



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I699376 B

(45)公告日：中華民國 109 (2020) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：107118861

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 06 月 01 日

(51)Int. Cl. : **C07K16/24 (2006.01)**
A61K47/68 (2017.01)
C12N15/13 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)
C12N15/63 (2006.01)

(30)優先權：2017/06/01 中國大陸 201710402559.0

(71)申請人：大陸商江蘇恒瑞醫藥股份有限公司(中國大陸) JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (CN)

中國大陸

大陸商上海恒瑞醫藥有限公司(中國大陸) SHANGHAI HENGRUI
 PHARMACEUTICAL CO., LTD (CN)

中國大陸

(72)發明人：閔樹德 YAN, SHUDE (CN)；蔣家驊 JIANG, JIAHUA (CN)；胡齊悅 HU, QIYUE
 (CN)；張連山 ZHANG, LIANSHAN (CN)；曹國慶 CAO, GUOQING (CN)

(74)代理人：洪蘭心

(56)參考文獻：

TW 200606204

Gladue RP et al., Cancer Immunol Immunother. 2011 Jul;60(7):
 1009-17.

審查人員：黃教威

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：4 共 85 頁

(54)名稱

抗 CD40 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

(57)摘要

本發明係關於抗 CD40 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途。進一步地，本發明係關於包含所述抗 CD40 抗體 CDR 區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含人類抗 CD40 抗體及其抗原結合片段的藥物組合物，以及其作為抗癌藥物的用途。尤其，本發明係關於一種人源化的抗 CD40 抗體，在製備用於治療 CD40 媒介的疾病或病症之藥物中的用途。

The present invention relates to an anti-CD40 antibody, an antigen-binding fragment and a pharmaceutical use thereof. The present invention further relates to a chimeric antibody includes a CDR region of the anti-CD40 antibody, a humanized antibody includes a CDR region of the anti-CD40 antibody, and a pharmaceutical composition includes a human anti-CD40 antibody and an antigen-binding fragment thereof, and their use as anti-cancer drugs. In particular, the present invention relates to a use of the humanized anti-CD40 antibody in the manufacture of a medicament for the treatment of CD40 mediated diseases or symptoms.

指定代表圖：

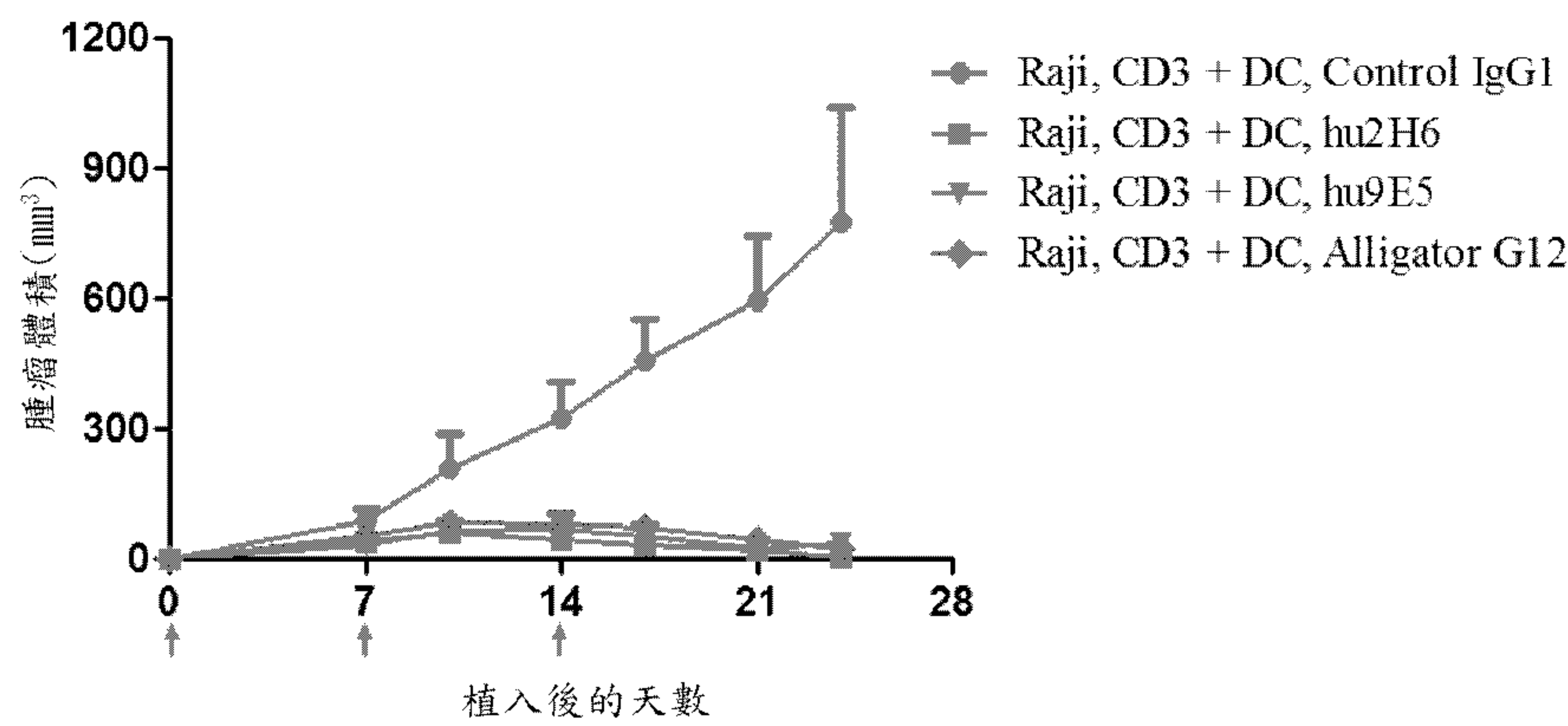


圖3



I699376

【發明摘要】

【中文發明名稱】 抗CD40抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

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

AND PHARMACEUTICAL USE THEREOF

【中文】

本發明係關於抗 CD40 抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途。進一步地，本發明係關於包含所述抗 CD40 抗體 CDR 區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含人類抗 CD40 抗體及其抗原結合片段的藥物組合物，以及其作為抗癌藥物的用途。尤其，本發明係關於一種人源化的抗 CD40 抗體，在製備用於治療 CD40 媒介的疾病或病症之藥物中的用途。

【英文】

The present invention relates to an anti-CD40 antibody, an antigen-binding fragment and a pharmaceutical use thereof. The present invention further relates to a chimeric antibody includes a CDR region of the anti-CD40 antibody, a humanized antibody includes a CDR region of the anti-CD40 antibody, and a pharmaceutical composition includes a human anti-CD40 antibody and an antigen-binding fragment thereof, and their use as anti-cancer drugs. In particular, the present invention relates to a use of the humanized anti-CD40 antibody in the manufacture of a medicament for the treatment of CD40 mediated diseases or symptoms.

【指定代表圖】 圖3

【代表圖之符號簡單說明】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】抗CD40抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

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

【技術領域】

【0001】本申請要求申請日為 2017 年 6 月 1 日的中國專利申請 CN201710402559.0 的優先權。本申請引用上述中國專利申請的全文。

【0002】本發明係關於一種抗CD40抗體，抗CD40的抗原結合片段，包含所述抗CD40抗體CDR區的嵌合抗體、人源化抗體，以及包含人類抗CD40抗體及其抗原結合片段的藥物組合物，以及其作為抗癌藥物的用途。

【先前技術】

【0003】癌症是當今人類社會長期面臨的最大健康挑戰。傳統的療法如手術、化療及放療在治療播散的實體腫瘤中功效甚微。腫瘤免疫治療是腫瘤治療領域一個熱點，其中T細胞的腫瘤免疫治療又處於其核心位置。腫瘤免疫治療是充分利用、調動腫瘤患者體內的細胞毒性T細胞，對腫瘤進行殺傷作用，它可能是最有效的也是最安全的治療腫瘤的途徑。腫瘤免疫療法目前對治療幾種不同類型的癌症，包括擴散的轉移性腫瘤已具有很好的前景。

【0004】人體內T細胞的活化採取了兩條訊息路徑的系統，除了需要藉由抗原呈現細胞（APC）呈現MHC-抗原肽給T細胞提供第一訊息外，還需要一系列協同刺激分子提供第二訊息，進而才能使T細胞產生正常的免疫反應。這個雙訊息路徑系統對體內免疫系統的平衡起到著至關重要的作用，它嚴格調控著身體對自體與非自體抗原產生不同的免疫反應。如果缺少協同刺激分子提供的第二

訊息，將會導致T細胞的無反應或持續特異性免疫反應，從而產生耐受。因此，第二訊息路徑在身體免疫反應的整個過程中起著非常關鍵的調節作用。

【0005】CD40係細胞表面表現的醣蛋白之一，為分子量48kDa的I型膜內在醣蛋白（integral glycoprotein），屬於腫瘤壞死因子受體（TNFR）超家族，並在免疫系統中起重要作用。其表現在多種免疫細胞中，如B細胞、樹突細胞、單核細胞及巨噬細胞等。當藉由CD40發生訊息傳導時，專門的抗原呈現細胞會被激活。CD40的天然配體被命名為CD154或CD40L，已知主要表現在成熟T淋巴細胞中。CD40L媒介訊息的傳導會觸發一些細胞生物事件，包括免疫細胞激活、增殖、以及細胞因子與趨化因子的產生。CD40訊息傳導對於T細胞依賴性免疫反應是非常重要的，尤其在腫瘤環境背景中，CD40刺激的樹突細胞能夠激活腫瘤特異性效應T細胞，該類T細胞具有根除腫瘤細胞的潛力。

【0006】CD40表現發生在包括B淋巴細胞在內的許多正常細胞與腫瘤細胞中。例如，黑色素瘤即屬於具有CD40表現的腫瘤，而30%至70%的實體腫瘤也具有CD40表現。目前已知CD40的激活可有效觸發抗腫瘤反應（Tong 等, *Cancer Gene Therapy*, 2003,10: 1-13），包括腫瘤特異性T細胞反應的免疫激活、對CD40陽性腫瘤直接的細胞凋亡作用，以及刺激導致ADCC的體液反應，且觀察到的腫瘤根除與腫瘤特異性細胞毒性T淋巴細胞的出現強烈相關。同時也不應被忽視的是，全身施用CD40抗體與副作用相關，如休克症候群及細胞激素釋放症候群（cytokine release syndrome）（van Mierlo 等，*Proc.Natl.Acad. Sci. USA*, 2002, 99:5561-5566）。

【0007】目前有多家國際製藥公司在研發如上述針對CD40的單株抗體，它通過特異性刺激免疫激活，最大限度提高患者自體對腫瘤的免疫系統反應，從而達到對腫瘤細胞進行殺傷之目的。相關專利如CN1198647、CN1369015、CN1582165、CN100430419、CN101014386、CN101237882、CN101289510、

CN101490086、CN103842382、CN104918957、WO2002028904、WO2011123489、WO2012149356、WO2013034904、WO2015091853、WO2016196314、WO2017040932、WO2017004006等。迄今為止，輝瑞（相關產品已許可給羅氏）、Alligator等公司的抗CD40抗體皆在臨床前動物模式中觀測到了良好的腫瘤殺傷效果，並已推進入第一期臨床試驗階段當中。

【0008】本發明旨在提供有著高親和力、高選擇性、高生物活性的抗CD40抗體，用於藉由刺激CD40及其路徑而導致免疫激活的癌症治療藥物/組合物及方法。

【發明內容】

【0009】本發明提供一種 CD40 抗體或其抗原結合片段，其包含：

抗體輕鏈可變區，所述的抗體輕鏈可變區包含至少 1 個選自如以下序列所示的 LCDR：SEQ ID NO:6，SEQ ID NO:7，SEQ ID NO: 8；SEQ ID NO:14，SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO: 16；SEQ ID NO:42，SEQ ID NO:43，SEQ ID NO: 44；SEQ ID NO:50，SEQ ID NO:51，SEQ ID NO: 52；SEQ ID NO:58，SEQ ID NO:59 或 SEQ ID NO: 60；及/或

