



(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 I851885 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：110111021 (22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 03 月 26 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01) A61P37/00 (2006.01)
A61P31/00 (2006.01)

(30)優先權：2020/03/30 美國 63/001612

(71)申請人：大陸商正大天晴藥業集團股份有限公司 (中國大陸) CHIA TAI TIANQING
PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD. (CN)
中國大陸

(72)發明人：馬志清 (CN)；劉勁禹 (CN)；張正平 (CN)；徐宏江 (CN)

(74)代理人：劉法正；尹重君

(56)參考文獻：
US 20180066053A1

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：23 項 圖式數：12 共 125 頁

(54)名稱

結合 CD40 的抗體及其用途

(57)摘要

本發明提供了特異性結合人 CD40 的分離的單株抗體或其抗原結合部分。本發明還提供了編碼抗體或其抗原結合部分的核酸分子、用於表現抗體或其抗原結合部分的表現載體、宿主細胞和方法。本發明進一步提供了包含所述抗體或其抗原結合部分的免疫綴合物、雙特異性分子、嵌合抗原受體、溶瘤病毒和藥物組成物，以及使用它們進行治療的方法。

指定代表圖：

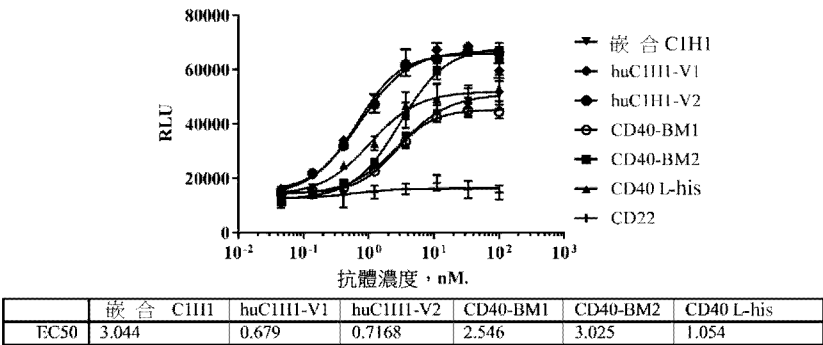


圖 12



I851885

【發明摘要】

【中文發明名稱】 結合CD40的抗體及其用途

【中文】

本發明提供了特異性結合人CD40的分離的單株抗體或其抗原結合部分。本發明還提供了編碼抗體或其抗原結合部分的核酸分子、用於表現抗體或其抗原結合部分的表現載體、宿主細胞和方法。本發明進一步提供了包含所述抗體或其抗原結合部分的免疫綴合物、雙特異性分子、嵌合抗原受體、溶瘤病毒和藥物組成物，以及使用它們進行治療的方法。

【指定代表圖】 圖12

【發明說明書】

【中文發明名稱】 結合CD40的抗體及其用途

【技術領域】

相關申請及以引用方式併入

【0001】 本申請要求2020年3月30日提交的美國臨時申請No.63/001,612的優先權。

【0002】 上述申請以及其引用或其審查程序中的所有文獻(“申請引用的文獻”)、本申請引用或參考的所有文獻(包括但不限於本申請引用的所有文獻、專利、已公開的專利申請)(“本申請引用的文獻”)以及本申請引用的文獻中引用或參考的所有文獻，連同本申請或透過引用併入本申請的任何文獻提及的任何產品的任何製造商的說明、描述、產品規格和產品頁，均透過引用的方式併入，並可以用於本發明的實踐。更具體地，本申請引用的所有參考文獻都以相同程度透過引用的方式併入，就如同各文獻被具體地和單獨地指出透過引用的方式併入本申請一樣。本發明提及的任何Genbank序列均透過引用Genbank序列的方式併入，以此引用日期作為本發明最早生效的申請日。

技術領域

【0003】 發明涉及一種分離的單株抗體，特別涉及一種小鼠、嵌合或人源化單株抗體或其抗原結合部分，其以高親和力和功能性特異性結合人CD40。本發明還提供了編碼本發明的抗體或其抗原結合部分的核酸分子、用於表現本發明的抗體或其抗原結合部分的表現載體、宿主細胞和方法。本發明進一步提供了包含本發明的抗體或其抗原結合部分的免疫綴合物、雙特異性分子、嵌合抗原受體、溶瘤病毒和藥物組成物，以及使用本發明的抗CD40抗體或其抗原結合部分進行治療的方法。

【先前技術】

【0004】 B淋巴細胞的活化需要抗原受體媒介的刺激和共刺激，而CD40是參與B淋巴細胞活化過程的共刺激分子之一(Jodi L. Karnell *et al.*, (2019) *Advanced Drug Delivery Review* 141:92-103)。

【0005】 CD40，一種I型跨膜蛋白，是TNF受體超家族的成員。它最初被特徵鑑定為在B淋巴細胞上，其在B淋巴細胞上持續地表現，並發出促進B細胞活化和增殖的信號。後來在樹突狀細胞(DC)、單核細胞、巨噬細胞以及非造血細胞上也發現了CD40。CD40的主要配體是CD40L，其主要表現於活化的T細胞、活化的B細胞和血小板上，並且在發炎條件下也存在於單核細胞、自然殺手細胞和嗜鹼性粒細胞上(Jodi L. Karnell *et al.*, (2019)同上)。這種共刺激對

的廣泛分布表明它們在免疫過程中起著關鍵作用。例如，DC細胞上CD40與CD40L的結合促進細胞激素的產生，誘導共刺激分子的表現，從而使T細胞活化和分化(Quezada SA *et al.*, (2004) *Annu Rev Immunol.* 22:307-328)。

【0006】 CD40還表現於腫瘤細胞上，包括B細胞惡性腫瘤、肺癌、膀胱癌、胃癌、乳腺癌和卵巢癌，據報導CD40還與多種發炎性疾病的病理學相關，包括自體免疫性疾病、動脈粥狀硬化、癌症和呼吸系統疾病(Costello *et al.*, (1999) *Immunol Today* 20(11): 488-493 ; Tong *et al.*, (2003) *Cancer Gene Ther* 10(1): 1-13 ; Lee *et al.*, (2014) *Curr Cancer Drug Targets* 14(7): 610-620 ; Ara A *et al.*, (2018)同上; Lee *et al.*, (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9136-9141 ; Stamenkovic *et al.*, (1989) *EMBO J.* 8:1403-1410)。一方面，在一些B細胞來源的腫瘤細胞株中，CD40媒介的信號轉導引起腫瘤細胞生長抑制和死亡(Grafton *et al.*, (1997) *Cell. Immunol.* 182:45-56)，而另一方面，在某些其他B細胞惡性腫瘤中，CD40媒介的信號轉導誘導多種使腫瘤細胞免於凋亡的因子表現增加(Lee *et al.*, (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9136-9141)。

【0007】 在結合CD40後活化或誘導CD40信號轉導的激動型抗CD40抗體，以及阻斷或抑制可能由CD40L參與誘導的CD40信號轉

導的拮抗型抗CD40抗體，已被開發用於疾病治療。Selicrelumab (Pfizer和VLS T)是一種激動型抗CD40抗體，已在許多患有晚期癌症的患者中顯示出臨床療效(Vonderheide *et al.*, (2013) *Clin Cancer Res.* 19(5):1035-1043)。Dacetuzumab (Sette Genetics)是一種弱於Selicrelumab的CD40激動劑，在瀰漫性大B細胞淋巴瘤、多發性骨髓瘤和CLL中顯示出抗腫瘤活性，並已進行了與利妥昔單抗和吉西他濱聯合治療復發或難治性DLBCL的試驗(Advani R *et al.*, (2009) *J Clin Oncol.* 27:4371-4377；Furman RR *et al.*, (2010) *Leuk Lymphoma.* 51:228-235；Forero-Torres A *et al.*, (2012) *Leuk Lymphoma* 54(2):277-283)。拮抗型抗CD40抗體Lucatumumab (Novartis)已進行了治療多發性骨髓瘤和慢性淋巴細胞白血病的臨床試驗(Hassan SB *et al.*, (2014) *Immunopharmacol immunotoxicol* 36(2):96-104)。活化CD40信號轉導的生物製劑也顯示出治療傳染病和自體免疫性疾病的功效，包括HIV-1/AIDS、結核病和瘧疾(Elizabeth A Thompson, *et al.*, (2015) *J Immunol.* 195(3): 1015-1024)。

【0008】 但仍然需要更多具有更好藥物特性的抗CD40抗體。

【0009】 在本申請中對任何文獻的引用或標識，並非承認這樣的文獻可用作本發明的現有技術。

【發明內容】**【0010】 發明概述**

【0011】 本發明提供了一種分離的單株抗體，例如小鼠、人、嵌合或人源化單株抗體或其抗原結合部分，其與CD40（例如，人CD40和猴CD40）結合，並且與現有技術中的抗CD40抗體例如Dacetuzumab和Selicrelumab相比，具有相當的(如果不是更高的話) CD40結合親和力，以及相當的(如果不是更高的話)活化CD40信號轉導的活性。

【0012】 本發明的抗體或其抗原結合部分具有多種用途，包括檢測CD40蛋白，以及治療和預防CD40相關疾病，例如癌症、傳染病和自體免疫性疾病。

【0013】 因此，在一方面，本發明提供了一種分離的單株抗體(例如，小鼠、嵌合或人源化抗體)或其抗原結合部分，所述單株抗體或其抗原結合部分結合CD40，其包含：i) 重鏈可變區，所述重鏈可變區包含VH CDR1區、VH CDR2區和VH CDR3區，其中VH CDR1區、VH CDR2區和VH CDR3區包含：(1)分別與SEQ ID NOs: 1、4和7所示的胺基酸序列；(2)分別與SEQ ID NOs: 2、5和8所示的胺基酸序列；或(3)分別與SEQ ID NOs: 3、6和9所示的胺基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性

的胺基酸序列；和/或 ii) 輕鏈可變區，所述輕鏈可變區包含VL CDR1區、VL CDR2區和VL CDR3區，其中VL CDR1區、VL CDR2區和VL CDR3區包含：(1)分別與SEQ ID NOs: 10、13和16所示的胺基酸序列；(2)分別與SEQ ID NOs: 11、14和17所示的胺基酸序列；或(3)分別與SEQ ID NOs: 12、15和18所示的胺基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的胺基酸序列。

【0014】 本發明的抗體或其抗原結合部分包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含VH CDR1區、VH CDR2區和VH CDR3區，所述輕鏈可變區包含VL CDR1區、VL CDR2區和VL CDR3區，其中VH CDR1區、VH CDR2區、VH CDR3區、VL CDR1區、VL CDR2區和VL CDR3區包含：(1)分別與SEQ ID NOs: 1、4、7、10、13和16所示的胺基酸序列；(2)分別與SEQ ID NOs: 2、5、8、11、14和17所示的胺基酸序列；或(3)分別與SEQ ID NOs: 3、6、9、12、15和18所示的胺基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的胺基酸序列，其中所述抗體或其抗原結合部分結合CD40。

【0015】 本發明的抗體或其抗原結合部分的重鏈可變區包含與SEQ ID NOs: 19、20 (X1=A或S)、21或22所示的胺基酸序列具

有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的胺基酸序列，其中所述抗體或其抗原結合部分結合CD40。如SEQ ID NO: 19所示的胺基酸序列可以由SEQ ID NOs: 31或32所示的核苷酸序列編碼，如SEQ ID NO: 20 (X1=S)所示的胺基酸序列可以由SEQ ID NO: 33所示的核苷酸序列編碼。

【0016】 本發明的抗體或其抗原結合部分的輕鏈可變區包含與SEQ ID NOs: 23、24 (X1=K、X2=F；或X1=Y、X2=Y)、25或26所示的胺基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的胺基酸序列，其中所述抗體或其抗原結合部分結合CD40。如SEQ ID NO: 23所示的胺基酸序列可以由SEQ ID NOs: 34或35所示的核苷酸序列編碼，如SEQ ID NO: 24 (X1=K、X2=F)所示的胺基酸序列可以由SEQ ID NO: 36所示的核苷酸序列編碼。

【0017】 本發明的抗體或其抗原結合部分包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區和輕鏈可變區包含：(1)分別與SEQ ID NOs: 19和23所示的胺基酸序列；(2)分別與SEQ ID NOs: 20 (X1=A)和24 (X1=K、X2=F)所示的胺基酸序列；(3)分別與SEQ ID NOs: 20 (X1=S)和24 (X1=K、X2=F)所示的胺基酸序列；(4)分別與SEQ ID NOs: 20 (X1=A)和24 (X1=Y、X2=Y)所示的胺基

