



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114671952 A

(43) 申请公布日 2022.06.28

(21) 申请号 202210146798.5

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2016.07.13

C07K 16/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/192,269 2015.07.14 US

62/197,966 2015.07.28 US

62/277,201 2016.01.11 US

(62) 分案原申请数据

201680053004.3 2016.07.13

(71) 申请人 里姆蒙埃克斯特股份有限公司

地址 美国新罕布什尔州

(72) 发明人 J·罗思坦 R·G·E·霍尔盖特

A·赫恩

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理人 封新琴

权利要求书1页 说明书40页

序列表20页 附图15页

(54) 发明名称

具有改善的结合、功能和安全性特征的抗CD154抗体及其在人免疫治疗中的用途

(57) 摘要

本文提供改善的抗-CD154抗体，其具有改善的治疗效能、体内半衰期和消除的FcR结合和/或补体结合/活化。本文公开了这些抗体用于诱导耐受性和治疗免疫疾病(其包括自身免疫性、炎症、移植受体、纤维化和过敏性病症)的用途。

重链

以粗体显示可变区
以黄色高亮的CDR
在亲和力成熟突变的残基下划线
以红色显示Fc突变(E→R和K→A)

EVQLQESGPG 20 30 40 50 60
LVKPSETL^SL TCTVSGDSIT NGFWIWIWIRKP PGNKLEYMGY ISYSGSTYYN
PSLKSRIIS 70 80 90 100 110 120
RDTSKNQFSL KLSSVTAADT G^YVYCA^RSY GRTPYYFD^EW GQGTTLT^AV
ASTKGPSVFP 130 140 150 160 170 180
LAPSSKST^GG GTAALGCLVK DYFPPEPVTVS WNSGALTSGV HTFP^AVLQSS
GLYSLSVVVT 190 200 210 220 230 240
VPSSSLGTQT YICNVNHRPS NTKVDKKAEP KSCDKTHTC^P PCPAPELLGG
PSVFLFPPK^P 250 260 270 280 290 300
KD^ALMISRT^P EVTCVVVDVS HRDPEVKFNW YVDGVEVHN^A KTKPREEQYN
STYRVVSVL^T 310 320 330 340 350 360
VLHQDWLN^GK EYKCAVSNKA LPAPIERT^IS KAKGQP^REPQ VYTLPPSR^DE
LTKNQVSLTC 370 380 390 400 410 420
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTT^PPV LDSDGSFFLY SKLTV^ADKSRW
QQGNVFSCSV 430 440 450
MHEALHNHYT QKSLSSLSPGK

1. 一种人源化的抗人CD154抗体，其包含(i)可变重链多肽，其包含具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:15、17和18的序列的多肽，或由具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:15、17和18的序列的多肽组成，和(ii)可变轻链多肽，其包含具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30和31的序列的多肽，或由具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30和31的序列的多肽组成，条件是所述人源化的抗人CD154抗体不包含SEQ ID NO:15的可变重链多肽和SEQ ID NO:20的可变轻链多肽。

2. 一种人源化的抗人CD154抗体，其包含(i)可变重链多肽，其包含具有如图1A-C所示的SEQ ID NO:1的序列的多肽，或由具有如图1A-C所示的SEQ ID NO:1的序列的多肽组成，和(ii)可变轻链多肽，其包含具有图1A-C所示的SEQ ID NO:2的序列的多肽，或由具有图1A-C所示的SEQ ID NO:2的序列的多肽组成。

3. 权利要求1或2的抗人CD154抗体，其包含IgG1、IG2、IgG3或IgG4恒定区，所述恒定区缺乏结合C1Q和与Fc γ R2和/或Fc γ R3结合的能力。

4. 权利要求1或2的抗人CD154抗体，其包含人IgG1恒定区，所述恒定区缺乏结合C1Q和与FcR γ 2和/或FcR γ 3结合的能力。

5. 权利要求4的人源化的抗人CD154抗体，其中，所述人IgG1恒定区包含E269R和K322A突变(根据Kabat编号)。

6. 权利要求1-5中任一项的人源化的抗人CD154抗体，其包含图1A-C所示的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:2的IgG1轻链和重链恒定区。

7. 权利要求1-6中任一项的人源化的抗人CD154抗体，其中，所述抗体是IgG1同种型，并且使所述抗体的Fc区进一步突变以引入影响效应器功能的至少一个其他突变，如损害FcRn结合的突变，损害或消除糖基化的突变，或损害抗体结合FcR如Fc γ R2或Fc γ R3或另一个FcR的能力或损害与补体结合的能力的另一个突变。

8. 权利要求1-7中任一项的人源化的抗人CD154抗体，其中，所述抗体是IgG1同种型，并且使所述抗体的Fc区突变以进一步引入E233P和/或D265A突变或表1、2或3中鉴定的任意Fc突变。

9. 权利要求1-8中任一项的人源化的抗人CD154抗体，其中，所述抗体是IgG1同种型，并且使所述抗体的Fc区突变以引入E233P突变。

10. 权利要求1-9中任一项的人源化的抗人CD154抗体，其中，使所述抗体的Fc区进一步突变以引入一个或多个改善体内半衰期的其他突变。

具有改善的结合、功能和安全性特征的抗CD154抗体及其在人免疫治疗中的用途

[0001] 本申请是申请日为2016年7月13日、申请号为201680053004.3、发明名称为“具有改善的结合、功能和安全性特征的抗CD154抗体及其在人免疫治疗中的用途”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 1. 背景

[0003] 相关申请

[0004] 本发明要求2015年7月14日提交的美国临时申请系列号62/192,269;2015年7月28日提交的美国临时申请系列号62/197,966;和2016年1月11日提交的美国临时申请系列号62/277,201的优先权。这些临时申请的每个的内容通过提述以其整体并入。

[0005] 发明的领域

[0006] 本发明涉及具有减小的毒性和功能特性的改善的抗CD154 (CD154) 抗体及它们在免疫治疗,尤其是炎性病症、过敏、自身免疫、移植和癌症的治疗中的用途。特别地,本发明提供具有改善的亲和力和功能活性的高亲和力抗CD154抗体,其在体内不引起血栓形成和凝固反应,并且其引起希望的治疗特性,如诱导免疫耐受性和阻断体液免疫。

[0007] 发明的领域

[0008] 本发明涉及具有减小的毒性和功能特性的改善的抗CD154 (CD154) 抗体及它们在免疫治疗,尤其是炎性病症、过敏、自身免疫、移植和癌症的治疗中的用途。特别地,本发明提供具有改善的亲和力和功能活性的高亲和力抗CD154抗体,其在体内不引起血栓形成或凝血反应,并且其引起希望的治疗特性,如诱导免疫耐受性和阻断体液免疫。

[0009] 相关技术的说明

[0010] CD40L (CD154) 在小鼠、非人灵长目动物 (NHP) 和人的自身免疫、移植排斥和其他免疫相关的疾病中是高度有效和有价值的治疗靶标。在很多II期临床试验中,显示 α CD154 在体内有效地阻断CD154的活性并且改善疾病。 α CD154在其对免疫反应的影响方面不同于所有其他治疗;它是可诱导功能免疫耐受性的仅有治疗之一,如在小鼠和猴子中所证明的。在小鼠中,实际上所有自身免疫性疾病模型可使用 α CD154治疗有效地改善 (Noelle, R.J., Mackey, M., Foy, T., Buhmann, J. and Burns, C., "CD40 and its ligand in autoimmunity". Ann N Y Acad Sci 1997.815:384-391; Mackey, M.F., Barth, R.J., Jr. and Noelle, R.J., "The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells", J Leukoc Biol 1998.63:418-428; Noelle, R.J., "CD40 and its ligand in cell-mediated immunity". Agents Actions Suppl 1998.49:17-22; 和 Quezada, S.A., Jarvinen, L.Z., Lind, E.F. and Noelle, R.J., "CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity". Annu Rev Immunol 2004.22:307-328), 观察到长期缓解。

[0011] 在NHP中,使用由 α CD154组成的短程治疗可获得永久异体移植耐受性 (Kenyon, N.S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J.L., Kirk, A.D., Harlan, D.M., Burkly, L.C. and Ricordi, C., "Long-term survival and function

of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154". Proc Natl Acad Sci., USA 1999.96:8132-8137; Kirk,A.D., Burkly,L.C., Batty,D.S., Baumgartner,R.E., Berning,J.D., Buchanan,K., Fechner,J.H., Jr., Germond,R.L., Kampen,R.L., Patterson,N.B., Swanson,S.J., Tadaki,D.K., TenHoor,C.N., White,L., Knechtle,S.J. and Harlan,D.M., "Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates". Nat Med 1999.5:686-693)。

[0012] 并且,人的II期临床试验表明 α CD154在SLE、多发性硬化症(见初步数据)和特发性血小板减少(Sidiropoulos,P.I. and Boumpas,D.T., "Lessons learned from anti-CD154 treatment in systemic lupus erythematosus patients", Lupus 2004.13:391-397)中是有效的(Sidiropoulos,P.I. and Boumpas,D.T., "Lessons learned from anti-CD154 treatment in systemic lupus erythematosus patients", Lupus 2004.13:391-397)。因此, α CD154是独特的药物,其允许具有长期临床益处的短期干预。它的失败不在于功效,而是由于未预料到的毒性。

[0013] 在二十世纪90年代早期艾迪制药和百健公司 (IDEC Pharmaceuticals and Biogen Inc.) (现在的Biogen Idec)推出了两个不同的 α CD154单克隆抗体进入多个I/II期临床试验。由IDEC (IDEC-131) 开发的抗体是在达特茅斯学院 (Dartmouth College) 开发的源自鼠抗人CD154抗体的人源化的IgG1。该抗体和人源化的变体在美国专利6,001,358;6,440,418;6,506,383;7,074,406;和7,122,187中公开,其内容通过提述全部并入本文。虽然早期适应症证明药物是高度有效的,但是另外的抗CD154的毒性阻滞了持续的临床开发。在该实验中,观察到的毒性包括诱导患者的血栓栓塞事件。基于毒性问题,暂停所有实验,并且致力于重新改造mAb以维持功效并减小毒性。

[0014] 虽然已经实现了减小的毒性,但是 α CD154 mAb的功效和耐受诱导能力已经显著降低(Farrant,J.L., Benjamin,C.D., Cutler,A.H., Kalled,S.L., Hsu,Y.M., Garber,E.A., Hess,D.M., Shapiro,R.I., Kenyon,N.S., Harlan,D.M., Kirk,A.D., Burkly,L.C. and Taylor,F.R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge". Int Immunol 2004.16:1583-1594)。

[0015] 百健艾迪公司(Biogen-Idec) 和UCB最近报道了据报道安全性改善的抗CD154抗体的开发。特别地,他们报道了产生长效抗人CD154 Fab,称为CDP-7657或鲁利单抗(ruplizumab)。因为Fab通常具有非常短的体内半衰期(即,约4-8小时),该Fab是为了改善其药代动力学特性。然而,虽然据报道临幊上有效,但是该抗体据报道表现出低的功效。并且,百时美施贵宝公司(Bristol Meyers Squib)报道了包含对CD154的特异性的结构域抗体-Fc融合蛋白的开发。据报道,该融合蛋白显示出在小鼠疾病模型特别是KLH激发模型和NZB×NZW SLE(狼疮)模型中的功效。

[0016] 尽管如此,在本领域中对改善的CD154抗体(即,是安全和有效的并且包含良好的功效和药代动力学特性的那些)仍然有重要的需要。本发明实现了这些目标。

[0017] 附图的详细说明

[0018] 图1A-1C含有本发明的抗CD154抗体的氨基酸序列,其衍生自IDEC-131。在图中,重

链和轻链多肽中的可变区残基以粗体显示,CDR以黄色高亮,并且在亲和力成熟突变残基下划线,并且Fc突变(E→R和K→A)以红色显示并在其下划线。

[0019] 图2A-2C比对不同的经修饰的IgG1恒定区和衍生自IDE-C-131和母鼠抗体的经修饰的轻链和重链序列。

[0020] 图3含有对于它们结合CD154表达Jurkat细胞的能力比较本发明人源化的抗人CD154抗体(在图中和在本申请中称为“INX021”)与IDE-C-131的结合的BIAcore结合测试的结果。如图所示,与IDE-C-131比较,本发明的抗体对CD154具有增加约5倍的结合亲和力。

[0021] 图4含有显示本发明的抗体(“INX021”)比IDE-C-131更加强有力地驱动T细胞CD154驱动的B细胞活化的实验结果。

[0022] 图5含有显示与INX021(K322A和E269R)含有相同突变的人IgG抗鼠CD154的FcR突变体在皮肤耐受性模型中诱导耐受性的实验结果。

[0023] 图6含有显示INX021的免疫复合物在体外没有诱导鼠或人血小板的聚集或活化的实验结果。

[0024] 图7A-7D含有显示与阳性对照抗体比较,INX021没有引起血小板活化或对血小板的其他影响的实验结果。图7A显示其不引起血栓性应激,图7B显示其不引起血小板聚集或凝集,如通过没有观察到的肺栓塞证明的,图7C显示其不影响循环血小板的数量,和图7D总结了在Fc γ RIIa Tg小鼠中观察到的该抗体的明显的优点。

[0025] 图8A和8B显示了减少或消除FcR结合和补体活性(包含在INX021中的E2669R和K322A突变)的含有Fc突变的抗鼠CD154 IgG1抗体在动物模型中是免疫抑制的。图8A显示了含有这些突变的抗CD154抗体抑制EAE,和图8B显示了含有这些突变的抗CD154抗体抑制体液免疫并在对髓磷脂/少突胶质细胞糖蛋白(“MOG”)的应答中诱导耐受性。

[0026] 图9比较了包括INX021的IDE-C-131的不同抗体变体对基于CD86表达的T细胞诱导的B细胞活化的作用。其作用是可变的,指示了增加的结合亲和力与更好的功效即免疫抑制活性没有必要相关。

[0027] 图10A和10B比较了在KLH测定中INX021和嵌合5c8抗体对产生IgG和IgM抗体的影响。图10A比较了它们对IgG的影响,和图10B比较了它们对IgM的影响。

[0028] 图11A和11B比较了运载体、INX021和5c8抗体对生发中心得分的影响。图11A显示发生得分比较,和图11B含有比较在经治疗的动物的脾脏和淋巴结(LN)中发生中心的数量和细胞性的程度的投影图。

[0029] 图12总结了观察到的与另外的抗CD154抗体公布的结果的损伤频率(Biogen/UCB的长效αCD154 Fab)。

[0030] 本发明的目的

[0031] 本发明的目的是提供具有改善的功效、安全性和药代动力学的抗CD154抗体及其在人治疗中的应用。

[0032] 更具体地,本发明的目的是提供人源化的抗人CD154抗体,其包含(i)可变重链多肽,其包含具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:15、17和18的序列的多肽,或由具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:15、17和18的序列的多肽组成,和(ii)可变轻链多肽,其包含具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30和31的序列的多肽,或由具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30和31的序列

的多肽组成,条件是所述人源化的抗人CD154抗体不包含SEQ ID NO:15的可变重链多肽和SEQ ID NO:20的可变轻链多肽。

[0033] 并且,本发明的目的是提供人源化的抗人CD154抗体,其包含(i)可变重链多肽,其包含具有如图1A-C所示的SEQ ID NO:1的序列的多肽,或由具有如图1A-C所示的SEQ ID NO:1的序列的多肽组成,和(ii)可变轻链多肽,其包含具有图1A-C所示的SEQ ID NO:2的序列的多肽,或由具有图1A-C所示的SEQ ID NO:2的序列的多肽组成。

[0034] 并且,本发明的目的是提供如前3段中所述的抗人CD154抗体,其包含IgG1、IG2、IgG3或IgG4恒定区,所述恒定区缺乏结合C1Q和与Fc γ R2和/或Fc γ R3结合的能力。

[0035] 并且,本发明的目的是提供如前4段中所述的抗人CD154抗体,其包含人IgG1恒定区,所述恒定区缺乏结合C1Q和与FcR γ 2和/或FcR γ 3结合的能力。

[0036] 并且,本发明的目的是提供如前5段中所述的抗人CD154抗体,其包含人IgG1恒定区,其包含E269R和K322A突变(根据Kabat编号)。

[0037] 并且,本发明的目的是提供根据先前段落中任一段的人源化的抗人CD154抗体,其包含图1A-C所示的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:2的IgG1轻链和重链恒定区。

[0038] 并且,本发明的目的是提供根据先前段落中任一段的人源化的抗人CD154抗体,其中,所述抗体是IgG1同种型,并且使所述抗体的Fc区进一步突变以引入影响效应器功能的至少一个其他突变,如损害FcRn结合的突变,损害或消除糖基化的突变,或损害抗体结合FcR如Fc γ R2或Fc γ R3或另一个FcR的能力或损害与补体结合的能力的另一个突变。

[0039] 并且,本发明的目的是提供根据先前段落中任一段的人源化的抗人CD154抗体,其中,所述抗体是IgG1同种型,并且使所述抗体的Fc区突变以进一步引入E233P和/或D265A突变或表1、2或3中鉴定的任意Fc突变。

[0040] 并且,本发明的目的是提供根据先前段落中任一段的人源化的抗人CD154抗体,其中,所述抗体是IgG1同种型,并且使所述抗体的Fc区突变以诱导E233P突变。

[0041] 并且,本发明的目的是提供根据先前段落中任一段的人源化的抗人CD154抗体,其中,使所述抗体的Fc区进一步突变以引入一个或多个改善体内半衰期的其他突变。

[0042] 并且,本发明的目的是提供一种药物组合物,其包含治疗或预防有效量的至少一个根据先前段落中任一段的人源化的人源化的抗人CD154抗体。

[0043] 并且,本发明的目的是提供一种药物组合物,其包含治疗或预防有效量的至少一个根据先前段落中任一段的人源化的人源化的抗人CD154抗体,其进一步包含抗原、细胞、组织或器官。

[0044] 并且,本发明的目的是提供一种药物组合物,其包含治疗或预防有效量的至少一个根据先前段落中任一段的人源化的人源化的抗人CD154抗体,其进一步包含自身抗原、变应原、炎性剂、药物或非HLA匹配的(同种)或异种(非人)供体细胞。

[0045] 并且,本发明的目的是提供一种使用根据先前段落中任一段的抗体或组合物的免疫抑制或免疫治疗方法。

[0046] 并且,本发明的目的是提供一种通过施用根据先前段落中任一段的抗体或组合物来治疗患有过敏性、炎性或自身免疫性病症的受试者或移植受体的方法。

[0047] 并且,本发明的目的是提供一种在移植可任选地经遗传改造的供体组织、器官或细胞之前、同时或之后通过施用根据先前段落中任一段的抗体或组合物来治疗或预防受试

者中的GVHD的方法。例如,CAR-T(嵌合抗原受体T细胞)或NK(天然杀伤)细胞。

[0048] 并且,本发明的目的是提供一种通过施用根据先前段落中任一段的抗体或组合物来引出耐受性或延长的抗原特异性免疫抑制的方法。

[0049] 并且,本发明的目的是提供一种基因、细胞、组织或器官治疗的方法,其包括施用根据先前段落中任一段的抗体或组合物。

[0050] 并且,本发明的目的是提供一种通过施用根据先前段落中任一段的抗体或组合物来治疗选自以下状况的方法:银屑病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、卵巢炎、狼疮或SLE、糖尿病、IBD、克罗恩病(Crohn's disease)、ITP、甲状腺炎、类风湿性关节炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮、格雷夫斯病(Graves' disease)、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、糖尿病、炎性肠病、克罗恩病、多发性硬化症、银屑病、药物诱导的自身免疫性疾病或药物诱导的狼疮。

[0051] 并且,本发明的目的是提供一种治疗用于在细胞治疗或器官或骨髓移植中使用的骨髓、器官或免疫细胞的方法,其包括与根据先前段落中任一段的抗体或组合物一起培养所述骨髓、器官、组织或免疫细胞,例如,其中经中资料的骨髓、组织、器官或免疫细胞包含供体和/或受体T细胞。

[0052] 并且,本发明的目的是提供一种在有此需要的患者中诱导耐受性而不引起血栓形成事件的方法,其包括向患者施用有效量的根据先前段落中任一段的抗体或组合物,其任选地进一步包括施用抗原例如自身抗原、变应原、炎性剂、药物或非HLA匹配的(同种)供体细胞。

[0053] 并且,本发明的目的是提供一种在会接受或已经接受移植的细胞、器官或组织的患者中诱导耐受性、延长的免疫或T或B细胞抑制的方法,例如,其中所述药物是生物的,如治疗抗体、受体、融合蛋白、激素、生长因子或细胞因子。

[0054] 并且,本发明的目的是提供一种通过施用有效量的根据先前段落中任一段的抗体或组合物来治疗T细胞介导的自身免疫性疾病的方法。

[0055] 并且,本发明的目的是提供一种通过使用有效量的根据先前段落中任一项的抗体或组合物来治疗B细胞介导的自身免疫性疾病的方法。

[0056] 并且,本发明的目的是提供一种通过施用有效量的根据先前段落中任一段的抗体或组合物来治疗选自以下的自身免疫性疾病的方法:类风湿性关节炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮、格雷夫斯病、亨廷顿病、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、糖尿病、帕金森病、银屑病、艾迪生病(Addison's disease)、多发性硬化症、狼疮和药物诱导的自身免疫性疾病,例如药物诱导的狼疮。

[0057] 并且,本发明的目的是提供一种根据先前段落中任一段的治疗的方法,其包括施用抗原。

[0058] 并且,本发明的目的是提供一种通过施用有效量的根据先前段落中任一段的抗体或组合物来治疗或预防GVHD、骨髓移植(BMT)、多发性硬化症、狼疮、ITP、类风湿性关节炎、哮喘、IBD或另一种炎性肠病的方法。

[0059] 并且,本发明的目的是提供一种治疗全部或部分由CD40信号介导的人状况、病症或疾病,或前述任一项的症状的方法,所述方法包括施用有效量的根据先前段落中任一段的抗体或组合物,例如,其中所述人状况、病症或疾病是炎症、过敏性或自身免疫性反应或

