



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202309095 A

(43) 公開日：中華民國 112 (2023) 年 03 月 01 日

(21) 申請案號：111124104

(22) 申請日：中華民國 111 (2022) 年 06 月 28 日

(51) Int. Cl. :

*C07K16/28 (2006.01)**C07K16/42 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61K45/06 (2006.01)**A61P37/00 (2006.01)**C12N15/13 (2006.01)**C12N15/63 (2006.01)**C12N15/64 (2006.01)*

(30) 優先權：2021/06/28

中國大陸

202110722124.0

(71) 申請人：大陸商江蘇恆瑞醫藥股份有限公司 (中國大陸) JIANGSU HENGRUI

PHARMACEUTICALS CO., LTD. (CN)

中國大陸

大陸商上海盛迪醫藥有限公司 (中國大陸) SHANGHAI SHENGDI

PHARMACEUTICAL CO., LTD (CN)

中國大陸

(72) 發明人：林源 LIN, YUAN (CN) ; 粟璐 SU, LU (CN) ; 林侃 LIN, KAN (CN) ; 廖成 LIAO, CHENG (CN)

(74) 代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：19 項 圖式數：10 共 88 頁

(54) 名稱

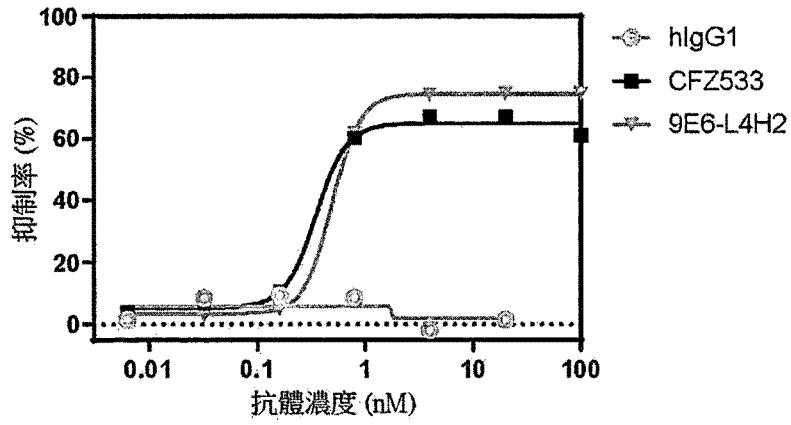
抗 CD40 抗體、其抗原結合片段及醫藥用途

(57) 摘要

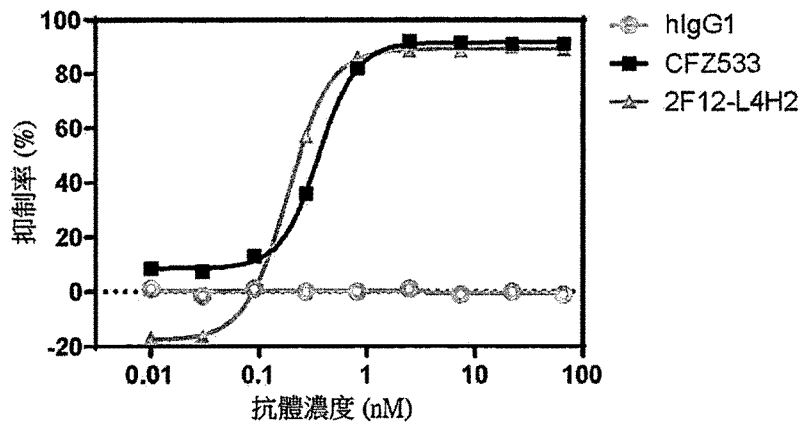
本揭露提供抗 CD40 抗體、其抗原結合片段及醫藥用途，以及包含抗 CD40 抗體或其抗原結合片段的醫藥組成物及治療、預防疾病的方法，特別是治療自身免疫疾病的方法。

The present disclosure provides anti-CD40 antibody, antigen-binding fragments and medicinal uses thereof, as well as pharmaceutical compositions comprising the anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof, and methods for treating and preventing diseases, especially methods for treating autoimmune diseases.

指定代表圖：



【圖1A】



【圖1B】

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗 CD40 抗體、其抗原結合片段及醫藥用途

【英文發明名稱】 ANTI-CD40 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING  
FRAGMENT AND MEDICAL USE THEREOF

### 【中文】

本揭露提供抗 CD40 抗體、其抗原結合片段及醫藥用途，以及包含抗 CD40 抗體或其抗原結合片段的醫藥組成物及治療、預防疾病的方法，特別是治療自身免疫疾病的方法。

### 【英文】

The present disclosure provides anti-CD40 antibody, antigen-binding fragments and medicinal uses thereof, as well as pharmaceutical compositions comprising the anti-CD40 antibody or antigen-binding fragment thereof, and methods for treating and preventing diseases, especially methods for treating autoimmune diseases.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無。

【特徵化學式】 無。

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗 CD40 抗體、其抗原結合片段及醫藥用途

【英文發明名稱】 ANTI-CD40 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING

FRAGMENT AND MEDICAL USE THEREOF

【0001】 本申請要求 2021 年 06 月 28 日提交的申請號為 202110722124.0 的中國專利申請的優先權。

### 【技術領域】

【0002】 本揭露關於生物醫藥領域，特別是治療或干預與 CD40/CD40L 信號通路相關疾病的領域。具體而言，本揭露關於 CD40 抗體、其抗原結合片段及其醫藥組成物，及用於治療自身免疫疾病的方法和相關製藥用途。

### 【先前技術】

【0003】 CD40 屬於腫瘤壞死因子受體 (TNFR) 超家族，是一種定位在細胞膜表面的 I 型跨膜糖蛋白，分子量約為 48kDa，在免疫系統中發揮重要作用。CD40 表達在多種免疫細胞中，如 B 細胞、樹突細胞、單核細胞和巨噬細胞，也在血小板上表達，並且在某些條件下可以在嗜酸性粒細胞和實質細胞上表達。CD40 的天然配體為 CD154 或 CD40L，是一種 II 型跨膜蛋白，可在多種細胞類型上誘導表達，包括活化的 CD4<sup>+</sup> T 細胞、NK 細胞、血小板和 B 細胞 (Pucino V 等人，2020)。

【0004】 CD40L 結合 CD40 後，可招募 TRAF 並藉由 NF- $\kappa$ B、JNK 和 MAPK 通路介導下游信號傳導，發揮多種細胞類型依賴性活化結果，包括免疫細胞激活與增殖、炎症因子和趨化因子分泌等（Vonderheide RH 等人，2007）。例如，藉由該途徑的信號傳導對於適應性免疫系統的若干重要效應子功能是必需的，包括原發性 T 細胞依賴性抗體應答(TDAR)、B 細胞增殖、生髮中心(GC)形成、免疫球蛋白(Ig)同種型轉換、體細胞突變、以及記憶 B 細胞和漿細胞的分化（Foy TM 等人，1993; Foy TM 等人，1994）。除了對 B 細胞產生影響外，CD40 途徑活化為 DC 成熟和功能以及單核細胞和巨噬細胞存活和細胞因子分泌提供了重要信號（Caux, C 等人，1994）。

【0005】 CD40 信號通路的功能調節障礙可導致自身免疫疾病（Karnell JL 等人，2018）。CD40-CD40L 信號通路被發現參與炎症組織中實質細胞的功能：來自腎、唾液腺和皮膚等部位，可分泌趨化因子的活化上皮細胞能夠響應 CD40。此外，CD40 或 CD40L 在動脈粥樣硬化患者及臨床前動脈粥樣硬化模型的病變部位中的表達水平均升高。CD40 可刺激誘導基質降解酶的表達，促進與動脈粥樣硬化致病相關的細胞類型如內皮細胞、平滑肌細胞及巨噬細胞等中的組織因子表達（Michel NA 等人，2017）。CD40 通路上調 IL-1、IL-6 及 IL-8 等炎症因子、以及細胞間黏附分子-1(ICAM-1)、E-選擇素(E-selectin)及血管細胞黏附分子(VCAM)等的黏附分子的生成。CD40/CD40L 相互作用還被用來預防移植排異，在恆河猴的腎臟同種異體移植研究中使用嵌合抗 CD40 拮抗劑 ch5D12 表明，CD40 的拮抗作用足以改善病情並延長平均存活時間超過 100 天。當將 ch5D12 與抗 CD86 抗體組合並僅在同種異體移植研究開始時給予，隨後用環孢素進行延

長治療時，實現大於 4 年的平均存活時間，這表明這種組合可潛在地誘導免疫耐受性(Haanstra 等人,2005)。

**【0006】** 大量臨床前研究提供了 CD40/CD40L 相互作用在促進 T 細胞依賴性免疫應答中的關鍵作用的證據。因此，CD40 信號傳導的阻斷被認為是在諸如類風濕性關節炎、系統性紅斑狼瘡、乾燥綜合症等疾病中抑制致病性自身免疫應答的合適且需要的治療策略。目前，尚未批准任何抗 CD40 抗體用於此類疾病的治療。因此，本領域仍然亟需可用於干預 CD40-CD40L 的相互作用並阻斷 CD40 信號傳導的治療劑。本揭露提供了這樣的治療性人源化抗 CD40 抗體，其能特異性結合 CD40，具有可用於干預或治療 CD40 信號通路相關疾病，特別是自身免疫疾病的優異的抗原結合特異性、親和力、藥物代謝動力學和藥效學特性。以及，提供治療性人源化抗 CD40 抗體和他莫克司聯合用於治療移植物抗宿主病或緩解移植排異反應。

### **【發明內容】**

**【0007】** 本揭露提供了一種抗 CD40 抗體及其抗原結合片段，其編碼多核苷酸、包含該多核苷酸的載體、宿主細胞、包含該抗體或其抗原結合片段的醫藥組成物、其用於治療或干預自體免疫疾病（包括移植物抗宿主病、移植排異）的方法和相關製藥用途。

### **【0008】 抗 CD40 抗體、其抗原結合片段**

一方面，一些實施方案中，本揭露提供抗 CD40 抗體及其抗原結合片段，包含：

重鏈 HCDR1，其包含如 SEQ ID NO:23 所示的序列；

重鏈 HCDR2，其包含如 SEQ ID NO:24 所示的序列；

重鏈 HCDR3，其包含如 SEQ ID NO:25 所示的序列；

輕鏈 LCDR1，其包含如 QX<sub>1</sub>SEDISSNLX<sub>2</sub> (SEQ ID NO:74)所示的序列，其中，X<sub>1</sub> 選自 A 或 S，X<sub>2</sub> 選自 A 或 S；

輕鏈 LCDR2，其包含如 X<sub>3</sub>ASNLAS (SEQ ID NO:75)所示的序列，其中，X<sub>3</sub> 選自 A 或 P；和

輕鏈 LCDR3，其包含如 QGX<sub>4</sub>YWX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>SX<sub>8</sub>FGX<sub>9</sub>X<sub>10</sub> (SEQ ID NO:76)所示，其中，X<sub>4</sub> 選自 A 或 G，X<sub>5</sub> 選自 S 或 T，X<sub>6</sub> 選自 S 或 G，X<sub>7</sub> 選自 T 或 S，X<sub>8</sub> 選自 N 或 Y，X<sub>9</sub> 選自 N、S、T 或 Q，X<sub>10</sub> 選自 V 或 G。

**【0009】** 一些具體實施方案中，提供抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含：

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和/或，輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:26、27、28 所示的序列；

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和/或，輕鏈 LCDR1，包含如 SEQ ID NO:29 所示的序列；輕鏈 LCDR2，包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列；輕鏈 LCDR3，包含如 QGGYWTSTSNFGX<sub>9</sub>X<sub>10</sub> (SEQ ID NO:73)所示的序列，其中，X<sub>9</sub> 選自 N、S、T 或 Q，X<sub>10</sub> 選自 V 或 G；

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和/或，輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:29、27、32 所示的序列。

【0010】 一些具體實施方案中，提供抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含：

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；輕鏈 LCDR1，包含如 SEQ ID NO:29 所示的序列；輕鏈 LCDR2，包含如 SEQ ID NO: 30 所示的序列；輕鏈 LCDR3，包含如 SEQ ID NO:69-72 任一所示的序列。

【0011】 一些具體實施方案中，本揭露提供抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含前述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3 中的任一個，或其任意組合。

【0012】 另一方面，一些實施方案中，本揭露提供抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含：

重鏈 HCDR1，其包含如 SYGVX<sub>11</sub> (SEQ ID NO:88)所示的序列，其中，X<sub>11</sub> 選自 S 或 T；

重鏈 HCDR2，其包含如 X<sub>12</sub>IX<sub>13</sub>SX<sub>14</sub>GX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>YYAX<sub>17</sub>WAX<sub>18</sub>S (SEQ ID NO:89) 所示的序列，其中，X<sub>12</sub> 選自 A 或 G，X<sub>13</sub> 選自 G 或 A，X<sub>14</sub> 選自 T、S 或 D，X<sub>15</sub> 選自 T 或 S，X<sub>16</sub> 選自 T 或 A，X<sub>17</sub> 選自 S、N，X<sub>18</sub> 選自 K 或 R；

重鏈 HCDR3，其包含如 GGITX<sub>19</sub>YAX<sub>20</sub> (SEQ ID NO:90)所示的序列，其中，X<sub>19</sub> 選自 A 或 V，X<sub>20</sub> 選自 I 或 M；

輕鏈 LCDR1，其包含如 QASX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>IX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>LA (SEQ ID NO:91)所示的序列，其中，X<sub>21</sub> 選自 Q 或 E，X<sub>22</sub> 選自 S 或 D，X<sub>23</sub> 選自 S 或 T，X<sub>24</sub> 選自 N、Q、S 或 T，X<sub>25</sub> 選自 V 或 G；

輕鏈 LCDR2，其包含如 SEQ ID NO:37 所示的序列；和

輕鏈 LCDR3，其包含如 QSYX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>SX<sub>28</sub>X<sub>29</sub>TX<sub>30</sub>(SEQ ID NO:92)所示的序列，其中，X<sub>26</sub> 選自 F 或 Y，X<sub>27</sub> 選自 S、D 或 N，X<sub>28</sub> 選自 S 或 F，X<sub>29</sub> 選自 S、T 或 Y，X<sub>30</sub> 選自 V 或 I。

【0013】 一些具體實施方案中，提供抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含：

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:33、34、35 所示的序列；和/或，輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:36、37、38 所示的序列；

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:39、40、41 所示的序列；和/或，輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:42、37、43 所示的序列；

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:39、44、35 所示的序列；和/或，輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:45、37、46 所示的序列；

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:39、47、41 所示的序列；和/或，輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:36、37、48 所示的序列；

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:39、47、49 所示的序列；和/或，輕鏈 LCDR1，包含如 QASQSI<sub>S</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>LA (SEQ ID NO:87)所示的序列，其中，X<sub>24</sub> 選自 N、Q、S 或 T，X<sub>25</sub> 選自 V 或 G；輕鏈 LCDR2，包含如 SEQ ID NO: 50 所示的序列；輕鏈 LCDR3，包含如 SEQ ID NO: 48 所示的序列。

【0014】 一些具體實施方案中，提供抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含：

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:39、47、49 所示的序列；輕鏈 LCDR1，包含如 SEQ ID NO:83-86 任一所示的序列；輕鏈 LCDR2 和輕鏈 LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:50、48 所示的序列。

【0015】 一些具體實施方案中，本揭露提供抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含前述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3 中的任一個，或其任意組合。

【0016】 另一方面，一些實施方案中，本揭露提供抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含：重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:51、52、53 所示的序列，和/或，輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:54、55、56 所示的序列。

【0017】 一些實施方案中，本揭露提供抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含：重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:57、58、59 所示的序列，和/或，輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:60、61、62 所示的序列。

【0018】 一些具體實施方案中，本揭露提供抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含前述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、LCDR3 中的任一個，或其任意組合

【0019】 另一方面，本揭露提供抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含重鏈可變區（VH）和輕鏈可變區（VL），其中，

a-1) 該 VH 包含如 SEQ ID NO : 1 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO : 2 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

a-2) 該 VH 包含如 SEQ ID NO : 3 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO : 4 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

a-3) 該 VH 包含如 SEQ ID NO : 5 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO : 6 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

a-4) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 67 或 68 任一所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、  
HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO : 63-66 任一所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、  
LCDR3；

b-1) 該 VH 包含如 SEQ ID NO : 7 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO : 8 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-2) 該 VH 包含如 SEQ ID NO : 9 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO : 10 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-3) 該 VH 包含如 SEQ ID NO : 11 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO : 12 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-4) 該 VH 包含如 SEQ ID NO : 13 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO : 14 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-5) 該 VH 包含如 SEQ ID NO : 15 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO : 16 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-6) 該 VH 包含如 SEQ ID NO : 17 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO : 18 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-7) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 81 或 82 任一所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO: 77-80 任一所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

c) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 19 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO: 20 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；或

d) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 21 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO: 22 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

**【0020】** 其中，該 CDR 是根據 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 編號系統定義的。一些具體實施方案中，CDR 是根據 Kabat 編號系統定義的。

**【0021】** 一些實施方案中，前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段為重組抗體。

**【0022】** 一些實施方案中，前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段為兔源抗體、嵌合抗體、人源化抗體、人抗體或其抗原結合片段。

**【0023】** 一些實施方案中，當前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段為人源化抗體時，重鏈框架區源自 IGHV2-26\*01、IGHV4-30-4\*02、IGHV4-4\*08、IGHJ1\*01；和/或，輕鏈框架區源自 IGkV1-13\*02、IGkV1-9\*01、IGkV1-6\*01、IGKJ4\*01。例如，重鏈框架區的 FR1-FR3 源自 IGHV2-26\*01、IGHV4-30-4\*02、IGHV4-4\*08，重鏈框架區的 FR4 源自 IGHJ1\*01；輕鏈框架區的 FR1-FR3 源自 IGkV1-13\*02、IGkV1-9\*01、IGkV1-6\*01，輕鏈框架區的 FR4 源自 IGKJ4\*01。

**【0024】** 一些實施方案中，前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段包含 VH 和 VL，其中，

A-1)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 1 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 2 所示或與之具有至少 90%同一性；

A-2)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 3 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 4 所示或與之具有至少 90%同一性；

A-3)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 5 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 6 所示或與之具有至少 90%同一性；

A-4)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 67 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 63-66 任一所示或與之具有至少 90%同一性；

A-5)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 68 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 63-66 任一所示或與之具有至少 90%同一性；

B-1)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 7 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 8 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-2)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 9 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 10 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-3)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 11 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 12 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-4)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 13 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 14 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-5)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 15 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 16 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-6)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 17 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 18 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-7)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 81 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 77-80 任一所示或與之具有至少 90%同一性；

B-8)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 82 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 77-80 任一所示或與之具有至少 90%同一性；

C)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 19 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 20 所示或與之具有至少 90%同一性；或

D)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 21 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 22 所示或與之具有至少 90%同一性。

**【0025】** 一些實施方案中，前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段為 IgG 抗體或其抗原結合片段，例如為 IgG1、IgG2、IgG2、IgG4 抗體或其抗原結合片段，例如為具有 N297A 突變的 IgG1 抗體或其抗原結合片段，例如為具有 L234A、L235A、M252Y、S254T 和 T256E 中之一或其任意組合的 IgG1 抗體或其抗原結合片段。

**【0026】** 一些實施方案中，前述抗 CD40 抗體的抗原結合片段為 Fab、Fv、sFv、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、線性抗體、單鏈抗體、scFv、sdAb、sdFv、奈米抗體、肽抗體 peptibody、結構域抗體和多特異性抗體（雙特異性抗體、diabody、triabody 和 tetrabody、串聯二-scFv、串聯三-scFv），例如為 scFv、Fv、Fab 或 Fab' 片段。

**【0027】** 一些實施方案中，前述抗 CD40 抗體的抗原結合片段的重鏈全長的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 93 或 97 所示或與之具有至少 90%同一性；輕鏈全長的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 94 所示或與之具有至少 90%同一性；或

【0028】重鏈全長的胺基酸序列如 SEQ ID NO：95 或 98 所示或與之具有至少 90%同一性；輕鏈全長的胺基酸序列如 SEQ ID NO：96 所示或與之具有至少 90%同一性。

【0029】如前所述的“至少 90%同一性”例如包含至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 同一性。

【0030】一些實施方案中，前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段的重鏈可變區有 0 至 10 個（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個）胺基酸變化；輕鏈可變區有 0 至 10 個（1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個）胺基酸變化。在一些具體實施方案中，該胺基酸變化為保守的替換、取代或修飾，和/或不影響功能的缺失、添加。

【0031】一些實施方案中，提供抗 CD40 抗體或抗原結合片段，其與前述抗 CD40 抗體或抗原結合片段結合或競爭結合相同的表位。

【0032】一些實施方案中，提供抗 CD40 抗體或抗原結合片段，其阻斷前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段與 CD40（例如人 CD40）的結合。

【0033】一些實施方案中，提供抗 CD40 抗體或抗原結合片段，其與 CD40（例如人 CD40）的結合被前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段阻斷。

【0034】一些實施方案中，前述抗 CD40 抗體或抗原結合片段具有以下至少一項：

- (i) 以 10nM 或更低的  $K_D$  結合人 CD40；
- (ii) 無明顯的激動活性。

【0035】 一些實施方案中，前述抗 CD40 抗體或抗原結合片段使 CD40 配體與 CD40 的結合降低至少 45%、至少 50%、至少 60%、至少 75%、至少 80%、至少 90%或至少 95%。