酸序列；(5)分別與SEQ ID NOs: 20 (X1=S)和24 (X1=Y、X2=Y)所示的胺基酸序列；(6)分別與SEQ ID NOs: 21和25所示的胺基酸序列；或(7)分別與SEQ ID NOs: 22和26所示的胺基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同性的胺基酸序列，其中所述抗體或其抗原結合部分結合CD40。

【0018】 本發明的分離的單株抗體或其抗原結合部分包含重鏈和輕鏈，所述重鏈和輕鏈透過二硫鍵連接，所述重鏈包含重鏈可變區和重鏈恆定區，所述輕鏈包含輕鏈可變區和輕鏈恆定區，其中重鏈可變區的C末端連接至重鏈恆定區的N末端，輕鏈可變區的C末端連接至輕鏈恆定區的N末端，其中重鏈可變區和輕鏈可變區包含上述的胺基酸序列，並且所述抗體或其抗原結合部分結合CD40。重鏈恆定區可以是具有如SEQ ID NO: 28所示胺基酸序列的人IgG2恆定區，或具有如SEQ ID NO: 27所示胺基酸序列的人IgG1恆定區，輕鏈恆定區可以是具有如SEQ ID NO: 29所示胺基酸序列的人κ恆定區。可以對重鏈恆定區如Fc片段進行改造，以使其具有降低的或增強的FcR結合親和力。如SEQ ID NOs: 27、28和29所示的胺基酸序列可以分別由SEQ ID NOs: 37、38和39所示的核苷酸序列編碼。

【0019】 在一些實施方案中，本發明的抗體包含兩條重鏈和兩條輕鏈，或由兩條重鏈和兩條輕鏈組成，其中每條重鏈包含上述的重鏈恆定區、重鏈可變區或CDR序列，並且每條輕鏈包含上述的輕鏈恆定區、輕鏈可變區或CDR序列，其中所述抗體結合CD40。本發明的抗體可以是全長抗體，例如IgG1、IgG2或IgG4同種型全長抗體。在其他實施方案中，本發明的抗體或其抗原結合部分可以是單鏈可變區(scFv)抗體，或抗體片段，例如Fab或F(ab')₂片段。

【0020】 本發明還提供了包含本發明的抗體或其抗原結合部分的雙特異性分子，其中所述抗體或其抗原結合部分和與其具有不同結合特異性的第二功能分子(例如，第二抗體)相連接。本發明還提供了包含本發明的抗體或其抗原結合部分的免疫綴合物，例如抗體藥物偶聯物，其中所述抗體或其抗原結合部分與治療劑(例如細胞毒素)相連接。在另一方面，本發明的抗體或其抗原結合部分可以是嵌合抗原受體(CAR)的一部分。本發明還提供了包含嵌合抗原受體的免疫細胞，例如T細胞和NK細胞。本發明的抗體或其抗原結合部分還可以由溶瘤病毒編碼或與溶瘤病毒一起使用。

【0021】 本發明還提供了包含編碼本發明的抗體或其抗原結合部分的核酸分子，以及包含所述核酸分子的表現載體和包含所述表現載體的宿主細胞。本發明還提供了一種使用宿主細胞製備本發明的抗CD40抗體或其抗原結合部分的方法，其包括以下步驟：(i)在

宿主細胞中表現抗體，和(ii)從宿主細胞或其細胞培養物中分離抗體。

【0022】 本發明還提供了組成物，其包含本發明的抗體或其抗原結合部分、免疫綴合物、雙特異性分子、溶瘤病毒、CAR、CAR-T細胞、核酸分子、表現載體或宿主細胞，以及藥學上可接受的載劑。在某些實施方案中，藥物組成物可以進一步包含治療劑，例如抗癌劑。

【0023】 在另一方面，本發明提供了一種在受試者中調節免疫反應的方法，所述方法包括向受試者施用本發明的抗體或其抗原結合部分，從而調節受試者的免疫反應。優選地，本發明的抗體或其抗原結合部分增強、刺激或增加受試者的免疫反應。在一些實施方案中，所述方法包括向受試者施用本發明的雙特異性分子、免疫綴合物、CAR-T細胞、或編碼抗體或帶有抗體的溶瘤病毒，或者能夠在受試者中表現前述相同成分的核酸分子。

【0024】 在另一方面，本發明提供了一種在有需要的受試者中抑制腫瘤生長的方法，所述方法包括向受試者施用治療有效量的本發明的組成物。所述腫瘤可以是實體瘤或非實體瘤，包括但不限於B細胞淋巴瘤、慢性淋巴細胞白血病、多發性骨髓瘤、黑色素瘤、結腸腺癌、胰腺癌、結腸癌、胃腸癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌、卵巢癌、子宮頸癌、乳腺癌、肺癌和鼻咽癌。在一些實施方案中，

至少一種其他抗癌抗體可以與本發明的抗體或其抗原結合部分一起施用，例如抗VISTA抗體，抗PD-1抗體，抗PD-L1抗體，抗LAG-3抗體，抗CTLA-4抗體，抗TIM-3抗體，抗STAT3抗體和/或抗ROR1抗體。在另一個實施方案中，本發明的抗體或其抗原結合部分可以與細胞激素(例如，IL-2、IL-21、GM-CSF和/或IL-4)或共刺激抗體(例如，抗CD137和/或抗GITR抗體)一起施用。在另一個實施方案中，本發明的抗體或其抗原結合部分可以與化療藥物一起施用，所述化療藥物可以是細胞毒性藥物，例如泛艾黴素、奧沙利鉑和/或5-氟尿嘧啶(5-FU)。本發明的抗體或其抗原結合部分可以是例如小鼠、人、嵌合或人源化的。

【0025】 在另一方面，本發明提供了一種在有需要的受試者中治療或緩解傳染病的方法，所述方法包括向受試者施用治療有效量的本發明的組成物。傳染病可以由病毒、細菌、真菌或黴漿菌感染引起的疾病。在某些實施方案中，傳染病是AIDS、結核病或瘧疾。在某些實施方案中，可以向受試者進一步施用至少一種抗感染劑，例如抗病毒劑、抗細菌劑、抗真菌劑或抗黴漿菌劑。

【0026】 在另一方面，本發明提供了一種在有需要的受試者中治療或緩解自體免疫性疾病的方法，所述方法包括向受試者施用治療有效量的本發明的組成物。在某些實施方案中，可以向受試者進一步施用至少一種抗炎劑。

【0027】 基於以下的具體描述與實施例，本發明的其他特徵與優點將變得清晰，具體描述與實施例不應解讀為限制性的。本申請引用的所有文獻、Genbank記錄、專利、以及已公開的專利申請的內容透過引用的方式明確地併入本文中。

【0028】 因此，本發明的目的是在本發明的範圍內不涵蓋任何先前已知的產品、製造該產品的過程、或使用該產品的方法，使得申請人保留權利並在此披露放棄任何先前已知的產品、過程、或方法的主張。進一步指出的是，本發明的範圍並不意圖涵蓋任何不符合USPTO (35 U.S.C. §112，第一段)或EPO (EPC的條款83)的書面描述要求和能夠實現要求的產品、過程、或產品的製造或使用產品的方法，使得申請人保留權利並在此披露放棄任何所述的產品、製造該產品的過程、或使用該產品的方法的主張。可能有利的是，在本發明的實踐中遵循EPC條款53(c)和EPC條例28(b)和(c)。明確保留在本申請的家族中、任何其他家族中或任何第三方的任何在先申請中明確拒絕作為申請人的任何已授權專利的主題的任何實施方案的所有權利。本文中的任何內容均不得解釋為承諾。

【0029】 應注意，在本發明特別是在申請專利範圍和/或段落中，如“包括(comprises)”、“包括的(comprised)”、“包括了(comprising)”等術語具有適用美國專利法賦予其的意義；例如，它們可以表示“包含(includes)”、“包含的(included)”、“包含了

(including)”等；並且如“基本上由……組成(consisting essentially of)”和“基本上由……組成(consists essentially of)”等術語具有適用美國專利法賦予其的意義，例如，它們涵蓋未被明確敘述的要素，但是排除在現有技術中存在或者影響本發明的基礎或新穎特徵的要素。

【圖式簡單說明】

【0030】 圖1A和1B示出在捕捉ELISA中，小鼠抗體1A3、1D1(A)和C1H1(B)與人CD40的結合能力。

【0031】 圖2A和2B示出在基於細胞的結合FACS中，小鼠抗體1A3、1D1(A)和C1H1(B)與表現人CD40的293T細胞的結合能力。

【0032】 圖3A和3B示出在競爭ELISA中，小鼠抗體1A3、1D1(A)和C1H1(B)阻斷人CD40與CD40L結合的能力。

【0033】 圖4A和4B示出在競爭ELISA中，小鼠抗體1A3、1D1(A)和C1H1(B)阻斷基準品與人CD40結合的能力。

【0034】 圖5A和5B示出在基於細胞的報導基因檢測中，小鼠抗體1A3、1D1(A)和C1H1(B)活化CD40信號轉導的活性。

【0035】 圖6A-6C示出在捕捉ELISA中，嵌合抗體1A3(A)、1D1(B)和C1H1(C)與人CD40的結合能力。

【0036】 圖7A-7C示出在基於細胞的報導基因檢測中，嵌合抗體1A3(A)、1D1(B)和C1H1(C)活化CD40信號轉導的活性。

【0037】 圖8示出在捕捉ELISA中，人源化抗體huC1H1-V1和huC1H1-V2與人CD40的結合能力。

【0038】 圖9示出在基於細胞的結合FACS中，人源化抗體huC1H1-V1和huC1H1-V2與表現人CD40的293T細胞的結合能力。

【0039】 圖10示出在競爭ELISA中，人源化抗體huC1H1-V1和huC1H1-V2阻斷人CD40與CD40L結合的能力。

【0040】 圖11示出在競爭ELISA中，人源化抗體huC1H1-V1和huC1H1-V2阻斷基準品與人CD40結合的能力。

【0041】 圖12示出在基於細胞的報導基因檢測中，人源化抗體huC1H1-V1和huC1H1-V2活化CD40信號轉導的活性。

【實施方式】

發明詳述

【0042】 為了更好地理解本發明，首先定義一些術語。其他定義則貫穿詳述部分而列出。

【0043】 術語“CD40”是指腫瘤壞死因子受體超家族成員5(TNFR5)。術語“CD40”包括變體、亞型、同源物、直系同源物和旁系同源物。例如，在某些情況下，對人CD40蛋白具有特異性的抗體可與人以外的物種(例如猴)的CD40蛋白發生交叉反應。在其他實施方案中，對人CD40蛋白具有特異性的抗體可以對人CD40蛋白完

全特異，並且不與其他物種或其他類型的蛋白發生交叉反應，或者可以與來源於某些其他物種但並非所有其他物種的CD40發生交叉反應。

【0044】 術語“人CD40”是指具有人的胺基酸序列的CD40蛋白，例如Genbank登錄號為NP_001241.1的人CD40的胺基酸序列(Amini M *et al.*, (2020) *Life Sci* 254: 117774)。術語“猴或恆河猴CD40”和“小鼠CD40”分別是指猴CD40序列和小鼠CD40序列，例如，其分別具有Genbank登錄號為Nos. NP_001252791.1和NP_035741.2的胺基酸序列。

【0045】 術語“免疫反應”是指如淋巴細胞、抗原呈遞細胞、吞噬細胞、粒細胞和由上述細胞或肝臟產生的可溶性大分子(包括抗體、細胞激素和補體)在人體中選擇性損害、破壞或清除侵入病原體、感染了病原體的細胞或組織、癌細胞、或者自體免疫或病理性發炎的情況下的正常人細胞或組織的作用。

【0046】 如本文所用，術語“抗體”是指透過至少一個抗原結合位址辨識並特異性結合標靶(如CD40)的免疫球蛋白分子，其中所述抗原結合位址通常位於免疫球蛋白分子的可變區內。如本文所用，術語“抗體”涵蓋完整多株抗體、完整單株抗體、單鏈Fv (scFv)抗體、重鏈抗體(HCAbs)、輕鏈抗體(LCAbs)、多特異性抗體、雙特異性抗體、單特異性抗體、單價抗體、包含抗體的抗原結合位址的