抗體重鏈可變區，所述的抗體重鏈可變區包含至少 1 個選自如以下序列所述的 HCDR：SEQ ID NO:3，SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:5，SEQ ID NO:11，SEQ ID NO:12 或 SEQ ID NO:13；SEQ ID NO:39，SEQ ID NO:40，SEQ ID NO:41；SEQ ID NO:47，SEQ ID NO:48，SEQ ID NO:49；SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56 或 SEQ ID NO:57。

【0010】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體輕鏈可變區包含如 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO. 42、SEQ ID NO. 50 或者 SEQ ID NO. 58 所示的 LCDR1。

【0011】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體輕鏈可變區包含如 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO. 43、SEQ ID NO. 51 或者 SEQ ID NO. 59 所示的 LCDR2。

【0012】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體輕鏈可變區包含如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO. 44、SEQ ID NO. 52 或者 SEQ ID NO. 60 所示的 LCDR3 區。

【0013】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體重鏈可變區包含如 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO. 39、SEQ ID NO. 47 或者 SEQ ID NO. 55 所示的 HCDR1。

【0014】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體重鏈可變區包含如 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO. 40、SEQ ID NO. 48 或者 SEQ ID NO. 56 所示的 HCDR2。

【0015】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體重鏈可變區包含如 SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO. 41、SEQ ID NO. 49 或者 SEQ ID NO. 57 所示的 HCDR3。

【0016】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其所述的抗體輕鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 及 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3。

【0017】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其所述的抗體輕鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 及 SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3。

【0018】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其所述的抗體輕鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 及 SEQ ID NO: 44 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3。

【0019】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其所述的抗體輕鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51 及 SEQ ID NO: 52 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3。

【0020】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其所述的抗體輕鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59 及 SEQ ID NO: 60 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3。

【0021】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其所述的抗體重鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 及 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3。

【0022】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其所述的抗體重鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 及 SEQ ID NO:13 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3。

【0023】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其所述的抗體重鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40 及 SEQ ID NO:41 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3。

【0024】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其所述的抗體重鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48 及 SEQ ID NO:49 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3。

【0025】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其所述的抗體重鏈可變區包含分別如 SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56 及 SEQ ID NO:57 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3。

【0026】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體輕鏈可變區包含分別如：

SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 及 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3；或

SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 及 SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3；或

SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 及 SEQ ID NO: 44 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3；或

SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51 及 SEQ ID NO: 52 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3；或

SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59 及 SEQ ID NO: 60 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3。

【0027】且其中所述的抗體重鏈可變區包含分別如：

SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 及 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3；或

SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 及 SEQ ID NO:13 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3；或

SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40 及 SEQ ID NO:41 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3；或

SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48 及 SEQ ID NO:49 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR；或

SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56 及 SEQ ID NO:57 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3。

【0028】尤佳的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段可選自下述任一種：

(1) 抗體輕鏈可變區包含分別如：SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7 及 SEQ ID NO: 8 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3；抗體重鏈可變區包含分別如：SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 及 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3。

(2) 抗體輕鏈可變區包含分別如：SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 及 SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3；抗體重鏈可變區包含分別如：SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 及 SEQ ID NO: 13 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3。

(3) 抗體輕鏈可變區包含分別如：SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43 及 SEQ ID NO: 44 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3；抗體重鏈可變區包含序列分別如：SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40 及 SEQ ID NO:41 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3。

(4) 抗體輕鏈可變區包含序列分別如：SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51 及 SEQ ID NO: 52 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3；抗體重鏈可變區包含分別如：SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48 及 SEQ ID NO:49 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR。

(5) 抗體輕鏈可變區包含序列分別如：SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59 及 SEQ ID NO: 60 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3；抗體重鏈可變區包含分別如：SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56 及 SEQ ID NO:57 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3。

【0029】在本發明一個較佳的實施方案中，所述的抗體輕鏈可變區序列選自 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:10；重鏈可變區序列選自 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:9。

【0030】上述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段可為鼠源抗體或者嵌合抗體。

【0031】較佳地：

其中所述鼠源抗體或者所述嵌合抗體的重鏈可變區的胺基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示，輕鏈可變區的胺基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示；或者，所述鼠源抗體或者所述嵌合抗體的重鏈可變區的胺基酸序列如 SEQ ID NO. 9 所示，輕鏈可變區的胺基酸序列如 SEQ ID NO. 10 所示；或者，所述抗體或抗原片段的輕鏈可變區 LCVR 為序列 SEQ ID NO:38，重鏈可變區 HCVR 為序列 SEQ ID NO：37；或者，所述抗體或抗原片段的輕鏈可變區 LCVR 為序列 SEQ ID NO:46，重鏈可變區 HCVR 為序列 SEQ ID NO：45；或者，所述抗體或抗原片段的輕鏈可變區 LCVR 為序列 SEQ ID NO:54，重鏈可變區 HCVR 為序列 SEQ ID NO：53。

【0032】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體為鼠源抗體或其片段。

【0033】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的鼠源抗體或其片段，其抗體輕鏈可變區進一步包含鼠源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈 FR 區。

【0034】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的鼠源抗體或其片段，其進一步包含鼠源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區。

【0035】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的鼠源抗體或其片段，其抗體重鏈可變區進一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體的重鏈 FR 區。

【0036】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的鼠源抗體或其片段，其進一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體的重鏈恆定區。

【0037】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體為嵌合抗體或其片段。

【0038】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 嵌合抗體或其片段，其中所述的嵌合抗體輕鏈可變區序列為：SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 10。

【0039】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 嵌合抗體或其片段，其中所述的嵌合抗體重鏈可變區序列為：SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO:9。

【0040】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 嵌合抗體或其片段，其進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區。

【0041】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 嵌合抗體或其片段，其進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區。

【0042】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體為人類抗體或其片段。

【0043】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體為人源化抗體或其片段。

【0044】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人類抗體或其抗原結合片段，其中所述的人類抗體輕鏈序列為：SEQ ID NO: 18 或 SEQ ID NO: 20 或其變體；所述的變體較佳在輕鏈有 0~10 的胺基酸變化，更佳為胺基酸位點在 2 及 3 的突變，位點 2 及位點 3 突變後的胺基酸皆較佳為 I、V 或 L。

【0045】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人類抗體或其抗原結合片段，其中所述的人類抗體重鏈序列為：SEQ ID NO: 17 或 SEQ ID NO: 19 或其變體；所述的變體較佳在重鏈有 0~10 的胺基酸變化，更佳為胺基酸位點在 6 及 8 的突變，兩個位點突變後的胺基酸皆較佳為 I、A 或 L。

【0046】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人類抗體或其抗原結合片段，其進一步包含人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的恆定區，較佳包含人 IgG1、IgG2 或 IgG4 恆定區。

【0047】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人源化抗體或其抗原結合片段，其人源化抗體輕鏈可變區進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈 FR 區。

【0048】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人源化抗體或其片段，其中所述人源化抗體輕鏈可變區上的輕鏈 FR 區序列，來源於如 SEQ ID NO: 22 所示的人種系輕鏈 IGkV1-33 序列；或來源於如 SEQ ID NO: 24 所示的人種系輕鏈 IGkV2-28 序列。

【0049】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人源化抗體或其片段，其中所述人源化抗體輕鏈可變區序列為如 SEQ ID NO:33 或 SEQ ID NO:34 所示的序列，或其變體。

【0050】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人源化抗體或其片段，其中所述人源化抗體輕鏈序列為如 SEQ ID NO:18 或 SEQ ID NO:20 所示的序列，或其變體。

【0051】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人源化抗體或其片段，其中所述人源化抗體輕鏈可變區變體較佳在輕鏈可變區有 0 ~ 10 的胺基酸變化，更佳為胺基酸位點在 2 及 3 的突變，突變後的胺基酸皆較佳為 I、V 或 L。

【0052】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人源化抗體或其片段，其進一步包含人源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區。

【0053】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人源化抗體或其片段，其人源化抗體重鏈可變區進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其變體的重鏈 FR 區。

【0054】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人源化抗體或其片段，其中所述人源化抗體重鏈可變區上的重鏈 FR 區序列，來源於

如 SEQ ID NO: 21 所示的人種系重鏈 IGHV1-69 序列;或來源於如 SEQ ID NO: 23 所示的人種系重鏈 IGHV1-2 序列。

【0055】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人源化抗體或其片段，其中所述人源化抗體重鏈可變區序列為如 SEQ ID NO:26 或 SEQ ID NO:30 所示的序列，或其變體。

【0056】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人源化抗體或其片段，其中所述人源化抗體重鏈序列為如 SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO: 19 所示的序列，或其變體；所述變體較佳在重鏈可變區有 0~10 的胺基酸變化，更佳為胺基酸位點在 6 及 8 的突變，突變後的胺基酸皆較佳為 I、A 或 L。

【0057】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 人源化抗體或其片段，其進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區，較佳包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重鏈 FR 區，更佳包含人源 IgG1 或 IgG2 重鏈 FR 區。

【0058】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗原結合片段為 Fab、Fv、sFv、F(ab')₂、線性抗體、單鏈抗體、奈米抗體、結構域抗體及多特異性抗體。

【0059】本發明進一步提供一種編碼如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體或者單鏈抗體的 DNA 序列。

【0060】本發明進一步提供一種含有如上所述的 DNA 序列的表現載體。

【0061】本發明進一步提供一種用如上所述的表現載體轉化的宿主細胞。

【0062】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的宿主細胞，其特徵在於，所述的宿主細胞為細菌，較佳為大腸桿菌。

【0063】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的宿主細胞為酵母菌，較佳為畢赤酵母。

【0064】在本發明一個較佳的實施方案中，一種如上所述的宿主細胞為哺乳動物細胞，較佳為中國倉鼠卵巢（CHO）細胞或人胚胎腎（HEK）293 細胞。

【0065】本發明進一步提供一種單鏈抗體，其含有如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。

【0066】本發明進一步提供一種多特異性抗體，其含有如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。

【0067】本發明進一步提供一種抗體-藥物偶聯物（antibody-drug conjugates），含有如前所述的抗 CD40 抗體輕鏈可變區及/或重鏈可變區。所述的抗體-藥物偶聯物是本領域所周知的，其由抗體-連接子-藥物（毒素）相互連接形成，已知的連接子（linker）包括裂解連接子、分裂解連接子，例如連接子包括但不限於 SMCC、SPDP 等；毒素也是本領域所周知的，例如 DM1、DM4、MMAE、MMAF 等。

【0068】本發明進一步提供一種藥物組合物，其含有如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體或者單鏈抗體，以及可藥用的賦形劑、稀釋或載體。

【0069】本發明進一步提供一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體、單鏈抗體或包含其的藥物組合物，在製備用於治療 CD40 或 CD40L 媒介的疾病或病症的藥物中的用途；其中所述的疾病較佳為癌症；所述的癌症尤佳為淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、腎癌、肺癌、肝癌、胃癌、結腸直腸癌、膀胱癌、橫紋肌肉瘤、食道癌、子宮頸癌、多發性骨髓瘤、白血病、膽囊癌、膠質母細胞瘤及黑色素瘤。

【0070】本發明進一步提供一種治療及預防 CD40 或 CD40L 媒介的疾病或病症的方法，該方法包括給予所需患者治療有效量的如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體、單鏈抗體或包含其的藥物組合物；其中所述

的疾病較佳為癌症；所述的癌症尤佳為淋巴癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、腎癌、肺癌、肝癌、胃癌、結腸直腸癌、膀胱癌、橫紋肌肉瘤、食道癌、子宮頸癌、多發性骨髓瘤、白血病、膽囊癌、膠質母細胞瘤及黑色素瘤。