纤维化,或所述人状况、病症或疾病选自狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、脊柱关节炎、药物诱导的红斑狼疮、炎性肠病、克罗恩病、银屑病和多发性硬化症,或所述人状况、病症或疾病选自过敏性接触性皮炎、普秃、类过敏性紫癜性哮喘、重度哮喘、代谢性哮喘、过敏性哮喘、特应性皮炎、疱疹样皮炎、持久隆起性红斑、边缘性红斑、多样性红斑;结节性红斑、过敏性肉芽肿、环状肉芽肿、粒细胞减少、超敏性肺炎、角膜炎、肾病综合征、重叠综合征、养鸽者病、特发性多神经炎、荨麻疹、葡萄膜炎、青少年型皮肌炎和白斑,或所述人状况、病症或疾病选自过敏性支气管肺曲霉病;自身免疫性溶血性贫血;黑棘皮病;过敏性接触性皮炎;艾迪生病;特应性皮炎;斑秃;普秃;淀粉样变性;类过敏性紫癜;类过敏性反应;再生障碍性贫血;血管性水肿,遗传性;血管性水肿,特发性;强直性脊柱炎;动脉炎,颅;动脉炎,巨细胞;动脉炎,Takayasu的;动脉炎,颞;哮喘;共济失调-毛细血管扩张;自身免疫性卵巢炎;自身免疫性睾丸炎;自身免疫性多内分泌腺衰竭;贝塞特病(Behçet's disease);贝格尔病(Berger's disease);伯格病(Buerger's disease);大疱性天疱疮;念珠菌病,慢性粘膜皮肤;卡普兰综合征(Caplan's syndrome);心肌梗塞后综合征;心包切开后综合征;心肌炎;乳糜泻;恰加斯病(Chagas's disease);Chédiak-Higashi综合征;Churg-Strauss病;寇甘综合征(Cogan's syndrome);冷凝集素病;肢端硬皮综合征(crest syndrome);克罗恩病;冷球蛋白血症;隐源性纤维化肺泡炎;疱疹样皮炎;皮肌炎;糖尿病;Diamond-Blackfan综合征;迪格奥尔格综合征(DiGeorge syndrome);盘状红斑狼疮;嗜酸性细胞性筋膜炎;巩膜外层炎;持久隆起性红斑;边缘性红斑;多样性红斑;结节性红斑;家族性地中海热;费尔蒂综合征(Felty's syndrome);肺纤维化;肾小球肾炎,类过敏性;肾小球肾炎,自身免疫性;肾小球肾炎,链球菌感染后;肾小球肾炎,移植后;肾小球病,膜性;古德帕斯丘综合征(Goodpasture's syndrome);移植植物抗宿主病;粒细胞减少,免疫介导的;环状肉芽肿;肉芽肿病,过敏性;肉芽肿性肌炎;格雷夫斯病(grave's disease);桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis);新生儿溶血病;血色素沉着病,特发性;Henoch-Schönlein紫癜;肝炎,慢性活动性和慢性进行性;组织细胞增多症x;高嗜酸粒细胞综合征;特发性血小板减少性紫癜;约伯综合征(job's syndrome);青少年型皮肌炎;青少年型类风湿性关节炎(青少年型慢性关节炎);川崎病(Kawasaki's disease);角膜炎;干燥性角膜结膜炎;Landry-Guillain-Barre-Strohl综合征;麻风,瘤型;吕弗勒综合征(Loeffler's syndrome);莱尔综合征(Lyell's syndrome);莱姆病;淋巴瘤样肉芽肿病;肥大细胞增多症,系统性;混合性结缔组织病;多发性单神经炎;Muckle-Wells综合征;皮肤粘膜淋巴结综合征;皮肤粘膜淋巴结综合征;多中心网状组织细胞增多症;多发性硬化症;重症肌无力;蕈样肉芽肿病(mycosis fungoides);坏死性脉管炎,系统性;肾病综合征;重叠综合征;脂膜炎;阵发性冷性血红蛋白尿症;阵发性夜间血红蛋白尿症;类天疱疮;天疱疮;红斑型天疱疮;落叶型天疱疮;寻常型天疱疮;养鸽者病;肺炎,超敏性;结节性多动脉炎;风湿性多肌痛;多肌炎;多神经炎,特发性;葡萄牙家族性多神经病变;先兆子痫/子痫;原发性胆汁性肝硬化;进行性系统性硬化症(硬皮病);银屑病;银屑病性关节炎;肺泡蛋白沉积症;肺纤维化,雷诺现象/综合征(Raynaud's phenomenon/syndrome);里德尔甲状腺炎(Reidel's thyroiditis);瑞特综合征(Reiter's syndrome),复发性多软骨炎;风湿热;类风湿性关节炎;结节病;巩膜炎;硬化性胆管炎;血清病;塞扎里综合征(Sézary syndrome);舍格伦综合征(Sjögren's syndrome);Stevens-Johnson综合征;斯蒂尔病(Still's disease);亚急性硬化性全脑炎;

交感性眼炎；系统性红斑狼疮；移植排斥；溃疡性结肠炎；未分化结缔组织病；荨麻疹，慢性；荨麻疹，寒冷致；葡萄膜炎；白斑；Weber-Christian病；韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)；和Wiskott-Aldrich综合征。

[0060] 发明详述

[0061] 在详细公开本发明之前，提供以下定义。除非另有定义，否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员之一通常理解的相同的含义。

[0062] 如本文所使用的关于本发明的术语“抗体”包括分离、重组或合成抗体，抗体缀合物或抗体衍生物。术语“抗体”经常试图包括抗体片段，其包括抗原结合片段，除非另有指示或通过上下文理解。抗原结合片段为特异性结合与完整抗体竞争。一般可见，基础免疫学，第7章(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))。可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶或化学切割产生抗原结合片段。在一些实施方式中，抗原结合片段包括Fab、F(ab)₂、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、Fd、Fv、结构域抗体(dAb)、其他单价和二价片段、互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如，scFv、scFab和scFabδC)、嵌合抗体、双抗体、三链抗体、微抗体、纳米抗体和含有至少一部分足以赋予多肽特异性抗原结合的抗体的多肽；以及前述的融合体和衍生物。见，例如，Holliger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136 (2005) and Hust et al., BMC Biotech 7:14 (2007)。

[0063] 除非另有说明或通过上下文中另有暗示的地方，否则本发明的“抗体”包括全抗体及其任意抗原结合片段、可含有一个或多个修饰(例如，氨基酸插入、删除、取代、修饰后翻译或其缺失等)的抗体衍生物或变体，其包括抗体缀合物(即，与功能部分缀合或相关的抗体或其抗原结合片段)。抗体衍生物(包括抗体缀合物)可基于或可包含特异性结合CD154的本发明的抗原结合片段。此外，前述抗体实施方式可为鼠、仓鼠、山羊、兔、嵌合的、人源化的或全人抗体、片段、衍生物或缀合物。应该理解的是在本发明的某些方面，术语“抗体”可排除上述列举的一个或多个抗体实施方式；这样的状况对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0064] 术语“效应器功能”指抗体的Fc或恒定区结合免疫系统的蛋白质和/或细胞的功能性能能力。具有减少的效应器功能的抗体和用于改造这样的抗体的方法是本领域中公知的(见，例如WO 05/18572、WO 05/03175和美国专利No. 6,242,195)并且在本文中进一步详细描述。一般的效应器功能包括集合补体蛋白(例如，补体蛋白C1q)，和/或Fc受体(FcR)(例如，Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIIa、Fc γ RIII和/或Fc γ RIIIb)的能力。能够结合一个或多个前述分子的功能性结果包括，但不限于，调理作用、吞噬作用、抗原依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或效应细胞调节。效应器功能的降低指至少部分通过Fc与其同源受体或与补体蛋白或效应细胞结合而诱导的一个或多个生物化学或细胞活性的降低，同时保持抗体(或其片段)的可变区的抗原结合活性，尽管具有减少的、类似的、相同的或增加的结合亲和力。本发明的特定抗体表现减少的效应器功能。效应器功能的降低，例如Fc与Fc受体或补体蛋白的结合，可用倍数减少(例如，减少1.5倍、2倍等)来表示，并且可基于例如使用本领域(见，例如，WO 05/18572)中已知的结合测定确定的结合活性的百分比减少来计算。

[0065] 除非通过上下文另有要求，否则单数术语应包括复数和复数，并且复数术语应包括单数。

[0066] 在整个说明书和权利要求书中，单词“包含 (comprise)”或变体如“包含 (comprises)”或“包含 (comprising)”应该被理解为包含所述整数或整数的组，但是不排除任何其他整数或整数的组。

[0067] 术语“CD154”指在活化的T细胞上表达的配体。通过本领域中的一些其他名称，如CD40配体(CD40L)、CD40反受体(CD40CR)、gp39、T-BAM、T-细胞活化分子、TRAF、TNF-相关的活化蛋白(TRAP)和肿瘤坏死因子配体超家族成员5(TNFSF5)(Gauchat et al., 1993 FEBS Lett. 315: 259-266; Graf et al. 1992, Europ. J. Immun. 22: 3191-3194; Hollenbaugh et al., 1992 EMBO J. 11: 4313-4321)知道CD154。这些术语在整个申请中交替使用。本发明的CD154结合蛋白(包括抗体)与人CD154特异性结合，并且可交叉反应，因此与其他物种的CD154特异性结合。在某些实施方式中，本发明的CD154结合蛋白(包括抗体)与人CD154、鼠CD154或非人灵长目动物CD154特异性结合。

[0068] 术语“抗CD154抗体”还包括合成抗体或使用重组DNA技术生成的重组抗体，如，例如，通过噬菌体表达的抗体。术语“抗CD154抗体”还应该被解释为包括抗体，其通过合成编码抗体的DNA分子生成并且其DNA分子表达抗体蛋白，或指定抗体的氨基酸序列，其中使用本领域可获得并公知的合成DNA或氨基酸序列的技术获得DNA或氨基酸序列。

[0069] 本文的“消除或减少FcR结合和消除毒性的突变(Mutation或mutations)”指在体外和/或体内消除或减少血小板减少或血栓或凝血的突变(Mutation或mutations)。可经修饰以消除或减少FcR结合并影响(损害或增强)其他Fc效应器功能的不同人抗体类型(其包括人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)的Fc或恒定区中的位点是在本领域中公知的。在表1-3和以下实施例中鉴定了可在人IgG1 Fc或恒定区修饰的示例性突变。

[0070] 消除或减少补体功能并保持耐受诱导特性的突变(Mutation或mutations)指在含有人恒定区，优选人IgG1或IgG3恒定区的人、嵌合的或人源化的抗体中的突变，其中其Fc区在一个或多个位点已经突变，以消除或基本上减少补体结合。优选地，这样的突变不会明显地影响抗体在体内诱导耐受性的能力。这可使用适当的耐受性模型如皮肤移植模型建立。可经修饰以消除或减少补体结合并可影响(损害或增强)其他Fc效应器功能的不同人抗体类型(其包括人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)的Fc或恒定区中的位点是在本领域中公知的。在表1-3和以下实施例中鉴定了可在IgG1中修饰的示例性位点。

[0071] “患者”可意指人或非人动物，优选地为哺乳动物。在优选的实施方式中，本发明产生含有突变的IgG1或IgG3的适合于人治疗的抗人CD154抗体，其中这样的突变消除或基本上抑制图形或安全性问题，如血小板减少或血栓或凝血反应或与补体反应相关的毒性，并且优选地，其中这样的抗体保持在体内诱导耐受性或延长的体液抑制的能力。

[0072] 如本文所使用的，“受试者”指有机体或由此而来的细胞样品、组织样品或器官样品，其包括，例如，培养的细胞系、活组织检查、血液样品或含有细胞的液体样品。在许多情况下，受试者或由此而来的样品包含多种细胞类型。在一个实施方式中，该样品包括，例如，肿瘤和正常细胞的混合物。在一个实施方式中，样品包含至少10%、15%、20%、以及下列等等、90%或95%肿瘤细胞。该有机体可为动物，其包括但不限于，动物如牛、猪、小鼠、大鼠、鸡、猫、狗等，并且通常是哺乳动物，如人。

[0073] 与本发明无关的各种语法形式的术语“治疗”指预防(即化学预防)、治愈、翻转、减弱、减轻、减小、抑制或中止疾病状态、疾病进展、疾病成因剂(例如细菌或病毒)或其他异常

状况的有害作用。例如,治疗可涉及减轻疾病的症状(即不必要所有症状)或减弱疾病的进展。

[0074] “治疗或预防自身免疫”或“治疗或预防”另外的疾病状况,如癌症、感染、发炎、过敏、移植、抗宿主移植疾病和其他状况,其中抗CD154抗体可能具有如本文所使用的治疗益处,指部分或全部抑制、延迟或预防疾病的基站。在癌症的情况下,这意指治疗或抑制癌症转移;抑制、延迟或预防癌症的重现,包括癌症转移;或在哺乳动物例如人中预防(化学预防)癌症的繁盛或发展。另外,可实践本发明的方法用于治疗患有癌症的人类患者。然而,这也可能的是,该方法在治疗其他哺乳动物的癌症中也应该是有效的。在优选的实施方式中,使用本发明的抗体治疗自身免疫、过敏、发炎、移植、GVHD、骨髓移植(BMT),并诱导抗原特异性耐受性或延长的抗原特异性免疫抑制,特别是在有此需要的受试者中抑制T细胞和/或B细胞分化、活化和/或增殖。优选的适应症包括多发性硬化症、狼疮或SLE、ITP、IBD、克罗恩病、炎性肠病、克罗恩病、银屑病、葡萄膜炎、类风湿性关节炎、哮喘、GVHD、骨髓移植、糖尿病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、银屑病、细胞移植、组织移植、器官移植、骨髓移植、细胞和基因治疗、卵巢炎和甲状腺炎。

[0075] 如本文所使用的术语“治疗有效量”意图限定在治疗方案中治疗状况(例如自身免疫、过敏、发炎、GVHD或移植)或降低或消除免疫应答,特别是对抗抗原(如自身抗原,过敏原,发炎诱导剂,移植的细胞、组织或器官)或对抗药物(如生物的,例如治疗抗体,Ig融合蛋白、激素、生长因子或其他治疗蛋白或多肽)的T细胞或B细胞抗体应答必需的治疗的量。

[0076] 如本文所使用的术语“预防有效量”是意图限定治疗方案中预防状况或疾病的进展和症状(例如自身免疫,过敏,发炎,GVHD或抗移植、药物或排斥反应)必需的治疗的量,

[0077] 本发明提供了用于人治疗的改善的抗CD154抗体,其源自由艾迪制药(现在的Biogen IDEC)制造的人源化的抗体IDEc-131。IDEc-131是高亲和力抗体,在25°C通过BIAcore检测到,以151pm的K_D与人CD154结合。

[0078] IDEc131是源自鼠抗人CD154抗体(24-31)的人IgG1同种型的人源化的抗CD154抗体。在美国典型组织保藏中心(American Type Tissue Collection)保藏了可商购的分泌24-31的杂交瘤细胞系,并且保藏的细胞系由ATCC登录号HB1712指定。

[0079] 在美国专利No.6,001,358;6,440,418;6,506,383;7,074,406和7,122,187中公开了IDEc-131的序列及其在治疗多种过敏、自身免疫和发炎适应症以及用于抑制T和B细胞介导的免疫反应中的用途。基于其特性,包括其对T和B细胞免疫力的有效免疫抑制作用和高亲和力,将IDEc-131推进到人类临床试验中。特别地,IDEc-131已经用于由IDEc赞助的用于治疗2种自身免疫适应症即特发性血小板减少性紫癜(“ITP”)和缓解性/复发性多发性硬化(“RR-MS”的人类临床试验。当用IDEc-131的这些临床试验显示出一些临床疗效试验时(即使很早进行,患者相对较少),它们在报道了由Biogen开发的另外的IgG1抗人CD154抗体(也源自鼠抗人CD154抗体)(由哥伦比亚大学的Seth Lederman分离的鼠5c8抗体)在人类患者中引起有害作用之后被中止。特别地,当Biogen嵌合的5c8抗体用于临床试验时,导致了在临床试验中的一些患者中造成中风和死亡的有害的血栓形成事件(“TE”)。本发明将这些问题作为获得药代动力学相对IDEc-131的其他优点提出。

[0080] 相比之下,本发明提供了衍生自IDEc-131的人源化的变体抗人CD154抗体,像IDEc-131一样是人IgG1同种型。然而,其Fc区已经经工程改造以消除FcR结合和补体活性。

特别地,其恒定区经工程改造以含有E269R和K322A突变(其中,这些突变的残基根据Kabat抗体编号系统编号)。这些突变分别导致减少的Fc γ RIIa和C1q结合。特别地,所得经修饰的抗体具有受限的FcR/C1q结合,即其不与血小板上的FcR γ 2或与FcR γ 3结合,并且不结合或活化补体。相比之下,其与FcRn的结合不受影响。如上所公开的,并且由本文公开的实验数据支持,含有这些突变的抗CD154 IgG1抗体当在不同实验模型中测定时,在体外或体内对鼠或人血小板均不表现任何可检测的血栓形成前活性。

[0081] 并且,通过亲和力成熟进一步工程改造IDE-C-131的可变重链和轻链序列。进行亲和力成熟,希望增强所得抗人CD154抗体与IDE-C-131相比的结合亲和力,同时保持其所希望的免疫抑制特性。然而,该结果远未得到保证,因为如所提及的IDE-C-131已经对人CD154(161pm)具有强的结合亲和力,并且在不同模型(EAE,体液免疫抑制和同种特异性耐受性模型)中有效地免疫抑制。

[0082] 在许多实验和成功筛选方法之后,获得了突变的版本的IDE-C-131的可变重链和轻链,其产生相对于IDE-C-131具有改善的亲和力的人源化的抗体(包括INX021)。具体地,获得了INX021以及12个其他变体。评估这些人源化的变体,并且基于其有利的结合(对人CD154的亲和力比对IDE-C-131大 \geq 5倍)选择INX021作为用于人类治疗的主要候选物,并且与IDE-C-131比较和其他变体比较其还拥有更好的功能(免疫抑制)特性。

[0083] 如图1A-C(其含有本发明人源化的IgG1抗人CD154抗体的序列,INX021)所示,该抗体含有重链CDR3中的两个突变,轻链CDR1中的3个突变和轻链CDR3中的两个突变(与IDE-C-131比较)。因此,整个的7CDR残基是经修饰的。意想不到地如下所示,所得人源化的抗人CD154抗体以比亲本抗体大约5倍的亲和力与人CD154结合,如前所述其本身与人CD154以极高的亲和力结合。这是令人惊奇,因为即使单一的CDR修饰可对抗体结合亲和力具有剧烈的影响。并且不可预测已经相对高亲和力的抗体的亲和力是可改善的。

[0084] 该经修饰的人源化的抗体,当在不同体外和体内模型中测定时拥有非常有效的免疫抑制特性。具体地,INX021有效地抑制体液免疫,EAE,并且其诱导同种特异性耐受性或延长的抗原特异性T细胞无应答性。如下所示,相对于IDE-C-131,INX021引起T细胞CD154驱动的B细胞活化的更有效抑制。

[0085] 因此,本发明的抗体(与IDE-C-131比较):

[0086] (i) 拥有对人CD154比对IDE-C-131大5倍的结合亲和力,

[0087] (ii) 与IDE-C-131相比,其更有效地引起免疫抑制活性,

[0088] (iii) 像IDE-C-131一样,其抑制T和B(体液)免疫,例如其抑制EAE并且其诱导同种异体特异性耐受性,和

[0089] (iv) 与IDE-C-131相比,其表现出改善的安全性概况,因为Fc区的突变基本上减少FcR和C1q结合,并且因此其在体外或体内对鼠或人血小板均不表现任何可检测的血栓形成前活性。

[0090] 基于这些结合的特性,本发明的抗人CD154抗体很好地适用于人类治疗,因为其应该在患者中表现出增强的安全性概况,并且应该更有效,并且因此比IDE-C-131更有效。预计该抗体的增强的结合亲和力应该促进其经由皮下给药的施用。这对于其在治疗慢性人类适应症的潜在用途是有利的。

[0091] 并且,本发明的抗体因为其是完整的,即其包含全长IgG1,可向由Biogen/UCB开发

的聚乙二醇Fab和向由百时美施贵宝开发的CD154特异性抗体提供药代动力学和安全性的优点。

[0092] 另外,因为本发明的抗体拥有较高效力,这可进一步增强给药,因为有可能不太频繁地施用抗体。这是重要的,因为本发明的抗体的大多数申请是对于慢性人类自身免疫、过敏或炎性适应症的治疗,其中对于任何有效治疗方案会需要重复给药。特别地,本发明的抗体应该很好适合于治疗,其中B或T免疫抑制是治疗上所希望的。

[0093] 因此,在本申请中,申请人提供了用于人免疫治疗的新的和改善的人源化的抗人CD154抗体,其具有改善的亲和力和其他药代动力学特性,所述抗体不应该在人类患者中引起笃定,特别是这些抗体不应该在人类受试者中引起血小板凝集或血栓栓塞事件,并且此外,基于它们结合和活化补体的进一步能力,它们应该进一步介导ADCC或CDC介导的细胞毒性。如实施例中所示,本发明的抗体相对于IDE131和先前用于人类治疗的另外的CD154抗体拥有基本上改善的功能和药代动力学特性。因此,当用于人类治疗时,该抗体应该提供临床益处。

[0094] 当本发明的抗体INX021含有分别减少FcR γ 2和3结合以及C1q结合的两个突变时,进一步想象可引入Fc区的其他突变,这可进一步减少与其他Fc受体或补体的结合或改变其他效应器功能。其他可能的突变的实例是本领域中已知的,例如Shields RL,Namenuk AK, Hong K, et al., (“High resolution mapping of the binding site on Human IgG1 for Fc for Fc γ RI,Fc for Fc γ RII,Fc for Fc γ RIII, and FcRn”) 报道了IgG1变体的设计与对于Fc γ R的Fc的受损结合。(J Biol.Chem.2001;276:6591-604) 另外,US20070237767和US20100104564描述了Fc突变形成以消除FcR结合。并且,特异性Fc突变及其作用列于下表1-3。这些突变意图是示例性的,并且不是穷举已知促进或损害Fc效应器功能的其他突变及其组合,如FcR结合、补体结合、糖基化、ADCC活化、CDC活化、FcRN结合,等等。

[0095] 表1(来自Shields et al., “High resolution mapping of the binding site on Human IgG1 for Fc for Fc γ RI,Fc for Fc γ RII,Fc for Fc γ RIII, and FcRn”, J Biol Chem 2001;276:6591-604)

Fc突变	Fc γ RI	Fc γ RIIa	Fc γ RIIb	Fc γ RIIIa	FcRn
E233P	0.12	0.08	0.12	0.04	0.54
D265A	0.16	0.07	0.13	0.09	1.23
D265N		0.02	0.03	0.02	
D270N		0.03	0.05	0.04	
N297A	0.15	0.05	0.1	0.03	0.8
S298N		0.05	0.08	0.06	

[0096]

P329A	0.48	0.08	0.12	0.21	0.8
D270A	0.76	0.06	0.1	0.14	1.05

[0097]

表2(来自US20100104564)

Fc突变	FcγR I	FcγRIIa (H131)	FcγRIIa (R131)	FcγRII b	FcγRIIIa (V158)	FcγIIIa (F158)
[0099]	K326V	0.52	0.01	0.01	0.02	0.87
	V369R	0.79	0.01	0.02	0.03	0.93
	F405K	1.52	0.02	0.02	0.02	1.08
	L410P	1.27	0.01	0.01	0.01	0.99
	V427R	1.69	0.03	0.05	0.03	1.27
[0100]	表3(来自US20070237767)					

