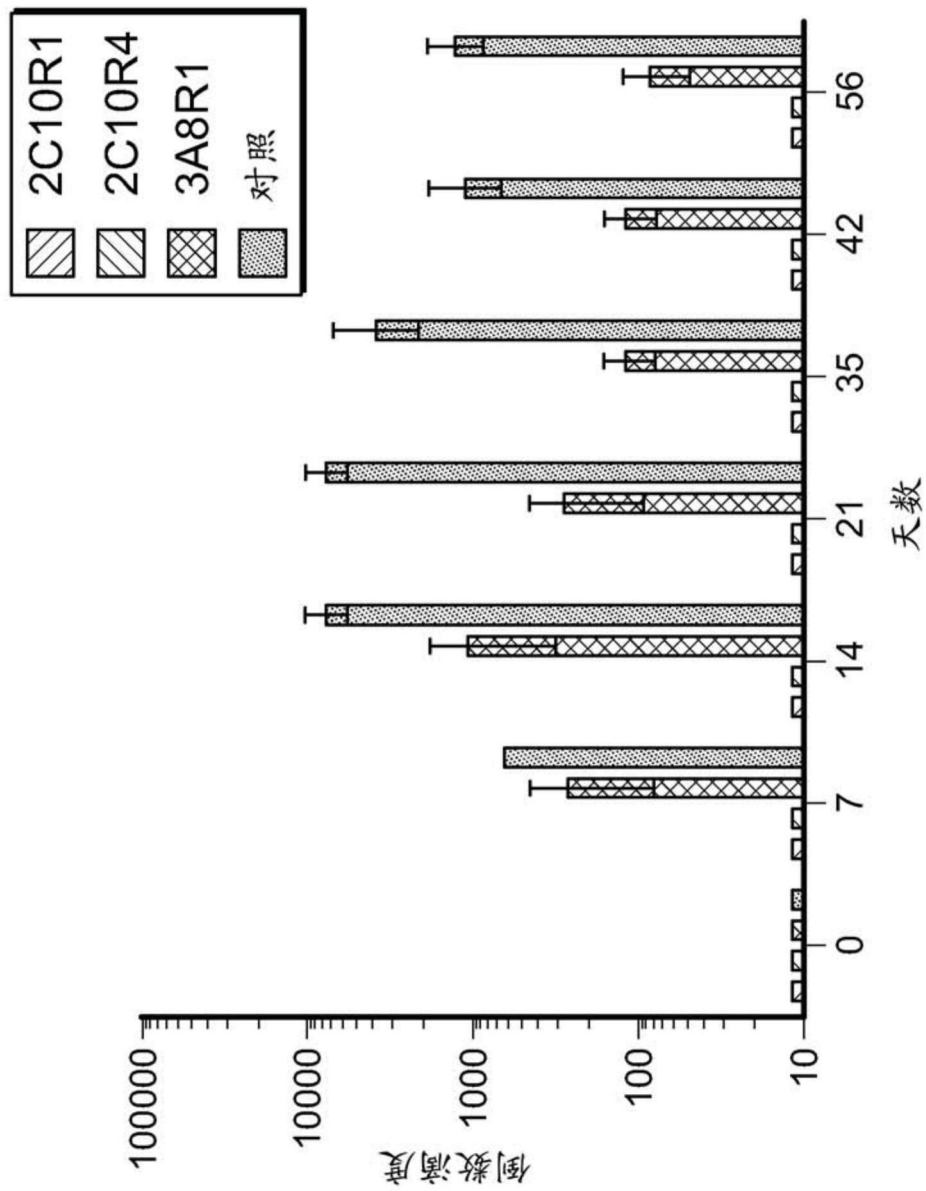


图9

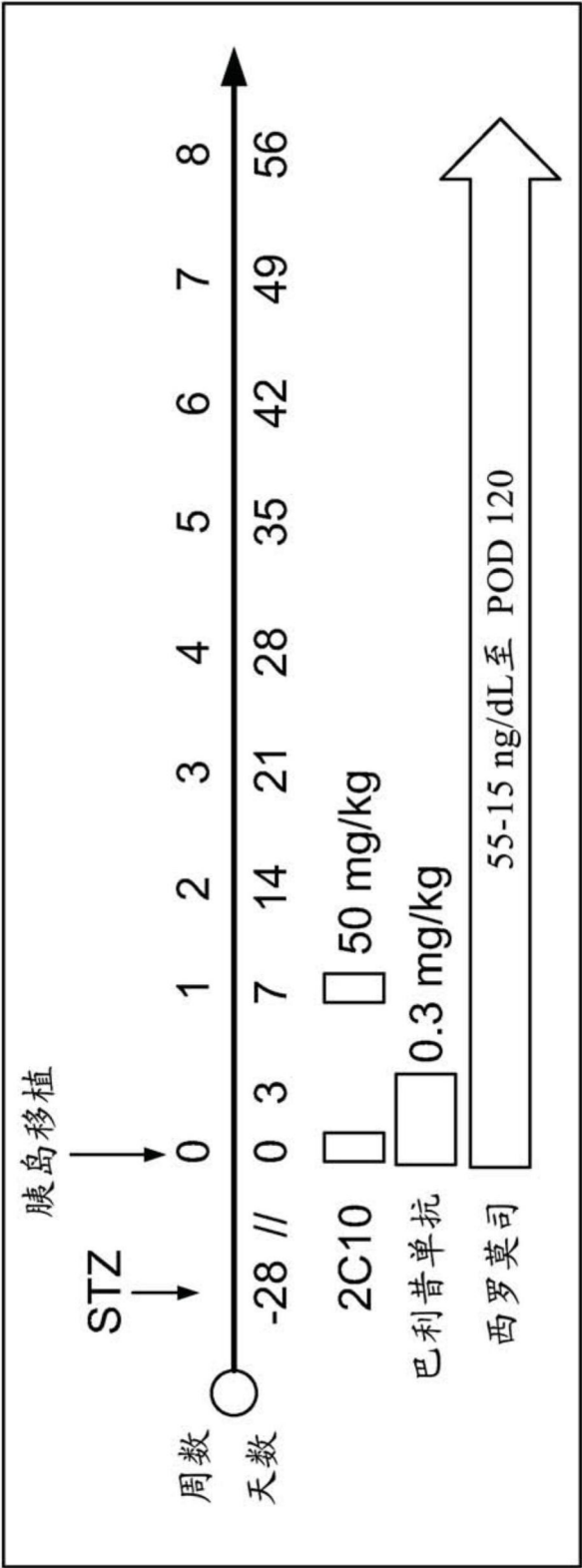


图10

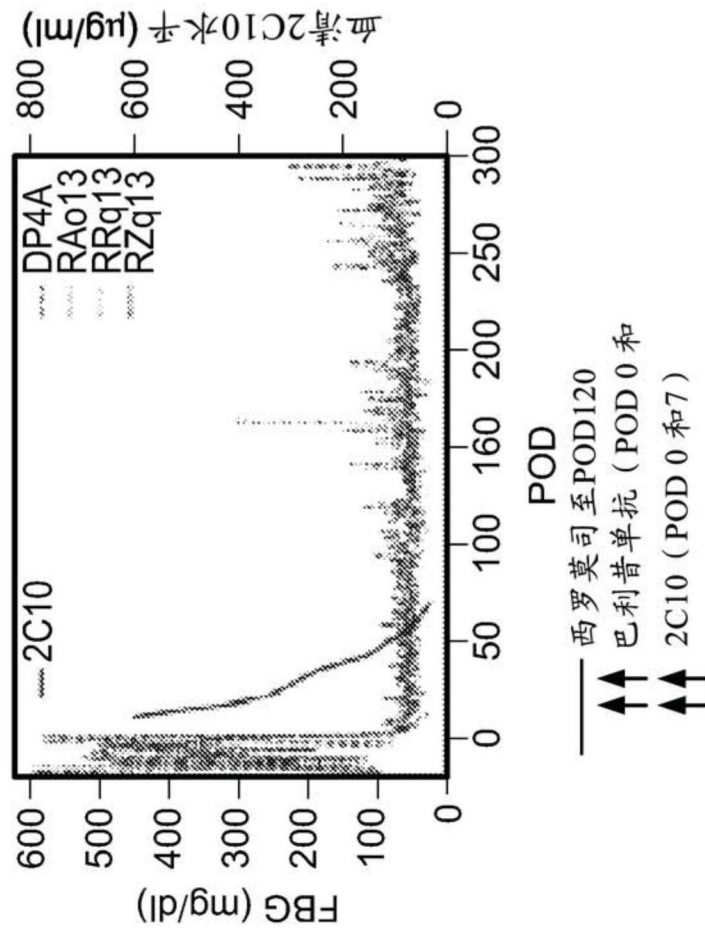


图11A

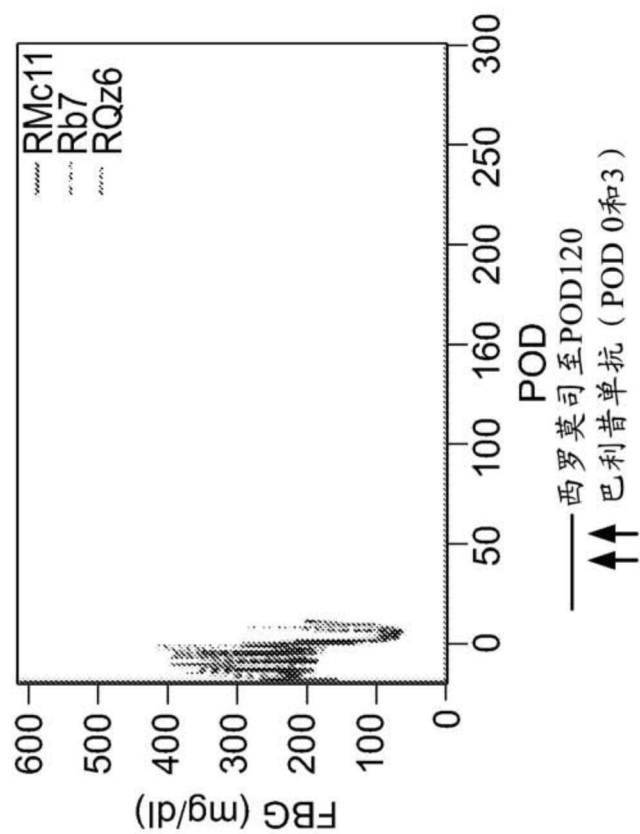


图11B

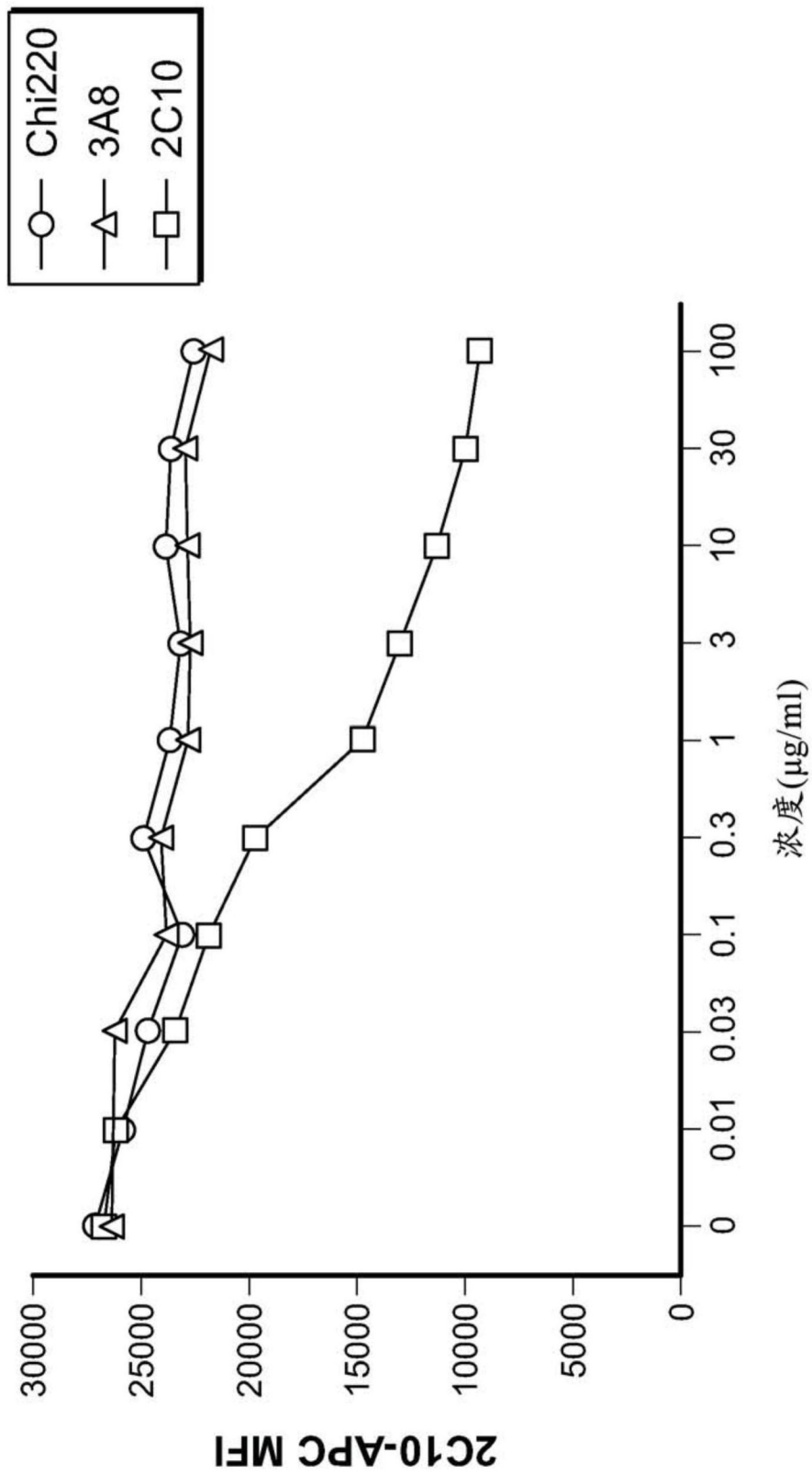


图12

2C10_VH QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASG YTFTNYWMH WVKRPGQGLEWIG YINPSNDYTKYNQKFKD
 VH1-3 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG YTFTSYAMH WVRQPGQRLEWMG WINAGNGNTKYSQKFQG
 2C10_h1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG YTFTNYWMH WVRQAPGQRLEWMG YINPSNDYTKYNQKFKD
 2C10_h2 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG YTFTNYWMH WVRQAPGQRLEWMG YINPSNDYTKYNQKFKD
 2C10_h3 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASG YTFTNYWMH WVRQAPGQRLEWIG YINPSNDYTKYNQKFKD