【0071】本發明進一步提供一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體、單鏈抗體或包含其的藥物組合物，在製備用於改善自體免疫疾病患者的症狀之藥物的用途。

【0072】本發明進一步提供一種如上所述的抗 CD40 抗體或其抗原結合片段、多特異性抗體、單鏈抗體或包含其的藥物組合物，在製備用於改善發炎性疾病患者的症狀之藥物的用途。

【圖式簡單說明】

【0073】

圖 1 為鼠源抗人類 CD40 抗體基於 CD80 活化分子對 DC 細胞的激活作用。

圖 2 為鼠源抗人類 CD40 抗體基於 CD86 活化分子對 DC 細胞的激活作用。

圖 3 為與人 PBMC 及 DC 細胞共移植的 Raji 移植淋巴瘤的腫瘤生長曲線。

圖 4 為與人 PBMC 及 DC 細胞共移植的 Raji 移植淋巴瘤的 NOG 小鼠的體重變化曲線。

【實施方式】

【0074】一、術語

【0075】為了更容易理解本發明，以下具體定義了某些技術及科學術語。除顯而易見在本文件中的它處另有明確定義，否則本文使用的所有其它技術及科學術語都具有本發明所屬領域的一般技術人員通常理解的含義。

【0076】本發明所用胺基酸三字母代碼及單字母代碼如 J. Biol. Chem, 243, p3558(1968)中所述。

【0077】本發明所述的術語「抗體」指免疫球蛋白，是由兩條相同的重鏈及兩條相同的輕鏈藉由鏈間雙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及排列順序不同，故其抗原性也不同。據此，可將免疫球蛋白分為五型，或稱為免疫球蛋白的同型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 及 IgE，其相應的重鏈分別為 μ 鏈、 δ 鏈、 γ 鏈、 α 鏈及 ϵ 鏈。同一型 Ig 根據其鉸鏈區胺基酸組成及重鏈雙硫鍵的數目及位置的差別，又可分為不同的亞型，如 IgG 可分為 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。輕鏈藉由恆定區的不同分為 κ 鏈或 λ 鏈。五型 Ig 中每一型 Ig 都可以有 κ 鏈或 λ 鏈。

【0078】在本發明中，本發明所述的抗體輕鏈可進一步包含輕鏈恆定區，所述的輕鏈恆定區包含人源或鼠源的 κ 、 λ 鏈或其變體。

【0079】在本發明中，本發明所述的抗體重鏈可進一步包含重鏈恆定區，所述的重鏈恆定區包含人源或鼠源的 IgG1、2、3、4 或其變體。

【0080】抗體重鏈及輕鏈靠近 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 個高度變異區（hypervariable region，HVR）及 4 個序列相對保守的構架區（framework region，FR）。3 個高度變異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）及重鏈可變區（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依次為：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 以及 FR4。輕鏈的 3 個 CDR 區指 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3；重鏈的 3 個 CDR 區指 HCDR1，HCDR2 及 HCDR3。本發明所述的抗體或抗原結合片段的 VL 區及 VH 區的 CDR 胺基酸殘基在數量及位置符合已知的 IMGT 編號規則。

【0081】術語「抗原呈現細胞」或「APC」是在其表面上展示與 MHC 偶聯的外來抗原的細胞。T 細胞利用 T 細胞受體（TCR）識別這種偶聯物。APC 的

實例包括但不限於樹突細胞（DC）、周邊血液單核細胞（peripheral blood mononuclear cell，PBMC）、單核細胞、B 淋巴母細胞及單核細胞衍生的樹突細胞（DC）。術語「抗原呈現」是指 APC 捕獲抗原及使它們能夠被 T 細胞識別的過程，例如作為 MHC-I/MHC-II 偶聯物的組分。

【0082】術語「CD40」是指為 TNF 受體超家族成員的細胞表面受體，又稱為 TNFRSF5。CD40 普遍表現於樹突細胞、B 細胞及巨噬細胞表面，是產生與維持 T 細胞免疫所需的分子。術語「CD40」包括由細胞天然表現的 CD40 的任何變體或同型。本發明的抗體可與源自非人物種的 CD40 交叉反應。作為另一種選擇，該抗體也可以是人類 CD40 特異性的，可不表現出與其他物種的交叉反應性。CD40 或其任何變體或同型可從天然表現它們的細胞或組織中分離而得，或使用本領域通用以及本文所述的那些技術通過重組技術產生。較佳地，抗 CD40 抗體標靶具有正常糖基化模式的人源 CD40。

【0083】術語「重組人類抗體」包括藉由重組方法製備、表現、創建或分離的人類抗體，所關於的技術及方法在本領域中是熟知的，諸如（1）從人類免疫球蛋白基因的基因轉殖、轉染色體動物（例如小鼠）或由其製備的雜交瘤中分離的抗體；（2）從經轉化以表現抗體的宿主細胞如轉染瘤中分離的抗體；（3）從重組組合人類抗體庫中分離的抗體；以及（4）藉由將人類免疫球蛋白基因序列剪接到其他 DNA 序列等方法製備、表現、創建或分離的抗體。此類重組人類抗體包含可變區及恆定區，這些區域利用特定的由種系基因（germ line gene）編碼的人種系免疫球蛋白序列，但也包括隨後諸如在抗體成熟過程中發生的重排及突變。

【0084】術語「鼠源抗體」在本發明中為根據本領域知識及技能製備的對人類 CD40 的單株抗體。製備時用 CD40 抗原注射試驗對象，然後分離表現具有所需序列或功能特性的抗體的雜交瘤。在本發明一個較佳的實施方案中，所述

的鼠源 CD40 抗體或其抗原結合片段，可進一步包含鼠源 κ 、 λ 鏈或其變體的輕鏈恆定區，或進一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其變體的重鏈恆定區。

【0085】術語「人類抗體」包括具有人種系免疫球蛋白序列的可變及恆定區的抗體。本發明的人類抗體可包括不由人種系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基（如通過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「人類抗體」不包括這樣的抗體，即其中已將衍生自另一種哺乳動物物種（諸如小鼠）種系的 CDR 序列移植到人類骨架序列上（即「人源化抗體」）。

【0086】術語「人源化抗體（humanized antibody）」，也稱為 CDR 移植抗體（CDR-grafted antibody），是指將小鼠的 CDR 序列移植到人類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小鼠蛋白成分，從而誘導的強烈的免疫反應。為了避免在免疫原性下降的同時引起活性的下降，可對所述的人類抗體可變區可進行最少回復突變，以保持活性。

【0087】術語「嵌合抗體（chimeric antibody）」，是將鼠源性抗體的可變區與人類抗體的恆定區融合而成的抗體，可以減輕鼠源性抗體誘發的免疫反應反應。建立嵌合抗體，要選建立分泌鼠源性特異性單抗的雜交瘤，然後從小鼠雜交瘤細胞中轉殖可變區基因，再依據需要選殖人類抗體的恆定區基因，將小鼠可變區基因與人恆定區基因連接成嵌合基因後插入人載體中，最後在真核產業系統或原核產業系統中表現嵌合抗體分子。人類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，較佳包含人源 IgG1 或 IgG2 重鏈恆定區。

【0088】術語「抗原結合片段」是指抗體的抗原結合片段及抗體類似物，其通常包括至少部分母體抗體（parental antibody）的抗原結合區或可變區（例

如一個或多個 CDR)。抗體片段保留母體抗體的至少某些結合特異性。通常，當基於莫耳來表示活性時，抗體片段保留至少 10% 的母體結合活性。較佳地，抗體片段保留至少 20%、50%、70%、80%、90%、95% 或 100% 或更多的母體抗體對標靶目標的結合親和力。抗原結合片段實例包括但不限於：Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv 片段、線性抗體 (linear antibody)、單鏈抗體、奈米抗體、結構域抗體及多特異性抗體。工程改造的抗體變體綜述於 Holliger 及 Hudson(2005)Nat.Biotechnol.23：1126-1136 中。

【0089】「Fab 片段」由一條輕鏈及一條重鏈的 CH1 及可變區組成。Fab 分子的重鏈不能與另一個重鏈分子形成雙硫鍵。

【0090】「Fc」區含有包含抗體的 CH1 及 CH2 結構域的兩個重鏈片段。兩個重鏈片段由兩個或多個雙硫鍵並通過 CH3 結構域的疏水作用保持在一起。

【0091】「Fab' 片段」含有一條輕鏈及包含 VH 結構域及 CH1 結構域以及 CH1 及 CH2 結構域之間區域的一條重鏈的部分，由此可在兩個 Fab' 片段的兩條重鏈之間形成鏈間雙硫鍵以形成 F(ab')₂ 分子。

【0092】「F(ab')₂ 片段」含有兩條輕鏈及兩條包含 CH1 及 CH2 結構域之間的恆定區的部分的重鏈，由此在兩條重鏈間形成鏈間雙硫鍵。因此，F(ab')₂ 片段由通過兩條重鏈間的雙硫鍵保持在一起的兩個 Fab' 片段組成。

【0093】「Fv 區」包含來自重鏈及輕鏈二者的可變區，但缺少恆定區。

【0094】術語「多特異性抗體」依其最廣義使用，涵蓋具有多表位特異性的抗體。這些多特異性抗體包括但不限於：包含重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL) 的抗體，其中該 VH-VL 單元具有多表位特異性；具有兩個或多個 VL 及 VH 區的抗體，每個 VH-VL 單元與不同的靶點或同一個靶點的不同表位結合；具有兩個或更多個單可變區的抗體，每個單可變區與不同的靶點或同一個

靶點的不同的表位結合；全長抗體、抗體片段、雙抗體（diabodies）、雙特異性雙抗體及三抗體（triabodies）、已共價或非共價連接在一起的抗體片段等。

【0095】術語「抗體-藥物偶聯物」（ADC）指與一種或多種異源的化學合成分子，包括但不限於細胞毒劑偶聯的抗體或抗體片段。

【0096】術語「單鏈抗體」是由抗體的重鏈可變區（VH）及輕鏈可變區（VL）藉由一段連接肽連接而成的單鏈重組蛋白，它是具有完全抗原結合位點的最小抗體片段。

【0097】術語「結構域抗體片段」是僅含有重鏈可變區或輕鏈可變區鏈的具有免疫學功能的免疫球蛋白片段。在某些情況下，兩個或多個 VH 區與肽連接子共價連接以形成二價結構域抗體片段。二價結構域抗體片段的兩個 VH 區可標靶相同或不同抗原。

【0098】本發明的術語「與 CD40 結合」，指能與人類 CD40 相互作用。本發明的術語「抗原結合位點」指抗原上不連續的，由本發明抗體或抗原結合片段識別的三維空間位點。

【0099】術語「表位」是指抗原上與免疫球蛋白或抗體特異性結合的位點。表位可以由相鄰的胺基酸、或藉由蛋白質的三級摺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，而藉由三級摺疊所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，包括免疫印漬及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及本文所述的技術，例如 X 射線晶體分析法及二維核磁共振等。

【0100】本發明所用的術語「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，當使用重組人類 CD40 作為分析物並使用抗體

作為配體，在儀器中藉由表面等離子體共振（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 ）與預定的抗原結合，並且其與預定抗原結合的親和力是其與預定抗原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」在本文中可以与術語「特異性結合的抗體」互換使用。

【0101】術語「交叉反應」是指本發明的抗體與來自不同物種的 CD40 結合的能力。例如，結合人類 CD40 的本發明的抗體也可以結合另一物種的 CD40。交叉反應性是藉由在結合測定（例如 SPR 及 ELISA）中檢測與純化抗原的特異性反應性，或與生理表現 CD40 的細胞的結合或功能性相互作用來測量。確定交叉反應性的方法包括如本文所述的標準結合測定，例如表面等離子體共振（SPR）分析，或流式細胞術。