变体#	Fc突变	Fc γ RI	Fc γ RIIa	Fc γ RIIb	Fc γ RIIc	Fc γ IIIa	C1q	FcRn
113	L234N	0.1	0.19	2.05		0.49	1.18	1.06
744	G237M	0.07	0.14	0.57	0.66	0.1	1.8	1.74
88	S239F	0.28	0.02	0.33		0.1	0.95	0.85
826	V262E	1.03	0.16	0.92	36.47		2.85	9.27
76	V264F	0.43	0.05	0.22		0.06	1.87	1.07
143	V266T	0.28	0.1	0.16	0.18		1.21	0.53
228	S267N	0.72	0.08			0.27	3.18	0.85
148	E269R	0.07	0.07	0.13	0.06	0.05	1.15	0.72
779	N286E		0.07	0.38	0.37	0.01	0	2.12
858	N297R	0.01	0.01	0.01	0.06	0.01		0.45
80	T299A	0.01	0.1	0.56	72.84	0.06	2.31	0.82
870	R301D	0.87	0.11	0.06	0.04	0.03	1.58	0.5
84	N325L	0.42	0.04	1.46		0.03	2.18	0.91
161	N325E	1.34	0.09	0.05	0.03	<0.02	0.86	0.55
473	L328R	0.07	0.1	0.88	0.37	0.11	1.21	1.82

[0102] 基于安全性、功能性和药代动力学特性的这样的结合,可使用本发明人源化的抗人CD154 IgG1抗体治疗或预防状况,其中T和/或B细胞活性、分化和增殖的抑制是治疗上所希望的,如过敏、自身免疫、移植(同种异体或异种器官、细胞、组织移植),和炎性状况。其特定的非限制性实例通过示例的方式包括多发性硬化症、系统性红斑狼疮(SLE)、其他形式的狼疮、自身免疫性血小板减少(ITP)、肾移植、皮肤和胰岛移植、类风湿性关节炎、结节病、银屑病性关节炎、克罗恩病、炎性肠病、克罗恩病、COPD、哮喘、糖尿病、甲状腺炎、移植物抗宿主病、骨髓(BM)或造血干细胞移植和动脉粥样硬化。而且,包括INX021的这些变体的一些拥有增加的效力功效,其包括在体内引起耐受性的能力。

[0103] 如通过实验数据所证明的,包括INX021的本发明抗体的特别考虑的应用用于减轻或预防抗药物反应,特别是那些针对生物制剂和其他药物,如治疗抗体、融合蛋白、激素、生长因子、酶、肽、抗生素、抗病毒药等引起的。这可使这些药物能够被施用更长时间,可增加对药物作出反应的患者的数量,和/或可促进药物治疗的患者的功效。

[0104] 如本文所讨论的,已知人IgG1和其他人恒定区的Fc区中的其他位点涉及补体结合

和/或活化以及FcR结合。因此,所述突变是IgG1或IgG3或其他抗体的Fc区的适当突变的示例,其导致补体结合和FcR结合中的一个或两者的丢失。

[0105] 补体结合突变αCD154变体或其变体的耐受性诱导或延长的(T或B)免疫抑制作用可在单倍体错配的皮肤同种异体移植物存活的很好研究的模型中评价,其中通过施用αCD154和同种异体抗原来诱导长期耐受性。然而,其他耐受性模型可替换地用来评估αCD154补体缺陷型和/或FcR缺陷型变体(含有突变的Fc区)诱导耐受性的能力。

[0106] 可在表达人Fc γ RIIA受体的鼠模型中测试FcR突变的αCD154血栓栓塞活性,这再现了在NHP中观察到的事件(Ferrant, J.L., Benjamin, C.D., Cutler, A.H., Kalled, S.L., Hsu, Y.M., Garber, E.A., Hess, D.M., Shapiro, R.I., Kenyon, N.S., Harlan, D.M., Kirk, A.D., Burkly, L.C. and Taylor, F.R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge". Int Immunol 2004;16:1583-1594)。在这样的小鼠中,用αCD154(抗小鼠CD154)的治疗诱导了肺栓塞;因此,在含有突变的人Fc区(突变的IgG1恒定区)的抗CD154抗体中的FcR结合的丢失消除或明显减少了血栓的形成。使用该模型或可比的模型,可确定特异性Fc突变对与αCD154治疗有关的毒性的影响。

[0107] 此外,衍生自IDE-131的本发明的突变的CD154特异性抗体可用于治疗和预防任何状况,其中拮抗CD154包括CD154/CD40信号传导的作用,或阻断或抑制CD154与CD40的结合可能是治疗上有效的,并且可减少疾病的症状。其实例包括治疗过敏、自身免疫、癌症、移植、GVHD、发言和其他状况,尤其是,其中诱导耐受性和/或体液免疫或T细胞免疫的抑制的状况是治疗上所希望的。特定的实例包括多发性硬化症、类风湿性关节炎、炎性肠病、克罗恩病、甲状腺炎、红斑狼疮、自身免疫性血小板减少症、糖尿病、移植物抗宿主病、细胞疗法、器官和组织移植,例如血缘、肾、胰腺、骨髓,动脉粥样硬化和其他状况,其中体液或T细胞抑制是所希望的。

[0108] 靶向CD154的本发明的抗体拥有改善的安全特性,具有很大治疗潜力,由于CD154在自身免疫和移植物相关的疾病的广泛范围内对免疫干预是极端引人注目的目标。实际上,通过αCD154治疗在治疗上改良迄今测试的小鼠中的自身免疫疾病的所有模型。除了简单阻止CD154-CD40的相互作用之外,αCD154治疗导致诱导免疫耐受性(为对以下诱导长期耐受性,已经重复地记录通过阻止CD40-CD154相互作用防止移植排斥:皮肤,Gordon, E.J., Markees, T.G., Phillips, N.E., Noelle, R.J., Shultz, L.D., Mordes, J.P., Rossini, A.A. and Greiner, D.L., "Prolonged survival of rat islet and skin xenografts in mice treated with donor splenocytes and anti-CD154 monoclonal antibody", Diabetes 1998;47:1199-1206; Markees, T.G., Phillips, N.E., Noelle, R.J., Shultz, L.D., Mordes, J.P., Greiner, D.L. and Rossini, A.A., "Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand", Transplantation 1997;64:329-335; Jarvinen, L.Z., Blazar, B.R., Adeyi, O.A., Strom, T.B. and Noelle, R.J., "CD154 on the surface of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance", Transplantation 2003;76:1375-1379; Quezada, S.A., Fuller, B., Jarvinen, L.Z., Gonzalez, M., Blazar, B.R., Rudensky, A.Y., Strom, T.B. and Noelle, R.J., "Mechanisms of donor-specific transfusion

tolerance:preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation”,Blood 2003.102:1920-1926;Frleta,D.,Lin,J.T.,Quezada,S.A.,Wade,T.K.,Barth,R.J.,Noelle,R.J.and Wade,W.F.,“Distinctive maturation of in vitro versus in vivo anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice”,J Immunother 2003.26:72-84;Quezada,S.,Eckert,M.,Schneid,A.,Noelle,R.J.and Burns,C.,“Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis”,Arth Rheum.2003.;Elster,E.A.,Xu,H.,Tadaki,D.K.,Montgomery,S.,Burkly,L.C.,Berning,J.D.,Baumgartner,R.E.,Cruzata,F.,Marx,R.,Harlan,D.M.and Kirk,A.D.,“Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody,hu5C8,prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates,Transplantation”,2001.72:1473-1478,胰岛(Benda,B.,Ljunggren,H.G.,Peach,R.,Sandberg,J.O.and Korsgren,O.,“Co-stimulatory molecules in islet xenotransplantation:CTLA4Ig treatment in CD40 ligand-deficient mice”,Cell Transplantation 2002.11:715-720)骨髓(Wekerle,T.and Sykes,M.,“Mixed chimerism and transplantation tolerance”,Annual Review of Medicine 2001,52:353-37019,和无数其他移植的器官(Camirand,G.,Caron,N.J.,Turgeon,N.A.,Rossini,A.A.and Tremblay,J.P.,“Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation”,Transplantation 2002.73:453-461;Tung,T.H.,Mackinnon,S.E.and Mohanakumar,T.,“Long-term limb allograft survival using anti-CD154 antibody in a murine model”,Transplantation”2003.75:644-650)。此外,显示了NHP中的 α 人CD154对同种异体皮肤移植诱导长期耐受性。

[0109] 用于产生本发明抗体的本发明方法的一般描述

[0110] 用于合成本发明抗体的示例性方法

[0111] 克隆如本文所公开的编码仓鼠 α 鼠CD154或IDE-131或变体的 V_H 和 V_L 的DNA并且与编码人 γ 1CH1、CH2、CH3区或本文所公开的IgG1变体的DNA融合。核苷酸序列使用Megabace™序列分析仪核实。将质粒表达载体,含有每个MR1变体的重链和轻链的pEE12转染到NS0细胞中并通过蛋白质A色谱法纯化产物。

[0112] 本发明的抗体与CD154的结合

[0113] 通过它们与转染有小鼠CD154的CHO细胞来测定CD154抗体变体的结合活性的比较。表达CD154的CHO细胞会在4℃与生物素标记的 α CD154在未标记的 α CD154重链变体或同种型匹配的抗体的存在下培养1小时。生物素化的MR1的结合会使用链霉亲和素缀合的荧光色素检测,并会进行流式细胞计数。通过变体的抑制的百分比可通过记录MR1染色的细胞的平均荧光强度的减少来测定。

[0114] 使用ELISA的抗体半衰期

[0115] 可使用ELISA或Biacore测定 α 人IgG1变体的体内半衰期。hIgG1的血清浓度可在设定时间例如施用后1个月测定。

[0116] 变体与FcR的结合。

[0117] 可通过固相测定来测定变体IgG1 mAb与FcR的结合。简言之,可用小鼠或人Fc γ

RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB或Fc γ RIIIA (R&D Systems) 涂布Maxisorb ELISA板。可产生变体的生物素化的版本。使用酶偶联的抗生物素蛋白通过比色检测测定结合。与WT分子相比,对于变体测定结合的减少。

[0118] α CD154 mAb与人C1q的结合

[0119] 可使用已知的方法或如本文所述的使这发生。纯化的人C1q可滴定到孔中,其中MR1的IgG1变体或IDE-C-131被吸收到Maxisorb ELISA板上。用HRP-鸡抗C1q检测结合的C1q。将所有变体与C1q与WT IgG1 MR1的结合比较,如所述的(Farrant, J.L., Benjamin, C.D., Cutler, A.H., Kalled, S.L., Hsu, Y.M., Garber, E.A., Hess, D.M., Shapiro, R.I., Kenyon, N.S., Harlan, D.M., Kirk, A.D., Burkly, L.C. and Taylor, F.R., "The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge", Int Immunol 2004.16:1583-1594.; and Taylor, P.A., Lees, C.J., Wilson, J.M., Ehrhardt, M.J., Campbell, M.T., Noelle, R.J. and Blazar, B.R., "Combined effects of calcineurin inhibitors or sirolimus with anti-CD40L mAb on alloengraftment under nonmyeloablative conditions", Blood 2002.100:3400-3407)。

[0120] 用突变体 α CD154 mAb诱导耐受性

[0121] 可通过已知的方法并且具体地如本文所述的测定抗CD154抗体引起耐受性或延长的免疫抑制的能力。在我们实验室MR1产生的仓鼠抗鼠CD154常规诱导长期生存的移植耐受性,如我们所示(Quzada, S.A., Fuller, B., Jarvinen, L.Z., Gonzalez, M., Blazar, B.R., Rudensky, A.Y., Strom, T.B. and Noelle, R.J., "Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation", Blood 2003.102:1920-1926; Quzada, S.A., Bennett, K., Blazar, B.R., Rudensky, A.Y., Sakaguchi, S. and Noelle, R.J., "Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation", J Immunol 2005.175:771-779; Rossini, A.A., Parker, D.C., Phillips, N.E., Durie, F.H., Noelle, R.J., Mordes, J.P. and Greiner, D.L., "Induction of immunological tolerance to islet allografts", Cell Transplant 1996.5:49-52)。

[0122] 通过同种异体抗原(以供体脾脏细胞的形式)和 α CD154的共施用来诱导耐受性。显示了MR1的人源化IgG1形式也诱导移植物耐受性24,并且因此WT γ 1会用作耐受性诱导的阳性对照。对于它们诱导移植耐受性的能力,会测试丢失结合补体能力的MR1的突变体版本。

[0123] 皮肤移植作为由Markees等人使用的改良的技术来进行(12)。简言之,年龄匹配的雄性CB6F1小鼠会用作脾脏细胞(DST)和皮肤移植物两者的供体。受体C57BL/6小鼠在第-3、-5和-7天会通过尾静脉注射(静脉内)来注射有或没有5x 10⁷DST细胞的500 μ L Hanks平衡盐溶液和500 μ g的WT或突变体 α CD154或对照免疫球蛋白或不注射,仓鼠或人(HIgG1)在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中腹膜内注射。此后在实验期间,会使用适当的抗体(250 μ g/注射)每周治疗小鼠3次。在第0天,受体小鼠以每克体重腹膜内注射的氯胺酮(ketamine)和赛拉嗪(xylazine)各50 μ g麻醉(PBS中的15mg/mL),并且CB6F1皮肤移植物将使用已建立的方法来制备。排斥将被定义为少于20%的皮肤移植物保留的那一天。将评估动物的100天的皮肤移

植排斥。另外,对于每个耐受组,将在第100天采集皮肤移植物并通过组织化学评估白细胞浸润并基于测量的细胞的数量/面积评分。最后,将第三方移植物(H-2Kskin)移植到耐受的小鼠(选定组中的)上以确保所诱导的耐受性是抗原特异性的,如先前已经在该系统中公开的(Markees,T.G.,Phillips,N.E.,Noelle,R.J.,Shultz,L.D.,Mordes,J.P.,Greiner,D.L.and Rossini,A.A.,“Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand”,Transplantation 1997.64:329-335,Markees,T.,Phillips,N.,Gordon,E.,Noelle,R.J.,Mordes,J.P.,Greiner,D.L.and Rossini,A.A.,“Improved skin allograft tolerance induced by treatment with donor splenocytes and an extended course of anti-CD154 monoclonal antibody”,Transplant Proc 1998.30:2444-2446;Markees,T.G.,Appel,M.C.,Noelle,R.J.,Mordes,J.P.,Greiner,D.L.and Rossini,A.A.,“Tolerance to islet xenografts induced by dual manipulation of antigen presentation and co-stimulation”,Transplantation Proceedings 1996.28:814-815)。

[0124] 除了测量补体和FcR突变对耐受性的影响之外,还会如先前所述测定抗体治疗对原发性和继发性体液免疫应答的发展的影响。简言之,用CFA中的鸡卵白蛋白(200 μ g/小鼠)免疫小鼠(4只/组),并用MR1变体(200 μ g/小鼠 \times 3次/周)处理。在第7、14和21天,会通过标准化的抗OVA ELISA测量IgM和IgG抗OVA,并且会定量抗OVA的血清浓度。

[0125] 用本发明的 α CD154 mAb的毒性研究。

[0126] 已经在使用表达人Fc γ RIIA的小鼠的鼠模型中证明了 α CD154的血栓形成活性。该模型使用完整和非糖基化形式的抗人CD154在NHP中平行毒性发现。简言之,小鼠将被注射sCD154的预先形成的免疫复合物(IC)(R&DSystems)和 α CD154的各种变体(138 μ g mAb和50 μ g Ag,以1:3(mAb/Ag)化学计量比接近500nM IC)。注射后,如果混合物是溶解血栓的,小鼠会表现出长时间的定向障碍、呼吸浅和活动能力受损。预计显示该活性的那些具有血小板计数的明显减少。60分钟后,会收集肺,固定在福尔马林中,切片并H&E染色。会评估小鼠肺切片以证明血栓形成(如通过血管内血栓测量的)并且会计数血栓/切片的数量。对于每只小鼠,会计数10个切片,并且穿过用IgG1 MR1的多种变体处理的所有组比较血栓的总数。另外,会通过流式细胞术评估总的血小板计数(在安乐死时通过心脏穿刺收获的),并且使用血栓形成的那些抗体预计会下降80%。这些发现将决定哪个MR1变体(FcR结合(N325L、K326V、E269R)是血栓形成的并且如果FcR结合的改变改变了该活性。

[0127] 阻断T细胞介导的自身免疫疾病,实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的发展。

[0128] 5-8周龄的雌性C57BL/6小鼠会用补充有5mg/ml结核分枝杆菌的CFA中乳化的200 μ g的MOG35-55肽皮下免疫。在免疫时和48小时后,小鼠会接受腹腔内注射250ng百日咳毒素。7天后,小鼠会接受用不含百日咳毒素的MOG/CFA的相同的加强免疫。临床疾病通常在免疫后第16天至第20天之间开始。在实验期间(50天),小鼠会被施用MR1变体、人IgG(作为变体的对照)、仓鼠Ig(作为MR1的对照)或仓鼠MR1(200 μ g/小鼠3x/周)中的每个。

[0129] 临床评估。小鼠每周评分四次,如下:0,没有EAE的可检测的迹象;0.5,无力的远端尾巴;1,完全无力的尾巴;1.5,无力的尾巴和后肢无力;2,单侧部分后肢瘫痪;2.5,双侧部分后肢瘫痪;3,完全双侧后肢瘫痪;3.5,完全后肢瘫痪和单侧前肢瘫痪;4,前肢和后肢的完全瘫痪;5,死亡。评分大于4但小于5的小鼠会被安乐死。

[0130] 毒性的测定

[0131] 根据本发明的所期望的抗体会在公开的血栓形成动物模型中具有大大降低的毒性或无毒性。使用上述模型,会显示IgG1抗CD154抗体,其中恒定区的重链含有E269R突变和K322A突变(根据Kabat编号方案)不引起血小板聚集。

[0132] 功效的确定

[0133] 可以在皮肤移植物耐受性模型中评估功效(诱导耐受性),如上所述。

[0134] 本发明的抗hCD154抗体的制药和诊断用途

[0135] 在本发明的一个实施方式中,抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制受试者中的免疫应答。本发明的抗体或本发明的药物组合物以有效抑制量向受试者施用。

[0136] 在某些实施方式中,抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物的“有效抑制量”是有效抑制施用其的受试者中的CD154-CD40相互作用的任何量。确定“抑制量”的方法对本领域技术人员来说是公知的,并且取决于以下因素,包括但不限于:涉及的受试者的类型、受试者的大小和年龄以及递送的特定治疗剂的药代动力学特性。

[0137] 在本发明的另一具体实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够通过抑制CD154-CD40相互作用来抑制免疫应答。

[0138] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制炎症。为了本发明的目的,炎性反应的特征在于发红、肿胀、热和疼痛,这是由于毛细血管扩张以及吞噬白细胞的水肿和迁移的结果。炎性反应的一些例子包括:关节炎、接触性皮炎、高IgE综合征、炎性肠病、过敏性哮喘和特发性炎性疾病。特发性炎性疾病包括,例如银屑病和狼疮(例如系统性红斑狼疮(SLE)、药物诱导的红斑狼疮和狼疮性肾炎)。见,例如,Gallin 1989. Fundamental Immunology, Chapter 26, Raven Press, 2d Ed., pp. 721-733, New York。本发明提供了治疗或预防个体系统性红斑狼疮(SLE)的症状的方法,所述方法包括,以治疗或预防SLE的症状的有效量向个体施用本发明的抗CD154抗体。

[0139] 关节炎的一些例子包括:类风湿性关节炎、非类风湿性炎性关节炎、与莱姆病有关的关节炎和炎性骨关节炎。特发性炎性疾病的一些例子包括:银屑病和系统性狼疮。在本发明的一个实施方式中,抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制受试者对移植器官的排斥。

[0140] 在本发明的更具体的实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制受试者对移植的心脏、肾、肝脏、皮肤、胰岛细胞或骨髓的排斥。

[0141] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制受试者的移植物抗宿主病。

[0142] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制受试者的过敏反应--例如枯草热或对青霉素或其他药物的过敏。

[0143] 在一方面,包括INX021的本发明的CD154抗体对于减轻或预防抗药物反应是有用的,具体是针对生物制剂和其它药物如治疗性抗体、融合蛋白、激素、生长因子、酶、肽、抗生素、抗病毒剂等的那些。这可以使这些药物能够施用更长时间,可增加对药物作出反应的患者数量,和/或可以促进药物治疗的患者的功效。其实例在本领域中是已知的,包括Humira、Enbrel、Rituxan、Xolair、Herceptin和Avastin。

[0144] 其中本发明的抗CD154抗体可用于预防或减轻抗药物反应的治疗抗体的其他实例

包括以下：3F8、8H9、Abagovomab、Abciximab、Abituzumab、Abrilumab、Actoxumab、Adalimumab、Adecatumumab、Aducanumab、Afasevikumab、Afelimomab、Afutuzumab、Alacizumab pego、ALD518、阿仑珠单抗(Alemtuzumab)、Alirocumab、Altumomab pentetate、Amatuximab、马安莫单抗(Anatumomab mafenatox)、Anetumab ravidansine、Anifrolumab、Anrukinzumab、Apolizumab、Arcitumomab、Ascrinvacumab、Aselizumab、Atezolizumab、Atinumab、Atlizumab(=tocilizumab)、Atorolimumab、Avelumab、Bapineuzumab、Basiliximab、Bavituximab、Bectumomab、Begelomab、Belimumab、Benralizumab、Bertilimumab、Besilesomab、Bevacizumab、Bezlotoxumab、Biciromab、Bimagrumab、Bimekizumab、Bivatuzumab mertansine、Bleselumab、Blinatumomab、Blontuvetmab、Blosozumab、Bococizumab、Brentuximab vedotin、Briakinumab、Brodalumab、Brolucizumab、Brontictuzumab、Cabiralizumab Canakinumab、Cantuzumab mertansine、Cantuzumab ravidansine Caplacizumab、Capromab pendetide Carlumab Carotuximab、Catumaxomab、CBR96-doxorubicin immunoconjugate、Cedelizumab、Cergutuzumab amunaleukin、Certolizumab pegol、Cetuximab、Ch.14.18、Citatuzumab bogatox、Cixutumumab、Clazakizumab、Clenoliximab、Clivatuzumab tetraxetan、Codrituzumab、Coltuximab ravidansine、Conatumumab、Concizumab、Crenezumab、Crotedumab、CR6261、Dacetuzumab、Daclizumab、Dalotuzumab、Dapirolizumab pegol、Daratumumab、Dectrekumab、Demcizumab、Denintuzumab mafodotin、Denosumab、Derlotuximab biotin、Detumomab、Dinutuximab、Diridavumab、Dapirolizumab pegol、Daratumumab、Dectrekumab、Demcizumab、Denintuzumab mafodotin、Denosumab、Derlotuximab biotin、Detumomab Dinutuximab、Diridavumab Domagrozumab、阿托度单抗(Dorlimomab aritox)、Drozitumab、Duligotumab Dupilumab Durvalumab Dusigitumab、Ecromeximab、Eculizumab、Edobacomb、Edrecolomab、Efalizumab、Efungumab、Eldelumab、Elgemtumab、Edrecolomab、Efalizumab、Efungumab、Eldelumab、Elgemtumab、Elotuzumab、Elsilimomab、Emactuzumab、Emibetuzumab、Emicizumab、Enavatuzumab、Enfortumab vedotin、培化恩莫单抗(Enlimomab pegol)、Enoblituzumab、Enokizumab、Ensituximab、西依匹莫单抗(Epitumomab cituxetan)、Epratuzumab、Erlizumab、Ertumaxomab、Etaracizumab、Etrolizumab、Evinacumab、Evolocumab、Exbivirumab、Fanolesomab、Faralimomab、Farletuzumab FBTA05、Felvizumab、Fezakinumab、Fibatuzumab、Ficlatuzumab、Figitumumab、Firivumab、Flanvotumab、Fletikumab、Fontolizumab、Foralumab、Foravirumab、Fresolimumab、Fulranumab、Futuximab、Galcanezumab、Galiximab、Ganitumab、Gantenerumab、Gavilimomab、吉妥珠单抗(Gemtuzumab)、ozogamicin、Gevokizumab、Girentuximab、Glembatumumab、vedotin、Golimu、Gomiliximab、Guselkumab、Ibalizumab、替伊莫单抗(Ibritumomab tiuxetan)、Icrucumab、Idarucizumab、Igovomab、IMAB362、Imalumab、Imciromab、Imgatuzumab、Inclacumab、Indatuximab ravidansine、Indusatumab vedotin、Inebilizumab、Infliximab、Intetumumab、Inolimomab、伊珠单抗奥加米星(Inotuzumab ozogamicin)、Ipilimumab、Iratumumab、Isatuximab、Itolizumab、Ixekizumab、Keliximab、Labetuzumab、Lambrolizumab、Lampalizumab、Lanadelumab、Laprituximab emtansine、Lebrikizumab、