【0036】 一些實施方案中，前述抗 CD40 抗體或抗原結合片段以  $10^{-7}\text{M}$ 、 $10^{-8}\text{M}$ 、 $10^{-9}\text{M}$ 、 $10^{-10}\text{M}$ 、 $10^{-11}\text{M}$  或更低的  $K_D$  結合人 CD40。

【0037】 一些實施方案中，提供 CD40 結合分子，包含前述任意的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。

【0038】 一些實施方案中，提供綴合物，其包含前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。例如，該綴合物為抗體藥物偶聯物。

#### 【0039】 多核苷酸和載體

本揭露提供經分離的多核苷酸，其編碼本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。該分離的多核苷酸可以為 RNA、DNA 或 cDNA。根據本揭露的一些實施方案，本揭露的多核苷酸是分離的多核苷酸。

【0040】 本揭露還提供 DNA 分子，其編碼前述本揭露任意的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。

【0041】 本揭露的多核苷酸也可呈載體形式，可存在於載體中和/或可為載體的一部分，該載體例如質粒、黏端質粒、YAC 或病毒載體。載體可尤其為表達載體，即可提供 VEGF 結合分子或其綴合物體外和/或體內（即在適合宿主細胞、宿主有機體和/或表達系統中）表達的載體。該表達載體通常包含至少一種本揭露的多核苷酸，其可操作地連接至一個或多個適合的表達調控元件（例如啟動子、增強子、終止子等）。針對在特定宿主中的表達對該元件及其序列進行選擇為所屬技術領域具有通常知識者的常識。對本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結

合片段的表達有用或必需的調控元件及其他元件例如為啟動子、增強子、終止子、整合因子、選擇標記物、前導序列、報告基因。

**【0042】** 本揭露的多核苷酸可基於本揭露的多肽的胺基酸序列的信息藉由已知的方式（例如藉由自動 DNA 合成和/或重組 DNA 技術）製備或獲得，和/或可從適合的天然來源加以分離。

**【0043】 宿主細胞**

本揭露提供表達本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段或綴合物或含有本揭露的多核苷酸或載體的重組宿主細胞。一些實施方案中，宿主細胞為細菌細胞、真菌細胞或哺乳動物細胞。

**【0044】** 細菌細胞例如包括革蘭氏陰性細菌菌株(例如大腸桿菌(*Escherichia coli*)菌株、變形桿菌屬(*Proteus*)菌株及假單胞菌屬(*Pseudomonas*)菌株)及革蘭氏陽性細菌菌株(例如芽孢桿菌屬(*Bacillus*)菌株、鏈黴菌屬(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌屬(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌屬(*Lactococcus*)菌株)的細胞。

**【0045】** 真菌細胞例如包括木黴屬(*Trichoderma*)、脈孢菌屬(*Neurospora*)及曲菌屬(*Aspergillus*)的物種的細胞；或者包括酵母屬(*Saccharomyces*)（例如釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)）、裂殖酵母屬(*Schizosaccharomyces*)（例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)）、畢赤酵母屬(*Pichia*)（例如巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)及嗜甲醇畢赤酵母(*Pichia methanolica*)）及漢森酵母屬(*Hansenula*)的物種的細胞。

**【0046】** 哺乳動物細胞例如包括例如 HEK293 細胞、CHO 細胞、BHK 細胞、HeLa 細胞、COS 細胞等。

【0047】然而，本揭露也可使用兩棲類細胞、昆蟲細胞、植物細胞及本領域中用於表達異源蛋白的任何其他細胞。

【0048】在一個實施方案中，本揭露中使用的宿主細胞不能發育成完成的植株或動物個體。

#### 【0049】製備方法

【0050】本揭露還提供了一種製備本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段的方法，其包括：

- 在允許表達本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段的條件下培養本揭露的宿主細胞；及
- 從培養物回收由該宿主細胞表達的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段；及
- 視需要的，包括進一步純化和/或修飾本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。

【0051】本揭露提供綴合物的製備方法，包括將藥物偶聯或修飾到本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段上。

【0052】本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段可在如上所述的細胞中以細胞內方式（例如在細胞質中、在周質中或在包涵體中）產生，接着從宿主細胞分離且視需要進一步純化；或其可以細胞外方式（例如在培養宿主細胞的培養基中）產生，接着自培養基分離且視需要進一步純化。例如，用含調整過的緩衝液的 A 或 G Sepharose FF 管柱進行純化，洗去非特異性結合的組分，再用 PH 梯度法沖提結合的抗體，用 SDS-PAGE 檢測，收集。可選地，用常規方法進行過濾濃縮。可溶的混合物和多聚體，也可以用常規方法去除，比如分子篩、離子交換。得到的產物需立即冷凍，如-70°C，或者凍乾。

**【0053】** 用於重組產生多肽的方法及試劑，例如特定適合表達載體、轉化或轉染方法、選擇標記物、誘導蛋白表達的方法、培養條件等在本領域中是已知的。類似地，適用於製造本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段或綴合物的方法中的蛋白分離及純化技術為所屬技術領域具有通常知識者所公知。

**【0054】 組成物**

本揭露提供組成物，包含前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。例如，提供醫藥組成物，其含有治療或緩解有效量的如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段和至少一種可藥用的賦形劑、稀釋劑或載體。

**【0055】** 在一些具體實施方式中，該醫藥組成物單位劑量中可含有 0.01 至 99 重量%的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，或醫藥組成物單位劑量中含抗 CD40 抗體或其抗原結合片段的量為 0.1-2000mg，在一些具體實施方式中為 1-1000mg。

**【0056】** 在一些實施方案中，提供前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段與一種或多種另外的免疫抑制劑的組合或組成物。該組成物例如是醫藥組成物。可選地，該醫藥組成物可進一步包含可藥用的賦形劑、稀釋劑或載體。

**【0057】** 在本揭露的一個實施方案中，提供了一種醫藥組成物，其包含前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段、他克莫司、以及可藥用的賦形劑、稀釋劑或載體。

**【0058】** 一些實施方案中，提供製品，包含前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。可選地，製品包含容器和標籤。容器例如瓶、注射器和試管。容器容納有效於治療病症的組成物。容器上或與容器相連的標籤表明該組成物用於治療

所選病症。組成物中含有前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。該製品可以進一步包括第二容器，該第二容器容納有效於治療病症的他克莫司。

**【0059】** 一些實施方案中，提供產品，包含前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段和他克莫司。

**【0060】 治療方法和製藥用途**

本揭露提供前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段用於治療、干預、預防、診斷疾病或病症的方法。

**【0061】** 具體地，在一些實施方案中，本揭露提供了根據本揭露所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段在製備用於治療或緩解自身免疫疾病、移植物抗宿主病、或緩解移植排異反應的藥物中的用途。

**【0062】** 進一步地，在一些實施方案中，本揭露提供了根據本揭露所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段與一種或多種其他免疫抑制劑組合在製備用於治療或緩解自身免疫疾病、移植物抗宿主病、或緩解移植排異反應的藥物中的用途。

**【0063】** 在本揭露的實施方案中，根據本揭露所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段可與一種或多種其他免疫抑制劑分開地、相續地或同時施用。

**【0064】** 在本揭露的實施方案中，根據本揭露所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段可在一種或多種其他免疫抑制劑之前、之後或同時施用。

**【0065】** 具體地，本揭露提供了根據本揭露所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段與他克莫司組合在製備用於治療或緩解自身免疫疾病、移植物抗宿主病、或緩解移植排異反應的藥物中的用途。一些實施方案中，提供改善或治療移

植物抗宿主病、器官移植排異的方法和相關製藥用途，包括向受試者施用改善或治療有效量的前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段或其醫藥組成物。

**【0066】** 一些實施方案中，提供改善或治療自身免疫性疾病、炎性疾病的方法和相關製藥用途，包括向受試者施用改善或治療有效量的前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段或其醫藥組成物。

**【0067】** 一些實施方案中，提供治療 CD40 相關障礙疾病的方法和相關製藥用途；一些實施方案中，提供抑制 CD40 相關障礙細胞生長或分化的方法和相關製藥用途；一些實施方案中，提供抑制表達人 CD40 抗原的細胞的生長和/或分化的方法和相關製藥用途；一些實施方案中，提供抑制受試者中 B 細胞的抗體產生的方法和相關製藥用途；一些實施方案中，提供治療患有免疫障礙疾病的方法和相關製藥用途。上述方法中，均包括向受試者或細胞施用治療或抑制有效量的前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段或其醫藥組成物。

**【0068】** 一些實施方案中，提供誘導外周 B 細胞耗竭的方法和相關製藥用途，包括向受試者施用誘導有效量的前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段或其醫藥組成物。

**【0069】** 一些實施方案中，提供治療、緩解疾病或病症的方法和相關製藥用途，包括向有需要的受試者施用有效量的前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，該疾病或病症可以是 CD40 相關或 CD40 不相關的，包括：類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、狼瘡腎炎、自身免疫性脫髓鞘疾病(例如多發性硬化症、變應性腦脊髓炎)、內分泌性眼病、葡萄膜視網膜炎、全身性紅斑狼瘡、重症肌無力、格雷夫斯病、腎小球性腎炎、自身免疫性肝病、炎性腸病(例如克羅恩氏病或潰瘍性結腸炎)、過敏症、過敏反應、舍格倫綜合症、I 型糖尿病、原發性膽汁性肝

硬化、韋格納氏肉芽腫病、纖維肌痛、多肌炎、皮肌炎、炎性肌炎、多發性內分泌衰竭、施密特氏綜合症(Schmidt's syndrome)、自身免疫性葡萄膜炎、阿迪森氏病、腎上腺炎、甲狀腺炎、橋本氏甲狀腺炎、自身免疫性甲狀腺疾病、惡性貧血、胃萎縮、慢性肝炎、狼瘡性肝炎、動脈粥樣硬化、亞急性皮膚性紅斑狼瘡、甲狀旁腺機能減退、德雷斯勒綜合症(Dressler's syndrome)、自身免疫性血小板減少症、特發性血小板減少性紫癍、溶血性貧血、尋常性天皰瘡、天皰瘡、皰疹樣皮炎、斑禿(alopecia arcata)、類天皰瘡、硬皮病、進行性全身性硬化症、CREST 綜合症(鈣質沉著、雷諾氏現象(Raynaud's phenomenon)、食管活動不良、指端硬化和毛細管擴張)、男性和女性自身免疫性不育症、僵直性脊柱炎(ankylosingspondylitis)、潰瘍性結腸炎、混合性結締組織病、結節性多動脈炎、系統性壞死性血管炎、特應性皮炎、特應性鼻炎、古德帕斯徹氏綜合症(Good pasture's syndrome)、恰加斯氏病(Chagas'disease)、結節病、風濕熱、哮喘、復發性流產、抗磷脂綜合症、農民塵肺、多形性紅斑、心臟切開術後綜合症、庫欣綜合症(Cushing's syndrome)、自身免疫性慢性活動性肝炎、養鳥迷的肺、中毒性表皮壞死松解症、阿爾波特綜合症(Alport's syndrome)、肺泡炎、過敏性肺泡炎、纖維性肺泡炎、間質性肺病、結節性紅斑、壞疽性膿皮病、輸血反應、高安氏動脈炎(Takayasu's arteritis)、風濕性多肌痛、顛動脈炎、血吸蟲病、巨細胞動脈炎、蛔蟲病、麩黴病、桑普特氏綜合症(Sampter's syndrome)、濕疹、淋巴瘤樣肉芽腫、貝塞特氏病(Behcet's disease)、卡普蘭氏綜合症(Caplan's syndrome)、川崎氏病(Kawasaki's disease)、登革熱、腦脊髓炎、心內膜炎、心肌內膜纖維變性、眼內炎、持久隆起性紅斑、牛皮癬、胎兒成紅細胞增多病、嗜酸性筋膜炎、舒爾曼綜合症(Shulman's syndrome)、費耳蒂氏綜合症(Felty's syndrome)、絲蟲病、睫狀體炎、

慢性睫狀體炎、異時性睫狀體炎、福氏睫狀體炎(Fuch's cyclitis)、IgA 腎病、亨-舍二氏紫癍(Henoch-Schonlein purpura)、移植物抗宿主病、移植排異反應、心肌症、伊頓-蘭伯特綜合症(Eaton-Lambert syndrome)、復發性多發性軟骨炎、冷球蛋白血症、瓦爾登斯特羅姆巨球蛋白血症、埃文氏綜合症(Evan's syndrome)、急性呼吸窘迫綜合症、肺部炎症、骨質疏鬆症、遲髮型超敏反應和自體免疫性腺衰竭。例如，乾燥綜合症、多發性硬化和系統性紅斑狼瘡。

**【0070】** 一些實施方案中，提供治療 B 淋巴細胞(例如全身性紅斑狼瘡、古德帕斯徹氏綜合症、類風濕性關節炎和 I 型糖尿病)、Th1 淋巴細胞(例如類風濕性關節炎、多發性硬化症、牛皮癬、舍格倫綜合症、橋本氏病、格雷夫氏病、原發性膽汁性肝硬化、韋格納肉芽腫病、結核病或移植物抗宿主病)或 Th2 淋巴細胞(例如特應性皮炎、全身性紅斑狼瘡、特應性哮喘、鼻結膜炎、過敏性鼻炎、歐門氏綜合症(Omenn's syndrome)、系統性硬化症或慢性移植物抗宿主病)相關疾病的方法和相關製藥用途，包括向有需要的受試者施用有效量的前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。

**【0071】** 一些實施方案中，提供治療腫瘤或癌症的方法和相關製藥用途，包括向有需要的受試者施用有效量的前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，該腫瘤或癌症可以是 CD40 表達相關或不相關的。

**【0072】** 一些實施方案中，提供治療或緩解移植物抗宿主病或移植排異反應的方法，包括向有需要的受試者施用前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段和他克莫司。

**【0073】** 一些實施方案中，提供前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段用於製備治療或緩解移植物抗宿主病或移植排異反應的藥物的用途，包括和他克莫

司聯用。一些實施方案中，提供他克莫司用於製備治療或緩解移植物抗宿主病或移植排異反應的藥物的用途，包括和前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段聯用。

**【0074】** 一些實施方案中，提供前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段和他克莫司聯合用於治療或緩解移植物抗宿主病或移植排異反應的方法，以及聯合用於製備治療或緩解移植物抗宿主病或移植排異反應的藥物的用途。

**【0075】** 一些實施方案中，上述移植為實體器官移植，例如腎移植、肝移植、心臟移植、肺移植、胰腺移植、小腸移植或複合組織移植。

**【0076】** 一些實施方案中，上述移植是指移植選自由同種細胞、異種細胞、同種組織、異種組織、同種器官及異種器官組成組中的一種。

**【0077】** 一些實施方案中，前述抗 CD40 抗體或其抗原結合片段抑制或逆轉基於移植受體的組織移植物的排異反應，或者延長或保留移植到移植受體的組織的功能，或者恢復移植受體中的受損移植組織的功能。

#### **【0078】 檢測**

本揭露提供檢測 CD40 的組成物，該組成物包含根據本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。本揭露還提供用於體內或體外檢測 CD40 的方法、系統或裝置，其包括用本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段處理樣品。

**【0079】** 一些實施方案中，體外檢測方法、系統或裝置可能例如包括：

- (1) 使樣品與抗 CD4 抗體或其抗原結合片段接觸；
- (2) 檢測在抗 CD40 抗體或其抗原結合片段和樣品之間形成的複合物；和  
/或
- (3) 使參比樣品（例如，對照樣品）與抗體接觸；和

(4) 藉由與參比樣品比較，確定複合物形成的程度。如與對照樣品或受試者中相比，樣品或受試者中複合物形成的變化（例如，統計學上的顯著變化）表示樣品中存在 CD40。

**【0080】** 另一些實施方案中，體內檢測方法、系統或裝置可以包括：

- (1) 向受試者施用抗 CD40 的抗體或其抗原結合片段；和
- (2) 檢測在抗 CD40 的抗體或其抗原結合片段和受試者之間複合物的形成。

**【0081】** 檢測可以包括確定形成複合物的位置或時間。用可檢測物質對 CD40 抗體標記，藉由對該標記檢測以實現對結合 CD40 抗體的物質（例如 CD40）的檢測。合適的可檢測物質包括多種酶、輔基、螢光物質、發光物質和放射性物質。可以藉由測量與 CD40 結合或不結合的抗體或使其可視化，檢測在結合 CD40 的抗體或其抗原結合片段和 CD40 之間的複合物形成。可以使用常規檢測測定法，例如，酶聯免疫吸附測定（ELISA）、放射免疫測定（RIA）或組織免疫組織化學。出於檢測目的，本揭露的抗 CD40 抗體或其片段可以用螢光團發色團標記。

**【0082】** 一些實施方案中，還提供試劑盒，該試劑盒包含與抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，還可以包含診斷使用說明。試劑盒還可以含有至少一種額外的試劑，如標記物或額外的診斷劑。對於體內使用，抗體可以配製為醫藥組成物。

**【0083】** 術語定義

為了更容易理解本揭露，以下具體定義了某些技術和科學術語。除非在本文中另有明確定義，本文使用的所有其它技術和科學術語都具有本揭露所屬技術領域具有通常知識者通常理解的含義。

【0084】除非上下文另外清楚要求，否則在整個說明書和申請專利範圍中，應將詞語“包含”、“具有”、“包括”等理解為具有包含意義，而不是排他性或窮舉性意義；也即，“包括但不僅限於”的意義。

【0085】本揭露所用胺基酸三字母代碼和單字母代碼如 J.biol.chem, 243, p3558(1968)中所述。

【0086】“CD40”和“CD40 抗原”是指在正常和贅生性 B 細胞表面上表達的約 48kD 糖蛋白，其充當參與細胞增殖和分化的信號的受體(Ledbetter 等人,1987,J.Immunol.138:788-785)。已從由伯基特氏淋巴瘤細胞系 Raji 製備的文庫中分離出編碼 CD40 的 cDNA 分子(Stamenkovic 等人,1989,EMBO J.8:1403)。序列信息可參見本揭露表 2。內源性表達 CD40 的細胞是特徵在於 CD40 的表面表達的任何細胞，包括但不限於正常和贅生性 B 細胞、交錯突細胞、基底上皮細胞、癌細胞、巨噬細胞、內皮細胞、濾泡樹突細胞、扁桃體細胞和骨髓來源的漿細胞。

【0087】“抗體”以最廣義使用，涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單株抗體，多株抗體；單特異性抗體，多特異性抗體（例如雙特異性抗體），全長抗體和抗體片段（或抗原結合片段，或抗原結合部分），只要它們展現出期望的抗原結合活性。抗體可以指免疫球蛋白，是由兩條相同的重鏈和兩條相同的輕鏈藉由鏈間二硫鍵連接而成的四肽鏈結構。免疫球蛋白重鏈恆定區的胺基酸組成和排列順序不同，故其抗原性也不同。據此，可將免疫球蛋白分為五類，或稱為免疫球蛋白的同種型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相應的重鏈分別為  $\mu$  鏈、 $\delta$  鏈、 $\gamma$  鏈、 $\alpha$  鏈和  $\epsilon$  鏈。同一類 Ig 根據其鉸鏈區胺基酸組成和重鏈二硫鍵的數目和位置的差別，又可分為不同的亞類，如 IgG 可分為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。

輕鏈藉由恆定區的不同分為  $\kappa$  鏈或  $\lambda$  鏈。五類 Ig 中每類 Ig 都可以有  $\kappa$  鏈或  $\lambda$  鏈。抗體重鏈和輕鏈靠近 N 端的約 110 個胺基酸的序列變化很大，為可變區（V 區）；靠近 C 端的其餘胺基酸序列相對穩定，為恆定區（C 區）。可變區包括 3 個高變區（CDR）和 4 個序列相對保守的骨架區（FR）。3 個高變區決定抗體的特異性，又稱為互補性決定區（CDR）。每條輕鏈可變區（VL）和重鏈可變區（VH）由 3 個 CDR 區 4 個 FR 區組成，從胺基端到羧基端依次排列的順序為：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。輕鏈的 3 個 CDR 區指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重鏈的 3 個 CDR 區指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

【0088】對於 CDR 的確定或定義，能夠藉由分辨抗體的結構和/或分辨抗體-配體複合物的結構來完成 CDR 的確定性描繪和包含抗體的結合位點的殘基的鑑定。這可藉由所屬技術領域具有通常知識者已知的各種技術中的任一種，例如 X 射線晶體學來實現。多種分析方法可用於鑑定 CDR，包括但不限於 Kabat 編號系統、Chothia 編號系統、AbM 編號系統、IMGT 編號系統、接觸定義、構象定義。

【0089】Kabat 編號系統是用於編號抗體中殘基的標準並且通常用於鑑定 CDR 區域（參見例如 Johnson&Wu，2000，Nucleic Acids Res.，28：214-8）。Chothia 編號系統與 Kabat 編號系統類似，但 Chothia 編號系統考慮了某些結構環區域的位置。（參見例如 Chothia 等，1986，J.Mol.Biol.，196：901-17；Chothia 等人，1989，Nature，342：877-83）。AbM 編號系統使用建模抗體結構的由 Oxford Molecular Group 生產的計算機程序集成套件（參見例如 Martin 等，1989，Proc Natl Acad Sci(USA)，86：9268-9272；“AbMTM，A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies，”Oxford，UK；Oxford Molecular，Ltd）。AbM 編

99600 第 24 頁，共 66 頁(發明說明書)