融合蛋白、以及任何其他包含抗原結合位址的經修飾的免疫球蛋白分子(例如，雙可變結構域免疫球蛋白分子)，只要該抗體展現出所需的生物學活性即可。抗體還包括但不限於小鼠抗體、嵌合抗體、人源化抗體、人抗體。根據抗體重鏈恆定區(分別被稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ)的特徵，抗體可以是免疫球蛋白五種主要類別中的任何一種：**IgA**、**IgD**、**IgE**、**IgG**和**IgM**，或其子類型(同種型)(例如**IgG1**、**IgG2**、**IgG3**、**IgG4**、**IgA1**和**IgA2**)。不同種類的免疫球蛋白具有不同且本領域熟知的次單元結構和三維構型。抗體可以是裸抗體或與其他分子綴合的，包括但不限於毒素和放射性同位素。除非另有明確說明，否則本文所用的術語“抗體”包括完整抗體的“抗原結合部分”。**IgG**是包含兩條重(H)鏈和兩條輕(L)鏈的糖蛋白，其中重鏈和輕鏈透過二硫鍵連接。每條重鏈由重鏈可變區(簡稱**V_H**)和重鏈恆定區構成。重鏈恆定區由三個結構域構成，即**C_{H1}**、**C_{H2}**和**C_{H3}**。每條輕鏈由輕鏈可變區(簡稱**V_L**)和輕鏈恆定區構成。輕鏈恆定區由一個結構域**C_L**構成。**V_H**和**V_L**區還可以進一步劃分為稱作互補決定區(CDR)的高度變異區，其由較為保守的框架區(FR)區分隔開。每個**V_H**和**V_L**由三個CDR以及四個FR構成，從胺基端到羧基端以**FR1**、**CDR1**、**FR2**、**CDR2**、**FR3**、**CDR3**、**FR4**的順序排布。重鏈和輕鏈的可變區包含與抗原相互作用的結合結構域。抗體的恆定區可以媒介免疫球蛋白與宿主組織或因子的結合，所述宿主組織或因子包

括多種免疫系統細胞(例如，效應細胞)和經典補體系統的第一組分(C1q)。

【0047】 如本文所用，抗體的“抗原結合部分”(或簡稱“抗體部分”)，是指抗體中保留特異性結合抗原(例如，CD40蛋白)能力的一個或多個片段。已證實，抗體的抗原結合功能可以透過全長抗體的片段來實現。涵蓋在抗體的“抗原結合部分”中的結合片段的例子包括：(i) Fab片段，由V_L、V_H、C_L和C_{H1}結構域構成的單價片段；(ii) F(ab')₂片段，包含在樞紐區透過二硫鍵連接的兩個Fab片段的二價片段；(iii) 由V_H和C_{H1}結構域構成的Fd片段；(iv) 由抗體單臂V_L和V_H結構域構成的Fv片段；(v) 由VH結構域構成的dAb片段(Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546)；(vi) 分離的互補決定區(CDR)；以及(viii) 奈米抗體，即一種包含單個可變結構域和兩個恆定結構域的重鏈可變區。此外，儘管Fv片段的兩個結構域V_L和V_H由不同的基因編碼，可以利用重組的方法透過合成連接子將V_H和V_L連接成單蛋白鏈，其中V_L和V_H區配對形成單價分子(稱為單鏈Fv(scFv)；參見例如Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426；和 Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。這樣的單鏈抗體也涵蓋在術語抗體的“抗原結合部分”中。這些抗體片段可以透過本領域技術人員已知的常用技術獲得，且可以透過與完整抗體相同的方式進行功能篩選。

【0048】 如本文所用，術語“分離的抗體”是指基本上不含具有不同抗原特異性的其他抗體的抗體(例如，特異性結合CD40蛋白的分離抗體基本上不含特異性結合CD40蛋白以外抗原的抗體)。但是，特異性結合人CD40蛋白的分離抗體可能對其他抗原例如其他物種的CD40蛋白具有交叉反應性。此外，分離的抗體基本上不含其他細胞材料和/或化學物質。

【0049】 本文所用的術語“單株抗體”或“單株抗體組成”是指單一分子組成的抗體分子製品。單株抗體組成呈現出對於特定表位的單一結合特異性和親和力。

【0050】 如本文所用，術語“小鼠抗體”是指可變區中框架區和CDR區均來自小鼠生殖系免疫球蛋白序列的抗體。此外，如果抗體包含恆定區，則恆定區也來自小鼠生殖系免疫球蛋白序列。本發明的小鼠抗體可以包含不由小鼠生殖系免疫球蛋白序列編碼的胺基酸殘基(例如，透過體外隨機突變或點突變、或透過體內體細胞突變而引入的突變)。但本文所用的術語“小鼠抗體”不包括在小鼠框架區序列中插入來自其他哺乳動物物種的CDR序列的抗體。

【0051】 術語“嵌合抗體”是指透過組合非人來源的遺傳物質與人來源的遺傳物質而得來的抗體。或者更籠統地說，嵌合抗體是指組合某一物種的遺傳物質與另一物種遺傳物質的抗體。

【0052】 如本文所用，術語“人源化抗體”是指來源於非人物種但其蛋白序列已經被修改以增加其與人天然抗體的相似度的抗體。

【0053】 短語“辨識抗原的抗體”以及“對抗原特異的抗體/對抗原具有特異性的抗體”在本文中與術語“特異性結合抗原的抗體”可互換使用。

【0054】 如本文所用，“特異性結合人CD40”的抗體或其抗原結合部分是指與人CD40蛋白(可能還包括一個或多個非人物種的CD40蛋白)結合但基本不與非CD40蛋白結合的抗體。優選地，抗體以“高親和力”結合人CD40蛋白，即以 5.0×10^{-8} M或更小，優選為 1.0×10^{-8} M或更小的 K_D 結合人CD40蛋白。

【0055】 如本文所用，術語“基本不結合”蛋白或細胞是指不與蛋白或細胞結合，或者不以高親和力與其結合，即以 1.0×10^{-6} M或更大，優選為 1.0×10^{-5} M或更大，更優選為 1.0×10^{-4} M或更大，更優選為 1.0×10^{-3} M或更大，甚至更優選為 1.0×10^{-2} M或更大的 K_D 結合蛋白或細胞。

【0056】 術語“高親和力”對於IgG抗體而言，是指對於目標抗原，抗體具有 1.0×10^{-6} M或更小，優選為 9.0×10^{-9} M或更小，更優選為 5.0×10^{-9} M或更小，甚至更優選為 1.0×10^{-9} M或更小，甚至更優選為 5.0×10^{-10} M或更小的 K_D 。但是對於其他抗體同種型，“高親和力”結合可能有所不同。例如，對於IgM同種型，“高親和力”是指

抗體具有 10^{-6} M或更小，優選為 10^{-7} M或更小，更優選為 10^{-8} M或更小的 K_D 。

【0057】 本文所用的術語“ K_{assoc} ”或“ K_a ”是指特定抗體-抗原相互作用的結合速率，而本文所用的術語“ K_{dis} ”或“ K_d ”是指特定抗體-抗原相互作用的解離速率。本文所用的術語“ K_D ”是指解離常數，其為 K_d 與 K_a 之比(即 K_d/K_a)並用莫耳濃度(M)表示。抗體的 K_D 值可以使用本領域熟知的方法測定。測定抗體 K_D 值的優選方法是使用表面電漿共振技術，優選使用生物感測器系統，例如Biacore™系統進行測定。

【0058】 術語“ EC_{50} ”，又叫半數最大效應濃度，是指在特定暴露時間後，誘導反應達到基線和最大值之間的一半的抗體濃度。

【0059】 術語“ IC_{50} ”，又叫半數最大抑制濃度，是指相對於不存在抗體時，將特異性生物學或生化功能抑制50%的抗體濃度。

【0060】 術語“受試者”包括任何人或非人動物。術語“非人動物”包括所有脊椎動物，例如哺乳動物和非哺乳動物，例如非人靈長類、羊、狗、貓、牛、馬、雞、兩棲類和爬行類；優選為哺乳動物，例如非人靈長類、羊、狗、貓、牛和馬。

【0061】 術語“治療有效量”是指足以防止或改善與疾病或病症(例如癌症)相關的症狀，和/或減輕疾病或病症的嚴重性的本發明的

抗體或其抗原結合部分的量。應當理解，治療有效量與被治療的疾病相關，其中本領域技術人員可以容易地判別出實際的有效量。

【0062】 術語“激動型CD40抗體”或“激動型抗CD40抗體”是指與CD40結合並活化或誘導CD40信號轉導(從而例如促進免疫細胞活化和增殖以及細胞激素和趨化因子產生)的抗CD40抗體。而術語“拮抗型CD40抗體/拮抗型抗CD40抗體”是指阻斷或抑制可能由CD40L參與誘導的CD40信號轉導的抗CD40抗體。激動型CD40抗體透過提高APC的抗原呈遞能力、活化腫瘤特異性CD4⁺和CD8⁺T細胞、刺激淋巴細胞和單核細胞分泌細胞激素和趨化因子、增強細胞毒性淋巴細胞和NK細胞的腫瘤細胞毒殺作用等，促進腫瘤受試者對腫瘤的先天性和適應性免疫反應。

【0063】 如本文在兩個或多個核酸或多肽的背景中所用的百分比“相同性”是指，當以最高對應性進行比較和比對(如果需要的話，引入空位)時，在將或不將保守胺基酸替換作為序列統一性的一部分的情況下，兩個或多個具有相同的或具有特定百分比相同的核苷酸或胺基酸殘基的序列或子序列。百分比相同性可以使用序列比對軟體或算法或透過目測來測量。可用於胺基酸或核苷酸序列比對的各種軟體和算法是本領域熟知的，包括但不限於BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin Package及其變換形式。在一些實施方案中，本發明所述的兩種核酸或多肽基本上是相同

的，是指當以最高對應性進行比較和比對時，使用序列比對算法或目測進行測量，兩種核酸或多肽具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%，並且在一些實施方案中具有至少95%、96%、97%、98%、99%的核苷酸或胺基酸殘基相同性。

【0064】 本發明的多個方面在以下更加具體地被描述。

【0065】 本發明的抗體或其抗原結合部分特異性結合人CD40，與已報導的抗CD40抗體（如Dacetuzumab和Selicrelumab）相比，具有相當的（如果不是更好的話）結合親和力/能力。

【0066】 其他功能特性包括阻斷CD40與CD40L的結合，和活化CD40信號轉導。

【0067】 優選地，本發明的抗體是人源化單株抗體。此外，或者，本發明的抗體可以是例如，嵌合單株抗體。

表1. 重/輕鏈可變區的胺基酸序列ID

抗體	V _H CDR1	V _H CDR2	V _H CDR3	V _H	V _L CDR1	V _L CDR2	V _L CDR3	V _L
C1H1	1	4	7	19	10	13	16	23
huC1H1-V1	1	4	7	20, X1=A	10	13	16	24, X1=K, X2=F
huC1H1-V2	1	4	7	20, X1=S	10	13	16	24, X1=K, X2=F
hu-C1H1-V3	1	4	7	20, X1=A	10	13	16	24, X1=Y, X2=Y

huC1H1-V4	1	4	7	20, X1=S	10	13	16	24, X1=Y, X2=Y
1A3	2	5	8	21	11	14	17	25
1D1	3	6	9	22	12	15	18	26

【0068】 本發明的例示性抗體或其抗原結合部分按下文和實施例中所述內容進行結構和化學上的特徵鑑定。抗體的重/輕鏈可變區的胺基酸序列ID彙總於下表1中，一些抗體具有相同的V_H或V_L。抗體的重鏈恆定區可以是人IgG1或IgG2重鏈恆定區，其分別具有如SEQ ID NO: 27和28所示的胺基酸序列，且抗體的輕鏈恆定區可以是人κ恆定區，其具有如SEQ ID NO: 29所示的胺基酸序列。這些抗體也可以包含小鼠IgG1或IgG2重鏈恆定區，和/或小鼠κ恆定區。

【0069】 表1中的重鏈可變區CDR和輕鏈可變區CDR已由Kabat編號系統定義。然而，如本領域所熟知的，CDR區也可以基於重/輕鏈可變區序列由其他編號系統例如Chothia、IMGT、AbM或Contact編號系統/方法確定。

【0070】 與人CD40結合的其他抗CD40抗體的V_H和V_L序列(或CDR序列)可以與本發明的抗CD40抗體的V_H和V_L序列(或CDR序列)“混合並配對”。優選地，當V_H和V_L鏈(或這些鏈中的CDR)混合並配對時，來自特定V_H/V_L對中的V_H序列被結構相似的V_H序列取代。同樣地，優選將來自特定V_H/V_L對中的V_L序列替換為結構相似的V_L序列。