Lentalizumab、Lenzilumab、Lerdelimumab、Lexatumumab、Libivirumab、Lifastuzumab vedotin、Ligelizumab、Lilotomab satetrahexan、Lintuzumab、Lirilumab、Lodelcizumab、Lokivetmab、Lorvotuzumab mertansine、Lucatumumab、Lulizumab pegol、Lumiliximab、Lumretuzumab、Mapatumumab、Margetuximab、Maslimomab、Mavrilimumab、Matuzumab、Mepolizumab、Metelimumab、Milatuzumab、Minretumomab、Mirvetuximab、soravtansine、Mitumomab、Mogamulizumab、Monalizumab、Morolimumab、Motavizumab、Moxetumomab pasudotox、Muromonab-CD3、他那可单抗(Nacolomab tafenatox)、Namilumab、他那莫单抗(Naptumomab estafenatox)、Naratumab emtansine、Narnatumab、Natalizumab、Navicixizumab、Navivumab、Nebacumab、Necitumumab、Nemolizumab、Nerelimomab、Nesvacumab、Nimotuzumab、Nimotuzumab、Nimotuzumab、Nivolumab、Nofetumomab merpentan、Obiltoxaximab、Obinutuzumab、Ocaratuzumab、Ocrelizumab、Odulimumab、Ofatumumab、Olaratumab、Olokizumab、Ontuxizumab、Opicinumab、莫奥珠单抗(Opertuzumab monatox)、Oregovomab、Orticumab、Otelixizumab、Otlertuzumab、Oxelumab、Ozanezumab、Ozoralizumab、Pagibaximab、Palivizumab、Pamrevlumab、帕木单抗(Panitumumab)、Pankomab、Panobacumab、Parsatuzumab、Pascolizumab、Pasotuxizumab、Pateclizumab、Patritumab、Pembrolizumab、Pemtumomab、Perakizumab、Perakizumab、培妥珠单抗(Pertuzumab)、Pexelizumab、Pinatuzumab vedotin、Pintumomab、Placulumab、Plozalizumab、Pogalizumab、Polatuzumab vedotin、Ponezumab、Prezalizumab、Priliximab、Pritoxaximab、Pritumumab、PRO 140、Quilizumab、Racotumomab、Radretumab、Rafivirumab、Ralpancizumab、Ramucirumab、Ranibizumab、Raxibacumab、Refanezumab、Regavirumab、Reslizumab、Rilotumumab、Rinucumab、Rituximab、Rivabazumab pegol、Robatumumab、Roledumab、Romosozumab、Rontalizumab、Rovalpituzumab tesirine、Rovelizumab、Ruplizumab、Sacituzumab govitecan、Samalizumab、Sapelizumab、Sarilumab、沙妥莫单抗喷地肽(Satumomab pendetide)、Secukinumab、Seribantumab、Setoxaximab、Sevirumab、西罗珠单抗(Sibrotuzumab)、SGN-CD19A、SGN-CD33A、Sifalimumab、Siltuximab、Simtuzumab、西利珠单抗(Siplizumab)、Sirukumab、Sofituzumab vedotin、Solanezumab、Solitomab、Sonepcizumab、索土珠单抗(Sontuzumab)、Stamulumab、Sulesomab、Suvizumab、Tabalumab、他珠单抗(Tacatuzumab tetraxetan)、Tadocizumab、他利珠单抗(Talizumab)、Tamtuvetmab、Tanezumab、帕他莫单抗(Taplitumomab paptox)、Tarextumab、特非珠单抗(Tefibazumab)、阿替莫单抗(Telimumab aritox)、Tenatumomab、Teneliximab、Teplizumab、Teprotumumab、Teprotumumab、Tesidolumab、Tetulomab、Tezepelumab、TGN1412、Ticilimumab(曲美木单抗(tremelimumab))、Tildrakizumab、Tigatuzumab、Timolumab、Tisotumab vedotin、TNX-650、托珠单抗(Tocilizumab)(atlizumab)、托利珠单抗(Toralizumab)、Tosatoxumab、Tositumomab、Tovetumab、Tralokinumab、Trastuzumab、Trastuzumab emtansine、TRBS07、Tregalizumab、Tremelimumab、Trevogrumab、Tucotuzumab celmoleukin、Tuvirumab、Ublituximab、Ulocuplumab、Urelumab、Urtoxazumab、Ustekinumab、Vadastuximab talirine、Vandortuzumab、Vedotin、Vantictumab、Vanucizumab、Vapaliximab、Varlilumab、Vatelizumab、Vepalimomab、Vesencumab、Visilizumab、Vobarilizumab、

Volociximab、Vorsetuzumab、mafodotin、Votumumab、Xentuzumab、Zalutumumab、Zanolimumab、Zatuximab、Ziralimumab和阿佐莫单抗(Zolimomab aritox)。

[0145] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制患有自身免疫性疾病的受试者中的自身免疫应答。在一些实施方式中,自身免疫应答与选自下组的状况有关或源自下组的状况:类风湿性关节炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮、格雷夫斯病、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、糖尿病、炎症性肠病、克罗恩病、多发性硬化症、牛皮癣、药物诱导的自身免疫疾病或药物诱导的狼疮。在某些实施方式中,自身免疫应答与系统性红斑狼疮相关或源自系统性红斑狼疮。

[0146] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制患有源自感染性疾病的自身免疫应答的受试者的自身免疫应答。

[0147] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制患有从瑞特综合征、脊椎关节炎、莱姆病、HIV感染、梅毒或结核病得到的自身免疫应答的受试者的自身免疫应答。

[0148] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制受试者的纤维化。

[0149] 纤维化的一些实例包括:肺纤维化或纤维化疾病。肺纤维化的一些实例包括:继发于成人呼吸窘迫综合征的肺纤维化、药物诱导的肺纤维化、特发性肺纤维化或过敏性肺炎。纤维化疾病的一些实例包括:丙型肝炎;乙型肝炎;肝硬化;继发于毒性损伤的肝硬化;继发于药物的肝硬化;继发于病毒感染的肝硬化;和继发于自身免疫疾病的肝硬化。

[0150] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制胃肠疾病。胃肠疾病的一些实例包括:食道运动障碍、炎性肠病(包括克罗恩病和溃疡性结肠炎)、胃炎、胶原性结肠炎(包括淋巴细胞性结肠炎和显微镜结肠炎)、乳糜泻疾病(也称为麸质肠病、乳糜泻或麸质不耐受),和硬皮病。

[0151] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制血管疾病。血管疾病的一些实例包括:动脉粥样硬化、肾动脉疾病、淋巴水肿、缺血性病症和再灌注损伤。还包括胶原血管/免疫复合物疾病,如系统性红斑狼疮或冷球蛋白血症。

[0152] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够抑制患有T细胞癌的受试者中T细胞肿瘤细胞的增殖,--例如T细胞白血病或淋巴瘤。这样的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物可以有效抑制该受试者中的T细胞肿瘤细胞增殖的量向受试者施用。

[0153] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够通过人类T细胞亲淋巴病毒1型抑制受试者的T细胞的病毒感染(HTLV I)。这样的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物可以有效抑制病毒感染的量向受试者施用。

[0154] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够使受试者中的肿瘤细胞或赘生性细胞成像,所述受试者表达本发明的抗体特异性结合的CD154蛋白。在受试者中对肿瘤细胞或赘生性细胞进行成像的方法包括以下步骤:在允许抗体与肿瘤细胞或赘生性细胞表面上的蛋白质形成复合物的条件下,向受试者施用有效量的本发明的抗CD154抗体或包含它的组合物;和对所形成的任何抗体/蛋白质复合物进行成

像,由此使受试者中的任何肿瘤细胞或赘生性细胞成像。

[0155] 在本发明的一个实施方式中,本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物能够检测受试者中的肿瘤细胞或赘生性细胞的存在,所述受试者表达与本发明抗体特异性结合的CD154蛋白。一种用于检测受试者中肿瘤细胞或赘生性细胞的存在的方法包括以下步骤:在允许形成抗体和蛋白质之间的复合物的条件下,向受试者施用有效量的本发明的抗CD154抗体或包含它的药物组合物;从受试者清除任何未结合的显像剂;和检测形成的任何抗体/蛋白质复合物的存在,这样的复合物的存在指示受试者中存在肿瘤细胞或赘生性细胞。

[0156] 药物组合物

[0157] 本发明提供包含CD154结合蛋白例如抗CD154抗体的药物组合物,如本发明所述。

[0158] 在本发明的一个实施方式中,药物组合物包含本发明的至少一种抗CD154抗体。

[0159] 本发明的抗CD154抗体或包含该抗体的药物组合物不引起血栓形成,包括血栓栓塞事件,并且因此非常适合人类治疗。

[0160] 这样的药物组合物可以进一步包含药学上可接受的载体、佐剂、递送运载体、缓冲剂和/或稳定剂中的任何一种或多种。用于配制和施用本发明的抗体的示例性技术可以例如在“Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PA, 最新版中找到。

[0161] 在本发明的更具体的实施方式中,药学上可接受的载体是磷酸盐缓冲盐水、生理盐水、水、柠檬酸盐/蔗糖/吐温制剂(Tween formulations)和乳剂--例如油/水乳剂。

[0162] 在本发明的一个实施方式中,药物组合物可以在微囊包封装置中递送以减少或预防针对组合物的宿主免疫应答。本发明的结合剂,例如抗体或抗体片段也可在膜,例如脂质体或其他包封的或免疫保护的递送运载体中微囊包封递送。

[0163] 在本发明的一个实施方式中,药物组合物可以是无菌可注射制剂,例如无菌注射水性或油性悬浮液的形式。该悬浮液可以根据本领域已知的技术使用合适的分散剂、润湿剂和悬浮剂配制。

[0164] 在本发明的一个实施方式中,药物组合物可以口服、局部或静脉内递送。当全身施用时,治疗组合物应该是无菌的,基本上无热原的并且在适当考虑pH、等渗性和稳定性的胃肠外可接受的溶液中。例如,药物制剂基本上没有热原材料以适合作为人类治疗剂施用。这些条件是本领域技术人员已知的。

[0165] 在本发明的一个更具体的实施方式中,对于口服施用,将药物组合物配制在合适的胶囊、片剂、水性悬浮液或溶液中。用于口服施用的组合物的固体制剂可含有合适的载体或赋形剂,例如玉米淀粉、明胶、乳糖、阿拉伯胶、蔗糖、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、磷酸二钙、碳酸钙、氯化钠或海藻酸。可以使用的崩解剂包括但不限于微晶纤维素、玉米淀粉、羟基乙酸淀粉钠和海藻酸。可以使用的片剂粘合剂包括阿拉伯胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮(PovidoneTM)、羟丙基甲基纤维素、蔗糖、淀粉和乙基纤维素。可以使用的润滑剂包括硬脂酸镁、硬脂酸、硅油、滑石、蜡、油和硅胶体。

[0166] 在本发明更具体的实施方式中,对于局部应用,药物组合物可配制成合适的软膏。用于局部使用的组合物制剂的一些实例包括:含有活性成分和各种负载物和运载体的滴剂、酊剂、洗剂、乳膏、溶液和软膏。

[0167] 在本发明的一个实施方式中，局部半固体软膏制剂一般包含在载体例如药物膏基中的约1至20%，--例如5至10%的浓度的活性成分。

[0168] 在本发明的一个实施方式中，用于吸入和透皮组合物的药物组合物也可以容易地制备。治疗组合物可以通过鼻或肺施用，例如作为液体或粉末气溶胶(冻干的)。

[0169] 在本发明的一个实施方式中，在水或其它水性运载体中制备的用于口服施用的药物组合物的液体制剂可以含有各种悬浮剂，例如甲基纤维素、藻酸盐、黄蓍胶、果胶、海藻酸钠、角叉菜胶、阿拉伯胶、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇。本发明药物组合物的液体制剂还可包括含有润湿剂、甜味剂以及着色剂和调味剂连同活性化合物的溶液、乳剂、糖浆和酏剂。药物组合物的多种液体和粉末制剂可以通过用于吸入待治疗哺乳动物的肺的常规方法来制备。

[0170] 在本发明的一个实施方式中，用于注射的药物组合物的液体制剂可包含多种载体，如植物油、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、乙醇、多元醇--即甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等。在一些实施方式中，组合物包括柠檬酸盐/蔗糖/吐温载体。对于静脉内注射，组合物的水溶性形式可通过滴注方法施用，由此输注含有抗真菌剂和生理上可接受的赋形剂的药物制剂。生理上可接受的赋形剂可以包括，例如5%右旋糖、0.9%盐水、林格溶液(Ringer's solution)或其他合适的赋形剂。该组合物的合适的不溶形式可以制备并作为在水基或药学上可接受的油基如长链脂肪酸的酯例如油酸乙酯中的悬浮液施用。

[0171] 在本发明的一个实施方式中，药物组合物包含在药学上可接受的载体中的约0.1至90重量% (例如1至20%或1至10%) 的本发明的抗CD154抗体。

[0172] 在本发明的一个实施方式中，每种药物组合物中本发明的抗CD154抗体的最佳百分比根据制剂本身和在特定病理学和相关治疗方案中所希望的治疗效果而变化。药物制剂在本领域中是公认的。可使用医学领域的普通技术人员已知的常规方法向受试者施用药物组合物。

[0173] 因此，本发明的药物组合物涉及延长释放制剂。延长释放或控制释放或缓慢释放指在向受试者施用后的一段时间内释放活性药物(如多肽或抗体药物)的药物制剂。可以在所希望的时间范围内(例如，分、小时、天、周或更长，取决于药物制剂)发生的多肽药物的延长释放不同于其中基本上整个剂量单位可立即吸收或经由血流立即分配的标准制剂。在某些实施方式中，延长释放制剂可以产生来自单次施用的循环药物的水平，其维持例如8小时或更多、12小时或更多、24小时或更多、36小时或更多、48小时或更多、60小时或更多，72小时或更多、84小时或更多、96小时或更多，或甚至例如1周或2周或更多，例如1个月或更多。延长释放的组合物可包含本发明的抗CD154抗体。

[0174] 在本发明的一些实施方式中，药物组合物进一步包含另外的免疫抑制或免疫调节化合物。例如，这样的免疫抑制或免疫调节化合物可以是以下中的一种：经由CD28中断T细胞共刺激信号传导的药剂；中断钙依赖磷酸酶信号传导的试剂，皮质类固醇，抗增殖剂和特异性结合免疫细胞表面上表达的蛋白质的抗体，所述蛋白质包括但不限于CD45、CD2、IL2R、CD4、CD8和RANK FcR、B7、CTLA4、TNF、LT β 和VLA-4。

[0175] 在本发明的一些实施方式中，免疫抑制或免疫调节化合物是他克莫司(tacrolimus)、西罗莫司(sirolimus)、吗替麦考酚酯(mycophenolate mofetil)或其活性

形式麦考酚酸(mycophenolic acid)、咪唑立宾(mizoribine)、脱氧精胍菌素(deoxyspergualin)、布喹那钠(brequinar sodium)、来氟米特(leflunomide)、雷帕霉素(rapamycin)或氮杂螺旋(azaspirane)。

[0176] 在本发明的其他实施方式中，本发明的抗体或包含它们的药物组合物可以单独包含在容器、包装或分配器中或作为具有标签和施用说明的试剂盒的一部分。

[0177] 施用和递送途径

[0178] 本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可以以医学上可接受的任何方式向受试者施用。为了本发明的目的，“施用”意指施用本领域技术人员已知的抗体、抗体片段或药物组合物的任何标准方法，并且不应局限于本文提供的实例。

[0179] 在本发明的一些实施方式中，本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可以通过静脉内、皮下、腹膜内、肌内、髓内、心室内、硬膜外、动脉内、血管内、关节内、滑膜内、皮内、鞘内、肝内、脊柱内、肿瘤内、颅内注射；通过肠内、肺内、穿粘膜、子宫内或舌下施用途径，或局部例如在炎症或肿瘤生长部位向受试者施用。

[0180] 在本发明的一些实施方式中，本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可以口服或经鼻，或通过吸入、眼的、直肠或局部途径向受试者施用。

[0181] 在一个更具体的实施方式中，本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可以以胶囊、片剂、水性混悬液或溶液的形式向受试者口服施用。

[0182] 在更具体的实施方式中，本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可以通过应用乳膏、软膏等向受试者局部施用。

[0183] 在本发明的其他实施方式中，本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物还可以通过使用喷雾器、干粉吸入器或定量吸入器吸入施用。

[0184] 在本发明的进一步的实施方式中，本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可以通过持续释放，通过如在手术期间直接应用的可易蚀植入物的贮存注射或通过将输注泵或生物相容性持续释放植入物植入受试者体内向受试者施用。

[0185] 在一个更具体的实施方式中，本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可以通过施用的可注射的贮存途径，如通过使用1-、3-或6-个月的贮存注射或生物可降解材料和方法向受试者施用。

[0186] 在一个更具体的实施方式中，本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可以通过向受试者的皮肤施用含有抗体、抗体衍生物或药物组合物的透皮贴剂向受试者施用，并使贴剂与受试者的皮肤接触，一般每贴剂1至5小时。

[0187] 在本发明的其他实施方式中，本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可以以每个体重的任何剂量和医学上可接受的任何剂量频率向受试者施用。可接受的剂量包括约0.01至200mg/kg受试者体重的范围。

[0188] 本发明的抗CD154抗体以有效引起对免疫的所希望的作用，即对T或B细胞免疫的抑制的量或有效预防、治疗或改善其中B或T细胞免疫的抑制是治疗上所希望的疾病的症状的量向受试者施用。如上所述的这些状况特别包括自身免疫性、炎性和过敏性适应症。

[0189] 抗体的总施用剂量可选地可包含.01、.1、1、5、10、15、20、25、50、100或更多mg或可以包含插入前述mg值的任何量。在本发明的优选实施方式中，本文所述的抗CD154抗体或其结合片段以及所述抗体片段的组合可以每26周或更少一次，如每十六周或更少一次、每八

周或更少一次、或每四周一次、每月一次、每两周或更少一次的频率给向受体受试者施用。

[0190] 在使用本发明的抗体或药物组合物的任何方法中,抗体或药物组合物可以每天,每2、3、4、5或6天,每周,每月或其任何分数或倍数以单剂量或多剂量向受试者施用,并且进一步可以从每天到每隔一个月的间隔向受试者重复施用,如由技术人员所确定的。

[0191] 在使用本发明的抗体或药物组合物的任何方法中,抗体或包含它们的药物组合物可以医学指示同样长的时间间隔(范围从数天或数周到受试者的一生)向有此需要的受试者施用。在进一步的实施方式中,本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可以每天至每隔一个月的时间间隔向受试者重复施用。

[0192] 在本发明的一个实施方式中,如果需要,本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可以每日多次剂量施用,以达到总的所希望的日剂量。治疗的方法的有效性可以通过监测受试者知道病症的迹象或症状来评估。

[0193] 对于本发明的所有实施方式,本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物有效产生所希望的效果的剂量和剂量率取决于多种因素,如要治疗的疾病的性质、受试者的大小和年龄、治疗的目标、使用的具体药物组合物、活性剂的药代动力学以及治疗医师的判断。

[0194] 应该理解,有效剂量可取决于受体受试者属性,如例如年龄、性别、妊娠状态、体重指数、瘦体重、状况或给予组合物的状况,可能影响组合物代谢或耐受性的受体受试者的其他健康状况,受体受试者中IL-6的水平以及对组合物的抗性(例如,由患者发展针对该组合物的抗体引起)。本领域技术人员应该能够通过,例如藉由本文的公开内容以及Goodman, L.S., Gilman, A., Brunton, L.L., Lazo, J.S., & Parker, K.L. (2006). Goodman&Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; Howland, R.D., Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C., & Mycek, M.J. (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; and Golan, D.E. (2008). Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia, Pa., [etc.]: Lippincott Williams&Wilkins中的教导指导的常规实验来确定施用的有效剂量和频率。

[0195] 因此,本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物会以有效实现其预期目的的量施用。治疗有效量可指抗体有效预防、减轻或改善疾病的症状或延长所治疗受试者的存活的量。治疗有效量可通过改变本发明的抗体施用的剂量和给药时间表来实现。

[0196] 本发明的抗CD154抗体和本发明的药物组合物可作为单一剂量施用用于某些适应症,如防止对受试者暴露短时间的抗原的免疫应答,如在一天治疗中施用的外源性抗原。这样的治疗的实例应该包括将本发明的抗体片段与治疗剂例如抗原性药物、变应原或血液产品或基因治疗载体一起共施用。在慢性存在抗原的适应症中,如控制对移植组织或慢性施用的抗原性药物的免疫反应时,本发明的抗体片段或药物组合物以医学指示同样长的时间间隔,范围从几天或几周到受试者的一生来施用。

[0197] 在本文所述的任何方法中,所述抗体或药物组合物可以用第二药剂向受试者施用。在某些实施方式中,所述药剂是治疗剂,如,例如免疫调节剂或免疫抑制剂。免疫调节剂或免疫抑制剂可为以下的任何一种:

[0198] (a) 经由CD28中断T细胞共刺激信号传导的药剂;