號系統使用知識數據庫和從頭開始方法的組合，從基本序列建模抗體的三級結構（參見 Samudrala 等，1999，在 *PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.*, 3 : 194-198 中的“Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach”描述的那些）。接觸定義基於可用複雜晶體結構的分析（參見例如 MacCallum 等，1996，*J.Mol.Biol.*, 5 : 732-45）。構象定義中，CDR 的位置可鑑定為對抗原結合做出焓貢獻的殘基（參見例如 Makabe 等，2008，*Journal of Biological Chemistry*, 283 : 1156-1166）。另外其它的 CDR 邊界定義可能不嚴格遵循上述方法之一，但仍然與 Kabat CDR 的至少一部分重疊，儘管根據特定殘基或殘基組不顯著影響抗原結合的預測或實驗結果，它們可縮短或延長。如本揭露使用的，CDR 可指藉由本領域已知的任何方法（包括方法的組合）定義的 CDR。各種編號系統之間的關係對應關係是所屬技術領域具有通常知識者熟知的，示例性的，如下表 1 中所示。

【0090】表 1. CDR 編號系統之間的關係

CDR	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
HCDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
HCDR2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
HCDR3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
LCDR1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
LCDR2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
LCDR3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

【0091】本揭露的抗體或抗原結合片段的 VL 區和 VH 區的 CDR 胺基酸殘基在數量和位置符合已知的 Kabat 編號系統。

【0092】“單株抗體”或“單抗”指從基本上同質的抗體群體獲得的抗體，即除了可能以少量存在的天然存在的突變之外，群體包含的各個抗體是相同

的。單株抗體是高度特異性的，針對單個抗原位點。此外，與通常包括針對不同決定簇（表位）的不同抗體的多株抗體製劑相反，每種單株抗體針對抗原上的單個決定簇。修飾語“單株”指示如從基本上同質的抗體群體獲得的抗體的特徵，並且不被解釋為需要藉由任何特定方法產生抗體。

**【0093】** 術語“兔源抗體”在本揭露中為根據本領域知識和技能製備的針對人 CD40 或其表位的單株抗體。製備時用 CD40 抗原注射試驗兔，然後分離表達具有所需序列或功能特性的抗體。在本揭露一個具體的實施方案中，該兔源抗人 CD40 抗體或其抗原結合片段，可進一步包含兔源  $\kappa$ 、 $\lambda$  鏈或其變體的輕鏈恆定區，或進一步包含兔源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區。

**【0094】** 術語“全人抗體”包括具有人種種系免疫球蛋白序列的可變和恆定區的抗體。本揭露的全人抗體可包括不由人種種系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基（如藉由體外隨機或位點特異性誘變或藉由體內體細胞突變所引入的突變）。然而，術語“全人抗體”不包括這樣的抗體，即其中已將衍生自另一種種哺乳動物物種（諸如兔）種系的 CDR 序列移植到人骨架序列上（即“人源化抗體”）。

**【0095】** 術語“人源化抗體（humanized antibody）”，也稱為 CDR 移植抗體（CDR-grafted antibody），是指將非人 CDR 序列移植到人的抗體可變區框架中產生的抗體。可以克服嵌合抗體由於攜帶大量非人蛋白成分，從而誘導的強烈的免疫應答反應。為避免在免疫原性下降的同時引起活性的下降，可對該全人抗體可變區可進行最少反向突變，以保持活性。

**【0096】** 術語“嵌合抗體（chimeric antibody）”，是將第一物種抗體的可變區與與第二物種抗體的恆定區融合而成的抗體，可以減輕第一物種抗體誘發的免疫應答反應。作為一個示例，建立嵌合抗體，要先建立分泌兔源性特異性單抗

的兔，分離該抗體，根據需要選殖全人抗體的恆定區基因，將兔可變區基因與與人恆定區基因連接成嵌合基因後插入人載體中，最後在真核工業系統或原核工業系統中表達嵌合抗體分子。全人抗體的恆定區可選自人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區，優先包含人源 IgG1 或 IgG4 重鏈恆定區，或者使用胺基酸突變後無 ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, 抗體依賴的細胞介導的細胞毒作用) 毒性的 IgG1。

【0097】術語“抗原結合片段”包括：單鏈抗體（即全長重鏈和輕鏈）；Fab、修飾的 Fab、Fab'、修飾的 Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、單結構域抗體（例如 VH 或 VL 或 VHH）、scFv、二價或三價或四價抗體、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody 和上述任意一種的表位結合片段（參見例如 Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech.23(9):1126-1136；Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews-Online 2(3),209-217）。產生和製備這些抗體片段的方法在本領域是公知的（參見例如 Verma 等人, 1998, Journal of Immunological Methods,216,165-181）。Fab-Fv 形式首先公開於 WO2009/040562，其二硫鍵穩定化形式 Fab-dsFv 首先公開於 WO2010/035012。本揭露的抗原結合片段還包括描述於 WO2005/003169、WO2005/003170 和 WO2005/003171 中的 Fab 和 Fab' 片段。多價抗體可包含多特異性例如雙特異性或可以是單特異性的（參見例如 WO92/22583 和 WO05/113605），後者的一個示例是描述於 WO 92/22583 中的 Tri-Fab（或 TFM）。

【0098】術語“與 CD40 結合”，指能與 CD40 或其表位相互作用，該 CD40 或其表位可以是人源的。本揭露的術語“抗原結合位點”指抗原上不連續的，由本揭露抗體或抗原結合片段識別的三維空間位點。

【0099】術語“抗原”指用於免疫接種免疫活性的脊椎動物的分子，以產生識別抗原的抗體，或篩選表達文庫（例如尤其是噬菌體、酵母或核糖體展示文庫）。在本揭露中，抗原被更廣義地定義，包括由抗體特異性識別的靶分子，以及包括用於產生抗體的免疫接種過程或用於選擇抗體的文庫篩選中使用的分子的一部分或模擬物。對於本揭露的與人 CD40 結合的抗體，人 CD40 的單體和多聚體（例如二聚體、三聚體等），以及人 CD40 的截短變體和其它變體均被稱為抗原。

【0100】術語“表位”是指抗原上與免疫球蛋白或抗體結合的位點。表位可以由相鄰的胺基酸、或藉由蛋白質的三級折疊而並列的不相鄰的胺基酸形成。由相鄰的胺基酸形成的表位通常在暴露於變性溶劑後保持，而藉由三級折疊形成的表位通常在變性溶劑處理後喪失。表位通常以獨特的空間構象包括至少 3-15 個胺基酸。確定什麼表位由給定的抗體結合的方法在本領域中是熟知的，包括免疫印跡和免疫沉澱檢測分析等。確定表位的空間構象的方法包括本領域中的技術和本揭露所述的技術，例如 X 射線晶體分析法和二維核磁共振等。

【0101】術語“特異性結合”、“選擇性結合”是指抗體與預定的抗原上的表位結合。通常，當使用人 CD40 或其表位作為分析物並使用抗體作為配體，在儀器中藉由表面電漿共振（SPR）技術測定時，抗體以大約低於  $10^{-7}M$  或甚至更小的平衡解離常數（ $K_D$ ）與預定的抗原或其表位結合，並且其與預定抗原或其表位結合的親和力是其與預定抗原（或其表位）或緊密相關的抗原之外的非特異性抗原（如 BSA 等）結合的親和力的至少兩倍。術語“識別抗原的抗體”在本揭露中可以與術語“特異性結合的抗體”互換使用。

【0102】“結合親和力”或“親和力”在本揭露中用作兩個分子（例如抗體或其部分與抗原）之間的非共價相互作用的強度量度。兩個分子之間的結合親和力可藉由確定解離常數（ $K_D$ ）來量化。可藉由使用例如表面電漿共振（SPR）方法（Biacore）測量複合物形成和解離的動力學來確定  $K_D$ 。對應於單價複合物的結合和解離的速率常數分別被稱為結合速率常數  $k_a$ （或  $k_{on}$ ）和解離速率常數  $k_d$ （或  $k_{off}$ ）。 $K_D$  藉由方程  $K_D = k_d/k_a$  與  $k_a$  和  $k_d$  有關。解離常數的值可藉由眾所周知的方法直接確定，並且可藉由方法例如 Caceci 等人（1984，Byte 9：340-362）中所述的那些甚至對於複雜混合物進行計算。例如，可使用雙重過濾硝化纖維素濾器結合測定如 Wong&Lohman（1993，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90：5428-5432）中公開的那種來確定  $K_D$ 。評估抗體針對靶抗原的結合能力的其它標準測定是本領域已知的，包括例如 ELISA、蛋白質印跡、RIA 和流式細胞術分析、以及本揭露其它地方例舉的其它測定。抗體的結合動力學和結合親和力也可藉由本領域已知的標準測定，例如表面電漿共振（SPR），例如藉由使用 Biacore™ 系統或 KinExA 來評價。可藉由比較各個抗體/抗原複合物的  $K_D$  值來比較與不同分子相互作用相關的結合親和力，例如，不同抗體對於給定抗原的結合親和力的比較。類似地，相互作用的特異性可藉由確定和比較目的相互作用（例如抗體和抗原之間的特異性相互作用）的  $K_D$  值與非目的相互作用（例如已知不結合 CD40 的對照抗體）的  $K_D$  值進行評價。

【0103】術語“保守性置換”指置換為具有與原始胺基酸殘基相似的特性的另一個胺基酸殘基。例如，賴胺酸、精胺酸和組胺酸具有相似的特性，在於它們具有鹼性側鏈，並且天冬胺酸和谷胺酸具有相似的特性，在於它們具有酸性側鏈。此外，甘胺酸、天冬醯胺、穀胺醯胺、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸

和色胺酸具有相似的特性，在於它們具有不帶電荷極性側鏈，並且丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、蘇胺酸、異亮胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸和甲硫胺酸具有相似的特性，在於它們具有非極性側鏈。另外，酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸和組胺酸具有相似的特性，在於它們具有芳族側鏈。因此，所屬技術領域具有通常知識者將顯而易見，甚至當置換如上文所述的顯示相似特性的組中的胺基酸殘基時，它將不顯示特性的特定變化。

【0104】“抑制”或“阻斷”可互換使用，並涵蓋部分和完全抑制/阻斷這兩者。對 CD40 的抑制/阻斷較佳地降低或改變無抑制或阻斷的情況下發生 CD40 結合時出現活性的正常水平或類型。抑制和阻斷也旨在包括與抗 CD40 抗體接觸時，與未與抗 CD40 抗體接觸的 CD40 相比，任何可測量的 CD40 結合親和力降低。

【0105】“抑制生長”（例如涉及細胞）旨在包括細胞生長任何可測量的降低。

【0106】“激動活性”、“激動劑活性”或“激動性”指作為激動劑的功能。激動劑與細胞受體的結合引起了與該受體的天然配體所引起的相類似或相同的反應或活性。例如，CD40 激動劑可誘導任何或全部的下列應答：細胞增殖和/或分化；藉由諸如 ICAM-1、E-選凝素、VCAM 等分子上調細胞之間的黏附；分泌促炎性細胞因子，例如 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF 等；經 CD40 受體藉由以下途徑轉導信號，例如 TRAF(例如，TRAF2 和/或 TRAF3)、MAP 激酶，如 NIK(NF- $\kappa$ B 誘導激酶)、1- $\kappa$ B 激酶(IKK $\alpha/\beta$ )、轉錄因子 NF- $\kappa$ B、Ras 和 MEK/ERK 途徑、PI3K/Akt 途徑、P38 MAPK 途徑等；藉由 XIAP、Mcl-1、BCLx 等分子轉導抗-凋亡信號；B 和/或 T 細胞記憶的產生；B 細胞抗體產生；B 細胞同種型轉換；上調 II 類 MHC

和 CD80/86 的細胞表面表達等。“拮抗活性”、“拮抗劑活性”或“拮抗性”指可作為拮抗劑的物質的功能。例如，CD40 的拮抗劑可防止或降低藉由 CD40 受體與激動性配體，具體是 CD40L 結合誘導的任何應答。拮抗劑可使激動劑結合所誘導的一種或多種應答降低 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、較佳 40%、45%、50%、55%、60%、更佳 70%、80%、85% 和最佳 90%、95%、99% 或 100%。檢測抗 CD40 抗體和 CD40 配體結合特異性與拮抗活性的方法是所屬技術領域具有通常知識者已知的，包括但不限於標準的競爭性結合試驗、監測 B 細胞分泌免疫球蛋白的試驗、B 細胞增殖試驗、Banchereau 樣 B 細胞增殖試驗、抗體產生的 T 細胞輔助試驗、B 細胞增殖的共同刺激試驗和上調 B 細胞激活標記的試驗。

**【0107】** 生產和純化抗體和抗原結合片段的方法在現有技術中熟知和能找到，如冷泉港的抗體實驗技術指南（5-8 章和 15 章）。如，可以用人 CD40 或其片段免疫小鼠或兔，所得到的抗體能被覆性、純化，並且可以用常規的方法進行胺基酸測序。抗原結合片段同樣可以用常規方法製備。本揭露所述的抗體或抗原結合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 區加上一個或多個人 FR 區。人 FR 種系序列可以從 ImMunoGeneTics (IMGT) 網站得到。

**【0108】** 可使用所屬技術領域具有通常知識者已知的常規技術，就與相同表位的結合競爭性篩選抗體。例如，可進行競爭和交叉競爭研究，以獲得彼此競爭或交叉競爭與抗原結合的抗體。基於它們的交叉競爭來獲得結合相同表位的抗體的高通量方法描述於國際專利公開 WO03/48731 中。因此，可使用所屬技術領域具有通常知識者已知的常規技術，獲得與本揭露的抗體分子競爭結合 CD40 上的相同表位的抗體及其抗原結合片段。

**【0109】** 術語“障礙”是將受益於使用本揭露的人源化抗 CD40 抗體進行的治療的任何病症。這包括慢性和急性障礙或疾病。本揭露要治療的障礙的非限制性例子包括癌症、血液惡性腫瘤、良性和惡性腫瘤、白血病和淋巴樣惡性腫瘤以及炎性障礙、血管生成障礙、自身免疫性障礙和免疫學障礙。

**【0110】** 術語“CD40 相關障礙”或“CD40 相關疾病”是指其中指示表達 CD40 的細胞的修飾或消除的病症。這些細胞包括表現出異常增殖的表達 CD40 的細胞或與癌性或惡性生長相關聯的表達 CD40 的細胞。表現出 CD40 抗原的異常表達的癌症的更具體例子包括 B 淋巴母細胞、伯基特氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、T 細胞淋巴瘤、卡波西氏肉瘤、骨肉瘤、表皮和內皮腫瘤、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、結腸癌、前列腺癌、頭頸癌、皮膚癌(黑色素瘤)、膀胱癌和腎癌。此類障礙包括但不限於白血病、淋巴瘤(包括 B 細胞淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、多發性骨髓瘤、瓦爾登斯特羅姆巨球蛋白血症；實體瘤，包括肉瘤，例如骨肉瘤、尤因氏肉瘤、惡性黑色素瘤、腺癌(包括卵巢腺癌)、卡波西氏肉瘤/卡波西氏腫瘤和鱗狀細胞癌。“CD40 相關障礙”還包括免疫系統疾病和障礙，例如自身免疫性障礙和炎性障礙。此類病症包括但不限於類風濕性關節炎(RA)、全身性紅斑狼瘡(SLE)、硬皮病、舍格倫綜合症、多發性硬化症、牛皮癬、炎性腸病(例如潰瘍性結腸炎和克羅恩病)、肺部炎症、哮喘和特發性血小板減少性紫癜(ITP)。

**【0111】** 術語“阻止...的生長”或“生長抑制”是指抑制細胞、尤其表達 CD40 抗原的贅生性細胞類型的生長或增殖。因此，生長抑制例如顯著降低了 S 期贅生性細胞的百分比。

**【0112】** “給予”、“施用”和“處理”當應用於動物、人、實驗受試者、細胞、組織、器官或生物流體時，是指外源性藥物、治療劑、診斷劑或組成物與動物、

人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。“給予”、“施用”和“處理”可以指例如治療、藥物代謝動力學、診斷、研究和實驗方法。細胞的處理包括試劑與細胞的接觸，以及試劑與流體的接觸，其中該流體與細胞接觸。“給予”、“施用”和“處理”還意指藉由試劑、診斷、結合成物或藉由另一種細胞體外和離體處理例如細胞。“處理”當應用於人、獸醫學或研究受試者時，是指治療處理、預防或預防性措施，研究和診斷應用。

**【0113】** “治療”意指給予受試者內用或外用治療劑，諸如包含本揭露的任一種抗體或其抗原結合片段或包含其的組成物，該受試者已經患有、疑似患有、傾向於患有一種或多種疾病或其症狀，而巳知該治療劑對這些症狀具有治療作用。通常，在受治療受試者或群體中以有效緩解一種或多種疾病症狀的量給予治療劑，無論是藉由誘導這類症狀退化還是抑制這類症狀發展到任何臨床右測量的程度。有效緩解任何具體疾病症狀的治療劑的量（也稱作“治療有效量”）可根據多種因素變化，例如受試者的疾病狀態、年齡和體重，以及藥物在受試者產生需要療效的能力。藉由醫生或其它專業衛生保健人士通常用於評價該症狀的嚴重性或進展狀況的任何臨床檢測方法，可評價疾病症狀是否巳被減輕。儘管本揭露的實施方案（例如治療方法或製品）在緩解某個受試者中目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域巳知的任何統計學檢驗方法如 Student t 檢驗、卡方檢驗、依據 Mann 和 Whitney 的 U 檢驗、Kruskal-Wallis 檢驗（H 檢驗）、Jonckheere-Terpstra 檢驗和 Wilcoxon 檢驗確定，其在統計學顯著數目的受試者中應當減輕目標疾病症狀。

**【0114】** “有效量”包含足以改善或預防醫學病症的症狀或病症的量。有效量還意指足以允許或促進診斷的量。用於特定受試者或獸醫學受試者的有效量

可依據以下因素而變化：如待治療的病症、受試者的總體健康情況、給藥的方法途徑和劑量以及副作用嚴重性。有效量可以是避免顯著副作用或毒性作用的最大劑量或給藥方案。

**【0115】** “同源性”或“同一性”是指兩個多核苷酸序列之間或兩個多肽之間的序列相似性。當兩個比較序列中的位置均被相同核苷酸或胺基酸單體亞基佔據時，例如如果兩個 DNA 分子的每一個位置都被相同核苷酸佔據時，那麼該分子在該位置是同源的。兩個序列之間的同源性百分率是兩個序列共有的匹配或同源位置數除以比較的位置數 $\times 100\%$ 的函數。例如，在序列最佳比對時，如果兩個序列中的 10 個位置有 6 個匹配或同源，那麼兩個序列為 60%同源。一般而言，當比對兩個序列而得到最大的同源性百分率時進行比較。

**【0116】** “細胞”、“細胞系”和“細胞培養物”可互換使用，並且所有這類名稱都包括其後代。還應當理解的是，由於故意或非有意的突變，所有後代在 DNA 含量方面不可能精確相同。包括具有與最初轉化細胞中篩選的相同的功能或生物學活性的突變後代。

**【0117】** “視需要”或“視需要地”意味著隨後所描述地事件或環境可以但不必發生，該說明包括該事件或環境發生或不發生地場合。例如，“視需要包含 1-3 個抗體重鏈可變區”意味著特定序列的抗體重鏈可變區可以但不必須存在。

**【0118】** 本揭露的“CD40 結合分子”以最大化解釋，包含本揭露的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，只要能夠實現與 CD40 結合的蛋白均在該術語範圍內。例如，CD40 結合蛋白可以包含一個或多個效應分子，以例如綴和的方式。該“效應分子”單獨可以具有治療活性（例如具有抗腫瘤活性或免疫激活或抑制活性）或具有檢測功能，其可以是任何形式，例如生物活性蛋白（例如酶）、其它抗體

或抗體片段、合成或天然存在的聚合物、多核苷酸及其片段例如 DNA、RNA 及其片段、放射性核素（特別地放射性碘化物）、放射性同位素、螯合金屬、納米顆粒和報導基團(例如螢光化合物)、或可藉由 NMR 或 ESR 光譜分析檢測的化合物。效應分子與本揭露抗 CD40 抗體或其抗原結合片段的綴和方式可以藉由常規方法實現。

**【0119】** “抗體藥物偶聯物”是指將藥物（例如抗腫瘤劑、毒素）連接至抗體上形成的偶聯物，該偶聯物可藉由常規的方法連接，例如藉由可裂解或不可裂解接頭連接。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0120】** 圖1A至圖1B: CD40拮抗型抗體在報告基因系統中的活性結果，圖1A和圖1B分別是9E6-L4H2和2F12-L4H2的相關結果，圖1A和圖1B均使用人IgG1同種型作為陰性對照，CFZ533作為陽性對照。

**【0121】** 圖2A至圖2B: CD40拮抗型抗體在B細胞激活實驗體系中的抑制活性結果，圖2A是9E6-L4H2和2F12-L4H2的CD19+CD69+的細胞百分比抑制結果，圖2B是9E6-L4H2和2F12-L4H2的CD19+CD69+的細胞MFI抑制結果，圖2A-圖2B均使用人IgG1同種型作為陰性對照，CFZ533作為陽性對照。

**【0122】** 圖3A至圖3D: CD40拮抗型抗體在DC細胞激活實驗體系中的抑制活性結果，圖3A是9E6-L4H2和2F12-L4H2的CD11C+CD80+的細胞MFI抑制結果，圖3B是9E6-L4H2和2F12-L4H2的CD11C+CD86+細胞MFI抑制結果，圖3C是9E6-L4H2和2F12-L4H2的抑制IL-12/23 p40的結果，圖3D是9E6-L4H2和2F12-

