(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119110807 A
(43)申请公布日 2024.12.10

(21)申请号 202380034047.7
(22)申请日 2023.04.14
(66)本国优先权数据
PCT/CN2022/087003 2022.04.15 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/088417 2023.04.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/198194 EN 2023.10.19
(71)申请人 百奥赛图(北京)医药科技股份有限公司
地址 102600 北京市大兴区大兴生物医药产业基地宝参南街12号院
(72)发明人 刘亚翠 田茂鹏 杨放 杨毅
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 程莹莹
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

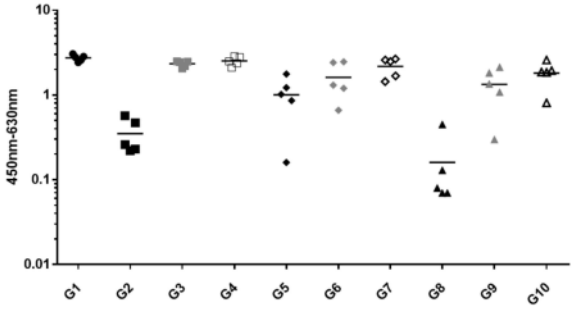
权利要求书5页 说明书41页
序列表（电子公布） 附图28页

(54)发明名称

抗CD40抗体及其用途

(57)摘要

本公开涉及抗CD40(TNF受体超家族成员5)抗体、抗原结合片段及其用途。



CN 119110807 A

1.一种结合CD40(TNF受体超家族成员5)的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包括:

包含互补决定区(CDR)1、2和3的重链可变区(VH),其中所述VH CDR1区包括与选定的VH CDR1氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,所述VH CDR2区包括与选定的VH CDR2氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,并且所述VH CDR3区包括与选定的VH CDR3氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列;和

包含互补决定区(CDR)1、2和3的轻链可变区(VL),其中所述VL CDR1区包括与选定的VL CDR1氨基酸序列具有至少80%的同一性的氨基酸序列,所述VL CDR2区包括与选定的VL CDR2氨基酸序列具有至少80%的同一性的氨基酸序列,并且所述VL CDR3区包括与选定的VL CDR3氨基酸序列具有至少80%的同一性的氨基酸序列,

其中所选的VH CDR1、2和3氨基酸序列以及所选的VL CDR1、2和3氨基酸序列是以下之一:

(1) 所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 1、2、3所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 4、5、6所示;

(2)所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 7、8、9所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 10、11、12所示;

(3)所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 13、14、15所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 16、17、18所示;

(4)所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 19、20、21所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 22、23、24所示;

(5)所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 25、26、27所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 28、29、30所示;和

(6)所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 31、32、33所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO: 34、35、36所示。

2.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包括分别具有如SEQ ID NO: 1、2和3所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且所述VL包括分别具有如SEQ ID NO: 4、5和6所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。

3.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包括分别具有如SEQ ID NO: 7、8和9所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且所述VL包括分别具有如SEQ ID NO: 10、11和12所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。

4.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包括分别具有如SEQ ID NO: 13、14和15所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且所述VL包括分别具有如SEQ ID NO: 16、17和18所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。

5.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包括分别具有如SEQ ID NO: 19、20和21所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且所述VL包括分别具有如SEQ ID NO: 22、23和24所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。

6.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包括分别具有如SEQ ID NO: 25、26和27所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且所述VL包括分别具有如SEQ ID NO: 28、29和30所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。

7.根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包括分别具有如SEQ ID NO: 31、32和33所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且所述VL包括分别具有如SEQ ID NO: 34、35和36所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人、猴或狗CD40。

9.根据权利要求1-8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是人抗体或其抗原结合片段、单链可变片段(scFv)和/或多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是人IgG1抗体或其抗原结合片段(可选地具有YTE和/或LALA突变)或人IgG4抗体或其抗原结合片段(可选地具有YTE)。

11.一种包括编码多肽的多核苷酸的核酸,所述多肽包括:

(1)免疫球蛋白重链或其片段,所述免疫球蛋白重链或其片段包括重链可变区(VH),所述VH包括互补决定区(CDR)1、2和3,所述CDR1、2和3分别包括如SEQ ID NO: 1、2和3所示的氨基酸序列,并且其中所述VH在与包括如SEQ ID NO: 37所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合CD40;

(2)免疫球蛋白轻链或其片段,所述免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,所述VL包括互补决定区(CDR)1、2、3,所述CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO: 4、5和6所示的氨基酸序列,并且其中所述VL在与包括如SEQ ID NO: 65所示的氨基酸序列的VH配对时结合CD40;

(3)免疫球蛋白重链或其片段,所述免疫球蛋白重链或其片段包括重链可变区(VH),所述VH包括互补决定区(CDR)1、2和3,所述CDR1、2和3分别包括如SEQ ID NO: 7、8和9所示的氨基酸序列,并且其中所述VH在与包括如SEQ ID NO: 39所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合CD40;

(4)免疫球蛋白轻链或其片段,所述免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,所述VL包括互补决定区(CDR)1、2、3,所述CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO: 10、11和12所示的氨基酸序列,并且其中所述VL在与包括如SEQ ID NO: 38所示的氨基酸序列的VH配对时结合CD40;

(5)免疫球蛋白重链或其片段,所述免疫球蛋白重链或其片段包括VH,所述VH包括互补决定区(CDR)1、2、3,所述CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO: 13、14和15所示的氨基酸序列,并且其中所述VH在与包括如SEQ ID NO: 41所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合CD40;或

(6)免疫球蛋白轻链或其片段,所述免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,所述VL包括CDR1、2、3,所述CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO: 16、17和18所示的氨基酸序列,并且其中所述VL在与包括如SEQ ID NO: 40所示的氨基酸序列的VH配对时结合CD40。

12.根据权利要求11所述的核酸,其中所述核酸包括编码多肽的多核苷酸,所述多肽包括免疫球蛋白重链或其片段,所述免疫球蛋白重链或其片段包括VH,所述VH包括CDR1、2、3,所述CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO: 1、2和3所示的氨基酸序列。

13.根据权利要求11所述的核酸,其中所述核酸包括编码多肽的多核苷酸,所述多肽包括免疫球蛋白轻链或其片段,所述免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,所述VL包括CDR1、2、3,所述CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO: 4、5和6所示的氨基酸序列。

14.根据权利要求11所述的核酸,其中所述核酸包括编码多肽的多核苷酸,所述多肽包括免疫球蛋白重链或其片段,所述免疫球蛋白重链或其片段包括VH,所述VH包括CDR1、2、3,所述CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO: 7、8和9所示的氨基酸序列。

15.根据权利要求11所述的核酸,其中所述核酸包括编码多肽的多核苷酸,所述多肽包括免疫球蛋白轻链或其片段,所述免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,所述VL包括CDR1、2、3,所述CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO: 10、11和12所示的氨基酸序列。

16.根据权利要求11所述的核酸,其中所述核酸包括编码多肽的多核苷酸,所述多肽包括免疫球蛋白重链或其片段,所述免疫球蛋白重链或其片段包括VH,所述VH包括CDR1、2、3,所述CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO: 13、14和15所示的氨基酸序列。

17.根据权利要求11所述的核酸,其中所述核酸包括编码多肽的多核苷酸,所述多肽包括免疫球蛋白轻链或其片段,所述免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,所述VL包括CDR1、2、3,所述CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO: 16、17和18所示的氨基酸序列。

18.根据权利要求11-17中任一项所述的核酸,其中所述VH在与VL配对时特异性结合人、猴或狗CD40,或所述VL在与VH配对时特异性结合人、猴或狗CD40。

19.根据权利要求11-18中任一项所述的核酸,其中所述免疫球蛋白重链或其片段是人免疫球蛋白重链或其片段(例如,人IgG1重链或其片段,可选地具有YTE和/或LALA突变;或人IgG4重链或其片段,可选地具有YTE),并且所述免疫球蛋白轻链或其片段是人免疫球蛋白轻链或其片段。

20.根据权利要求11-19中任一项所述的核酸,其中所述核酸编码单链可变片段(scFv)或多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

21.根据权利要求11-20中任一项所述的核酸,其中所述核酸是cDNA。

22.一种载体,所述载体包括如权利要求11-21中任一项所述的一种或多种核酸。

23.一种载体,所述载体包括如权利要求11-21中任一项所述的两种核酸,其中所述载体编码VL区和VH区,所述VL区和VH区一起结合CD40。

24.一对载体,其中每个载体包括如权利要求11-21中任一项所述的一种核酸,其中所述载体对共同编码VL区和VH区,所述VL区和VH区一起结合CD40。

25.一种细胞,所述细胞包括如权利要求22或23所述的载体,或如权利要求24所述的载体对。

26.根据权利要求25所述的细胞,其中所述细胞是CHO细胞。

27.一种细胞,所述细胞包括如权利要求11-21中任一项所述的一种或多种核酸。

28.一种细胞,所述细胞包括如权利要求11-21中任一项所述的两种核酸。

29.根据权利要求28所述的细胞,其中所述两种核酸共同编码VL区和VH区,所述VL区和VH区一起结合CD40。

30.一种产生抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括

(a)在足以使如权利要求25-29中任一项所述的细胞产生抗体或抗原结合片段的条件下培养所述细胞;以及

(b)收集由所述细胞产生的抗体或抗原结合片段。

31.一种结合CD40的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包括:

重链可变区(VH),所述VH包括与选定的VH序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,和轻

链可变区(VL),所述VL包括与选定的VL序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所选的VH序列和所选的VL序列是以下之一:

(1)所选的VH序列为SEQ ID NO: 65,并且所选的VL序列为SEQ ID NO: 37;

(2)所选的VH序列是SEQ ID NO: 38,并且所选的VL序列是SEQ ID NO: 39;和

(3)所选的VH序列是SEQ ID NO: 40,并且所选的VL序列是SEQ ID NO: 41。

32.根据权利要求31所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包括SEQ ID NO: 65的序列,并且所述VL包括SEQ ID NO: 37的序列。

33.根据权利要求31所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包括SEQ ID NO: 38的序列,并且所述VL包括SEQ ID NO: 39的序列。

34.根据权利要求31所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包括SEQ ID NO: 40的序列,并且所述VL包括SEQ ID NO: 41的序列。

35.根据权利要求31-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人、猴或狗CD40。

36.根据权利要求31-35中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是人抗体或其抗原结合片段、单链可变片段(scFv)和/或多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

37.根据权利要求31-36中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是人IgG1抗体或其抗原结合片段(可选地具有YTE和/或LALA突变)或人IgG4抗体或其抗原结合片段(可选地具有YTE)。

38.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包括如权利要求1-10和31-37中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的VH CDR1、2、3和VL CDR1、2、3。

39.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段与如权利要求1-10和31-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段交叉竞争。

40.一种抗体药物缀合物,所述抗体药物缀合物包含与治疗剂共价结合的如权利要求1-10和31-39中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

41.根据权利要求40所述的抗体药物缀合物,其中所述治疗剂是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。

42.一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:向所述受试者施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含如权利要求1-10和31-39中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或如权利要求40或41所述的抗体药物缀合物。

43.根据权利要求42所述的方法,其中所述受试者患有实体瘤。

44.根据权利要求42所述的方法,其中所述癌症是黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤或恶性血液肿瘤。

45.根据权利要求42所述的方法,其中所述癌症是非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病。

46.一种降低肿瘤生长速率的方法,所述方法包括

使所述肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包含如权利要求1-10和31-39中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求40或41所述的抗体药物缀合物。

47.一种杀死肿瘤细胞的方法,所述方法包括

使所述肿瘤细胞与有效量的组合物接触,所述组合物包含如权利要求1-10和31-39中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求40或41所述的抗体药物缀合物。

48.一种抑制受试者中的免疫应答的方法,所述方法包括

向受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含如权利要求1-10和31-39中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求40或41所述的抗体药物缀合物。

49.根据权利要求48所述的方法,其中所述受试者患有自身免疫性疾病。

50.一种治疗自身免疫性疾病的方法,所述方法包括

向受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含如权利要求1-10和31-39中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,或如权利要求40或41所述的抗体药物缀合物。

51.根据权利要求50所述的方法,其中所述自身免疫性疾病是类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、过敏性皮炎或多发性硬化症。

52.一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1-10和31-39中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。

53.一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求40或41所述的抗体药物缀合物和药学上可接受的载体。

54.一种结合CD40(TNF受体超家族成员5)的抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包括Fc区,其中所述Fc区与野生型Fc区相比缺乏ADCC作用或具有降低的ADCC作用。

55.根据权利要求54所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与FcRn(例如人FcRn)之间的KD小于1×10^{-5}M、小于5×10^{-6}M、小于1×10^{-6}M、小于5×10^{-7}M、小于1×10^{-7}M或小于5×10^{-8}M。

56.根据权利要求54或55所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述Fc区是IgG1或IgG4亚型。

57.根据权利要求54-56中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述Fc区包括YTE突变。

58.根据权利要求54、55和57中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述Fc区包括LALA突变。

59.根据权利要求1-10、31-37和54-58中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中当施用于受试者时,所述抗体或其抗原结合片段的半衰期为至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天或至少18天。

60.根据权利要求59所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述受试者是小鼠。

根据权利要求59或60所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述受试者经遗传修饰以表达人或人源化CD40。

抗CD40抗体及其用途

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求于2022年4月15日提交的PCT申请号PCT/CN2022/087003的权益。前述申请的全部内容以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及抗CD40(TNF受体超家族成员5)抗体及其用途。

背景技术

[0004] 自身免疫性疾病是由对正常身体部分的异常免疫应答引起的病症。至少有80种自身免疫性疾病。自身免疫性疾病的原因通常不是很清楚。一些自身免疫性疾病诸如狼疮具有家族遗传性,而一些其他自身免疫性疾病则可能由感染或其他环境因素引发。一些常见的自身免疫性疾病包括例如乳糜泻、1型糖尿病、格雷夫斯病、炎性肠病、多发性硬化症、银屑病、类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮。

[0005] 最近治疗性抗体在临床和商业上取得的成功引起了人们对使用抗体治疗各种免疫相关疾病的极大兴趣。我们需要开发基于抗体的疗法,用于治疗自身免疫性疾病。

发明内容

[0006] 本公开涉及抗CD40抗体、其抗原结合片段及其用途。

[0007] 在一方面,本公开涉及一种结合CD40(TNF受体超家族成员5)的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区(VH),该VH包括互补决定区(CDR)1、2和3,在一些实施方案中,VH CDR1区包括与选择的VH CDR1氨基酸序列具有至少80%的同一性的氨基酸序列,VH CDR2区包括与选择的VH CDR2氨基酸序列具有至少80%的同一性的氨基酸序列,并且VH CDR3区包括与选择的VH CDR3氨基酸序列具有至少80%的同一性的氨基酸序列;和轻链可变区(VL),该VL包括CDR1、2和3,在一些实施方案中,VL CDR1区包括与选择的VL CDR1氨基酸序列具有至少80%的同一性的氨基酸序列,VL CDR2区包括与选择的VL CDR2氨基酸序列具有至少80%的同一性的氨基酸序列,并且VL CDR3区包括与选择的VL CDR3氨基酸序列具有至少80%的同一性的氨基酸序列,在一些实施方案中,所选的VH CDR1、2和3氨基酸序列以及所选的VL CDR1、2和3氨基酸序列是以下项中的一者:

[0008] (1)所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:1、2、3所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:4、5、6所示;

[0009] (2)所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:7、8、9所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:10、11、12所示;

[0010] (3)所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:13、14、15所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:16、17、18所示;

[0011] (4)所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:19、20、21所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:22、23、24所示;

[0012] (5)所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:25、26、27所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:28、29、30所示;和

[0013] (6)所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:31、32、33所示,并且所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列分别如SEQ ID NO:34、35、36所示。

[0014] 在一些实施方案中,VH包括分别具有如SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且VL包括分别具有如SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。在一些实施方案中,VH包括分别具有如SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且VL包括分别具有如SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。在一些实施方案中,VH包括分别具有如SEQ ID NO:13、14和15所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且VL包括分别具有如SEQ ID NO:16、17和18所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。在一些实施方案中,VH包括分别具有如SEQ ID NO:19、20和21所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且VL包括分别具有如SEQ ID NO:22、23和24所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。在一些实施方案中,VH包括分别具有如SEQ ID NO:25、26和27所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且VL包括分别具有如SEQ ID NO:28、29和30所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。在一些实施方案中,VH包括分别具有如SEQ ID NO:31、32和33所示的氨基酸序列的CDR1、2、3,并且VL包括分别具有如SEQ ID NO:34、35和36所示的氨基酸序列的CDR1、2、3。

[0015] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段特异性结合人、猴或狗CD40。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是人抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是单链可变片段(scFV)或多特异性抗体(例如双特异性抗体)。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是人IgG1抗体或其抗原结合片段(任选具有YTE和/或LALA突变)或人IgG4抗体或其抗原结合片段(任选具有YTE)。

[0016] 在一方面,本公开涉及一种包括编码多肽的多核苷酸的核酸,该多肽包括:

[0017] (1)免疫球蛋白重链或其片段,该免疫球蛋白重链或其片段包括重链可变区(VH),该VH包括互补决定区(CDR)1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:1、2

[0018] 和3所示的氨基酸序列,并且在一些实施方案中,当与包括如SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时,该VH结合CD40;

[0019] (2)免疫球蛋白轻链或其片段,该免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,该VL包括互补决定区(CDR)1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列,并且在一些实施方案中,当与包括如SEQ ID NO:65所示的氨基酸序列的VH配对时,该VL结合CD40;

[0020] (3)免疫球蛋白重链或其片段,该免疫球蛋白重链或其片段包括重链可变区(VH),该VH包括互补决定区(CDR)1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:7、8

[0021] 和9所示的氨基酸序列,并且在一些实施方案中,当与包括如SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时,该VH结合CD40;

[0022] (4)免疫球蛋白轻链或其片段,该免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,该VL包括互补决定区(CDR)1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列,并且在一些实施方案中,当与包括如SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列的VH配对时,该VL结合CD40;

[0023] (5)免疫球蛋白重链或其片段,该免疫球蛋白重链或其片段包括VH,该VH包括互补决定区(CDR)1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:13、14和15所示的氨基酸序列,并且在一些实施方案中,当与包括如SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时,

该VH结合CD40;或

[0024] (6)免疫球蛋白轻链或其片段,该免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,该VL包括CDR1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:16、17和18所示的氨基酸序列,并且在一些实施方案中,当与包括如SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列的VH配对时,该VL结合CD40。

[0025] 在一些实施方案中,核酸包括编码多肽的多核苷酸,该多肽包括免疫球蛋白重链或其片段,该免疫球蛋白重链或其片段包括VH,该VH包括CDR1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,核酸包括编码多肽的多核苷酸,该多肽包括免疫球蛋白轻链或其片段,该免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,该VL包括CDR1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,核酸包括编码多肽的多核苷酸,该多肽包括免疫球蛋白重链或其片段,该免疫球蛋白重链或其片段包括VH,该VH包括CDR1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,核酸包括编码多肽的多核苷酸,该多肽包括免疫球蛋白轻链或其片段,该免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,该VL包括CDR1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,核酸包括编码多肽的多核苷酸,该多肽包括免疫球蛋白重链或其片段,该免疫球蛋白重链或其片段包括VH,该VH包括CDR1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:13、14和15所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,核酸包括编码多肽的多核苷酸,该多肽包括免疫球蛋白轻链或其片段,该免疫球蛋白轻链或其片段包括VL,该VL包括CDR1、2、3,CDR1、2、3分别包括如SEQ ID NO:16、17和18所示的氨基酸序列。

[0026] 在一些实施方案中,当与VL配对时,VH特异性结合人、猴或狗CD40,或当与VH配对时,VL特异性结合人、猴或狗CD40。在一些实施方案中,免疫球蛋白重链或其片段是人免疫球蛋白重链或其片段(例如,人IgG1重链或其片段,任选地具有YTE和/或LALA突变;或人IgG4重链或其片段,任选地具有YTE),并且免疫球蛋白轻链或其片段是人免疫球蛋白轻链或其片段。在一些实施方案中,核酸编码单链可变片段(scFv)或多特异性抗体(例如双特异性抗体)。在一些实施方案中,核酸是cDNA。

[0027] 在一方面,本公开涉及一种载体,该载体包括如本文所述的核酸中的一者或多者。在一方面,本公开涉及一种载体,该载体包括如本文所述的核酸中的两者,在一些实施方案中,该载体编码共同结合CD40的VL区和VH区。在一方面,本公开涉及一对载体,在一些实施方案中,每个载体包括如本文所述的核酸中的一者,在一些实施方案中,该对载体共同编码共同结合CD40的VL区和VH区。

[0028] 在一方面,本公开涉及一种细胞,该细胞包括如本文所述的载体或载体对。在一些实施方案中,细胞是CHO细胞。在一方面,本公开涉及一种细胞,该细胞包括如本文所述的核酸中的一者或多者。在一方面,本公开涉及一种细胞,该细胞包括如本文所述的核酸中的两者。在一些实施方案中,该两种核酸共同编码共同结合CD40的VL区和VH区。

[0029] 在一方面,本公开涉及一种产生抗体或其抗原结合片段的方法,该方法包括:(a)在足以使如本文所述的细胞产生该抗体或抗原结合片段的条件下培养该细胞;以及(b)收集由该细胞产生的该抗体或抗原结合片段。

[0030] 在一方面,本公开涉及一种结合CD40的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区(VH),该VH包括与选择的VH序列具有至少90%的同一性的氨基

酸序列,和轻链可变区(VL),该VL包括与选择的VL序列具有至少90%的同一性的氨基酸序列,在一些实施方案中,所选的VH序列和所选的VL序列是以下项中的一者:(1)所选的VH序列是SEQ ID NO:65,并且所选的VL序列是SEQ ID NO:37;(2)所选的VH序列是SEQ ID NO:38,并且所选的VL序列是SEQ ID NO:39;并且(3)所选的VH序列是SEQ ID NO:40,并且所选的VL序列是SEQ ID NO:41。

[0031] 在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:65的序列,并且VL包括SEQ ID NO:37的序列。在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:38的序列,并且VL包括SEQ ID NO:39的序列。在一些实施方案中,VH包括SEQ ID NO:40的序列,并且VL包括SEQ ID NO:41的序列。

[0032] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段特异性结合人、猴或狗CD40。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是人抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是单链可变片段(scFV)或多特异性抗体(例如双特异性抗体)。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段是人IgG1抗体或其抗原结合片段(任选具有YTE和/或LALA突变)或人IgG4抗体或其抗原结合片段(任选具有YTE)。

[0033] 在一方面,本公开涉及一种抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包括如本文所述的抗体或其抗原结合片段的VH CDR1、2、3和VL CDR1、2、3。

[0034] 在一方面,本公开涉及一种与如本文所述的抗体或其抗原结合片段交叉竞争的抗体或其抗原结合片段。

[0035] 在一方面,本公开涉及一种抗体药物缀合物,该抗体药物缀合物包含与治疗剂共价结合的如本文所述的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,治疗剂是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。

[0036] 在一方面,本公开涉及一种治疗患有癌症的受试者的方法,该方法包括:向受试者施用治疗有效量的组合物,该组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段或如本文所述的抗体药物缀合物。在一些实施方案中,受试者患有实体瘤。在一些实施方案中,癌症是黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤或恶性血液肿瘤。在一些实施方案中,癌症是非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤或慢性淋巴细胞性白血病。

[0037] 在一方面,本公开涉及一种降低肿瘤生长速率的方法,该方法包括使肿瘤细胞与有效量的组合物接触,该组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段或如本文所述的抗体药物缀合物。在一方面,本公开涉及一种杀死肿瘤细胞的方法,该方法包括使该肿瘤细胞与有效量的组合物接触,该组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段或如本文所述的抗体药物缀合物。在一方面,本公开涉及一种抑制受试者中的免疫应答的方法,该方法包括:向受试者施用有效量的组合物,该组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段或如本文所述的抗体药物缀合物。在一些实施方案中,受试者患有自身免疫性疾病。

[0038] 在一方面,本公开涉及一种治疗自身免疫性疾病的方法,该方法包括向受试者施用有效量的组合物,该组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段或如本文所述的抗体药物缀合物。在一些实施方案中,该自身免疫性疾病是类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、狼疮性肾炎、过敏性皮炎或多发性硬化症。

[0039] 在一方面,本公开涉及一种药物组合物,该药物组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载体。在一方面,本公开涉及一种药物组合物,该药物组合物包含如本文所述的抗体药物缀合物,和药学上可接受的载体。

[0040] 在一方面,本公开涉及一种结合CD40的抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段包括Fc区,在一些实施方案中,该Fc区与野生型Fc区相比缺乏ADCC作用或具有降低的ADCC作用。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段与FcRn(例如人FcRn)之间的KD小于1×10^{-5}M、小于5×10^{-6}M、小于1×10^{-6}M、小于5×10^{-7}M、小于1×10^{-7}M或小于5×10^{-8}M。在一些实施方案中,该Fc区为IgG1或IgG4亚型。在一些实施方案中,该Fc区包括YTE突变。在一些实施方案中,该Fc区包括LALA突变。在一些实施方案中,当施用给受试者时,如本文所述的抗体或其抗原结合片段的半衰期为至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天或至少18天。在一些实施方案中,该受试者是小鼠。在一些实施方案中,该受试者经遗传修饰以表达人或人源化CD40。

[0041] 如本文所用,术语“癌症”是指具有自主生长能力的细胞。此类细胞的示例包括具有以快速增殖细胞生长为特征的异常状态或状况的细胞。该术语意在包括癌生长(例如肿瘤)、致癌过程、转移性组织和恶性转化的细胞、组织或器官,无论其组织病理学类型或侵袭阶段如何。还包括各种器官系统的恶性肿瘤,诸如呼吸系统、心血管系统、肾系统、生殖系统、血液系统、神经系统、肝系统、胃肠系统和内分泌系统;以及腺癌,其包括恶性肿瘤,诸如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、非小细胞肺癌和小肠癌。“天然发生的”癌症包括任何不是通过将癌细胞植入受试者而实验诱导的癌症,并且包括例如自发发生的癌症、由患者暴露于致癌物引起的癌症、由插入转基因致癌基因或敲除肿瘤抑制基因引起的癌症以及由感染(例如病毒感染)引起的癌症。术语“癌”是本领域公认的,并且是指上皮或内分泌组织的恶性肿瘤。该术语还包括癌肉瘤,其包括由癌和肉瘤组织构成的恶性肿瘤。“腺癌”是指来源于腺组织或其中肿瘤细胞形成可识别的腺体结构的癌。术语“肉瘤”是本领域公认的,并且是指间充质衍生的恶性肿瘤。术语“造血肿瘤疾病”包括涉及造血来源的增生/肿瘤细胞的疾病。造血肿瘤疾病可由骨髓细胞、淋巴细胞或红系细胞或它们的前体细胞引起。

[0042] 如本文所用,术语“抗体”是指含有至少一个(例如,一个、两个、三个、四个、五个或六个)互补决定区(CDR)(例如,来自免疫球蛋白轻链的三个CDR中的任一者或来自免疫球蛋白重链的三个CDR中的任一者),并且能够特异性结合表位的任何抗原结合分子。抗体的非限制性示例包括:单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、单链抗体、嵌合抗体、人抗体和人源化抗体。在一些实施方案中,抗体可含有人抗体的Fc区。术语抗体还包括衍生物,例如双特异性抗体、单链抗体、双抗体、线性抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0043] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指全长抗体的一部分,其中该抗体的该部分能够与抗原特异性结合。在一些实施方案中,抗原结合片段含有至少一个可变结构域(例如,重链可变结构域或轻链可变结构域)。抗体片段的非限制性示例包括例如Fab、Fab’、$F(ab')_2$和Fv片段。