- [0199] (b) 中断钙依赖磷酸酶信号传导的药剂，
[0200] (c) 皮质类固醇，
[0201] (d) 抗增殖剂；和
[0202] (e) 与免疫细胞表面上表达的蛋白特异性结合的抗体，包括但不限于CD45、CD2、IL2R、CD4、CD8和RANK FcR、B7、CTLA4、TNF、LT β 和VLA-4。
- [0203] 免疫抑制或免疫调节化合物可为，例如他克莫司、西罗莫司、吗替麦考酚酯、咪唑立宾、脱氧精氨酸、布喹那钠、来氟米特、雷帕霉素或氮杂螺烷。抗体和第二药剂可同时或顺序施用。在一些情况下，将本发明的一种或多种核酸向有此需要的受试者施用可能是有利的。包括根据公知方法施用本发明的至少一个核酸的步骤的本发明的治疗和诊断方法包括在本发明的范围内。
- [0204] 在本发明的一个实施方式中，可通过上述方法治疗的受试者是动物。优选地，动物是哺乳动物。可以治疗的哺乳动物的实例包括但不限于人、非人灵长目动物、啮齿动物（包括大鼠、小鼠、仓鼠和天竺鼠）、牛、马、绵羊、山羊、猪、狗和猫。优选地，哺乳动物是人。
- [0205] 基于下面的实施例可以更好地理解本发明。然而，本领域技术人员将容易理解，所讨论的具体方法和结果仅仅是对如本文所述的本发明的说明。
- [0206] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供关于如何制造和使用本发明的完整公开和描述，并且意图限制被认为是本发明的范围。已经努力确保关于所使用的数字（例如，数量、温度、浓度等）的准确性，但应该允许一些实验误差和偏差。除非另有说明，份数是重量份数、分子量是平均分子量，温度是摄氏度；并且压力处于或接近大气压。

实施例：

- [0207] 实施例1：与人CD154亲和力更高的抗体变体的设计 (K_D 值较低)
- [0208] 在本申请中，本发明的发明人描述了具有包含在图1A-C中的序列的新的人源化的抗人CD154 IgG1抗体，其用于人的治疗，特别是其中在治疗上希望抑制T和B细胞免疫的治疗适应症。如前所述，通过组合使用亲和力成熟和诱变方法并通过修饰IDECK-131的IgG1 Fc区以消除Fc γ RII和Fc γ RIII以及C1q（补体结合），由此从IDECK-131衍生出该抗体。
- [0209] 特别地，以获得对人CD154具有改善的结合亲和力的IDECK-131变体为目的使IDECK-131的重链和轻链可变区中的CDR残基的各种组合突变。这些实验导致了大量的变体。这些变体中的压倒性数目并不比IDECK-131与人CD154的结合更好，相反地它们对人CD154具有相同或更差的结合亲和力（结果未显示）。
- [0210] 这些实验产生了11个人源化变体，其被鉴定并含有图2A-2C和3所示的可变轻链和重链序列。然后通过Biacore筛选这些变体各自对人CD154的结合亲和力。如下所示进行Biacore测定。
- [0211] BIACORE测定：
- [0212] 设备：Biacore 3000
- [0213] 测定缓冲液-10nM HEPES缓冲液 (pH 7.4), 150nM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% P20 (聚氧乙烯山梨糖醇酐)
- [0214] 再生缓冲液-10mM甘氨酸HCl (pH 1.75)
- [0215] 缀合缓冲液-10nM乙酸钠缓冲液 (pH 5)

[0216] 流速-配体捕获的流速为 $5\mu\text{l}/\text{min}$ 。动力学分析的流速为 $30\mu\text{l}/\text{min}$ 。

[0217] 程序：

[0218] 结合实验在 25°C 在Biacore 300上进行。将抗体直接固定在流动池2(1000RU的组合#23)和流动池4(1000RU的EWT#131)上，并使CD154抗原流过芯片。实时监测抗原与测试的抗体的结合。从观察到的 k_{on} ，测定每个变体的 k_{off} 和 K_D 。

[0219] 使用特定分析物浓度进行评分分析。在测试的浓度下，即使配体结合亲和力相对较弱，也应该观察到结合。可以通过已知的方法进行完整的动力学。对于具有快速解离速率的分子相互作用，可以使用稳态动力学来确定KD值。

[0220] 可以进行 χ^2 方 (χ_2) 分析以测定分析的准确性。1-2范围内的 χ_2 被认为是显著的，低于1被认为是非常显著的。该筛选导致鉴定了许多具有显著改善的结合亲和力的序列变体，即相对于IDEC-131好4-5倍。如前所述，该结果非常出人意料，因为IDEC-131具有 151pm 的结合亲和力或KD。这一结果更令人惊讶，因为IDEC-131是基于其对CD154的强效结合亲和力，从许多不同的候选人源化的序列中作为主要临床候选者选择的。

[0221] 如下所示，获得了衍生自IDEC-131的人源化抗CD154抗体，其具有低至 26pm 至 57pm 的 K_D 值。在本申请中被鉴定为变体21、变体22、变体23、变体24、变体25、变体26、变体27、变体28、变体29、变体30和变体31的这些变体的重链和轻链可变序列的氨基酸序列包含在图2中。

[0222] 表4总结了由Biacore测定的这些变体的不同结合亲和力。

[0223] 表4

变体*	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D	Chi ²	K _D 的倍数改进 (与 IDEC131相比)
[0224]	IDE-131	3.468E +06	5.25E -04	1.51E -10	0.097
	21	4.42E +06	1.28E -04	2.89E -11	0.184
	22	4.48E +06	1.17E -04	2.62E -11	0.222
	23	3.35E +06	1.41E -04	4.21E -11	0.242
	24	3.70E +06	1.35E -04	3.64E -11	0.265
	25	4.11E +06	1.49E +04	3.62E -11	0.243
	26	2.03E +06	1.17 +04	5.76E -11	0.201
	27	3.58E +06	1.20E -04	3.36E -11	0.135
	28	3.65E +06	1.15E -04	3.15E -11	0.108
	29	3.86E +06	1.33E -04	3.44E -11	0.152
	30	4.24E +06	1.40E -04	3.29E -11	0.171
	31	3.61E +06	1.23E -04	3.41E -11	0.121

[0225] ● (平均n=6)

[0226] 实施例2: 用于SC施用的对人CD154具有较高亲和力的抗体变体(较低的K_D值) 的用途

[0227] 如上表所示,选择为主要候选物#21的变体具有29pM的K_D值,其比IDE-131好4.7倍。这种亲和力改善是显著的,因为它应该允许皮下施用该抗体。用IDE-131的以前的研究显示人体临床功效在10mg/kg以上,或者为了分析目的上限为20mg/kg。基于此,假设平均体重约80kg的人,可以如下计算剂量有效量:

[0228] 10mg/kg X 80kg=800mg剂量。

[0229] 然而,使用的抗体制剂习惯上不超过100ng/ml。(http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06000895)

[0230] 此外,s.q.施用的一般耐受的剂量体积范围从约0.5-5ml(体积大于3mL被认为是“大”)。因此,IDE-131的有效剂量需要约8mL。(见下面的计算)。这个剂量体积远远超过了s.q.医疗规范。

[0231] (10mg/kg X 80kg)/100mg/ml=8mL。

[0232] 相比之下,由于变体#21(INX021)具有约小5倍的K_D(即,以更大的亲和力与CD154

结合),该变体将需要少5倍的药物以实现相同的效果。如下所示,这应该转化为约1.6ml的剂量体积,这与患者的s.q.注射的医学惯例水平一致。

[0233] $(2\text{mg/kg} \times 80\text{kg}) / 100\text{mg/ml} = 1.6\text{mL}$ 。

[0234] 因此,与IDE-131不同,INX021应该非常适合经由s.q.途径施用。

[0235] 实施例3:根据本发明的抗CD154抗体的效力的比较

[0236] 图4示意性描绘了检测T细胞CD154驱动的B细胞活化的抑制的实验结果。图中包含的这些结果证明与IDE-131相比,改善的效力,即对T细胞CD154驱动的INX-021B细胞活化的更大抑制。

[0237] 实施例4:本发明抗体引起耐受性的能力

[0238] 图5显示实验结果,证明含有与INX021(E269R和K322A)中所含的相同Fc突变的抗小鼠CD154 IgG1抗体能够在前述皮肤试验中诱导耐受性。因此,含有这些突变的IgG1恒定区的抗人CD154抗体应该引起耐受性并阻断CD154在人类患者中的其他作用。

[0239] 实施例6:INX021在体外不引起血小板聚集

[0240] 图6显示实验结果,其揭示了含有降低或消除FcR结合的突变的INX021抗体在使用受试者INX021抗体和胶原蛋白的免疫复合物的测定中在体外不诱导血小板聚集。这些体外实验揭示了在16或20分钟时间段内FcR突变体的免疫复合物不诱导分离的小鼠或人血小板的活化或聚集。相反,在相同的测定中,对照5c8抗体引起血小板聚集。

[0241] 实施例7:根据本发明的抗CD154抗体在体内不引起血小板聚集

[0242] 图7A-D显示了证明INX021不活化血小板,不诱导血小板聚集并且不影响(减少)体内血小板数量的实验结果。图7A中的实验显示与阳性对照相比,INX021不诱导血栓形成应激或激活血小板。图7B中的实验显示与阳性对照相比,INX021不影响循环血小板的数量。图7C中的实验显示与阳性对照相比,INX021不引起肺中凝血(栓子)的形成。图7D总结了INX021体内的益处,即它不减少血小板数量,不激活血小板,不引起血小板应激,并且不诱导凝血形成。

[0243] 实施例8:根据本发明的抗CD154抗体在自身免疫模型中的用途

[0244] 图8A-B中总结的实验显示在INX021中含有降低或消除FcR结合的Fc突变的抗人源化抗CD154 IgG1抗体在不同的自身免疫或炎症模型中有活性。

[0245] 图8A中的实验显示在INX021中含有Fc突变的人类CD154 IgG1抗体在约20天的时间内有效地抑制EAE。图8B中的实验显示在INX021中含有Fc突变的人源化的抗CD154 IgG1抗体与亲本抗体相比有效地抑制针对髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白("MOG")的体液免疫。

[0246] 实施例9:测试包括INX021在内的IDE-131变体抑制T细胞诱导的B细胞活化的能力

[0247] 图9中的实验比较了根据本发明的不同抗体变体(即变体#21(INX021)-#31)基于CD86表达抑制T细胞诱导的B细胞活化的效果。在这些实验中,在混合淋巴细胞反应中比较根据本发明的抗体变体的抑制效果。读数是藉由活化的B细胞进行的CD86表达。如图所示,具有更好 K_D 值的抗体不一定与MLR反应中改善的功能效应相关。与其他变体相比,INX021具有更好的免疫抑制特性。

[0248] 实施例10:INX021毒理学研究和T细胞依赖性抗体应答(TDAR)测量

[0249] 为了评估其在人类疗法中的适用性,在CRL和Harvard促进的猕猴的8周非GLP tox

研究中检查了本发明的抗体INX021。研究设计如下表所示。该研究的目标是评估INX021在非人灵长目动物(NHP)中的安全性和功效。

[0250] 表5 TDAR实验概述：

[0251] TDAR实验概述：

[0252]	给药开始	第1天
	1 st KLH给药	第29天
	流血	第29、36、39天 (KLH给药后第0、7、10天)
	2 nd KLH给药	第43天
	流血	第43、50、53、57天 (KLH给药后第14、21、24、28天)
	测量IgG和IgM	

[0253] 表6 TDAR NHP组

地点	治疗	N	NHP物种
CRL	运载体	4	恒河猴
CRL	INX021 50mg/kg	8	恒河猴
CRL	5C8 20mg/kg	8	恒河猴
Harvard	运载体	3	短尾猴
Harvard	INX021 1mg/kg	3	短尾猴
Harvard	INX021 5mg/kg	3	短尾猴

[0255] 图10A-B比较了INX021和嵌合5c8抗体对KLH测定中IgG和IgM抗体产生的影响。图10A比较了它们对IgG的作用，并且图10B比较它们对IgM的作用。

[0256] 图11A-B比较了运载体、INX021和5c8抗体对生发中心评分的影响。图11A显示生发分数比较，并且图11B含有比较处理动物的脾和淋巴结(LN)中的生发中心的细胞数和程度的直方图。

[0257] 图12总结了用另外的抗CD154抗体(Biogen/UCB的聚乙二醇化αCD154Fab)公布的结果观察到的损害频率。

[0258] 这些结果表明INX021在人类治疗中应该是安全和有效的。

[0259] 实施例11：INX021抑制NHP中的抗药物抗体(ADA)应答

[0260] 在之前实施例中讨论的INX021 tox/TDAR实验期间，我们测量了所有群组中ADA的存在。在所有动物中的TDAR反应被抑制，这表明在INX021处理的动物中可以防止对可溶性抗原的抗体应答。为了检查这一点，我们测量了8周的INX021或5C8注射后恒河猴的ADA反应。最低剂量(1mg/kg)的INX021组中除一个之外的所有动物均未发展任何可检测的ADA。

[0261] 方法：

[0262] 恒河猴中抗INX021和ch5C8的抗体的检测(ELISA)

[0263] 2N硫酸(终止溶液)的制备

[0264] 对于每1000mL的待制备的2N硫酸，将500mL的4N硫酸与500mL的蒸馏水组合。混合好。将为每个单独组件的制备的日期或制造商的有效期限(以先到者为准)分配一年的到期日期。溶液将在室温(17°C至27°C)下储存。

[0265] 制备包被的96孔板

[0266] 在这些方案中，测试材料指含有恒河猴或短尾猴血清的样品，含有阳性对照的样

品和/或空白。

[0267] 方案

[0268] 1. 使用涂层缓冲液 (0.2碳酸盐碳酸氢盐缓冲液) 作为稀释剂,用INX021或ch5C8制备1.0pg/mL涂层溶液。

[0269] 2. 向96孔透明聚苯乙烯板的每个孔中添加100μL涂布溶液并覆盖。

[0270] 3. 在2°C至8°C的温度孵育平板12至24小时。

[0271] 4. 从板的每个孔中吸出(去除)涂层溶液,然后用3×300pL的1X PBS-T洗涤每个孔。

[0272] 5. 将200pL阻滞剂酪蛋白加入平板的每个孔中并覆盖。

[0273] 6. 孵育平板1小时±5分钟。

[0274] 7. 从板的每个孔中吸出阻滞剂酪蛋白,然后用3×300pL的1X PBS-T洗涤每个孔。

[0275] 8. 洗涤后立即使用平板(完成洗涤后2小时内完成平板)。完成分配日期平板制备的截止日期。

[0276] 用于检测抗INX021或ch5C8的抗体的测定程序

[0277] 在这些实验方案中,“测试材料”是指含有恒河猴或短尾猴血清的样品,含有阳性对照的样品和/或空白。房间/环境温度为17°C至27°C。

[0278] 方案

[0279] 1. 将100μL的每种测试材料添加到INX021或ch5C8涂层板的适当的孔中并用平板密封器覆盖。

[0280] 2. 使用平板模板记录测试材料的位置。

[0281] 3. 在室温用INX021或ch5C8涂层平板孵育测试材料1小时±5分钟。

[0282] 分析程序

[0283] 1. 从平板的每个孔中吸出测试材料,然后用3 × 300pL的1X PBS-T洗涤板的每个孔。

[0284] 2. 将100μl的0.125pg/mL INX021-生物素或1.0μg/mL ch5C8-生物素添加到板的每个孔中并用平板密封器覆盖。

[0285] 3. 在室温下孵育平板1小时±5分钟。

[0286] 4. 从平板的每个孔中吸出(去除)INX021-生物素或ch5C8-生物素,然后用3×300pL的1X PBS-T洗涤平板的每个孔。

[0287] 5. 加入100pL的0.1pg/mL SA-HRP到板的每个孔中并覆盖。

[0288] 6. 在室温下孵育平板30分钟±5分钟。

[0289] 7. 从平板的每个孔中吸出(去除)SA-HRP,然后用3×300pL的1X PBS-T洗涤平板的每个孔。

[0290] 8. 向平板的每个孔中加入100μLTMB。

[0291] 9. 在室温下孵育平板20分钟±5分钟。

[0292] 10. 向平板的每个孔中加入100μL的2N硫酸。

[0293] 11. 在分析的30分钟内使用微板分光光度计在450nm处读板。

[0294] 一般数据减少

[0295] 对于所有测试材料,除非另有说明,将计算平均A450、标准偏差和%差异(如果n=

2) 或CV% (如果n>3) 以评估差异。如果计算%差异代替CV%, 则所有CV%验收标准将应用于%差异。如果分析三个或更多测试材料的孔, 如果CV%未通过概述的标准, 则可以省略一个孔。

[0296] $\%CV: r \text{ 标准偏差} > \text{ 平均值} \times 100$

[0297] $\% \text{ 差异}: r \text{ 值A} - r \text{ 值B} > \text{ 平均值} \times 100$

[0298] 将执行最大标准残差(MNR)分析以评估空白TS上5%水平的变化以去除至多两个异常值A450空白测试样品(TS)值。平均值A450将根据所有未作为异常值移除的值计算。由于技术错误, 可能会省略其他孔。

[0299] 将特定切割点(PSCP)作为整体切割点(CP) \times 空白TS平均值A450(无异常值) = PSCP来计算。

[0300] 一般接受标准

[0301] 如果空白TS具有多于两个异常值, 则平板失效并且应该被重新分析。屏蔽由于技术错误而被屏蔽的异常值和孔后, 必须保留至少5个空白TS A450值用于MNR分析。以下等式将用于计算MNR值:MNR空白TS值-平均空白TS

[0302] 标准偏差 $\times \sqrt{n-1}$

[0303] 如果MNR值大于临界值, 则该值将被确定为异常值。临界值定义为:n=12=0.727, n=11=0.745, n=10=0.763, n=9=0.783, n=8=0.804, n=7=0.825, n=6=0.844, N=5=0.858。所有异常值将被屏蔽。

[0304] 去除异常值后的阻滞剂酪蛋白空白和空白TS平均值A450应该小于LPCA<<0。平板特异性切割点(PSCP)将按照以下公式计算:PSCP=CF*空白TS全部平均值(不含异常值)。校正因子(CF)将被添加到研究文件中。LPC平均值A450必须高于PSCP。如果不是, 则该集合的LPC失败。

[0305] 测定缓冲液空白CV%应该<30%。如果测定缓冲液空白未通过上述标准, 则将在科学评估过程中评估平板以确定数据是否可以利用。

[0306] HPC>MPC>LPC用于每个PC组的平均值A450。至少三分之二的PC级别必须符合验收标准, 每个PC级别至少有一台PC在验收标准内。

[0307] 测试样品重复孔之间的差异应该是<25%。如果测试样品未通过这些标准, 样品将被重新分析。

[0308] 阳性对照、空白TS和测定缓冲液空白的制备

[0309] 通过在100%恒河猴血清(RHS)或短尾猴血清中掺入替代阳性对照抗体来制备阳性对照。100%基质中的阳性对照将用阻滞剂酪蛋白稀释10倍以产生适当的工作浓度和10%的基质。每台PC机将彼此独立准备, 并将在每个平板上进行分析。在分析的当天, PC将在每个平板上进行分析。

[0310] 每个平板将含有两套PC LPC(50ng/mL)、MPC(250ng/mL)和HPC(1000ng/mL)。还将制备空白TS, 使用阻滞剂酪蛋白稀释的10%基质的最终浓度, 空白TS的12个孔将在每个平板上运行。阻滞剂酪蛋白将在每个平板上至少两个孔中运行。除非另有说明, 会在至少两个孔中分析所有测试材料。

[0311] 筛选测定

[0312] 为了筛选, 将在阻滞剂酪蛋白中1/10稀释的样品根据7.0节中描述的步骤分析。样

品分析过程中,将研究样品的平均吸光度值与PSCP进行比较,如果平均吸光度值>PSCP则报告为潜在阳性,如果平均吸光度值<PSCP则报告为阴性。

[0313] 结果

[0314] 所有动物中的TDAR反应被抑制,这表明在INX021处理的动物中可以防止针对可溶性抗原的抗体应答。为了检查这一点,我们测量了8周的INX021或5C8注射后恒河猴的ADA反应。在最低剂量的INX021组中除了一个之外的所有动物均未发展任何可检测的ADA。因此,本发明的抗体INX021可以用于抑制,例如针对免疫原性药物,例如生物制剂,例如治疗性抗体,融合蛋白等的体液免疫。

[0315] 在申请中引用的参考文献

[0316] 引用以下参考文献。全部内容通过提述并入本文。

[0317] 1 Noelle,R.J.,Mackey,M.,Foy,T.,Buhlmann,J.and Burns,C.,CD40 and its ligand in autoimmunity.Ann N Y Acad Sci 1997.815:384-391.

[0318] 2 Mackey,M.F.,Barth,R.J.,Jr.and Noelle,R.J.,The role of CD40/CD154 interactions in the priming,differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells.J Leukoc Biol 1998.63:418-428.

[0319] 3 Noelle,R.J.,CD40 and its ligand in cell-mediated immunity.Aagents Actions Suppl 1998.49:17-22.

[0320] 4 Quezada,S.A.,Jarvinen,L.Z.,Lind,E.F.and Noelle,R.J.,CD40/CD154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity.Annu Rev Immunol 2004.22:307-328.

[0321] 5 Kenyon,N.S.,Chatzipetrou,M.,Masetti,M.,Ranuncoli,A.,Oliveira,M.,Wagner,J.L.,Kirk,A.D.,Harlan,D.M.,Burkly,L.C.and Ricordi,C.,Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154.Proc Natl Acad Sci U S A 1999.96:8132-8137.

[0322] 6 Kirk,A.D.,Burkly,L.C.,Batty,D.S.,Baumgartner,R.E.,Berning,J.D., Buchanan,K.,Fechner,J.H.,Jr.,Germond,R.L.,Kampen,R.L.,Patterson,N.B.,Swanson,S.J.,Tadaki,D.K.,TenHoor,C.N.,White,L.,Knechtle,S.J.and Harlan,D.M.,Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates.Nat Med 1999.5:686-693.

[0323] 7 Sidiropoulos,P.I.and Boumpas,D.T.,Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients.Lupus 2004.13:391-397.

[0324] 8 Sidiropoulos,P.I.and Boumpas,D.T.,Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients.Lupus 2004.13:391-397.

[0325] 9 Ferrant,J.L.,Benjamin,C.D.,Cutler,A.H.,Kalled,S.L.,Hsu,Y.M.,Garber,E.A.,Hess,D.M.,Shapiro,R.I.,Kenyon,N.S.,Harlan,D.M.,Kirk,A.D.,Burkly,L.C.and Taylor,F.R.,The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge.Int Immunol 2004.16:1583-1594.