【0102】術語「抑制」或「阻斷」可互換使用，並涵蓋部分及完全抑制/阻斷這兩者。配體的抑制/阻斷較佳為降低或改變無抑制或阻斷的情況下發生配體結合時出現活性的正常水平或類型。抑制及阻斷也旨在包括與抗 CD40 抗體接觸時，與未與抗 CD40 抗體接觸的配體相比，任何可測量的配體結合親和力降低。

【0103】術語「抑制生長」（例如關於細胞）旨在包括細胞生長任何可測量的降低。

【0104】術語「誘導免疫反應」及「增強免疫反應」可互換使用，並指免疫反應對特定抗原的刺激（即，被動或適應性的）。針對誘導 CDC 或 ADCC 的術語「誘導」是指刺激特定的直接細胞殺傷機制。

【0105】本發明中所述的「ADCC」，即 antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，抗體依賴性細胞媒介的細胞毒性作用，是指表現 Fc 受體的細胞藉由識別抗體的 Fc 段而直接殺傷被抗體披覆的靶細胞。可藉由對 IgG 上 Fc 段的修飾，而降低或消除抗體的 ADCC 效應功能。所述的修飾指在抗體的重鏈恆定區

進行突變，如選自 IgG1 的 N297A、L234A、L235A；IgG2/4chimera、IgG4 的 F235E、或 L234A/E235A 突變。

【0106】生產及純化抗體及抗原結合片段的方法在現有技術中熟知且能找到，如冷泉港的抗體實驗技術指南，5～8 章及 15 章。如，老鼠可以用人類 CD40 或其片段免疫，所得到的抗體能被覆性，純化，並且可以用例行的方法進行胺基酸測序。抗原結合片段同樣可以用例行方法製備。發明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類 FR 區。人類 FR 種系序列可以從 ImMunoGeneTics (IMGT) 的網站 <http://imgt.cines.fr> 得到，或者從免疫球蛋白雜誌，2001ISBN012441351 上獲得。

【0107】本發明工程化的抗體或抗原結合片段可用例行方法製備及純化。相應抗體的 cDNA 序列可以選殖並重組至 GS 表現載體。重組的免疫球蛋白表現載體可以穩定地轉染 CHO 細胞。作為一種更推薦的現有技術，哺乳動物類表現系統會導致抗體的醣基化，特別是在 FC 區的高度保守 N 端。藉由表現與人源抗原特異性結合的抗體而得到穩定的殖株。陽性的殖株在生物反應器的無血清培養基中擴大培養以生產抗體。分泌了抗體的培養液可以用例行技術純化、收集。抗體可用例行方法進行過濾濃縮。可溶的混合物及多聚體，也可以用例行方法去除，比如分子篩、離子交換。得到的產物需立即冷凍，如-70℃，或者冷凍乾燥。

【0108】本發明的抗體指單株抗體。本發明所述的單株抗體 (mAb)，指由單一的選殖細胞株得到的抗體，所述的細胞株不限於真核的，原核的或噬菌體的選殖細胞株。單株抗體或抗原結合片段可以用如雜交瘤技術、重組技術、噬菌體顯示技術、合成技術 (如 CDR-grafting)、或其它現有技術進行重組得到。

【0109】「給予」及「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、診斷劑或組合物與動物、

人、受試者、細胞、組織、器官或生物流體的接觸。「給予」及「處理」可以指例如治療、藥物代謝動力學、診斷、研究及實驗方法。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，其中所述流體與細胞接觸。「給予」及「處理」還意指藉由試劑、診斷、結合組合物或藉由另一種細胞體外及離體處理例如細胞。「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、研究及診斷應用。

【0110】「治療」意指給予患者內用或外用治療劑，諸如包含本發明的任一種結合化合物的組合物，所述患者具有一種或多種疾病症狀，而巳知所述治療劑對這些症狀具有治療作用。通常，在受治療患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而發展到任何臨床不可測量的程度。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，例如患者的疾病狀態、年齡及體重，以及藥物在患者產生需要療效的能力。通過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已被減輕。雖本發明的實施方案（例如治療方法或製品）在緩解每個患者都有的目標疾病症狀方面可能無效，但是根據本領域已知的任何統計學檢定方法如 Student t 檢定、卡方檢定、依據 Mann 及 Whitney 的 U 檢定、Kruskal-Wallis 檢定（H 檢定）、Jonckheere-Terpstra 檢定及 Wilcoxon 檢定確定，其在統計學顯著數目的患者中應當減輕目標疾病症狀。

【0111】「保守修飾」或「保守置換或取代」是指具有類似特徵（例如電荷、側鏈大小、疏水性/親水性、主鏈構象及剛性等）的其它胺基酸置換蛋白中的胺基酸，使得可頻繁進行改變而不改變蛋白的生物學活性。本領域技術人員知曉，一般而言，多肽的非必需區域中的單個胺基酸置換基本上不改變生物學活性（參見例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene, The

Benjamin/Cummings Pub.Co.,第 224 頁，（第 4 版））。另外，結構或功能類似的胺基酸的置換不大可能破壞生物學活性。胺基酸常見的保守取代如下：

原始殘基	例示性取代基	較佳取代基
Ala(A)	val、leu、ile	val
Arg(R)	lys、gln、asn	lys
Asn(N)	gln、his、asp、lys、arg	gln
Asp(D)	glu、asn	glu
Cys(C)	ser、ala	ser
Gln(Q)	asn、glu	asn
Glu(E)	asp、gln	asp
Gly(G)	ala	ala
His(H)	arg、asn、gln、lys	arg
Ile(I)	leu、val、met、ala、phe、正白胺酸	leu
Leu(L)	ile、正白胺酸、val、met、ala、phe	ile
Lys(K)	arg、gln、asn	arg
Met(M)	leu、phe、ile	leu
Phe(F)	tyr、leu、val、ile、ala	tyr
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr、phe	tyr
Tyr(Y)	phe、trp、thr、ser	phe
Val(V)	leu、ile、met、phe、ala、正白胺酸	leu

【0112】整個說明書及申請專利範圍中使用的術語「基本上由.....組成」或其變形表示包括所有所述元件或元件組，並且任選包括與所述元件類似或不同性質的其它元件，所述其它元件非顯著改變指定給藥方案、方法或組合物的基本性質或新性質。作為非限制性例子，基本上由所提及的胺基酸序列組成的結合化合物還可以包括一種或多種胺基酸，其不顯著影響結合化合物的性質。

【0113】本發明所述的應用於某個對象的術語「天然存在的」是指這樣的事實，即該對象可在自然界中發現。例如存在於可從自然界來源分離得到的生物體（包括病毒）、且未經人工在實驗室中有意修飾的多肽序列或多核苷酸序列即是天然存在的。

【0114】「有效量」包含足以改善或預防醫字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。用於特定患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、患者的總體健康情況、給藥的方法途徑及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】「外源性」指要據背景在生物、細胞或人體外產生的物質。「內源性」指根據背景在細胞、生物或人體內產生的物質。

【0116】「同源性」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皆被相同鹼基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腺嘌呤佔據時，那麼所述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×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。

【0117】本文使用的表述「細胞」、「細胞系」及「細胞培養物」可互換使用，並且所有這類名稱都包括其後代。因此，單詞「轉化體」及「轉化細胞」包括初代受試細胞及由其衍生的培養物，而不考慮轉移數目。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。在意指不同名稱的情況下，其由上下文清楚可見。

【0118】「任選」或「任選地」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，「任選包含 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。

【0119】「藥物組合物」表示含有一種或多種本文所述化合物或其生理學上/可藥用的鹽或前驅藥物與其他化學組分的混合物，以及其他組分例如生理學/可藥用的載體及賦形劑。藥物組合物的目的是促進對生物體的給藥，利於活性成分的吸收進而發揮生物活性。

【0120】具體實施方式

【0121】以下結合實施例用於進一步描述本發明，但這些實施例並非限制著本發明的範圍。本發明實施例中未注明具體條件的實驗方法，通常按照例行條件，如冷泉港的抗體技術實驗手冊，分子選殖手冊；或按照原料或商品製造廠商所建議的條件。未注明具體來源的試劑，為市場購買的例行試劑。

【0122】實施例 1 免疫抗原、篩選抗原的序列及製備

【0123】帶 his 標記的人類 CD40 (h-CD40-his) 重組蛋白、帶 Fc 標記的人類 CD40 (h-CD40-Fc) 重組蛋白、帶 his 標記的小鼠 CD40 (m-CD40-his) 重組蛋白及帶 his 標記的恆河猴 CD40 (rhesus-CD40-his) 重組蛋白 (#CD0-C52H7) 皆為購買自 Acrobiosystems 公司的純化商業蛋白實際，其各自的序列來源見表 1。蛋白可用於下述各實施例實驗中。

【0124】表 1. 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	AAH12419.1
h-CD40-Fc	Glu21-Arg193	NP_001241.1
m-CD40-his	Val24-Arg193	P27512
rhesus-CD40-his	Glu21-Arg193	NP_001252791.1

【0125】實施例 2 抗體雜交瘤的製備

【0126】抗人類 CD40 單株抗體通過免疫小鼠產生。實驗用 C57BL/6 小鼠，雌性，6～8 週齡[昭衍（蘇州）新藥研究中心有限公司，動物生產許可證號：201503259]。飼養環境：SPF 級。小鼠購入後，實驗室環境飼養 1 週，12/12 小時光/暗週期調節，溫度 20～25℃；濕度 40～60 %。將已適應環境的小鼠分成 2 籠，每籠 5 隻。

【0127】免疫抗原為帶 Fc 標記的人類經修飾的 CD40 重組蛋白（h-CD40-Fc，用磷酸鹽緩衝液配製成 1μg/μl）。用弗氏佐劑（Freund's adjuvant）（Sigma，Lot No.：F5881/F5506）乳化：首次用弗氏完全佐劑（CFA），其餘加強免疫用核酸類佐劑（CpG，Sangon Biotech）及注射用鋁（Imject Alum，Thermo，Lot No.：PH203866）。免疫注射時間為第 0、14、28、42、56、70 天。於第 21、35、49、63，77 天採血進行血液檢查，用 ELISA 方法檢測小鼠血清，確定小鼠血清中的抗體效價。

【0128】在第 4 次免疫以後，選擇血清中抗體效價高並且效價趨於平臺的小鼠進行脾細胞融合，融合前 3 天加強免疫，腹膜內（IP）注射 10 μg/隻的磷酸鹽緩衝液配製的抗原溶液。採用最佳化的 PEG 媒介的融合步驟將脾淋巴細胞與

骨髓瘤細胞 Sp2/0 細胞（ATCC® CRL-8287™）進行融合得到雜交瘤細胞，選出體外活性好的五株單株雜交瘤細胞株。

【0129】實施例 3 ELISA 結合實驗

【0130】ELISA 實驗被用來檢測抗 CD40 抗體的結合特性。用直接披覆帶 his 標記的 CD40 重組蛋白，抗體加入後，通過加入二抗（HRP 偶聯的抗一抗 Fc 的抗體）及 HRP 基質 TMB 檢測抗體與抗原結合的活性。

【0131】人或恆河猴 CD40-his 蛋白披覆 96 孔 ELISA 微量盤(ELISA Plate)，以 0.5 µg/ml 濃度每孔 100 µl，4℃培養過夜。清洗液清洗三遍，每孔 250 µl。每次洗滌震盪 10 秒以保證充分清洗。加入 200 µl/孔封閉液室溫培養 2 小時。清洗液清洗三遍，每孔 250 µl。每次洗滌震盪 10 秒以保證充分清洗。每孔加 100 µl 用稀釋液稀釋好的抗 CD40 待測抗體。室溫培養 1 小時。清洗液清洗三遍，每孔 250 µl。每孔加入 100 µl 用稀釋液以 1:20000 倍稀釋的 HRP 標記的山羊抗人類 IgG 二抗。室溫培養 1 小時。清洗液清洗三遍，每孔 250µl。每孔加入 100 µl TMB，避光反應 15 分鐘。加入 50 µl 每孔的 0.16M 硫酸。Thermo MultiSkanFc 酵素免疫分析測讀儀（ELISA Reader）讀取 450nm OD 值，計算 CD40 抗體對 CD40 的結合 EC50 值。