[0044] 如本文所用,术语“人抗体”是指由存在于人中的内源性核酸(例如,重排的人免疫球蛋白重链或轻链基因座)编码的抗体。在一些实施方案中,人抗体从人中收集或在人细胞培养物(例如,人杂交瘤细胞)中产生。在一些实施方案中,人抗体在非人细胞(例如,小鼠或仓鼠细胞系)中产生。在一些实施方案中,人抗体在细菌或酵母细胞中产生。在一些实施方

案中,人抗体在含有未经重排或重排的人免疫球蛋白基因座(例如,重链或轻链人免疫球蛋白基因座)的转基因非人动物(例如,牛)中产生。

[0045] 如本文所用,术语“嵌合抗体”是指含有存在于至少两个不同抗体中的序列的抗体(例如,来自两个不同哺乳动物物种的抗体,诸如人和小鼠抗体)。嵌合抗体的非限制性示例是含有非人(例如,小鼠)抗体的可变结构域序列(例如,轻链和/或重链可变结构域序列的全部或部分)和人抗体的恒定结构域的抗体。本文描述了嵌合抗体的其他示例,且这些示例是本领域已知的。

[0046] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指非人抗体,其含有最少的来源于非人(例如,小鼠)免疫球蛋白的序列,并含有来源于人免疫球蛋白的序列。在非限制性示例中,人源化抗体是人抗体(受体抗体),其中该受体抗体的高变区(例如,CDR)残基被具有期望的特异性、亲和力和能力的来自非人抗体(例如,供体抗体),例如小鼠、大鼠或兔抗体的高变区(例如,CDR)残基替换。在一些实施方案中,人免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人(例如,小鼠)免疫球蛋白残基替换。在一些实施方案中,人源化抗体可含有在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。可进行这些修饰以进一步改进抗体性能。在一些实施方案中,人源化抗体包含至少一个、并且通常两个可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部的高变环(CDR)对应于非人(例如,小鼠)免疫球蛋白的高变环,并且全部或基本上全部的框架区是人免疫球蛋白的框架区。人源化抗体还可包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。人源化抗体可使用本领域已知的分子生物学方法来产生。本文描述了用于产生人源化抗体的方法的非限制性示例。

[0047] 如本文所用,术语“单链抗体”是指含有至少两个能够与抗原特异性结合的免疫球蛋白可变结构域(例如,哺乳动物免疫球蛋白重链或轻链的可变结构域)的单个多肽。本文描述了单链抗体的非限制性示例。

[0048] 如本文所用,术语“多聚体抗体”是指含有四个或更多个(例如六个、八个或十个)免疫球蛋白可变结构域的抗体。在一些实施方案中,多聚体抗体能够将哺乳动物细胞(例如人T细胞)表面上的一个靶分子(例如CD40)交联到至少一个第二靶分子(例如CTLA-4)。

[0049] 如本文所用,术语“受试者”和“患者”在整个说明书中可互换使用,并且描述了根据本发明的方法为其提供治疗的动物(人或非人)。本发明考虑了兽医和非兽医应用。人患者可以是成人或青少年(例如,18岁以下的人)。除了人之外,患者包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、雪貂、猫、狗和灵长类动物。包括例如非人灵长类动物(例如,猴、黑猩猩、大猩猩等)、啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、沙鼠、仓鼠、雪貂、兔)、兔类动物、猪(例如,猪、小型猪)、马、犬、猫、牛和其他家养动物、农场动物和动物园动物。

[0050] 如本文所用,当提及抗体时,短语“特异性结合”是指相比于其他分子,抗体优选地与其靶分子(例如CD40)相互作用,因为相互作用取决于靶分子上特定结构(即,抗原决定簇或表位)的存在;换句话说,试剂识别并结合包括特定结构的分子,而非通常情况下的所有分子。与靶分子特异性结合的抗体可被称为靶特异性抗体。例如,特异性结合CD40分子的抗体可被称为CD40特异性抗体或抗CD40抗体。

[0051] 如本文所用,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,是指至少两个氨基酸的任何长度的氨基酸聚合物。

[0052] 如本文所用,术语“多核苷酸”、“核酸分子”和“核酸序列”在本文中可互换使用,是

指至少两个核苷酸的任何长度的核苷酸聚合物,并且包括但不限于DNA、RNA、DNA/RNA杂合体及其修饰。

[0053] 除非另有说明,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。本文描述了用于本发明的方法和材料;也可使用本领域已知的其他合适的方法和材料。材料、方法和实施例仅是说明性的,并非旨在进行限制。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献全文均以引用方式并入本文。在有冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0054] 从下文的具体实施方式和附图以及权利要求中可以清楚地了解本发明的其他特征和优点。

附图说明

[0055] 图1示出了分析抗CD40抗体对hCD40小鼠中免疫应答的作用的实验方案。在第0天和第4天施用抗CD40抗体。在第1天施用OVA和CFA。在第10天和第17天通过ELISA测定抗OVA抗体水平。

[0056] 图2示出了通过ELISA测定的第10天的抗OVA抗体水平。对hCD40小鼠施用PBS(G1)、布来鲁单抗类似物(G2)、12B5-IgG4-FLAA(G3)、16D5-IgG4-FLAA(G4)、2F8-IgG4-FLAA(G5)、6A4-IgG4-FLAA(G6)或15B4-IgG4-FLAA(G7)。

[0057] 图3示出了通过ELISA测定的第17天的抗OVA抗体水平。

[0058] 图4示出了布来鲁单抗类似物(G1)、12B5-IgG4-FLAA(G2)、6A4-IgG4-FLAA(G3)和2F8-IgG4-FLAA(G4)在hCD40小鼠血清中的浓度随时间的变化,以及布来鲁单抗类似物(G5)、12B5-IgG4-FLAA(G6)、6A4-IgG4-FLAA(G7)和2F8-IgG4-FLAA(G8)在C57BL/6小鼠血清中的浓度随时间的变化。

[0059] 图5示出了12B5-IgG1-LALA-YTE(G1)、12B5-IgG1-N297A-YTE(G2)、12B5-IgG4-YTE(G3)和12B5-IgG4-FLAA(G4)在hFcRn小鼠血清中的浓度随时间的变化。

[0060] 图6示出了通过ELISA测定的第10天的抗OVA抗体水平。对hCD40/hFcRn小鼠施用PBS(G1)、布来鲁单抗类似物(G2-G4)、12B5-IgG1-LALA-YTE(G5-G7)或2F8-IgG1-LALA-YTE(G8-G10)。在第0天施用抗CD40抗体。在第1天施用OVA和CFA。

[0061] 图7示出了通过ELISA测定的第17天的抗OVA抗体水平。

[0062] 图8示出了通过ELISA测定的第21天的抗OVA抗体水平。

[0063] 图9列出了通过Kabat编号定义的抗CD40抗体(2F8、6A4和12B5)的CDR序列以及它们相关抗CD40抗体的CDR序列。

[0064] 图10列出了通过Chothia编号定义的抗CD40抗体(2F8、6A4和12B5)的CDR序列以及它们相关抗CD40抗体的CDR序列。

[0065] 图11列出了抗CD40抗体(2F8、6A4和12B5)的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0066] 图12示出了12B5-IgG1-LALA-YTE、12B5-IgG1、利妥昔单抗类似物和人IgG1的细胞毒性数据。

[0067] 图13示出了12B5-IgG1-LALA-YTE、利妥昔单抗类似物和人IgG1的细胞毒性数据。

[0068] 图14示出了12B5-IgG1-LALA-YTE和人IgG1对PBMC增殖的抑制作用。

[0069] 图15A示出了12B5-IgG1-LALA-YTE对B细胞增殖的抑制作用。

[0070] 图15B示出了hIgG1对B细胞增殖的抑制作用。

[0071] 图16示出了hCD40/hFcRn小鼠的体重,该小鼠注射MOG以诱导EAE模型,然后用hIgG1(G2)或抗hCD40抗体2F8-IgG1-LALA-YTE(G3)治疗。注射PBS的hCD40/hFcRn小鼠用作对照(G1)。

[0072] 图17示出了hCD40/hFcRn小鼠的临床评分,该小鼠注射MOG以诱导EAE模型,然后用hIgG1(G2)或抗hCD40抗体2F8-IgG1-LALA-YTE(G3)治疗。注射PBS的hCD40/hFcRn小鼠用作对照(G1)。

[0073] 图18示出了hCD40/hFcRn小鼠的脊髓H&E(苏木精和伊红)染色图像,该小鼠注射MOG以诱导EAE模型,然后用hIgG1(G2)或抗hCD40抗体2F8-IgG1-LALA-YTE(G3)治疗。注射PBS的hCD40/hFcRn小鼠用作对照(G1)。检查图像中的炎性细胞浸润。

[0074] 图19示出了来自hCD40/hFcRn小鼠的脊髓的LFB(劳克坚牢蓝(Luxol Fast Blue))染色图像,该小鼠注射MOG以诱导EAE模型,然后用hIgG1(G2)或抗hCD40抗体2F8-IgG1-LALA-YTE(G3)治疗。注射PBS的hCD40/hFcRn小鼠用作对照(G1)。检查图像中的脊髓脱髓鞘。

[0075] 图20示出了hCD40小鼠的体重,该小鼠注射CII乳液以诱导CIA模型,然后用PBS(G2)或抗hCD40抗体12B5-IgG1-LALA-YTE(G3)治疗。仅注射PBS的hCD40小鼠用作对照(G1)。

[0076] 图21示出了hCD40小鼠的临床评分,该小鼠注射CII乳液以诱导CIA模型,然后用PBS(G2)或抗hCD40抗体12B5-IgG1-LALA-YTE(G3)治疗。仅注射PBS的hCD40小鼠用作对照(G1)。

[0077] 图22示出了hCD40小鼠的发病率,该小鼠注射CII乳液以诱导CIA模型,然后用PBS(G2)或抗hCD40抗体12B5-IgG1-LALA-YTE(G3)治疗。仅注射PBS的hCD40小鼠用作对照(G1)。

[0078] 图23示出了从hCD40小鼠四肢收集的关节组织的H&E染色图像,该小鼠注射CII乳液以诱导CIA模型,然后用PBS(G2)或抗hCD40抗体12B5-IgG1-LALA-YTE(G3)治疗。仅注射PBS的hCD40小鼠用作对照(G1)。(a)代表炎性细胞浸润,(b)代表滑膜增生,以及(c)代表血管翳。

[0079] 图24列出了本公开中讨论的氨基酸序列。

具体实施方式

[0080] 本公开提供了结合CD40(TNF受体超家族成员5)的抗体、其抗原结合片段的实施例。

[0081] CD40和免疫系统

[0082] 免疫系统可区分体内的正常细胞和被认为是“外来的”细胞,这使得免疫系统攻击外来细胞,而不影响正常细胞。这种机制有时涉及被称为免疫检查点的蛋白质。免疫检查点是免疫系统中开启信号(共刺激分子)或者关闭信号的分子。

[0083] 检查点抑制剂可防止免疫系统攻击正常组织,从而预防自身免疫性疾病。许多肿瘤细胞也表达检查点抑制剂。这些肿瘤细胞通过“拉拢”(co-opt)某些免疫检查点途径(特别是在对肿瘤抗原特异性的T细胞中)逃避免疫监视(Creelan,Benjamin C.“Update on immune checkpoint inhibitors in lung cancer”,Cancer Control 21.1(2014年):第80-89页)。因为许多免疫检查点是由配体-受体相互作用启动的,所以它们很容易被针对配

体和/或其受体的抗体阻断。

[0084] CD40(也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员5或TNFRSF5)是在抗原呈递细胞(APC)诸如树突细胞(DC)、巨噬细胞、B细胞和单核细胞以及许多非免疫细胞和广泛的肿瘤上表达的肿瘤坏死因子受体超家族成员。在激活的T辅助细胞上与其三聚体配体CD154(也被称为CD40配体或CD40L)的相互作用导致APC激活,从而诱导适应性免疫。

[0085] 从生理学上讲,通过CD40在APC上的信号传导被认为代表T细胞辅助的主要组成部分,并且在很大程度上介导辅助T细胞授权(license)APC的能力。例如,CD40在DC上的连接诱导共刺激分子和MHC分子的表面表达增加,促炎细胞因子的产生和T细胞触发增强。CD40在静息B细胞上的连接增加了抗原呈递功能和增殖。

[0086] 在临床前模型中,大鼠抗小鼠CD40 mAb在治疗CD40+B细胞淋巴瘤中显示出显著的治疗活性(80%-100%的小鼠治愈并以CD8 T细胞依赖的方式免疫再攻击),并且对各种CD40阴性肿瘤也有效。这些mAb能够清除患有近终末期疾病的小鼠的大块肿瘤。CD40mAb已在临床试验中进行了研究,并用于治疗黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤、血液恶性肿瘤,尤其是非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病和晚期实体瘤。

[0087] 治疗性抗CD40抗体显示从强激动到拮抗的各种活性。目前,对于这种异质性还没有令人满意的解释。激动性CD40 mAb的主要机理是激活宿主APC,以在患者中诱导具有临床意义的抗肿瘤T细胞应答。这些应答包括不依赖T细胞但依赖巨噬细胞的肿瘤消退引发。CD40激活的巨噬细胞可具有肿瘤杀伤作用(至少在胰腺癌中),还可能促进肿瘤间质耗竭,从而诱导体内肿瘤萎缩。重要的是,这些机制不需要肿瘤表达CD40,因此有理由在许多临床试验中纳入多种肿瘤患者。就这些旨在激活DC、巨噬细胞或两者的策略而言,CD40 mAb的目标不一定是杀死与其结合的细胞,例如经由补体介导的细胞毒性(CMC)或抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC)。因此,通过设计,强激动性抗体不介导CMC或ADCC。

[0088] 相比之下,其他人CD40 mAb可介导针对CD40+肿瘤的CMC和ADCC,这些肿瘤诸如几乎所有B细胞恶性肿瘤、一部分黑色素瘤和某些癌。最后,有一些证据表明结合肿瘤细胞上的CD40促进可促进肿瘤细胞凋亡,并且这可以在不涉及任何免疫效应途径的情况下完成。这已被证明适用于CD40+B细胞恶性肿瘤和某些实体瘤,诸如CD40+癌和黑色素瘤。

[0089] 由于CD40在产生有效免疫应答中的核心作用,CD40在自身免疫性疾病的发病机理中也起重要作用。CD40以几种方式导致T细胞依赖性自身免疫性疾病。首先,CD40信号传导可在胸腺的T细胞选择水平上起作用。髓质胸腺上皮细胞(mTEC)通过表达外周组织限制性抗原来介导潜在的自身反应性T细胞的负向选择。虽然TNFR家族成员RANK在胚胎mTEC发育中至关重要,但CD40与RANK在促进出生后mTEC发育方面协同作用,从而促进自身耐受。mTEC中CD40-CD154相互作用的破坏可潜在地导致中枢耐受的失效。其次,CD40信号传导导致促炎细胞因子诸如IL-6的产生,其可影响T细胞分化为Th17细胞。CD40在抗原呈递细胞(APC)激活后也上调。无论是组成型还是诱导型的CD40水平的增加,均可导致CD40-CD154相互作用强度的增加。另一种机制可以是CD40在通常检测不到的组织中异常表达。已经假设,MHC II类分子在内分泌组织上的异常表达可导致引发自身免疫性疾病。在此类组织上异常的CD40表达也被认为是引发格雷夫斯病自身免疫的作用因素,以及导致胰岛细胞移植失效的炎性细胞因子产生的作用因素。最后,携带CD40的CD4+T细胞在人和小鼠的1型糖尿病中起作用。因此,CD40是一种有吸引力的候选受体,它能引发各种自身免疫过程,其中B细胞和T

细胞的活化在发病机理中起作用。

[0090] CD40及其功能的详细描述可参见例如,Vonderheide等人,“Agonistic CD40antibodies and cancer therapy”,(2013年):第1035-1043页;Beatty等人,“CD40agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans”,Science 331.6024(2011年):第1612-1616页;Vonderheide等人,“Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893,a novel CD40 agonist monoclonal antibody”,Journal of Clinical Oncology 25.7(2007年):第876-883页;Peters等人,“CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator.”,Seminars in immunology.,第21卷,第5期,Academic Press,2009;这些文献中的每一篇全文均以引用方式并入本文。

[0091] 本公开提供了几种抗CD40抗体、其抗原结合片段,以及使用这些抗CD40抗体和抗原结合片段抑制肿瘤生长和治疗癌症的方法。

[0092] 抗体和抗原结合片段

[0093] 本公开提供了抗CD40抗体及其抗原结合片段。通常,抗体(也被称为免疫球蛋白)由两类多肽链组成,即轻链和重链。本公开的非限制性抗体可以是完整的、包括两条重链和两条轻链的四免疫球蛋白链抗体。抗体的重链可以是任何同种型(包括IgM、IgG、IgE、IgA或IgD)或亚同种型(包括IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4、IgE1、IgE2等)。轻链可以是κ轻链或λ轻链。抗体可包括两个相同拷贝的轻链和两个相同拷贝的重链。各自含有一个可变结构域(或可变区,V_H)和多个恒定结构域(或恒定区)的重链通过其恒定结构域内的二硫键彼此结合以形成抗体的“主干”。各自含有一个可变结构域(或可变区,V_L)和一个恒定结构域(或恒定区)的轻链分别通过二硫键结合一条重链。每条轻链的可变区与其所结合的重链的可变区对准。轻链和重链的可变区均含有三个高变区,它们夹在更保守的框架区(FR)之间。

[0094] 这些高变区(称为互补决定区(CDR))形成包括抗体的主要抗原结合表面的环。四个框架区大部分采用beta-折叠构象,而CDR则形成环,这些环连接beta-折叠结构并且在某些情况下形成beta-折叠结构的一部分。每条链中的CDR通过框架区紧密地保持在一起,并且与来自另一条链的CDR一起促成抗原结合区的形成。

[0095] 通过分析抗体的氨基酸序列来鉴定该抗体的CDR区的方法是众所周知的,并且通常使用CDR的许多定义。Kabat定义是基于序列变异性,Chothia定义是基于结构环区的位置。这些方法和定义描述于例如Martin,“Protein sequence and structure analysis of antibody variabledomains”,Antibody engineering,Springer Berlin Heidelberg,2001年,第422-439页;Abhinandan等人,“Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variabledomains,”,Molecular immunology 45.14(2008年):第3832-3839页;Wu,T.T.和Kabat,E.A.,(1970年)J.Exp.Med.,第132卷:第211-250页;Martin等人,Methods Enzymol.,第203卷:第121-153页(1991年);Morea等人,Biophys Chem.,第68卷第1-3期:第9-16页(1997年10月);Morea等人,J Mol Biol.,第275卷第2期:第269-294页(1998年1月);Chothia等人,Nature,第342卷第6252期:第877-883页(1989年12月);Ponomarenko和Bourne,BMC Structural Biology,第7卷第64期(2007年),这些文献中的每一篇全文均以引用方式并入本文。除非在本公开中特别指出,否则在本公开中使用Kabat编号作为默认编号。

[0096] CDR对于识别抗原的表位非常重要。如本文所用,“表位”是靶分子的能够被抗体的抗原结合结构域特异性结合的最小部分。表位的最小尺寸可以是约三个、四个、五个、六个或七个氨基酸,但这些氨基酸不必在抗原一级结构的连续线性序列中,因为表位可以取决于基于抗原二级和三级结构的抗原三维构型。

[0097] 在一些实施方案中,抗体是完整的免疫球蛋白分子(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgD、IgE、IgA)。IgG亚类(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)是高度保守的,但其恒定区有所不同,特别是铰链和上部CH2结构域不同。IgG亚类的序列和差异是本领域已知的,并且描述于例如Vidarsson等人,“IgG subclasses and allotypes:from structure to effector functions.”,Frontiers in immunology 5(2014年);Irani等人,“Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases.”,Molecular immunology 67.2(2015年):第171-182页;Shakib,Farouk编辑,“The human IgG subclasses:molecular analysis of structure,function and regulation.”,Elsevier,2016,这些文献中的每一篇全文均以引用方式并入本文。

[0098] 抗体还可以是来源于任何物种(例如人、啮齿动物、小鼠、骆驼科动物)的免疫球蛋白分子。本文公开的抗体还包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体和包括与另一多肽融合的免疫球蛋白结合结构域的嵌合抗体。术语“抗原结合结构域”或“抗原结合片段”是抗体的保留完整抗体的特异性结合活性的一部分,即,抗体的能够特异性结合完整抗体的靶分子上的表位的任何部分。其包括例如Fab、Fab’、$F(ab')_2$和这些片段的变体。因此,在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段可以是例如scFv、Fv、Fd、dAb、双特异性抗体、双特异性scFv、双抗体、线性抗体、单链抗体分子、由抗体片段形成的多特异性抗体和包括为抗体结合结构域或与其同源的结合结构域的任何多肽。抗原结合结构域的非限制性示例包括例如完整抗体的重链和/或轻链CDR、完整抗体的重链和/或轻链可变区、完整抗体的全长重链或轻链、或来自完整抗体重链或轻链的单个CDR。

[0099] 在一些实施方案中,抗原结合片段可形成嵌合抗原受体(CAR)的一部分。在一些实施方案中,嵌合抗原受体是如本文所述的单链可变片段(scFv)与CD3-ζ跨膜结构域和胞内结构域融合的融合物。在一些实施方案中,嵌合抗原受体还包括来自各种共刺激蛋白受体(例如,CD28、41BB、ICOS)的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括多个信号传导结构域,例如CD3z-CD28-41BB或CD3z-CD28-OX40,以增加效力。因此,在一方面,本公开还提供了表达如本文所述的嵌合抗原受体的细胞(例如,T细胞)。

[0100] 在一些实施方案中,scFV具有一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域。在一些实施方案中,scFV具有两个重链可变结构域和两个轻链可变结构域。

[0101] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段的序列(例如CDR或VH/VL序列)可用于产生靶向CD40和附加抗原(例如TNFRSF9(4-1BB)、MSLN、FAP、ALB、CTLA4、HER2、GPC3、MYC、EPCAM、TNFRSF14(LIGHTR)或ITGAX(CD11c))的双特异性抗体。

[0102] 抗CD40抗体和抗原结合片段

[0103] 本公开提供了特异性结合CD40(例如人CD40)的抗体及其抗原结合片段。本文所述的抗体和抗原结合片段能够结合CD40。这些抗体可以是激动剂或拮抗剂。在一些实施方案中,这些抗体可促进CD40信号传导途径,从而增加免疫应答。在一些实施方案中,抗体可阻

断CD40信号传导途径,从而降低免疫应答。在一些实施方案中,这些抗体可引发补体依赖性细胞毒性(CMC)或抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0104] 本公开提供了例如小鼠抗CD40抗体2F8、6A4、12B5、它们的嵌合抗体,以及它们的人或人源化抗体。

[0105] 2F8和2F8衍生抗体(例如,人或人源化抗体)的CDR序列包括如Kabat编号所定义的重链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:1-3)和轻链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:4-6)。CDR也可由Chothia系统定义。根据Chothia编号,重链可变结构域的CDR序列如SEQ ID NO:19-21所示,轻链可变结构域的CDR序列如SEQ ID NO:22-24所示。

[0106] 类似地,6A4和6A4衍生抗体的CDR序列包括如Kabat编号所定义的重链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:7-9)和轻链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:10-12)。根据Chothia编号,重链可变结构域的CDR序列如SEQ ID NO:25-27所示,并且轻链可变结构域的CDR如SEQ ID NO:28-30所示。

[0107] 12B5和12B5衍生抗体的CDR序列包括如Kabat编号所定义的重链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:13-15)和轻链可变结构域的CDR(SEQ ID NO:16-18)。根据Chothia编号,重链可变结构域的CDR序列如SEQ ID NO:31-33所示,并且轻链可变结构域的CDR如SEQ ID NO:34-36所示。

[0108] 2F8抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:65所示。2F8抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:37所示。

[0109] 6A4抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:38所示。6A4抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:39所示。

[0110] 12B5抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:40所示。12B5抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:41所示。

[0111] 还提供了修饰抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。在一些实施方案中,重链可变区与SEQ ID NO:65、38或40具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。在一些实施方案中,轻链可变区与SEQ ID NO:37、39或41具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。重链可变区序列可与相应的轻链可变区序列配对,并且它们共同结合CD40。

[0112] 人源化百分比意指在国际免疫遗传学信息系统(IMGT)数据库中,重链或轻链可变区序列与人抗体序列相比的同一性百分比。最优比对(top hit)意指重链或轻链可变区序列与特定物种比与其他物种更接近。例如,与人为最优比对意指该序列与人比与其他物种更接近。与人和食蟹猴(Macaca fascicularis)为最优比对意指该序列与人和食蟹猴序列具有相同的同一性百分比,且与其他物种序列相比,这些同一性百分比最高。在一些实施方案中,人源化百分比大于80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或95%。关于如何确定人源化百分比和如何确定最优比对的详细描述是本领域已知的,并且描述于例如Jones等人,“The INNs and outs of antibody nonproprietary names”,MAbs.第8卷,第1期,Taylor&Francis,2016,其全文以引用方式并入本文。高人源化百分比通常具有多种优点,例如,在人体内更安全且更有效,被人受试者耐受的可能性更大,和/或具有副作用的可能性更小。在一些实施方案中,可变区是完全人的,例如,源自人重链免疫球蛋白基因座序列(例如,人IGHV、人IGHD和人IGHJ基因的重组),

和/或人κ链免疫球蛋白基因座序列(例如,人IGKV和人IGKJ基因的重组)。

[0113] 此外,在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段还可含有一个、两个或三个选自以下项的重链可变区CDR:SEQ ID NO:1-3、SEQ ID NO:7-9、SEQ ID NO:13-15、SEQ ID NO:19-21、SEQ ID NO:25-27和SEQ ID NO:31-33;和/或一个、两个或三个选自以下项的轻链可变区CDR:SEQ ID NO:4-6、SEQ ID NO:10-12、SEQ ID NO:16-18、SEQ ID NO:22-24、SEQ ID NO:28-30和SEQ ID NO:34-36。

[0114] 在一些实施方案中,抗体可具有重链可变区(VH),该VH包括互补决定区(CDR)1、2、3,其中该CDR1区包括与选择的VH CDR1氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的氨基酸序列或由其组成,该CDR2区包括与选择的VH CDR2氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的氨基酸序列或由其组成,该CDR3区包括与选择的VH CDR3氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,抗体可具有轻链可变区(VL),该VL包括CDR1、2、3,其中该CDR1区包括与选择的VL CDR1氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的氨基酸序列或由其组成,该CDR2区包括与选择的VL CDR2氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的氨基酸序列或由其组成,该CDR3区包括与选择的VL CDR3氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的氨基酸序列或由其组成。所选的VH CDR1、2、3氨基酸序列和所选的VL CDR1、2、3氨基酸序列示于图9(Kabat CDR)和图10(Chothia CDR)中。

[0115] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的重链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:1的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:2的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:3的CDR。

[0116] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的重链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:7的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:8的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:9的CDR。

[0117] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的重链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:13的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:14的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:15的CDR。

[0118] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的重链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:19的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:20的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:21的CDR。

[0119] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的重链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:25的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:26的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:27的CDR。

[0120] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的重链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的

SEQ ID NO:31的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:32的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:33的CDR。

[0121] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的轻链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:4的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:5的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:6的CDR。

[0122] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的轻链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:10的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:11的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:12的CDR。