[0326] 10 U.S.Patent No.6,444,018

- [0327] 11 Gordon,E.J.,Markees,T.G.,Phillips,N.E.,Noelle,R.J.,Shultz,L.D.,Mordes,J.P.,Rossini,A.A.and Greiner,D.L.,Prolonged survival of rat islet and skin xenografts in mice treated with donor splenocytes and anti-CD154 monoclonal antibody.Diabetes 1998.47:1199-1206.
- [0328] 12 Markees,T.G.,Phillips,N.E.,Noelle,R.J.,Shultz,L.D.,Mordes,J.P.,Greiner,D.L.and Rossini,A.A.,Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand.Transplantation 1997.64:329-335.
- [0329] 13 Jarvinen,L.Z.,Blazar,B.R.,Adeyi,O.A.,Strom,T.B.and Noelle,R.J.,CD154 on the surface of CD4+CD25+regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance.Transplantation 2003.76:1375-1379.
- [0330] 14 Quezada,S.A.,Fuller,B.,Jarvinen,L.Z.,Gonzalez,M.,Blazar,B.R.,Rudensky,A.Y.,Strom,T.B.and Noelle,R.J.,Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance:preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation.Blood 2003.102:1920-1926.
- [0331] 15 Frleta,D.,Lin,J.T.,Quezada,S.A.,Wade,T.K.,Barth,R.J.,Noelle,R.J.and Wade,W.F.,Distinctive maturation of in vitro versus in vivo anti-CD40 mAb-matured dendritic cells in mice.J Immunother 2003.26:72-84.
- [0332] 16 Quezada,S.,Eckert,M.,Schned,A.,Noelle,R.J.and Burns,C.,Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis.Arth Rheum.2003.in press.
- [0333] 17 Elster,E.A.,Xu,H.,Tadaki,D.K.,Montgomery,S.,Burkly,L.C.,Berning,J.D.,Baumgartner,R.E.,Cruzata,F.,Marx,R.,Harlan,D.M.and Kirk,A.D.,Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody,hu5C8,prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates.Transplantation 2001.72:1473-1478.
- [0334] 18 Benda,B.,Ljunggren,H.G.,Peach,R.,Sandberg,J.O.and Korsgren,O.,Co-stimulatory molecules in islet xenotransplantation:CTLA4Ig treatment in CD40 ligand-deficient mice.Cell transplantation 2002.11:715-720.
- [0335] 19 Wekerle,T.and Sykes,M.,Mixed chimerism and transplantation tolerance.Annual review of medicine 2001.52:353-370.
- [0336] 20 Camirand,G.,Caron,N.J.,Turgeon,N.A.,Rossini,A.A.and Tremblay,J.P.,Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation.Transplantation 2002.73:453-461.
- [0337] 21 Tung,T.H.,Mackinnon,S.E.and Mohanakumar,T.,Long-term limb allograft survival using anti-CD40L antibody in a murine model.Transplantation 2003.75:644-650.
- [0338] 22 Koyama,I.,Kawai,T.,Andrews,D.,Boskovic,S.,Nadazdin,O.,Wee,S.L.,Sogawa,H.,Wu,D.L.,Smith,R.N.,Colvin,R.B.,Sachs,D.H.and Cosimi,A.B.,

Thrombophilia associated with anti-CD154 monoclonal antibody treatment and its prophylaxis in nonhuman primates. Transplantation 2004;77:460-462.

[0339] 23 Kawai,T., Andrews,D., Colvin,R.B., Sachs,D.H. and Cosimi,A.B., Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. Nat Med 2000;6:114.

[0340] 24 Daley,S.R., Cobbold,S.P. and Waldmann,H., Fc-disabled anti-mouse CD40L antibodies retain efficacy in promoting transplantation tolerance. Am J Transplant 2008;8:2265-2271.

[0341] 25 Sanchez-Fueyo,A., Domenig,C., Strom,T.B. and Zheng,X.X., The complement dependent cytotoxicity (CDC) immune effector mechanism contributes to anti-CD154 induced immunosuppression. Transplantation 2002;74:898-900.

[0342] 26 Monk,N.J., Hargreaves,R.E., Marsh,J.E., Farrar,C.A., Sacks,S.H., Millrain,M., Simpson,E., Dyson,J. and Jurcevic,S., Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. Nat Med 2003;9:1275-1280.

[0343] 27 Truscott,S.M., Abate,G., Price,J.D., Kemper,C., Atkinson,J.P. and Hoft,D.F., CD46 engagement on human CD4+T cells produces T regulatory type 1-like regulation of antimycobacterial T cell responses. Infection and immunity 2010;78:5295-5306.

[0344] 28 Cardone,J., Le Friec,G., Vantourout,P., Roberts,A., Fuchs,A., Jackson,I., Suddason,T., Lord,G., Atkinson,J.P., Cope,A., Hayday,A. and Kemper,C., Complement regulator CD46 temporally regulates cytokine production by conventional and unconventional T cells. Nature immunology 2010;11:862-871.

[0345] 29 Fuchs,A., Atkinson,J.P., Fremeaux-Bacchi,V. and Kemper,C., CD46-induced human Treg enhance B-cell responses. European journal of immunology 2009;39:3097-3109.

[0346] 30 Alford,S.K., Longmore,G.D., Stenson,W.F. and Kemper,C., CD46-induced immunomodulatory CD4+T cells express the adhesion molecule and chemokine receptor pattern of intestinal T cells. Journal of immunology 2008;181:2544-2555.

[0347] 31 Barchet,W., Price,J.D., Cella,M., Colonna,M., MacMillan,S.K., Cobb,J.P., Thompson,P.A., Murphy,K.M., Atkinson,J.P. and Kemper,C., Complement-induced regulatory T cells suppress T-cell responses but allow for dendritic-cell maturation. Blood 2006;107:1497-1504.

[0348] 32 Liszewski,M.K., Kemper,C., Price,J.D. and Atkinson,J.P., Emerging roles and new functions of CD46. Springer seminars in immunopathology 2005;27:345-358.

[0349] 33 Kawai,T., Andrews,D., Colvin,R.B., Sachs,D.H. and Cosimi,A.B., Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against

- CD40 ligand [In Process Citation]. Nat Med 2000.6:114.
- [0350] 34 Langer,F., Ingersoll,S.B., Amirkhosravi,A., Meyer,T., Siddiqui,F.A., Ahmad,S., Walker,J.M., Amaya,M., Desai,H. and Francis,J.L., The role of CD40 in CD40L-and antibody-mediated platelet activation. Thrombosis and haemostasis 2005.93:1137-1146.
- [0351] 35 Robles-Carrillo,L., Meyer,T., Hatfield,M., Desai,H., Davila,M., Langer, F., Amaya,M., Garber,E., Francis,J.L., Hsu,Y.M. and Amirkhosravi,A., Anti-CD40L immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice. J Immunol 2010.185:1577-1583.
- [0352] 36 Couzin,J., Drug discovery. Magnificent obsession. Science 2005.307: 1712-1715.
- [0353]
- [0354] 37 Hessell,A.J., Hangartner,L., Hunter,M., Havenith,C.E., Beurskens,F.J., Bakker,J.M., Lanigan,C.M., Landucci,G., Forthal,D.N., Parren,P.W., Marx,P.A. and Burton,D.R., Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. Nature 2007.449:101-104.
- [0355] 38 Armour,K.L., Clark,M.R., Hadley,A.G. and Williamson,L.M., Recombinant human IgG molecules lacking Fcgamma receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur J Immunol 1999.29:2613-2624.
- [0356] 39 Taylor,P.A., Lees,C.J., Wilson,J.M., Ehrhardt,M.J., Campbell,M.T., Noelle,R.J. and Blazar,B.R., Combined effects of calcineurin inhibitors or sirolimus with anti-CD40L mAb on alloengraftment under nonmyeloablative conditions. Blood 2002.100:3400-3407.
- [0357] 40 Noelle,R.J., Roy,M., Shepherd,D.M., Stamenkovic,I., Ledbetter,J.A. and Aruffo,A., A novel ligand on activated T helper cells binds CD40 and transduces the signal for the cognate activation of B cells. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1992.89:6550-6554.
- [0358] 41 Quezada,S.A., Bennett,K., Blazar,B.R., Rudensky,A.Y., Sakaguchi,S. and Noelle,R.J., Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation. J Immunol 2005.175:771-779.
- [0359] 42 Rossini,A.A., Parker,D.C., Phillips,N.E., Durie,F.H., Noelle,R.J., Mordes,J.P. and Greiner,D.L., Induction of immunological tolerance to islet allografts. Cell Transplant 1996.5:49-52.
- [0360] 43 Markees,T., Phillips,N., Gordon,E., Noelle,R.J., Mordes,J.P., Greiner, D.L. and Rossini,A.A., Improved skin allograft tolerance induced by treatment with donor splenocytes and an extended course of anti-CD154 monoclonal antibody. Transplant Proc 1998.30:2444-2446.
- [0361] 44 Markees,T.G., Appel,M.C., Noelle,R.J., Mordes,J.P., Greiner,D.L. and

Rossini,A.A.,Tolerance to islet xenografts induced by dual manipulation of antigen presentation and co-stimulation.Transplantation Proceedings 1996.28: 814-815.

[0362] 45 van den Eertwagh,A.J.,Van Meurs,M.,Foy,T.M.,Noelle,R.J.,Boersma,W.J.and Claassen,E.,In vivo gp39-CD40 interactions occur in the non-follicular compartments of the spleen and are essential for thymus dependent antibody responses and germinal center formation.Adv Exp Med Biol 1994.355: 75-80.

[0363] 46 van,den,Eertwagh,Aj,Van,M.M.,Foy,T.M.,Noelle,R.J.,Boersma,W.J.and Claassen,E.,In vivo gp39-CD40 interactions occur in the non-follicular compartments of the spleen and are essential for thymus dependent antibody responses and germinal center formation.Advances in experimental medicine and biology 1994.355:75-80.

[0364] 47 Foy,T.M.,Laman,J.D.,Ledbetter,J.A.,Aruffo,A.,Claassen,E.and Noelle,R.J.,gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory.J.Exp.Med.1994.180:157-164.

[0365] 48 Gerritse,K.,Laman,J.D.,Noelle,R.J.,Aruffo,A.,Ledbetter,J.A.,Boersma,W.J.and Claassen,E.,CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis.National Academy of Sciences,Washington,D.c,Proceedings of the National Academy of Sciences 1996.93:2499-2504.

[0366] 49 Nagelkerken,L.,Haspels,I.,van Rijs,W.,Blauw,B.,Ferrant,J.L.,Hess,D.M.,Garber,E.A.,Taylor,F.R.and Burkly,L.C.,FcR interactions do not play a major role in inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by anti-CD154 monoclonal antibodies.J Immunol 2004.173:993-999.

[0367] 50 Becher,B.,Durell,B.G.and Noelle,R.J.,Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12.J Clin Invest 2002.110:493-497.

[0368] 51 Becher,B.,Durell,B.G.,Miga,A.V.,Hickey,W.F.and Noelle,R.J.,The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system.J Exp Med 2001.193:967-974.

[0369] 52 Howard,L.M.,Miga,A.J.,Vanderlugt,C.L.,Dal Canto,M.C.,Laman,J.D.,Noelle,R.J.and Miller,S.D.,Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L(CD154) antibody in an animal model of multiple sclerosis.J Clin Invest 1999.103:281-290.

[0370] 在本发明的背景中,详细的说明和实施例中引用的每篇文献(包括专利、专利申请、期刊文章、摘要、手册、书籍或其他公开内容)的全部公开内容通过提及以其整体并入本文中。

[0371] 根据以上详细的描述,可对本发明做出这些和其他改变。一般地,在下面的权利要求中,所使用的术语不应被解释为将本发明局限于说明书和权利要求书中公开的具体实施例。因此,本发明不受本公开的限制,而是本发明的范围完全通过以下权利要求确定。

[0372] 本发明可以以不同于上述描述和实施例中具体描述的方式来实践。根据上述教导,本发明的许多修改和变化是可能的,并且因此在所附权利要求的范围内。

[0373] 更具体地,本申请提供下列各项:

[0374] 1.一种人源化的抗人CD154抗体,其包含(i)可变重链多肽,其包含具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:15、17和18的序列的多肽,或由具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:15、17和18的序列的多肽组成,和(ii)可变轻链多肽,其包含具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30和31的序列的多肽,或由具有选自图2A-2C所示的SEQ ID NO:20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30和31的序列的多肽组成,条件是所述人源化的抗人CD154抗体不包含SEQ ID NO:15的可变重链多肽和SEQ ID NO:20的可变轻链多肽。

[0375] 2.一种人源化的抗人CD154抗体,其包含(i)可变重链多肽,其包含具有如图1A-C所示的SEQ ID NO:1的序列的多肽,或由具有如图1A-C所示的SEQ ID NO:1的序列的多肽组成,和(ii)可变轻链多肽,其包含具有图1A-C所示的SEQ ID NO:2的序列的多肽,或由具有图1A-C所示的SEQ ID NO:2的序列的多肽组成。

[0376] 3.项1或2的抗人CD154抗体,其包含IgG1、IG2、IgG3或IgG4恒定区,所述恒定区缺乏结合C1Q和与Fc γ R2和/或Fc γ R3结合的能力。

[0377] 4.项1或2的抗人CD154抗体,其包含人IgG1恒定区,所述恒定区缺乏结合C1Q和与FcR γ 2和/或FcR γ 3结合的能力。

[0378] 5.项4的人源化的抗人CD154抗体,其中,所述人IgG1恒定区包含E269R和K322A突变(根据Kabat编号)。

[0379] 6.项1-5中任一项的人源化的抗人CD154抗体,其包含图1A-C所示的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:2的IgG1轻链和重链恒定区。

[0380] 7.项1-6中任一项的人源化的抗人CD154抗体,其中,所述抗体是IgG1同种型,并且使所述抗体的Fc区进一步突变以引入影响效应器功能的至少一个其他突变,如损害FcRn结合的突变,损害或消除糖基化的突变,或损害抗体结合FcR如Fc γ R2或Fc γ R3或另一个FcR的能力或损害与补体结合的能力的另一个突变。

[0381] 8.项1-7中任一项的人源化的抗人CD154抗体,其中,所述抗体是IgG1同种型,并且使所述抗体的Fc区突变以进一步引入E233P和/或D265A突变或表1、2或3中鉴定的任意Fc突变。

[0382] 9.项1-8中任一项的人源化的抗人CD154抗体,其中,所述抗体是IgG1同种型,并且使所述抗体的Fc区突变以引入E233P突变。

[0383] 10.项1-9中任一项的人源化的抗人CD154抗体,其中,使所述抗体的Fc区进一步突变以引入一个或多个改善体内半衰期的其他突变。

[0384] 11.一种药物组合物,其包含治疗或预防有效量的至少一个根据项1-10中任一项的人源化的抗人CD154抗体。

[0385] 12.项11的组合物,其进一步包含抗原、细胞、组织或器官。

[0386] 13.项12的组合物,其中,所述抗原是自身抗原、变应原、炎性剂、药物或非HLA匹配的(同种异体)或异种(非人)供体细胞。

[0387] 14.一种免疫抑制或免疫治疗的方法,其使用根据项1-13中任一项的抗体或组合物。

[0388] 15.一种通过施用根据项1-13中任一项的抗体或组合物来治疗患有过敏性、炎性或自身免疫性病症的受试者或移植受体的方法。

[0389] 16.一种在移植可任选地经遗传改造的供体组织、器官或细胞之前、同时或之后通过施用根据项1-13中任一项的抗体或组合物来治疗或预防受试者中的GVHD的方法。

[0390] 17.项16的方法,其中,所述细胞是CAR-T或NK细胞。

[0391] 18.一种通过施用根据项1-13的抗体或组合物来引出耐受性或延长的抗原特异性免疫抑制的方法。

[0392] 19.项18的方法,其中,所述方法进一步包括施用细胞、抗原、组织或器官,其包含针对其会引发耐受性或延长的免疫抑制的抗原。

[0393] 20.一种基因、细胞、组织或器官治疗的方法,其包括施用根据项1-13中任一项的抗体或组合物。

[0394] 21.项15的方法,其中,治疗的状况选自银屑病、类风湿性关节炎、银屑病性关节炎、卵巢炎、狼疮或SLE、糖尿病、IBD、克罗恩病(Crohn's disease)、ITP、甲状腺炎、类风湿性关节炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮、格雷夫斯病(Graves' disease)、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、糖尿病、炎性肠病、克罗恩病、多发性硬化症、银屑病、药物诱导的自身免疫性疾病或药物诱导的狼疮。

[0395] 22.一种处理用于在细胞治疗或器官或骨髓移植中使用的骨髓、器官或免疫细胞的方法,其包括与根据项1-13中任一项的抗体或组合物一起温育所述骨髓、器官、组织或免疫细胞。

[0396] 23.项22的方法,其中,治疗的骨髓、组织、器官或免疫细胞包含供体和/或受体T细胞。

[0397] 24.一种在有此需要的患者中诱导耐受性而不引起血栓形成事件的方法,其包括向患者施用有效量的根据项1-13中任一项的抗体或组合物。

[0398] 25.项24的方法,其进一步包括施用抗原。

[0399] 26.项25的方法,其中,抗原是自身抗原、变应原、炎性剂、药物或非HLA匹配的(同种异体)供体细胞。

[0400] 27.项24-26的方法,其中,患者会接受或已经接受移植细胞、器官或组织。

[0401] 28.项26的方法,其中,所述药物是生物的,如治疗抗体、受体、融合蛋白、激素、生长因子或细胞因子。

[0402] 29.一种通过施用有效量的根据项1-13中任一项的抗体或组合物来治疗T细胞介导的自身免疫性病症的方法。

[0403] 30.一种通过施用有效量的根据项1-13中任一项的抗体或组合物来治疗B细胞介导的自身免疫性病症的方法。

[0404] 31.项29的方法,其中,所述疾病是选自以下的自身免疫性疾病:类风湿性关节炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮、格雷夫斯病、亨廷顿病、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫

血、糖尿病、帕金森病、银屑病、艾迪生病 (Addison's disease)、多发性硬化症、狼疮和药物诱导的自身免疫性疾病，例如药物诱导的狼疮。

[0405] 32. 项29-21的方法，其包括施用抗原。

[0406] 33. 一种通过施用有效量的根据项1-13中任一项的抗体或组合物来治疗或预防 GVHD、骨髓移植 (BMT)、多发性硬化症、狼疮、ITP、类风湿性关节炎、哮喘、IBD 或另一种炎性肠病的方法。

[0407] 34. 一种治疗全部或部分由CD40信号介导的人的状况、病症或疾病，或任何前述的症状的方法，所述方法包括施用有效量的根据项1-13中任一项的抗体或组合物。

[0408] 35. 项34的方法，其中，所述人的状况、病症或疾病是炎症、过敏性或自身免疫性反应或纤维化。

[0409] 36. 项34或35的方法，其中，所述人的状况、病症或疾病选自狼疮性肾炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、脊柱关节炎、药物诱导的红斑狼疮、炎性肠病、克罗恩病、银屑病和多发性硬化症。

[0410] 37. 项34的方法，其中，所述人的状况、病症或疾病选自过敏性接触性皮炎、普秃、类过敏性紫癜性哮喘、重度哮喘、代谢性哮喘、过敏性哮喘、特应性皮炎、疱疹样皮炎、持久隆起性红斑、边缘性红斑、多形性红斑；结节性红斑、过敏性肉芽肿、环状肉芽肿、粒细胞减少、超敏性肺炎、角膜炎、肾病综合征、重叠综合征、养鸽者病、特发性多神经炎、荨麻疹、葡萄膜炎、青少年型皮肌炎和白斑。

[0411] 38. 项34的方法，其中，所述人的状况、病症或疾病选自过敏性支气管肺曲霉病；自身免疫性溶血性贫血；黑棘皮病；过敏性接触性皮炎；艾迪生病；特应性皮炎；斑秃；普秃；淀粉样变性；类过敏性紫癜；类过敏性反应；再生障碍性贫血；血管性水肿，遗传性；血管性水肿，特发性；强直性脊柱炎；动脉炎，颅；动脉炎，巨细胞；动脉炎，Takayasu的；动脉炎，颞；哮喘；共济失调-毛细血管扩张；自身免疫性卵巢炎；自身免疫性睾丸炎；自身免疫性多内分泌腺衰竭；贝塞特病 (*Behcet's disease*)；贝格尔病 (*Berger's disease*)；伯格病 (*Buerger's disease*)；大疱性天疱疮；念珠菌病，慢性粘膜皮肤；卡普兰综合征 (*Caplan's syndrome*)；心肌梗塞后综合征；心包切开后综合征；心肌炎；乳糜泻；恰加斯病 (*Chagas's disease*)；Chédiak-Higashi综合征；Churg-Strauss病；寇甘综合征 (*Cogan's syndrome*)；冷凝集素病；肢端硬皮综合征 (*crest syndrome*)；克罗恩病；冷球蛋白血症；隐源性纤维化肺泡炎；疱疹样皮炎；皮肌炎；糖尿病；Diamond-Blackfan综合征；迪格奥尔格综合征 (*DiGeorge syndrome*)；盘状红斑狼疮；嗜酸性细胞性筋膜炎；巩膜外层炎；持久隆起性红斑；边缘性红斑；多形性红斑；结节性红斑；家族性地中海热；费尔蒂综合征 (*Felty's syndrome*)；肺纤维化；肾小球肾炎，类过敏性；肾小球肾炎，自身免疫性；肾小球肾炎，链球菌感染后；肾小球肾炎，移植后；肾小球病，膜性；古德帕斯丘综合征 (*Goodpasture's syndrome*)；移植物抗宿主病；粒细胞减少，免疫介导的；环状肉芽肿；肉芽肿病，过敏性；肉芽肿性肌炎；格雷夫斯病 (*grave's disease*)；桥本甲状腺炎 (*Hashimoto's thyroiditis*)；新生儿溶血病；血色素沉着病，特发性；**Henoch-Schönlein**紫癜；肝炎，慢性活动性和慢性进行性；组织细胞增多症x；高嗜酸粒细胞综合征；特发性血小板减少性紫癜；约伯综合征 (*Job's syndrome*)；青少年型皮肌炎；青少年型类风湿性关节炎（青少年型慢性关节炎）；川崎病 (*Kawasaki's disease*)；角膜炎；干燥性角膜结膜炎；Landry-Guillain-Barre-Strohl综合征；麻风，瘤

型;吕弗勒综合征 (Loeffler's syndrome);莱尔综合征 (Leyell's syndrome);莱姆病;淋巴瘤样肉芽肿病;肥大细胞增多症,系统性;混合性结缔组织病;多发性单神经炎;Muckle-Wells综合征;皮肤粘膜淋巴结综合征;皮肤粘膜淋巴结综合征;多中心网状组织细胞增多症;多发性硬化症;重症肌无力;蕈样肉芽肿病 (mycosis fungoides);坏死性血管炎,系统性;肾病综合征;重叠综合征;脂膜炎;阵发性冷性血红蛋白尿症;阵发性夜间血红蛋白尿症;类天疱疮;天疱疮;红斑型天疱疮;落叶型天疱疮;寻常型天疱疮;养鸽者病;肺炎,超敏性;结节性多动脉炎;风湿性多肌痛;多肌炎;多神经炎,特发性;葡萄牙家族性多神经病变;先兆子痫/子痫;原发性胆汁性肝硬化;进行性系统性硬化症(硬皮病);银屑病;银屑病性关节炎;肺泡蛋白沉积症;肺纤维化,雷诺现象/综合征 (Raynaud's phenomenon/syndrome);里德尔甲状腺炎 (Reidel's thyroiditis);瑞特综合征 (Reiter's syndrome),复发性多软骨炎;风湿热;类风湿性关节炎;结节病;巩膜炎;硬化性胆管炎;血清病;塞扎里综合征 (Sézary syndrome);舍格伦综合征 (Sjögren's syndrome);Stevens-Johnson综合征;斯蒂尔病 (Still's disease);亚急性硬化性全脑炎;交感性眼炎;系统性红斑狼疮;移植排斥;溃疡性结肠炎;未分化结缔组织病;荨麻疹,慢性;荨麻疹,寒冷致;葡萄膜炎;白斑;Weber-Christian病;韦格纳肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis);和Wiskott-Aldrich综合征。