L4H2抑制TNF $\alpha$ 的結果，圖3A至3D均使用人IgG1同種型作為陰性對照，CFZ533作為陽性對照。

**【0123】** 圖4: CD40拮抗型抗體9E6-L4H2、2F12-L4H2在B細胞激活實驗體系中的內源激動活性結果，使用人IgG1同種型、CFZ533、激動性抗CD40抗體9E5-SELFNS作為對照。

**【0124】** 圖5A至圖5B: CD40拮抗型抗體在小鼠T細胞依賴的體液免疫反應模型中的活性結果，圖5A為流程圖，圖5B為第7、14、21、28天的檢測結果圖。

**【0125】** 圖6A至圖6B: CD40拮抗型抗體在小鼠皮膚移植排異模型中的活性結果，圖6A為流程圖，圖6B為皮膚移植物生存率(%)和皮膚移植物評分結果。

**【0126】** 圖7: CD40拮抗型抗體聯用他克莫司(FK506)在小鼠皮膚移植排異模型中的活性結果，圖7的A為9E6-L4H2(10mpk)及其與他克莫司(FK506)聯用的皮膚移植物生存率(%)結果，圖7的B為2F12-L4H2(10mpk)及其與他克莫司(FK506)聯用的皮膚移植物生存率(%)結果，圖7的C為9E6-L4H2(10mpk)及其與他克莫司(FK506)聯用的皮膚移植物評分結果，圖7的D為2F12-L4H2(10mpk)及其與他克莫司(FK506)聯用的皮膚移植物評分結果。

**【0127】** 圖8: CD40拮抗型抗體9E6-L4H2、2F12-L4H2在人CD40轉基因小鼠中的PK檢測結果，使用CFZ533作為對照。

**【0128】** 圖9A至圖9B: Fc突變的CD40拮抗型抗體在B細胞激活實驗體系中的抑制活性結果，圖9A是9E6-L4H2和9E6-L4H2-AAYTE的CD19+CD69+的細胞MFI抑制結果，圖9B是2F12-L4H2和2F12-L4H2-AAYTE的CD19+CD69+的細胞MFI抑制結果。

【0129】 圖10A至圖10D: Fc突變的CD40拮抗劑在DC細胞激活實驗體系中的抑制活性結果，圖10A是9E6-L4H2和9E6-L4H2-AAYTE抑制IL-12/23 p40的結果，圖10B是9E6-L4H2和9E6-L4H2-AAYTE抑制TNF $\alpha$ 的結果，圖10C是2F12-L4H2和2F12-L4H2-AAYTE抑制IL-12/23 p40的結果，圖10D是2F12-L4H2和2F12-L4H2-AAYTE抑制TNF $\alpha$ 的結果。

### 【實施方式】

【0130】 以下結合實施例用於進一步描述本揭露，但這些實施例並非限制本揭露的範圍。

【0131】 本揭露實施例或測試例中未註明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件，或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。參見 Sambrook 等，分子選殖，實驗室手冊，冷泉港實驗室；當代分子生物學方法，Ausubel 等著，Greene 出版協會，Wiley Interscience，NY。未註明具體來源的試劑，為市場購買的常規試劑。

### 【0132】 實施例 1. CD40 免疫抗原、篩選抗原的序列及製備

帶 his 標籤的人 CD40 (h-CD40-his)重組蛋白（貨號 CD0-H5228）、帶小鼠 Fc 標籤的人 CD40 (h-CD40-mFc)重組蛋白（貨號 CD0-H525a）、帶 his 標籤和生物素標籤的人 CD40 (hCD40-his-avi)重組蛋白（貨號 CD0-H82E8）和帶 his 標籤的食蟹猴 CD40 (cyno-CD40-his)重組蛋白（貨號 CD0-C52H6）均為購買自 Acrobiosystems 公司的純化商業蛋白試劑，其各自的序列來源見表 2。該蛋白試劑可用於下述各實施例實驗中。

【0133】表 2. 重組蛋白胺基酸序列來源

名稱	胺基酸序列起止	GenBank 登錄號
h-CD40-his	Glu21-Arg193	P25942-1
h-CD40-mFc	Glu21-Arg193	P25942-1
h-CD40-his-avi	Glu21-Arg193	P25942-1
cyno-CD40-his	Glu21-Arg193	G7PG38

## 【0134】實施例 2. 抗 CD40 兔單株抗體的篩選和人-兔嵌合抗體的製備

抗人 CD40 單株抗體藉由免疫 2 隻新西蘭白兔產生。免疫抗原為帶 His 標籤的人 CD40 重組蛋白 (h-CD40-his, 用磷酸鹽緩衝液配製成 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )。用弗氏佐劑乳化：首次用弗氏完全佐劑(CFA)，其餘加強免疫用弗氏不完全佐劑 (IFA)。每次免疫採用多點皮下注射 400  $\mu\text{g}$  抗原。免疫注射時間為第 0、7、20、41 天。於第 27 和 48 天採血進行血檢，用 ELISA 和 FACS 方法檢測兔子血清中的抗體滴度。選擇血清中抗體滴度高並且滴度趨於平穩的兔子：第 63 天加強免疫，靜脈注射 400  $\mu\text{g}/\text{隻}$  的磷酸鹽緩衝液配製的抗原溶液；第 67 天收集該兔子的脾臟，加入帶有生物素標籤的 CD40 抗原，用流式細胞儀分選被標記的單株 B 細胞至 96 孔板中。培養 14 天後，收集上清液，藉由 ELISA 和 FACS 的方法篩選上清液可以結合人 CD40、食蟹猴 CD40 以及 Raji 細胞 (表達人 CD40 的腫瘤細胞系) 的株，一共 28 株 B 細胞單株。對這些單株細胞提取 RNA，反轉錄，進行 PCR 擴增後送測序公司測序，最終得到 28 株兔源抗體的序列，經親和力、活性鑑定實驗 (方法參見實施例 2-3)，篩選獲得 11 株單抗，重鏈和輕鏈可變區序列如表 3 所示，CDR 序列如表 4 所示。

【0135】表 3. 抗 CD40 兔單株抗體可變區序列

編號	重鏈可變區和輕鏈可變區序列	
5A9	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTASRFSLSYDMSWVRQAPGN GLEWIGAIGGAGGTYYASWAKSRSTITRNTNLNTLTKMTSL TAADTATYFCARGWTRLDLWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:1)
	VL	ADIVLTQTASPVS GAVGGT VTINCQSS EDISSNLSWYQQKPGQ PPKLLIYAASN LASGVPSRFK GSGSGTEFTLTISDLECADAATY YCQGGYWSGISNFGNGFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:2)
9E6	VH	QSVRESEGGLVKPTDTLTLTCTVSGFSLSSYDMSWVRQAPGN GLEWIGAIGGAGGTYYASWAKSRSTITRNTNLNTVTLKMSSL TAADTATYFCARGWTRLDLWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:3)
	VL	ADIVLTQTPSPVS GAVGGT VTIKCQASE DISSNLA WYQQKPG QPPKLLIFPASN LASGVSSRFK GSGSGTEFTLTISDLECADAAT YYCQGGYWTSTSNFGNGFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:4)
9F10	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSYDMSWVRQAPGN GLEWIGAIGGAGGTYYASWAKSRSTITRNTNLNTVTLKMTSL TAADTATYFC TRGWTRLDLWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:5)
	VL	ADIVLTQTESPVS GPGVGGT VTINCQASE DISSNLA WYQQKPG QPPKLLIYAASN LASGVPSRFK GSGSGTEFTLTISDLECADAAT YYCQGAYWSSTSYFGNGFGGGTQVVVK (SEQ ID NO:6)
4F6	VH	QSVKESEGGLFKPADTLTLTCTVSRFSLSYGVTVWRQAPGN GLEWIGAIGSTGSAYYASWAKSRSTITRDTNLNTVTLKMTSLT AADTATYFCARGGITAYAIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:7)
	VL	AFELTQTPSSVEAAVGGT VTIKCQASQ SISNGLAWYQQKPGQ PPKLLIAGASN LASGVSSRFK GSGSIEFILTISDLECADAATY YCQSYNSFTTVFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:8)
5B8	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLNSYGVSWVRQAPGN GLEWIGAIGSSGSAYYASWARSRSTITRDTNLNTVTLKMTSLT AADTATYFCARGGITVYAIWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:9)

	VL	AFELTQTPSPVSAAVGGT <sup>U</sup> VTINCQASEDITNGIAWYQQKPGQP PKLLIAGASN <sup>U</sup> LASGVSSRFK <sup>U</sup> GSGSGTEFTLTISDLECDDAATY YCQSY <sup>U</sup> YSSSYTIFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:10)
8G10	VH	QSVKESEGGLFKPTATLTLTCTVSGFSLSSYGVS <sup>U</sup> WVRQAPGSG LEWIGGIAS <sup>U</sup> TGTTYANWAKSRSTITRDTNLKTVTLKMTSLT AADTATYFCARGGITAYAIWGPGLVTVSS (SEQ ID NO:11)
	VL	AFELTQTPSSVEAAVGGT <sup>U</sup> VTIKCQASQSITNGLAWYQQKPGQ PPKLLIAGASN <sup>U</sup> LASGVSSRFK <sup>U</sup> GSGSGTEFTLTISDLECADAAT YYCQSY <sup>U</sup> YDSSSTVFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:12)
8C12	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSYGVS <sup>U</sup> WVRQAPGN GLEWIGGIGSDGSAYYASWAKSRATITRDTNLKTVTLEMTSL TVADTATYFCARGGITVYAIWGPGLVTVSS (SEQ ID NO:13)
	VL	AFELTQTPSPVSAAVGGT <sup>U</sup> VTIKCQASQ <sup>U</sup> SISNGLAWYQQKPGQ PPKVLIVGASN <sup>U</sup> LASGVSSRFK <sup>U</sup> GSGSGTEFTLSISDLECADGAT YYCQSY <sup>U</sup> FSSSSTVFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:14)
4D4	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSYGVS <sup>U</sup> WVRQAPGN GLEWIGGIGSDGSAYYASWAKSRATITRDTNLKTVTLEMTSL TAADTATYFCARGGITVYAIWGPGLVTVSS (SEQ ID NO:15)
	VL	AFELTQTPSPVSAAVGGT <sup>U</sup> VTIKCQASQ <sup>U</sup> SISNGLAWYQQKPGQ PPKVLIVGASN <sup>U</sup> LASGVSSRFK <sup>U</sup> GSGSGTEFTLSISDLECADGAT YYCQSY <sup>U</sup> FSSSSTVFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:16)
2F12	VH	QSVKESEGGLFKPKDTLTLTCTVSGFSLSSYGVS <sup>U</sup> WVRQAPGN GLEWIGGIGSDGSAYYASWAKSRATITRDTNLKTVTLEMTSL TAADTATYFCARGGITVYAMWGPGLVTVSS (SEQ ID NO:17)
	VL	AFELTQTPASVEAAMGGT <sup>U</sup> VTIKCQASQ <sup>U</sup> SISNGLAWYQQKPGQ PPKLLIVGASN <sup>U</sup> LASGVSSRFK <sup>U</sup> GSGSGTEFTLSISDLECADGAT YYCQSY <sup>U</sup> FSSSSTVFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:18)
3F6	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSY <sup>U</sup> AI <sup>U</sup> SWVRQAPGNG LEWIGAI <sup>U</sup> DRYGTTYATWAKSRSTITRNTNENTVTLKMTSLT AADTATYFCARGPWYYGGDVAWTGSFDPWGPGLVTVSS (SEQ ID NO:19)
	VL	AQVLTQTASPVSAAVGGT <sup>U</sup> VTISCQSSQSVANNDFLSWYQQKP GQPPKLLIYGASTLASGVPSRFRGNGSGTQFTLTITGMQCDD AATYFCTGGYAGPIYIFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:20)

10A4	VH	QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCTVSGIDLSR <b>NAIS</b> WVRQSPGNG LEWIGGIGSSGSAYYASWAKSRSTITRDTNLNTVTLKMTSLTA ADTATYFCARDGYAGSSWGIYYGMDPWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO:21)
	VL	AIEMTQSPPSLSASVGETVRIRCLASEDIYRGISWYQQKPGKP PTLLIYGASTLQSGVPPRFSGSGSGTDYTLTIGGVQAEDAATY YCLGGHSYSSAGLTFGAGTKVEIK (SEQ ID NO:22)

(註：下劃線為重輕鏈可變區的 CDR 區，使用 Kabat 編號規則確定)

【0136】表 4. 抗 CD40 兔單株抗體的 CDR 區 (Kabat 編號規則)

編號	重鏈 CDR		輕鏈 CDR	
5A9	HCDR1	SYDMS (SEQ ID NO:23)	LCDR1	QSEDISSNLS (SEQ ID NO:26)
	HCDR2	AIGGAGGTY <b>YASWAKS</b> (SEQ ID NO:24)	LCDR2	AASN <b>LAS</b> (SEQ ID NO:27)
	HCDR3	GWTRL <b>DL</b> (SEQ ID NO:25)	LCDR3	QGGYWSGISN <b>FGNG</b> (SEQ ID NO:28)
9E6	HCDR1	SYDMS (SEQ ID NO:23)	LCDR1	QASEDISS <b>NLA</b> (SEQ ID NO:29)
	HCDR2	AIGGAGGTY <b>YASWAKS</b> (SEQ ID NO:24)	LCDR2	PASN <b>LAS</b> (SEQ ID NO:30)
	HCDR3	GWTRL <b>DL</b> (SEQ ID NO:25)	LCDR3	QGGYWTSTSN <b>FGNG</b> (SEQ ID NO:31)
9F10	HCDR1	SYDMS (SEQ ID NO:23)	LCDR1	QASEDISS <b>NLA</b> (SEQ ID NO:29)
	HCDR2	AIGGAGGTY <b>YASWAKS</b> (SEQ ID NO:24)	LCDR2	AASN <b>LAS</b> (SEQ ID NO:27)
	HCDR3	GWTRL <b>DL</b> (SEQ ID NO:25)	LCDR3	QGAYWSSTSY <b>FGNG</b> (SEQ ID NO:32)
4F6	HCDR1	SYG <b>VT</b> (SEQ ID NO:33)	LCDR1	QASQ <b>SISNGLA</b> (SEQ ID NO:36)
	HCDR2	AIGSTGSAYYAS <b>WAKS</b> (SEQ ID NO:34)	LCDR2	GASN <b>LAS</b> (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITAY <b>AI</b> (SEQ ID NO:35)	LCDR3	QSY <b>YNSFTTV</b> (SEQ ID NO:38)
5B8	HCDR1	SYG <b>VS</b> (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASEDI <b>TNGIA</b> (SEQ ID NO:42)
	HCDR2	AIGSSGSAYYAS <b>WARS</b> (SEQ ID NO:40)	LCDR2	GASN <b>LAS</b> (SEQ ID NO:37)

	HCDR3	GGITVYAI (SEQ ID NO:41)	LCDR3	QSYSSSYTI (SEQ ID NO:43)
8G10	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQSITNGLA (SEQ ID NO:45)
	HCDR2	GIASGTYYANWAKS (SEQ ID NO:44)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITAYAI (SEQ ID NO:35)	LCDR3	QSYDSSSTV (SEQ ID NO:46)
8C12	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:36)
	HCDR2	GIGSDGSAYYASWAKS (SEQ ID NO:47)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITVYAI (SEQ ID NO:41)	LCDR3	QSYFSSSTV (SEQ ID NO:48)
4D4	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:36)
	HCDR2	GIGSDGSAYYASWAKS (SEQ ID NO:47)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:37)
	HCDR3	GGITVYAI (SEQ ID NO:41)	LCDR3	QSYFSSSTV (SEQ ID NO:48)
2F12	HCDR1	SYGVS (SEQ ID NO:39)	LCDR1	QASQISNGLA (SEQ ID NO:36)
	HCDR2	GIGSDGSAYYASWAKS (SEQ ID NO:47)	LCDR2	GASNLAS (SEQ ID NO:50)
	HCDR3	GGITVYAM (SEQ ID NO:49)	LCDR3	QSYFSSSTV (SEQ ID NO:48)
3F6	HCDR1	SYAIS (SEQ ID NO:51)	LCDR1	QSSQSVANNDFLS (SEQ ID NO:54)
	HCDR2	AIDRYGTTYATWAKS (SEQ ID NO:52)	LCDR2	GASTLAS (SEQ ID NO:55)
	HCDR3	GPWYYGGDVAWTGSFDP (SEQ ID NO:53)	LCDR3	TGGYAGPIYI (SEQ ID NO:56)
10A4	HCDR1	RNAIS (SEQ ID NO:57)	LCDR1	LASEDIYRGIS (SEQ ID NO:60)
	HCDR2	GIGSSGSAYYASWAKS (SEQ ID NO:58)	LCDR2	GASTLQS (SEQ ID NO:61)
	HCDR3	DGYAGSSWGIYYGMDP (SEQ ID NO:59)	LCDR3	LGGHSYSSAGLT (SEQ ID NO:62)

【0137】 將獲得的可變區序列分別接上人的抗體 IgG1 恆定區(帶有 N297A 突變，Eu 編號系統) 序列和人 kappa 鏈恆定區序列，得到人-兔嵌合抗體序列，

利用分子選殖技術，把嵌合抗體的序列插入到表達載體中，利用 HEK293 細胞表達系統，即可獲得人-兔嵌合抗體。

**【0138】 實施例 3. 人-兔嵌合抗 CD40 抗體 Raji 細胞結合實驗**

Raji 細胞是過表達人 CD40 的腫瘤細胞系。將數量為  $2 \times 10^5$  的 Raji 細胞接種到 96 孔板上。加入 100  $\mu$ L 待測抗體，最高終濃度為 100 nM，5 倍稀釋，一共 8 個濃度，4°C 孵育 1 小時。用洗液洗一遍，按 1:500 的稀釋度加入偶聯了 AF647 的抗人 IgG 抗體(Jackson Immunoresearch Laboratories, 貨號 205-609-088)，4°C 孵育 30 分鐘。用洗液洗一遍，流式細胞儀讀取螢光強度。計算抗 CD40 抗體對 CD40 的結合  $EC_{50}$  值。使用抗 CD40 拮抗型抗體 CFZ533(即，Iscalimab, Nova)作為陽性對照，重鏈和輕鏈可變區序列分別來源於 US8277810B 的序列 5 和序列 2。

**【0139】** 表 5 結果顯示，2F12、3F6、4F6、5A9、5B8、9E6、10A4 均具有強於 CFZ533 的結合  $EC_{50}$ ，而以 8E1(序列未出示)為例的其他抗體的  $EC_{50}$  則弱於 CFZ533。

**【0140】** 表 5. 人-兔嵌合抗 CD40 抗體對 Raji 細胞的 FACS 結合  $EC_{50}$  (nM)

編號	結合 $EC_{50}$ (nM)
2F12	0.412
3F6	1.506
4F6	0.258
5A9	0.671
5B8	0.435
8E1	2.511
9E6	0.608
10A4	0.467
CFZ533	2.410

**【0141】 實施例 4 人-兔嵌合抗 CD40 抗體報告基因細胞活性實驗**

HEK-Blue CD40L 細胞購自 Invivogen (Cat#hkb-cd40)，該細胞穩定轉染了人 CD40 基因和 NF- $\kappa$ B 介導的 SEAP 基因組，可以藉由 SEAP 受質 QUANTI-Blue 檢測上清中分泌的 SEAP 來表徵 CD40 信號通路的活化水平。本實驗藉由檢測 CD40L 對細胞 HEK-Blue CD40L 的活化，根據 IC<sub>50</sub> 大小評價抗 CD40 抗體的體外拮抗劑活性。細胞 HEK-Blue CD40L 培養在含 10% FBS，100  $\mu$ g/mL Zeocin 和 30  $\mu$ g/mL Blasticidin 的 DMEM 培養基中，一週傳代 2~3 次，傳代比例 1:5 或 1:10。傳代時，吸掉培養基，用 5mL 0.25% 的胰酶沖洗細胞層，然後吸掉胰酶，將細胞放在培養箱中消化 3~5 分鐘，加入新鮮培養基重新懸浮細胞。在 96 孔細胞培養板中加入 100  $\mu$ L 的細胞懸液，密度為  $5 \times 10^5$  細胞/mL，培養基為含 10% FBS，100  $\mu$ g/mL Zeocin 和 30  $\mu$ g/mL Blasticidin 的 DMEM，96 孔板外圍只加入 100 $\mu$ L 無菌水。將培養板在培養箱培養 24 小時 (37°C，5% CO<sub>2</sub>)。細胞貼壁後，每孔加入 100 $\mu$ L 梯度稀釋的待測抗體，37°C 孵育 30 分鐘。加入 25 ng/mL CD40L (R&D, 貨號 2706-CL) 和 2  $\mu$ g/mL anti-His 抗體 (R&D, 貨號 MAB050)，將培養板在培養箱孵育 20-24 小時 (37°C，5% CO<sub>2</sub>)。每孔取 20 $\mu$ L 細胞上清到一個新的 96 孔平底板中，加入 180  $\mu$ L QUANTI-Blue 受質溶液，將培養板在培養箱內避光孵育 1-3 小時。用酶標儀 (Thermo MultiSkanFc) 測定在 630 nm 處的吸光度，計算 IC<sub>50</sub> 值評價抗 CD40 抗體的體外細胞活性。參見表 6，結果顯示 2F12、3F6、4D4、4F6、5A9、5B8、8C12、8G10、9E6、9F10、10A4 均具有與 CFZ533 相當或略強的報告基因細胞抑制活性 IC<sub>50</sub>，而以 2F1 (序列未出示) 為例的其他抗體的 IC<sub>50</sub> 則弱於 CFZ533。

【0142】表 6. 抗 CD40 抗體報告基因細胞活性 IC<sub>50</sub> (nM)

編號	IC <sub>50</sub> (nM)
2F12	0.1717
3F6	0.3778
4D4	0.197
4F6	0.1823
5A9	0.3173
5B8	0.2033
8C12	0.1729
8G10	0.1556
9E6	0.2206
9F10	0.2171
10A4	0.2172
2F1	0.6849
CFZ533	0.2715