【0132】表 2.鼠源雜交瘤抗體對不同種系 CD40 的 ELISA 結合實驗結果

抗體株	人源 CD40-his ELISA EC50 (ng/ml)	猴 CD40-his ELISA EC50 (ng/ml)	鼠 CD40-his ELISA EC50
1D9	10.01	9.808	無結合
2H6	7.063	7.207	無結合
9E5	5.996	6.704	無結合
14C10	8.808	9.494	無結合
38B4	12.9	11.81	無結合

【0133】實施例 4 抗 CD40 抗體阻斷 CD40 及 CD40L 結合實驗

【0134】本實驗中，通過體外阻斷實驗，檢測所篩選出來的抗人類 CD40 抗體阻斷人類 CD40 及人類 CD40L 結合。具體方法是將帶 Fc 標記的 CD40 重組蛋白（h-CD40-Fc）披覆到 96 孔 ELISA 微量盤上，加入抗 CD40 抗體充分結合佔據表位後，再加入帶 his 標記的 CD40L，通過檢測 his 標記，來計算 CD40 與 CD40L 的結合量，計算 CD40 抗體對 CD40 活性位點阻斷的 IC50 值。

【0135】人類 CD40-Fc 蛋白披覆 96 孔 ELISA 微量盤，按 1μg/ml 濃度每孔 100 μl，4℃培養過夜。清洗液清洗三遍，每孔 250μl。每次洗滌震盪 10 秒以保證充分清洗。加入 200μl/孔封閉液室溫培養 2 小時。清洗液清洗三遍，每孔 250 μl。每次洗滌震盪 10 秒以保證充分清洗。每孔加 100 μl 用稀釋液稀釋好的抗 CD40 待測抗體，室溫培養 1 小時。清洗液清洗三遍，每孔 250μl。每孔加入 100μl 稀釋好的 CD40L-his，室溫培養 1 小時，清洗液清洗三遍。每孔加入 100 μl 用稀釋液以 1:2000 倍稀釋的 HRP 標記的抗 his 標記的二抗。室溫培養 1 小時。清洗液清洗三遍，每孔 250 μl。每孔加入 100 μl TMB，避光反應 15 分鐘。加入 50 μl 每孔的 0.16M 硫酸。Thermo MultiSkanFc 酵素免疫分析測讀儀讀取 450 nm OD 值，計算 CD40 抗體對 CD40 與 CD40L 結合阻斷的 IC50 值。

【0136】表 3.人 hCD40/hCD40L ELISA 阻斷實驗結果

抗體株	人類 hCD40/hCD40L ELISA 阻斷 IC50(μg/ml)
1D9	0.2634
2H6	0.2682
9E5	0.2787
14C10	0.3001
38B4	0.2934

【0137】實施例 5 Biacore 親和力測定

【0138】按照人類抗體捕獲套組（Cat. # BR-1008-39，GE）說明書中的方法將人類抗體捕獲抗體共價偶聯於 Biacore 儀器（Biacore X100，GE）的生物感測晶片 CM5 上，從而親和捕獲一定量的待測嵌合或人源化抗體，然後於晶片表面流經一系列濃度梯度下的 CD40 抗原（CD40 抗原皆購自 Acrobiosystems），利用 Biacore 儀器（Biacore X100，GE）實時檢測反應訊息從而獲得結合及解離曲線。在每個循環解離完成後，用人類抗體捕獲套組裡配置的再生溶液將生物晶片洗淨再生。實驗中用到的胺基偶聯套組購自 GE 公司（Cat. # BR-1000-50，GE），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）。實驗得到的數據用 BiacoreX100 evaluation software2.0 GE 軟件以（1:1）Binding 模型進行擬合，得出親和力數值，見表 10 及表 11。

【0139】實施例 6 抗 CD40 抗體報告基因細胞活性實驗

【0140】HEK-Blue CD40L 細胞購自 Invivogen（Cat#hkb-cd40），該細胞穩定轉染了人類 CD40 基因及 NF-kB 媒介的 SEAP 基因組，可以藉由 SEAP 基質 QUANTI-Blue 檢測上清中分泌的 SEAP 來表徵 CD40 訊息路徑的活化水平。本實驗藉由檢測細胞 HEK-Blue CD40L 的活化，根據 EC50 大小評價 CD40 抗體的體外細胞活性。細胞 HEK-Blue CD40L 培養在含 10%FBS、100 µg/ml Zeocin 及 30µg/ml Blasticidin 的 DMEM 培養基中，一週繼代 2~3 次，繼代比例 1:5 或 1:10。繼代時，吸去培養基，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 孔細胞培養盤中加入 100 µL 的細胞懸浮液，密度為 5×10^5 細胞/ml，培養基為含 10%FBS、100 µg/ml Zeocin 及 30 µg/ml Blasticidin 的 DMEM，96 孔盤外圍只加入 100µl 無菌水。將培養盤在培養箱培養 24 小時（37℃，5% CO₂）。細胞貼壁後，每孔加入 100µl 梯度稀釋的待測抗體。將培養盤在培養箱培養 20~24 小時（37℃，5%

CO₂)。每孔取 40μl 細胞上清到一個新的 96 孔平底盤中，加入 160μl QUANTI-Blue 基質溶液，將培養盤在培養箱內避光培養 1~3 小時。用酵素免疫分析測讀儀 (Thermo MultiSkanFc) 測定在 620 nm 處的吸光度，計算 EC50 值評價 CD40 抗體的體外細胞活性。

【0141】表 4 抗 CD40 抗體報告基因細胞活性實驗結果

抗體株	HEK293-CD40L 細胞活性實驗	
	EC50 (μg/ml)	
1D9	+++	0.01454
2H6	+++	0.01511
9E5	++	0.01712
14C10	+++	0.01087
38B4	++	0.0365

【0142】實施例 7 抗 CD40 抗體激活 DC 細胞實驗

【0143】從正常人周邊血液中分離 PBMC，然後用 CD14 MACS beads 分選單核細胞。加入含 10ng/ml IL4 及 100ng/ml GM-CSF 的 RPMI 1640 培養液培養 6 天，進行 MoDC 細胞（單一核細胞來源的樹突細胞）的誘導培養。6 天後收集細胞，取 1×10⁵ 個細胞，CD209-PE，CD1a-PerCP/Cy5.5 及 CD14-PE/Cy7 染色，FACS 分析是否成功誘導 MoDC（上述操作皆為本領域的例行操作）。收集成功誘導的 DC，加入各待測抗體及參照抗體抗體，分別設置相應梯度濃度稀釋（抗體的梯度濃度詳見圖 1）。培養 48 小時後，收集細胞，進行 CD80、CD86 及 HLA-DR 染色、FACS 檢測收集數據。根據數據藉由激活初代 DC 細胞實驗，五個鼠源抗體皆顯示了明顯的活性，激活了 DC 細胞表面的活化分子 CD80 及 CD86，並呈

劑量依賴效應，總體效果與兩株參照抗體(分別為Pfizer的CP-870,893及Alligator Bioscience 的 ADC-1013) 相當或略優。見圖 1 及圖 2。

【0144】實施例 8 抗 CD40 抗體的選殖與定序

【0145】取以上篩選鑑定出的 5 株抗體的雜交瘤進行次選殖 (subcloning)，收集對數生長期雜交瘤細胞，用 Trizol (Invitrogen, 15596-018) 提取 RNA (按照套組說明書步驟)，反轉錄 (PrimeScript™ Reverse Transcriptase，Takara, cat # 2680A)。將反轉錄得到的 cDNA 採用 mouse Ig-Primer Set(Novagen, TB326 Rev.B 0503) 進行 PCR 增幅後送測序公司測序。最終得到 5 株鼠源抗體的序列。

【0146】鼠單抗 2H6 的重鏈及輕鏈可變區序列如下：

2H6 HCVR

QVQLQQSGAELVRPGTSVKV SCKASGYAFSDYLIEWAKQRPGQGLEWI
GVINPGSGGSNYNEKIKDRATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGG
GGFTYWGQGTLVTVSA SEQ ID NO：1

2H6 LCVR

EIQLTQTTSSL SASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTIKLLLNF
ASRLHSGVPSRFSGSGSGTDFFLTISNLEQDDIATYFCQQGSTLPWTFGGGGTK
LEIK

SEQ ID NO：2

【0147】其含有下表 5 中的 CDR 序列：

【0148】表 5

名稱	序列	編號
HCDR1	GYAFSDYLIE	SEQID NO：3
HCDR2	VINPGSGGSNYNEKIKD	SEQID NO：4
HCDR3	GGGGFTY	SEQID NO：5
LCDR1	RASQDISNYLN	SEQID NO：6

LCDR2	FASRLHS	SEQID NO：7
LCDR3	QQGSTLPWT	SEQID NO：8

【0149】 9E5 的重鏈及輕鏈可變區序列如下：

9E5 HCVR

QVQLQQPGADLVKPGASVKMSCKASGYILTTYWITWVKQRPGQGLEW
IGDIHPGSGSTKYNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLTRLSSEDSAVYYCARRD
YWGQGTTLTVSSEQ ID NO：9

9E5 LCVR

DVLMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVNSQGNTYLEWYLQKPGESP
KLLIYKVTNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQASLVPWT
FGGGTKLEIK

SEQ ID NO：10

【0150】 其含有下表 6 中的 CDR 序列：

【0151】 表 6

名稱	序列	編號
HCDR1	GYILTTYWIT	SEQID NO：11
HCDR2	DIHPGSGSTKYNEKFKS	SEQID NO：12
HCDR3	RDY	SEQID NO：13
LCDR1	RSSQNIVNSQGNTYLE	SEQID NO：14
LCDR2	KVTNRFS	SEQID NO：15
LCDR3	FQASLVPWT	SEQID NO：16

【0152】 1D9 的重鏈及輕鏈可變區序列如下：

1D9 HCVR

QVRLQQSGAELVRPGTSMRVSCKASGYAFTNYLINWVKQRPGQGLEWI
GILNPGSGGTNYNENFKDKATLTADKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYFCIRGSP
GFAYWGQGTLVTVSA

SEQ ID NO：37

1D9 LCVR

DIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDINIYLNWYQQKPDGTVKLLIYS
TSGLHSGVPSRFNGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGYTLPTYTFGGGK
LEIK

SEQ ID NO：38

【0153】其含有下表 7 中的 CDR 序列：

【0154】表 7

名稱	序列	編號
HCDR1	GYAFTNYLIN	SEQID NO：39
HCDR2	ILNPGSGGTNYNENFKD	SEQID NO：40
HCDR3	GSPGFAY	SEQID NO：41
LCDR1	RASQDINIYLN	SEQID NO：42
LCDR2	STSGLHS	SEQID NO：43
LCDR3	QQGYTLPTY	SEQID NO：44

【0155】14C10 的重鏈及輕鏈可變區序列如下：

14C10 HCVR

QVQVQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGLEWI
GVINPEFGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGG
GGFTYWGQGTLVTVSA

SEQ ID NO：45

14C10 LCVR

HIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISSHLNWYQQKPDGTVKLLISY
TSRLHSGVPSRFSGSGSGADYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGK
LEIK

SEQ ID NO：46

【0156】其含有下表 8 中的 CDR 序列：

【0157】表 8

名稱	序列	編號
----	----	----

HCDR1	GYAFTNYLIE	SEQID NO：47
HCDR2	VINPEFGGTNYNEKFKG	SEQID NO：48
HCDR3	GGGGFTY	SEQID NO：49
LCDR1	RASQDISSHLN	SEQID NO：50
LCDR2	YTSRLHS	SEQID NO：51
LCDR3	QQGNTLPWT	SEQID NO：52