序列表

<110> 里姆蒙埃克斯特股份有限公司

<120> 具有改善的结合、功能和安全性特征的抗CD154抗体及其在人免疫治疗中的用途

<130> 43260.2613

<140> TBA

<141> 2016-07-13

<150> 62/192269

<151> 2015-07-14

<150> 62/197966

<151> 2015-07-28

<150> 62/277201

<151> 2016-01-11

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> INX021可变重链

<400> 1

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly

20 25 30

Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Tyr Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> INX021可变轻链

<400> 2

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ser Asn Leu Gly His Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 3

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> INX021恒定重链

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85	90	95
Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Arg Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330	
<210> 4		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> INX021恒定轻链		
<400> 4		
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		

1	5	10	15												
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
			20					25					30		
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
					35				40			45			
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
					50		55			60					
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
					65		70		75			80			
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
					85			90			95				
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
					100			105							
<210>	5														
<211>	10														
<212>	PRT														
<213>	小家鼠														
<400>	5														
Gly	Asp	Ser	Ile	Thr	Asn	Gly	Phe	Trp	Ile						
			1	5					10						
<210>	6														
<211>	9														
<212>	PRT														
<213>	小家鼠														
<400>	6														
Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr							
			1	5											
<210>	7														
<211>	13														
<212>	PRT														
<213>	小家鼠														
<400>	7														
Tyr	Arg	Ser	Tyr	Gly	Arg	Thr	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr			
			1	5					10						
<210>	8														
<211>	11														
<212>	PRT														
<213>	小家鼠														
<400>	8														

Lys Ala Ser Ser Asn Leu Gly His Ala Val Ala
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 9

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 10

Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 11
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 12
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> IDEC-131
 <400> 12
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 13
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 13

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Arg Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Ala Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
325	330		
<210> 14			
<211> 330			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 恒定重链序列共有序列			
<400> 14			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1	5	10	15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
20	25	30	
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35	40	45	
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50	55	60	
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
85	90	95	
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
100	105	110	
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
115	120	125	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
130	135	140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
165	170	175	
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
180	185	190	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
195	200	205	
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
210	215	220	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu			

225	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
245	250	255	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
275	280	285	
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
325	330		
<210> 15			
<211> 120			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> IDEC-131可变重链序列			
<400> 15			
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly			
20	25	30	
Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met			
35	40	45	
Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
50	55	60	
Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala			
85	90	95	
Cys Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln			
100	105	110	
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
115	120		
<210> 16			
<211> 120			
<212> PRT			

<213> 小家鼠

<400> 16

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly
 20 25 30
 Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Tyr Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly
 20 25 30
 Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Tyr Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变重链序列共有序列

<400> 18

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Thr Asn Gly

20 25 30

Phe Trp Ile Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met

35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Tyr Arg Ser Tyr Gly Arg Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Ile Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 20		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> IDEC_AB2-IMX可变轻链序列		
<400> 20		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Ile Thr Ala		
20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 21		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 可变轻链序列30		
<400> 21		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Gly His Ser Leu Gly Thr Ala		
20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
50	55	60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 22
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 可变轻链序列25
 <400> 22
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Leu Asn His Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 可变轻链序列22
 <400> 23
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ser Asn Leu Gly Asn Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 24		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 可变轻链序列21		
<400> 24		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Ser Asn Leu Gly His Ala		
20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 25		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 可变轻链序列28		
<400> 25		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly		
15		

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Pro Ser Ser Leu Gly His Ala			
20	25	30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105		
<210> 26			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 可变轻链序列23			
<400> 26			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Ser Ser Pro Leu Gly His Ala			
20	25	30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105		
<210> 27			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 可变轻链序列31			

<400> 27

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1					5					10				15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Asn	Gln	Pro	Leu	Gly	His	Ala
				20					25				30		
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
				35					40				45		
Tyr	Ser	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly
				50					55			60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70					75				80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Pro	Tyr
				85					90				95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
				100					105						

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链序列29

<400> 28

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1					5					10				15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Gly	Asn	Gln	Pro	Leu	Gly	His	Ala
				20					25				30		
Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
				35					40				45		
Tyr	Ser	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly
				50					55			60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70					75				80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Pro	Tyr
				85					90				95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
				100					105						

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链序列27

<400> 29

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln His Leu Gly His Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链序列26

<400> 30

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln His Leu Gly Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链序列24

<400> 31

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Pro Gln Asn Leu Gly Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 可变轻链序列共有序列

<400> 32

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Leu Gly His Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Tyr Pro Tyr

85

90

95

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

重链

以粗体显示可变区

以黄色高亮的CDR

在亲和力成熟突变的残基下划线

以红色显示Fc突变(E→R和K→A)

10	20	30	40	50	60
EVQLQESGPG	LVKPSETLSL	TCTVSGDSIT	NGFWIWIRKP	PGNKLEYMGY	ISYSGSTYYN
70	80	90	100	110	120
PSLKSRISIS	RDTSKNQFSL	KLSSVTAADT	GVYYCA <u>R</u> SY	GRTPYYFD <u>W</u>	GQGTTLTVSS
130	140	150	160	170	180
ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
190	200	210	220	230	240
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHKPS	NTKVDKKAEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG
250	260	270	280	290	300
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	H <u>R</u> DPEVKFN <u>W</u>	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
310	320	330	340	350	360
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKC <u>A</u> VSNKA	LPAPIEK <u>T</u> IS	KAKGQP <u>RE</u> P <u>Q</u>	VYTLPPSRDE
370	380	390	400	410	420
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTPPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW
430	440	450			
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK			

图1A

轻链

以粗体显示可变区

以黄色高亮的CDR

在亲和力成熟突变的残基下划线

10	20	30	40	50	60
DIVMTQSPSF	LSASVGDRVT	ITCKASS <u>NL</u> G	HA <u>VA</u> WYQQ <u>KP</u>	GKSPKLLIYS	ASNRYTGVPD
70	80	90	100	110	120
RFSGSGSGTD	FTLT <u>I</u> SSI <u>L</u> QP	EDFADYFCQQ	Y <u>DD</u> Y <u>P</u> TY <u>F</u> GG	GTKLEIKRTV	AAPSVFIFPP
130	140	150	160	170	180
SDEQLKSGTA	SVVCLLNNFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSTLT
190	200	210			
LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	R <u>G</u> EC		

图1B

INX021 序列**可变重链 (SEQ ID NO.1)**

EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSITNGFWIWIWRKPPGNKLEYMGYISYSGSTYYNPSLKSRIISR
DTSKNQFSLKLSSVTAADTGVYYCAYRSYGRTPYYFDYWGQGTTLTVSS

可变轻链 (SEQ ID NO.2)

DIVMTQSPSFLSAVGDRVTITCKASSNLGHAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSTDF
TLTISSLQPEDFADYFCQQYDDYPYTFGGGTKLEIK

恒定重链 (SEQ ID NO.3)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWNNSGALTSGVHTFPAPVLQSSGLYSLSSVVTVP
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPKPKDLMISRTP
TCVVVDVSHRDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

恒定轻链 (SEQ ID NO.4)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

INX021 可变重链 CDR1 (SEQ ID NO:5)

GDSITNGFWI

INX021 可变重链 CDR2 (SEQ ID NO:6)

YISYSGSTY

INX021 可变重链 CDR3 (SEQ ID NO:7)

YRSYGRTPYYFDY

INX021 可变轻链 CDR1 (SEQ ID NO:8)

KASSNLGHAVA

INX021 可变轻链 CDR2 (SEQ ID NO:9)

SASNRYT

INX021 可变轻链 CDR3 (SEQ ID NO:10)

QQYDDYPYT

图1C

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GG1	A	S	T	C	P	S	V	E	P	A	G
IDE-131	A	S	T	C	P	S	S	G	V	H	
IDE-131	A	S	T	C	P	S	S	G	V	H	

共具有 ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNGALTSGVHTFPAVQSSGGLYISSVVVTPVSSSLGTTYICNVNKKPSNTKVDKKAEP

	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
BG1	SCC	CTT	TTC	TTG	GGT	GGG	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT
DEC-131	SCC	CTT	TTC	TTC	GGT	GGG	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT
背景	SCC	CTT	TTC	TTC	GGT	GGG	TTT	TTT	TTT	TTT	TTT

共有 KSCD KTH C P C P P A P E L U G P S V F L P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y D G V E H N A K T K P R E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K

	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GG1	STC	SNK	APR	ITIS	AQG	PQV	PPS	SHO	SLT	LIV	SCE
IDE-131	STTC	SNKA	APRIT	IS	AQGP	PQVY	TP	SLT	QVSLT	PPV	SEW
亲本	AVANNA	IPAK	ITIS	AP	ITIS	AGC	PPQV	Y	PPV	PPV	PPV

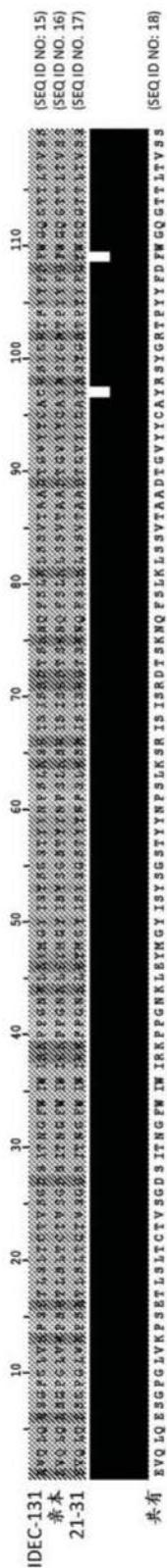
共有有EYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPOVYTULLPSRDELTKNQVSLLTCLVKGFYPSDIAVENESNGOPENNYKTTPPPVLDSDGSSEFLYSKLTVDSKRW

恒定重链序列
301 310 320 330

 IgG1 QGKVVQSYWVQALNNYTTQSISLSSPQG
 IgG2a QGKVVQSYWVQALNNYTTQSISLSSPQG
 IgG2b QGKVVQSYWVQALNNYTTQSISLSSPQG
 IgG3 QGKVVQSYWVQALNNYTTQSISLSSPQG
 IgG4 QGKVVQSYWVQALNNYTTQSISLSSPQG
 IgM QGKVVQSYWVQALNNYTTQSISLSSPQG
 IgA1 QGKVVQSYWVQALNNYTTQSISLSSPQG
 IgA2 QGKVVQSYWVQALNNYTTQSISLSSPQG
 (SEQ ID NO: 11)
 (SEQ ID NO: 12)
 (SEQ ID NO: 13)
 (SEQ ID NO: 14)

共有 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14)