【0143】實施例 5. 抗 CD40 抗體的人源化

將兔源抗體 2F12、3F6、9E6 和 10A4 的重、輕鏈可變區序列與抗體 GermLine 數據庫比較，獲得同源性高的人種系模板。最終抗體進行人源化的人種系模板信息參見表 7。

【0144】表 7. 抗體人源化過程的人種系模板信息

編號	重鏈可變區		輕鏈可變區	
	FR1-FR3	FR4	FR1-FR3	FR4
2F12	IGHV2-26*01	IGHJ1*01	IGkV1-13*02	IGKJ4*01
3F6	IGHV4-30-4*02		IGkV1-13*02	
9E6	IGHV4-30-4*02		IGkV1-9*01	
10A4	IGHV4-4*08		IGkV1-6*01	

【0145】將兔源抗體的 CDR 區移植到選擇的人種系模板上，替換人種系可變區，再與相應的人源 IgG 恆定區（較佳重鏈為帶有 N297A 突變的 IgG1，輕鏈為 κ）重組。然後以兔源抗體的三維結構為基礎，對包埋殘基、與 CDR 區有

直接相互作用的殘基，以及對 VL 和 VH 的構象有重要影響的殘基進行回復突變，並對潛在的翻譯後修飾風險點進行突變，得到最終的人源化分子。實例性出示 2F12 和 9E6 對應的人源化輕、重鏈可變區序列（參見表 8、表 9），其中 L 代表輕鏈，H 代表重鏈，L 和 H 後的數字代表包含不同回復突變的不同版本的人源化序列。

【0146】表 8. 人源化的 9E6 的重、輕鏈可變區序列

重、輕鏈可變區序列	序列編號
9E6-L1 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQ KPGKPPKLLIFPASNLAGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS LQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGNVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:63
9E6-L2 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQ KPGKPPKLLIFPASNLAGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS LQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGSGFEGGGTKVEIK	SEQ ID NO:64
9E6-L3 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQ KPGKPPKLLIFPASNLAGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS LQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGTGFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:65
9E6-L4 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCQASEDISSNLAWYQQ KPGKPPKLLIFPASNLAGVPSRFSGSGSGTEFTLTISS LQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGQGFEGGGTKVEIK	SEQ ID NO:66
9E6-H1 EVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWI RQPPGKGLEWIGAIGGAGGTYYASWAKSRVTISVDTS LNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGWTRLDLWGQGT LVTVSS	SEQ ID NO:67
9E6-H2 QVQVQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWI RQPPGKGLEWIGAIGGAGGTYYASWAKSRVTISVDTS LNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGWTRLDLWGQGT LVTVSS	SEQ ID NO:68

（下劃線為 Kabat 編碼規則的 CDR。）

【0147】9E6 在人源化的過程中，獲得了如下的 LCDR3:

>9E6-L1 的 LCDR3

QGGYWTSTSNFGNV (SEQ ID NO:69)

【0148】 >9E6-L2 的 LCDR3

QGGYWTSTSNFGSG (SEQ ID NO:70)

【0149】 >9E6-L3 的 LCDR3

QGGYWTSTSNFGTG (SEQ ID NO:71)

【0150】 >9E6-L4 的 LCDR3

QGGYWTSTSNFGQG (SEQ ID NO:72)

【0151】 >9E6-L 的 LCDR3 通式

QGGYWTSTSNFGX<sub>9</sub>X<sub>10</sub> (SEQ ID NO:73), 其中, X<sub>9</sub> 選自 N、S、T 或 Q, X<sub>10</sub> 選自 V 或 G。

【0152】 5A9、9E6、9F10 具有如下的通式結構：

HCDR1、HCDR2、HCDR3 分別如 SYDMS(SEQ ID NO:23)、AIGGAGGTYYASWAKS(SEQ ID NO:24)、GWTRLDL(SEQ ID NO:25)所示；

LCDR1 如 QX<sub>1</sub>SEDISSNLX<sub>2</sub> (SEQ ID NO:74)所示，其中，X<sub>1</sub> 選自 A 或 S，X<sub>2</sub> 選自 A 或 S；

LCDR2 如 X<sub>3</sub>ASNLAS (SEQ ID NO:75)所示，其中，X<sub>3</sub> 選自 A 或 P；

LCDR3 如 QGX<sub>4</sub>YWX<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>SX<sub>8</sub>FGX<sub>9</sub>X<sub>10</sub> (SEQ ID NO:76)所示，其中，X<sub>4</sub> 選自 A 或 G，X<sub>5</sub> 選自 S 或 T，X<sub>6</sub> 選自 S 或 G，X<sub>7</sub> 選自 T 或 S，X<sub>8</sub> 選自 N 或 Y，X<sub>9</sub> 選自 N、S、T 或 Q，X<sub>10</sub> 選自 V 或 G。

【0153】表 9. 人源化的 2F12 的重、輕鏈可變區序列

重、輕鏈可變區序列		序列編號
2F12-L1	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ <b><u>Q</u></b> SISNV <b><u>L</u></b> LAWYQ QKPGKPPKLLIVGASN <b><u>L</u></b> ASGVPSR <b><u>F</u></b> SGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQ <b><u>S</u></b> YFSS <b><u>S</u></b> STVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:77
2F12-L2	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ <b><u>S</u></b> ISQ <b><u>G</u></b> LAWYQ QKPGKPPKLLIVGASN <b><u>L</u></b> ASGVPSR <b><u>F</u></b> SGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQ <b><u>S</u></b> YFSS <b><u>S</u></b> STVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:78
2F12-L3	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ <b><u>S</u></b> ISS <b><u>G</u></b> LAWYQ <b><u>Q</u></b> KPGKPPKLLIVGASN <b><u>L</u></b> ASGVPSR <b><u>F</u></b> SGSGSGTDFTLTI <b><u>S</u></b> SLQPEDFATYYCQ <b><u>S</u></b> YFSS <b><u>S</u></b> STVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:79
2F12-L4	AFQLTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ <b><u>S</u></b> IS <b><u>T</u></b> G <b><u>L</u></b> LAWYQ QKPGKPPKLLIVGASN <b><u>L</u></b> ASGVPSR <b><u>F</u></b> SGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQ <b><u>S</u></b> YFSS <b><u>S</u></b> STVFGGGTKVEIK	SEQ ID NO:80
2F12-H1	EVT <b><u>L</u></b> KESGPVLV <b><u>K</u></b> PTETLTL <b><u>T</u></b> CTVSG <b><u>F</u></b> SL <b><u>S</u></b> SYGV <b><u>S</u></b> WIR QPPG <b><u>K</u></b> ALE <b><u>W</u></b> L <b><u>G</u></b> IGSDGS <b><u>A</u></b> YYAS <b><u>W</u></b> AKS <b><u>R</u></b> L <b><u>T</u></b> IS <b><u>R</u></b> DT <b><u>N</u></b> L K <b><u>Q</u></b> V <b><u>V</u></b> L <b><u>T</u></b> M <b><u>T</u></b> N <b><u>M</u></b> D <b><u>P</u></b> V <b><u>D</u></b> T <b><u>A</u></b> YYC <b><u>A</u></b> R <b><u>G</u></b> G <b><u>I</u></b> T <b><u>V</u></b> Y <b><u>A</u></b> M <b><u>W</u></b> G <b><u>Q</u></b> TL <b><u>V</u></b> T <b><u>V</u></b> SS	SEQ ID NO:81
2F12-H2	E <b><u>V</u></b> T <b><u>V</u></b> KESGPVLV <b><u>K</u></b> PTETLTL <b><u>T</u></b> CTVSG <b><u>F</u></b> SL <b><u>S</u></b> SYGV <b><u>S</u></b> WIR QPPG <b><u>K</u></b> ALE <b><u>W</u></b> L <b><u>G</u></b> G <b><u>I</u></b> IGSDGS <b><u>A</u></b> YYAS <b><u>W</u></b> AKS <b><u>R</u></b> L <b><u>T</u></b> IS <b><u>R</u></b> DT <b><u>N</u></b> L K <b><u>Q</u></b> V <b><u>V</u></b> L <b><u>T</u></b> M <b><u>T</u></b> N <b><u>M</u></b> D <b><u>P</u></b> V <b><u>D</u></b> T <b><u>A</u></b> YYC <b><u>A</u></b> R <b><u>G</u></b> G <b><u>I</u></b> T <b><u>V</u></b> Y <b><u>A</u></b> M <b><u>W</u></b> G <b><u>Q</u></b> TL <b><u>V</u></b> T <b><u>V</u></b> SS	SEQ ID NO:82

(下劃線為 Kabat 編碼規則的 CDR。)

【0154】2F12 在人源化的過程中，獲得了如下的 LCDR1:

>2F12-L1 的 LCDR1

QASQ**S**IS**N**V**L**A (SEQ ID NO:83)

【0155】>2F12-L2 的 LCDR1

QASQ**S**IS**Q**G**L**A (SEQ ID NO:84)

【0156】>2F12-L3 的 LCDR1

QASQ**S**IS**S**G**L**A (SEQ ID NO:85)

【0157】>2F12-L4 的 LCDR1

QASQSISTGLA (SEQ ID NO:86)

【0158】 >2F12-L 的 LCDR1 通式

QASQSISX<sub>24</sub>X<sub>25</sub>LA (SEQ ID NO:87)，其中，X<sub>24</sub> 選自 N、Q、S 或 T，X<sub>25</sub> 選自 V 或 G。

【0159】 4F6、5B8、8G10、8C12、4D4、2F12 具有如下的通式結構：

HCDR1 如 SYGVX<sub>11</sub> (SEQ ID NO:88) 所示，其中，X<sub>11</sub> 選自 S 或 T；

HCDR2 如 X<sub>12</sub>IX<sub>13</sub>SX<sub>14</sub>GX<sub>15</sub>X<sub>16</sub>YYAX<sub>17</sub>WAX<sub>18</sub>S (SEQ ID NO:89) 所示，其中，X<sub>12</sub> 選自 A 或 G，X<sub>13</sub> 選自 G 或 A，X<sub>14</sub> 選自 T、S 或 D，X<sub>15</sub> 選自 T、S，X<sub>16</sub> 選自 T、A，X<sub>17</sub> 選自 S、N，X<sub>18</sub> 選自 K 或 R；

HCDR3 如 GGITX<sub>19</sub>YAX<sub>20</sub> (SEQ ID NO:90) 所示，其中，X<sub>19</sub> 選自 A 或 V，X<sub>20</sub> 選自 I 或 M；

LCDR1 如 QASX<sub>21</sub>X<sub>22</sub>IX<sub>23</sub>X<sub>24</sub>X<sub>25</sub>LA (SEQ ID NO:91) 所示，其中，X<sub>21</sub> 選自 Q 或 E，X<sub>22</sub> 選自 S 或 D，X<sub>23</sub> 選自 S 或 T，X<sub>24</sub> 選自 N、Q、S 或 T，X<sub>25</sub> 選自 V 或 G。

【0160】 LCDR2 如 GASNLAS (SEQ ID NO:37) 所示；

LCDR3 如 QSYX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>SX<sub>28</sub>X<sub>29</sub>TX<sub>30</sub> (SEQ ID NO:92) 所示，其中，X<sub>26</sub> 選自 F 或 Y，X<sub>27</sub> 選自 S、D 或 N，X<sub>28</sub> 選自 S 或 F，X<sub>29</sub> 選自 S、T 或 Y，X<sub>30</sub> 選自 V 或 I。

【0161】 在每個兔抗的人源化各版本輕、重鏈之間進行兩兩組合、表達和純化。命名規則為重鏈和輕鏈可變區編號的組合，例如“2F12-L1H1”即是 VH 選擇 SEQ ID NO:63，VL 選擇 SEQ ID NO:67 的抗體。輕、重鏈恆定區分別採用人 IgG1 恆定區（帶有 N297A 突變，Eu 編號系統）序列和人 kappa 鏈恆定區序列。

【0162】 示例性的人源化分子 2F12-L4H2（使用 2F12-L4 輕鏈和 2F12-H2 重鏈）和 9E6-L4H2（使用 9E6-L4 輕鏈和 9E6-H2 重鏈）序列如下，其輕、重鏈恆定區分別採用人 IgG1 恆定區(帶有 N297A 突變, Eu 編號系統)序列和人 kappa 鏈恆定區序列。

【0163】 >9E6-L4H2 HC:

QVQVQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKGLEWIGAIGG  
 AGGTYIASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGWTRLDL  
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVIV  
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:93

【0164】 >9E6-L4H2 LC:

DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCQASEDISSNLAWYQQKPGKPKLLIFPASNLA  
 SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQGGYWTSTSNFGQGFGGGTK  
 VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS  
GNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
NRGEC SEQ ID NO:94

【0165】 >2F12-L4H2 HC :

EVTVKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKALEWLGIGS  
 DGSAYIASWAKSRLTISRDTNLKQVVLMTNMDPVDTATYYCARGGITVYA

MWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV  
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDW  
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ  
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:95

【0166】 >2F12-L4H2 LC :

AFQLTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSISTGLAWYQQKPGKPPKLLIVGASNLAS  
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYFSSSTVFGGGTKVEIKRTVAA  
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:96

【0167】 對上述抗體的重鏈恆定區進行改造，抗體採用人 IgG1 恆定區，帶有 L234A、L235A、M252Y、S254T 和 T256E (Eu 編號系統) 5 個點突變，輕鏈恆定區以及輕、重鏈可變區保持不變。新產生的抗體為 2F12-L4H2-AAYTE 和 9E6-L4H2-AAYTE，其完整重鏈序列如下所示：

【0168】 >9E6-L4H2-AAYTE HC:

QVQVQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGFSLSSYDMSWIRQPPGKGLEWIGAIGG  
AGGTYIASWAKSRVTISVDTSLNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARGWTRLDL  
WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV  
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV

DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT  
LVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ  
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:97

【0169】 >2F12-L4H2-AAYTE HC:

EVTVKESGPVLVKPTETLTLCTVSGFSLSSYGVSWIRQPPGKALEWLGIGS  
DGSAYYASWAKSRLTISRDTNLKQVVLMTNMDPVDATYYCARGGITVYA  
MWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK  
VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV  
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW  
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT  
CLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ  
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:98

以上下劃線區為重鏈或輕鏈恆定區。

【0170】 實例性的 IgG Fc 如下所示：

> IgG1-Fc(N297A)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE

WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA  
LHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:99

【0171】 > IgG1-Fc(AAYTE)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT  
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV  
EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:100

【0172】 實施例 6. 人源化抗 CD40 抗體 Raji 細胞結合實驗

Raji 細胞表面高表達人 CD40，可用於檢測 CD40 拮抗型抗體與細胞表面人 CD40 的結合特性。

【0173】 將 Raji 以 1.5E5/孔鋪板，加入不同濃度的 CD40 拮抗型抗體，4 度孵育 1 小時。FACS 緩衝液(PBS+2% FBS)洗滌兩遍後，加入二抗(Alexa Flour488 偶連的抗人 IgG(H+L)抗體)，4 度孵育 0.5 小時。FACS 緩衝液洗滌兩遍後，流式細胞儀(BD FACS Celesta)檢測細胞表面的螢光強度。

【0174】 結果如表 10 所示，其中 2F12-L4H2、9E6-L4H2 和 CFZ533 與 Raji 表面的人 CD40 有相似的結合能力。

【0175】表 10. 人源化抗 CD40 抗體對 Raji 細胞的 FACS 結合 EC<sub>50</sub> 結果

抗體編號	結合 EC <sub>50</sub> (nM)	抗體編號	結合 EC <sub>50</sub> (nM)
2F12	0.479	9E6	0.895
2F12-L1H1	0.549	9E6-L1H1	1.083
2F12-L1H2	0.469	9E6-L1H2	1.048
2F12-L2H1	0.516	9E6-L2H1	1.993
2F12-L2H2	0.516	9E6-L2H2	1.660
2F12-L3H1	0.456	9E6-L3H1	1.065
2F12-L3H2	0.762	9E6-L3H2	1.148
2F12-L4H1	0.508	9E6-L4H1	0.928
2F12-L4H2	0.589	9E6-L4H2	0.870
CFZ533	1.009		

## 【0176】實施例 7. 抗 CD40 抗體與人 CD40 和食蟹猴 CD40 的親和力測定

將待測抗體親和捕獲在抗人 Fc 的芯片上，然後於芯片表面流經一系列濃度梯度下的帶有 His 標籤的人或食蟹猴 CD40 抗原，利用 Biacore 儀器實時檢測反應信號從而獲得結合和解離曲線。實驗中用到的緩衝液為 HBS-EP+ 10×緩衝溶液(Cat. # BR-1006-69, GE)，用 D. I. Water 稀釋至 1× (pH 7.4)。實驗得到的數據以 (1:1) Binding 模型進行擬合，得出親和力數值，見表 11。

【0177】9E6-L4H2、2F12-L4H2 相比 CFZ533 與人 CD40 有相似的結合常數，9E6-L4H2 與食蟹猴 CD40 的結合親和力較強，2F12-L4H2 與食蟹猴 CD40 的結合親和力略弱。

【0178】表 11. CD40 拮抗型抗體與不同種系 CD40 的 SPR 親合力

流動相	固定相	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
人 CD40	2F12-L4H2	7.58E+05	2.06E-03	2.71E-09
	9E6-L4H2	4.13E+05	2.21E-04	5.36E-10
	CFZ533	6.88E+05	1.41E-04	2.05E-10
食蟹猴 CD40	2F12-L4H2	1.17E+07	4.14E-01	3.53E-08
	9E6-L4H2	5.14E+05	6.23E-05	1.21E-10

## 【0179】實施例 8. 抗 CD40 抗體報告基因細胞活性實驗

HEK-Blue CD40L 細胞購自 Invivogen (Cat# hkb-cd40)，該細胞穩定轉染了人 CD40 基因和 NF-kB 介導的 SEAP 基因組，可以藉由 SEAP 受質 QUANTI-Blue 檢測上清中分泌的 SEAP 含量來表徵 CD40 信號通路的活化水平。本實驗藉由檢測 CD40 拮抗型抗體對 CD40L 誘導的 HEK-Blue CD40L 細胞活化的抑制作用，根據 IC<sub>50</sub> 大小評價 CD40 拮抗型抗體的體外細胞活性。

【0180】HEK-Blue CD40L 細胞培養在含 10% FBS，100 µg/ml Normocin，100 µg/ml Zeocin 和 30 pg/ml Blasticidin 的 DMEM 培養基中，一週傳代 2~3 次。將 HEK-Blue CD40L 細胞以 5E4/孔鋪入 96 孔細胞培養板(培養基為 DMEM, 10% FBS，100 µg/ml Normocin)，培養過夜。細胞貼壁後，每孔加入 100µL 梯度稀釋的待測抗體，37°C 孵育 1 小時。加入 CD40L-his (R&D, 2706-CL-025) 和抗 His 抗體 (R&D, MAB050-500)，過夜培養。將細胞離心，轉移 20 µL 細胞上清到一個新的 96 孔白板中，加入 180µL QUANTI-Blue 受質溶液，避光孵育 15 分鐘，用 Envision 酶標儀測定在 620 nm 處的吸光度，計算 IC<sub>50</sub> 值評價 CD40 拮抗型抗體的體外細胞活性。

【0181】結果如表 12 和圖 1A 至圖 1B 所示，9E6-L4H2 和 CFZ533 對報告基因系統具有相似的抑制活性，2F12-L4H2 的抑制活性比 CFZ533 更優。

【0182】表 12. 抗 CD40 抗體對 CD40 報告基因細胞活性抑制 IC<sub>50</sub>

	抗體編號	IC <sub>50</sub> (nM)
實驗 1	2F12-L4H2	0.18
	CFZ533	0.36
實驗 2	9E6-L4H2	0.50
	CFZ533	0.35

## 【0183】實施例 9. 抗 CD40 抗體在 B 細胞激活實驗體系中的抑制活性

CD40 高表達於 B 細胞，CD40L 結合 CD40 後可誘導 B 細胞活化，上調一系列激活標誌物的表達。CD40 拮抗型抗體藉由阻斷 CD40L 與 CD40 的結合，解除 B 細胞的免疫激活過程。

【0184】將人 PBMC 以 2E5/孔，每孔 50  $\mu$ L 鋪入 96 孔細胞培養板（培養基為 RPMI-1640，10% FBS, 1%青黴素-鏈黴素）。每孔加入 50  $\mu$ L 梯度稀釋的待測抗體，37°C，5%CO<sub>2</sub> 條件共孵育 0.5 小時。每孔加入 CD40L-his 和抗 His 抗體，刺激過夜。第二天離心去除上清，細胞用 FACS 緩衝液洗滌兩遍，加入 100  $\mu$ L 1:1000 稀釋的 Fixable viability dye EF780（Invitrogen, 65086514）室溫染色 15 分鐘。細胞洗滌兩遍後加入 100  $\mu$ L 1:200 稀釋的人 Fc 封閉劑（Fc blocker，BD, 564220）室溫封閉 10 分鐘。離心細胞後加入 1:200 稀釋的流式抗體（PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD19（Biolegend, 302230），APC anti-human CD69（Biolegend, 310910）），4°C 孵育 0.5 小時。離心去除上清，細胞用 FACS 緩衝液洗滌兩遍後，用 200  $\mu$ L PBS 重新懸浮細胞，流式細胞儀（BD FACS Celesta）檢測細胞表面的螢光強度。

【0185】結果如表 13 和圖 2A 至圖 2B 所示，9E6-L4H2 相比 CFZ533 具有相似的 B 細胞激活抑制活性。2F12-L4H2 的 B 細胞抑制活性強於 CFZ533。