【0071】 因此，在一個實施方案中，本發明的抗體或其抗原結合部分包含：

- (a)重鏈可變區，其包含列於表1中的胺基酸序列；和
- (b)輕鏈可變區，其包含列於表1中的胺基酸序列，或另一種抗CD40抗體的V_L，其中所述抗體特異性結合人CD40。

【0072】 在另一個實施方案中，本發明的抗體或其抗原結合部分包含：

- (a)列於表1中的重鏈可變區的CDR1、CDR2和CDR3；和
- (b)列於表1中的輕鏈可變區的CDR1、CDR2和CDR3，或另一種抗CD40抗體的CDR，其中所述抗體特異性結合人CD40。

【0073】 在另一個實施方案中，本發明的抗體或其抗原結合部分包括抗CD40抗體的重鏈可變區的CDR2以及其他結合人CD40的抗體的CDR，例如來自另一種抗CD40抗體的重鏈可變區的CDR1和/或CDR3，和/或輕鏈可變區的CDR1、CDR2和/或CDR3。

【0074】 此外，本領域所熟知的是，不依賴於CDR1和/或CDR2結構域，單獨的CDR3結構域可以確定抗體對同源抗原的結合特異性，並且基於共同的CDR3序列可以預測性地產生具有相同結合特異性的多種抗體。參見例如，Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000)；Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000)；Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U.S.A. 95:8910-8915 (1998) ; Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) ; Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995) ; Ditzel *et al.*, *J. Immunol.* 157:739-749 (1996) ; Berezov *et al.*, *BIAjournal 8: Scientific Review 8* (2001) ; Igarashi *et al.*, *J. Biochem (Tokyo)* 117:452-7 (1995) ; Bourgeois *et al.*, *J. Virol* 72:807-10 (1998) ; Levi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4374-8 (1993) ; Polymenis and Stoller, *J. Immunol.* 152:5218-5329 (1994)和Xu and Davis, *Immunity* 13:37-45 (2000)。另參見美國專利Nos. 6,951,646 ; 6,914,128 ; 6,090,382 ; 6,818,216 ; 6,156,313 ; 6,827,925 ; 5,833,943 ; 5,762,905和5,760,185。這些參考文獻均透過引用的方式全部併入本文。

【0075】 因此，在另一個實施方案中，本發明的抗體包含抗CD40抗體的重鏈可變區的CDR2以及至少抗CD40抗體的重鏈可變區和/或輕鏈可變區的CDR3，或另一種抗CD40抗體的重鏈可變區和/或輕鏈可變區的CDR3，其中該抗體特異性結合人CD40。這些抗體優選與本發明的抗CD40抗體(a)競爭結合CD40；(b)保留功能特性；(c)結合相同表位；和/或(d)具有相似的結合親和力。在另一個實施方案中，本發明的抗體還可以包含抗CD40抗體的輕鏈可變區的CDR2，或者另一種抗CD40抗體的輕鏈可變區的CDR2，其中該

抗體特異性結合人CD40。在另一個實施方案中，本發明的抗體還可以包括抗CD40抗體的重鏈可變區和/或輕鏈可變區的CDR1，或另一種抗CD40抗體的重鏈可變區和/或輕鏈可變區的CDR1，其中該抗體特異性結合人CD40。

【0076】 在另一個實施方案中，本發明的抗體包含重鏈可變區和/或輕鏈可變區，所述重鏈可變區和輕鏈可變區分別包含CDR1、CDR2和CDR3，其中這些CDR序列不同於本發明抗CD40抗體的CDR序列，所述不同是源於一個或多個保守修飾。本領域中應理解，某些保守的序列修飾不會使抗原結合性消失。參見，例如Brummell *et al.*, (1993) *Biochem* 32:1180-8; de Wildt *et al.*, (1997) *Prot. Eng.* 10:835-41; Komissarov *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem.* 272:26864-26870; Hall *et al.*, (1992) *J. Immunol.* 149:1605-12; Kelley and O'Connell (1993) *Biochem.* 32:6862-35; Adib-Conquy *et al.*, (1998) *Int. Immunol.* 10:341-6 和 Beers *et al.*, (2000) *Clin. Can. Res.* 6:2835-43。

【0077】 因此，在一個實施方案中，本發明的抗體包含重鏈可變區和/或輕鏈可變區，所述重鏈可變區和輕鏈可變區分別包含CDR1、CDR2和CDR3序列，其中：

- (a) 重鏈可變區的CDR1序列包含表1中列出的序列，和/或其保守修飾；和/或
- (b) 重鏈可變區的CDR2序列包含表1中列出的序列，和/或其保守修飾；和/或
- (c) 重鏈可變區的CDR3序列包含表1中列出的序列，和/或其保守修飾；和/或
- (d) 輕鏈可變區的CDR1、和/或CDR2、和/或CDR3序列包含表1中列出的序列，和/或其保守修飾；和
- (e) 該抗體特異性結合人CD40。

【0078】 本發明的抗體具有一種或多種上述的以下功能特性，例如對人CD40的高親和力，以及在表現CD40的細胞中活化CD40信號轉導的能力。

【0079】 在多個實施方案中，抗體可以是例如，小鼠、人、人源化或嵌合抗體。

【0080】 如本文所用，術語“保守序列修飾”是指不會顯著影響或改變抗體結合特性的胺基酸修飾。這樣的保守修飾包括胺基酸替換、添加和缺失。可以透過本領域已知的標準技術將修飾引入本發明的抗體中，例如點突變和PCR媒介的突變。保守胺基酸替換是指將胺基酸殘基替換為具有相似側鏈的胺基酸殘基。具有相似側鏈的胺基酸殘基組在本領域中已知。這些胺基酸殘基組包括具有鹼性側

鏈(例如，離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如，天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如，甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、非極性側鏈(例如，丙胺酸、纈胺酸、亮胺酸、異亮胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、 β -支鏈側鏈(例如，蘇胺酸、纈胺酸、異亮胺酸)和芳香族側鏈(例如，酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)的胺基酸。因此，本發明的抗體的CDR區中的一個或多個胺基酸殘基可以被來自相同側鏈組的其他胺基酸殘基替換，且得到的抗體可以使用本發明所述的功能檢測對其進行保留功能(即，上述的功能)測試。

【0081】 本發明的抗體可以用包含本發明抗CD40抗體的一個或多個 V_H/V_L 序列的抗體作為起始材料來工程化產生修飾抗體。抗體可以透過修飾一個或兩個可變區(即， V_H 和/或 V_L)內(例如，在一個或多個CDR區和/或一個或多個框架區)的一個或多個殘基來進行工程化。此外，或者，可以透過修飾恆定區中的殘基來進行工程化，例如來改變抗體的效應功能。

【0082】 在某些實施方案中，CDR移植可以用來修飾抗體的可變區。抗體主要透過位於重鏈和輕鏈的六個互補決定區(CDR)中的胺基酸殘基與標靶抗原相互作用。因此，CDR內的胺基酸序列比CDR外的胺基酸序列在各種抗體之間更加地多樣。因為CDR序列負責主要的抗體-抗原相互作用，可以透過建構這樣的表現載體，其中

特定天然抗體的CDR序列移植到具有不同特性的另一抗體的框架區序列，來表現模擬特定天然抗體特性的重組抗體(參見，例如，Riechmann *et al.*, (1998) *Nature* 332:323-327；Jones *et al.*, (1986) *Nature* 321:522-525；Queen *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad.*。另外參見 U.S.A. 86:10029-10033；美國專利 Nos. 5,225,539；5,530,101；5,585,089；5,693,762和6,180,370)。

【0083】 因此，本發明的另一個實施方案涉及分離的單株抗體或其抗原結合部分，其包含重鏈可變區和/或輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含本發明上述的CDR1、CDR2和CDR3，所述輕鏈可變區包含本發明上述的CDR1、CDR2和CDR3。儘管這些抗體包含本發明的單株抗體的V_H和V_L CDR序列，它們可以含有不同的框架序列。

【0084】 這樣的框架序列可以從包括生殖系抗體基因序列的公開DNA資料庫或發表的參考文獻中獲得。例如，用於人重鏈可變區基因和人輕鏈可變區基因的生殖系DNA序列可以在Vbase人生殖系序列資料庫(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)以及Kabat *et al.*, (1991)，同上；Tomlinson *et al.*, (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798和Cox *et al.*, (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:827-836文獻中獲得，其內容各以引用的方式明確地併入本文。另一個實施方案中，用於人重鏈可變區基因和人輕鏈可變區基因的生殖系DNA序列可以在Genbank資料庫中獲得。例如，下列來自HCo7 HuMAb

小鼠的重鏈生殖系序列的 Genbank 登錄號為：1-69 (NG--0010109, NT--024637 & BC070333)、3-33 (NG--0010109 & NT--024637) 和 3-7 (NG--0010109 & NT--024637)。另一個實施方案中，以下來自 HCo12 HuMAb 小鼠的重鏈生殖系序列的 Genbank 登錄號為：1-69 (NG--0010109, NT--024637 & BC070333)、5-51 (NG--0010109 & NT--024637)、4-34 (NG--0010109 & NT--024637)、3-30.3 (CAJ556644) 和 3-23 (AJ406678)。

【0085】 使用本領域技術人員所熟知的序列相似性搜索方法之一 Gapped BLAST (Altschul *et al.*, (1997), 同上)，將抗體蛋白序列與編譯蛋白序列資料庫進行比較。

【0086】 用於本發明的抗體的框架序列，優選在結構上與本發明的抗體框架序列相似的那些。 V_H 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列可以移植到與得到該框架序列的生殖系免疫球蛋白基因中具有相同序列的框架區中，或者 CDR 序列可以移植到包含與生殖系序列相比具有一個或多個突變的框架區中。例如，在某些情況下，將框架區中的殘基進行突變是有益的，可以保持或增強抗體的抗原結合能力(參見例如美國專利 Nos. 5,530,101；5,585,089；5,693,762 和 6,180,370)。

【0087】 另一種類型的可變區修飾是將 V_H 和/或 V_L 的CDR1、CDR2和/或CDR3區內的胺基酸殘基進行突變，從而改善目標抗體的一種或多種結合特性(例如，親和力)。可以透過點突變或PCR媒介的突變引入突變，並且可以透過本領域已知的體外或體內檢測來評估突變對抗體結合或其他功能特性的影響。優選地，引入本領域已知的保守修飾。突變可以是胺基酸替換、添加或缺失，但優選為替換。而且，通常改變一個CDR區內不超過一個、兩個、三個、四個或五個的殘基。

【0088】 因此，在另一個實施方案中，本發明提供分離的抗CD40單株抗體或其抗原結合部分，包含重鏈可變區，其包含：(a) V_H CDR1區，其包含本發明的 V_H CDR1序列，或具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸替換、缺失或添加的胺基酸序列；(b) V_H CDR2區，其包含本發明的 V_H CDR2序列，或具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸替換、缺失或添加的胺基酸序列；(c) V_H CDR3區，其包含本發明的 V_H CDR3序列，或具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸替換、缺失或添加的胺基酸序列；(d) V_L CDR1區，其包含本發明的 V_L CDR1序列，或具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸替換、缺失或添加的胺基酸序列；(e) V_L CDR2區，其包含本發明的 V_L CDR2序列，或具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸替換、缺失或添加的胺基酸序列；和 (f) V_L

CDR3區，其包含本發明的V_L CDR3序列，或具有一個、兩個、三個、四個或五個胺基酸替換、缺失或添加的胺基酸序列。

【0089】 本發明的工程化抗體包括在V_H和/或V_L的框架區殘基中進行修飾以例如改善抗體特性的那些抗體。通常而言，此類框架區修飾可用來降低抗體的免疫原性。例如，將一個或多個框架區殘基“回復突變”成相應的生殖系序列。更具體地，經歷體細胞突變的抗體可能包含不同於得到該抗體的生殖系序列的框架殘基。這些殘基可以透過將抗體框架序列與得到該抗體的生殖系序列相比較而鑑別出來。

【0090】 另一種類型的框架區修飾包括對框架區的、或者甚至一個或多個CDR區的一個或多個殘基進行突變，以去除T細胞表位，從而減少抗體可能導致的免疫原性。該方法也稱為“去免疫化”，在美國專利公開No.20030153043中有更加詳細的描述。