2C10_VH KATLTADKSSNTAYMQLGSLTSEDSAVYYCAR QGFPY WGQGLTVTVSA
 VH-3 RVTITRDTASTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR - - - - - WGQGLTVTVSS
 2C10_h1 RVTITRDTASTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR QGFPY WGQGLTVTVSS
 2C10_h2 RVTITADKASTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR QGFPY WGQGLTVTVSS
 2C10_h3 RATLTADKASANTAYMELSSLRSEDYAVYYCAR QGFPY WGQGLTVTVSS

图13A

2C10_VL QIVLTQSPAISASPGEKVTMTC SASSSVS-YMH WYHQSGTSPKRWIY DTSKLAS
 VKW_11 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY DASNRAT
 2C10_11 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC SASSSVS-YMH WYQQKPGQAPRLLIY DTSKLAS
 2C10_12 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC SASSSVS-YMH WYQQKPGQAPRRWIY DTSKLAS

2C10_VL GVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYC HQLSSDPFT FGSGTKLEIK
 VK3-11 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSEAEADFAVYYC - - - - - FGSGTKVEIK
 2C10-11 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC HQLSSDPFT FGSGTKVEIK
 2C10-12 GVPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDFAVYYC HQLSSDPFT FGSGTKVEIK

图13B

2C10HP: CDR2 R--L---K-A-..... CDR3
 2C10HB1: CDR2 R--L---T-T-..... CDR3
 2C10HB2: CDR2 K--I---E-T-..... CDR3

图14

2C10HP:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYWMHWVRQAPGQRLEWIGYIN
PSNDYTKYNQKFKDRATLTADKSANTAYMELSSLRSED¹AVYYCARQGFPYWGQGTLLVTVSS

2C10HB1:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYWMHWVRQAPGQRLEWIGYIN
PSNDYTKYNQKFKDRATLTADTSTNTAYMELSSLRSED¹AVYYCARQGFPYWGQGTLLVTVSS

2C10HB2:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTFTNYWMHWVRQAPGGGLEWIGYIN
PSNDYTKYNQKFKDKATITADESTNTAYMELSSLRSED¹AVYYCARQGFPYWGQGTLLVTVSS

2C10KP:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQKPGQAPRRWIYDTSKLAS
GVPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCHQLSSDPFTFGGGTKVEIK

2C10KB1:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHYQQKPGKAPKLLIYDTSKLAS
GVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQPD¹FATYYCHQLSSDPFTFGQGTKVEVK

2C10KB2:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCHQLSSDPFTFGQGTKLEIK

图15

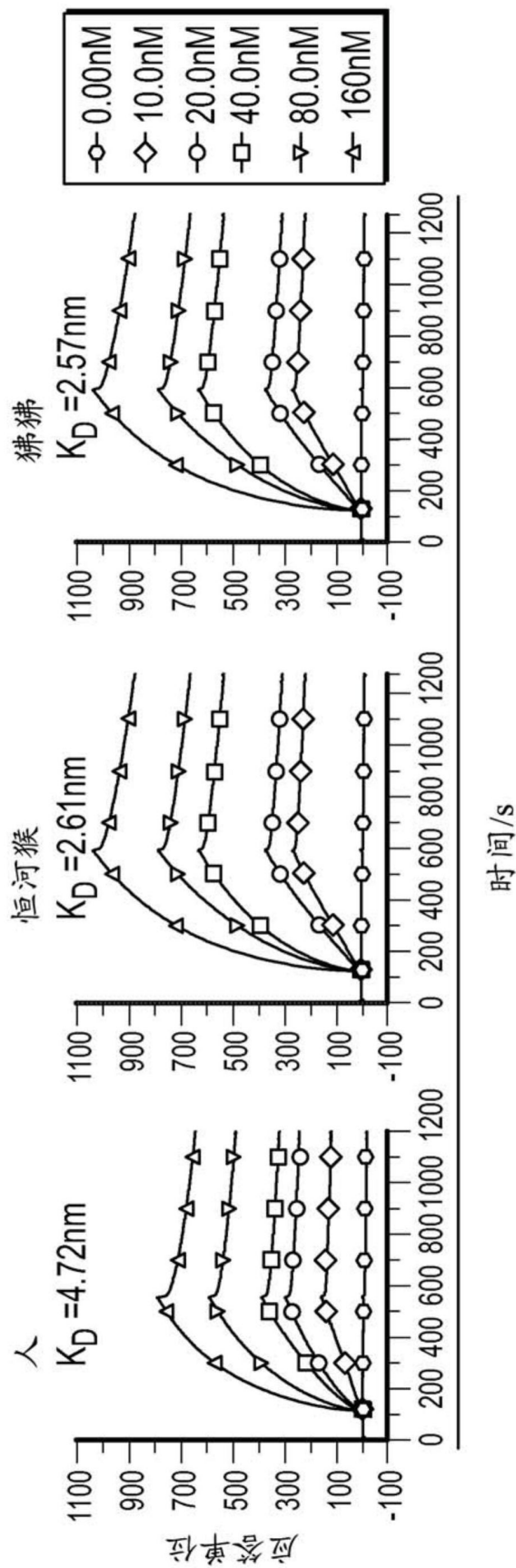


图16

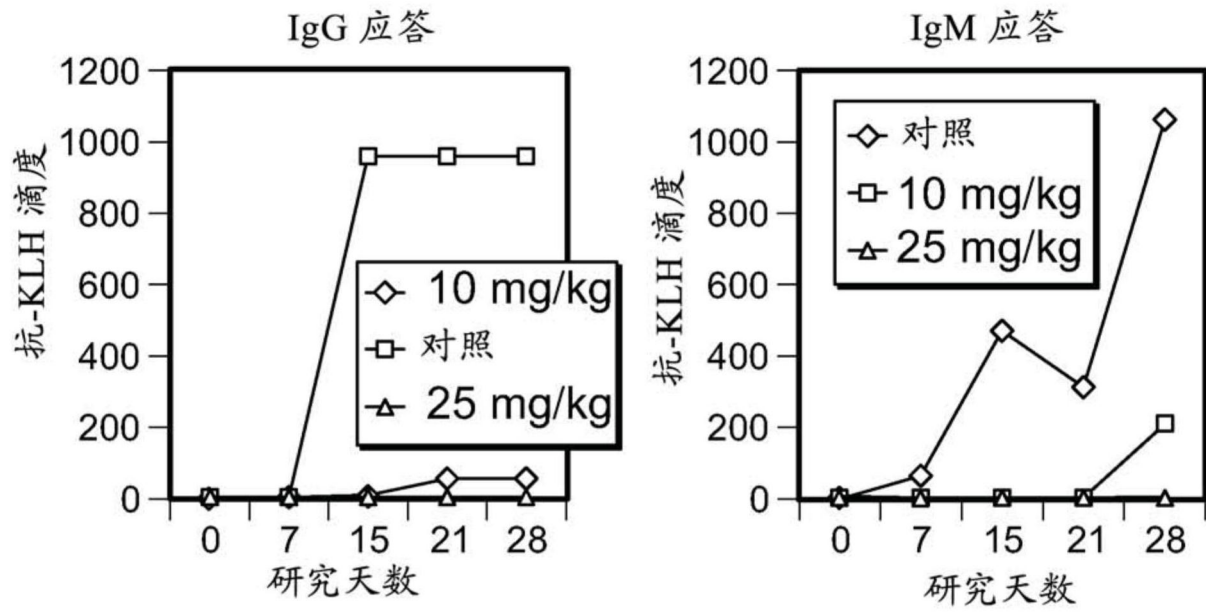


图17