[0123] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的轻链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:16的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:17的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:18的CDR。

[0124] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的轻链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:22的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:23的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:24的CDR。

[0125] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的轻链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:28的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:29的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:30的CDR。

[0126] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可包含含有以下CDR中的一个、两个或三个CDR的轻链可变结构域:具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:34的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:35的CDR;具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:36的CDR。

[0127] 插入、缺失和取代可在CDR序列内,也可在CDR序列的一个或两个末端。在一些实施方案中,CDR是基于Kabat编号规则确定的。在一些实施方案中,CDR是基于Chothia编号规则确定的。在一些实施方案中,CDR是基于Kabat和Chothia编号规则的组合确定的。

[0128] 本公开还提供了结合CD40的抗体或其抗原结合片段。该抗体或其抗原结合片段含有:重链可变区(VH),该VH包括与选择的VH序列具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的氨基酸序列或由其组成,和轻链可变区(VL),该VL包括与选择的VL序列具有至少80%、85%、90%或95%的同一性的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,所选的VH序列是SEQ ID NO:65,并且所选的VL序列是SEQ ID NO:37。在一些实施方案中,所选的VH序列是SEQ ID NO:38,并且所选的VL序列是SEQ ID NO:39。在一些实施方案中,所选的VH序列是SEQ ID NO:40,并且所选的VL序列是SEQ ID NO:41。

[0129] 本公开还提供了可与本文所述的抗体竞争的抗体或其抗原结合片段。在一些方面,抗体或抗原结合片段可结合与本文所述的抗体相同的表位。

[0130] 本公开还提供了与如本文所述的任何抗体或抗原结合片段交叉竞争的抗体或其

抗原结合片段。交叉竞争测定法是本领域已知的,并且描述于例如Moore等人,“Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1gp120 exterior envelope glycoprotein.”,Journal of virology,70.3(1996年):第1863-1872页,其全文以引用方式并入本文。在一方面,本公开还提供了与如本文所述的任何抗体或抗原结合片段结合相同表位或区域的抗体或其抗原结合片段。表位分组测定法是本领域已知的,并且描述于例如Estep等人,“High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning.”,MAbs.第5卷第2期,Taylor&Francis,2013,其全文以引用方式并入本文。

[0131] 为了确定两条氨基酸序列或两条核酸序列的同一性百分比,出于最佳比较目的将这些序列进行比对(例如,可为了最佳比对而在第一和第二氨基酸或核酸序列中的一者或两者中引入空位,并且可为了比较目的而忽略非同源序列)。然后比较对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中对应位置处相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,这些分子在该位置处是相同的。考虑到需要被引入以实现两个序列的最佳比对的空位的数量和每个空位的长度,两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数量的函数。例如,序列的比较和两条序列之间的同一性百分比的测定可使用Blossum 62评分矩阵来完成,其中空位罚分为12,空位延伸罚分为4,移码空位罚分为5。

[0132] 本公开还提供了包括编码多肽的多核苷酸的核酸,该多肽包括免疫球蛋白重链或免疫球蛋白轻链。免疫球蛋白重链或免疫球蛋白轻链包括如图9或图10所示的CDR,或具有如图11所示的序列。当多肽与相应的多肽(例如,相应的重链可变区或相应的轻链可变区)配对时,所配对的多肽结合CD40(例如,人CD40)。

[0133] 抗CD40抗体和抗原结合片段也可以是抗体或抗体片段和多特异性(例如,双特异性)抗体或抗体片段的抗体变体(包括衍生物和缀合物)。本文提供的其他抗体是多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性(多聚体,例如,双特异性)抗体、人抗体、嵌合抗体(例如,人-小鼠嵌合体)、单链抗体、细胞内制备的抗体(即,内抗体)及它们的抗原结合片段。抗体或其抗原结合片段可以是任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是IgG抗体或其抗原结合片段。

[0134] 只要抗体片段保留全长抗体的期望的亲和力和特异性,即适用于提供的方法。因此,结合CD40的抗体片段将保留结合CD40的能力。Fv片段是含有完整抗原识别和结合位点的抗体片段。该区域由紧密结合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成,该紧密结合可以是共价性质的,例如scFv。在这种构型中,正是每个可变结构域的三个CDR相互作用限定了VH-VL二聚体表面上的抗原结合位点。总的来说,六个CDR或其子集共同赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使是单个可变结构域(或只包括特异性于某抗原的三个CDR的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,但亲和力通常低于整个结合位点。

[0135] 单链Fv(scFv)抗体片段包含抗体的VH和VL结构域(或区),其中这些结构域存在于单一多肽链中。通常,scFv多肽还包括VH和VL结构域之间的多肽接头,使得scFv形成用于抗原结合的期望结构。

[0136] Fab片段含有轻链的可变结构域和恒定结构域以及重链的可变结构域和第一恒定

结构域(CH1)。F(ab')$_2$抗体片段包含一对Fab片段,这些片段通常通过它们之间的铰链半胱氨酸在它们的羧基末端附近共价连接。抗体片段的其他化学偶联也是本领域已知的。

[0137] 双抗体是具有两个抗原结合位点的小抗体片段,这些片段包含连接在同一多肽链上的VH和VL。通过使用因太短而不允许在同一条链上的两个结构域之间配对的接头,迫使该结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。

[0138] 线性抗体包括一对串联Fd区段(VH-CH1-VH-CH1),其与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0139] 本公开的抗体和抗体片段可以在Fc区中被修饰以提供期望的效应子功能或血清半衰期。

[0140] 抗体的多聚化可通过抗体的天然聚集或通过本领域已知的化学或重组连接技术来实现。例如,一定百分比的纯化抗体制剂(例如,纯化IgG1分子)自发形成含有抗体同二聚体和其他高级抗体多聚体的蛋白质聚集体。

[0141] 另选地,抗体同二聚体可通过本领域已知的化学连接技术形成。例如,异源双功能交联剂包括但不限于SMCC(琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯)和SATA(N-琥珀酰亚胺基S-乙酰硫代乙酸酯)可用于形成抗体多聚体。形成抗体同二聚体的示例性方案描述于Ghetie等人(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,第94卷:第7509-7514页,1997年)。通过胃蛋白酶消化,抗体同二聚体可转化为Fab'$_2$同二聚体。形成抗体同二聚体的另一种方法是通过使用自噬T15肽,该自噬T15肽描述于Zhao等人(J.Immunol.第25卷:第396-404页,2002年)。

[0142] 在一些实施方案中,多特异性抗体是双特异性抗体。双特异性抗体可通过工程化一对抗体分子之间的界面以使从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化来制备。例如,该界面可包含抗体恒定结构域的至少一部分CH3结构域。在该方法中,来自第一抗体分子界面的一条或多条小氨基酸侧链被较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)置换。通过用较小的氨基酸侧链(例如,丙氨酸或苏氨酸)置换大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生与大侧链大小相同或相似的补偿"腔"。这提供了一种可使异二聚体的产率高于其他不需要的终产物(诸如同二聚体)的机制。该方法描述于例如WO 96/27011中,其全文以引用方式并入本文。

[0143] 双特异性抗体包括交联或"异源缀合"抗体。例如,异源缀合物中抗体中的一种抗体可与抗生物素蛋白偶联,另一种抗体可与生物素偶联。也可以使用任何方便的交联方法制备异源缀合抗体。合适的交联剂和交联技术是本领域熟知的,并公开于美国专利号4,676,980中,其全文以引用方式并入本文。

[0144] 从抗体片段产生双特异性抗体的方法也是本领域已知的。例如,双特异性抗体可使用化学连接制备。Brennan等人(Science,第229卷:第81页,1985年)描述了一种方法,其中将完整抗体通过蛋白水解切割产生F(ab')$_2$片段。这些片段在二硫醇络合剂亚砷酸钠存在的情况下被还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫化物形成。然后将产生的Fab'片段转化成硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原将Fab'TNB衍生物中的一种转化为Fab'硫醇,并与等摩尔量的另一种Fab'TNB衍生物混合,形成双特异性抗体。

[0145] 本文所述的抗体或抗原结合片段的任一者可缀合至稳定分子(例如,增加抗体或其抗原结合片段在受试者或溶液中的半衰期的分子)。稳定分子的非限制性示例包括:聚合

物(例如,聚乙二醇)或蛋白质(例如血清白蛋白,诸如人血清白蛋白)。稳定分子的缀合可增加抗体或抗原结合片段在体外(例如,在组织培养物中或以药物组合物形式储存时)或在体内(例如,在人体内)的半衰期或延长其生物活性。

[0146] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可缀合至治疗剂。包括抗体或其抗原结合片段的抗体药物缀合物可共价或非共价结合至治疗剂。在一些实施方案中,治疗剂是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂(例如,细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素、美登木素生物碱(诸如DM-1和DM-4)、二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、嘌呤霉素、表柔比星和环磷酰胺及类似物)。

[0147] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段识别内源性CD40或重组CD40。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段识别人CD40。

[0148] 在一些实施方案中,本文所述抗体或其抗原结合片段在野生型小鼠(例如C57BL/6小鼠)中的半衰期为至少10天、至少11天、至少12天、至少13天、至少14天、至少15天、至少16天、至少17天或至少18天。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段在CD40基因人源化小鼠(例如hCD40小鼠)中的半衰期为至少1天、至少2天、至少3天、至少4天或至少5天。

[0149] 在一些实施方案中,本文所述抗体或其抗原结合片段在野生型小鼠(例如C57BL/6小鼠)中的清除率(CL)小于7ml/天/kg、小于6ml/天/kg、小于5ml/天/kg或小于4ml/天/kg。在一些实施方案中,本文所述抗体或其抗原结合片段在CD40基因人源化小鼠(例如hCD40小鼠)中的清除率(CL)小于15ml/天/kg、小于14ml/天/kg、小于13ml/天/kg或小于12ml/天/kg。

[0150] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段在FcRn基因人源化小鼠(例如,hFcRn小鼠)中的半衰期为至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天或至少14天。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段在FcRn基因人源化小鼠(例如,hFcRn小鼠)中的清除率(CL)小于16ml/天/kg、小于15ml/天/kg、小于14ml/天/kg、小于13ml/天/kg、小于12ml/天/kg、小于11ml/天/kg、小于10ml/天/kg、小于9ml/天/kg、小于8ml/天/kg或小于7ml/天/kg。

[0151] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可进入表达内源、重组或人CD40的细胞。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段可通过胞吞作用进入细胞。在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段通过胞吞作用进入至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的细胞(例如表达CD40的细胞)。

[0152] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段表现出免疫刺激作用。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段表现出免疫抑制作用。在一些实施方案中,与不施用抗体或其抗原结合片段时的相同免疫功能相比,本文所述的抗体或其抗原结合片段将一种或多种免疫功能(例如,抗原诱导的抗体产生)抑制至小于95%、小于90%、小于85%、小于80%、小于75%、小于70%、小于65%、小于60%、小于55%、小于50%、小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、

小于4%、小于3%、小于2%或小于1%。

[0153] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段的免疫抑制作用是可逆的。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段的免疫抑制作用是不可逆的。在一些实施方案中,在对受试者(例如小鼠)施用抗体或其抗原结合片段后至少10天、至少15天、至少20天、至少25天、至少30天、至少32天、至少35天、至少40天、至少45天或至少60天后,受试者的免疫功能(例如T细胞依赖性体液免疫功能)恢复。在一些实施方案中,与对受试者(例如小鼠)施用抗体或其抗原结合片段之前的相同免疫功能相比,受试者的免疫功能(例如T细胞依赖性体液免疫功能)恢复到至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或更高。

[0154] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段的免疫抑制作用不降低受试者(例如小鼠)的免疫系统器官(例如脾)中$CD20^+/CD19^+$细胞的百分比。

[0155] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段使CD40受体饱和的浓度为约或小于0.1μg/mL、约0.2μg/mL、约0.3μg/mL、0.4μg/mL、0.5μg/mL、1μg/mL、2μg/mL、5μg/mL、10μg/mL。

[0156] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其抗原结合片段使CD154与CD40的结合降低至小于95%、小于90%、小于85%、小于80%、小于75%、小于70%、小于65%、小于60%、小于55%、小于50%、小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%或小于1%。

[0157] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段的CD40受体占据百分比(RO%)为至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%。在一些实施方案中,与不施用抗体或其抗原结合片段时活化B细胞的百分比相比,抗体或其抗原结合片段使活化B细胞的百分比降低至小于95%、小于90%、小于85%、小于80%、小于75%、小于70%、小于65%、小于60%、小于55%、小于50%、小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%或小于1%。

[0158] 抗体特征

[0159] 本文所述的抗体或其抗原结合片段可阻断CD40和CD40配体(例如CD154)之间的结合。

[0160] 如本文所述的抗体或其抗原结合片段可以是CD40激动剂或拮抗剂。在一些实施方案中,通过结合CD40,抗体可抑制CD40信号传导途径。在一些实施方案中,抗体可上调免疫应答或下调免疫应答。

[0161] 在一些实施方案中,如本文所述的抗体或其抗原结合片段可使免疫应答、免疫细胞(例如,T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、巨噬细胞、抗原呈递细胞)的活性或数量增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍或20倍。在一些实施方案中,如本文所述的抗体或其抗原结合片段可使免疫细胞(例如,T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、巨噬细胞、抗原呈递细胞)的活性或数量降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、10倍或20倍。

[0162] 在一些实施方案中,抗体(或其抗原结合片段)以小于$0.1s^{-1}$、小于$0.01s^{-1}$、小于$0.001s^{-1}$、小于$0.0001s^{-1}$或小于$0.00001s^{-1}$的解离速率(koff)特异性结合CD40(例如,人

CD40、猴CD40(例如,猕猴、食蟹猴(Macaca fascicularis))、狗CD40、小鼠CD40和/或嵌合CD40)。在一些实施方案中,解离速率(koff)大于0.01s^{-1}、大于0.001s^{-1}、大于0.0001s^{-1}、大于0.00001s^{-1}或大于0.000001s^{-1}。

[0163] 在一些实施方案中,动力学结合速率(kon)大于1×10^{2}/Ms、大于1×10^{3}/Ms、大于1×10^{4}/Ms、大于1×10^{5}/Ms或大于1×10^{6}/Ms。在一些实施方案中,动力学结合速率(kon)小于1×10^{5}/Ms、小于1×10^{6}/Ms或小于1×10^{7}/Ms。

[0164] 亲和力可根据动力学速率常数的商(KD=koff/kon)推导。在一些实施方案中,KD小于1×10^{-6}M、小于1×10^{-7}M、小于1×10^{-8}M、小于1×10^{-9}M或小于1×10^{-10}M。在一些实施方案中,KD小于50nM、30nM、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM或1nM。在一些实施方案中,KD大于1×10^{-7}M、大于1×10^{-8}M、大于1×10^{-9}M、大于1×10^{-10}M、大于1×10^{-11}M或大于1×10^{-12}M。

[0165] 测量抗体对抗原的亲和力的一般技术,包括例如ELISA、RIA和表面等离子体共振(SPR)。在一些实施方案中,抗体结合人CD40(SEQ ID NO:42)、小鼠CD40(SEQ ID NO:50)和/或嵌合CD40(SEQ ID NO:49)。在一些实施方案中,抗体不结合人CD40(SEQ ID NO:42)、小鼠CD40(SEQ ID NO:50)和/或嵌合CD40(SEQ ID NO:49)。在一些实施方案中,该抗体结合FcRn(SEQ ID NO:51)。

[0166] 在一些实施方案中,测定热稳定性。在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以具有大于60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃或95℃的Tm,在一些实施方案中,Tm小于60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃、66℃、67℃、68℃、69℃、70℃、71℃、72℃、73℃、74℃、75℃、76℃、77℃、78℃、79℃、80℃、81℃、82℃、83℃、84℃、85℃、86℃、87℃、88℃、89℃、90℃、91℃、92℃、93℃、94℃或95℃。

[0167] 在一些实施方案中,抗体具有大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%的肿瘤生长抑制百分比(TGI%)。在一些实施方案中,抗体具有小于60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%的肿瘤生长抑制百分比。TGI%可例如在治疗开始后3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天或30天,或在治疗开始后1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月确定。如本文所用,肿瘤生长抑制百分比(TGI%)使用下式计算:

[0168] TGI(%)=[1-(Ti-T0)/(Vi-V0)]×100%

[0169] Ti是第i天时治疗组中的平均肿瘤体积。T0是第零天时治疗组中的平均肿瘤体积。Vi是第i天时对照组中的平均肿瘤体积。V0是第零天时对照组中的平均肿瘤体积。

[0170] 在一些实施方案中,如本文所述的抗体或其抗原结合片段是CD40拮抗剂。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段降低表达CD40的靶细胞中的CD40信号转导。

[0171] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可增强APC(例如,DC细胞)功能,例如,诱导共刺激和MHC分子的表面表达,诱导促炎性细胞因子的产生,并且/或者增强T细胞触发功能。

[0172] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可结合表达CD40的肿瘤细胞。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可诱导补体介导的细胞毒性(CMC)和/或抗体依赖性细胞毒性(ADCC),并且杀死肿瘤细胞。

[0173] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段具有功能性Fc区。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应子功能是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应子功能是吞噬作用。在一些实施方案中,功能性Fc区的效应子功能是ADCC和吞噬作用。

[0174] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段不能诱导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可诱导补体介导的细胞毒性(CMC)。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段不能诱导补体介导的细胞毒性(CMC)。

[0175] 在一些实施方案中,Fc区是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4。在一些实施方案中,抗体是人IgG1抗体,任选具有SI突变、LALA突变、N297A突变、YTE突变和/或FLAA突变。在一些实施方案中,抗体是人IgG4抗体,任选具有SI突变、LALA突变、N297A突变、YTE突变和/或FLAA突变。

[0176] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段不具有功能性Fc区。例如,抗体或抗原结合片段是Fab、Fab'、$F(ab')_2$和Fv片段。在一些实施方案中,Fc区具有LALA突变(根据EU编号的L234A和L235A突变),或LALA-PG突变(根据EU编号的L234A、L235A、P329G突变)。在一些实施方案中,Fc区具有FLAA突变(根据EU编号的F234A和L235A)。在一些实施方案中,Fc具有SI突变(根据EU编号的S239D和I332E突变)。在一些实施方案中,Fc具有根据EU编号的N297A突变。在一些实施方案中,Fc具有YTE突变(根据EU编号的M252Y、S254T和T256E)。

[0177] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段包括与SEQ ID NO:52-59中的任一序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或100%的同一性的氨基酸序列。

[0178] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可抑制PMBC增殖,例如,与同种型对照抗体(例如,hIgG1)相比,抑制至小于90%、小于80%、小于70%、小于60%、小于50%、小于40%或小于30%。

[0179] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可抑制B细胞增殖和/或B细胞活化。例如,与同种型对照抗体(例如hIgG1)处理后相比,本文所述抗体或抗原结合片段处理后PMBC细胞中活化B细胞亚群的百分比可降低至小于90%、小于80%、小于70%、小于60%、小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%或小于5%。

[0180] 制备抗CD40抗体的方法

[0181] 可使用分离的人CD40片段作为免疫原,使用多克隆和单克隆抗体制备的标准技术产生抗体。多克隆抗体可通过多次注射(例如,皮下或腹膜内注射)抗原肽或蛋白在动物体内产生。在一些实施方案中,抗原肽或蛋白与至少一种佐剂一起注射。在一些实施方案中,抗原肽或蛋白可缀合至在待免疫的物种中具有免疫原性的药剂。动物可注射超过一次(例如两次、三次或四次)的抗原肽或蛋白。

[0182] 可使用全长多肽或蛋白,或其抗原肽片段作为免疫原。蛋白质的抗原肽包括CD40的氨基酸序列的至少8个(例如,至少10个、15个、20个或30个)氨基酸残基,并且涵盖该蛋白质的表位,使得针对该肽产生的抗体与该蛋白质形成特异性免疫复合物。如上所述,人CD40

的全长序列(SEQ ID NO:42)是本领域已知的。在一些实施方案中,带Fc标签或带His标签的人CD40蛋白用作免疫原。

[0183] 免疫原通常用于通过免疫合适的受试者(例如,表达至少一个人免疫球蛋白基因座的人或转基因动物)来制备抗体。适当的免疫原性制剂可含有例如重组表达的或化学合成的多肽(例如,人CD40的片段)。该制剂还可包括佐剂(诸如弗氏完全或不完全佐剂)或类似的免疫刺激剂。

[0184] 多克隆抗体可如上所述通过以CD40多肽或其抗原肽(例如,CD40的一部分)作为免疫原免疫合适的受试者来制备。可通过标准技术,诸如用酶联免疫吸附测定(ELISA),使用固定化CD40多肽或肽随时间监测经免疫的受试者中的抗体滴度。如有需要,可从哺乳动物(例如,从血液)中分离抗体分子,并通过熟知的技术(诸如蛋白A或蛋白G层析)进一步纯化,以获得IgG级分。在免疫后的适当时间,例如,当特异性抗体滴度最高时,可从受试者获得产生抗体的细胞,并用于通过标准技术,诸如最初由Kohler等人(Nature,第256卷,第495-497页,1975年)所述的杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人,Immunol.Today,第4卷,第72页,1983年)、EBV-杂交瘤技术(Cole等人,“Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy”,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页,1985年)或三源杂交瘤技术(trioma technique)制备单克隆抗体。产生杂交瘤的技术是众所周知的(通常参见“Current Protocols in Immunology”,1994年,Coligan等人编辑,John Wiley&Sons,Inc.,New York,NY)。产生单克隆抗体的杂交瘤细胞通过筛选杂交瘤培养物上清液中结合目的多肽或表位的抗体来检测,例如使用标准ELISA测定法。

[0185] 本文所述的抗体或抗原结合片段的变体可通过将适当的核苷酸变化引入编码本文所述的人、人源化或嵌合抗体或其抗原结合片段的DNA中,或通过肽合成来制备。此类变体包括例如,在构成抗体或抗原结合结构域的抗原结合位点的氨基酸序列内的残基的缺失、插入或取代。在此类变体的群体中,一些抗体或抗原结合片段将对靶蛋白(例如CD40)具有增加的亲和力。可进行缺失、插入和/或组合的任何组合,以获得对靶标具有增加的结合亲和力的抗体或其抗原结合片段。引入抗体或抗原结合片段的氨基酸改变也可改变或引入新的翻译后修饰至抗体或抗原结合片段中,诸如改变(例如,增加或减少)糖基化位点的数量、改变糖基化位点的类型(例如,改变氨基酸序列,使得不同的糖通过细胞中存在的酶连接)、或引入新的糖基化位点。

[0186] 本文公开的抗体可来源于任何物种的动物,包括哺乳动物。天然抗体的非限制性示例包括来源于人、灵长类动物(例如,猴和猿)、牛、猪、马、绵羊、骆驼科动物(例如,骆驼和美洲驼)、鸡、山羊和啮齿动物(例如,大鼠、小鼠、仓鼠和兔,包括经基因工程改造以产生人抗体的转基因啮齿类动物)的抗体。

[0187] 人和人源化抗体包括具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区(或与来源于人种系免疫球蛋白序列的抗体具有相同氨基酸序列)的抗体。人抗体可包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR中。

[0188] 人源化抗体通常是在人类框架(FR)上移植非人类的CDR。因此,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入其中的氨基酸序列。这些非人氨基酸残基通常被称为“导入”残基,其通常取自“导入”可变结构域。人源化基本上可通过例如用啮齿动物CDR或CDR序列取

代人抗体的相应序列来进行。这些方法描述于例如Jones等人,Nature,第321卷:第522-525页(1986年);Riechmann等人,Nature,第332卷:第323-327页(1988年);Verhoeyen等人,Science,第239卷:第1534-1536页(1988年),这些文献中的每一篇全文以引用方式并入本文。因此,“人源化”抗体是嵌合抗体,其中完整人V结构域的一小部分被来自非人物种的相应序列取代。实际上,人源化抗体通常是小鼠抗体,其中一些CDR残基和一些FR残基被来自人抗体中类似位点的残基取代。

[0189] 用于制备人源化抗体的人VH和VL结构域的选择对于降低免疫原性是非常重要的。根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知人结构域序列的整个文库筛选小鼠抗体的V结构域序列。然后,将最接近小鼠序列的人序列接受为人源化抗体的人FR(Sims等人,J.Immunol.,第151卷:第2296页(1993年);Chothia等人,J.Mol.Biol.,第196卷:第901页(1987年))。

[0190] 更重要的是,抗体人源化的同时保留对抗原的高特异性和亲和力和其他有利的生物学特性。为了实现这个目标,人源化抗体可通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性的人源化产物的方法来制备。三维免疫球蛋白模型是本领域技术人员通常可获得的并且熟悉的。可获得说明和展示选择的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。对这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能的作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。通过这种方法,可从受体和导入序列中选择和组合FR残基,以便获得期望的抗体特征,诸如增加的对靶抗原的亲和力。

[0191] 通常,人、人源化或嵌合抗CD40抗体的氨基酸序列变体将含有与原始抗体轻链或重链中存在的序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0192] 在一些实施方案中,使用具有人源化重链免疫球蛋白基因座和人源化κ链免疫球蛋白基因座的小鼠(例如RenMab™小鼠)产生抗体。重链免疫球蛋白基因座是染色体上含有抗体重链基因的区域。该基因座可以包括例如人IGHV(可变)基因、人IGHD(多样性)基因、人IGHJ(连接)基因和小鼠重链恒定结构域基因。κ链免疫球蛋白基因座是染色体上含有编码抗体轻链(κ链)基因的区域。κ链免疫球蛋白基因座可以包括例如人IGKV(可变)基因、人IGKJ(连接)基因和小鼠轻链恒定结构域基因。关于RenMab™小鼠的详细描述可见于PCT/CN2020/075698,其全文以引用方式并入本文。

[0193] 在一些实施方案中,使用具有人源化重链免疫球蛋白基因座和人源化κ链免疫球蛋白基因座的小鼠(例如RenLite™小鼠)产生抗体。重链免疫球蛋白基因座是染色体上含有抗体重链基因的区域。该基因座可以包括例如人IGHV(可变)基因、人IGHD(多样性)基因、人IGHJ(连接)基因和小鼠重链恒定结构域基因。κ链免疫球蛋白基因座是染色体上含有编码共同轻链基因的区域。κ链免疫球蛋白基因座可以包括例如人IGKV(可变)基因、人IGKJ(连接)基因和小鼠轻链恒定结构域基因。关于RenLite™小鼠的详细描述可见于PCT/CN2021/097652,其全文以引用方式并入本文。

[0194] 由小鼠产生的抗体具有完整的人VH、完整的人VL和小鼠恒定区。在一些实施方案中,人VH和人VL与人IgG恒定区(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)连接。在一些实施方案中,恒定区具有与SEQ ID NO:52、53、54、55、56、57、58或59具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的序列。

[0195] 相对于原始序列的同一性或同源性通常是在将候选序列与原始序列进行比对并在必要时引入空位以实现最大百分比序列同一性,且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分之后,候选序列内存在的与人、人源化或嵌合抗CD40抗体或片段内存在的序列相同的氨基酸残基的百分比。

[0196] 可对抗CD40抗体或抗原结合片段进行另外的修饰。例如,可将半胱氨酸残基引入Fc区,从而允许在该区域中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可具有任何增加的体外和/或体内半衰期。具有增加的体外和/或体内半衰期的同二聚体抗体还可使用异源双功能交联剂来制备,如例如Wolff等人(Cancer Res.,第53卷:第2560-2565页,1993年)所述。另选地,可对抗体进行工程改造使其具有双Fc区(参见,例如Stevenson等人,Anti-Cancer Drug Design,第3卷:第219-230页,1989年)。