【0091】 此外，或者作為框架區或CDR區修飾之外的替代方案，可以對本發明的抗體的Fc區進行工程化修飾，通常用來改變抗體的一個或多個功能特性，例如血清半衰期、補體結合、Fc受體結合和/或抗體依賴的細胞毒性。此外，可以對本發明的抗體進行化學修飾(例如，可以將一個或多個化學功能基團連接至抗體)，或者修飾以改變其糖基化，來改變抗體的一個或多個功能特性。

【0092】 在一個實施方案中，對位於CH1區和CH2區之間的樞紐區進行修飾，從而改變(例如增加或減少)樞紐區的半胱胺酸殘基的數量。該方法在美國專利No.5,677,425中有具體描述。改變樞紐區的半胱胺酸殘基的數量，例如可以促進重鏈和輕鏈的組裝、或增加/降低抗體的穩定性。

【0093】 在另一個實施方案中，對抗體的Fc-樞紐區進行突變，以增加或降低抗體的生物半衰期。更具體地，將一個或多個胺基酸突變引入Fc-樞紐片段的C_{H2}-C_{H3}結構域界面區，使得抗體相對於天然Fc-樞紐結構域，具有減弱的葡萄球菌A蛋白(SpA)結合力。該方法在美國專利No.6,165,745中有更詳細的描述。

【0094】 在另一個實施方案中，改變抗體的糖基化。例如，可以製備去糖基化的抗體(即，抗體缺少糖基化)。改變糖基化以例如增加抗體對抗原的親和力。這樣的糖修飾可以透過例如改變抗體序列中的一個或多個糖基化位址來實現。例如，可以進行一個或多個胺基酸替換，以消除一個或多個可變區中框架區的糖基化位址，從而消除該位址的糖基化。這樣的去糖基化可以增加抗體對抗原的親和力。參見，例如美國專利Nos.5,714,350和6,350,861。

【0095】 此外，或者，可以製備糖基化類型改變的抗體，例如岩藻糖殘基量減少的低岩藻糖基化抗體，或者具有平分型GlcNac結構增加的抗體。已經證明這種糖基化類型的改變能增加抗體的

ADCC活性。這樣的糖修飾可以透過例如在糖基化機制改變的宿主細胞中表現抗體來實現。糖基化機制改變的細胞在本領域中已知，且可以用作表現本發明的重組抗體的宿主細胞，以製備糖基化改變的抗體。例如，細胞株Ms704、Ms705和Ms709缺少岩藻糖基轉移酶基因FUT8 ($\alpha(1,6)$ -岩藻糖基轉移酶基因)，因此在Ms704、Ms705和Ms709細胞株中表現的抗體在其糖中缺失岩藻糖。使用兩種置換型載體靶向破壞CHO/DG44細胞中的FUT8基因，來製備Ms704、Ms705和Ms709 FUT8^{-/-}細胞株(參見美國專利公開No.20040110704和Yamane-Ohnuki *et al.*, (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22)。作為另一個例子，EP1,176,195記載了FUT8基因功能破壞的細胞株，該基因編碼岩藻糖基轉移酶，從而使在該細胞株中表現的抗體因減少或消除了 α -1,6鍵相關的酶而表現出低岩藻糖基化。EP1,176,195還描述了一種細胞株，其具有較低的或缺乏向結合至抗體Fc區的N-乙醯葡萄糖胺添加岩藻糖的酶活性，例如大鼠骨髓瘤細胞株YB2/0 (ATCC CRL 1662)。PCT公開WO03/035835描述了一種CHO變體細胞株Lec13細胞，其具有降低的向Asn(297)-連接的糖上添加岩藻糖的能力，從而導致該宿主細胞中表現的抗體為低岩藻糖基化(另外參見Shields *et al.*, (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740)。如WO06/089231中所述，也可以在雞蛋中製備糖基化圖譜改變的抗體。或者，可以在

植物細胞如 *Lemna* 中製備糖基化圖譜改變的抗體。在植物系統中生產抗體的方法揭示於2006年8月11日提交的對應於 *Alston & Bird LLP* 代理案卷號 040989/314911 的美國專利申請中。PCT 公開 WO99/54342 記載了一種工程化細胞株，其表現糖蛋白修飾的糖基轉移酶(例如， $\beta(1,4)$ -N-乙醯葡萄糖胺轉移酶 III(GnTIII))，使得在該工程化細胞株中表現的抗體表現出增加的平分型 GlcNAc 結構，從而導致抗體的 ADCC 活性提高(另參見 *Umana et al.*, (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180)。或者，可以使用岩藻糖苷酶切割抗體的岩藻糖殘基，例如，利用 α -L-岩藻糖苷酶去除抗體的岩藻糖殘基(*Tarentino et al.*, (1975) *Biochem.* 14:5516-23)。

【0096】 本發明抗體的另一種修飾是聚乙二醇化(PEG化)。可以將抗體 PEG 化以例如增加抗體的生物(例如，血清)半衰期。為使抗體 PEG 化，抗體或其片段與聚乙二醇(PEG)如 PEG 的反應性酯或醛類衍生物，在使一個或多個 PEG 基團連接至抗體或抗體片段的條件下進行反應。優選地，透過與反應性 PEG 分子(或類似的反應性的水溶性聚合物)進行醯化反應或烷化反應來進行 PEG 化。本文所用的術語“聚乙二醇”包括用於衍生其他蛋白的任何形式的 PEG，例如單(C₁-C₁₀)烷氧基聚乙二醇或芳氧基聚乙二醇或聚乙二醇-馬來醯亞胺。在某些實施方案中，待 PEG 化的抗體是去糖基化的抗體。PEG

化蛋白的方法在本領域是已知的，且可以用於本發明的抗體。參見，例如EP0154316和EP0401384。

【0097】 本發明的抗體可以用它們的多種物理特性進行特徵鑑定，以檢測和/或區分其類別。

【0098】 例如，抗體可以在輕鏈可變區或重鏈可變區包含一個或多個糖基化位址。這些糖基化位址可能導致抗體免疫原性的增加，或由於抗原結合的改變而引起抗體pK值的改變(Marshall *et al* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702 ; Gala and Morrison (2004) *J Immunol* 172:5489-94 ; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109 ; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R ; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7 ; Mimura *et al.*, (2000) *Mol Immunol* 37:697-706)。已知糖基化在含有N-X-S/T序列的基序中發生。在一些情況下，優選可變區不包含糖基化的抗CD40抗體。可以選擇可變區不包含糖基化基序的抗體或透過突變糖基化區域的殘基來實現。

【0099】 在一個優選的實施方案中，抗體不包含天冬醯胺異構位址。天冬醯胺的脫醯胺作用可能在N-G或D-G序列中發生，並導致異天冬胺酸殘基的產生，其向多肽框架中引入一個扭結並降低其穩定性(異天冬胺酸作用)。

【0100】 各抗體具有獨特的等電點(pI)，通常落在6-9.5的pH範圍內。IgG1抗體的pI通常落在7-9.5的pH範圍內，而IgG4抗體的pI基本落在6-8的pH範圍內。推測pI在正常範圍外的抗體在體內可能會發生一些解摺疊且不穩定。因此，優選pI值落在正常範圍內的抗CD40抗體。這可以選擇pI在正常範圍內的抗體或透過突變帶電的表面殘基來實現。

【0101】 在另一方面，本發明提供編碼本發明的抗體的重鏈可變區和/或輕鏈可變區或CDR的核酸分子。核酸可以存在於完整細胞中、細胞裂解液中、或以部分純化或基本上純的形式存在。透過標準技術將核酸從其他細胞組分或其他污染物例如其他細胞核酸或蛋白中純化出來後，核酸是“分離的”或“基本上純的”。本發明的核酸可以是DNA或RNA，且可包含或不包含內含子序列。在優選的實施方案中，核酸是cDNA分子。

【0102】 本發明的核酸可以透過標準的分子生物學技術獲得。對於由融合瘤(例如，由下文所述的攜帶人免疫球蛋白基因的基因轉殖小鼠製備的融合瘤)表現的抗體，可以透過標準PCR擴增或cDNA選殖技術獲得編碼由融合瘤製備的抗體的輕鏈和重鏈的cDNA。對於從免疫球蛋白基因庫(例如使用噬菌體展示技術)中獲得的抗體，可以從基因庫中回收編碼這類抗體的核酸。

【0103】 優選地，本發明的核酸分子包括編碼CD40單株抗體的 V_H 和 V_L 序列或CDR的那些。一旦獲得了編碼 V_H 和 V_L 的DNA片段，可以透過標準重組DNA技術對這些DNA片段進行進一步操作，例如將可變區基因轉變為全長抗體鏈基因、Fab片段基因或scFv基因。在這些操作中，將編碼 V_H 或 V_L 的DNA片段與編碼另一蛋白(例如抗體恆定區或柔性連接子)的DNA片段可操作地連接。這種情況下所使用的術語“可操作地連接”是指兩個DNA片段連接在一起，從而使兩個DNA片段編碼的胺基酸序列都在閱讀框內。

【0104】 將編碼 V_H 的DNA與編碼重鏈恆定區(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})的另一DNA分子可操作地連接，可以將編碼 V_H 區的分離的DNA轉變成全長重鏈基因。人重鏈恆定區基因的序列是本領域已知的，且可以透過標準PCR擴增獲得包括人重鏈恆定區基因的DNA片段。重鏈恆定區可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恆定區，但是最優選為IgG1或IgG2恆定區。對於Fab片段重鏈基因，可將編碼 V_H 區的DNA可操作地連接至僅編碼重鏈 C_{H1} 恆定區的另一DNA分子。

【0105】 將編碼 V_L 的DNA與編碼輕鏈恆定區 C_L 的另一DNA分子可操作地連接，可以將編碼 V_L 區的分離的DNA轉變成全長輕鏈基因(以及Fab輕鏈基因)。人輕鏈恆定區基因的序列是本領域已知的，

且可以透過標準PCR擴增獲得包括人輕鏈恆定區基因的DNA片段。在優選的實施方案中，輕鏈恆定區是 κ 或 λ 恆定區。

【0106】 為了製備scFv基因，將編碼V_H和V_L的DNA片段可操作地連接至編碼柔性連接子例如編碼胺基酸序列(Gly4-Ser)₃的另一片段，使得V_H和V_L序列可以表現為連續的單鏈蛋白，其中V_L和V_H區域透過該柔性連接子連接(參見，例如Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426；Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883；McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554)。

【0107】 本發明的單株抗體(mAbs)可以使用本領域熟知的Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495的體細胞雜交(融合瘤)技術進行製備。製備單株抗體的其他實施方案包括B淋巴細胞的病毒或致癌性轉化以及噬菌體展示技術。嵌合或人源化抗體也是本領域熟知的。參見，例如美國專利Nos.4,816,567；5,225,539；5,530,101；5,585,089；5,693,762和6,180,370，其全部內容透過引用的方式明確地併入本文。

【0108】 本發明的抗體還可以使用例如本領域熟知的重組DNA技術結合基因轉染的方法，在宿主細胞轉染瘤中製備(例如Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202)。在一個實施方案中，將透過標準分子生物技術得到的編碼部分或全長輕鏈和重鏈的

DNA插入一個或多個表現載體中，使得基因可操作地連接至轉錄和轉譯調控序列。在這種情況下術語“可操作地連接”是指抗體基因連接到載體中，使得載體內的轉錄和轉譯調控序列行使它們既定的調控抗體基因轉錄和轉譯的功能。

【0109】 術語“調控序列”包括控制抗體基因轉錄或轉譯的啟動子、增強子和其他表現控制元件(例如，多腺苷酸化信號)。這樣的調控序列在例如 Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990))中有過描述。用於哺乳動物宿主細胞表現的優選調控序列包括在哺乳動物細胞中引導高位準蛋白表現的病毒元件，例如源自巨細胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))和多瘤病毒的啟動子和/或增強子。或者，可以使用非病毒調控序列，例如泛素啟動子或 β -珠蛋白啟動子。另外，調控元件由不同來源的序列構成，例如SR α 啟動子系統，其包含來自SV40早期啟動子的序列和人T細胞白血病病毒1型的長末端重複序列 (Takebe *et al.*, (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。選擇與所使用的表現宿主細胞相容的表現載體和表現調控序列。

【0110】 可以將抗體輕鏈基因和抗體重鏈基因插入到同一或不同的表現載體中。在優選的實施方案中，將可變區插入到已經編碼

所需同種型的重鏈恆定區和輕鏈恆定區的表現載體中建構任何抗體同種型的全長抗體基因，使 V_H 與載體中的 C_H 可操作地連接， V_L 與載體中的 C_L 可操作地連接。此外，或者，重組表現載體可以編碼促進抗體鏈從宿主細胞分泌的信號胜肽。可以將抗體鏈基因選殖到載體中，使得信號胜肽在閱讀框內連接到抗體鏈基因的胺基端。信號胜肽可以是免疫球蛋白信號胜肽或異源信號胜肽(即，來自非免疫球蛋白的信號胜肽)。