【0158】 38B4 的重鏈及輕鏈可變區序列如下：

38B4 HCVR

QVRLKQSGAELVRPGASVKVSCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWI
AGIYPGTGNTYYNEKFKGKATLTAERSSTAYMQLTSLTSEDSAVYFCTRRG
LPSLCFDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO：53

38B4 LCVR

DFQMTQTTSSLASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIY
YTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPPTFGGGTK
LEIK

SEQ ID NO：54

【0159】 其含有下表 9 中的 CDR 序列：

【0160】 表 9

名稱	序列	編號
HCDR1	GYTFTDYYIN	SEQID NO：55
HCDR2	GIYPGTGNTYYNEKFKG	SEQID NO：56
HCDR3	RGLPSLCFDY	SEQID NO：57
LCDR1	SASQGISNYLN	SEQID NO：58
LCDR2	YTSSLHS	SEQID NO：59
LCDR3	QQYSKLPPT	SEQID NO：60

【0161】其中最佳兩株抗體 2H6 及 9E5 進入後續開發。將獲得的可變區序列分別接上人類的抗體 IgG1 恆定區序列，得到人-鼠嵌合的抗體序列，利用分子選殖技術，把嵌合抗體的序列插入到 pCP 表現載體中（購自邁博斯生物公司）中，經過 PCR 後測序鑑定（該部分的分子選殖等分子生物學操作方法以例行操作條件進行，具體可以參照《分子選殖：實驗室手冊》），利用 HEK293 細胞表現系統，即可獲得人-鼠嵌合抗體 2H6-C 及 9E5-C。對經過 MabSelect SuRe（GE Lifesciences）親和力層析純化後的嵌合抗體進行各項體外活性檢測，數據見表 10。

【0162】表 10. 嵌合抗體的體外活性

嵌合抗體	人源 CD40-his ELISA EC50 (ng/ml)	人類 hCD40/hCD40L ELISA 阻斷 IC50(μg/ml)	HEK293-CD40 細胞結合 EC50(μg/ml)	Biacore 親和 力 K _D (nM)
2H6-C	4.565	0.6275	0.02593	3.98
9E5-C	1.346	0.1218	0.03333	2.68
Pfizer 參照 (hIgG4)	5.628	0.2583	0.01638	20.35
Alligator 參照 (hIgG1)	3.288	0.7233	0.39650	65.9

【0163】實施例 9 小鼠抗體人源化實驗

【0164】在所獲得的鼠源抗體 2H6 及 9E5 的 VH/VLCDR 典型結構的基礎上，將重、輕鏈可變區序列與抗體 Germline 資料庫比較，獲得同源性高的人種系模板。其中人類種系輕鏈框架區來自人 κ 輕鏈基因，本發明抗體較佳人種系輕鏈模版 Vk1-33/JK4（2H6）或 Vk2-28/JK4（9E5）。人類種系重鏈框架區來自人類重鏈，本發明抗體較佳人種系重鏈模版 VH1-69/JH6（2H6）或 VH1-2/JH6（9E5），如下所示：

2H6 較佳人種系重鏈模版 IGHV1-69（SEQ ID NO：21）：

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEW
MGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED
TAVYYCAR

2H6 較佳人種系輕鏈模板 IGkV1-33 (SEQ ID NO : 22) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIY
DASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLP

9E5 較佳人種系重鏈模版 IGHV1-2 (SEQ ID NO : 23) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLE
WMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR
LSDDTAVYYCAR

9E5 較佳人種系輕鏈模板 IGkV2-28 (SEQ ID NO : 24) :

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQ
LLIYLG
SNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTP

【0165】將鼠源抗體的 CDR 區移植到選擇的人源化模板上，替換人源化可變區，再與相應的人源 IgG 恆定區（較佳重鏈為 IgG1，輕鏈為 κ）重組。然後以鼠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 及 VH 的構象有重要影響的殘基進行回復突變，並對 CDR 區化學不穩定胺基酸殘基最佳化，得到最終的人源化分子。其重鏈可變區序列如 SEQ ID NO: 25-30 所示；輕鏈可變區序列如 SEQ ID NO: 31-36 所示。

hu2H6-H1a (SEQ ID NO: 25) :

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYLIEWVRQAPGQGLEW
MGVINPGSGGSNYNEKIKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED
TAVYYCARGGGGFTYWGQGTLVTVSS

hu2H6-H1b (SEQ ID NO: 26) :

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSDYLIEWVRQAPGQGLEW
MGVINPGSGGSNYNEKIKDRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED
TAVYYCARG
GGGFTYWGQGTLVTVSS

hu2H6-H1c (SEQ ID NO: 27) :

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSDYLIEWVRQAPGQGLEWI
GVINPGSGGSNYNEKIKDRATLTADKSTSTAYMELSSLRSED
TAVYYCARGG
GGFTYWGQGTLVTVSSFGQGKLEIK

hu9E5-H1a (SEQ ID NO: 28) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWITWVRQAPGQGLEW
MGDIHPGSGSTKYNEKFKSRVTMTVDTSISTAYMELSRLRSED
TAVYYCARR
DYWGQGTTVTVSS

hu9E5-H1b (SEQ ID NO: 29) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWITWVRQAPGQGLEW
MGDIHPGSGSTKYNEKFKSRVTLTVDTSISTAYMELSRLRSED
TAVYYCARR
DYWGQGTTVTVSS

hu9E5-H1c (SEQ ID NO: 30) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYILTTYWITWVRQAPGQGLEW
MGDIHPGSGSTKYNEKFKSRVTLTVDTSISTAYMELSRLRSED
TAVYYCARR
DYWGQGTTVTVSS

hu2H6-L1a (SEQ ID NO: 31) :

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLLN
FASRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGSTLPWTFGGG
TK
VEIK

hu2H6-L1b (SEQ ID NO: 32) :

DIQLTQSPSSLASVGDRVITICRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLLNF
ASRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYCQQGSTLPWTFGGGTV
EIK

hu2H6-L1c (SEQ ID NO: 33) :

DIQLTQSPSSLASVGDRVITICRASQDISNYLNWYQQKPGKTIKLLLNF
ASRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYCQQGSTLPWTFGGGTV
EIK

hu9E5-L1a (SEQ ID NO: 34) :

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVNSQGNTYLEWYLQKPGQSPQ
LLIYKVTNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASLPWTF
GGGTV EIK

hu9E5-L1b (SEQ ID NO: 35) :

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVNSQGNTYLEWYLQKPGQSP
QLLIYKVTNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASLPWT
FGGGTV EIK

hu9E5-L1c (SEQ ID NO: 36) :

DVLMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVNSQGNTYLEWYLQKPGQSPQ
LLIYKVTNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASLPWTF
GGGTV EIK

【0166】經由以上輕重鏈組合的表現測試及回復突變數量對比，選擇出最
終的人源化 hu2H6（使用 H1b 重鏈及 L1c 輕鏈）及 hu9E5 抗體分子（使用 H1c
重鏈及 L1a 輕鏈），其各自的完整輕重鏈序列如 SEQ ID NO: 17-20 所示。

hu2H6 HC

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSDYLIEWVRQAPGQGLEW
MGVINPGSGGSNYNEKIKDRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSED
TAVYYCARGGGFTYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO : 17

hu2H6 LC

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKTIKLLLN
FASRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQGSTLPWTFGGG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

SEQ ID NO : 18

hu9E5 HC

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYILTTYWITWVRQAPGQGLEW
MGDIHPGSGSTKYNEKFKSRVTLTVDTSISTAYMELSRLRSED
TAVYYCARRDYWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KV
DDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：19

hu9E5 LC

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVNSQGNTYLEWYLQKPGQSPQ
LLIYKVTNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQASLVPWTF
GGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO：20

【0167】實施例 10 人源化抗體測試數據

【0168】本發明人源化抗體 hu2H6 及 hu9E5 與人類、恆河猴 CD40 的結合活性、阻斷活性等，見表 11。結果表明，本發明人源化抗人類 CD40 抗體的 ELISA 結合、阻斷活性與陽性抗體 pfizer/alligator 相當，尤其是，hu9E5 及人類 CD40 的 Biacore 測量親和力是陽性抗體 Alligator 參照的 10 倍以上、Pfizer 參照的 4 倍以上。

【0169】表 11 人源化 hu2H6 及 hu9E5 抗體的體外活性

	人源 CD40-his ELISA EC50 (ng/ml)	猴 CD40-his ELISA EC50 (ng/ml)	人類 hCD40/hCD40L ELISA 阻斷 IC50(μg/ml)	HEK293-CD40 細胞結合 EC50(μg/ml)	Biacore 親 和力 K _D (M)
Hu2H6-11	3.680	2.945	0.6735	0.01538	1.120E-8
Hu9E5-25	1.650	1.661	0.3084	0.13970	5.301E-9

Alligator 參照(hIgG1)	1.293	1.243	0.6471	1.36200	1.66E-7
Pfizer 參照(hIgG4)	3.976	3.561	0.3106	0.01907	2.035E-8

【0170】實施例 11 抗 CD40 抗體對小鼠腫瘤生長的抑制

【0171】取正常人周邊血液，用密度梯度離心法分離健康人 PBMC。用 CD14+ microbeads 套組分選單核細胞，按照套組所提供的 protocol 進行 CD14+ 單核細胞的分離，即每 10⁷ 個細胞加入 20 μl Anti-CD14 microbeads，4℃ 培養 15 分鐘。然後，將細胞加入磁柱中，洗三次後，收集磁柱中的細胞，即 CD14+ 單核細胞。CD14+ 單核細胞中加入含 10ng/ml IL4 及 100ng/ml GM-CSF 的 RPMI 1640 培養液培養 6 天（培養方法為本領域例行方法），進行 MoDC 細胞的誘導培養，剩餘的細胞加入含 IL-2 的 RPMI 1640，培養後收集懸浮的細胞（培養方法以及收集細胞的方法皆為本領域的例行方法），使用 CD3+ microbeads 套組分選 T 細胞。六天後收集並分取 MoDC 細胞及 CD3+ T 細胞，將他們與 Raji 細胞（上海生科院細胞庫，培養於含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培養液中）以 1 : 5 : 20 的比例混合，接種於每隻 NOG 小鼠（南京銀河生物，適應性飼養 5 天）皮下。實驗動物皆飼養於恆溫恆濕的獨立通風盒內，飼養室溫度 18.0～26.0℃，濕度 40～70%，10～20 次/小時換氣，晝夜明暗交替時間 12h/12h。

【0172】實驗分為人 IgG1 抗體對照組，hu2H6，、hu9E5 及參照抗體 G12，給藥劑量皆為 3 mg/kg。每組 5 隻小鼠，每週一次，六週注射給藥，連續給藥 3 次。整個實驗過程中，用遊標卡尺每週測量 2 次腫瘤長徑及寬徑，腫瘤體積(mm³) = 0.5 × (腫瘤長徑 × 腫瘤短徑²) 計算。相對腫瘤抑制率 TGI(%) : TGI% = (1-T/C) × 100%。T/C % 為相對腫瘤增殖率，即在某一時間點，治療組及對照組相對腫

瘤體積或瘤重的百分比值。T 及 C 分別為治療組及 IgG1 對照組在某一特定時間點的腫瘤體積（TV）或瘤重（TW）。

【0173】結果顯示，人源化的抗 CD40 抗體 hu2H6 及 hu9E5 相對 IgG1 對照皆有非常顯著的抑瘤作用，給藥 21 天後腫瘤接近完全消除；對比參照抗體 G12 的抑瘤作用總體相當或稍好，如圖 3 及圖 4 所示。