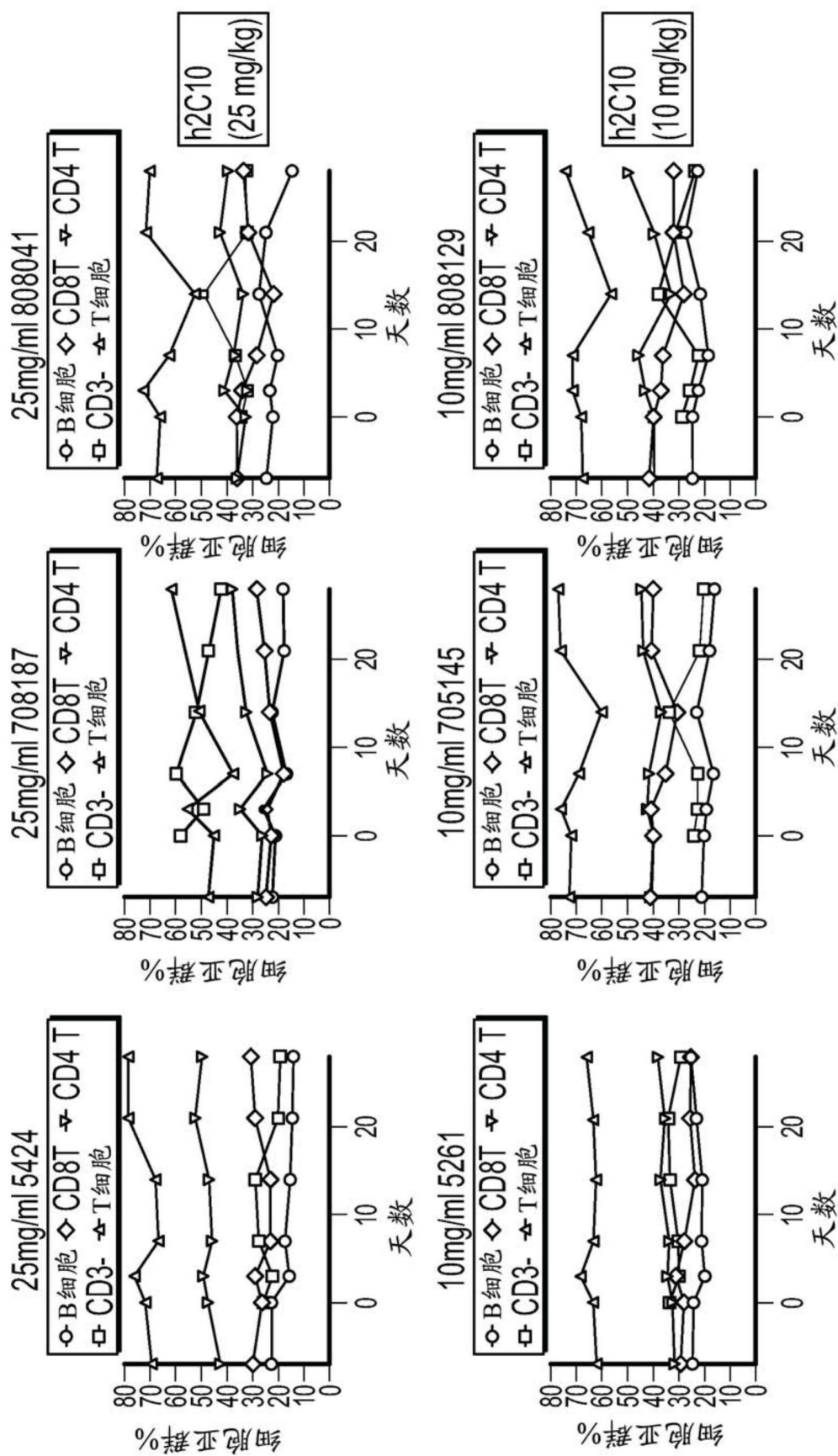


图18

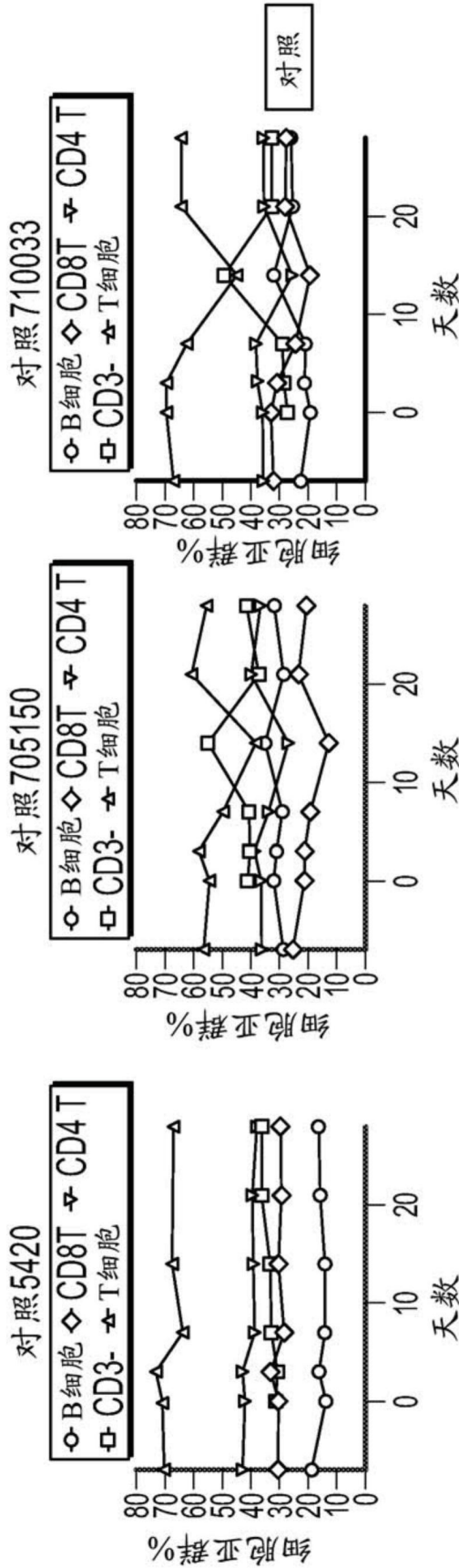


图18(续)