【0186】表 13. 人源化抗 CD40 抗體在 B 細胞激活實驗體系中的抑制活性

抗體編號	CD19+CD69+%		CD19+CD69+ MFI	
	IC <sub>50</sub> (nM)	最大抑制率	IC <sub>50</sub> (nM)	最大抑制率
CFZ533	0.14	95%	0.07	110%
9E6-L4H2	0.14	98%	0.07	110%
2F12-L4H2	0.04	93%	0.03	111%

加入抗體後，CD19+CD69+信號低於本底值，可能是因為一定程度抑制了 B 細胞的本底激活（除抑制 CD40L 誘導的信號外）。

## 【0187】實施例 10. 抗 CD40 抗體在 DC 細胞激活實驗體系中的抑制活性

CD40 在樹突狀細胞（Dendritic Cell, DC）上高表達，CD40L 結合 CD40 後可誘導 DC 活化，上調 DC 細胞表面多個激活標誌物的表達，並促進 DC 分泌多種炎症因子，進一步擴大免疫反應。CD40 拮抗型抗體藉由阻斷 CD40L 與 CD40 的結合，解除 DC 細胞的免疫激活過程。

【0188】使用 EsaySep™ 人 CD14 分選試劑盒（Stemcell, 19359）從新鮮原代人外周血 PBMC 中分選並富集單核細胞，用 RPMI-1640 培養基(10% FBS, 1%青黴素-鏈黴素)，50 ng/ml IL-4（PeproTech, 200-04）和 50 ng/ml GM-CSF（PeproTech, 300-03）分化 6 天。第 7 天時將分化完成的 DC 細胞以 1E5/孔鋪入 96 孔細胞培養板。每孔加入梯度稀釋的待測抗體，37°C，5% CO<sub>2</sub> 條件共孵育 0.5 小時。每孔再加入終濃度為 CD40L-his 和抗 His 抗體。培養 48 小時後流式檢測 DC 細胞的激活水平：離心去除上清，細胞用 FACS 緩衝液（PBS+2% FBS）洗滌兩遍，加入 100 μL 1:1000 稀釋的 Fixable viability dye EF780（Invitrogen, 65086514）室溫染色 15 分鐘。細胞洗滌兩遍後加入 100 μL 1:200 稀釋的人 Fc 封

閉 (BD, 564220) 室溫封閉 10 分鐘。離心細胞後加入 1 : 200 稀釋的流式抗體 (Alexa Fluor® 700 anti-human CD11c (Biolegend, 337220), Brilliant Violet 421™ anti-human CD80(Biolegend, 305221), APC anti-human CD86(Biolegend, 305412)), 4°C 孵育 0.5 小時。離心去除上清, 細胞用 FACS 緩衝液洗滌兩遍後, 用 200  $\mu$ L PBS 重新懸浮細胞, 流式細胞儀 (BD FACS Celesta) 檢測細胞表面的螢光強度。

【0189】此外, 分別於培養 24 小時 (TNF $\alpha$ , Cisbio, 62HTNFAPEG) 和 48 小時 (IL-12/23 p40, Novus, VAL121) 後檢測上清中細胞因子的分泌水平。

【0190】實驗結果如表 14 和圖 3A 至圖 3D 所示, 9E6-L4H2 和 2F12-L4H2 具有與對照抗體 CFZ533 相似的 DC 細胞抑制活性。

表 14. 人源化抗 CD40 抗體在 DC 細胞激活實驗體系中的抑制活性

抗體編號	DC 細胞激活實驗體系的 IC <sub>50</sub> (nM)			
	CD80 MFI	CD86 MFI	IL-12/23 p40	TNF $\alpha$
CFZ533	1.19	1.93	0.68	0.35
9E6-L4H2	3.44	3.72	1.85	0.7
2F12-L4H2	0.78	0.52	0.68	0.30

【0191】實施例 11. 人源化抗 CD40 抗體在 B 細胞激活實驗體系中的激動活性

CD40 屬於 TNF 超家族受體, 在結合配體 CD40L 或被抗體交聯後可介導下游信號通路的特異和非特異性激活, 因此在不加入 CD40L 條件下可檢測 CD40 拮抗型抗體對 B 細胞的本底激動劑活性。

【0192】將人 PBMC 以 2E5/孔, 每孔 100  $\mu$ L 鋪入 96 孔細胞培養板 (培養基為 RPMI-1640, 10% FBS, 1% 青黴素-鏈黴素)。每孔加入 100  $\mu$ L 梯度稀釋的

待測抗體，37°C，5% CO<sub>2</sub>培養過夜。第二天離心去除上清，細胞用 FACS 緩衝液洗滌兩遍，加入 100 μL 1:1000 稀釋的 Fixable viability dye EF780 室溫染色 15 分鐘。細胞洗滌兩遍後加入 100 μL 1:200 稀釋的人 Fc 封閉室溫封閉 10 分鐘。離心細胞後加入 1:200 稀釋的流式抗體（PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD19（Biolegend, 302230），APC anti-human CD69（Biolegend, 310910）），4°C 孵育 0.5 小時。離心去除上清，細胞用 FACS 緩衝液洗滌兩次後，用 200 μL PBS 重新懸浮細胞，流式細胞儀（BD FACS Celesta）檢測細胞表面的螢光強度。

**【0193】** 結果如圖 4 所示，CD40 激動性抗體 9E5-SELFNS (WO2020108611A1)劑量依賴地激活 B 細胞，而 9E6-L4H2 和 2F12-L4H2 在 2.5 nM 下仍然沒有表現出明顯的 B 細胞激動活性。

#### **【0194】 實施例 12. 小鼠 T 細胞依賴的體液免疫反應（TDAR）模型**

雌性人 CD40 轉基因小鼠，6-7 週齡，購自百奧賽圖江蘇基因生物技術有限公司。飼養環境：SPF；生產許可證：SCXK（蘇）-2016-0004；人 CD40 轉基因小鼠合格證編號：320726200100167773。動物到達後適應性飼養 7 天，隨機分組。實驗第 0 天，各組小鼠取 1 隻採血，之後腹腔注射給藥。第 1 天時小鼠腹腔注射 50 μg KLH（KLH: 弗氏完全佐劑 CFA=1:1 乳化免疫複合物）/隻免疫。實驗第 15 天時，腹腔注射 50 μg KLH（KLH: 弗氏不完全佐劑 IFA=1:1 乳化免疫複合物）/隻進行二次免疫。各組藥物每週腹腔注射 2 次，分別於第 7、14、21 和 28 天經眼眶靜脈叢採血~150 μL。全血室溫放置 1-4 小時，7000 rpm 速度 4°C 離心 10 分鐘分離血清-80°C 保存備用。具體實驗流程如圖 5A 所示。

**【0195】** 具體給藥方案如表 15 所示，每週分離小鼠血清並用 ELISA 檢測抗 KLH 的特異性 IgG 水平。

【0196】 表 15.小鼠 TDAR 模型實驗給藥方案

	分組	給藥	N	劑量	頻率
hCD40轉基因小鼠	1	IgG1	5	1 mg/kg	BIW
	2	CFZ533	5	1 mg/kg	BIW
	3	CFZ533	5	0.3 mg/kg	BIW
	4	9E6-L4H2	5	1 mg/kg	BIW
	5	9E6-L4H2	5	0.3 mg/kg	BIW
	6	2F12-L4H2	5	1 mg/kg	BIW
	7	2F12-L4H2	5	0.3 mg/kg	BIW

【0197】 結果如圖 5B 和表 16 所示，1 mg/kg CD40 拮抗型抗體顯著抑制兩次免疫後抗 KLH 特異 IgG 的產生。低劑量 0.3 mg/kg 9E6-L4H2 和 2F12-L4H2 相比同劑量 CFZ533 對兩次免疫後抗 KLH 的 IgG 的產生有更優的抑制作用。

表 16. 抗 CD40 抗體對免疫後 IgG 產生的抑制作用 (0.3 mpk)

	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
給藥前	0	0	0	0
IgG1	1.5±0.4	247.4±33.1	2187±1248	4773±2280
CFZ533 (0.3 mpk)	0.04±0.01	30.9±10.8	845±423	3043±1600
9E6-L4H2 (0.3 mpk)	0.002±0.001	0.02±0.01	0	18.25±8.9
2F12-L4H2 (0.3 mpk)	0.22±0.14	33.4±25.8	175.5±103	805.7±415.6

【0198】 實施例 13. 小鼠皮膚移植排異模型

雄性 Balb/c 小鼠，6 週齡，購自上海市計劃生育科學研究所實驗動物經營部。飼養環境：SPF；合格證編號：20180006023393。

【0199】雌性人 CD40 轉基因小鼠，6-7 週齡，購自百奧賽圖江蘇基因生物技術有限公司。飼養環境：SPF；合格證編號：320726200100179778。

【0200】動物到達後適應性飼養 7 天，隨機分組。實驗第-2 天，小鼠腹腔注射他克莫司 FK506 或 CD40 拮抗型抗體。實驗第 0 天，4%水合氯醛麻醉供體 Balb/c 小鼠和 C57BL6/J 小鼠，取下供體小鼠尾巴，分離整圈長度 1cm 尾部皮膚。受體小鼠背部去毛，沿皮膚層切口，在保留背部脂肪和結締組織的情況下去掉等面積的皮膚，將供體皮膚放置於受體小鼠切口處，使用膠水縫合邊緣皮膚，放入籠中恢復。具體實驗流程如圖 6A 所示。

【0201】藉由表 17 的給藥方案給藥小鼠，小鼠恢復 7 天後，每天觀察小鼠皮膚生存情況，根據排異評分記錄排異分數。評分體系如下，3：皮膚沒有出現紅色，光滑；2：部分皮膚發紅，失去光澤，乾燥；1：皮膚大部分變紅，沒有條紋，縮水；0：移植排異導致 80%的皮膚壞死。

【0202】表 17.小鼠皮膚移植排異模型給藥方案

	分組	給藥	N	劑量	給藥途徑
供體: Balb/c 受體: hCD40轉基因小鼠 C57BL6/J	1	對照組(同種移植)	2	IgG1 10 mg/kg	ip
	2	模型組(異種移植)	7	IgG1 10 mg/kg	ip
	3	CFZ533	7	3 mg/kg	ip
	4	CFZ533	7	10 mg/kg	ip
	5	9E6-L4H2	7	3 mg/kg	ip
	6	9E6-L4H2	7	10 mg/kg	ip
	7	2F12-L4H2	7	3 mg/kg	ip
	8	2F12-L4H2	7	10 mg/kg	ip
	9	他克莫司	6	3 mg/kg	ip
	10	9E6-L4H2 + 他克莫司	6	10 mg/kg + 3 mg/kg	ip
	11	2F12-L4H2 + 他克莫司	6	10 mg/kg + 3 mg/kg	ip

【0203】結果如圖 6B 和表 18-表 20 所示，CD40 拮抗型抗體相比模型組均能顯著改善小鼠皮膚移植物評分，並延長皮膚移植物的存活時間。在對皮膚移植物評分的過程中，由於之前看不出來是否有排異，是從第 8 天開始進行評分。9E6-L4H2 和 2F12-L4H2 相比對照抗體 CFZ533 表現出更優的抗移植排異活性。

【0204】表 18. 抗 CD40 抗體的第 15 天皮膚移植物生存率 (%)

	皮膚移植物生存率(%)		皮膚移植物生存率(%)
對照(control)	100%	對照(control)	100%
模型(model)	0%	模型(model)	0%
CFZ533(3mpk)	0%	CFZ533(10mpk)	0%
9E6-L4H2(3mpk)	28.5%	9E6-L4H2(10mpk)	14.3%
2F12-L4H2(3mpk)	28.5%	2F12-L4H2(10mpk)	42.9%

【0205】表 19. 抗 CD40 抗體的皮膚移植物評分 (3mpk)

	8 天	10 天	15 天	20 天
對照(control)	3	3	3	3
模型(model)	0.7	0	0	0
CFZ533(3mpk)	2.7	2.1	0	0
9E6-L4H2(3mpk)	3	2.7	0.6	0
2F12-L4H2(3mpk)	2.9	2.4	0.6	0.1

【0206】表 20. 抗 CD40 抗體的皮膚移植物評分 (10mpk)

	8 天	10 天	15 天	20 天
對照(control)	3	3	3	3
模型(model)	0.7	0	0	0
CFZ533(10mpk)	2.9	2.1	0	0
9E6-L4H2(10mpk)	3	2.7	0.3	0
2F12-L4H2(10mpk)	2.7	2.4	0.9	0.4

【0207】此外，如圖 7 和表 21-表 23 所示，9E6-L4H2 和 2F12-L4H2 聯用他克莫司後對抗小鼠皮膚移植排異有進一步的增效。

【0208】表 21. 抗 CD40 抗體和他莫克司聯用的第 15 天皮膚移植物生存率

	皮膚移植物生存率 (%)		皮膚移植物生存率 (%)
對照(control)	100%	對照(control)	100%
模型(model)	0%	模型(model)	0%
FK506(3mpk)	16.7%	FK506(3mpk)	16.7%
9E6-L4H2(10mpk)	14.3%	2F12-L4H2(10mpk)	42.9%
9E6-L4H2(10mpk) +FK506	33.3%	2F12-L4H2(10mpk) +FK506	83.3%

【0209】表 22. 抗 CD40 抗體和他莫克司聯用的皮膚移植物評分

	8 天	10 天	15 天	20 天
對照(control)	3	3	3	3
模型(model)	0.7	0	0	0
FK506(3mpk)	2.5	1.5	0.5	0
9E6-L4H2(10mpk)	3	2.7	0.3	0
9E6-L4H2(10mpk)+FK506(3mpk)	2.3	1.5	0.7	0.7

【0210】表 23. 抗 CD40 抗體和他莫克司聯用的皮膚移植物評分

	8 天	10 天	15 天	20 天
對照(control)	3	3	3	3
模型(model)	0.7	0	0	0
FK506(3mpk)	2.5	1.5	0.5	0
2F12-L4H2(10mpk)	2.7	2.4	0.9	0.4
2f12-L4H2(10mpk)+FK506(3mpk)	2.7	2.3	1.5	0.8

【0211】實施例 14. 人源化抗 CD40 抗體在人 CD40 轉基因小鼠中的 PK 檢測

雌性人 CD40 轉基因小鼠，6-7 週齡，購自百奧賽圖江蘇基因生物技術有限公司。飼養環境：SPF；生產許可證：SCXK（蘇）-2016-0004；人 CD40 轉基因小鼠合格證編號：320726200100154632。動物到達後適應性飼養 7 天，隨機分組。實驗第 0 天，各組小鼠 10 mg/kg 腹腔注射抗 CD40 抗體，於給藥後 15 分鐘，4 小時，8 小時，第 1、2、4、7、10 和 14 天，分別採血 100-150  $\mu$ L，使用 10  $\mu$ L EDTA-K2 (0.1M) 抗凝，冰上保存。用 ELISA 檢測不同時間點小鼠血漿中的抗體濃度。具體檢測方法如下：將山羊抗人 IgG Fc 抗體（Rockland, Cat#609-101-017）用 PBS 稀釋至 2.5  $\mu$ g/ml，50  $\mu$ L/每孔加入 96 孔板中，4 度孵育過夜。洗液

洗三遍後，每孔加入 50  $\mu\text{L}$  封閉液，37°C 孵育 1 小時。加入小鼠血漿和待檢測抗體的標準曲線，37°C 孵育 2 小時。洗液洗三遍，按 50  $\mu\text{L}$ /每孔加入抗 hlgG Fab-  
HRP (Sigma, Cat# A0293, 1 : 10000)，室溫孵育 1 小時。洗液洗三遍。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  TMB，避光反應 5 分鐘。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的 0.16 M 硫酸。Envision 酶標儀讀取 450 nm OD 值，計算 CD40 拮抗型抗體的濃度。

【0212】結果如表 24 和圖 8 所示，9E6-L4H2、2F12-L4H2 和對照分子 CFZ533 在人 CD40 轉基因小鼠中有相似的 PK 特徵。

【0213】表 24. CD40 拮抗型抗體在 hCD40 轉基因小鼠中的 PK 數據

	CFZ533	9E6-L4H2	2F12-L4H2
T1/2 (h)	214.8	226.8	257.1
Cmax (mg/L)	75.95	85.8	88.78
AUC <sub>(0-d14)</sub> ((h)*(mg/L))	12655	13439	12014

【0214】實施例 15. 人源化抗 CD40 抗體與人 FcRn 的親合力測定

將待測抗體親和捕獲在抗人 Fab 的芯片上，然後於芯片表面流經一系列濃度梯度下的人 FcRn 抗原（購自 AcroBiosystem），利用 Biacore 儀器實時檢測反應達到穩態時的信號。實驗中用到的緩衝液為 HBS-EP+ 10 $\times$ 緩衝溶液(Cat. # BR-1006-69, GE)，用 D. I. Water 稀釋至 1 $\times$  (pH 7.4)。實驗得到的數據以穩態結合 (Steady State Binding) 模型進行擬合，得出親和力數值，見表 25。相比母本抗體，攜帶 AAYTE 突變的抗 CD40 抗體與人 FcRn 有更高的結合親和力。

【0215】表 25. 人源化抗 CD40 抗體與人 FcRn 的親合力測定

流動相	固定相	KD (M)
人 FcRn	2F12-L4H2	2.79E-07
	2F12-L4H2-AAYTE	4.42E-08
	9E6-L4H2	2.93E-07
	9E6-L4H2-AAYTE	3.98E-08

**【0216】實施例 16. Fc 攜帶 AAYTE 突變的抗 CD40 抗體在 B 細胞激活實驗體系中的抑制活性**

參照實施例 10 中的方法，檢測 Fc 上攜帶 AAYTE 突變的抗 CD40 抗體 2F12-L4H2-AAYTE、9E6-L4H2-AAYTE 在 B 細胞激活實驗體系中的抑制活性。結果如圖 9A 至圖 9B 所示，Fc 突變的抗 CD40 抗體與母本抗 CD40 抗體具有相似的 B 細胞抑制活性。

**【0217】實施例 17. Fc 攜帶 AAYTE 突變的抗 CD40 抗體在 DC 細胞激活實驗體系中的抑制活性**

參照實施例 11 中的方法，檢測 Fc 上攜帶 AAYTE 突變的抗 CD40 抗體 2F12-L4H2-AAYTE、9E6-L4H2-AAYTE 在 DC 細胞激活實驗體系中的抑制活性。結果如圖 10A 至圖 10D 所示，Fc 突變抗 CD40 抗體與母本抗 CD40 抗體具有相似的 DC 細胞抑制活性。

**【符號說明】** 無

**【發明申請專利範圍】**

**【請求項1】** 一種抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含重鏈可變區 (VH) 和輕鏈可變區 (VL)，其中，

a-1) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 67 或 68 任一所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO: 63-66 任一所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

a-2) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 1 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO: 2 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

a-3) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 3 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO: 4 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

a-4) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 5 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO: 6 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-1) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 81 或 82 任一所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO: 77-80 任一所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-2) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 7 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO: 8 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-3) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 9 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO: 10 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-4) 該 VH 包含如 SEQ ID NO: 11 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，該 VL 包含如 SEQ ID NO: 12 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-5) 該 VH 包含如 SEQ ID NO:13 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO:14 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-6) 該 VH 包含如 SEQ ID NO:15 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO:16 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

b-7) 該 VH 包含如 SEQ ID NO:17 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO:18 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

c) 該 VH 包含如 SEQ ID NO:19 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO:20 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；或

d) 該 VH 包含如 SEQ ID NO:21 所示 VH 中的 HCDR1、HCDR2、HCDR3，  
該 VL 包含如 SEQ ID NO:22 所示 VL 中的 LCDR1、LCDR2、LCDR3；

其中，該 CDR 是根據 Kabat、IMGT、Chothia、AbM 或 Contact 編號系統定義的，較佳為 Kabat 編號系統定義的。

**【請求項2】** 如請求項 1 所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其包含：

1) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列，和輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:74、75、76 所示的序列；

2) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:88、89、90 所示的序列，和輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:91、37、92 所示的序列；

3) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:51、52、53 所示的序列，和輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:54、55、56 所示的序列；或

4) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:57、58、59 所示的序列，和輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:60、61、62 所示的序列；

較佳地，1) 中的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含：

1-1) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:29、30、73 所示的序列；

1-2) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:26、27、28 所示的序列；

1-3) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；和輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:29、27、32 所示的序列；

較佳地，2) 中的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含：

2-1) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:39、47、49 所示的序列；輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:87、50、48 所示的序列；

2-2) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:33、34、35 所示的序列；和輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:36、37、38 所示的序列；

2-3) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:39、40、41 所示的序列；和輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:42、37、43 所示的序列；

2-4) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:39、44、35 所示的序列；和輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:45、37、46 所示的序列；

2-5) 重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:39、47、41 所示的序列；和輕鏈 LCDR1、LCDR2、LCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:36、37、48 所示的序列；

更佳地，1-1) 中的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含：

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:23、24、25 所示的序列；輕鏈 LCDR1，包含如 SEQ ID NO:29 所示的序列；輕鏈 LCDR2，包含如 SEQ ID NO:30 所示的序列；輕鏈 LCDR3，包含如 SEQ ID NO:69-72 任一所示的序列；

更佳地，2-1) 中的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，包含：

重鏈 HCDR1、HCDR2、HCDR3，分別包含如 SEQ ID NO:39、47、49 所示的序列；輕鏈 LCDR1，包含如 SEQ ID NO:83-86 任一所示的序列；輕鏈 LCDR2，包含如 SEQ ID NO:50 所示的序列；和輕鏈 LCDR3，包含如 SEQ ID NO:48 所示的序列。