【0174】雖然以上描述了本發明的具體實施方式，但是本領域的技術人員應當理解，這些僅是舉例說明，在不背離本發明的原理及實質的前提下，可以對這些實施方式做出多種變更或修改。因此，本發明的保護範圍由所附申請專利範圍限定。

【符號說明】

【0175】無

【序列表】

<110> 江蘇恒瑞醫藥股份有限公司；上海恒瑞醫藥有限公司

<120> 抗CD40抗體、其抗原結合片段及其醫藥用途

<130>

<150> CN201710402559.0

<151> 2017-06-01

<160> 60

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Ile
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ala
115

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 2

Glu Ile Gln Leu Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Leu
35 40 45

Asn Phe Ala Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 3

Gly Tyr Ala Phe Ser Asp Tyr Leu Ile Glu
1 5 10

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 4

Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Ile Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Phe Thr Tyr
1 5

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 7

Phe Ala Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 8

<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 9
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 9

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

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

Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile His Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

<210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

I699376

<400> 10

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 11

Gly Tyr Ile Leu Thr Thr Tyr Trp Ile Thr
1 5 10

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 12

Asp Ile His Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 13
<211> 3
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 13

Arg Asp Tyr
1

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Asn Ser Gln Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15

Lys Val Thr Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16

Phe Gln Ala Ser Leu Val Pro Trp Thr
1 5

I699376

<210> 17
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人種系化抗體

<400> 17

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Ile
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 18
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人種系化抗體

<400> 18

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Ile Lys Leu Leu Leu
35 40 45

Asn Phe Ala Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 19
<211> 442
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人種系化抗體

<400> 19

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

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

Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile His Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
340 345 350

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 20
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人種系化抗體

<400> 20

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 21
<211> 98
<212> PRT
<213> 人種系

<400> 21

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65707580

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
859095

Ala Arg

<210> 22

<211> 95

<212> PRT

<213> 人種系

<400> 22

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
151015

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
202530

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
354045

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
505560

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65707580

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
859095

<210> 23

<211> 98

<212> PRT

<213> 人種系

<400> 23

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

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

Ala Arg

<210> 24
<211> 100
<212> PRT
<213> 人種系

<400> 24

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
			20					25					30		
Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro
100

<210> 25
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體重鏈可變區

<400> 25

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

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

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

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Ile
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體重鏈可變區

<400> 26

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Ile
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 126
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體重鏈可變區

<400> 27

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Ile
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體重鏈可變區

<400> 28

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

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

Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile His Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

<210> 29
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體重鏈可變區

<400> 29

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

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

Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile His Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

<210> 30
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體重鏈可變區

<400> 30

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

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

Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Asp Ile His Pro Gly Ser Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體輕鏈可變區

<400> 31

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Asn Phe Ala Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 32
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體輕鏈可變區

<400> 32

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Asn Phe Ala Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體輕鏈可變區

<400> 33

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Ile Lys Leu Leu Leu
 35 40 45

Asn Phe Ala Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp
85 90 95

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

<210> 34
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體輕鏈可變區

<400> 34

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 35
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體輕鏈可變區

<400> 35

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 36
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人源化抗體輕鏈可變區

<400> 36

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Asn Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 37

<211> 116

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 37

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

Ser Met Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Leu Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Leu Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe

50					55					60					
Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
			85						90					95	
Ile	Arg	Gly	Ser	Pro	Gly	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
			100					105					110		
Thr	Val	Ser	Ala												
		115													
<210>	38														
<211>	107														
<212>	PRT														
<213>	小鼠														
<400>	38														
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ile	Tyr
			20					25					30		
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ser	Thr	Ser	Gly	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Asn	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln
65					70					75					80
Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Tyr	Thr	Leu	Pro	Tyr
				85					90					95	

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

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 39

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

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 40

Ile Leu Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Asn Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 41

Gly Ser Pro Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 42

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ile Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 43

Ser Thr Ser Gly Leu His Ser
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 44

Gln Gln Gly Tyr Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 45
<211> 116
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 45

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

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

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

Gly Val Ile Asn Pro Glu Phe Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ala
115

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 46

His Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

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

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

<210> 47
<211> 10

<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 47

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

<210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 48

Val Ile Asn Pro Glu Phe Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Phe Thr Tyr
1 5

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 50

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser His Leu Asn
1 5 10

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 51

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 52

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 53

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

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

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

Ala Gly Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Glu Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

100105110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 107
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 54

Asp Phe Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
151015

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
202530

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
354045

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
505560

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
65707580

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Pro
859095

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100105

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 55

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn

I699376

1 5 10

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 56

Gly Ile Tyr Pro Gly Thr Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 57

Arg Gly Leu Pro Ser Leu Cys Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 58

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 59

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 60

Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Pro Thr
1 5

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其包含：

抗體輕鏈可變區，所述的抗體輕鏈可變區包含序列分別如 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15 及 SEQ ID NO: 16 所示的 LCDR1、LCDR2 及 LCDR3；及

抗體重鏈可變區，所述的抗體重鏈可變區包含序列分別如 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 及 SEQ ID NO:13 所示的 HCDR1、HCDR2 及 HCDR3。

【第2項】如請求項 1 所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述的抗體或其抗原結合片段為鼠源抗體、嵌合抗體、人源化抗體或者人類抗體。

【第3項】如請求項 2 所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述鼠源抗體或者所述嵌合抗體的重鏈可變區的胺基酸序列如 SEQ ID NO. 9 所示，輕鏈可變區的胺基酸序列如 SEQ ID NO. 10 所示。

【第4項】如請求項 2 所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述人源化抗體重鏈可變區進一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重鏈 FR 區。

【第5項】如請求項 4 所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述人源化抗體重鏈可變區上的重鏈 FR 區序列，來源於如 SEQ ID NO: 23 所示的人種系重鏈 IGHV1-2 序列；及/或人源化抗體輕鏈可變區上的輕鏈 FR 區序列，來源於如 SEQ ID NO: 24 所示的人種系輕鏈 IGkV2-28 序列。

【第6項】如請求項 4、5 任一項所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述人源化抗體重鏈可變區為如 SEQ ID NO: 28-30 之一所示的序列，及/或輕鏈可變區為 SEQ ID NO: 34-36 之一所示的序列。

【第7項】如請求項 6 所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段，其中所述人源化抗體輕鏈序列為如 SEQ ID NO: 20 所示的序列，及/或所述人源化抗體重鏈序列為如 SEQ ID NO: 19 所示的序列。

【第8項】一種單鏈抗體，含有如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。

【第9項】一種抗體-藥物偶聯物，其中所述的抗體含有如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段。

【第10項】一種編碼如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CD40 抗體或抗原結合片段、或者如請求項 8 所述之單鏈抗體的 DNA 序列。

【第11項】一種含有如請求項 10 所述之 DNA 序列的表現載體。

【第12項】一種用如請求項 11 所述之表現載體轉化的宿主細胞。

【第13項】如請求項 12 所述之宿主細胞，其中所述的宿主細胞為細菌；或者為酵母菌；或者為哺乳動物細胞。

【第14項】如請求項 13 所述之宿主細胞，其中所述的細菌為大腸桿菌；所述的酵母菌為畢赤酵母；所述的哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢（CHO）細胞或人胚胎腎（HEK）293 細胞。

【第15項】一種藥物組合物，其含有如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段、如請求項 8 所述之單鏈抗體或者如請求項 9 所述之抗體-藥物偶聯物，以及可藥用的賦形劑、稀釋劑或載體。

【第16項】一種如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段、如請求項 8 所述之單鏈抗體、如請求項 9 所述之抗體-藥物偶聯物或者如請求項 15 所述之藥物組合物在製備用於治療或預防 CD40 或 CD40L 媒介的疾病或病症的藥物中的用途。

【第17項】如請求項 16 所述之用途，其中所述的疾病為癌症。

【第18項】如請求項 17 所述之用途，所述的癌症為淋巴瘤、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、腎癌、肺癌、肝癌、胃癌、結腸直腸癌、膀胱癌、橫

紋肌肉瘤、食道癌、子宮頸癌、多發性骨髓瘤、白血病、膽囊癌、膠質母細胞瘤及黑色素瘤。

【第19項】一種如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段、如請求項 8 所述之單鏈抗體、如請求項 9 所述之抗體-藥物偶聯物或者如請求項 15 所述之藥物組合物在製備用於改善自體免疫疾病患者的症狀之藥物的用途。

【第20項】一種如請求項 1 至 7 中任一項所述之抗 CD40 抗體或其抗原結合片段、如請求項 8 所述之單鏈抗體、如請求項 9 所述之抗體-藥物偶聯物或者如請求項 15 所述之藥物組合物在製備用於改善發炎性疾病患者的症狀之藥物的用途。