[0197] 在一些实施方案中,可对抗CD40抗体或其抗原结合片段进行共价修饰。这些共价修饰可通过化学或酶促合成,或通过酶促或化学切割进行。通过使抗体或片段的靶向氨基酸残基与能够与选择的侧链或N末端或C末端残基反应的有机衍生剂反应,将抗体或抗体片段的其他类型的共价修饰引入分子中。

[0198] 在一些实施方案中,提供了抗体变体,其具有缺乏(直接或间接)连接至Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构。例如,此类抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。通过计算Asn297处糖链内岩藻糖的平均量相对于连接至Asn297的所有糖结构(例如,复合型、杂合型和高甘露糖结构)的总和来确定岩藻糖量,如通过MALDI-TOF质谱法(例如WO 2008/077546中所述)测量。Asn297是指位于Fc区中约位置297处的天冬酰胺残基(Fc区残基的Eu编号;或Kabat编号中的位置314);然而,由于抗体中微小的序列变异,Asn297也可位于位置297上游或下游约±3个氨基酸处,即位置294与300之间。此类岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。在一些实施方案中,为了降低聚糖异质性,抗体的Fc区可被进一步工程改造以用丙氨酸替换位置297处的天冬酰胺(N297A)。

[0199] 在一些实施方案中,为通过避免Fab臂交换来促进生产效率,抗体的Fc区被进一步工程改造以用脯氨酸替换IgG4的位置228(EU编号)处的丝氨酸(S228P)。关于S228突变的详细描述参见例如Silva等人,“The S228P mutation prevents in vivo and in vitro IgG4 Fab-arm exchange as demonstrated using a combination of novel quantitative immunoassays and physiological matrix preparation.”,Journal of Biological Chemistry 290.9(2015年):第5462-5469页,其全文以引用方式并入本文。

[0200] 重组载体

[0201] 本公开还提供了包括本文公开的分离的多核苷酸(例如,编码本文公开的多肽的多核苷酸)的重组载体(例如,表达载体)、引入这些重组载体的宿主细胞(即,使得这些宿主细胞含有多核苷酸和/或包括多核苷酸的载体),以及通过重组技术产生重组抗体多肽或其片段。

[0202] 如本文所用,“载体”是将载体引入宿主细胞时能够将一种或多种目的多核苷酸递送至该宿主细胞的任何构建体。“表达载体”能够在已经引入该表达载体的宿主细胞中递送一种或多种目的多核苷酸并将其表达为编码的多肽。因此,在表达载体中,通过与该载体内或宿主细胞的基因组中在目的多核苷酸的整合位点处或附近或两侧的调控元件(诸如启动子、增强子和/或poly-A尾)可操作地连接,将该目的多核苷酸定位以在该载体中表达,使得

该目的多核苷酸将在引入该表达载体的宿主细胞中被翻译。

[0203] 载体可通过本领域已知的方法引入宿主细胞,例如电穿孔、化学转染(例如,DEAE-葡聚糖)、转化、转染和感染和/或转导(例如用重组病毒)。因此,载体的非限制性示例包括病毒载体(其可用于产生重组病毒)、裸DNA或RNA、质粒、粘粒、噬菌体载体和与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体。

[0204] 在一些实施方案中,使用病毒表达系统(例如,牛痘或其他痘病毒、逆转录病毒或腺病毒)引入本文公开的多核苷酸(例如,编码本文公开的多肽的多核苷酸),其可涉及使用非致病性(缺陷性)、有复制能力的病毒,或可使用复制缺陷性病毒。在后一种情况下,病毒繁殖通常仅在互补病毒包装细胞中发生。合适的系统公开于例如Fisher-Hoch等人,1989年,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第86卷:第317-321页;Flexner等人,1989年,Ann.N.Y.Acad Sci.,第569卷:第86-103页;Flexner等人,1990年,Vaccine,第8卷:第17-21页;美国专利号4,603,112、4,769,330和5,017,487;WO 89/01973;美国专利号4,777,127;GB 2,200,651;EP 0,345,242;WO 91/02805;Berkner-Biotechniques,第6卷:第616-627页,1988年;Rosenfeld等人,1991年,Science,第252卷:第431-434页;Kolls等人,1994年,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第91卷:第215-219页;Kass-Eisler等人,1993年,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,第90卷:第11498-11502页;Guzman等人,1993年,Circulation,第88卷:第2838-2848页;和Guzman等人,1993年,Cir.Res.,第73卷:第1202-1207页。将DNA整合到此类表达系统中的技术是本领域普通技术人员所熟知的。DNA也可以是“裸露的”,如例如Ulmer等人,1993年,Science,第259卷:第1745-1749页,和Cohen,1993年,Science,第259卷:第1691-1692页中所述的。可通过将DNA包被在高效转运到细胞中的可生物降解珠上增加裸DNA的摄取。

[0205] 为了表达,可将包括本文公开的编码抗体或编码多肽的多核苷酸的DNA插入片段可操作地连接到合适的启动子(例如,异源启动子),诸如噬菌体λPL启动子、大肠杆菌(E.coli)lac、trp和tac启动子、SV40早期和晚期启动子以及逆转录病毒LTR的启动子等。其他合适的启动子是本领域技术人员已知的。表达构建体还可含有转录起始、终止位点,并且在转录区中包含用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的成熟转录物的编码部分可包括在待翻译多肽的起始处的翻译起始密码子和在待翻译多肽末端的适当位置的终止密码子(UAA、UGA或UAG)。

[0206] 如上所述,表达载体可包括至少一个可选择标记物。此类标记物包括用于真核细胞培养的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性基因和用于在大肠杆菌和其他细菌中培养的四环素或氨苄青霉素抗性基因。合适宿主的代表性示例包括但不限于细菌细胞,诸如大肠杆菌(E.coli)、链霉菌(Streptomyces)和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)细胞;真菌细胞,诸如酵母细胞;昆虫细胞,诸如果蝇S2和草地贪夜蛾Sf9细胞;动物细胞,诸如CHO、COS、Bowes黑色素瘤和HK 293细胞;以及植物细胞。用于本文所述宿主细胞的合适的培养基和条件是本领域已知的。

[0207] 用于细菌的非限制性载体包括获自Qiagen的pQE70、pQE60和pQE-9;获自Stratagene的pBS载体、Phagescript载体、Bluescript载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A;和获自Pharmacia的ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5。非限制性真核载体包括获自Stratagene的pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG;以及获自Pharmacia的

pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL。其他合适的载体对本领域技术人员来说将是显而易见的。

[0208] 适用的非限制性细菌启动子包括大肠杆菌lacI和lacZ启动子、T3和T7启动子、gpt启动子、λPR和PL启动子和trp启动子。合适的真核启动子包括CMV立即早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、早期和晚期SV40启动子、逆转录病毒LTR的启动子(诸如劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus,RSV)的启动子)和金属硫蛋白启动子(诸如小鼠金属硫蛋白-I启动子)。

[0209] 在酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)中,可使用许多含有组成型或诱导型启动子的载体,诸如α因子、醇氧化酶和PGH。关于综述,参见Ausubel等人(1989年)Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,N.Y,和Grant等人,Methods Enzymol.,第153卷:第516-544页(1997年)。

[0210] 将构建体引入宿主细胞可通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他方法实现。这些方法描述于许多标准实验室手册中,诸如Davis等人,Basic Methods In Molecular Biology(1986年),其全文以引用方式并入本文。

[0211] 可通过将增强子序列插入载体中来增加高等真核生物对编码本公开的抗体的DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常为约10bp-300bp,其作用是增加给定宿主细胞类型中启动子的转录活性。增强子的示例包括位于碱基对100-270的复制起点后侧(late side)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、在复制起点后侧的多瘤病毒增强子和腺病毒增强子。

[0212] 为了使翻译好的蛋白质分泌到内质网腔、细胞周质间隙或细胞外环境中,可将适当的分泌信号并入表达的多肽中。信号可以是多肽的内源性信号,也可以是异源信号。

[0213] 多肽(例如,抗体)可以修饰的形式表达,诸如融合蛋白(例如,GST融合蛋白)或带有组氨酸标签,并且不仅可以包括分泌信号,还可以包括另外的异源功能区。例如,可将另外的氨基酸(特别是带电荷的氨基酸)的区域添加到多肽的N末端以改善在宿主细胞中、在纯化过程中或在随后的处理和储存过程中的稳定性和持久性。此外,可将肽部分添加到多肽中以促进纯化。这些区域可在最终制备多肽之前去除。将肽部分添加到多肽中以引起分泌或排泄、提高稳定性并促进纯化等是本领域熟知的常规技术。

[0214] 治疗方法

[0215] 本公开的抗体或其抗原结合片段可用于各种治疗目的。

[0216] 在一方面,本公开提供了用于治疗受试者中的癌症的方法、降低受试者中肿瘤体积随时间的增加速率的方法、降低形成转移的风险的方法或降低在受试者中形成另外的转移的风险的方法。在一些实施方案中,治疗可终止、减缓、延迟或抑制癌症的进展。在一些实施方案中,治疗可使受试者中癌症的一种或多种症状的数量、严重性和/或持续时间减少。

[0217] 在一方面,本公开特征在于包括向有需要的受试者(例如,患有或鉴定或诊断为患有癌症的受试者)施用治疗有效量的本文公开的抗体或其抗原结合片段的方法,该癌症例如乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、类癌、宫颈癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、头颈癌、肝癌、肺癌、小细胞肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、结直肠癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、膀胱癌、尿道癌或血液系统恶性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是不可切除的黑色素瘤或转移性黑色素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌(SCLC)、膀胱癌或转移性激素难治性前列腺癌。在一些实施方案中,受试者患有实体瘤。在一些实施方案中,癌症是

头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、肾细胞癌(RCC)、三阴性乳腺癌(TNBC)或结肠直肠癌。在一些实施方案中,受试者患有霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,受试者患有三阴性乳腺癌(TNBC)、胃癌、尿路上皮癌、梅克尔细胞癌或头颈癌。在一些实施方案中,癌症是黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤、血液系统恶性肿瘤,尤其是非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病或晚期实体瘤。

[0218] 在一些实施方案中,本文公开的组合物和方法可用于治疗有癌症风险的患者。癌症患者可用本领域已知的各种方法鉴定。

[0219] 在一方面,本公开提供了例如通过影响APC细胞的功能性质(例如通过阻断CD40和CD40L之间的相互作用)来治疗、预防与异常或不需要的免疫应答相关的疾病(例如自身免疫性疾病)或降低其发展风险的方法。这些自身免疫性疾病包括但不限于斑秃、狼疮、强直性脊柱炎、梅尼埃病、抗磷脂综合征、混合性结缔组织病、自身免疫性艾迪生病(autoimmune Addison's disease)、多发性硬化症、自身免疫性溶血性贫血、重症肌无力、自身免疫性肝炎、寻常天疱疮、白塞氏病、恶性贫血、大疱性类天疱疮、结节性多发性关节炎、心肌病、多软骨炎、乳糜泻皮炎、多腺体综合征、慢性疲劳综合征(CFIDS)、风湿性多肌痛、慢性炎性脱髓鞘、多肌炎和皮肌炎、慢性炎性多发性神经病、原发性无丙种球蛋白血症、Churg-Strauss综合征、原发性胆汁性肝硬化、瘢痕性类天疱疮、银屑病、CREST综合征、雷诺现象、冷凝集素病、赖特综合征、克罗恩病、风湿热、盘状狼疮、类风湿关节炎、冷球蛋白血症、结节病、纤维肌痛、硬皮病、格雷夫斯病、干燥综合征、格林-巴利综合征、僵人综合征、桥本氏甲状腺炎、大动脉炎、特发性肺纤维化、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、溃疡性结肠炎、IgA肾病、葡萄膜炎、糖尿病(例如I型糖尿病)、血管炎、扁平苔癣和白癜风。抗CD40抗体或其抗原结合片段也可施用于受试者,以治疗、预防与异常或不需要的免疫应答相关的疾病或降低其发展风险,该免疫应答与细胞、组织或器官移植(例如肾、肝)以及心脏移植(例如移植物抗宿主病(GVHD))相关,或预防同种异体移植物排斥。在一些实施方案中,该受试者患有皮肤病、肝病(例如肝硬化)、汗腺炎、实验性自身免疫性脑脊髓炎。在一些实施方案中,该受试者患有肾病、狼疮、干燥综合征、溃疡性结肠炎、银屑病、过敏性皮炎、特应性皮炎、化脓性汗腺炎、免疫性血小板减少症(ITP)或其他炎性关节炎。在一些实施方案中,该受试者患有多发性硬化症或重症肌无力。在一些实施方案中,该受试者患有克罗恩病、溃疡性结肠炎或1型糖尿病。在一些实施方案中,该受试者患有自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病、多发性硬化症、银屑病、炎性肠病(例如克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎)、类风湿性关节炎、干燥综合征、自身免疫性肾炎或系统性红斑狼疮。CD40与各种自身免疫性疾病的关系描述于例如Peters等人,"CD40 and autoimmunity:the dark side of a great activator.",Seminars in immunology.,第21卷,第5期,Academic Press,2009年,和Karnell,Jodi L.等人,"Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond.",Advanced drug delivery reviews(2018年);Albach等人,"Safety,pharmacokinetics and pharmacodynamics of single rising doses of BI 655064,an antagonistic anti-CD40 antibody in healthy subjects:a potential novel treatment for autoimmune diseases.",European journal of clinical pharmacology 74.2(2018年):第161-169页;这些文献中的每一篇全文均以引用方式并入本文。

[0220] 如本文所用,“有效量”是指足以实现有益或期望结果的量或剂量,这些结果包括终止、减缓、延迟或抑制疾病(例如,自身免疫性疾病或癌症)的进展。有效量将根据例如抗体、抗原结合片段、抗体编码多核苷酸、包括该多核苷酸的载体和/或其组合物待施用的受试者的年龄和体重,症状的严重性和给药途径而变化,因此可基于个体确定施用。

[0221] 有效量可在一次或多次给药中施用。例如,抗体或抗原结合片段的有效量是足以改善、终止、稳定、逆转、抑制、减缓和/或延迟患者中自身免疫性疾病或癌症的进展的量,或者是足以改善、终止、稳定、逆转、减缓和/或延迟细胞(例如,活检细胞、本文所述的癌细胞中的任一者或细胞系(例如,癌细胞系))在体外增殖的量。如本领域所理解的,抗体或抗原结合片段的有效量可根据,尤其是患者病史以及其他因素(诸如所用抗体的类型(和/或剂量))变化。

[0222] 本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸和/或组合物的有效量和给药方案可以凭经验确定,并且做出此类确定在本领域技术范围内。本领域技术人员将理解,必须施用的剂量将根据例如将接受本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸和/或组合物的哺乳动物,给药途径,所用的本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸、抗原结合片段和/或组合物的具体类型以及施用于哺乳动物的其他药物而变化。选择抗体或抗原结合片段的合适剂量的指导可参见关于抗体和抗原结合片段的治疗用途的文献,例如Handbook of Monoclonal Antibodies,Ferrone等人编辑,Noges Publications,Park Ridge,N.J.,1985年,第22章第303-357页;Smith等人,Antibodies in Human Diagnosis and Therapy,Haber等人编辑,Raven Press,New York,1977年,第365-389页。

[0223] 有效量的抗体的典型日剂量为0.01mg/kg至100mg/kg。在一些实施方案中,剂量可小于100mg/kg、10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg或0.1mg/kg。在一些实施方案中,剂量可大于10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.5mg/kg、0.1mg/kg、0.05mg/kg或0.01mg/kg。在一些实施方案中,剂量为约10mg/kg、9mg/kg、8mg/kg、7mg/kg、6mg/kg、5mg/kg、4mg/kg、3mg/kg、2mg/kg、1mg/kg、0.9mg/kg、0.8mg/kg、0.7mg/kg、0.6mg/kg、0.5mg/kg、0.4mg/kg、0.3mg/kg、0.2mg/kg或0.1mg/kg。

[0224] 在本文所述的方法的任一者中,至少一种抗体、其抗原结合片段或药物组合物(例如,本文所述的抗体、抗原结合片段或药物组合物中的任一者)和任选地至少一种另外的治疗剂可至少每周一次(例如,每周一次、每周两次、每周三次、每周四次、每天一次、每天两次或每天三次)施用于受试者。在一些实施方案中,至少两种不同的抗体和/或抗原结合片段以同一组合物(例如,液体组合物)施用。在一些实施方案中,至少一种抗体或抗原结合片段和至少一种另外的治疗剂以同一组合物(例如,液体组合物)施用。在一些实施方案中,至少一种抗体或抗原结合片段和至少一种另外的治疗剂以两种不同的组合物(例如,含有至少一种抗体或抗原结合片段的液体组合物和含有至少一种另外的治疗剂的固体口服组合物)施用。在一些实施方案中,至少一种另外的治疗剂以丸剂、片剂或胶囊剂的形式施用。在一些实施方案中,至少一种另外的治疗剂以缓释口服制剂施用。

[0225] 在一些实施方案中,可在施用至少一种抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物(例如,本文所述的抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物中的任一者)之前或之后向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。在一些实施方案中,向受试者施用一种或多种另外的治疗剂

和至少一种抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物(例如,本文所述的抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物中的任一者),使得受试者中一种或多种另外的治疗剂和至少一种抗体或抗原结合片段(例如,本文所述的抗体或抗原结合片段中的任一者)的生物活性期存在重叠。

[0226] 在一些实施方案中,可在延长的时间段内(例如,在至少1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1年、2年、3年、4年或5年的时间段内)向受试者施用至少一种抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物(例如,本文所述的抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物中的任一者)。熟练的医学专业人员可使用本文所述的方法中的任一者来确定治疗期的长度,以诊断或跟踪治疗有效性(例如,观察癌症的至少一种症状)。如本文所述,熟练的医学专业人员还可改变施用于受试者的抗体或抗原结合抗体片段(和/或一种或多种另外的治疗剂)的种类和数量(例如,增加或减少),并且还可基于治疗有效性的评估(例如,使用本文所述和本领域已知的方法中的任一者)来调节(例如,增加或减少)施用于受试者的至少一种抗体或抗原结合抗体片段(和/或一种或多种另外的治疗剂)的剂量或频率。

[0227] 在一些实施方案中,可向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。该另外的治疗剂可包括一种或多种抑制剂,该一种或多种抑制剂选自由以下组成的组:B-Raf抑制剂、EGFR抑制剂、MEK抑制剂、ERK抑制剂、K-Ras抑制剂、c-Met抑制剂、间变性淋巴瘤激酶(ALK)抑制剂、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、Akt抑制剂、mTOR抑制剂、PI3K/mTOR双重抑制剂、布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)抑制剂,以及异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)和/或异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)抑制剂。在一些实施方案中,另外的治疗剂是吲哚胺2,3-双加氧酶-1(IDO1)抑制剂(例如,艾卡哚司他(epacadostat))。

[0228] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可包括一种或多种抑制剂,该一种或多种抑制剂选自由以下组成的组:HER3抑制剂、LSD1抑制剂、MDM2抑制剂、BCL2抑制剂、CHK1抑制剂、活化刺猬信号传导途径(hedgehog signaling pathway)抑制剂和选择性降解雌激素受体的药剂。

[0229] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可包括一种或多种治疗剂,该一种或多种治疗剂选自由以下组成的组:曲贝替定(trabectedin)、白蛋白结合型紫杉醇(nab-paclitaxel)、曲巴尼布(trebananib)、西地尼布(cediranib)、帕博西尼(palbociclib)、依维莫司(everolimus)、氟嘧啶、IFL、瑞戈非尼(regorafenib)、Reolysin、爱宁达(Alimta)、Zykadia、Sutent、西罗莫司(temsirolimus)、阿昔替尼(axitinib)、索拉非尼(sorafenib)、Votrient、帕唑帕尼、IMA-901、AGS-003、卡博替尼(cabozantinib)、长春氟宁(vinflunine)、Hsp90抑制剂、Ad-GM-CSF、替莫唑胺(temazolomide)、IL-2、IFNa、长春碱、沙利度胺(Thalomid)、达卡巴嗪、环磷酰胺、来那度胺(lenalidomide)、氮胞苷(azacytidine)、硼替佐米(bortezomid)、氨柔比星(amrubicine)、卡非佐米(carfilzomib)、普拉曲沙(pralatrexate)和恩扎妥林(enzastaurin)。

[0230] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可包括一种或多种治疗剂,该一种或多种治疗剂选自由以下组成的组:佐剂、TLR激动剂、肿瘤坏死因子(TNF)α、IL-1、HMGB1、IL-10拮抗剂、IL-4拮抗剂、IL-13拮抗剂、IL-17拮抗剂、HVEM拮抗剂、ICOS激动剂、靶向CX3CL1的治疗、靶向CXCL9的治疗、靶向CXCL10的治疗、靶向CCL5的治疗、LFA-1激动剂、ICAM1激动剂和选择

蛋白激动剂。

[0231] 在一些实施方案中,向受试者施用卡铂、白蛋白结合型紫杉醇、紫杉醇、顺铂、培美曲塞、吉西他滨、FOLFOX或FOLFIRI。

[0232] 在一些实施方案中,另外的治疗剂是抗OX40抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗LAG-3抗体、抗TIGIT抗体、抗BTLA抗体、抗CTLA-4抗体、抗ICOS抗体、抗CD27抗体、抗4-1BB抗体和/或抗GITR抗体。在一些实施方案中,本文所述的抗CD40抗体或其抗原结合片段可与抗PD-1抗体和抗TIGIT抗体一起施用。

[0233] 药物组合物和给药途径

[0234] 本文还提供了包含至少一种(例如,一种、两种、三种或四种)本文所述的抗体或抗原结合片段的药物组合物。本文所述的抗体或抗原结合片段中的任一者的两种或更多种(例如,两种、三种或四种)可以任何组合存在于药物组合物中。药物组合物可以本领域已知的任何方式配制。

[0235] 药物组合物被配制成与它们的预期给药途径(例如,静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下或腹膜内)相容。组合物可包括无菌稀释剂(例如,无菌水或盐水)、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂、抗细菌剂或抗真菌剂(诸如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)、抗氧化剂(诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠)、螯合剂(诸如乙二胺四乙酸)、缓冲剂(诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐)和等渗剂(诸如糖(例如,葡萄糖)、多元醇(例如,甘露糖醇或山梨糖醇)或盐(例如,氯化钠)),或它们的任何组合。脂质体悬浮液也可用作药学上可接受的载体(参见例如,美国专利号4,522,811)。组合物的制剂可被配制并包封在安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。当需要时(如例如在可注射制剂中),可通过例如使用包衣(诸如卵磷脂)或表面活性剂来保持适当的流动性。可通过包括延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)延长抗体或其抗原结合片段的吸收。另选地,可通过植入物和微囊化递送系统实现控释,其可包括可生物降解的、生物相容的聚合物(例如,乙烯-乙酸乙烯共聚物、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸;Alza公司和Nova制药公司)。

[0236] 可将含有本文所述的抗体或抗原结合片段中的任一者的一种或多种的组合物配制成用于以剂量单位形式(即,含有预定量的活性化合物的物理上离散的单位,以便于给药和剂量均匀性)进行肠胃外(例如,静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下或腹膜内)给药。

[0237] 用于肠胃外给药的药物组合物优选是无菌的和基本上等渗的,并且在良好生产规范(GMP)条件下生产。药物组合物可以单位剂型(即,单次给药的剂量)提供。药物组合物可使用一种或多种生理学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或助剂配制。制剂取决于所选择的给药途径。对于注射,抗体可配制在水溶液中,优选配制在生理相容的缓冲液中以减少注射部位的不适。溶液可含有配制剂,诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。另选地,抗体可以是冻干形式,以便在使用前用合适的溶媒(例如无菌无热原水)配制。

[0238] 可通过标准药学方法在细胞培养物或实验动物(例如,猴)中确定组合物的毒性和疗效。例如,可确定LD50(50%群体致死的剂量)和ED50(50%群体治疗有效的剂量):治疗指数是LD50:ED50的比率。优选显示高治疗指数的药剂。当药剂表现出不良副作用时,应注意最大程度地减少潜在的损害(即,减少不良副作用)。可通过其他标准药学方法确定毒性和疗效。

[0239] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制适当剂量的用于受试者(例

如,人)的任何给定药剂。一种或多种(例如,一种、两种、三种或四种)抗体或其抗原结合片段(例如,本文所述的抗体或抗体片段中的任一者)的治疗有效量,将是治疗受试者(例如,鉴定为患有癌症的人受试者)或鉴定为有患病风险的受试者(例如,先前患过癌症但现在已经治愈的受试者)中的疾病(例如,杀死癌细胞)、降低受试者(例如,人)中的疾病的一种或多种症状的严重性、频率和/或持续时间的量。本文所述的抗体或抗原结合片段中的任一者的有效性和剂量可由医疗保健专业人员或兽医专业人员使用本领域已知的方法以及通过观察受试者(例如,人)中的疾病的一种或多种症状来确定。某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量和时间安排(例如,疾病或病症的严重性、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄,以及其他疾病的存在)。

[0240] 示例性剂量包括毫克或微克量的本文所述的抗体或抗原结合片段的任一者/千克受试者体重(例如,约1μg/kg至约500mg/kg;约100μg/kg至约500mg/kg;约100μg/kg至约50mg/kg;约10μg/kg至约5mg/kg;约10μg/kg至约0.5mg/kg;或约1μg/kg至约50μg/kg)。虽然这些剂量涵盖了广泛范围,但本领域普通技术人员将理解,治疗剂(包括抗体及其抗原结合片段)的药效各不相同,并且有效量可通过本领域已知的方法来确定。通常,首先施用相对低的剂量,之后主治的医疗保健专业人员或兽医专业人员(在治疗应用的情况下)或研究人员(当仍在开发阶段工作时)可逐渐增加剂量,直到获得适当的反应。此外,应当理解,任何特定受试者的具体剂量水平将取决于多种因素,包括所用具体化合物的活性,受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食,给药时间,给药途径,排泄速率和抗体或抗体片段在体内的半衰期。

[0241] 药物组合物可与给药说明书一起包含在容器、包装或分配器中。本公开还提供了制备用于如本文所述的各种用途的抗体或其抗原结合片段的方法。

[0242] 实施例

[0243] 本发明在以下实施例中进一步描述,这些实施例不限制权利要求中描述的本发明的范围。

[0244] 实施例1.产生人抗CD40抗体

[0245] 为了产生抗人CD40的抗体,用人CD40免疫RenMab™小鼠或RenLite™小鼠。抗CD40抗体通过如下所述的方法制备。

[0246] RenMab™小鼠具有人源化重链免疫球蛋白基因座和人源化κ链免疫球蛋白基因座。重链免疫球蛋白基因座是染色体上含有抗体重链基因的区域。该基因座包括IGHV(可变)、IGHD(多样性)、IGHJ(连接)和重链恒定结构域基因。κ链免疫球蛋白基因座是染色体上含有编码抗体轻链(κ链)基因的区域。κ链免疫球蛋白基因座包括IGKV(可变)、IGKJ(连接)和轻链恒定结构域基因。关于RenMab™小鼠的详细描述可见于PCT/CN2020/075698,其全文以引用方式并入本文。

[0247] RenLite™小鼠可用作在重链可变区完全人源化,同时保持完全人源化的共同轻链的抗体基因策略性工程改造的基因工程改造模型。RenLite™小鼠的详细描述可见于例如PCT/CN2021/097652,其全文以引用方式并入本文。