【0111】 除抗體鏈基因和調控序列外，本發明的重組表現載體還可以攜帶其他序列，例如調控載體在宿主細胞中複製的序列(例如，複製起始點)和選擇標記物基因。選擇標記物基因有助於選擇已導入載體的宿主細胞(參見，例如，美國專利Nos. 4,399,216；4,634,665和5,179,017)。例如，通常選擇標記物基因賦予已導入載體的宿主細胞以藥物抗性，例如G418、潮黴素、或胺甲喋呤抗性。優選的選擇標記物基因包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於dhfr宿主細胞的胺甲喋呤選擇/擴增)和neo基因(用於G418選擇)。

【0112】 為了表現輕鏈和重鏈，透過標準技術將編碼重鏈和輕鏈的表現載體轉染到宿主細胞中。“轉染”的各種形式包括多種常用於將外源DNA導入原核或真核宿主細胞的技術，例如，電穿孔、磷酸鈣沉澱、DEAE-葡聚糖轉染等。儘管理論上有可能在原核或真核宿主細胞中表現本發明的抗體，但優選在真核細胞中表現抗體，最

優選在哺乳動物宿主細胞中表現抗體，因為真核細胞，特別是哺乳動物細胞，比原核細胞更可能組裝抗體並分泌正確摺疊且有免疫活性的抗體。

【0113】 優選的用於表現本發明的重組抗體的哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢細胞(CHO細胞)(包括與DHFR選擇性標記物一起使用的dhfr-CHO細胞，在Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220中有過描述，DHFR選擇性標記物在例如R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621中描述)、NSO骨髓瘤細胞、COS細胞和SP2細胞。特別是在使用NSO骨髓瘤細胞時，另一優選的表現系統是GS基因表現系統，記載於WO87/04462、WO89/01036和EP338,841。當編碼抗體基因的重組表現載體導入哺乳動物宿主細胞後，透過將宿主細胞培養足以使得抗體在宿主細胞中表現、或優選足以使得使抗體分泌到宿主細胞生長的培養基中的一段時間來製備抗體。可以使用標準蛋白純化方法從培養基中回收抗體。

【0114】 本發明的抗體可以與治療劑偶聯形成免疫綴合物，例如抗體-藥物偶聯物(ADC)。合適的治療劑包括細胞毒素、烷化劑、DNA小溝結合分子、DNA嵌入劑、DNA交聯劑、組蛋白去乙醯化酶抑制劑、核輸出抑制劑、蛋白酶體抑制劑、拓撲異構酶I或II的抑制劑、熱休克蛋白抑制劑、酪胺酸激酶抑制劑、抗生素和抗有絲分

裂劑。在ADC中，抗體和治療劑優選地透過可裂解的连接子偶聯，例如胜肽類连接子、二硫類连接子或脲類连接子。更優選的连接子是胜肽類连接子，例如Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Pro-Val-Gly-Val-Val、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Cit-Cit、Val-Lys、Lys、Cit、Ser或Glu。ADC可以根據美國專利Nos.7,087,600；6,989,452；和7,129,261；PCT公開WO02/096910；WO07/038,658；WO07/051,081；WO07/059,404；WO08/083,312；和WO08/103,693；美國專利公開Nos.20060024317；20060004081；和20060247295中的描述進行製備，其揭示的內容透過引用的方式併入本文。

【0115】 另一方面，本發明提供一種雙特異性分子，其包含一種或多種本發明的抗體，所述抗體與至少一個其他功能分子如另一種胜肽或蛋白(例如，另一抗體或受體的配體)相連接，以產生與至少兩個不同結合位址或標靶分子結合的雙特異性分子。因此，本發明所用的“雙特異性分子”包括具有三種或更多種特異性的分子。

【0116】 在一個實施方案中，除Fc結合特異性和CD40結合特異性外，雙特異性分子還具有第三特異性。第三特異性可以針對增強因子(EF)，例如與參與細胞毒性的表面蛋白結合從而增加對標靶細胞的免疫反應的分子。例如，抗增強因子可以結合細胞毒性T細胞(例

如透過CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40或ICAM-1)或其他免疫細胞，從而導致對標靶細胞的免疫反應增加。

【0117】 雙特異性分子可以具有多種不同的形式和尺寸。在尺寸譜的一端，雙特異性分子保留了傳統的抗體形式，不同的是兩個結合臂具有不同的特異性而不是具有相同的特異性。在尺寸譜的另一端，雙特異性分子由兩個經胜肽鏈連接的單鏈抗體片段(scFv)構成，即所謂的Bs(scFv)₂建構體。中間尺寸的雙特異性分子包括由胜肽類連接子連接的兩個不同的F(ab)片段。這些和其他形式的雙特異性分子可以透過基因工程、體細胞雜交或化學法進行製備。參見，例如 Kufer et al, 同上；Cao and Suresh, *Bioconjugate Chemistry*, 9 (6), 635-644 (1998)；和 van Spriel et al., *Immunology Today*, 21 (8), 391-397 (2000)，以及其中所引用的參考文獻。

【0118】 本發明還提供了偏好地感染並殺滅癌細胞的溶瘤病毒。本發明的抗體可與溶瘤病毒一起使用。此外，可以將編碼本發明抗體的溶瘤病毒引入人體中。

【0119】 本發明還提供了包含抗CD40 scFv的嵌合抗原受體(CAR)，該抗CD40 scFv包含本發明所述的CDR和重/輕鏈可變區。

【0120】 抗CD40 CAR可以包含(a)包含抗CD40 scFv的胞外抗原結合結構域；(b)跨膜結構域；(c)胞內信號傳導結構域。

【0121】 CAR可以在胞外抗原結合結構域的N端包含指導新生受體進入內質網的信號胜肽，和在胞外抗原結合結構域的N端包含使受體更易於結合的樞紐胜肽。優選地，CAR在細胞內信號傳導結構域包括初級胞內信號傳導結構域和一個或多個共刺激性信號傳導結構域。常用且最有效的初級胞內信號傳導結構域是CD3-zeta胞質結構域，其包含ITAM，ITAM的磷酸化導致T細胞活化。共刺激信號傳導結構域可源自共刺激蛋白，例如CD28、CD137和OX40。

【0122】 CARs可以進一步添加增強T細胞擴增、持久性和抗腫瘤活性的要素，例如細胞激素和共刺激配體。

【0123】 本發明還提供了工程化免疫效應細胞，其包含本發明提供的CAR。在一些實施方案中，免疫效應細胞是T細胞、NK細胞、周邊血液單核細胞(PBMC)、造血幹細胞、多能幹細胞或胚胎幹細胞。在一些實施方案中，免疫效應細胞是T細胞。

【0124】 在另一方面，本發明提供一種藥物組成物，其包含與藥學上可接受的載劑配製在一起的本發明的一種或多種抗體或其抗原結合部分、雙特異性分子、CAR-T細胞、溶瘤病毒、免疫綴合物、核酸分子、表現載體或宿主細胞。當組成物包含一種以上抗體(或抗體的抗原結合部分、雙特異性分子、CAR-T細胞、溶瘤病毒、免疫綴合物、核酸分子、表現載體或宿主細胞)時，可以分開施用抗體或其抗原結合部分、雙特異性分子、CAR-T細胞、溶瘤病毒、免疫綴

合物、核酸分子、表現載體或宿主細胞。藥物組成物可以任選地包含一種或多種其他藥物活性成分，例如另一種抗體或藥物，例如抗腫瘤藥物。

【0125】 藥物組成物可以包含任何數量的賦形劑。可以使用的賦形劑包括載劑、界面活性劑、增稠或乳化劑、固體粘合劑、分散或懸浮劑、增溶劑、著色劑、矯味劑、包衣、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、防腐劑、等滲劑及其組合。合適的賦形劑的選擇和使用在 Gennaro, ed., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003) 中教導，其揭示的內容透過引用的方式併入本文。

【0126】 優選地，藥物組成物適合於靜脈內、肌內、皮下、腸道外、脊髓或表皮施用(例如透過注射或輸液)。基於給藥途徑，可以將活性成分包覆在材料中，以保護其不受酸和可能使其失去活性的其他自然條件的影響。本文所用的短語“腸道外施用”是指除腸內和局部施用以外的施用方式，通常採用注射，並且包括但不限於靜脈內、肌內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊髓內、硬膜外和胸骨內注射和輸液。或者，本發明的藥物組成物可以透過非腸道外途徑施用，例如局部、表皮或粘膜途徑施用，如鼻內、口服、陰道、直腸、舌下或局部施用。

【0127】 藥物組成物可以是無菌水溶液或分散液的形式。它們也可以配製在微乳劑、脂質體或其他適於高濃度藥物的有序結構中。

【0128】 與載劑材料組合製備成單一劑量的活性成分的量根據所治療的受試者和特定給藥方式而變化，通常是產生療效的組成物的量。通常，以百分比計算，該量為約0.01%至約99%的與藥學上可接受的載劑組合的活性成分。

【0129】 調整給藥方案以提供最佳的所需反應(例如，治療反應)。例如，可以施用單次大劑量，可以隨時間推移施用多個分劑量，或者可以隨治療情況的危急程度按比例降低或提高劑量。特別有利的是，以易於施用和劑量均勻的劑量單位形式配製腸道外施用的組成物。此處所用的劑量單位形式是指適於待治療受試者的單一劑量的物理上離散的單位；每個單位包含經計算可以與所需的藥物載劑一起產生所需的治療效果的預定量的活性成分。或者，抗體可以作為緩釋劑施用，這種情況下所需的施用頻率降低。

【0130】 對於抗體的施用，劑量可以為約0.0001至100 mg/kg。

【0131】 “治療有效量”的本發明的抗CD40抗體或其抗原結合部分優選能引起疾病症狀嚴重程度降低、無疾病症狀期頻率和持續時間增加，或預防疾病病痛引起的損傷或殘疾。例如，對於腫瘤受試者的治療，與未治療的受試者相比，“治療有效量”優選為抑制至少約20%、優選為抑制至少約40%，更優選為抑制至少約60%，更

優選為抑制至少約80%的腫瘤生長。治療有效量的治療性抗體可以減小腫瘤尺寸，或者改善受試者的症狀，所述受試者通常是人或其他哺乳動物。

【0132】 藥物組成物可以是控制釋放劑型，包括植入物、透皮貼劑和微膠囊遞送系統。可以使用生物可降解的、生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。參見，例如，*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

【0133】 可以透過醫療裝置施用藥物組成物，例如(1)無針皮下注射裝置(例如，美國專利 Nos. 5,399,163；5,383,851；5,312,335；5,064,413；4,941,880；4,790,824；和4,596,556)；(2)微量輸液泵(美國專利 No.4,487,603)；(3)透皮裝置(美國專利 No.4,486,194)；(4)輸液裝置(美國專利 Nos.4,447,233 和 4,447,224)；和(5)滲透裝置(美國專利 Nos.4,439,196 和 4,475,196)，其揭示內容透過引用的方式併入本文。

【0134】 在某些實施方案中，本發明的單株抗體可以經配製，以確保合適的體內分布。例如，為確保本發明的治療性抗體穿過血腦屏障，可以將抗體配製在脂質體中，該脂質體還可以額外地包含具有靶向部分，以增強對特定細胞或器官的選擇性輸送。參見，例

如美國專利 Nos.4,522,811 ; 5,374,548 ; 5,416,016 ; 和 5,399,331 ; V. V. Ranade (1989) *J. Clin.Pharmacol.*29:685 ; Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038 ; Bloeman *et al.*, (1995) *FEBS Lett.*357:140 ; M. Owais *et al.*, (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180 ; Briscoe *et al.*, (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134 ; Schreier *et al.*, (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090 ; Keinanen and Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123 ; 和 Killion and Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273 。

【0135】 本發明的藥物組成物具有多種體外和體內的用途，包括例如，治療和/或預防癌症，或者更普遍地，增強癌症患者的免疫反應。可向人受試者例如體內施用藥物組成物，以抑制腫瘤生長，或者治療或緩解傳染病或自體免疫性疾病。