图2A



可变重链序列

图2B

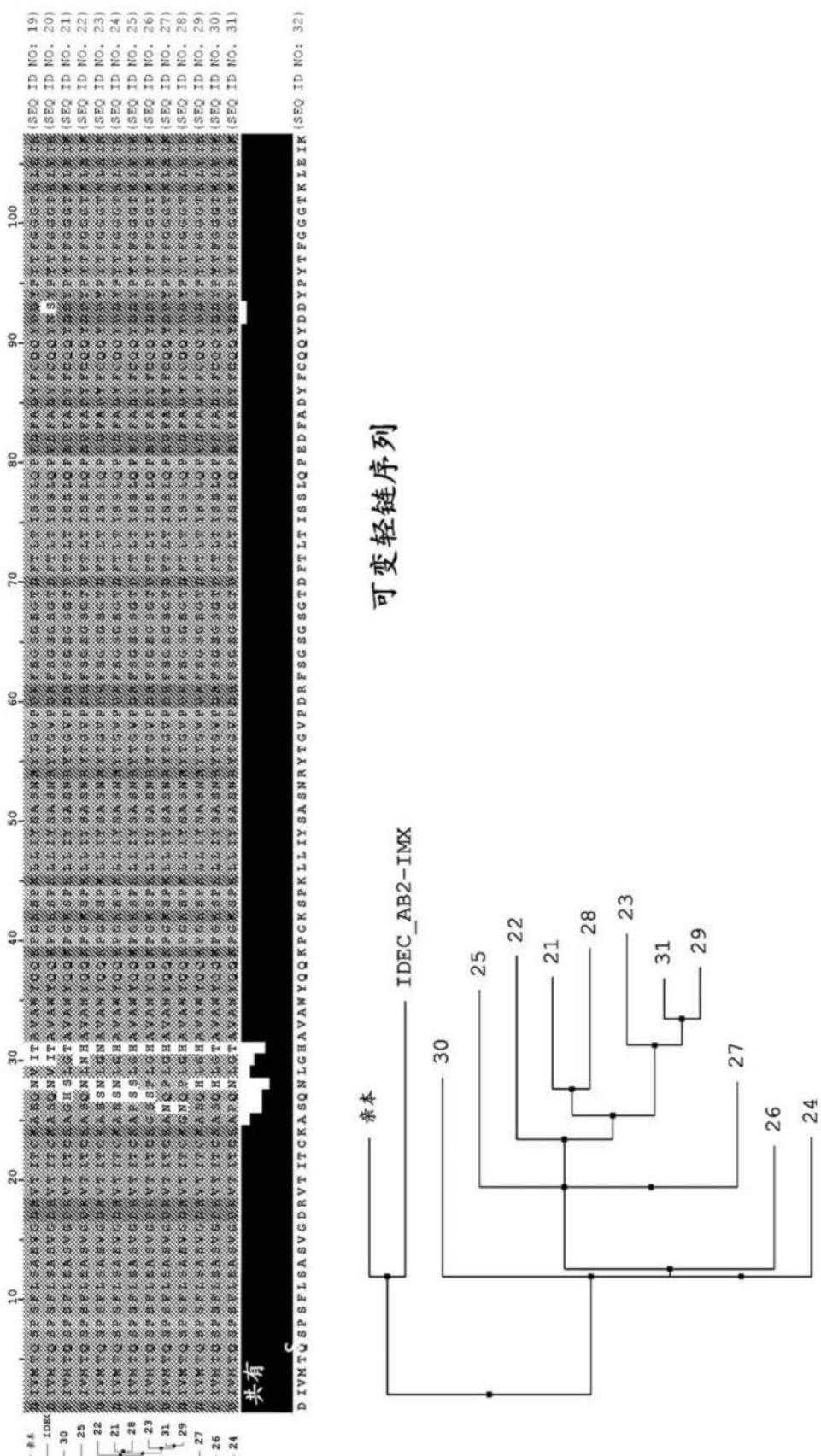


图2C

改善的效力：使用IDECK表位

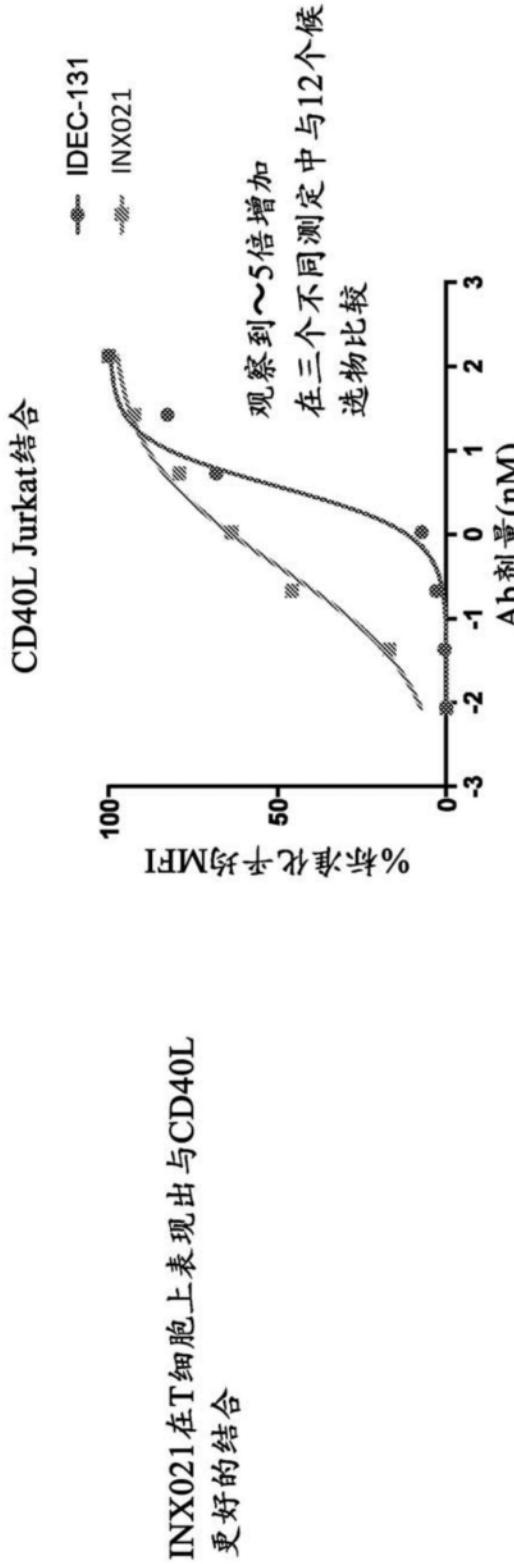


图3

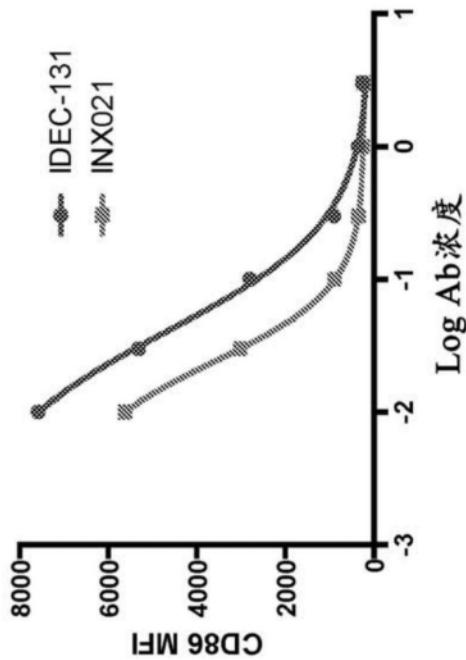


图4

INX021显示更有效的抑制T细胞
CD40L驱动的B细胞活化

hIgG抗mCD40L的FcR突变体诱导耐受性

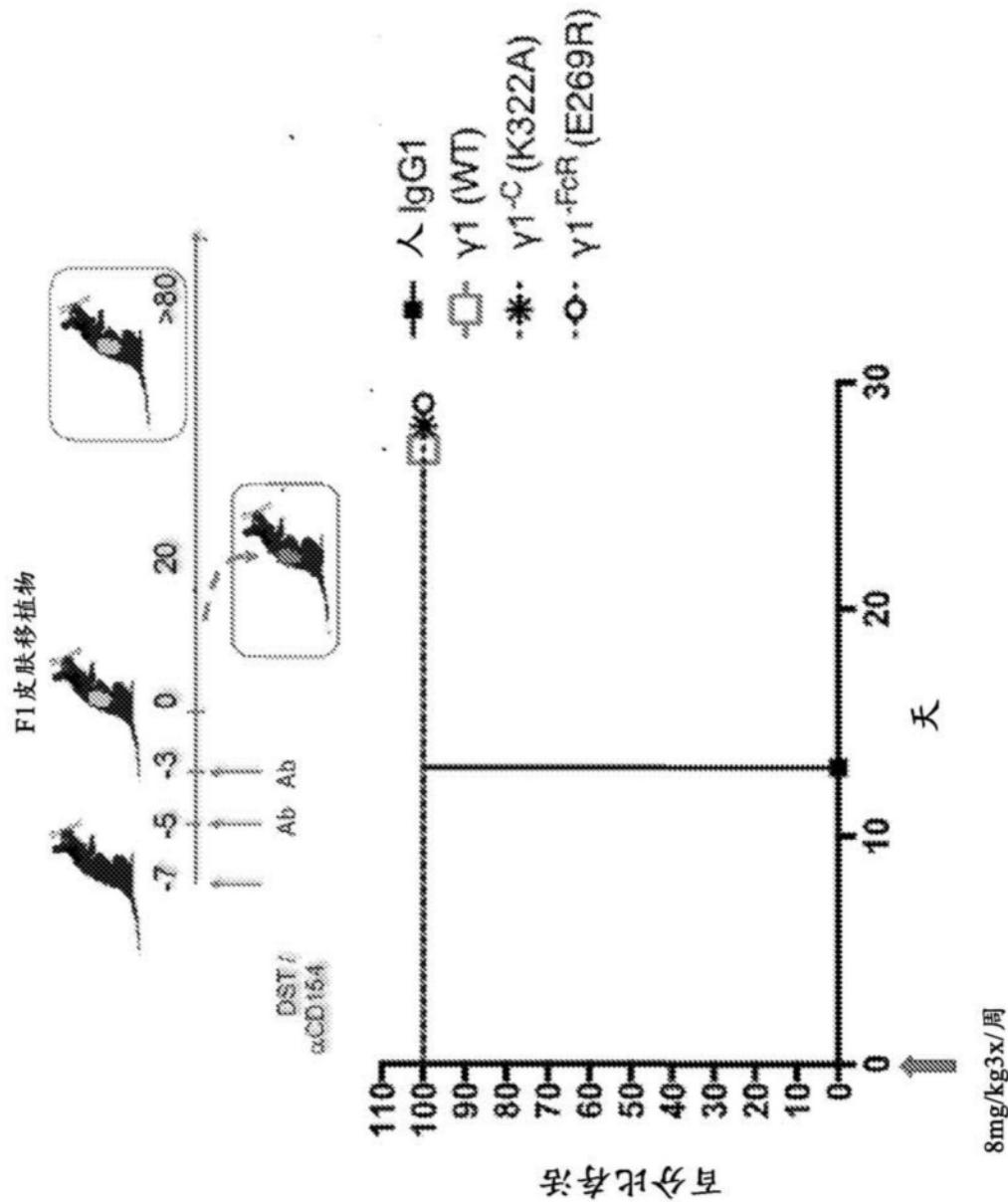


图5

hIgG1 抗CD40L 的FcR突变体不诱导血小板聚集

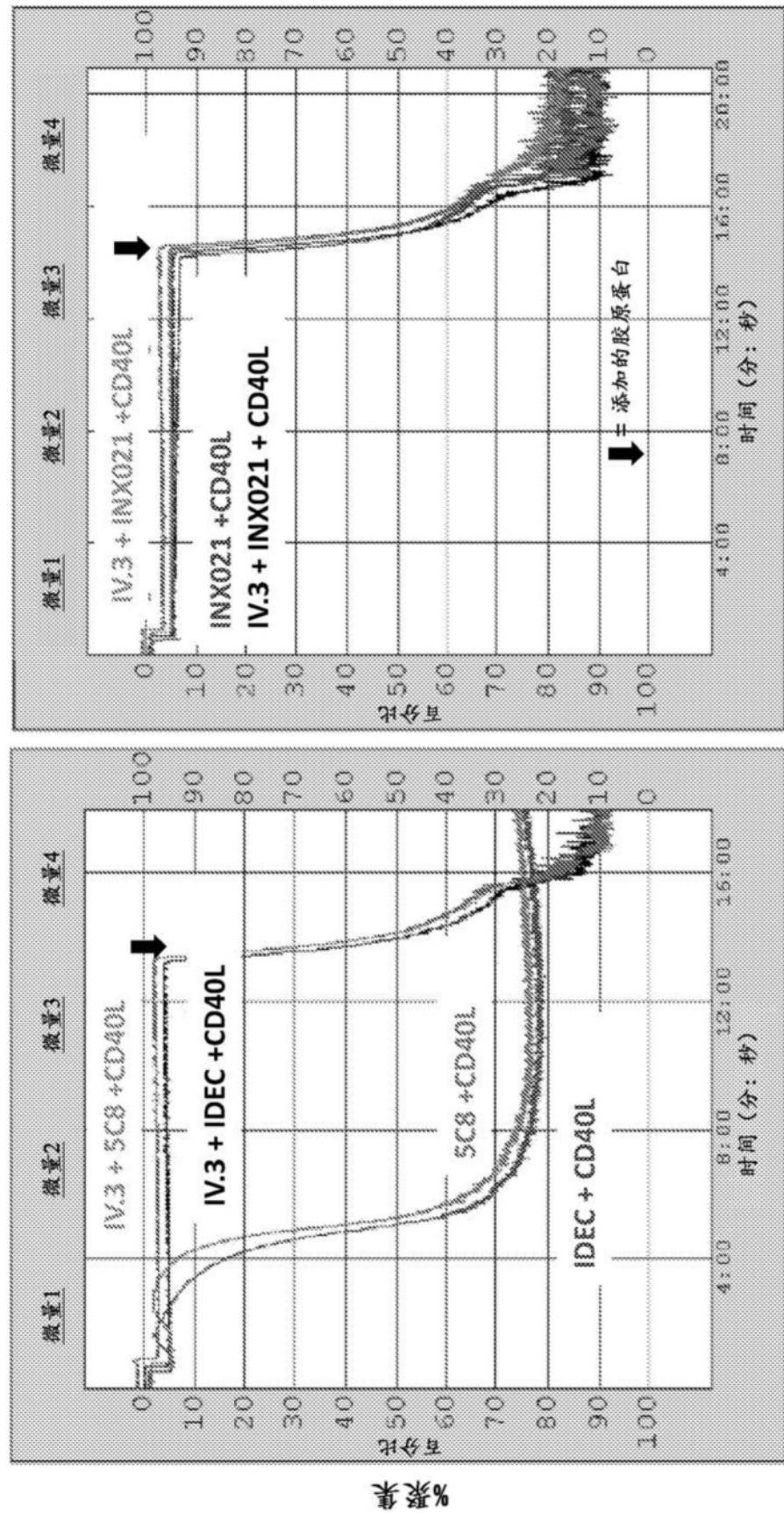


图6

hIgG1抗huCD40L的FcR突变体在体内缺乏血小板活性

FcR突变体不会诱导血栓应激、减少的血小板数量或肺部凝血。

血栓应激

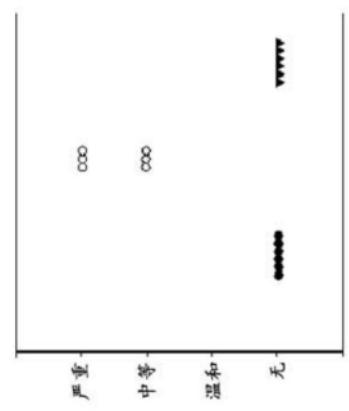


图7A

循环

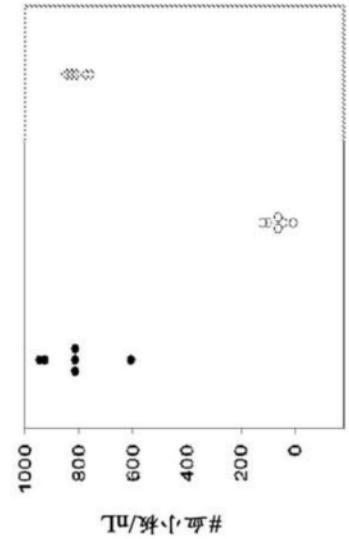


图7C

免疫复合物诱导的血小板减少模型：

FcγRIIa Tg 小鼠

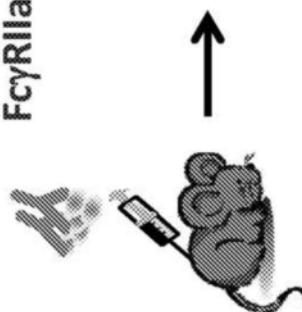


图7D

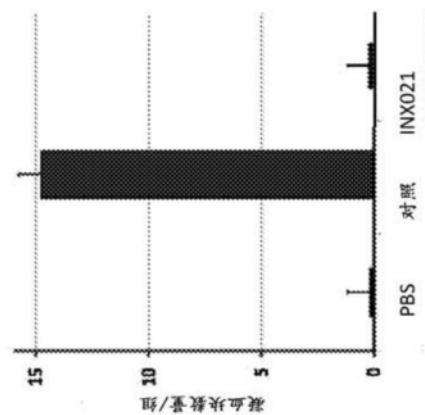


图7B

FcR / C1q突变体抗mCD40L ab的活性

FcR / C1q结合突变体在感兴趣的模型例如EAE，对MOG的耐受性和免疫应答中仍然有活性。

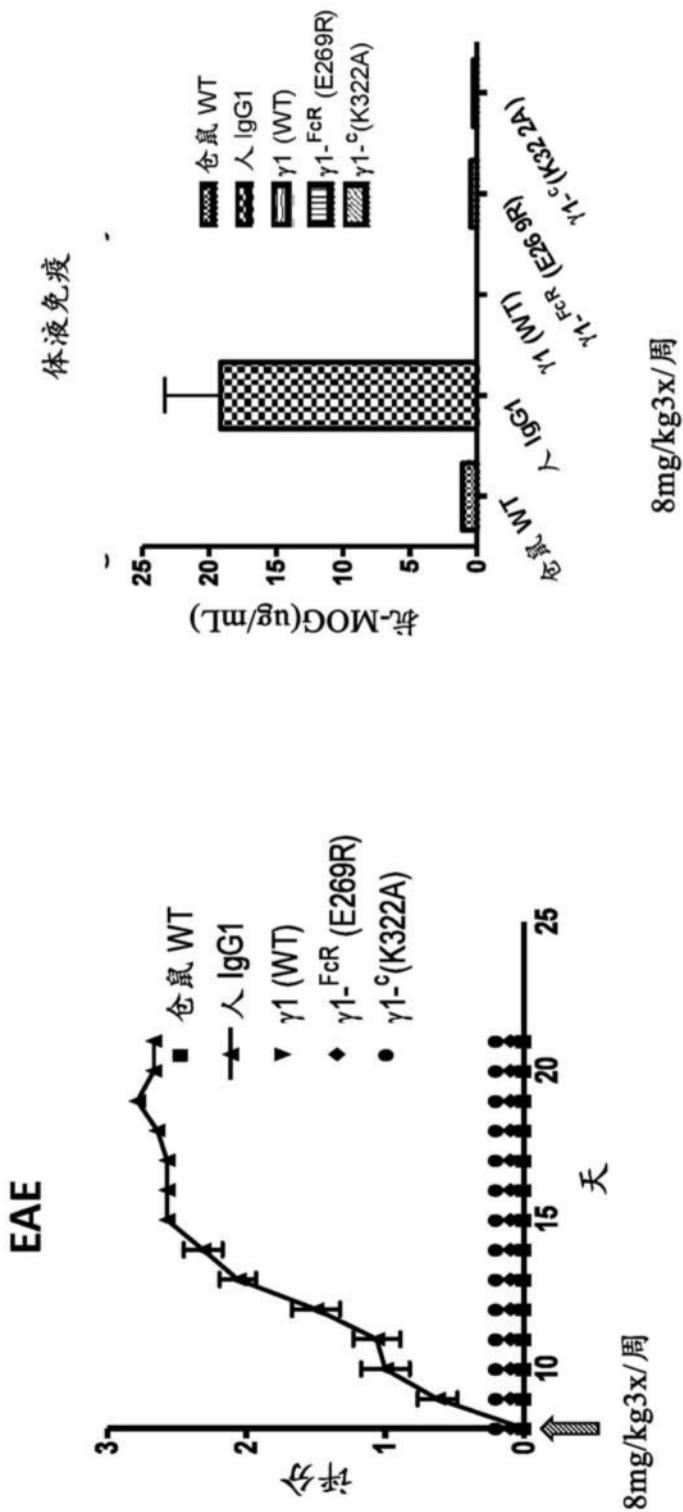


图8A

图8B

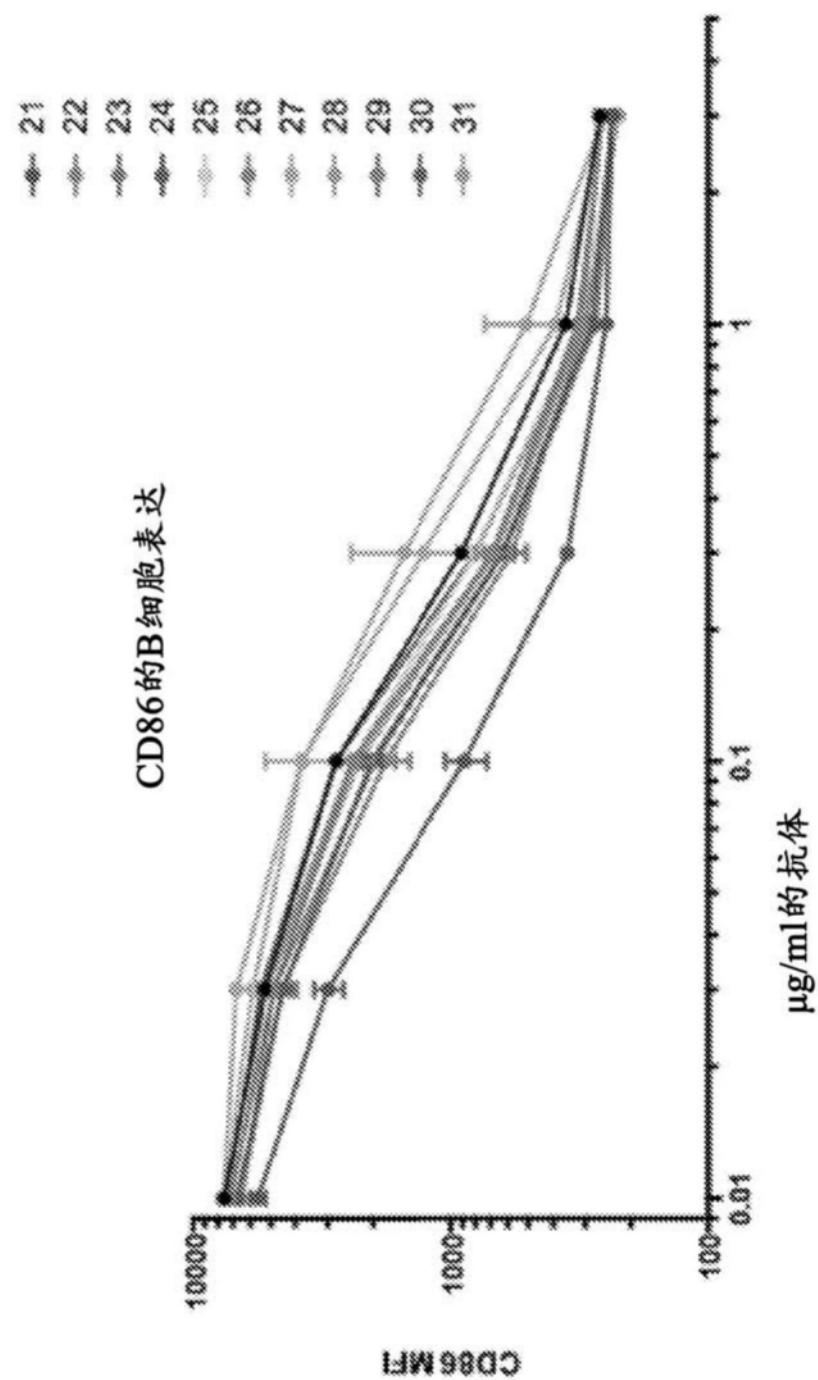


图9

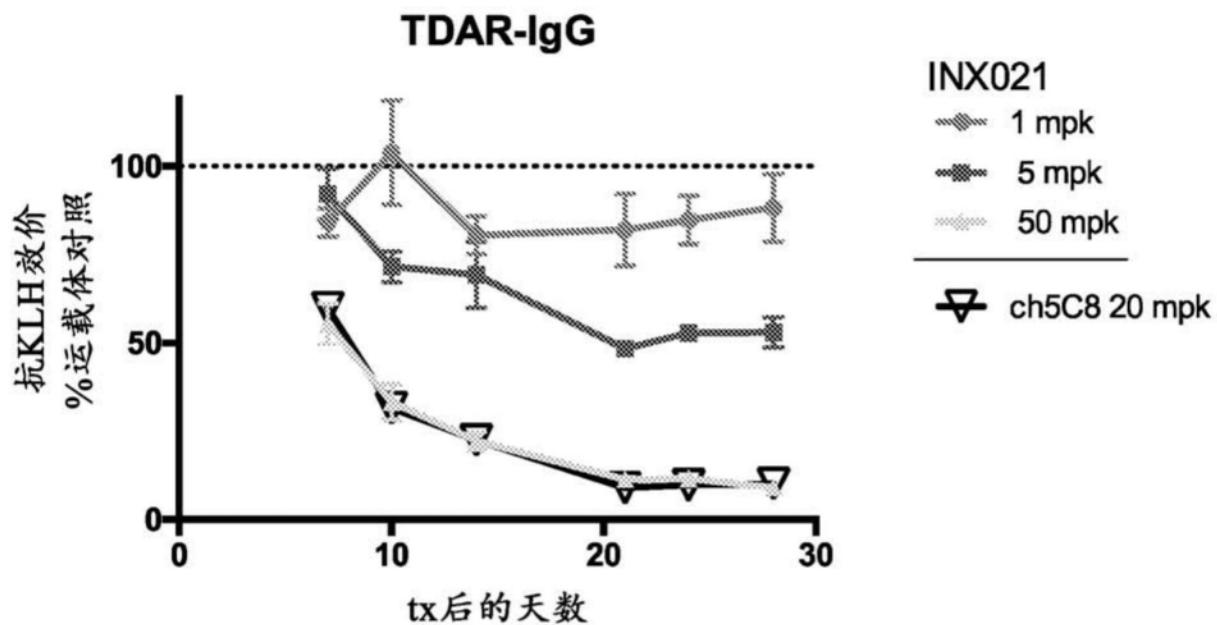
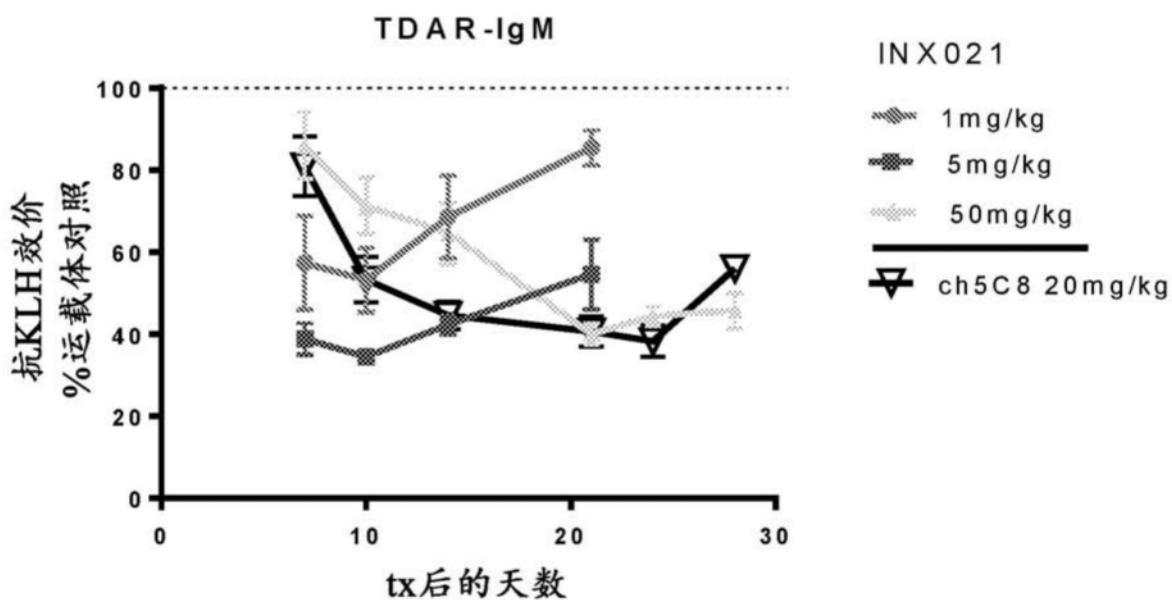


图10A



TDAR结果: IgG TDAR (TOP) 与盐水对照 (虚线) 比较。IgM TDAR (底部) 与盐水对照 (虚线) 比较。

图10B

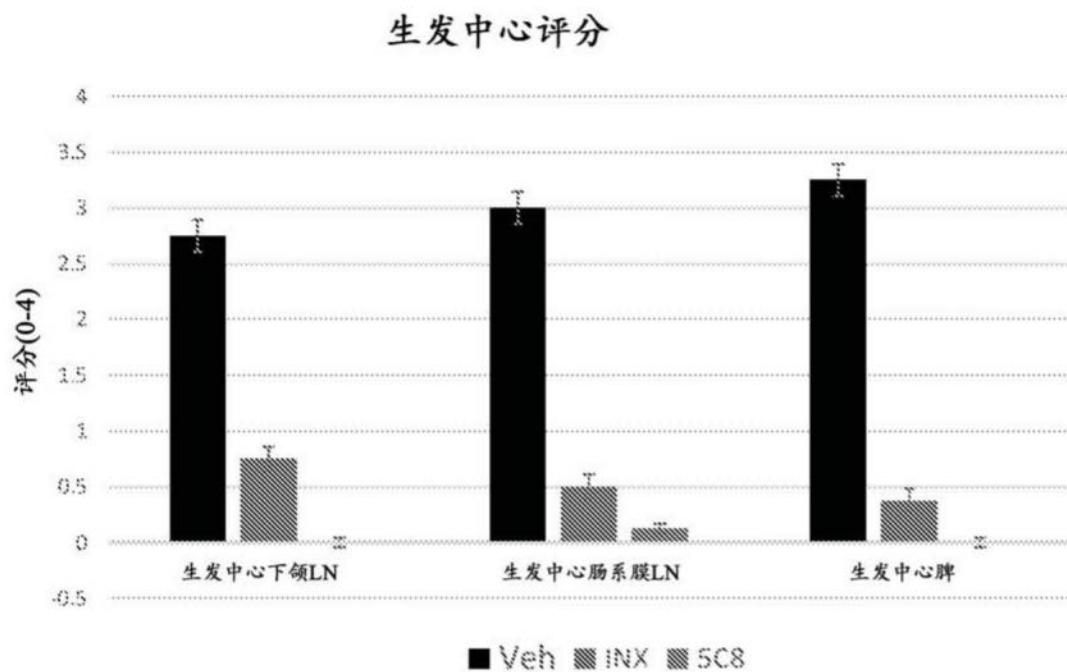


图11A

生发中心评分（以上）：治疗的动物的脾和LN中的生发中心的细胞数量和程度。

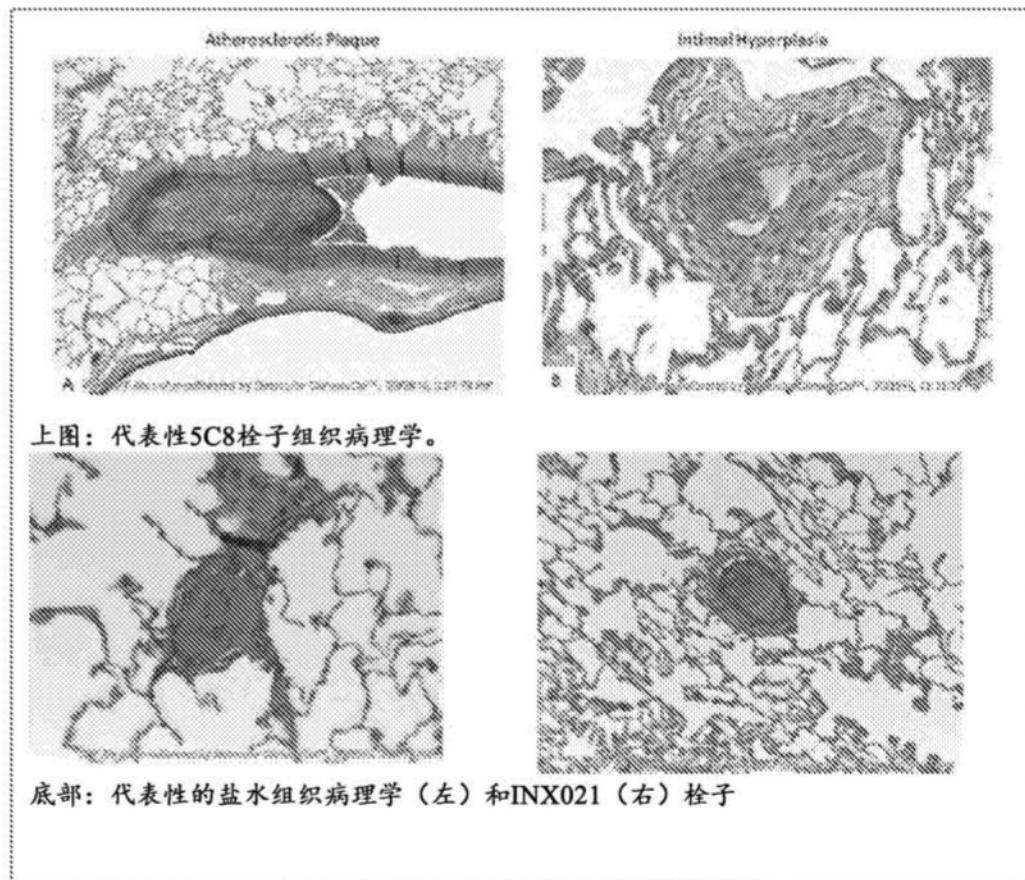


图11B

与已发表的UCB栓子数据相比，病变频率总结：

(CDP7657，缺乏Fc结构域的抗CD40L抗体，在没有血栓形成并发症的情况下抑制CD40L)

依赖性免疫应答：体内研究Arthritis Res Ther. 2015;17(1):234.)

剂量组	受影响的动物 (%)	检查的总肺部分	受影响的 肺部分 (%)
历史的控制			
盐水	7 (50%)	406	2.5%
Biogen / UCB聚乙二醇化的Fab			
盐水	1 (25%)	116	0.9%
Peg-Fab CDP765	3 (37.5%)	203	2.0%
无糖基5C8	3 (37.5%)	232	1.3%
hu5C8	5 (62.5%)	232	17.6%
ImmunoNext INX021			
运载体	2 (50%)	174	1.7%
INX021	3 (37.5%)	232	3.4%
ch5C8	6 (75%)	232	3.8%

图12