[0248] 小鼠免疫

[0249] 用带Fc标签的人CD40蛋白(hCD40-Fc,北京百普赛斯生物科技股份有限公司,目录号:CD0-H5253)或狗CD40(dCD40-Fc,北京义翘神州科技股份有限公司,目录号:70105-

D02H)免疫RenMab™小鼠或RenLite™小鼠。具体地,hCD40-Fc或dCD40-Fc用佐剂乳化,并且注射到小鼠的脚后跟、颈部或尾根部。小鼠共免疫3次:第一次免疫使用完全弗氏佐剂(CFA),第二次和第三次免疫使用不完全弗氏佐剂(IFA)。第一次和第二次免疫之间的间隔为两周,第二次和第三次免疫之间的间隔为两周。在第三次免疫后1周收集眼眶血,使用ELISA分析抗体滴度。两周后,选择高滴度的小鼠,并且通过尾静脉注射hCD40-His(带His标签的人CD40蛋白,北京百普赛斯生物科技股份有限公司,目录号:CD0-H5228)或dCD40-His(CD40蛋白,犬,重组体(His标签),北京义翘神州科技股份有限公司,目录号:70105-D08H)。

[0250] 在另一个实验中,通过将编码人CD40和/或狗CD40的表达质粒注射(通过肌内(i.m.)注射)至小鼠的胫骨前肌中,免疫RenMab™小鼠或RenLite™小鼠。小鼠注射至少四次,每次注射间隔至少14天。最后一次免疫后七天收集血液,并且通过ELISA测试血清的抗体滴度。

[0251] 在免疫后至少七天还进行增强免疫的步骤(通过注射表达质粒或通过注射蛋白质)。此外还对小鼠注射(通过腹膜内给药)CHO-S-hCD40(表达人CD40蛋白的转染CHO-S细胞)或CHO-S-dCD40(表达狗CD40蛋白的转染CHO-S细胞)进行脉冲免疫。然后在注射五天后收集免疫系统器官(例如骨髓、淋巴结和脾)。

[0252] 抗原特异性B细胞也直接从免疫的小鼠中分离,而不与骨髓瘤细胞融合。抗体轻链和重链可变区序列直接从抗原特异性B细胞获得。例如,使用单细胞技术(例如,Beacon®光流体系统,Berkeley Lights Inc.)筛选分泌抗原特异性单克隆抗体的浆细胞。使用逆转录和基于PCR的测序获得抗体可变区序列。通过用包含抗体可变区序列的载体转染细胞来表达抗体。使用FACS来验证抗体与CD40之间的结合。通过该方法获得的示例性抗CD40抗体包括:2F8、6A4、15B4、16D5和12B5。

[0253] 抗体按照以下规则命名。例如,当2F8抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)与人IgG1恒定区连接时,该抗体命名为2F8-IgG1。类似地,产生了2F8-IgG2和2F8-IgG4,其包括2F8的相同VH和VL序列,但恒定区分别来自人IgG2和IgG4亚型。

[0254] 恒定区也可包括突变。例如,将LALA突变(根据EU编号的L234A和L235A)、N297A、YTE突变(根据EU编号的M252Y、S254T和T256E)、FLAA突变(根据EU编号的F234A和L235A)或SI突变(根据EU编号的S239D和I332E)引入2F8-IgG1的Fc区,分别产生2F8-IgG1-LALA、2F8-IgG1-N297A、2F8-IgG1-YTE、2F8-IgG1-FLAA和2F8-IgG1-SI。YTE突变也被引入2F8-IgG1-LALA或2F8-IgG1-N297A的Fc区,分别产生2F8-IgG1-LALA-YTE或2F8-IgG1-N297A-YTE。对6A4、15B4、16D5和12B5也制备了具有不同恒定区序列的抗体。

[0255] 2F8的重链CDR1、2、3和轻链CDR1、2、3的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:1-6(Kabat编号)或SEQ ID NO:19-24(Chothia编号)中。2F8的人重链可变区和人轻链可变区分别示于SEQ ID NO:65和SEQ ID NO:37中。

[0256] 6A4的重链CDR1、2、3和轻链CDR1、2、3的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:7-12(Kabat编号)或SEQ ID NO:25-30(Chothia编号)中。6A4的人重链可变区和人轻链可变区分别示于SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39中。

[0257] 12B5的重链CDR1、2、3和轻链CDR1、2、3的氨基酸序列分别示于SEQ ID NO:13-18(Kabat编号)或SEQ ID NO:31-36(Chothia编号)中。12B5的人重链可变区和人轻链可变区分别示于SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41中。

[0258] 抗体制备

[0259] 将序列验证阶段的阳性抗体序列进行质粒提取并转染到100ml系统中。在细胞培养10天-13天后收集表达上清液,然后进行亲和层析。获得的抗体样品用于后续体外测试和筛选。

[0260] 实施例2.抗CD40抗体的结合亲和力

[0261] 布来鲁单抗(Bleselumab)(VH SEQ ID NO:43,VL SEQ ID NO:44;HC SEQ ID NO:66,LC SEQ ID NO:60)是靶向CD40的全人IgG4单克隆抗体,其被批准用于治疗狼疮。

[0262] 使用配备有预固定的蛋白A传感器芯片的Biacore™(Biacore,Inc.,美国新泽西州皮斯卡特韦)8K生物传感器,使用表面等离子体共振(SPR)测量抗CD40抗体2F8-IgG4-FLAA、6A4-IgG4-FLAA、12B5-IgG4-FLAA和布来鲁单抗类似物对人CD40(hCD40)、猴(食蟹猴)CD40(fasCD40)或狗CD40(dCD40)的结合亲和力。

[0263] 具体地,hCD40-His、fasCD40-His(食蟹猴CD40/TNFRSF5蛋白,His标签,北京百普赛斯生物科技股份有限公司,目录号:CD0-C52H6)或dCD40-His用1×HBS-EP+缓冲液(PH 7.4)稀释至200nM、100nM、50nM、25nM、6.25nM、3.125nM或0nM,然后以10μl/min注射到Biacore™8K生物传感器中,持续约50秒以满足所需的捕获水平(例如,约100个响应单位(RU))。然后以1μl/min注射1×HBS-EP+缓冲液(PH 7.4)的1μg/ml浓度的纯化抗CD40抗体,持续50秒。监测解离,持续400秒。在每轮滴定的最后一次注射后,以30μl/min的速率用甘氨酸溶液(pH 2.0)持续30秒再生芯片。

[0264] 通过使用Biacore™8K评估软件3.0将数据整体拟合到1:1的Langmuir结合模型(Karlsson,R.Roos,H.Fagerstam,L.Petersson,B.,1994年,Methods Enzymology,第6卷,第99-110页),从而同时获得动力学结合速率(kon)和解离速率(koff)。亲和力由动力学速率常数的商(KD=koff/kon)推导。

[0265] 如本领域普通技术人员理解的,对每个测试的抗体都采用相同的方法,并对参数(如抗体浓度)进行适当的调整。

[0266] 受试抗体的结果汇总于下表中。结果显示抗CD40抗体2F8-IgG4-FLAA和12B5-IgG4-FLAA特异性结合人、猴和狗CD40。6A4-IgG4-FLAA特异性结合人和猴CD40。

[0267] 表1

[0268]

抗CD40抗体	分析物1溶液	K_{on}(1/Ms)	K_{off}(1/s)	KD(M)
2F8-IgG4-FLAA	hCD40-His	6.54E+05	2.29E-04	3.51E-10
2F8-IgG4-FLAA	fasCD40-His	9.89E+05	2.97E-04	3.01E-10
2F8-IgG4-FLAA	dCD40-His	5.13E+05	2.66E-03	5.18E-09
6A4-IgG4-FLAA	hCD40-His	3.09E+05	5.11E-04	1.66E-09
6A4-IgG4-FLAA	fasCD40-His	2.88E+05	1.49E-02	5.17E-08
6A4-IgG4-FLAA	dCD40-His	—	—	—
12B5-IgG4-FLAA	hCD40-His	5.29E+05	3.89E-04	7.35E-10
12B5-IgG4-FLAA	fasCD40-His	5.35E+05	2.65E-04	4.95E-10
12B5-IgG4-FLAA	dCD40-His	4.01E+05	1.29E-02	3.21E-08
布来鲁单抗类似物	hCD40-His	4.29E+05	6.82E-04	1.59E-09
布来鲁单抗类似物	fasCD40-His	2.70E+05	9.07E-04	3.35E-09

布来鲁单抗类似物	dCD40-His	—	—	—

[0269] 实施例3.Jurkat-luc-hCD40报告细胞激活试验

[0270] 伊卡利单抗(Iscalimab)(VH SEQ ID NO:45,VL SEQ ID NO:46;HC SEQ ID NO:61,LC SEQ ID NO:62)是阻断CD40信号传导途径的全人IgG1抗体,其由诺华(Novartis)和XOMA开发,用于治疗干燥综合征。

[0271] BI655064(VH SEQ ID NO:47,VL SEQ ID NO:48;HC SEQ ID NO:63,LC SEQ ID NO:64)是人源化的纯拮抗性抗CD40 IgG1单克隆抗体,其由勃林格殷格翰(Boehringer Ingelheim)开发,用于治疗类风湿性关节炎(RA)和狼疮性肾炎等。

[0272] 进行实验以测试抗CD40抗体2F8-IgG4-FLAA、6A4-IgG4-FLAA、15B4-IgG4-FLAA、12B5-IgG4-FLAA、BI655064类似物、伊卡利单抗类似物和布来鲁单抗类似物是否能阻断CD40信号传导途径。

[0273] 将CHO-K1-Fcγ RIIB细胞(普洛麦格(Promega),目录号:CS1979A09)接种在96孔板中(细胞密度:4×10^4个细胞/孔),并在37℃温育过夜。受试抗体自最高浓度6μg/mL经连续(3倍)稀释。人CD40配体CD40L-His(人CD40配体/TNFSF5蛋白、His、Flag标签(活性三聚体)(MALS验证),北京百普赛斯生物科技股份有限公司,目录号:CDL-H52Db)自最高浓度3μg/ml经连续稀释。将Jurkat-Luc-hCD40细胞(表达人CD40蛋白的转染Jurkat-Luc细胞)接种在96孔板中(细胞密度:5×10^5个细胞/孔),然后向每孔中加入25μl连续稀释的抗体溶液和/或人CD40配体。抗体的工作浓度为0.5μg/ml、1μg/ml和2μg/ml。将上述96孔板在37℃培养箱中温育6小时。温育后,取出培养板,每孔加入75μl Bio-lite™荧光素酶检测试剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,目录号:DD1201-02-AB)。培养板在室温下孵育5分钟-10分钟,然后置于发光检测器中以检测荧光信号。

[0274] 当所有抗CD40抗体的浓度降低时,荧光信号(指示细胞结合CD40配体)增加,表明人CD40和人CD40配体之间的结合被抗CD40抗体阻断。

[0275] 实施例4:抗CD40抗体的体内免疫抑制作用

[0276] 抗CD40抗体在hCD40小鼠中的免疫抑制作用

[0277] 产生CD40基因人源化小鼠模型以表达嵌合CD40蛋白(SEQ ID NO:49),其中小鼠CD40蛋白的胞外区的一部分被相应的人CD40胞外区替换。具体地,小鼠CD40的氨基酸20-192(SEQ ID NO:50)被人CD40的氨基酸20-192(SEQ ID NO:42)替换。人源化小鼠模型(hCD40小鼠)通过显著降低人和表达小鼠CD40的实验小鼠的临床结果之间的差异,提供了在临床环境中测试新治疗方法的工具。CD40基因人源化小鼠模型的详细描述可见于PCT/CN2018/091845,其全文以引用方式并入本文。

[0278] 进行实验以分析人抗CD40抗体对免疫应答的作用。卵清蛋白(OVA)用作抗原以刺激hCD40小鼠的免疫应答。简言之,将hCD40小鼠(6周龄-8周龄)分成一个对照组和六个治疗组(每组5只小鼠)。治疗组小鼠分别随机选择以2mg/kg的剂量水平腹膜内(i.p.)施用抗CD40抗体布来鲁单抗类似物(G2)、12B5-IgG4-FLAA(G3)、16D5-IgG4-FLAA(G4)、2F8-IgG4-FLAA(G5)、6A4-IgG4-FLAA(G6)和15B4-IgG4-FLAA(G7)。对照组小鼠(G1)注射等体积的磷酸盐缓冲液(PBS)。在第0天(分组当天)和第4天(分组后4天)分别进行总共两次给药。卵清蛋白(OVA)用PBS稀释至1mg/ml,与CFA以1:1的体积比混合,免疫接种量为200μl/小鼠。在第1天(分组后1天)给小鼠腹膜内施用OVA/CFA混合物。在第10天和第17天从每只动物收集血

清,并且将收集的血清进行ELISA分析。图1示出了实验方案。将OVA预包被在ELISA板上。使用山羊抗小鼠IgG H&L(HRP)(Abcam,目录号:ab97265)进行ELISA分析。详细给药方案示于下表中。

[0279] 表2

[0280]

组别	小鼠数	抗体	剂量(mg/kg)	途径	频率	给药总次数
G1	5	PBS	-	i.p.	BIW	2
G2	5	布来鲁单抗类似物	2	i.p.	BIW	2
G3	5	12B5-IgG4-FLAA	2	i.p.	BIW	2
G4	5	16D5-IgG4-FLAA	2	i.p.	BIW	2
G5	5	2F8-IgG4-FLAA	2	i.p.	BIW	2
G6	5	6A4-IgG4-FLAA	2	i.p.	BIW	2
G7	5	15B4-IgG4-FLAA	2	i.p.	BIW	2

[0281] 如图2所示,第10天收集的血清的ELISA结果显示抗CD40抗体布来鲁单抗类似物(G2)、12B5-IgG4-FLAA(G3)、16D5-IgG4-FLAA(G4)、2F8-IgG4-FLAA(G5)、6A4-IgG4-FLAA(G6)和15B4-IgG4-FLAA(G7)与PBS(G1)相比降低了hCD40小鼠的免疫应答。图3示出了第17天收集的血清的ELISA结果。第17天的结果与第10天获得的结果相似。具体地,布来鲁单抗类似物(G2)、12B5-IgG4-FLAA(G3)、2F8-IgG4-FLAA(G5)和6A4-IgG4-FLAA(G6)降低了免疫应答,OD低于16D5-IgG4-FLAA(G4)和15B4-IgG4-FLAA(G7)。预计在第10天更多的抗体表现出降低的免疫应答,这是因为在第17天抗体降解增加。

[0282] 抗CD40抗体在hCD40/hFcRn小鼠中的免疫抑制作用

[0283] 通过使hCD40小鼠与FcRn基因人源化小鼠(hFcRn小鼠)杂交,还产生了CD40/FcRn双基因人源化小鼠模型。将FcRn基因人源化小鼠工程化以表达人FcRn蛋白(SEQ ID NO:51)。FcRn基因人源化小鼠和CD40/FcRn双基因人源化小鼠(hCD40/hFcRn小鼠)的详细描述可见于PCT/CN2022/075057,其全文以引用方式并入本文。

[0284] 与上述实验相似,在hCD40/hFcRn小鼠中测试了抗CD40抗体布来鲁单抗类似物、12B5-IgG1-LALA-YTE和2F8-IgG1-LALA-YTE的药代动力学(PK)和体内功效。在治疗组(G2-G10)中,在第0天(分组当天)通过腹膜内(i.p.)给药分别给hCD40/hFcRn小鼠注射1mg/kg-4mg/kg(即1mg/kg、2mg/kg或4mg/kg)抗CD40抗体布来鲁单抗类似物、12B5-IgG1-LALA-YTE和2F8-IgG1-LALA-YTE。对照组小鼠(G1)注射等体积的PBS。在第1天(分组后1天)给小鼠腹膜内施用OVA/CFA混合物。在抗体给药后4小时,以及在第1天、第5天、第10天、第17天和第21天,从每只动物收集血清。然后对收集的血清进行PK分析。对在第10天、第17天和第21天从每只动物收集的血清也进行ELISA分析。详细给药方案示于下表中。

[0285] 表3

[0286]

组别	小鼠数	抗体	剂量（mg/kg）	途径	频率	给药总次数
G1	5	PBS	-	i.p.	第0天	1
G2	5	布来鲁单抗类似物	4	i.p.	第0天	1
G3	5	布来鲁单抗类似物	2	i.p.	第0天	1
G4	5	布来鲁单抗类似物	1	i.p.	第0天	1
G5	5	12B5-IgG1-LALA-YTE	4	i.p.	第0天	1
G6	5	12B5-IgG1-LALA-YTE	2	i.p.	第0天	1
G7	5	12B5-IgG1-LALA-YTE	1	i.p.	第0天	1
G8	5	2F8-IgG1-LALA-YTE	4	i.p.	第0天	1
G9	5	2F8-IgG1-LALA-YTE	2	i.p.	第0天	1
G10	5	2F8-IgG1-LALA-YTE	1	i.p.	第0天	1

[0287] 药代动力学结果表明,注射不同抗体后,hCD40/hFcRn小鼠血清中抗体浓度随时间下降,与药代动力学特征一致。第10天、第17天和第21天收集的血清的ELISA结果分别示于下表以及图6至图8中。总之,对照组和治疗组中所有小鼠的抗OVA抗体在整个实验中显示出持续增加的趋势。此外,治疗组小鼠比对照组小鼠产生较少的抗OVA抗体。结果也显示了剂量相关性,即施用抗体的剂量水平越高,产生的抗OVA抗体越少,并且获得的免疫抑制作用越好。通常,2F8-IgG1-LALA-YTE的免疫抑制作用好于12B5-IgG1-LALA-YTE的免疫抑制作用,并且12B5-IgG1-LALA-YTE的免疫抑制作用好于布来鲁单抗类似物的免疫抑制作用。

[0288] 表4

[0289]

组别		第10天（OD值）	第17天（OD值）	第21天（OD值）
G1	平均值	0.28	2.31	2.74
	CV	0.63	0.19	0.09
G2	平均值	0.03	0.08	0.35
	CV	0.06	0.31	0.45
G3	平均值	0.03	1.22	2.34
	CV	0.05	0.17	0.09
G4	平均值	0.05	1.72	2.53
	CV	0.33	0.11	0.12
G5	平均值	0.03	0.16	1.01
	CV	0.04	0.70	0.58
G6	平均值	0.03	0.64	1.61
	CV	0.08	0.62	0.50
G7	平均值	0.04	1.38	2.17
	CV	0.22	0.64	0.26
G8	平均值	0.03	0.03	0.16
	CV	0.02	0.03	1.02
G9	平均值	0.03	0.37	1.34
	CV	0.06	0.77	0.53
G10	平均值	0.03	0.79	1.81
	CV	0.05	0.49	0.35

[0290] CV:变异系数

[0291] 实施例5.药代动力学分析

[0292] hCD40小鼠和C57BL/6小鼠中的PK分析

[0293] 测定hCD40小鼠中抗CD40抗体的药代动力学清除速率。具体地,将小鼠分成4组(每组3只小鼠),并且通过静脉内注射分别施用3mg/kg的布来鲁单抗类似物(G1)、12B5-IgG4-FLAA(G2)、6A4-IgG4-FLAA(G3)和2F8-IgG4-FLAA(G4)。在给药后15分钟、1天、3天、7天、10天和14天以及给药前4天收集血样。

[0294] 通过夹心ELISA测定人抗体的血清水平。简言之,将山羊抗人IgG(H+L)(Jackson ImmunoResearch公司,目录号:109-005-088)稀释至2000ng/mL的终浓度,以100μl/孔加入96孔板(ELISA板),然后于4℃孵育过夜。在孵育结束后,用PBS-T缓冲液(补充有Tween™20的PBS)将板洗涤4次。抗体未结合的区域用2% BSA(牛血清白蛋白)在37℃封闭2小时。然后用PBS-T缓冲液将板洗涤4次。洗涤后,向每个孔中加入100μL血清(1/20稀释(MRD)于1% BSA中)。将孔密封,并且在37℃温育1小时。使用洗板机洗涤板后,以100μl/孔的过氧化物酶AffiniPure F(ab')2片段山羊抗人IgG、Fcγ特异性片段(Jackson ImmunoResearch公司,目录号:109-036-098)加入板的每个孔中,并且在37℃温育1小时。洗涤板后,以100μl/孔的量将四甲基联苯胺(TMB)溶液加入96孔板中作为底物。在室温下避光孵育后,向每个孔中加入100μl终止溶液(Beyotime,目录号:P0215)。使用酶标仪在450nm和630nm波长处读取每个孔的吸光度值。使用Gen5™数据分析软件分析数据。用每种测试产品制备的校准样品的吸光度值和相应浓度建立具有四个参数(即$T_{1/2}$、C_{max}、$AUC_{0天-14天}$和CL)的标准曲线。使用标准曲线计算每个血清样品的抗体浓度。使用在每个时间点计算的样品浓度建立药物浓度-时间曲线。Phoenix™WinNolin8.3用于计算药代动力学参数。结果示于下表中。

[0295] 与上述实验相似,在C57BL/6小鼠中也测定了抗CD40抗体布来鲁单抗类似物、12B5-IgG4-FLAA、6A4-IgG4-FLAA和2F8-IgG4-FLAA的药代动力学清除率。详细给药方案示于下表中。

[0296] 表5

[0297]

组别	抗体	剂量(mg/kg)	途径	小鼠	小鼠数	给药总次数
G1	布来鲁单抗类似物	3	i.v.	hCD40	3	1
G2	12B5-IgG4-FLAA	3	i.v.	hCD40	3	1
G3	6A4-IgG4-FLAA	3	i.v.	hCD40	3	1
G4	2F8-IgG4-FLAA	3	i.v.	hCD40	3	1
G5	布来鲁单抗类似物	3	i.v.	C57BL/6	3	1
G6	12B5-IgG4-FLAA	3	i.v.	C57BL/6	3	1
G7	6A4-IgG4-FLAA	3	i.v.	C57BL/6	3	1
G8	2F8-IgG4-FLAA	3	i.v.	C57BL/6	3	1

[0298] 在抗体给药前4天,检测的抗体浓度为0μg/ml(结果未显示)。如图4和下表所示,结果与典型的药代动力学特征一致,表明注射不同抗体后,hCD40小鼠和C57BL/6小鼠血清中的抗体浓度随时间降低。抗CD40抗体在C57BL/6(B6)小鼠中的半衰期在12.37天-17.70天的范围内,而抗CD40抗体在hCD40小鼠中的半衰期在1.87天-4.84天的范围内。抗CD40抗体在C57BL/6小鼠中的清除率(CL)在4.65ml/天/kg-6.35ml/天/kg的范围内,而抗CD40抗体在hCD40小鼠中的CL在12.92ml/天/kg-14.69ml/天/kg的范围内。结果显示野生型C57BL/6小

鼠中所有抗体浓度相似。相反,在hCD40小鼠中,所有抗体浓度降低更快,这可通过TMDD(靶标介导的药物处置)解释。

[0299] 表6

[0300]

组别		$T_{1/2}$（天）	C_{max}（μg/ml）	$AUC_{0天-14天}$（天*μg/ml）	CL（ml/天/kg）
G1	平均值	4.84	60.64	200.76	12.92
	CV	0.11	0.06	0.08	0.07
G2	平均值	1.87	61.10	201.68	14.69
	CV	0.26	0.09	0.06	0.06
G3	平均值	4.77	53.65	184.74	14.11
	CV	0.12	0.04	0.06	0.09
G4	平均值	4.44	53.85	187.48	14.18
	CV	0.29	0.07	0.07	0.11
G5	平均值	12.37	65.38	292.19	5.75
	CV	0.13	0.07	0.06	0.04
G6	平均值	13.49	71.48	341.94	4.65
	CV	0.19	0.04	0.04	0.11
G7	平均值	12.89	52.84	253.70	6.35
	CV	0.08	0.07	0.09	0.09
G8	平均值	17.70	56.70	262.04	5.18
	CV	0.34	0.08	0.05	0.17

[0301] $T_{1/2}$:终末半衰期

[0302] C_{max}:最大浓度

[0303] $AUC_{0天-14天}$:0天-14天血药浓度-时间曲线下面积

[0304] CL:清除率

[0305] hFcRn小鼠中的PK分析

[0306] 与上述实验相似,在hFcRn小鼠中测定抗CD40抗体12B5的药代动力学清除率,并且将小鼠分成4组(每组5只小鼠)。通过静脉内注射施用2mg/kg 12B5-IgG1-LALA-YTE(G1)、12B5-IgG1-N297A-YTE(G2)、12B5-IgG4-YTE(G3)或12B5-IgG4-FLAA(G4)。在给药后2小时、1天、3天、7天、10天、14天、21天、28天和35天以及给药前4天收集血样。详细给药方案示于下表中。

[0307] 表7

[0308]

组别	抗体	剂量（mg/kg）	途径	小鼠数	给药总次数

[0309]

G1	12B5-IgG1-LALA-YTE	2	i.v.	5	1
G2	12B5-IgG1-N297A-YTE	2	i.v.	5	1
G3	12B5-IgG4-YTE	2	i.v.	5	1
G4	12B5-IgG4-FLAA	2	i.v.	5	1

[0310] 在抗体给药前4天,检测的抗体浓度为0μg/ml(结果未显示)。如图5和下表所示,结果与典型的药代动力学特征一致,表明注射不同抗体后,hFcRn小鼠血清中的抗体浓度随时

间降低。小鼠中12B5-IgG1-LALA-YTE(G1)和12B5-IgG4-YTE(G3)的半衰期($T_{1/2}$)分别为11.99天和13.72天。12B5-IgG1-N297A-YTE(G2)表现出6.58天的最短半衰期。结果显示,12B5-IgG1-N297A-YTE(G2)具有最短的半衰期。12B5-IgG1-LALA-YTE(G1)和12B5-IgG4-YTE(G3)的半衰期比12B5-IgG4-FLAA(G4)的半衰期长。

[0311] 表8

[0312]

组别		$T_{1/2}$ (天)	C_{max} (μg/ml)	$AUC_{0天-35天}$ (天*μg/ml)	CL (ml/天/kg)
G1	平均值	11.99	26.83	260.73	6.59
	CV	0.10	0.07	0.06	0.05
G2	平均值	6.58	23.76	129.08	15.09
	CV	0.04	0.09	0.03	0.03
G3	平均值	13.72	26.47	249.21	6.62
	CV	0.04	0.10	0.05	0.05
G4	平均值	10.53	26.74	193.54	9.29
	CV	0.07	0.10	0.08	0.07

[0313] $T_{1/2}$:终末半衰期;

[0314] C_{max}:最大浓度;

[0315] $AUC_{0天-35天}$:0天-35天血药浓度-时间曲线下面积

[0316] CL:清除率

[0317] 实施例6.抗CD40抗体对人FcRn的结合亲和力

[0318] 使用配备有预固定的蛋白A传感器芯片的Biacore™(Biacore,Inc.,美国新泽西州皮斯卡塔韦)8K或T200生物传感器,使用表面等离子体共振(SPR)测量抗CD40抗体12B5-IgG1-LALA-YTE、12B5-IgG1-N297A-YTE、12B5-IgG4-YTE和12B5-IgG4对人FcRn的结合亲和力。