**【請求項3】** 如請求項 1 或 2 所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其為重組抗體、兔源抗體、嵌合抗體、人源化抗體、全人抗體或其抗原結合片段。

**【請求項4】** 如請求項 3 所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中，

該人源化抗體或其抗原結合片段的重鏈框架區源自 IGHV2-26\*01、IGHV4-30-4\*02、IGHV4-4\*08、IGHJ1\*01；和/或，輕鏈框架區源自 IGkV1-13\*02、IGkV1-9\*01、IGkV1-6\*01、IGKJ4\*01；

較佳地，重鏈框架區的 FR1-FR3 源自 IGHV2-26\*01、IGHV4-30-4\*02、IGHV4-4\*08，重鏈框架區的 FR4 源自 IGHJ1\*01；輕鏈框架區的 FR1-FR3 源自 IGkV1-13\*02、IGkV1-9\*01、IGkV1-6\*01，輕鏈框架區的 FR4 源自 IGKJ4\*01。

**【請求項5】** 如請求項 1 至 4 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中，

A-1)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：67 所示或與之具有至少 90%同一性，VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：63-66 任一所示或與之具有至少 90%同一性；

A-2)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：68 所示或與之具有至少 90%同一性，VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：63-66 任一所示或與之具有至少 90%同一性；

A-3)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：1 所示或與之具有至少 90%同一性，VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：2 所示或與之具有至少 90%同一性；

A-4)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：3 所示或與之具有至少 90%同一性，VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：4 所示或與之具有至少 90%同一性；

A-5)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：5 所示或與之具有至少 90%同一性，VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：6 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-1)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：81 所示或與之具有至少 90%同一性，VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：77-80 任一所示或與之具有至少 90%同一性；

B-2)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：82 所示或與之具有至少 90%同一性，VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO：77-80 任一所示或與之具有至少 90%同一性；

B-3)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 7 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 8 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-4)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 9 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 10 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-5)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 11 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 12 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-6)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 13 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 14 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-7)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 15 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 16 所示或與之具有至少 90%同一性；

B-8)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 17 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 18 所示或與之具有至少 90%同一性；

C)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 19 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 20 所示或與之具有至少 90%同一性；或

D)VH 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 21 所示或與之具有至少 90%同一性，  
VL 的胺基酸序列如 SEQ ID NO : 22 所示或與之具有至少 90%同一性。

**【請求項6】** 如請求項 1 至 5 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其還含有 IgG 抗體的 Fc 區；較佳地，該 IgG 抗體為 IgG1、IgG2 或 IgG4 抗體；更佳地，該 Fc 區為含有 N297A 突變的 IgG1 的 Fc 區，或為具有 L234A、L235A、M252Y、S254T、T256E 中任一個或多個突變的 IgG1 的 Fc 區。

**【請求項7】** 如請求項 1 至 6 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中該抗原結合片段為 scFv、Fv、Fab 或 Fab' 片段。

【請求項8】如請求項 1 至 7 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中，

重鏈全長的胺基酸序列如 SEQ ID NO：93 或 97 所示或與之具有至少 90% 同一性；輕鏈全長的胺基酸序列如 SEQ ID NO：94 所示或與之具有至少 90% 同一性；或

重鏈全長的胺基酸序列如 SEQ ID NO：95 或 98 所示或與之具有至少 90% 同一性；輕鏈全長的胺基酸序列如 SEQ ID NO：96 所示或與之具有至少 90% 同一性。

【請求項9】如請求項 1 至 8 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其具有以下至少一項：

- i) 以 10nM 或更低的  $K_D$  結合人 CD40；
- ii) 無明顯的激動活性。

【請求項10】一種經分離的多核苷酸，其編碼如請求項 1 至 9 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。

【請求項11】一種載體，其含有如請求項 10 所述的多核苷酸。

【請求項12】一種宿主細胞，其含有如請求項 10 所述的多核苷酸或如請求項 11 所述的載體。

【請求項13】一種 CD40 結合分子，其含有如請求項 1 至 9 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。

【請求項14】一種組醫藥組成物，其含有如請求項 1 至 9 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，以及至少一種可藥用的賦形劑、稀釋劑或載體。

【請求項15】如請求項 14 所述的醫藥組成物，其還含有他克莫司。

【請求項16】 一種治療自體免疫疾病的方法，包括：

向有需要的受試者施用治療有效量的如請求項 1 至 9 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，或如請求項 14 所述的醫藥組成物；

該自身免疫疾病較佳為乾燥綜合症、多發性硬化或紅斑狼瘡，更佳為系統性紅斑狼瘡。

【請求項17】 一種如請求項 1 至 9 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段用於製備治療自身免疫疾病的藥物的用途；

該自身免疫疾病較佳為乾燥綜合症、多發性硬化或紅斑狼瘡，更佳為系統性紅斑狼瘡。

【請求項18】 一種治療移植物抗宿主病或緩解移植排異反應的方法，包括：

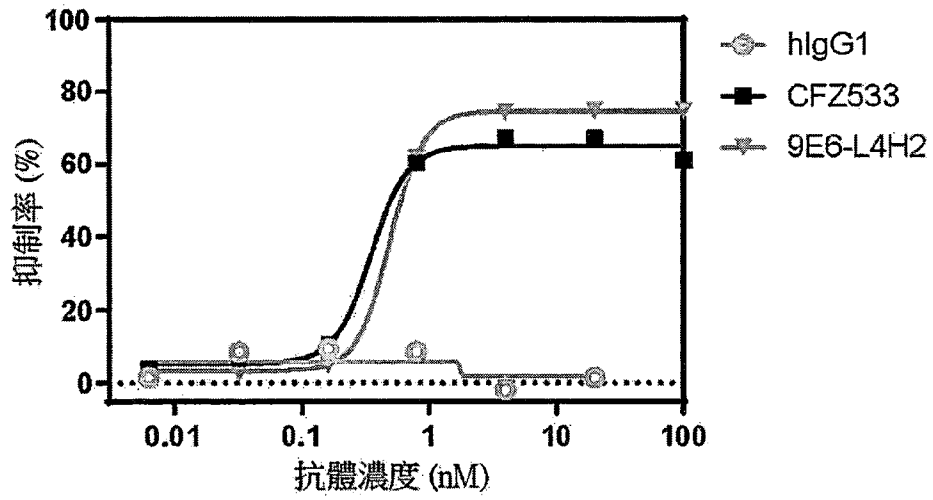
向有需要的受試者施用治療有效量的如請求項 1 至 9 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，或如請求項 14 或 15 所述的藥組醫藥組成物；

該移植較佳為實體器官移植，更佳為肝、腎、心臟、肺移植。

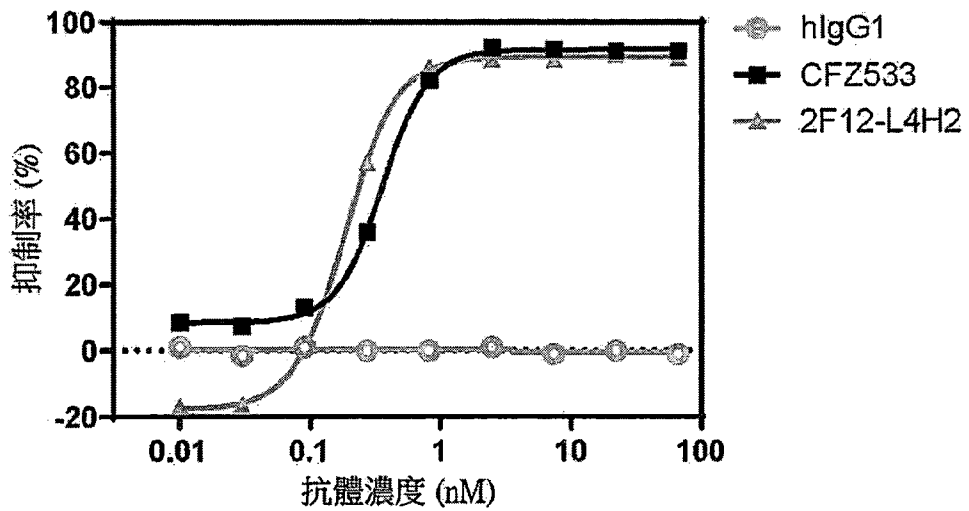
【請求項19】 一種如請求項 1 至 9 中任一項所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段和他克莫司聯合用於製備治療移植物抗宿主病或緩解移植排異反應的藥物的用途；