【0136】 鑒於本發明的藥物組成物具有抑制腫瘤細胞增殖和存活的能力，本發明提供了在有需要的受試者中抑制腫瘤細胞生長的方法，所述方法包括向受試者施用本發明的藥物組成物，從而抑制受試者體內的腫瘤生長。本發明的藥物組成物可以治療的腫瘤的非限制性實例包括但不限於B細胞淋巴瘤、慢性淋巴細胞白血病、多發性骨髓瘤、黑色素瘤、結腸腺癌、胰腺癌、結腸癌、胃腸癌、前列腺癌、膀胱癌、腎癌、卵巢癌、子宮頸癌、乳腺癌、肺癌和鼻咽

癌。此外，本發明的藥物組成物可用於難治性或復發性惡性腫瘤，其中所述惡性腫瘤的生長可以被本發明的組成物抑制。

【0137】 本發明的這些和其他方法更加詳細地描述於下文中。

【0138】 在另一方面，本發明提供了聯合治療的方法，所述方法是將本發明的藥物組成物與一種或多種可有效抑制受試者腫瘤生長的其他抗體或非抗體藥物共同施用。在一個實施方案中，本發明提供了一種在受試者中抑制腫瘤生長的方法，所述方法包括向受試者施用本發明的藥物組成物和一種或多種抗體，例如抗TIM3抗體、抗PD-L1抗體、抗PD-1抗體和/或抗CTLA-4抗體。在某些實施方案中，受試者是人。在某些實施方案中，本發明的藥物組成物還可以進一步與癌症的標準治療方法組合。例如，可以將活化CD40信號轉導的本發明的藥物組成物與CTLA-4和/或PD-1抑制劑以及化療方案組合。例如，可以將化療藥物與本發明的藥物組成物一起施用，所述化療藥物可以是細胞毒性藥物。例如，可以向正在接受抗CD40治療的患者施用泛艾黴素、奧沙利鉑和5-氟尿嘧啶。可以與抗CD40治療聯合的其他療法包括但不限於施用介白素2 (IL-2)、放射、手術或激素剝奪。

【0139】 本發明討論的治療劑的組合(或聯合)可以作為在藥學可接受載劑中的單一組成物同時施用，或者作為分開的組成物同時

施用，其中各藥劑各自處於藥學可接受載劑中。在另一個實施方案中，治療劑的組合可以按序施用。

【0140】 此外，如果按序進行多次聯合療法施用，則在各時間點的按序施用的次序可以反轉或保持相同，按序施用可以與同時施用或其任何組合相結合。

【0141】 透過以下實施例進一步描述本發明，實施例不應當解讀為進一步限制性的。本申請的所有附圖以及本申請中引用的所有參考文獻、Genebank序列、專利和已公開的專利申請都透過引用的方式明確併入本文。

實施例

實施例1：使用融合瘤技術產生小鼠抗CD40單株抗體

免疫接種

【0142】 根據E Harlow, D. Lane, Antibody: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998中所述的方法免疫小鼠。將C末端連有IgG1 Fc標籤(SEQ ID NO: 27)的重組人CD40蛋白(Uniprot編號#P25942的第21-193位胺基酸，SEQ ID NO: 30的第21-193位胺基酸殘基)作為免疫原。將人CD40-his蛋白(Acro biosystems，產品目錄CD0-H5228)用於測定抗血清的效價和篩選分泌抗原特異性抗體的融合瘤。初次免疫和加強免疫的免疫劑量均為每隻小鼠每次注射25

μg 人CD40-Fc蛋白。為了增強免疫反應，初次免疫和加強免疫分別使用了完全弗氏佐劑和不完全弗氏佐劑(Sigma, St. Louis, Mo., USA)。簡而言之，佐劑-免疫原混合物的製備如下：首先透過渦旋儀將佐劑溫和混合於小瓶中；將所需量的佐劑轉移至高壓滅菌過的1.5 mL微量離心管中；用PBS或鹽水稀釋免疫原至濃度範圍為0.5-1.0 mg/mL；然後將計算量的免疫原添加到含有佐劑的微量離心管中，並溫和渦旋混合2分鐘，使佐劑-免疫原混合物形成油包水型乳液。用合適的注射器吸取佐劑-免疫原乳液進行動物注射。總共以50-100 μL 的體積注射了25 μg 免疫原。每隻動物免疫後，根據抗血清的效價加強免疫2至3次。在細胞融合之前，透過腹腔注射對具有高效價的動物進行最後一次加強免疫。

融合瘤融合與篩選

【0143】 在細胞融合之前，培養鼠骨髓瘤細胞株(SP2/0-Ag14, ATCC#CRL-1581)的細胞至對數期。根據Kohler G, and Milstein C, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," Nature, 256: 495-497(1975)中描述的方法，無菌分離免疫小鼠的脾細胞，並將其與骨髓瘤細胞融合。然後將存在於DMEM/20% FCS/HAT培養基中的融合“雜交細胞”分配到96孔盤中。融合後7至10天，在顯微鏡下觀察存活的融合瘤細胞集落。兩周後，使用重組人CD40-his蛋白

對每個孔的上清液進行ELISA檢測，使用細胞膜上表現人CD40蛋白(uniprot #P25942-1，SEQ ID NO: 30)的293T-CD40細胞對每個孔的上清液進行基於細胞的結合FACS測定。透過極限稀釋法，對分泌與人CD40-his蛋白結合並與293T-CD40細胞高特異性結合的抗體的融合瘤(即選殖株1A3、1D1和C1H1)進行次選殖，以確保細胞株的單株性，然後純化單株抗體。簡而言之，以5至10倍管柱體積的PBS緩衝液洗滌蛋白A瓊脂糖管柱(bestchrom (Shanghai) Biosciences，產品目錄AA0273)。使細胞上清液流過蛋白A瓊脂糖管柱，然後用PBS緩衝液洗滌管柱直到蛋白的吸光度達到基線。用洗提緩衝液(0.1 M甘胺酸-HCl，pH 2.7)對管柱進行洗提，並立即將洗提液收集到1.5 mL管中，用中和緩衝液(1 M Tris-HCl，pH 9.0)中和。合併含免疫球蛋白的部分，並在PBS中於4℃透析過夜。隨後，根據如下所述的方法對純化的單株抗體的體外功能活性進行特徵鑑定。

實施例2：使用BIACORE表面電漿共振技術對小鼠抗CD40單株抗體進行親和力測定

【0144】 透過Biacore T200系統(GE Healthcare，Pittsburgh，PA，USA)對實施例1中純化的小鼠抗CD40單株抗體(mAb)的親和力和結合動力學進行特徵鑑定。

【0145】簡而言之，使用 Biacore (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)提供的標準胺偶聯套組，透過伯胺基團將山羊抗鼠IgG(GE healthcare, 產品目錄BR100838, 小鼠抗體捕捉套組)共價連接至CM5晶片(來自GE healthcare 產品目錄為BR100530的羧甲基化葡聚糖塗層晶片)上，而基準品的親和力測定使用蛋白G晶片(GE healthcare, 產品目錄29-1793-15)。用乙醇胺封阻生物感測器表面未反應的部分。然後，將濃度為66.67 nM的純化的本發明的抗CD40抗體和兩個基準品抗體(BM1(Dacetuzumab, Genentech Inc., 也稱為CD40-BM1, 內部製備, 重鏈和輕鏈的胺基酸序列分別如SEQ ID NOs: 40和41所示)和BM2(Selicrelumab, Abgenix Inc., 也稱為CD40-BM2, 內部製備, 重鏈和輕鏈的胺基酸序列分別如SEQ ID NOs: 42和43所示))以10 μL/分鐘的流速流過晶片。然後，將梯度稀釋的重組人CD40-his (Acro biosystems, 產品目錄CD0-H5228, 以80 nM為起始濃度, 在HBS-EP+緩衝液(由Biacore提供)中2倍梯度稀釋)或食蟹猴CD40-his蛋白(Acro biosystems, 產品目錄CD0-C52H6, 以80 nM為起始濃度, 在HBS-EP+緩衝液(由Biacore提供)中2倍梯度稀釋)以30 μL/分鐘的流速流過晶片。追蹤抗原-抗體結合動力學2分鐘，並追蹤解離動力學10分鐘。使用BIAcore

evaluation 軟體將結合和解離曲線擬合至 1:1 Langmuir 結合模型。測定 K_D 、 K_a 和 K_d 值，並彙總於下表 2 中。

表 2. 小鼠抗 CD40 抗體的結合親和力

Biacore 動力學						
小鼠單株抗體	人 CD40-his			食蟹猴 CD40-his		
	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)
C1H1	2.10E+06	8.97E-04	4.28E-10	2.29E+06	8.63E-04	3.77E-10
BM1	8.03E+05	7.562E-03	9.42E-09	7.64E+05	7.397E-03	9.68E-09
BM2	2.06E+05	1.616E-03	7.84E-09	1.73E+05	1.508E-03	8.73E-09

【0146】 本發明的小鼠抗體 C1H1 能夠特異性結合人 CD40 和猴 CD40，並具有高於 BM1 和 BM2 的結合親和力。

實施例 3：小鼠抗 CD40 單株抗體的結合活性

【0147】 透過捕捉 ELISA 和流式細胞術 (FACS) 測定小鼠抗 CD40 抗體的結合活性。

【0148】 對於捕捉 ELISA，溶於 PBS 的濃度為 2 $\mu g/mL$ 的親和純化山羊抗鼠 IgG (F(ab')₂ 片段特異性，Jackson Immuno Research，產品目錄 115-005-072) 以 100 μL /孔塗覆在 96 孔盤中，於 4℃ 培育過夜。用洗滌緩衝液 (PBS + 0.05% v/v Tween-20，PBST) 洗滌盤 1 次，然後加入 200 μL /孔的封阻緩衝液 (含 5% w/v 脫脂牛奶的 PBST)，於 37℃ 封阻 2 小時。洗滌盤 4 次，每孔加入 100 μL 梯度稀釋 (以 66.7 nM 為起始濃度，在含 2.5% w/v 脫脂牛奶的 PBST

中5倍梯度稀釋)的本發明的抗CD40抗體、BM1、BM2和陰性對照品hIgG (用於靜脈注射的人免疫球蛋白(pH 4), Hualan Biological Engineering Inc.), 於37°C 培育40分鐘, 然後再次洗滌盤4次。在捕捉有抗CD40抗體的96孔盤中加入100 µL/孔的生物素標記的人CD40-Fc蛋白(SEQ ID NO: 30的第21-193位胺基酸殘基連接至SEQ ID NO: 28的第99-330位胺基酸殘基的N末端, 溶於含2.5% w/v脫脂牛奶的PBST中, 濃度為1.15 nM), 於37°C 培育40分鐘, 洗滌盤4次, 然後加入100 µL/孔的HRP標記鏈黴親和素(在PBST中以1:10000的比例稀釋, Jackson Immuno Research, 產品目錄016-030-084), 於37°C 培育40分鐘。最後一次洗滌後, 加入100 µL/孔的ELISA基質TMB(Innoreagents, 產品目錄TMB-S-002)於室溫進行培育。3-10分鐘後, 加入50 µL/孔的1 M H₂SO₄終止反應, 並在微量盤檢測儀上用雙波長模式(TMB檢測波長450 nm, 參考波長630 nm)讀取每個孔的吸光度值, 然後用OD (450-630)值與抗體濃度作圖。使用Graphpad Prism軟體分析數據, 並得到EC₅₀值。

【0149】 透過流式細胞術(FACS)檢測抗CD40抗體與293T-CD40細胞的結合, 其中293T-CD40細胞由Biosion內部製備, 其細胞膜穩定表現全長人CD40(uniprot#P25942-1, SEQ ID NO: 30)。按照lipofectamine 3000轉染試劑(Thermo Fisher)的說明, 將EcoRI和XbaI位址之間插入了CD40編碼序列的

pCMV-T-P質體轉染至293T細胞，來製備293T-CD40細胞。具體而言，從細胞培養瓶中收取293T-CD40細胞，洗滌兩次後重新懸浮於FACS緩衝液(含有2% v/v胎牛血清的磷酸鹽緩衝液(PBS))中。在含有 2×10^5 個細胞/孔的96孔盤中加入100 μ L/孔FACS緩衝液梯度稀釋(以80 nM為起始濃度，4倍梯度稀釋)的本發明的抗CD40抗體或對照品，冰浴40分鐘。將細胞用FACS緩衝液洗滌兩次後，每孔加入100 μ L R-藻紅蛋白標記的親和純化F(ab')₂片段化山羊抗鼠IgG (H+L)(在FACS緩衝液中以1:1000的比例稀釋，Jackson ImmunoResearch，產品目錄115-116-146)。於4℃避光培育40分鐘後，將細胞洗滌3次後重新懸浮於FACS緩衝液中。使用Becton Dickinson FACS Canto II-HTS測量螢光值，並用螢光值與抗體濃度作圖。使用Graphpad Prism軟體分析數據，並得到EC₅₀值。