[0319] 将hFcRn-His(FCGRT&B2M异二聚体蛋白,His标签&Strep II标签(SPR&BLI&MALS验证,北京百普赛斯生物科技股份有限公司,目录号:FCM-H5286))用1×HBS-EP+缓冲液(PH 7.4)稀释至1μg/ml,然后以10μl/min注射到BiacoreTM8K或T200生物传感器中,持续约50秒以满足所需的捕获水平(例如,约200个响应单位(RU))。然后以30μl/min的速率注射1250nM、625nM、312.5nM、156.25nM、78.125nM或0nM浓度的纯化抗CD40抗体(用1×HBS-EP+缓冲液(PH 7.4)),持续50秒。监测解离,持续200秒。在每轮滴定的最后一次注射后,以30μl/min的速率用甘氨酸溶液(pH 1.7)持续30秒再生芯片。获得结合曲线。通过分析软件进行数据分析,并且使用稳态亲和结合模型拟合结合和解离曲线,以获得亲和动力学数据。

[0320] 将1×HBS-EP+缓冲液(pH 7.4)替换为1×HBS-EP+缓冲(pH 6.0),重复上述实验。

[0321] 如本领域普通技术人员将理解的,对各受试抗体采用适当调节参数(例如抗体浓度)的相同方法。受试抗体的结果汇总于下表中。

[0322] 结果示于下表中。当pH值为7.4时,12B5-IgG4-FLAA不与hFcRn结合,而其他抗体与hFcRn结合。在pH 6.0时,所有抗体对hFcRn都表现出高结合亲和力。结果表明,在酸性条件下,所有抗体对hFcRn的亲和力都增加。此外,12B5-IgG1-LALA-YTE和12B5-IgG4-YTE对hFcRn的结合亲和力高于12B5-IgG1-N297A-YTE。

[0323] 表9

[0324]

捕获物1溶液	分析物1溶液	KD（M）
12B5-IgG1-LALA-YTE	hFcRn-His (PH 6.0)	3.78E-08
12B5-IgG1-N297A-YTE	hFcRn-His (PH 6.0)	1.12E-07
12B5-IgG4-YTE	hFcRn-His (PH 6.0)	9.10E-08
12B5-IgG4-FLAA	hFcRn-His (PH 6.0)	4.97E-07
12B5-IgG1-LALA-YTE	hFcRn-His (PH 7.4)	1.18E-06
12B5-IgG1-N297A-YTE	hFcRn-His (PH 7.4)	2.68E-06
12B5-IgG4-YTE	hFcRn-His (PH 7.4)	2.06E-06
12B5-IgG4-FLAA	hFcRn-His (PH 7.4)	—

[0325] 实施例7.抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的测定

[0326] 利妥昔单抗(VH SEQ ID NO:67,VL SEQ ID NO:68)是靶向CD20的嵌合单克隆抗体,并且在1997年首次推出作为复发性或难治性低级或滤泡性CD20阳性B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)的静脉内治疗。

[0327] 在该实验中,将FcR-TANK细胞(宜明昂科生物医药技术(上海)股份有限公司)用作效应细胞,并且将Raji细胞(ATCC,目录号:CCL-86)用作靶细胞。将细胞与每种抗体(终浓度50μg/mL)以3:1的E:T(效应子:靶标)比孵育2小时或4小时,以测定ADCC活性。

[0328] 结果示于图12中。2F8-IgG1和利妥昔单抗类似物具有ADCC活性,但2F8-IgG1-LALA-YTE未显示ADCC作用。

[0329] 实施例8.补体依赖性细胞毒性(CDC)的测定

[0330] 进行实验以评估抗CD40抗体的CDC作用。在实验中,将Raji细胞(细胞密度5×10^4个细胞/孔)接种在96孔板中,然后加入终浓度为50μg/mL的抗体2F8-IgG1-LALA-YTE、利妥昔单抗类似物或人IgG1。将细胞与每种抗体在37℃下温育30分钟,然后加入稀释的正常人血清补体(QIDEL,目录号:A113)。在37℃5% CO_2温育1.5小时后,将PrestoBlue™细胞活力试剂(Invitrogen,目录号:2413466)加入每个孔,并将板在37℃与5% CO_2温育2小时。

[0331] 结果示于图13中。2F8-IgG1-LALA-YTE没有表现出CDC作用,而阳性对照利妥昔单抗类似物表现出强CDC作用。

[0332] 实施例9.抗CD40抗体对PBMC增殖的抑制作用

[0333] 将外周血单核细胞(PBMC)接种在96孔板中(5×10^4个细胞/孔)。向每个孔中加入连续稀释的抗体2F8-IgG1-LALA-YTE或hIgG1(100ng/mL、10ng/mL、8ng/mL、5ng/mL、4ng/mL、2ng/mL、1ng/mL、0.5ng/mL或0.25ng/mL),并且在37℃温育1小时。然后将10μl缀合shCD154(人CD40配体/TNFSF5蛋白、His、Flag标签(活性三聚体MALS验证),ACRO,目录号:CDL-H52Db)的抗-FLAG抗体(Sigma,目录号:F1804)加入每个孔中,并且将板在37℃温育64小时。使用诺唯赞生物科技CellCounting-Lite®2.0发光细胞活力测定(诺唯赞,目录号:DD1101-02)通过酶标仪测量荧光信号。

[0334] 结果示于图14中,其表明2F8-IgG1-LALA-YTE有效抑制PBMC增殖。

[0335] 实施例10.抗CD40抗体对B细胞增殖的抑制作用

[0336] 在外周血中,可根据分化、成熟和活化的不同阶段来区分B细胞亚群,其特征在于表达不同的表面标记物,诸如CD19、CD20、CD27、CD23、CD69、CD80和CD86,其中CD23、CD69、CD80和CD86是活性B细胞的特殊表面标记物。

[0337] 在该实验中,人PBMC细胞以1×10^{5}个细胞/孔的密度接种在96孔板中。抗CD40抗体2F8-IgG1-LALA-YTE和hIgG1自1000ng/mL的最高浓度连续稀释(3倍)。将10μL抗体加入96孔板中。在37℃温育1小时后,加入10μL缀合shCD154的抗FLAG®M2抗体(Sigma,目录号:F1804),并且在37℃温育18小时。然后,在流式细胞术分析之前,将细胞与PE抗人CD20(BioLegend,目录号:302306)、PerCP/Cyanine5.5抗人CD69抗体(BioLegend,目录号:310926)、Brilliant Violet 421™抗人CD86抗体(BioLegend,目录号:305426)、FITC抗人CD80抗体(BioLegend,目录号:375406)、APC/Cy7抗人CD23(BioLegend,目录号:338502)、人CD40配体/TNFSF5蛋白、His、Flag标签(活性三聚体)(MALS验证)(ACRO,目录号:CDL-H52Db-100ug)和单克隆抗FLAG®M2抗体(Sigma,目录号:F1804-1MG)在4℃避光孵育30分钟。结果示于图15A至图15B中。

[0338] 随着2F8-IgG1-LALA-YTE浓度的增加,活化B细胞亚群的百分比全部降低,表明2F8-IgG1-LALA-YTE有效抑制B细胞的增殖和活化。

[0339] 实施例11.使用hCD40/hFcRn小鼠的EAE模型评估抗CD40抗体的作用

[0340] 实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)是人炎性脱髓鞘疾病多发性硬化症(MS)的最常用的实验模型。在该实验中,用hCD40/hFcRn小鼠建立EAE模型,分析人抗CD40抗体的作用。具体地,将hCD40/hFcRn小鼠分成对照组(G1)和两个治疗组(G2和G3)。然后,在第1天(分组后一天),通过向后肋骨的两个点注射100μL MOG(髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(35-55))(300μg/小鼠的剂量水平)免疫hCD40/hFcRn小鼠,并且在免疫后2小时和48小时腹膜内注射250μL PTX(百日咳毒素),获得EAE模型。对照组(G1)小鼠注射等体积的PBS。

[0341] 在第0天(分组当天)、第4天(分组后4天)和第8天(分组后8天),通过腹膜内注射,分别给G2和G3组小鼠施用10mg/kg hIgG1或2F8-IgG1-LALA-YTE。对照组小鼠(G1)不注射。对小鼠称重并每天检查EAE的神经症状,根据以下等级评分:0=无症状;1=尾巴松软;2=后肢无力;3=后肢瘫痪;4=前肢瘫痪;5=小鼠垂死或死亡;0.5等级代表中间分数。在实验结束时(分组后30天),收集脊髓用于组织病理学分析。详细给药方案示于下表中。

[0342] 表10

[0343]

组别	抗体	剂量(mg/kg)	途径	小鼠数	给药总次数
G1	-	-	-	8	-
G2	hIgG1	10	i.p.	8	3
G3	2F8-IgG1-LALA-YTE	10	i.p.	8	3

[0344] 如图16至图19所示,2F8-IgG1-LALA-YTE(G3)可预防由动物建模引起的体重减轻(图16),并且降低临床评分(图17)。在施用2F8-IgG1-LALA-YTE的EAE小鼠中,脊髓炎细胞浸润(图18)和脊髓脱髓鞘(图19)也有一定的改善作用。

[0345] 实施例12.使用hCD40小鼠的CIA模型评估抗CD40抗体的作用

[0346] 胶原诱导性关节炎(CIA)模型是一种常用的模型,因为它与人类类风湿性关节炎(RA)具有免疫学和病理学上的相似性。用hCD40小鼠建立CIA模型,分析人抗CD40抗体的作用。

[0347] 具体地,将hCD40小鼠分成对照组(G1)和两个模型组(G2和G3)。然后,在第0天(免疫的第一天),通过向尾根的两个点注射50μL II型胶原(CII)乳剂(由等体积的CFA和来自

鸡胸软骨的胶原(SIGMA目录号:C9301)组成)免疫hCD40小鼠。第21天(第一次免疫后21天)用相同剂量进行第二次免疫以获得CIA模型。对照组(G1)注射等体积的PBS。

[0348] 在第0天、第4天、第7天、第20天、第24天和第27天,通过腹膜内注射给G3小鼠施用3mg/kg 12B5-IgG1-LALA-YTE。给G2小鼠施用等体积的PBS。G1小鼠不注射。对所有小鼠称重并每天监测以下部位的红斑和肿胀迹象:(A)指趾间关节,(B)掌指关节和(C)前爪腕关节和后爪跖趾关节和踝关节。在单个爪中临床关节炎的严重程度以0-4的等级评分如下:

[0349] 0=正常。相对于健康小鼠,外观没有明显差异;

[0350] 1=一种类型的关节(A、B或C)红斑和肿胀;

[0351] 2=两种类型的关节(A、B或C)红斑和肿胀;

[0352] 3=所有三种类型的关节(A、B或C)红斑和肿胀;以及

[0353] 4=整个爪红斑和肿胀。

[0354] 动物的评分是以0-16的等级的所有四肢评分的总和。在实验结束时(第一次免疫后56天),收集肢体用于组织病理学分析。详细给药方案示于下表中。

[0355] 表11

[0356]

组别	抗体	剂量(mg/kg)	途径	小鼠数	给药总次数
G1	-	-	-	10	-
G2	PBS	-	i.p.	10	6
G3	12B5-IgG1-LALA-YTE	3	i.p.	10	6

[0357] 如图20至图23所示,如与对照组G2相比,12B5-IgG1-LALA-YTE(G3)可预防由动物建模引起的体重减轻(图20),并且显著降低临床严重性,表现为较低的临床评分和发病率(图21至图22)。如图23所示,关节组织的组织病理学分析结果表明,与对照组相比,12B5-IgG1-LALA-YTE治疗组中炎性细胞流入(a)、滑膜增生(b)、血管翳形成(c)和脊髓脱髓鞘也得到改善。

[0358] 实施例13.抗CD40抗体的体内功效

[0359] 过敏性皮炎(AD)是一种皮肤的炎性病症,其特征在于红斑、瘙痒、脱皮、苔藓样硬化和丘疱疹。

[0360] 在该实验中,评估了抗CD40抗体2F8-IgG1-LALA-YTE在诊断为患有AD的狗中的体内功效。在实验之前,该狗具有超过1年的复发性AD症状,并且接受重复的糖皮质激素治疗。具体地,通过静脉内(i.v.)注射施用抗体。基于狗的体重计算注射量。给药频率为每2周一次(总共6次给药)。两次注射后,观察到狗皮肤上的红斑显著减少。还收集外周血以测试血液生化和全血细胞计数(CBC)。结果显示受试抗体2F8-IgG1-LALA-YTE耐受性良好,并且对狗没有毒性。没有观察到不良反应。

[0361] 其他实施方案

[0362] 应当理解,尽管已经结合本发明的具体实施方式对本发明进行了描述,但是前面的描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在以下权利要求的范围内。

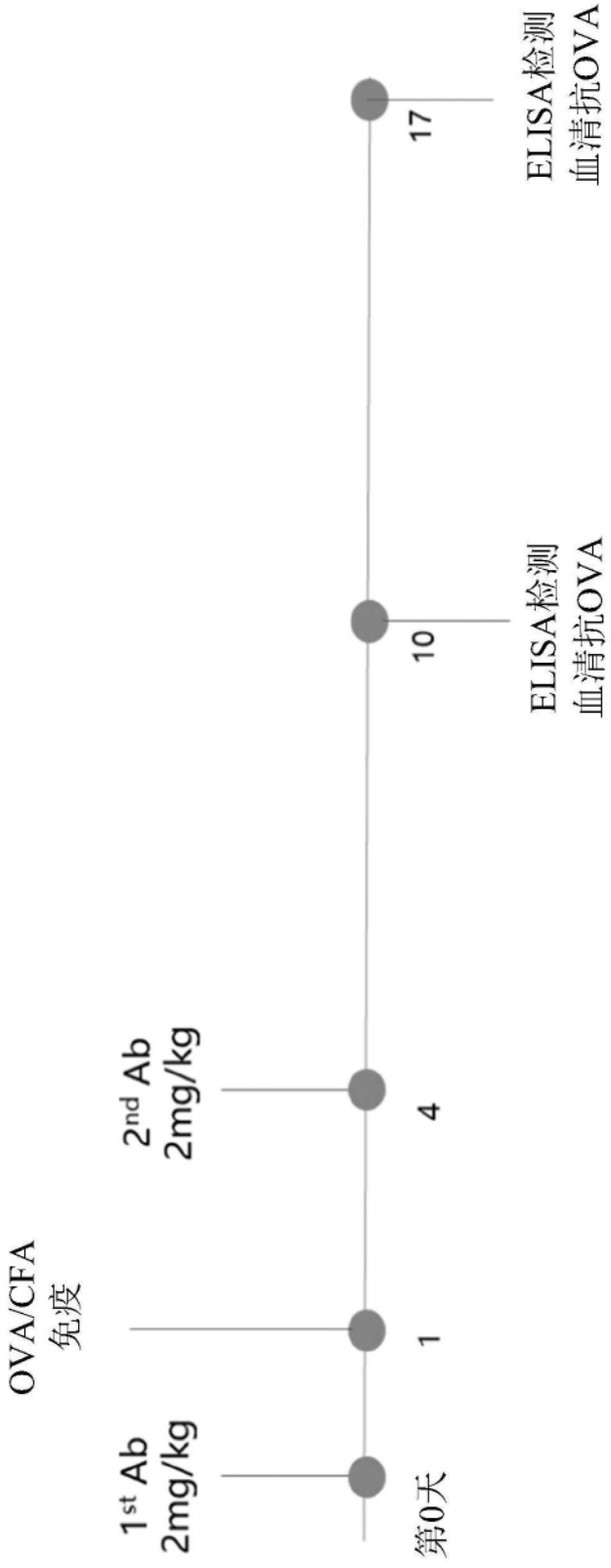

1st Ab
2mg/kg
OVA/CFA
免疫
2nd Ab
2mg/kg
第0天
1
4
10
17
ELISA检测
血清抗OVA
ELISA检测
血清抗OVA