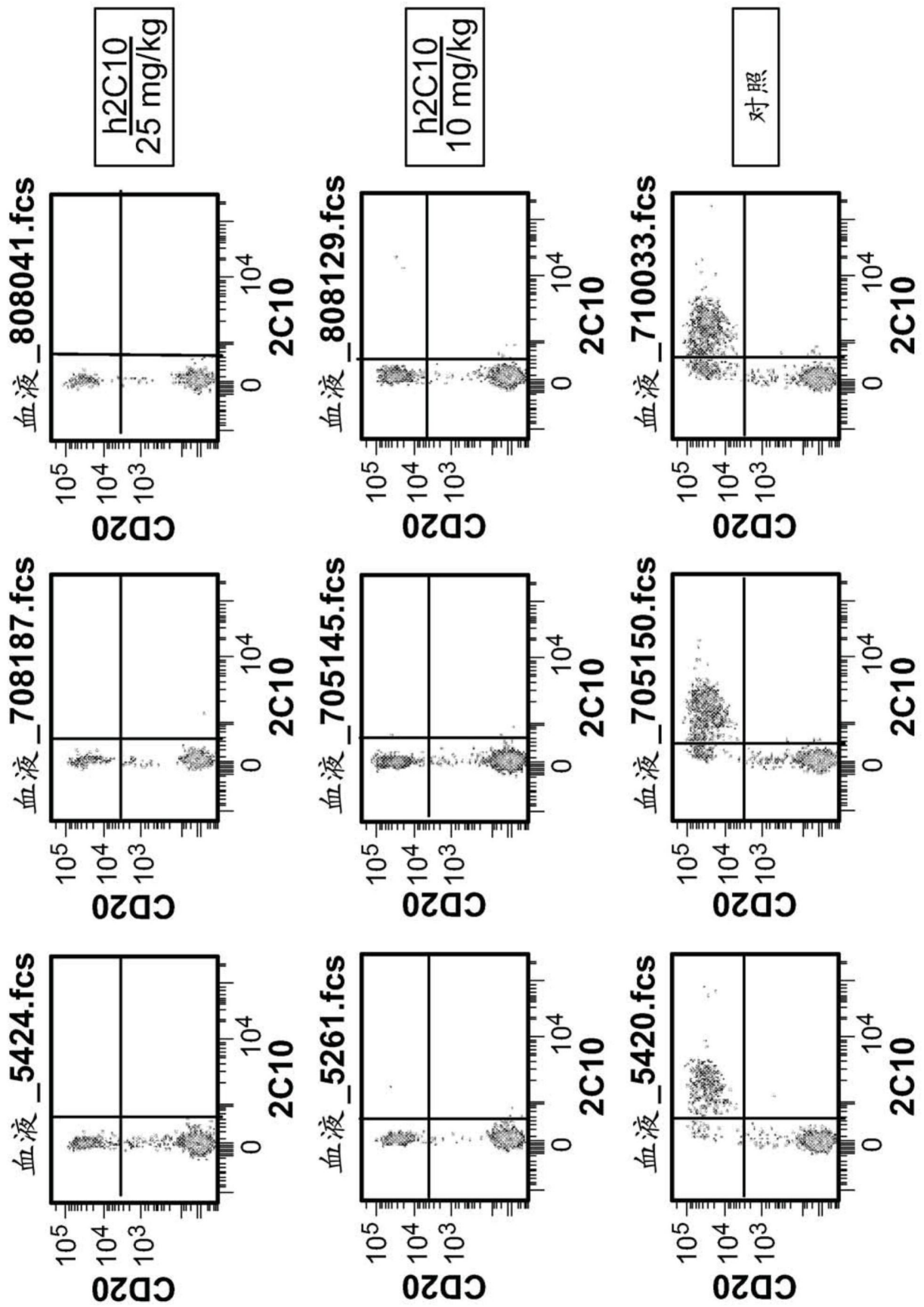


图19

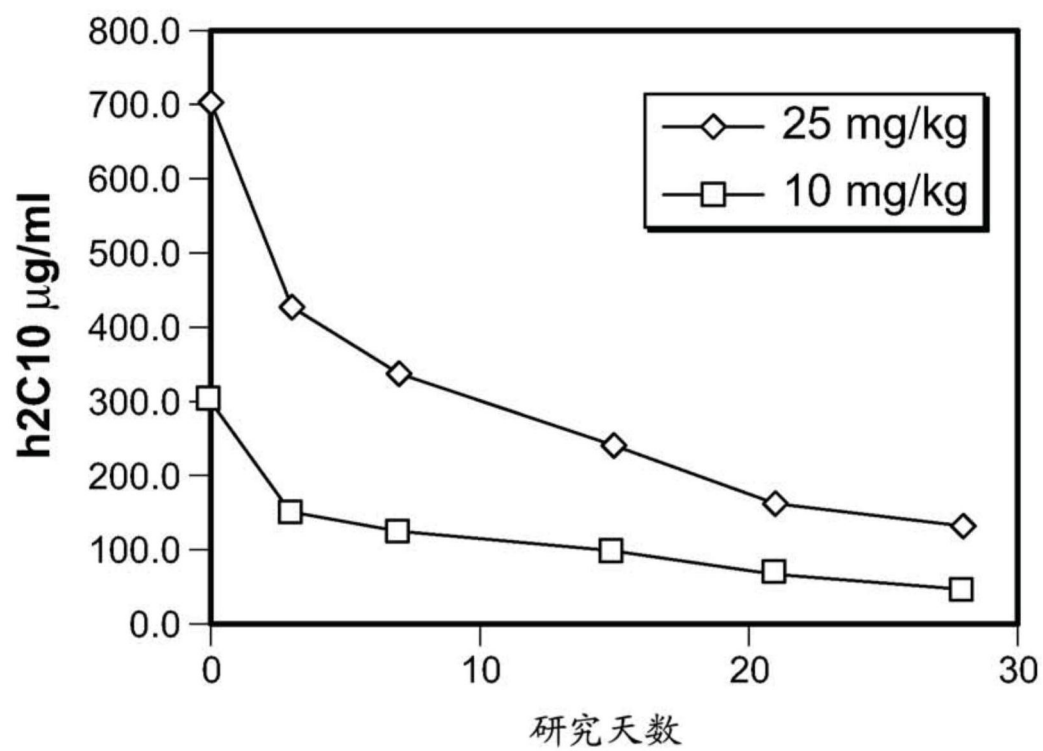


图20

重链序列

```
1  atggactgga cctggaggat tctctttttg gtggcagcag ccacaggtgc
   M D W T W R I L F L V A A A T G

51  ccactcccaa gtgcagcttg tccagtccgg agccgaggtg aaaaagcccg
   A H S Q V Q L V Q S G A E V K K P

101 gtgcctcagt aaaggtctcc tgcaaggcct ctggctatac tttcaccaat
   G A S V K V S C K A S G Y T F T N

151 tattggatgc actgggtgag gcaggctccc ggacagcgcc tcgaatggat
   Y W M H W V R Q A P G Q R L E W

201 cggttatatc aacccatcta acgattacac caaatacaat cagaaattca
   I G Y I N P S N D Y T K Y N Q K F

251 aggaccgggc cacactgaca gctgataaaa gcgctaacac agcttacatg
   K D R A T L T A D K S A N T A Y M

301 gaacttagct ctctgcgaag cgaggatacc gctgtatact actgcgcaag
   E L S S L R S E D T A V Y Y C A

351 gcagggcttt ccttactggg ggcagggcac tctcgttact gtgagtagtg
   R Q G F P Y W G Q G T L V T V S S

401 ctagcaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc
   A S T K G P S V F P L A P C S R S

451 acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc
   T S E S T A A L G C L V K D Y F

501 cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcggtg
   P E P V T V S W N S G A L T S G V

551 acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc
   H T F P A V L Q S S G L Y S L S S

601 gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acgaagacct acacctgcaa
   V V T V P S S S L G T K T Y T C
```

图21a

```

651  cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagtcca
    N V D H K P S N T K V D K R V E S
701  aatatggtcc cccatgcccc ccatgcccag cacctgagtt cctgggggga
    K Y G P P C P P C P A P E F L G G
751  ccatcagtct tcctgttccc cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc
    P S V F L F P P K P K D T L M I
801  ccggacccct gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc caggaagacc
    S R T P E V T C V V V D V S Q E D
851  ccgaggtcca gttcaactgg tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc
    P E V Q F N W Y V D G V E V H N A
901  aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac agcacgtacc gtgtggtcag
    K T K P R E E Q F N S T Y R V V
951  cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt
    S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