【發明圖式】

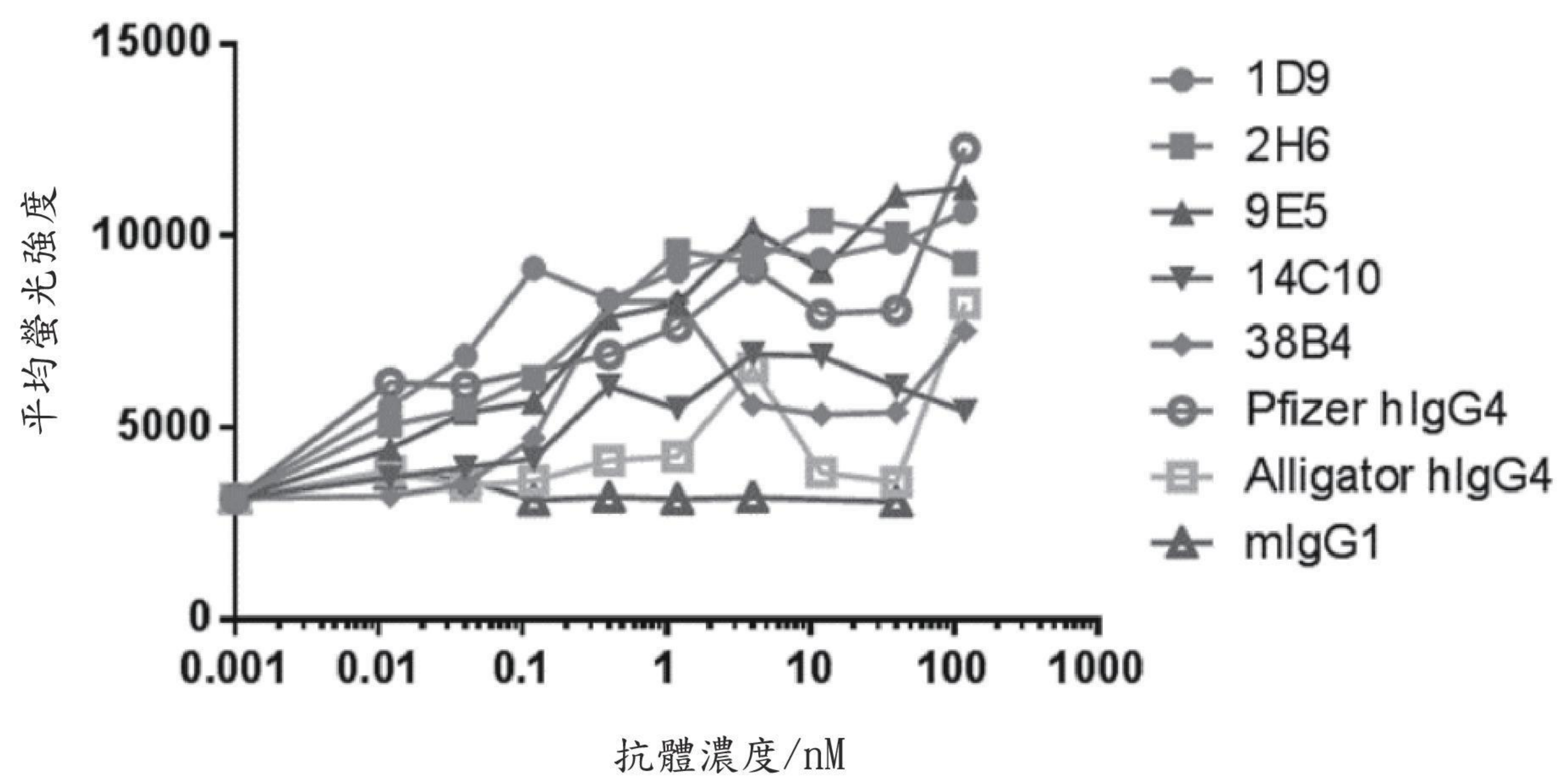


圖 1

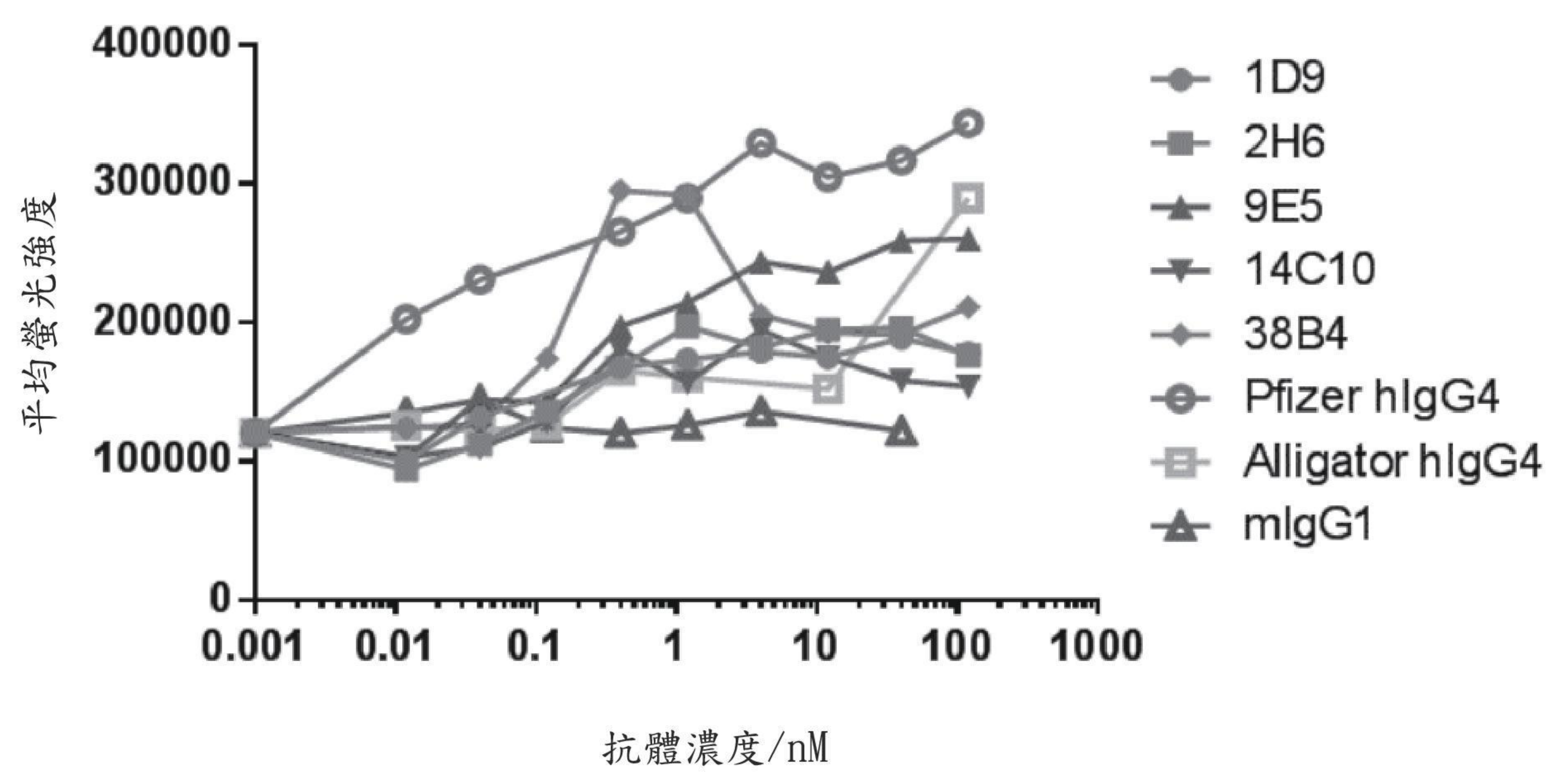


圖2

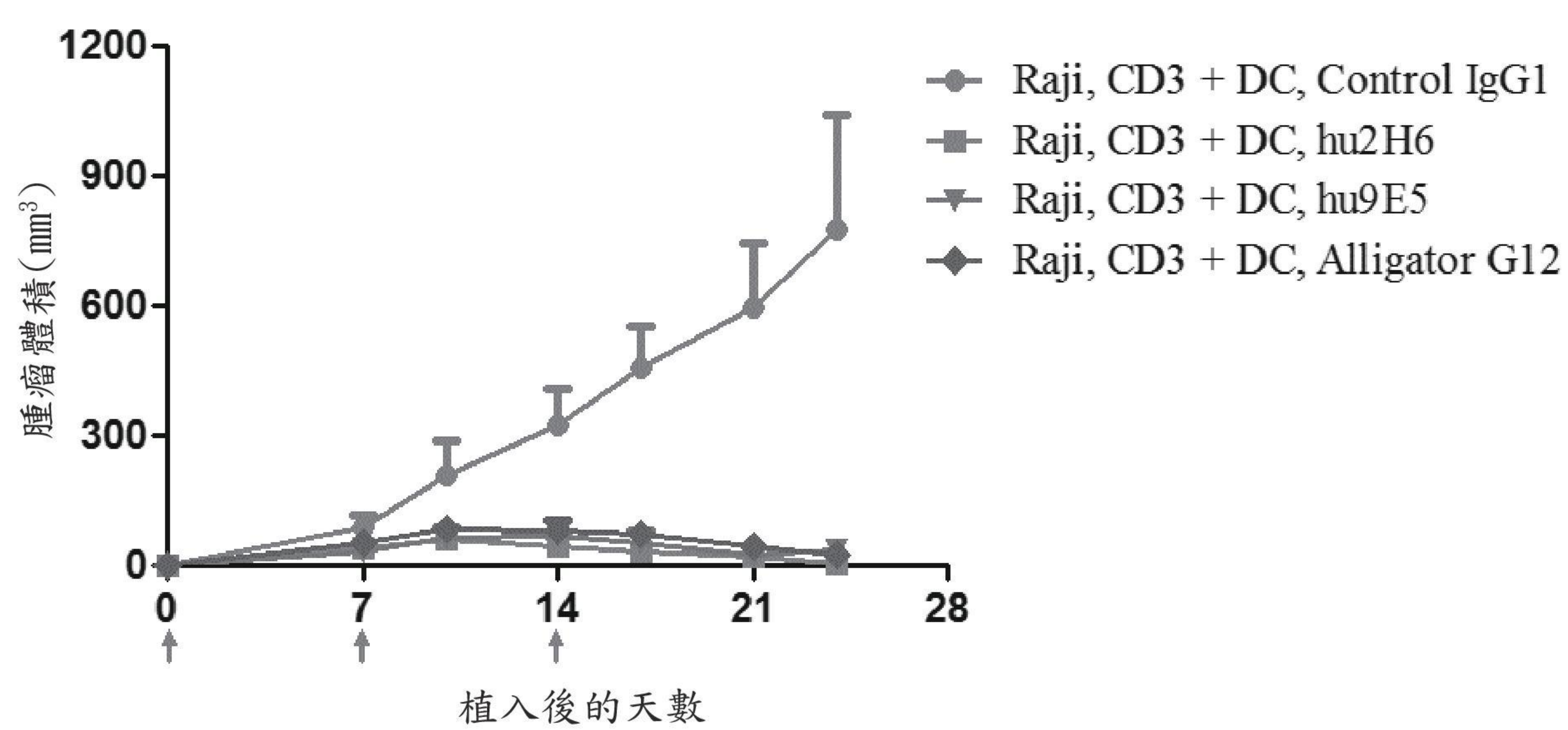


圖3

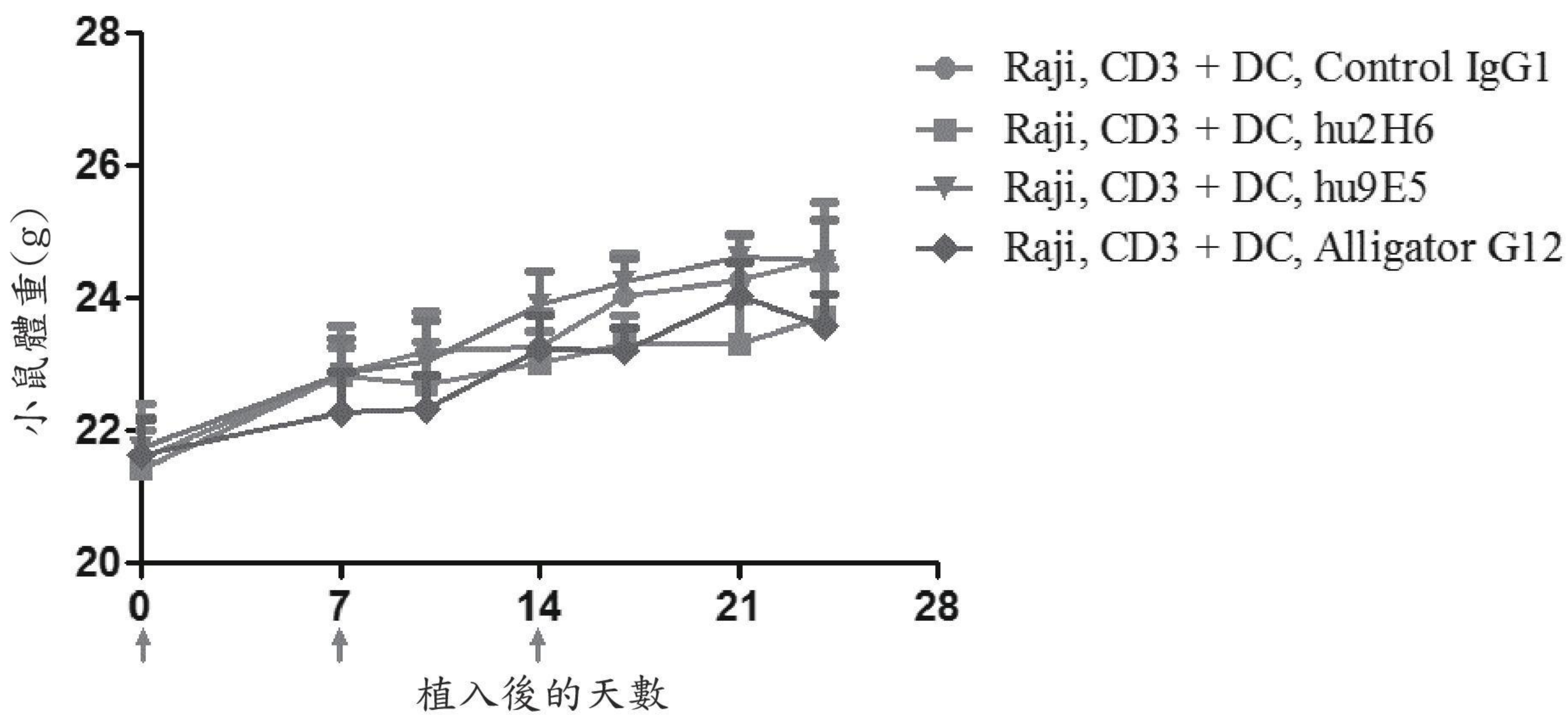


圖4