图1

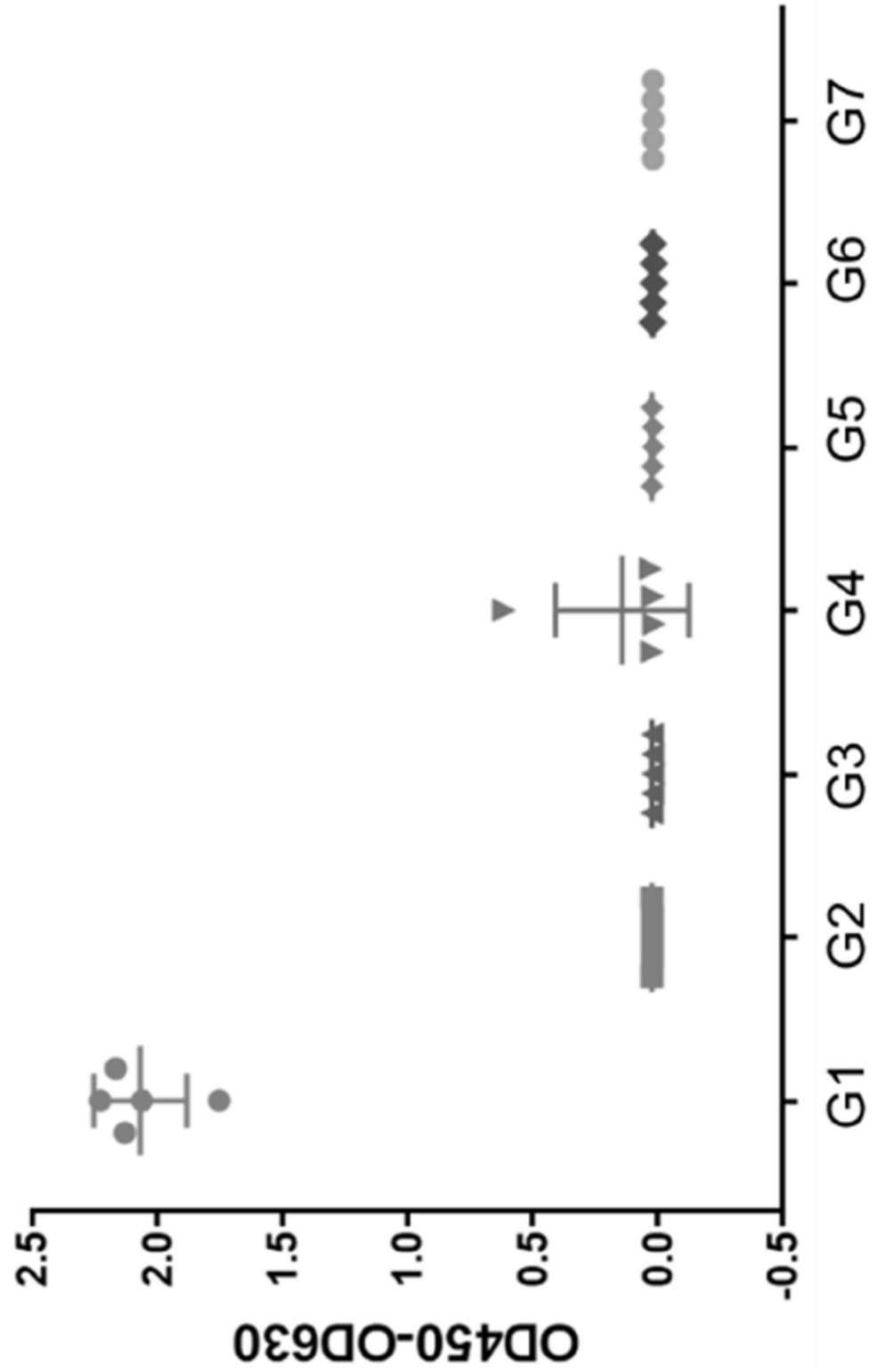


图2

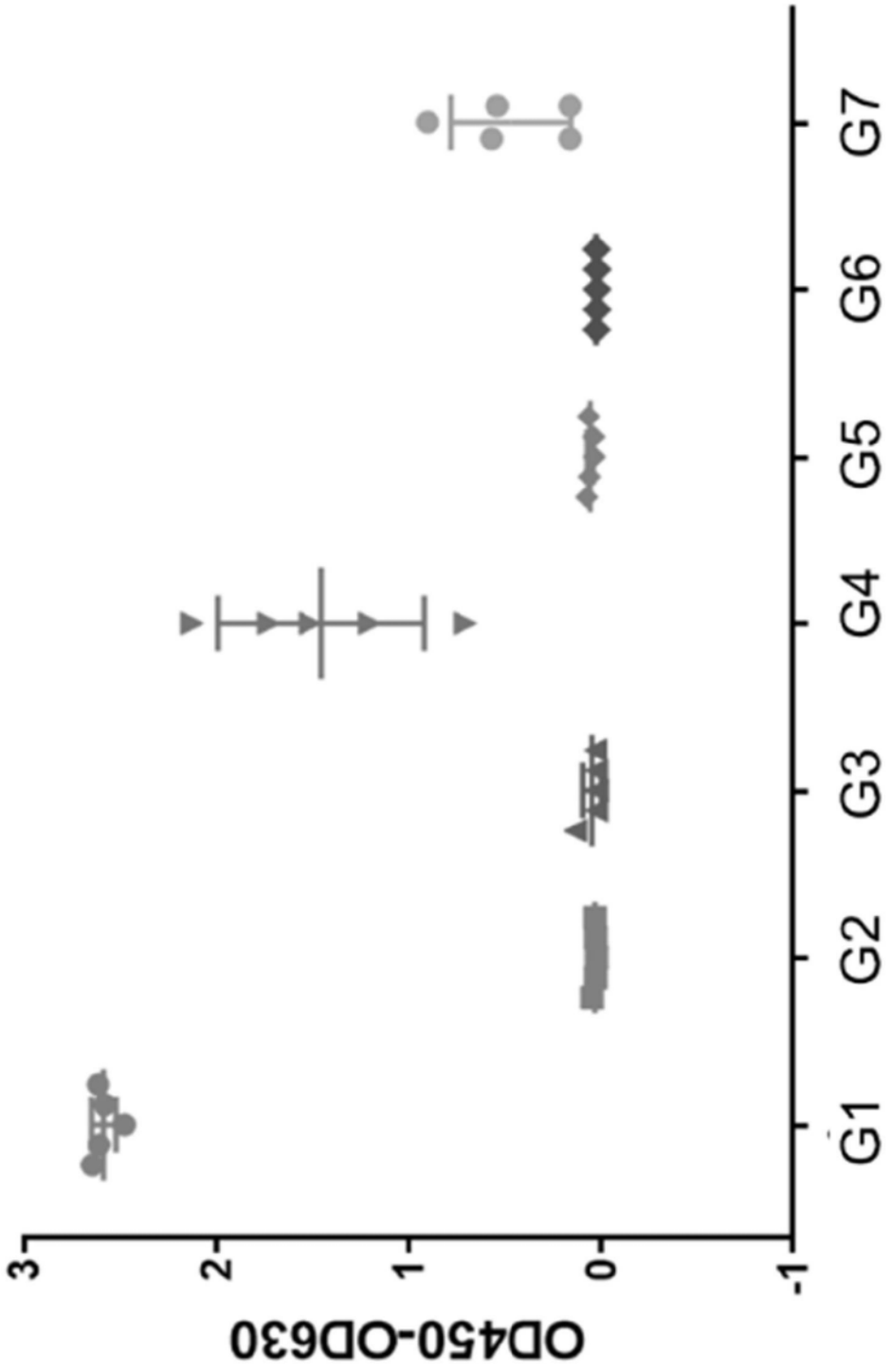


图3

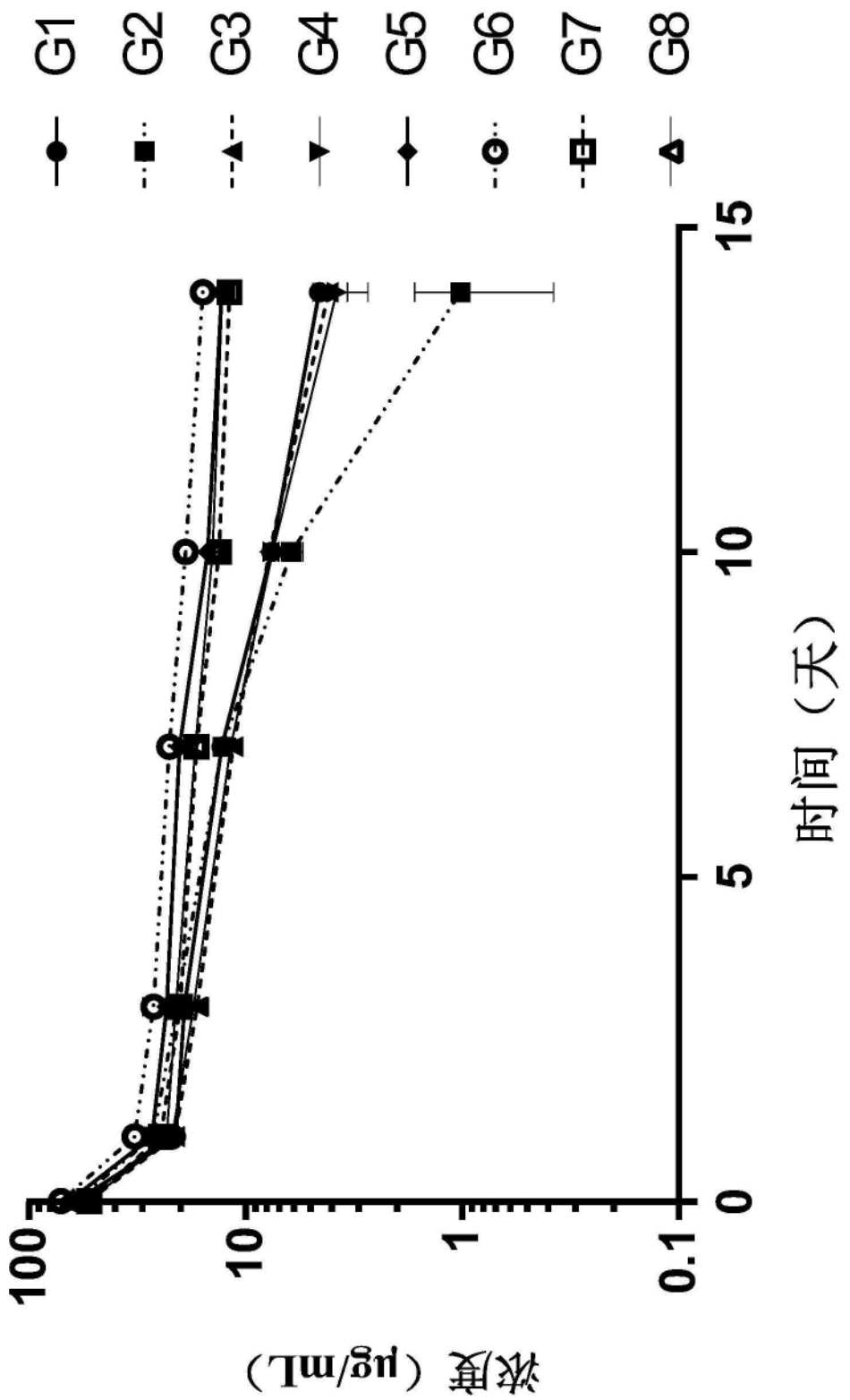


图4

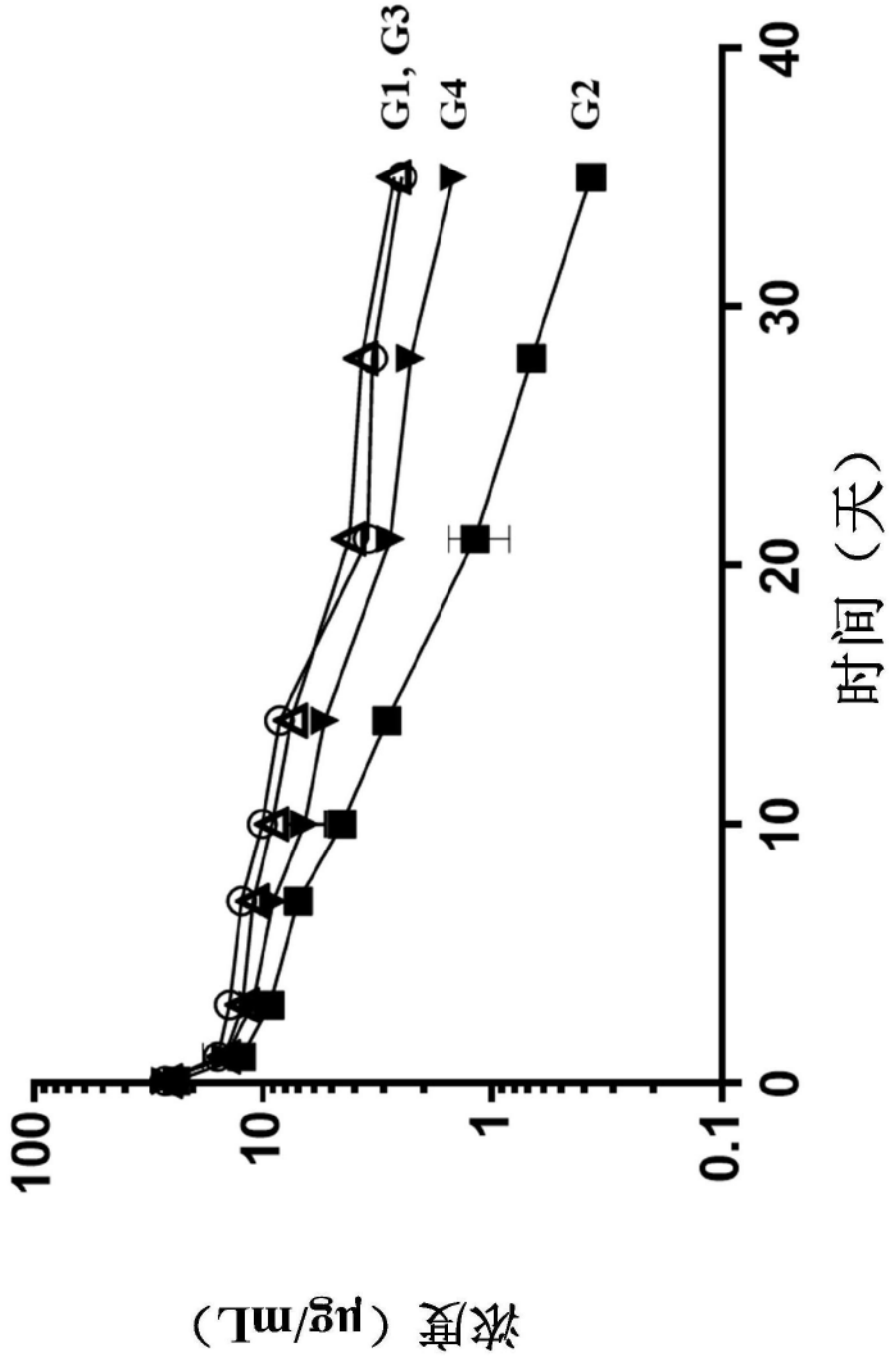


图5

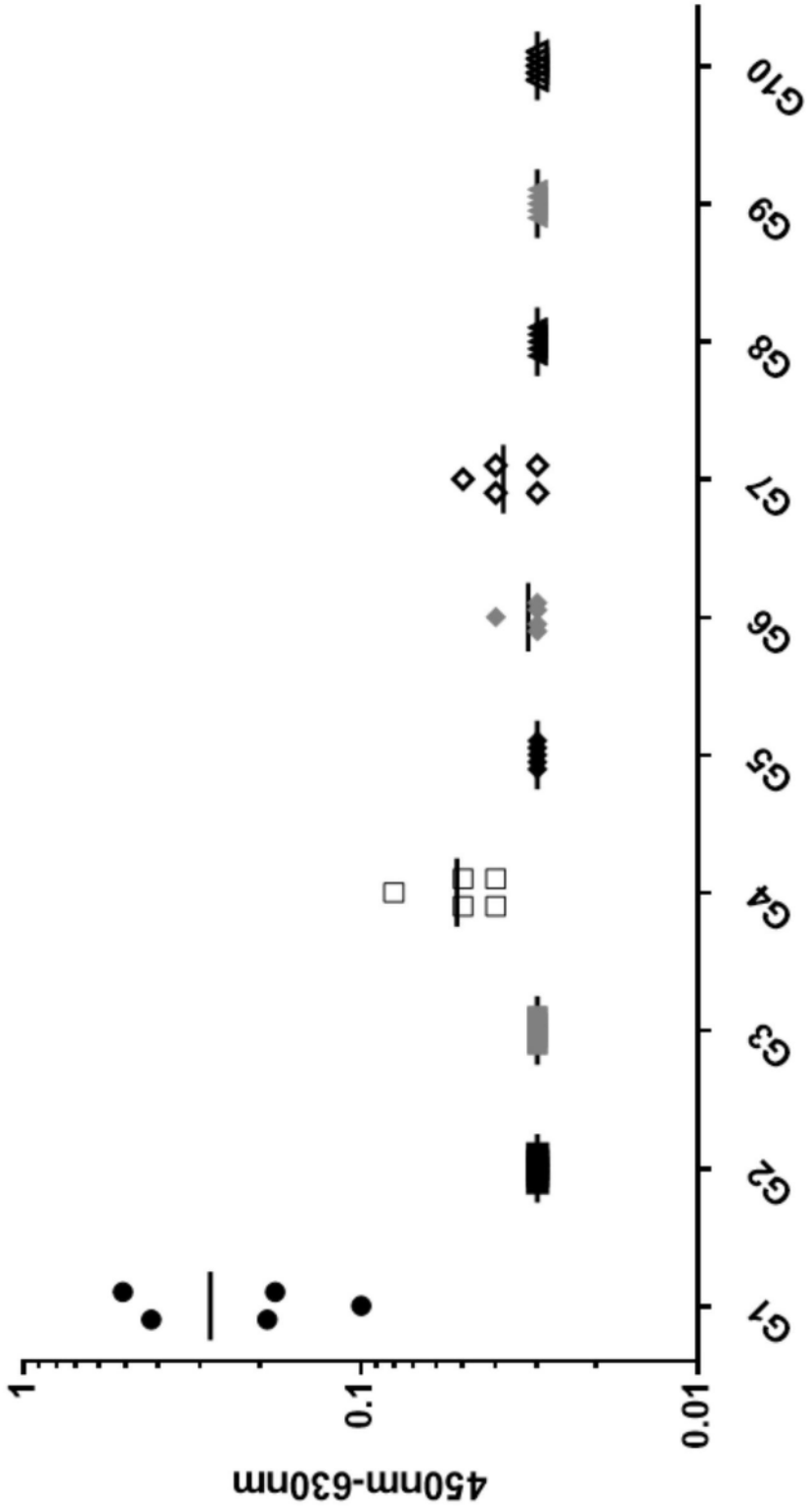


图6

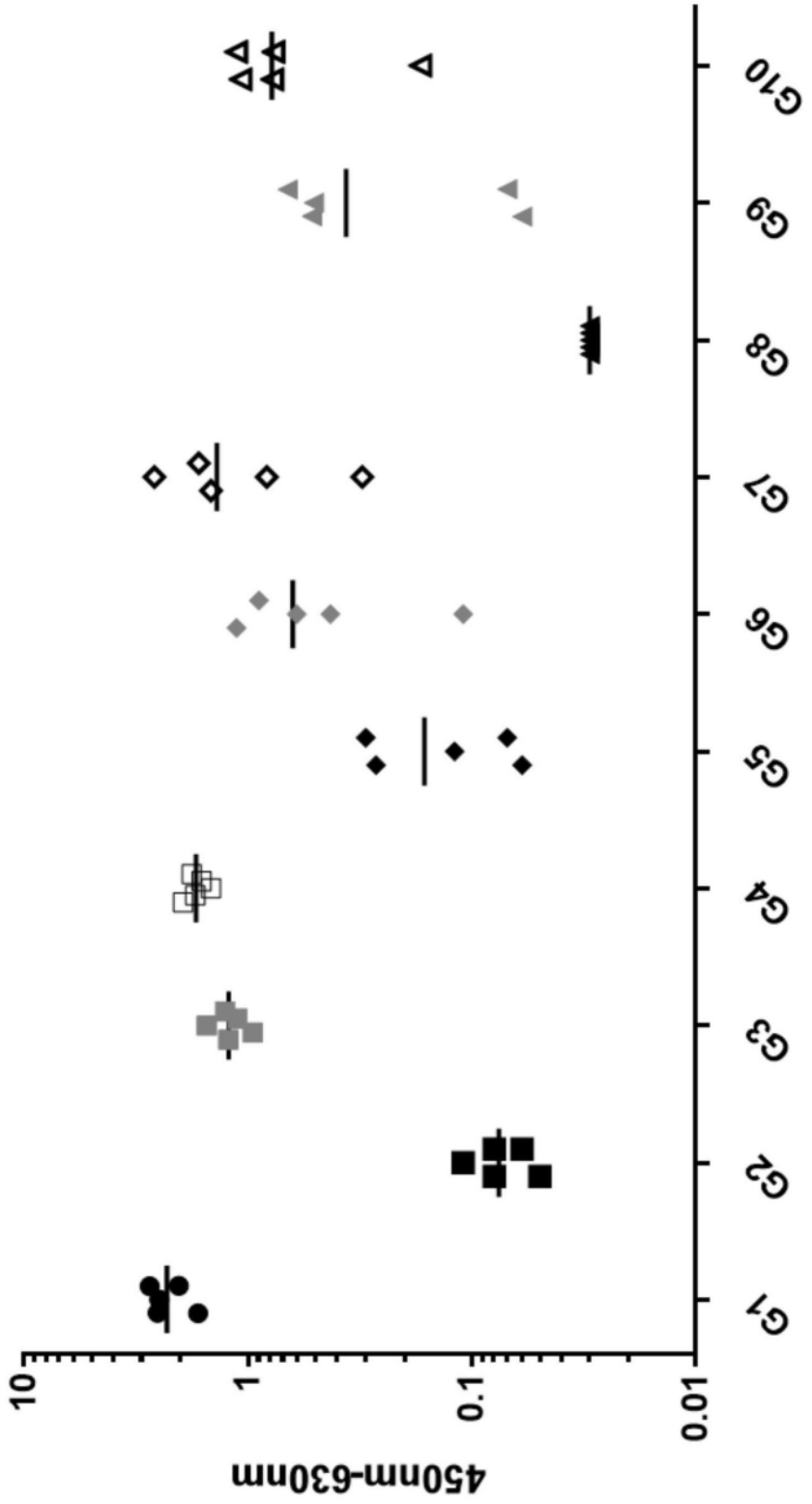


图7



图8

抗CD40抗体的Kabat CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID NO:	VH CDR2	SEQ ID NO:	VH CDR3	SEQ ID NO:	VL CDR1	SEQ ID NO:	VL CDR2	SEQ ID NO:	VL CDR3	SEQ ID NO:
2F8	SYAMH	1	VISYDGDNKY HAESVKG	2	RGTVTNY YSYSGLD V	3	RSSQSLL YSNGKN YLD	4	LASNRA S	5	MQALQT PRT	6
6A4	NYVMS	7	TIRGSGISTYY TDSVKG	8	GIVGATTP FDY	9	RASQSV RSFLA	10	ETSNRA T	11	QQRSDW PPT	12
12B5	YYYWS	13	HISYSGSTNY NPSLKS	14	GIVGARR GFDF	15	RASQSV SNNLA	16	DASNRA A	17	QQRNNW PPT	18

图9

抗CD40抗体的Chothia CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID NO:	VH CDR2	SEQ ID NO:	VH CDR3	SEQ ID NO:	VL CDR1	SEQ ID NO:	VL CDR2	SEQ ID NO:	VL CDR3	SEQ ID NO:
2F8	GFSFSSY	19	SYDGDN	20	RGTVTNYY SYSGLDV	21	RSSQSLLY SNGKNYL D	22	LASNRAS	23	MQALQT PRT	24
6A4	GFTFSNY	25	RGSGIS	26	GIVGATTPF DY	27	RASQSVR SFLA	28	ETSNRAT	29	QQRSD WPPT	30
12B5	GGSISYY	31	SYSGS	32	GIVGARRGF DF	33	RASQSVS NNLA	34	DASNRAA	35	QQRNN WPPT	36

图10

抗体可变结构域	氨基酸序列	SEQ ID NO
2F8人重链可变区	EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYAMHWVRQVPGKGLEWVSVISYDGDNKYHAESVKGRFTISRDN SKNILYLQMNSLRPEDTAVYYCARRGTVTNYYSYSGLDVWGQGTTVTVSS	65
2F8人轻链可变区	DIQLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGKNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLASNRASGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYFCMQALQTPRTFGQGTKVEIKR	37
6A4人重链可变区	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYVMSWVRQAPGKGLEWVSTIRGSGISTYYTDSVKGRFTTSRDNP KNTLFLQMSSLRAEDTAVYYCAKGIVGATTPFDYWGQGTLVTVSS	38
6A4人轻链可变区	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSFLAWYQQKPGQAPRLLIYETSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQQRSDWPPTFGQGTKVEIKR	39
12B5人重链可变区	QVQLVQSGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISYYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSTNYNPSLKSRVTISEDTSKKQ FSLKLDSVTAADTAVYYCAGGIVGARRGFDFWGQGTLVTVSS	40
12B5人轻链可变区	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSNNLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAADIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCQQRNNWPPTFGQGTKVEIKR	41

图11

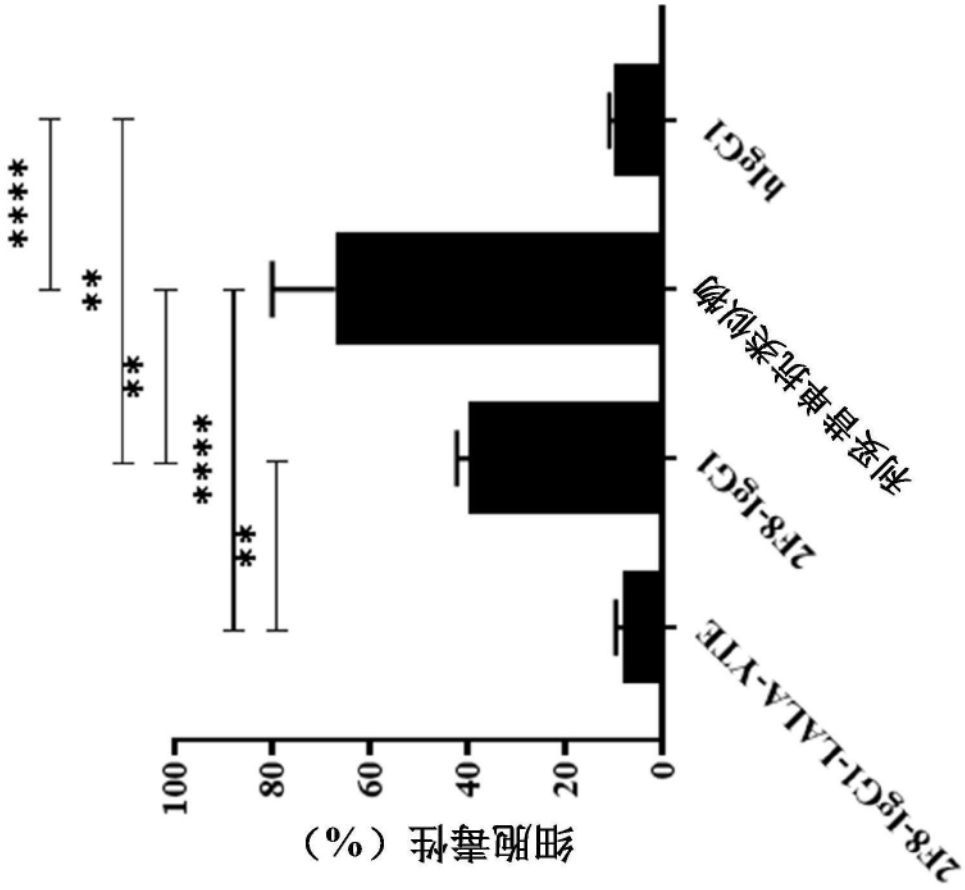

hIgG1
利妥昔单抗类似物
2F8-IgG1
2F8-IgG1-LALA-YTE
细胞毒性（%）
0
20
40
60
80
100
**
**
****
**
****

图12

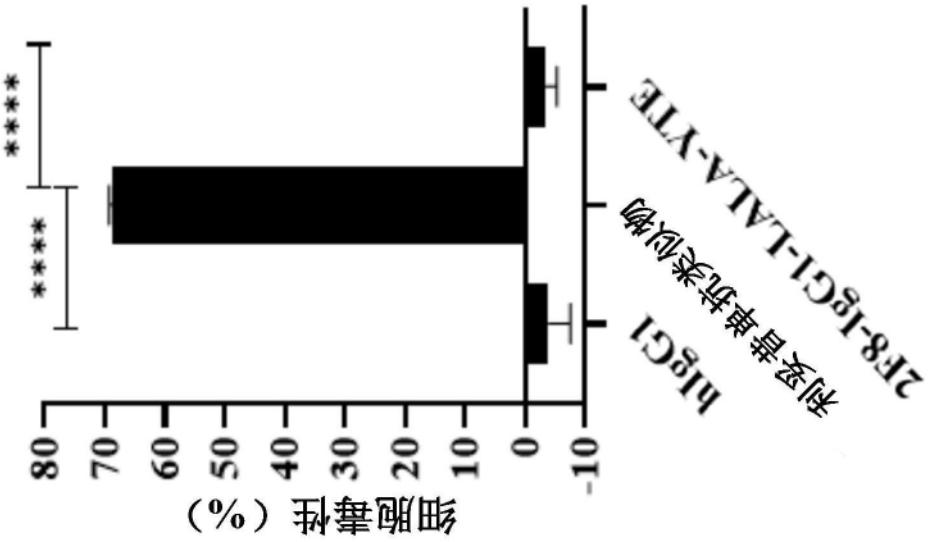

hIgG1
利妥昔单抗类似物
2F8-IgG1-LALA-YTE
细胞毒性（%）
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
****
****

图13

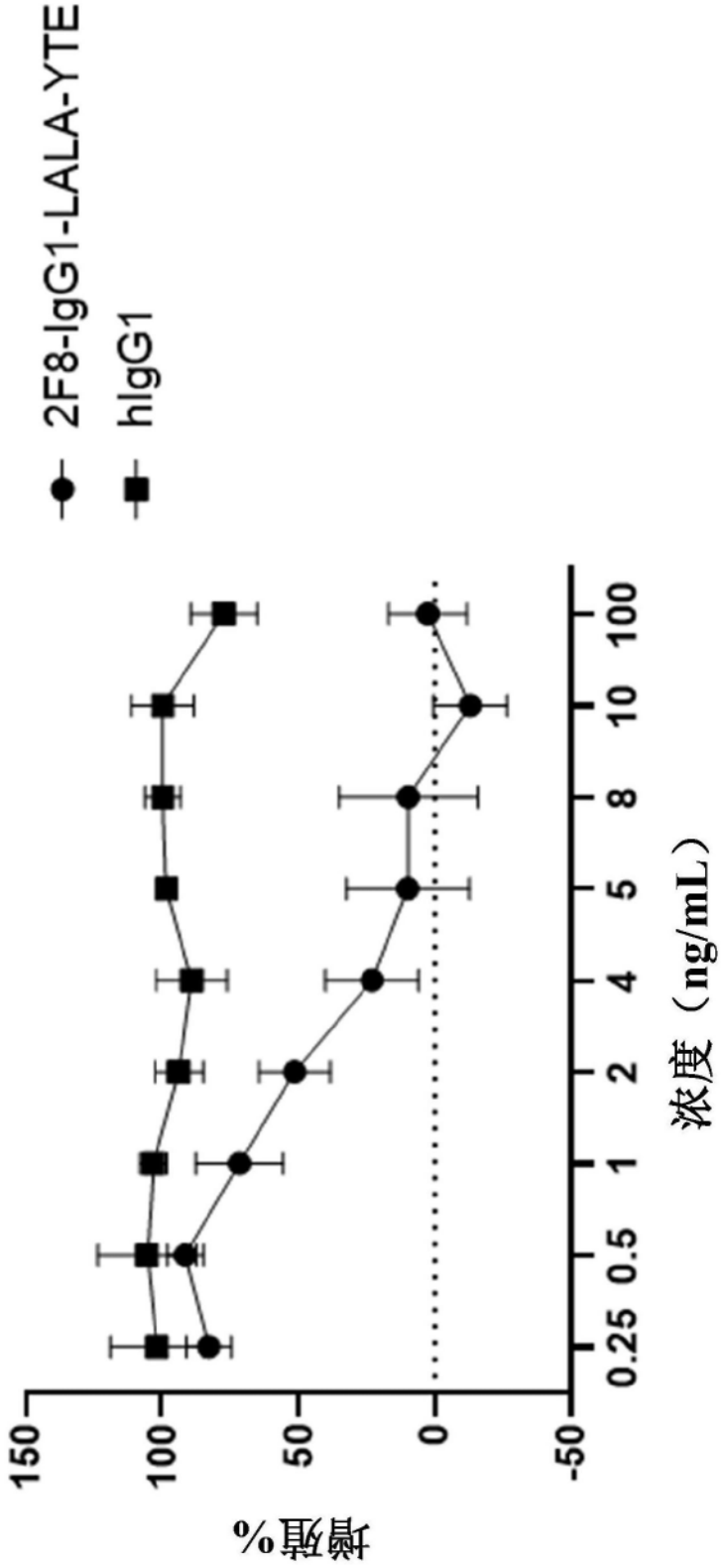

2F8-IgG1-LALA-YTE
hIgG1
增殖%
150
100
50
0
-50
0.25
0.5
1
2
4
5
8
10
100
浓度（ng/mL）

图14

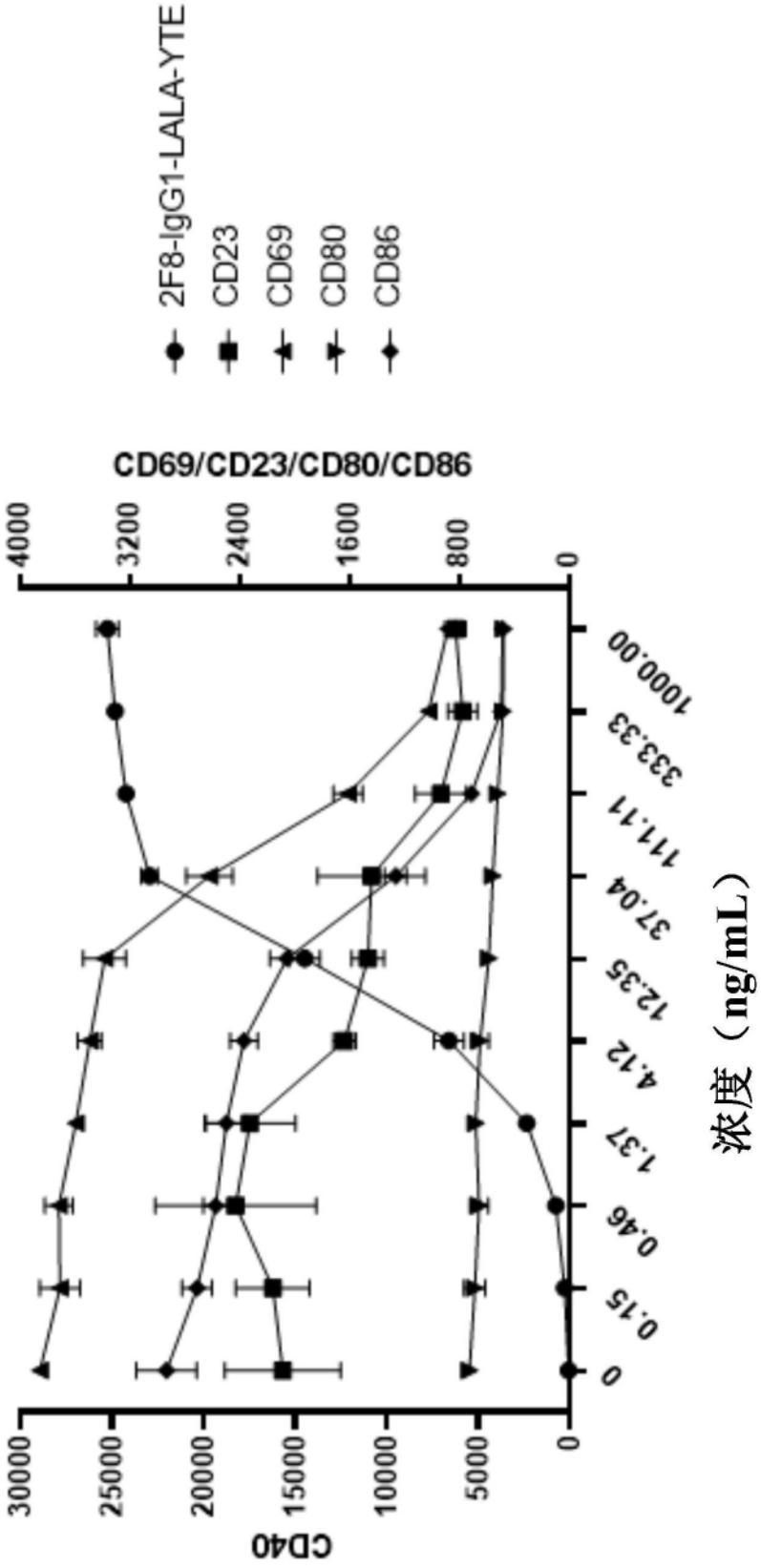

2F8-IgG1-LALA-YTE
CD23
CD69
CD80
CD86
CD69/CD23/CD80/CD86
4000
3200
2400
1600
800
0
CD40
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
浓度（ng/mL）
1000.00
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
1.37
0.46
0.15
0