該移植較佳為實體器官移植，更佳為肝、腎、心臟、肺移植。

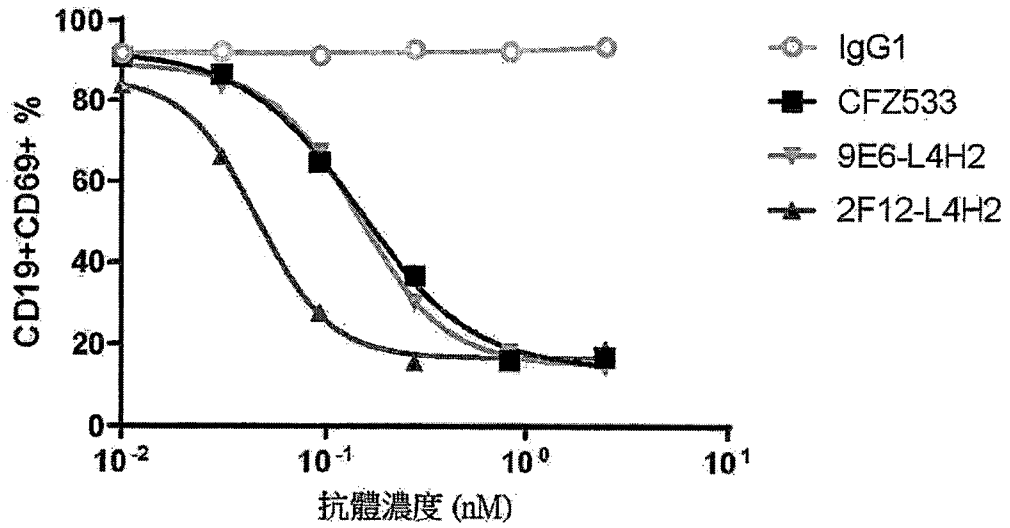
【發明圖式】



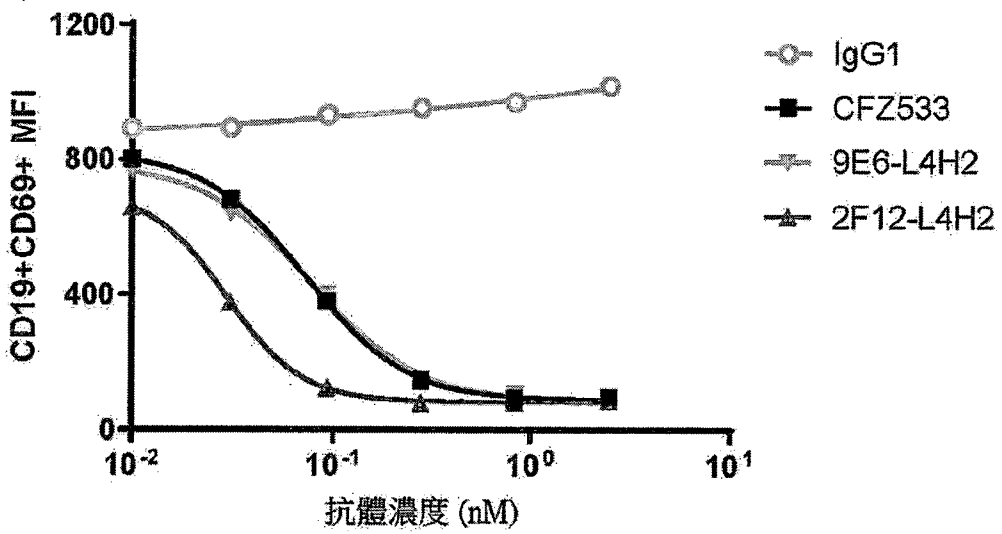
【圖1A】



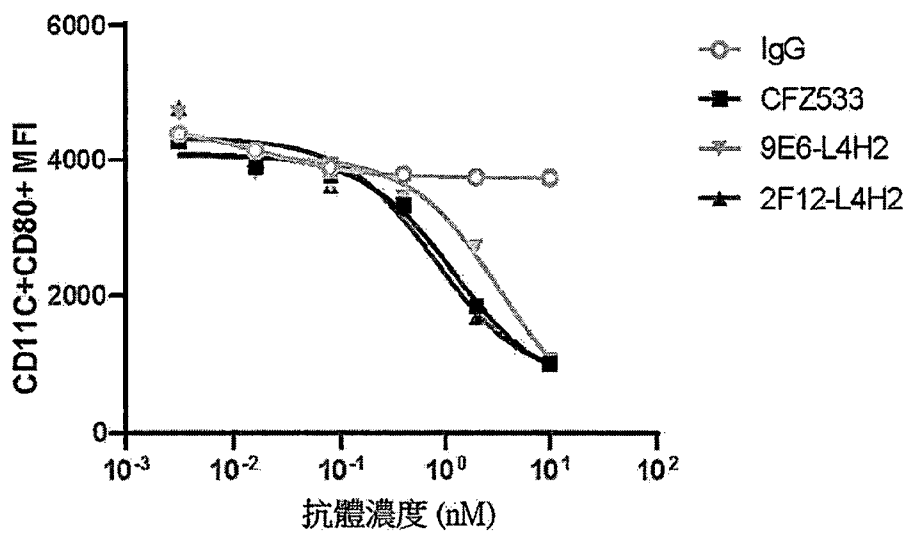
【圖1B】



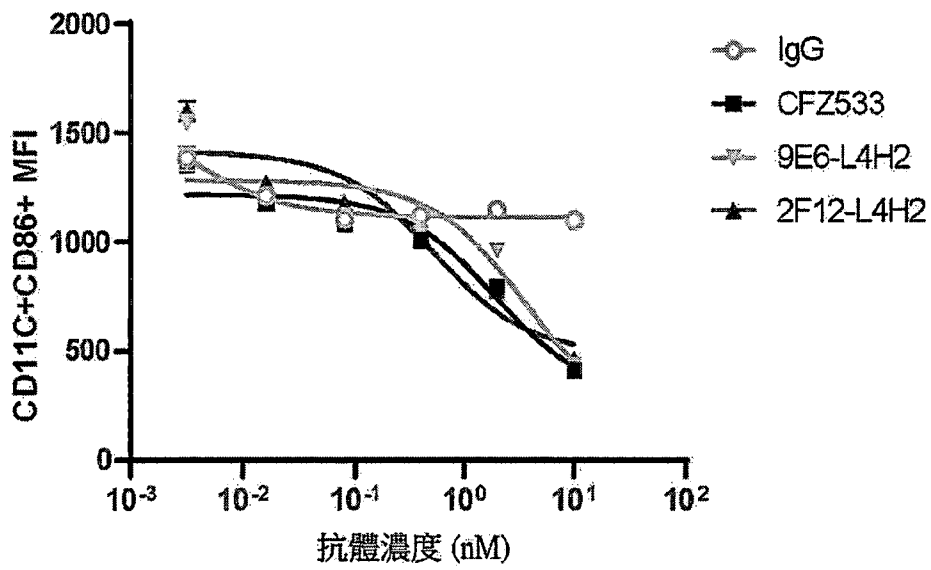
【圖2A】



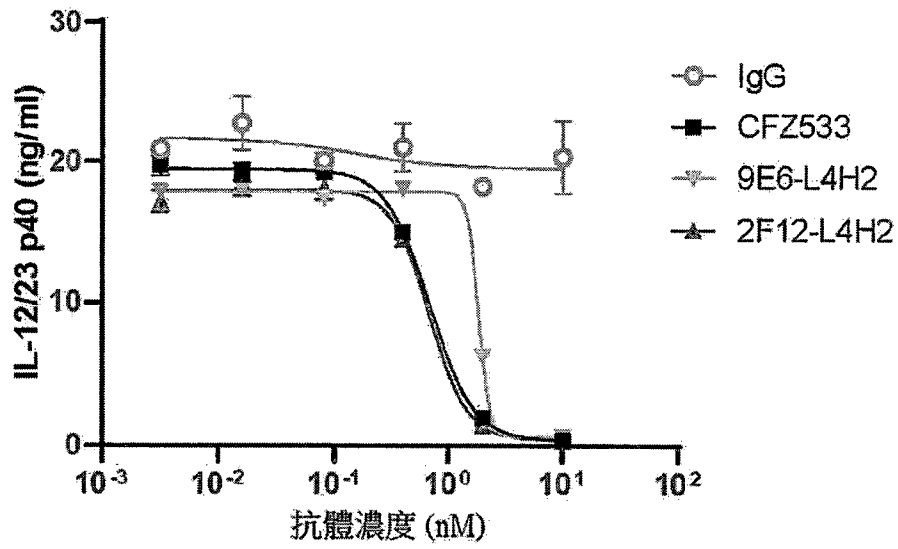
【圖2B】



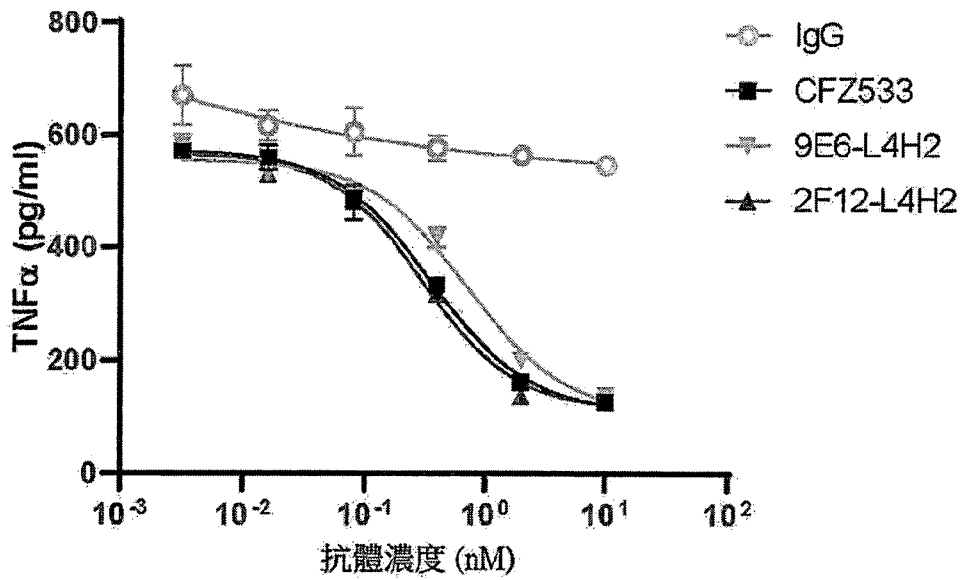
【圖3A】



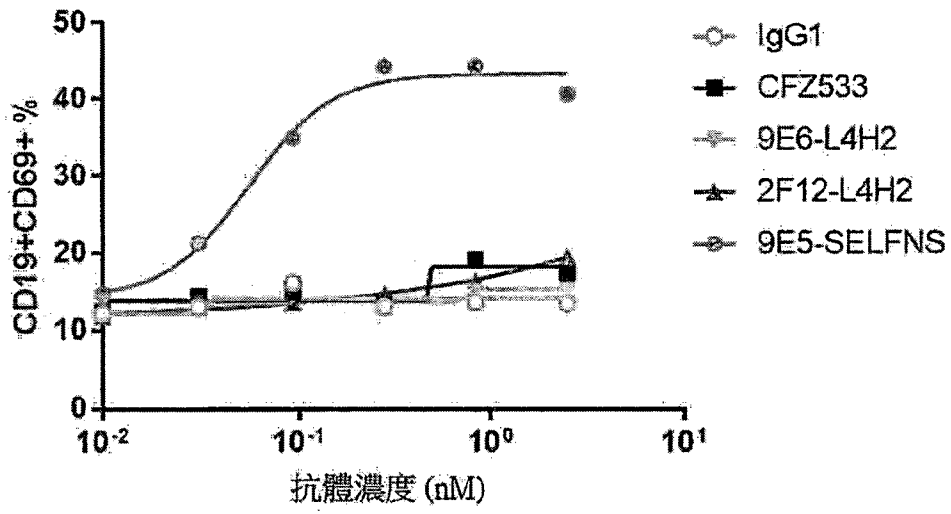
【圖3B】



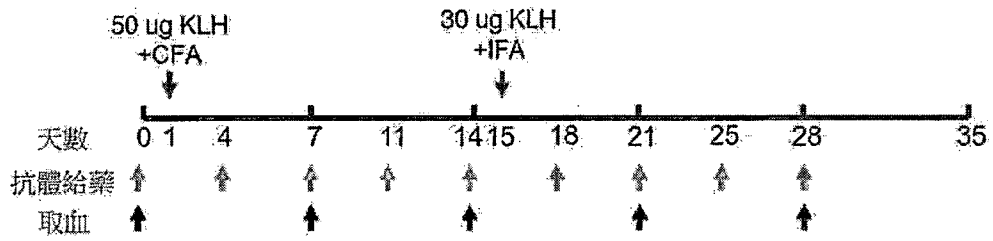
【圖3C】



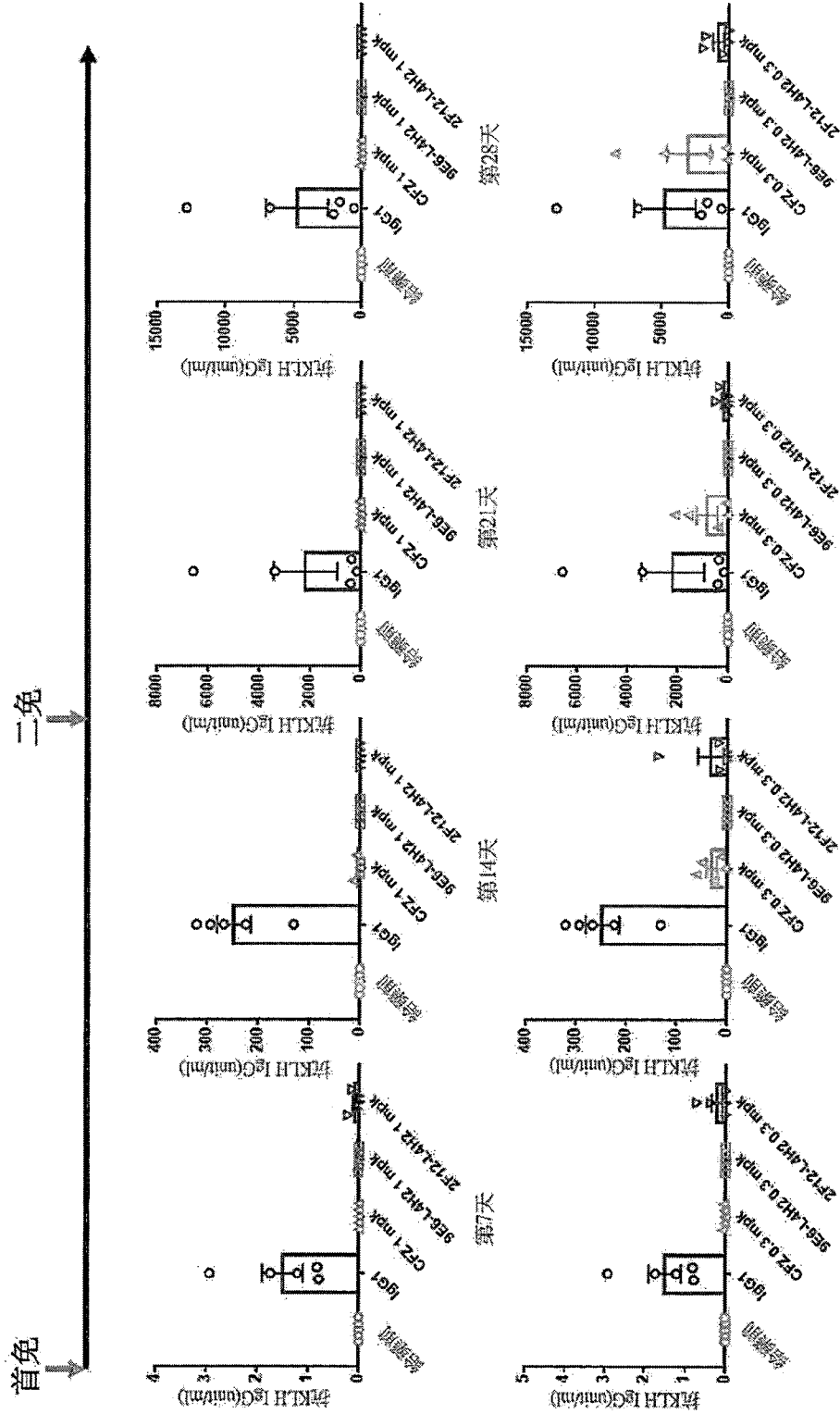
【圖3D】



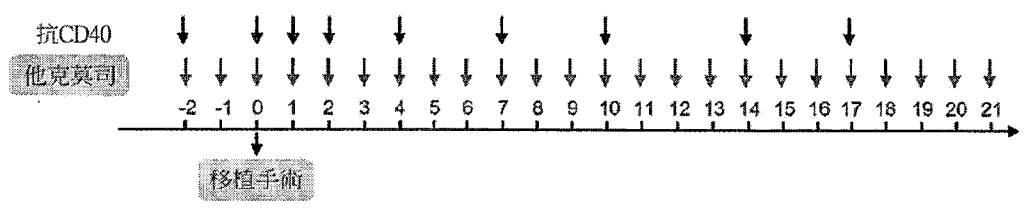
【圖4】



【圖5A】

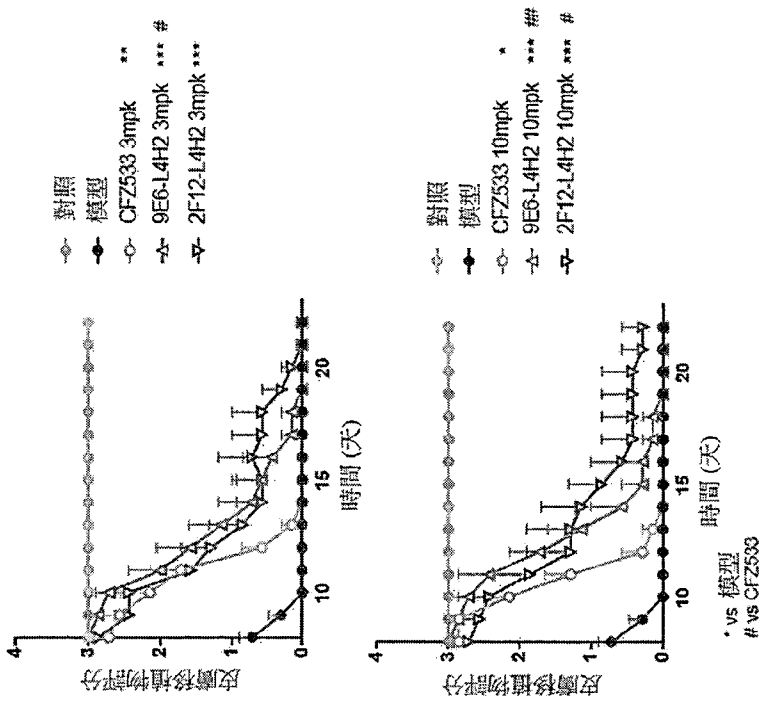


【圖5B】

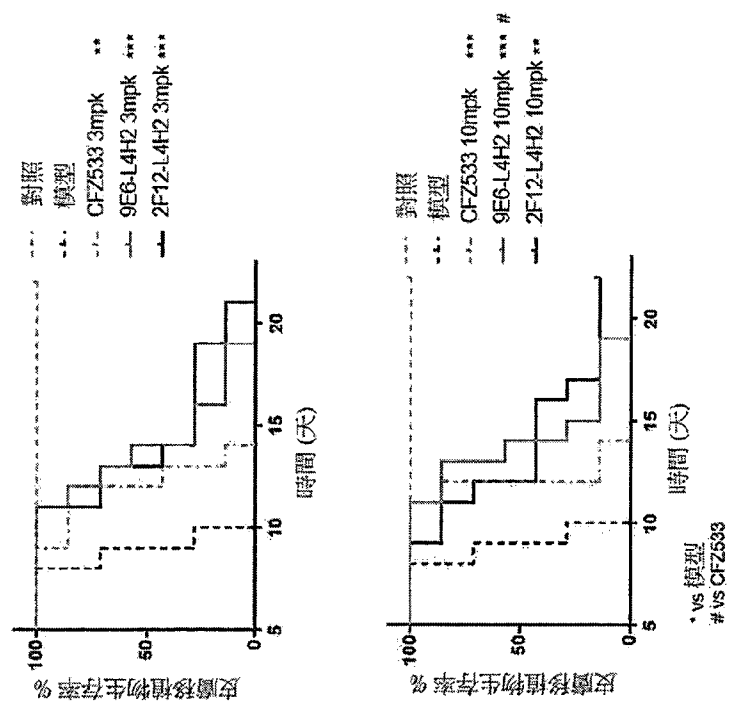


【圖6A】

皮膚移植植物評分

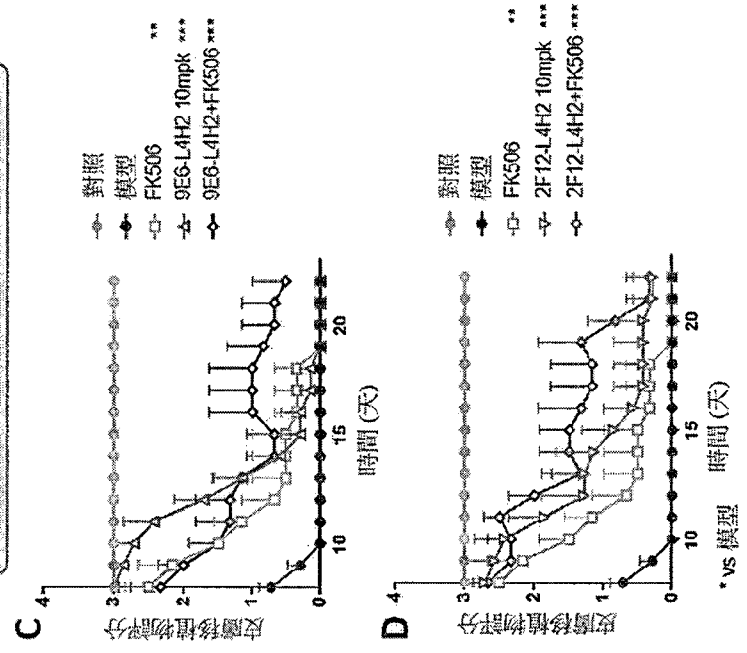


皮膚移植植物生存率 (%)

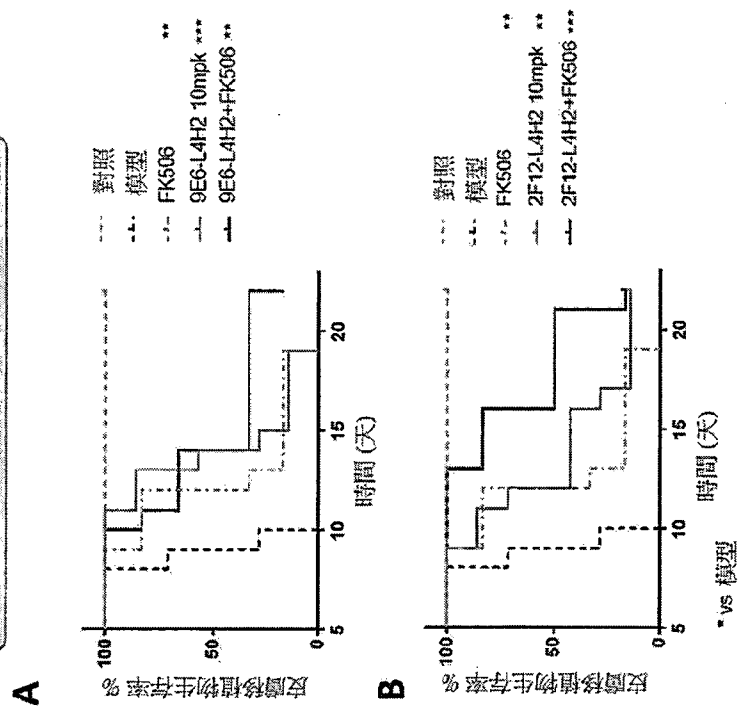


【圖6B】

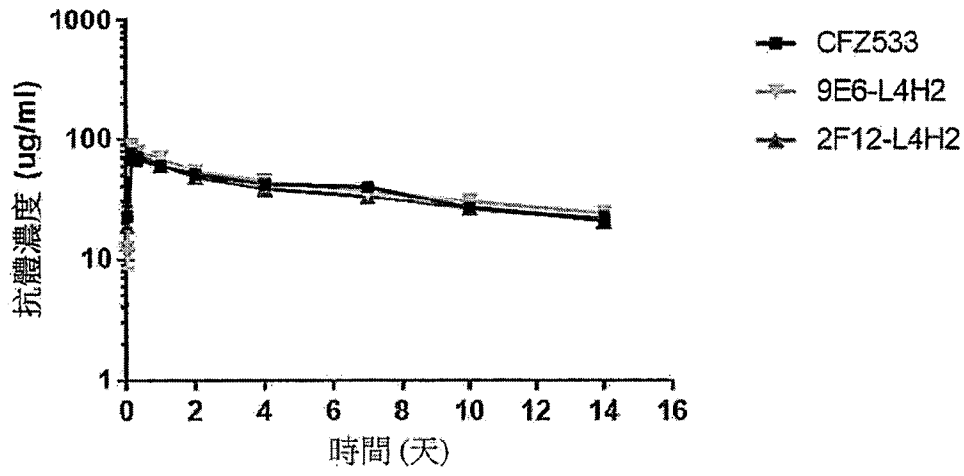
皮膚移植植物評分



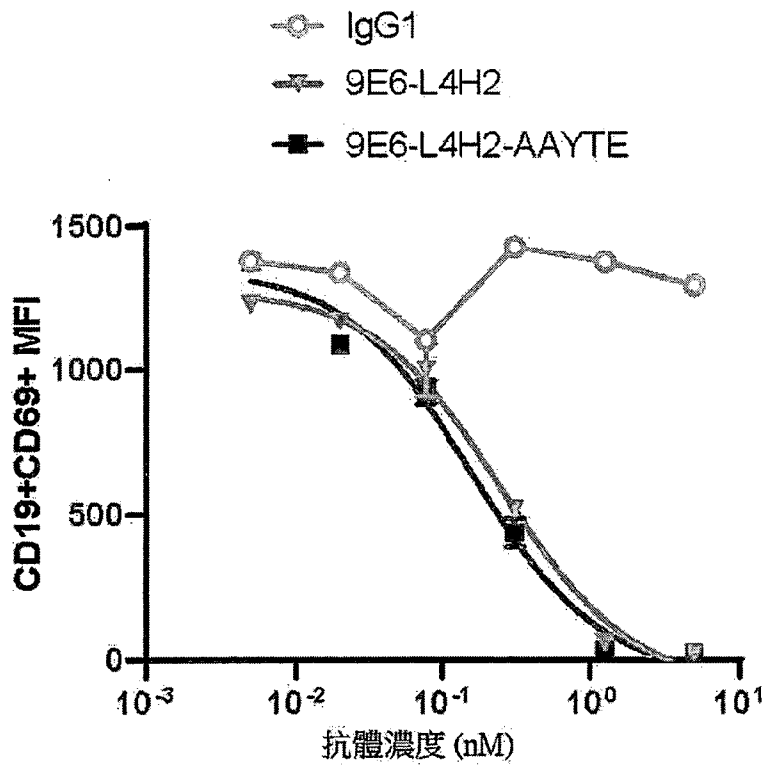
皮膚移植物生存率 (%)



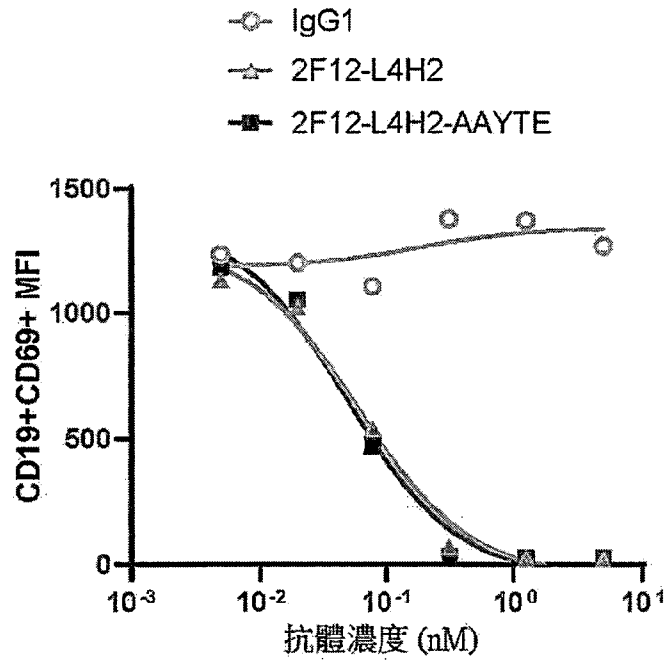
【圖7】



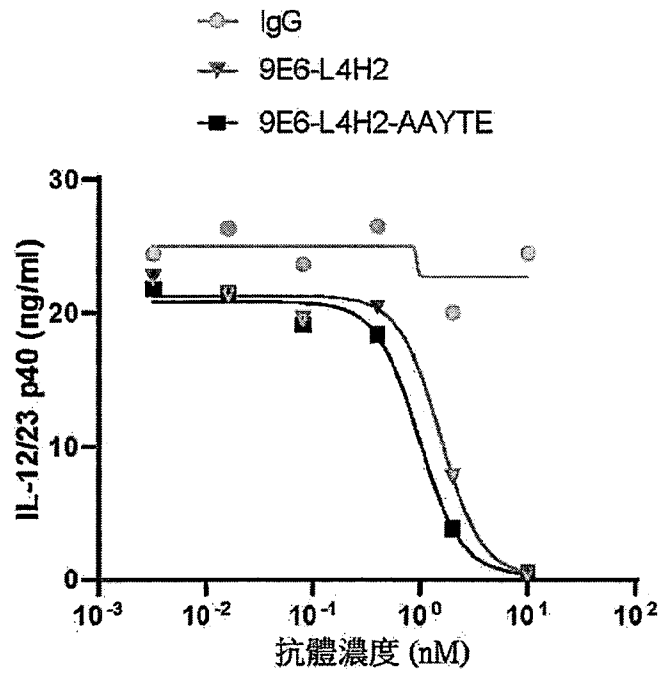
【圖8】



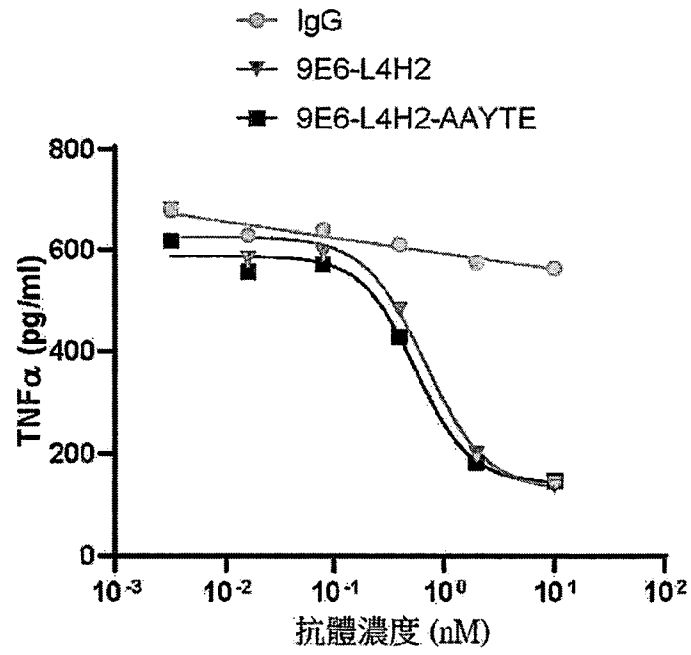
【圖9A】



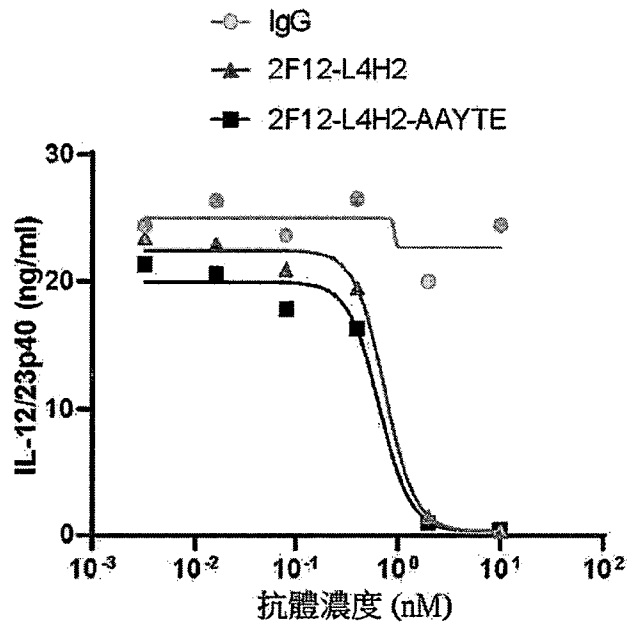
【圖9B】



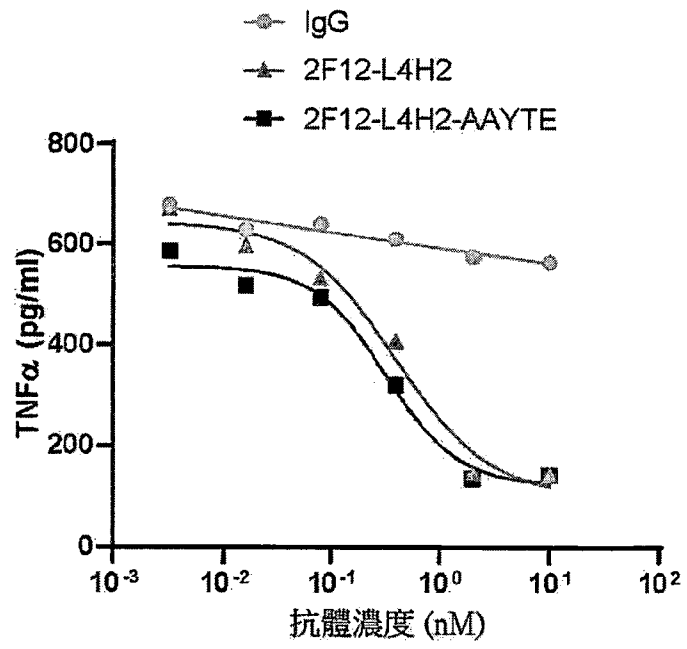
【圖10A】



【圖10B】



【圖10C】



【圖10D】