1001 gcaaggtctc caacaaaggc ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc
    C K V S N K G L P S S I E K T I S
1051 aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacaccc tgcccccatc
    K A K G Q P R E P Q V Y T L P P
1101 ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag
    S Q E E M T K N Q V S L T C L V K
1151 gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg
    G F Y P S D I A V E W E S N G Q P
1201 gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt
    E N N Y K T T P P V L D S D G S
1251 cttcctctac agcaggctca ccgaggacaa gagcaggtag caggagggga
    F F L Y S R L T V D K S R W Q E G
1301 atgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca
    N V F S C S V M H E A L H N H Y T
1351 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga
    Q K S L S L S P G K -

```

图21a(续)

轻链序列

```
1  atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga
   M E A P A Q L L F L L L L W L P
51  taccaccgga gagattgtgc tgactcagtc accagcaaca ctgagtctct
   D T T G E I V L T Q S P A T L S L
101 ctcccggcga gcgtgctaca ctgtcctggt ccgcaagcag ctcagtgtcc
   S P G E R A T L S C S A S S S V S
151 tacatgcact ggtatcagca aaagcccggc caggccccca gacggtggat
   Y M H W Y Q Q K P G Q A P R R W
201 ctatgacaca tccaagttgg cttccggcgt ccccgcacgg ttttcaggct
   I Y D T S K L A S G V P A R F S G
251 caggaagcgg tactgattac actttgacca ttagctctct tgaacctgag
   S G S G T D Y T L T I S S L E P E
301 gacttcgcag tatactactg ccaccagctg agttccgatc cttttacctt
   D F A V Y Y C H Q L S S D P F T
351 tgggtggtggt actaaggctcg agatcaaacg tacggtggct gcaccatctg
   F G G G T K V E I K R T V A A P S
401 tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct
   V F I F P P S D E Q L K S G T A S
451 gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg
   V V C L L N N F Y P R E A K V Q
501 gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag
   W K V D N A L Q S G N S Q E S V T
551 agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg
   E Q D S K D S T Y S L S S T L T L
601 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca
   S K A D Y E K H K V Y A C E V T
651 tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt
   H Q G L S S P V T K S F N R G E C
701 ag
   -
```

图21b