图15A

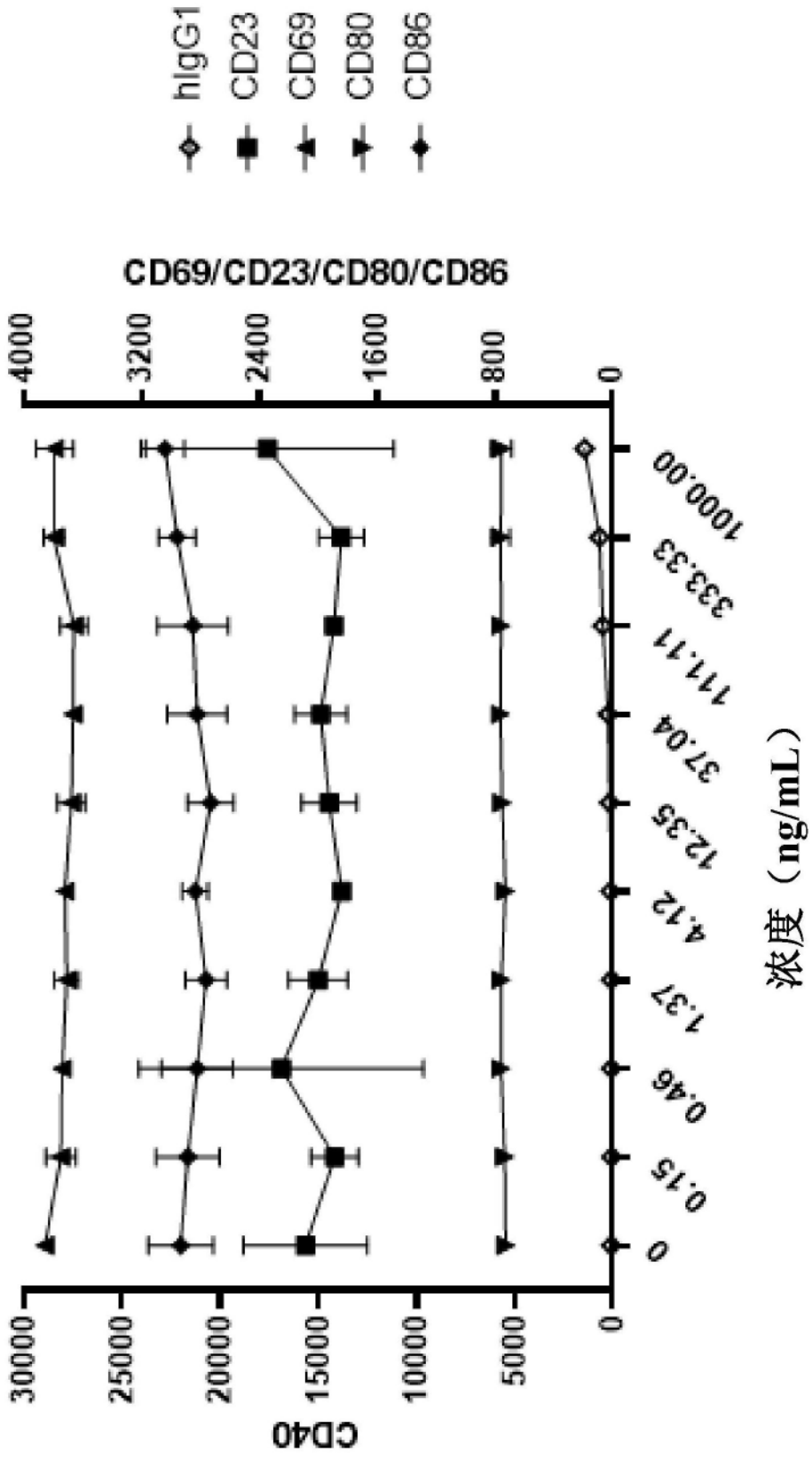

hIgG1
CD23
CD69
CD80
CD86
CD69/CD23/CD80/CD86
CD40
浓度（ng/mL）
4000
3200
2400
1600
800
0
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1000.00
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
1.37
0.46
0.15
0

图15B

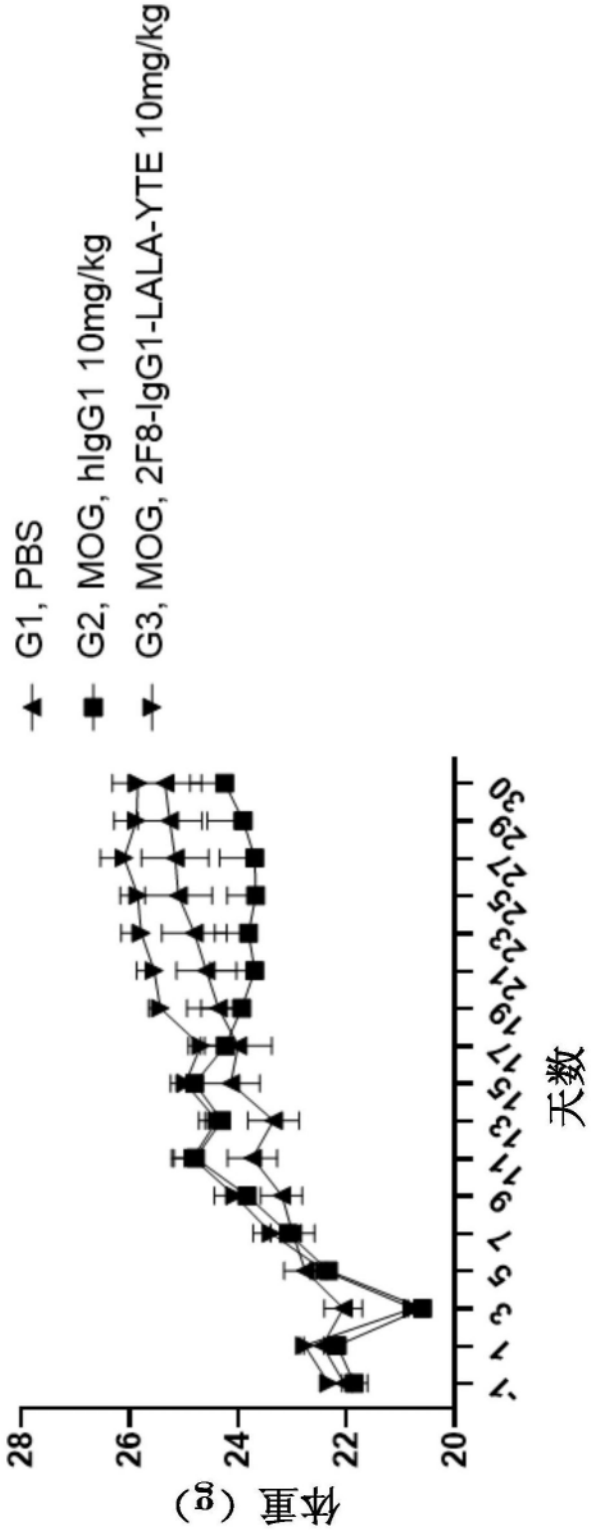

G1, PBS
G2, MOG, hIgG1 10mg/kg
G3, MOG, 2F8-IgG1-LALA-YTE 10mg/kg
体重（g）
28
26
24
22
20
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 30
天数

图16

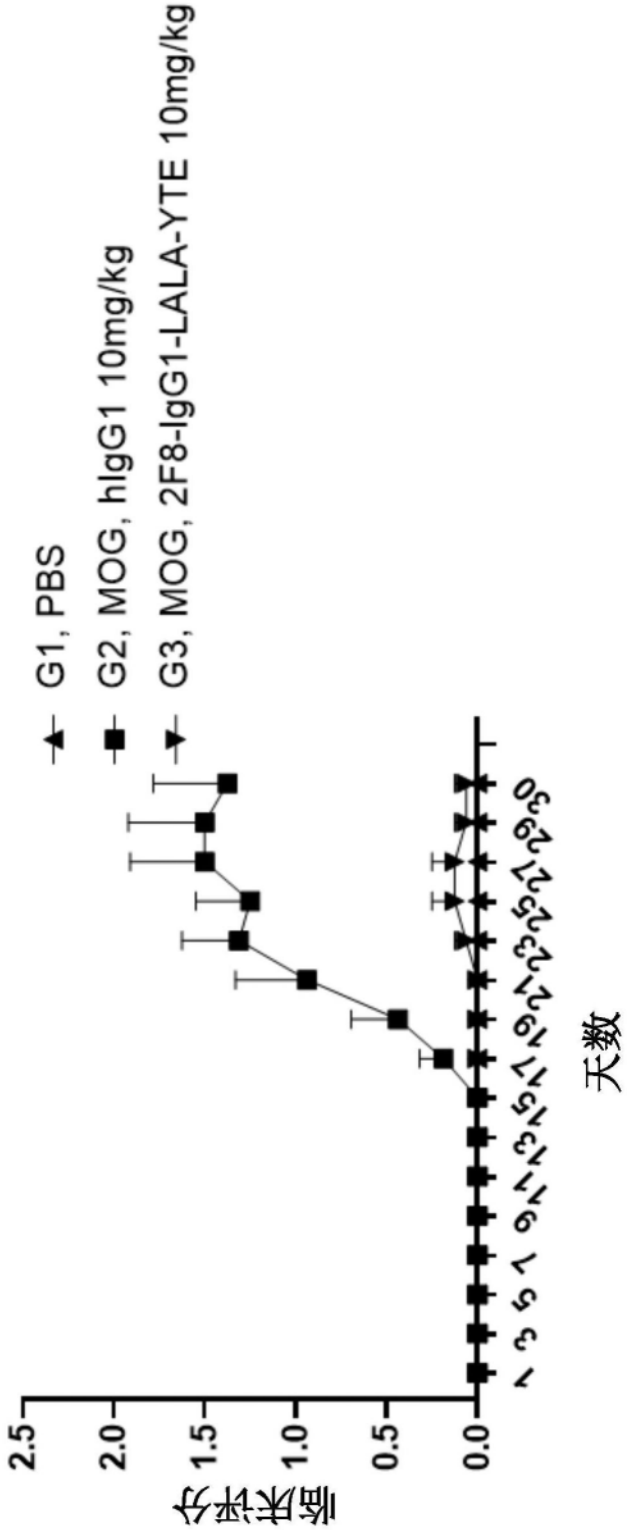

G1, PBS
G2, MOG, hIgG1 10mg/kg
G3, MOG, 2F8-IgG1-LALA-YTE 10mg/kg
临床评分
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 30
天数

图17

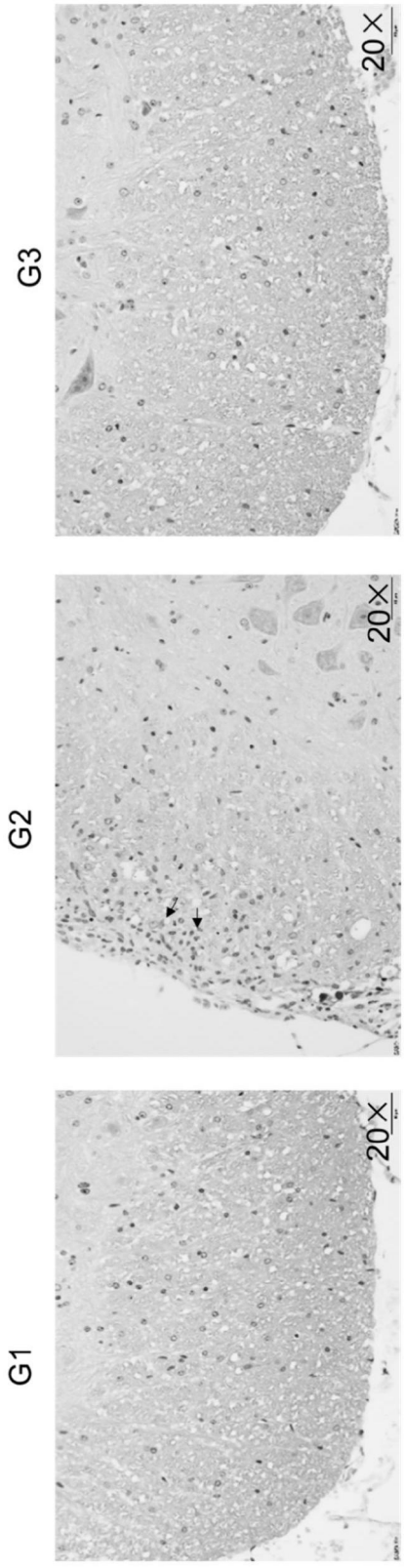


图18

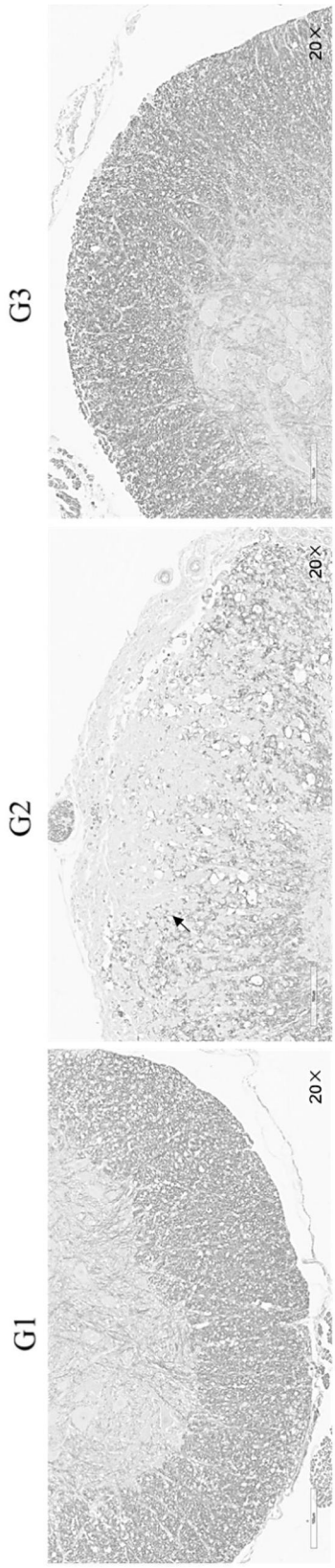


图19

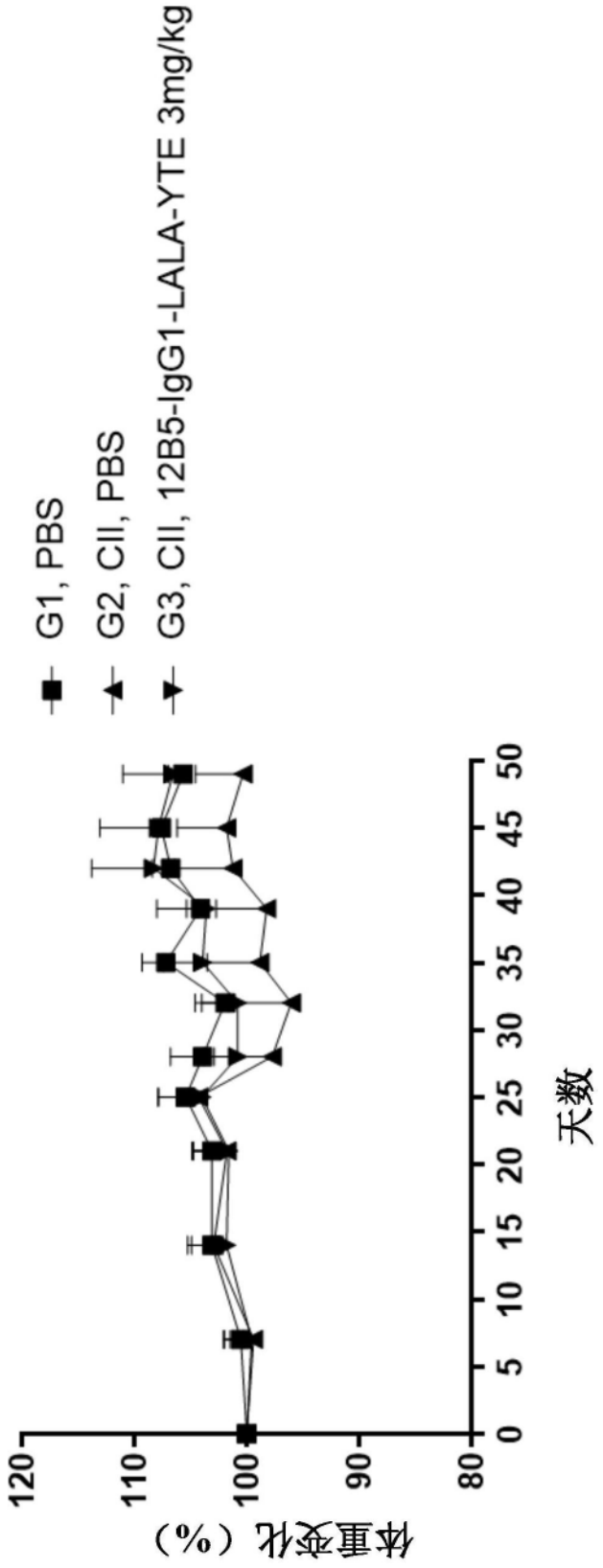

G1, PBS
G2, CII, PBS
G3, CII, 12B5-IgG1-LALA-YTE 3mg/kg
体重变化（%）
120
110
100
90
80
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
天数

图20

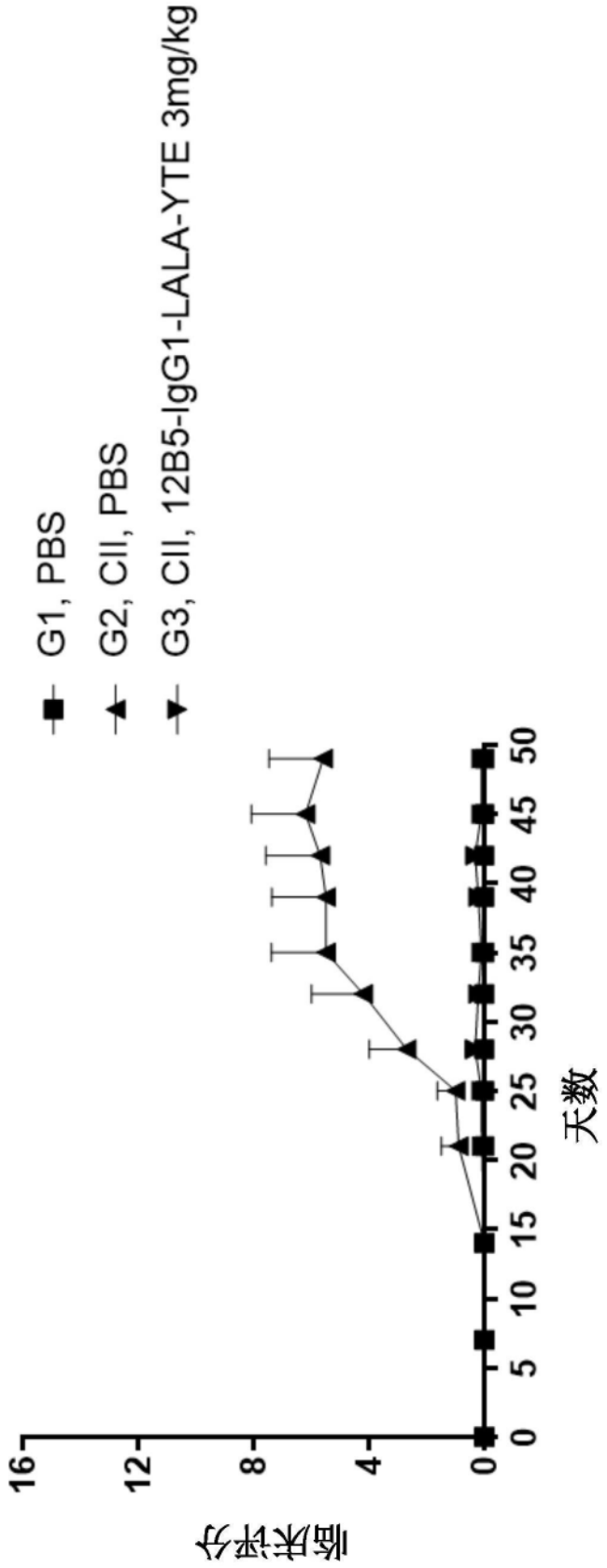

G1, PBS
G2, CII, PBS
G3, CII, 12B5-IgG1-LALA-YTE 3mg/kg
临床评分
16
12
8
4
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
天数

图21

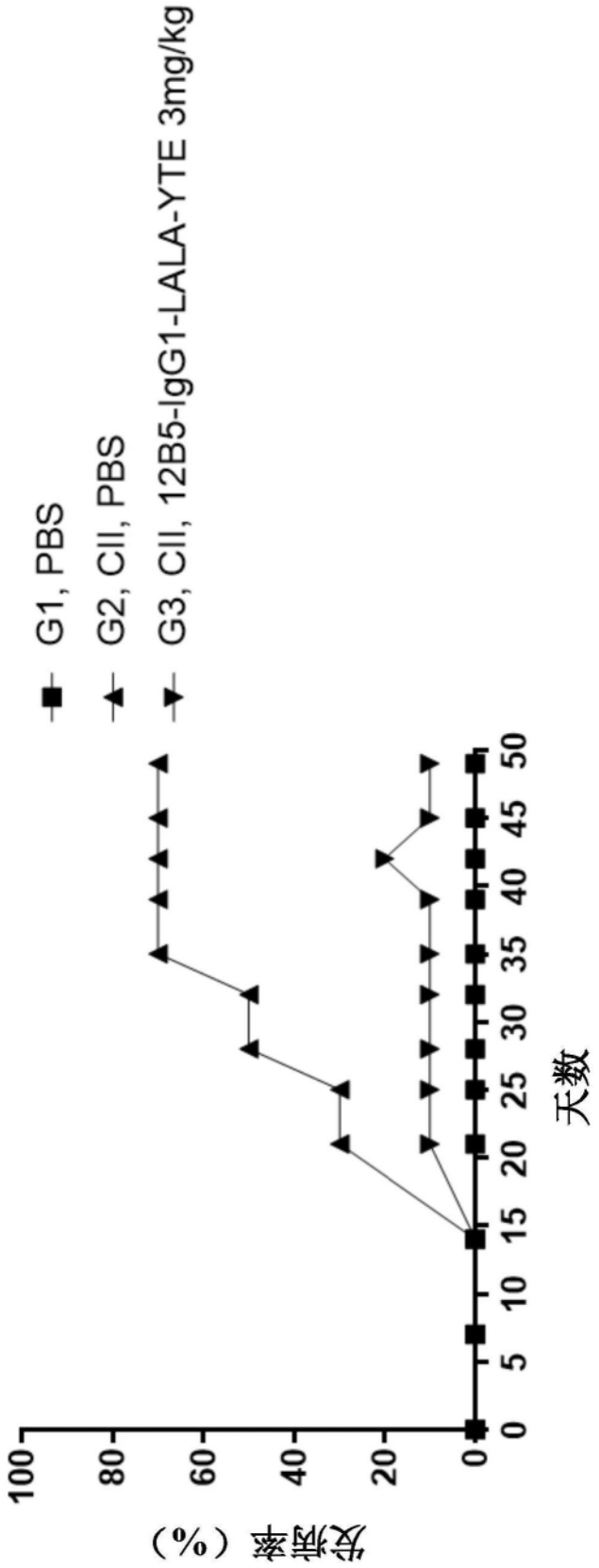

G1, PBS
G2, CII, PBS
G3, CII, 12B5-IgG1-LALA-YTE 3mg/kg
发病率（%）
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
天数

图22

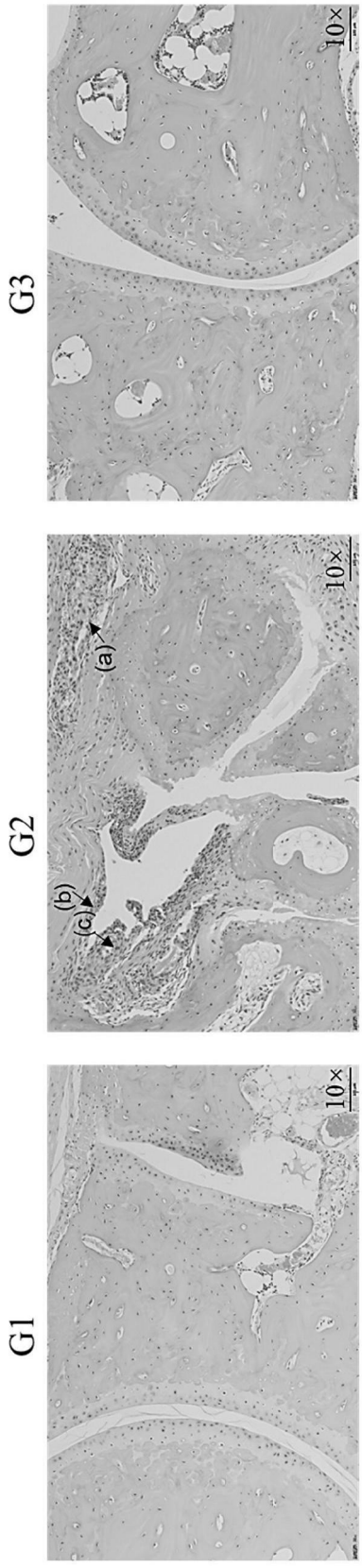


图23

人CD40蛋白（SEQ ID NO: 42）

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGW
HCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKK
PTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

布来鲁单抗VH（SEQ ID NO: 43）

QLQLQESGPGLLKPSETLSLTCTVSGGSISSPGYYGGWIRQPPGKGLEWIGSIYKSGSTYHNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRPVVRYFGWFDPW
GQGTLVTVSS

布来鲁单抗VL（SEQ ID NO: 44）

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPTFGQGTKVEIKR

伊卡利单抗VH（SEQ ID NO: 45）

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPD
YWGQGTLVTVSS

伊卡利单抗VL（SEQ ID NO: 46）

DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDI
RR

BI655064 VH（SEQ ID NO: 47）

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMNWVRQAPGKGLEWIAYISSGRGNIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSWGYFDVWG
QGTTVTVSS

BI655064 VL（SEQ ID NO: 48）

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNRGNQKNYLTWFQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYTYPLTFGQGTKL
EIKR

嵌合CD40蛋白（SEQ ID NO: 49）

MVSLPRLCALWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGW
HCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALLVIPVVMGILITIFGVFLYIKKVVK
KPKDNEILPPAARRQDPQEMEDYPGHNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQVTDSIALRPLV

小鼠CD40蛋白（SEQ ID NO: 50）

MVSLPRLCALWGCLLTAVHLGQCVTCSDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSHCTALEKTQCHPCDSGEFSAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAESDTVCTCKE
GQHCTSKDCEACAQHTPCIPGFGVMEMATETTDTVCHPCPVGFFSNQSSLFEKCYPWTSCEDKNLEVLQKGTSQTNVICGLKSRMRALLVIPVVMGILITIFGVFLYIKKV
VKKPKDNEILPPAARRQDPQEMEDYPGHNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQVTDSIALRPLV

人FcRn蛋白（SEQ ID NO: 51）

MGVPRPQPWALGLLLFLLPGSLGAESHLSLLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQYLSYNSLRGEAEPCGAWVWENQVSWYWEKETTDLRIKEKLFLEAFKALGG
KGPYTLQGLLGCELGPDNTSVPTAKFALNGEEFMNFDLKQGTWGGDWPEALAISQRWQQQDKAANKELTFLLFSCPHRLREHLERGRGNLEWKEPPSMRLKARPSSPG
FSVLTCSAFSFYPPELQLRFLRNGLAAGTGQGDFGPNSDGSFHASSSLTVKSGDEHHYCCIVQHAGLAQPLRVELESPAKSSVLVVGIVIGVLLLTAAAVGGALLWRRMR
SGLPAPWISLRGDDTGVLLPTPGEAQDADLKDVNVIPATA

IgG1重链恒定区（SEQ ID NO: 52）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

具有SI突变的IgG1重链恒定区（SEQ ID NO: 53）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GK

具有LALA突变的IgG1重链恒定区（SEQ ID NO: 54）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

具有LALA突变和YTE突变的IgG1重链恒定区（SEQ ID NO: 55）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

具有N297A突变和YTE突变的IgG1重链恒定区（SEQ ID NO: 56）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

IgG4重链恒定区（SEQ ID NO: 57）

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

具有FLAA突变的IgG4重链恒定区（SEQ ID NO: 58）

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA
PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

具有YTE突变的IgG4重链恒定区（SEQ ID NO: 59）

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

布来鲁单抗重链恒定区SEQ ID NO: 66

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPA
PEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

布来鲁单抗轻链恒定区SEQ ID NO: 60

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

伊卡利单抗重链恒定区SEQ ID NO: 61

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

伊卡利单抗轻链恒定区SEQ ID NO: 62

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

BI655064重链恒定区SEQ ID NO: 63

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

BI655064轻链恒定区SEQ ID NO: 64

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

利妥昔单抗VH（SEQ ID NO: 67）

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSA

VYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA

利妥昔单抗VL（SEQ ID NO: 68）

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPT

FGGGTKLEIKR

图24