【0150】 結果如圖1A-1B和圖2A-2B所示。

【0151】 結果顯示，本發明的小鼠抗體能夠特異性結合人CD40，其中1A3、1D1和C1H1的EC₅₀值低於BM1或BM2，或者BM1和BM2，表明它們能更有效地結合人CD40蛋白。此外，如圖1A-1B和圖2A-2B所示，小鼠抗體1A3或C1H1與BM1或BM2具有相當的最大結合。

實施例4：小鼠抗CD40抗體對CD40-CD40L結合或CD40-基準品結合的阻斷活性

4.1 配體阻斷ELISA

【0152】 透過競爭ELISA測定抗CD40抗體阻斷CD40與CD40L結合的能力。簡而言之，溶於塗覆緩衝液(碳酸鹽/碳酸氫鹽緩衝液)的濃度為2 µg/mL的人CD40-Fc蛋白(SEQ ID NO: 30的第21-193位胺基酸殘基連接至SEQ ID NO: 28的第99-330位胺基酸殘基的N末端)以100 µL/孔塗覆於96孔盤中，於4°C培育過夜。第二天，用洗滌緩衝液(PBS + 0.05% v/v Tween-20, PBST)洗滌盤1次，並加入含5% w/v脫脂牛奶的PBST，於37°C中封阻2小時。然後，用洗滌緩衝液洗滌盤4次。

【0153】 用含2.5% w/v脫脂牛奶的PBST梯度稀釋(以200 nM為起始濃度，5倍梯度稀釋)本發明的抗CD40抗體或對照品，並將梯度稀釋的抗CD40抗體或對照品以100 µL/孔添加到塗覆有CD40-Fc的盤中，於37°C培育40分鐘。再次用洗滌緩衝液洗滌盤4次，然後每孔加入100 µL濃度為95 ng/mL的生物素標記的人CD40L-his蛋白(Sino biological Inc.，產品目錄10239-H08E)，於37°C培育40分鐘。再次用洗滌緩衝液洗滌盤。接著，將100 µL/孔的HRP標記鏈黴親和素(在PBST緩衝液中以1:10000的比例稀釋，Jackson ImmunoResearch，產品目錄016-030-084)加到盤中，於37°C培育40分鐘。再次用洗滌緩衝液洗滌盤。最後，加入TMB，並用1 M H₂SO₄終止反應，並在微量盤檢測儀上用雙波長模

式(TMB檢測波長450 nm，參考波長630 nm)讀取每個孔的吸光度值，然後用OD(450-630)值與抗體濃度作圖。使用Graphpad Prism軟體分析數據，並得到IC₅₀值。

4.2 基準品阻斷ELISA

【0154】 透過競爭ELISA測定本發明的抗CD40抗體阻斷基準品與人CD40結合的能力。簡而言之，溶於PBS的濃度為1 μg/mL的BM2以100 μL/孔塗覆於96孔盤中，於4℃培育過夜。第二天，用洗滌緩衝液洗滌盤1次，並加入封阻緩衝液(含5% w/v脫脂牛奶的PBST)，於37℃封阻2小時。在封阻96孔盤期間，用生物素標記的人CD40-Fc蛋白(SEQ ID NO: 30的第21-193位胺基酸殘基連接至SEQ ID NO: 28的第99-330位胺基酸殘基的N末端，溶於含2.5% w/v脫脂牛奶的PBST中，濃度為0.23 nM)稀釋本發明的抗CD40抗體或對照品，以66.7 nM為起始濃度，5倍梯度稀釋，然後於室溫培育40分鐘。洗滌盤4次後，將100 μL/孔的抗體/生物素標記的人CD40-Fc混合物加到塗覆有BM2的盤中。於37℃培育40分鐘後，再次用洗滌緩衝液洗滌盤4次。然後將100 μL/孔的HRP標記鏈黴親和素加到盤中，於37℃培育40分鐘，以檢測結合到盤上的生物素標記的人CD40-Fc。再次用洗滌緩衝液洗滌盤4次。最後，加入TMB，並用1 M H₂SO₄終止反應，並在微量盤檢測儀上用雙波長模式(TMB檢測波長450 nm，參考波長630 nm)讀取吸光度值，然後用

OD(450-630)值與抗體濃度作圖。使用Graphpad Prism軟體分析數據，並得到IC₅₀值。

【0155】 兩種測定的結果如圖3A-3B和4A-4B所示。

【0156】 如圖3B所示，與BM1和BM2相比，小鼠抗體C1H1能以相似的或更低的IC₅₀值阻斷人CD40與人CD40L的結合。此外，如圖3B所示，與BM1和BM2相比，小鼠抗體C1H1顯示出更高的最大阻斷。

【0157】 圖4A和4B顯示，小鼠抗體C1H1能阻斷人CD40與BM2的結合，表明它可能與BM2結合相同或相似的表位。小鼠抗體1A3和1D1未顯示出阻斷活性，表明它可能與BM2結合至不同的表位。

實施例5：小鼠抗CD40抗體基於細胞的報導基因檢測

【0158】 使用穩定表現全長人CD40(uniprot No. P25942-1，SEQ ID NO: 30)的CD40表現報導基因細胞株293T-NF- κ B-Luc-CD40進一步測定本發明的抗CD40抗體的激動活性。按照lipofectamine 3000轉染試劑(Thermo Fisher)的說明，先後將pGL4.32[luc2P NF- κ B-RE Hygro]載體(Promega，GenBank®登錄號：EU581860)和pCMV-T-P質體(*EcoRI*和*XbaI*位址之間插入了CD40編碼序列)轉染至293T細胞，製備293T-NF- κ B-Luc-CD40細胞。當CD40激動劑與這些細胞接觸

後，其中CD40信號轉導被活化，螢光素酶的表現向上調控，並且能夠用發光檢測測定出來。

【0159】 簡而言之，將對數期的293T-NF- κ B-Luc-CD40細胞重新懸浮於含10% FBS (Gibco，產品目錄10099-141)的DMEM培養基(Gibco Inc.，產品目錄10566-016)中，並以20 μ L/孔(含 5×10^3 個細胞)接種至384孔細胞培養盤(Corning，產品目錄3707)。然後，每孔加入20 μ L梯度稀釋(以200 nM為起始濃度，在培養基中3倍梯度稀釋)的本發明的抗CD40抗體或對照品(包括內部製備的陰性對照品抗CD22抗體)，於37°C培育6小時。然後，每孔加入30 μ L ONE-Glo™螢光素酶檢測系統(Promega，產品目錄E6120)的試劑，並於室溫培育5分鐘。使用Tecan Infiniit® 200 Pro測量化學發光值。使用Graphpad Prism軟體分析數據，並得到EC₅₀值。

【0160】 結果如圖5A-5B所示。

【0161】 結果顯示，小鼠抗體1A3、1D1和C1H1的激動活性與BM1相當，但不如BM2。

實施例6：嵌合抗體的產生和特徵鑑定

【0162】 將小鼠抗CD40單株抗體的重鏈可變區和輕鏈可變區進行了定序並彙總於表1中。

【0163】 將小鼠抗CD40單株抗體C1H1、1D1和1A3的重鏈可變區和輕鏈可變區分別選殖至含人IgG1重鏈恆定區(SEQ ID NO: 27)的片段中和含人κ輕鏈恆定區(SEQ ID NO: 29)的片段中，其中可變區的C末端與相應恆定區的N末端相連。

【0164】 包含編碼連接至人IgG1重鏈恆定區的重鏈可變區的核苷酸的載體，和包含編碼連接至人κ輕鏈恆定區的輕鏈可變區的核苷酸的載體，按1.1:1的輕鏈建構體：重鏈建構體的比例，用1 mg/mL PEI瞬時轉染至50 mL 293F懸浮細胞中。

【0165】 在搖瓶中培養六天後收取細胞上清液，透過離心沉澱上清液中的細胞，然後透過前述方法從細胞上清液中純化嵌合抗體。按照前述實施例中的方案(有些內容進行了修改，有些內容沒有修改)和下述方案，透過捕捉ELISA、BIAcore親和力測定和基於細胞的報導基因檢測純化的嵌合抗體。

【0166】 對於BIAcore，用山羊抗人IgG(GE healthcare，產品目錄BR100839，人抗體捕捉套組)替代山羊抗鼠IgG，共價連接至CM5晶片上，並且用CM5晶片替代蛋白G晶片進行BM1和BM2的親和力測定。結果如表3所示。

【0167】 對於捕捉ELISA，用親和純化山羊抗人IgG (F(ab')₂ 片段特異性，Jackson Immuno Research，產品目錄109-005-097) 替代親和純化山羊抗鼠IgG (F(ab')₂ 片段特異性)，100 μL/孔。

【0168】 結果如表3、圖6A-6C和圖7A-7C所示。

表3. 嵌合抗體的結合親和力

選殖株 ID#	Biacore 動力學					
	人 CD40-his			食蟹猴 CD40-his		
	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)
小鼠 C1H1	1.79E+06	0.001227	6.84E-10	1.39E+06	0.001184	8.52E-10
嵌合 C1H1	1.82E+06	0.001567	8.61E-10	1.39E+06	0.001478	1.06E-09
BM1	7.39E+05	0.006556	8.87E-09	6.23E+05	0.006164	9.89E-09

【0169】 結果顯示，嵌合抗體與其親代抗體具有相似的結合能力和激動活性。特別地，與BM1相比，嵌合抗體C1H1對人CD40具有更高的結合親和力和能力，且對食蟹猴CD40具有更高的結合親和力。

實施例7：小鼠抗CD40單株抗體C1H1的人源化

【0170】 選擇小鼠抗CD40抗體C1H1進行人源化和進一步的研究。該抗體的人源化是採用業已成熟的CDR移植方法進行的，如下所述。

【0171】 為了選擇用於小鼠抗體C1H1人源化的接收體框架，將小鼠抗體C1H1輕鏈可變區和重鏈可變區的序列與人免疫球蛋白基因資料庫進行BLAST比對。選擇與小鼠抗體C1H1具有最高同源性的人生殖系抗體作為人源化的接收體框架。將小鼠抗體的重/輕鏈可變區CDR插入到選出的框架中，並進一步突變框架中的殘基以獲得

更多候選的重/輕鏈可變區。總共獲得4個人源化C1H1抗體，即huC1H1-V1至huC1H1-V4，其重/輕鏈可變區序列如表1中所示。

【0172】 包含編碼連接至人IgG2重鏈恆定區(SEQ ID NO: 28)的重鏈可變區的核苷酸的載體，和包含編碼連接至人κ輕鏈恆定區(SEQ ID NO: 29)的人源化輕鏈可變區的核苷酸的載體，按60%:40%的輕鏈建構體：重鏈建構體的比例，用1 mg/mL PEI瞬時轉染至50 mL 293F懸浮細胞中。

實施例8：人源化抗體的特徵鑑定

【0173】 在搖瓶中培養六天後，收取分別含有人源化抗體huC1H1-V1至huC1H1-V4的細胞上清液，並使用Octet系統(Fortebio，Octet RED 96)，按照下述方案透過Octet測定抗體與人CD40的結合親和力。簡而言之，將抗人IgG Fc捕捉(AHC)的生物感測器(來自ForteBio)用10 mM 甘胺酸(pH 1.5)預浸泡3秒，再浸入運行緩衝液(含0.5% w/v BSA的PBST)中3秒，浸泡和浸入的步驟重複3次。然後，將感測器浸入含有人源化抗CD40抗體的細胞上清液、溶於HBS-EP⁺的濃度為5 μg/mL的嵌合抗體C1H1、或溶於HBS-EP⁺的濃度為5 μg/mL的基準品中120秒，之後浸入運行緩衝液中5分鐘。新基線在運行緩衝液中運行180秒。然後將感測器浸入運行緩衝液梯度稀釋的人CD40-his蛋白(Acro biosystems，產品目錄CD0-H5228，以40 nM為起始濃度，2倍梯度稀釋)中120秒，

然後浸入運行緩衝液中10分鐘以建立基線。最後，將感測器用10 mM甘胺酸(pH 1.5)預浸泡3秒，再浸入運行緩衝液中3秒，浸泡和浸入的步驟重複3次。使用ForteBio Data Analysis 8.1將結合和解離曲線擬合至1:1 Langmuir結合模型。測定 K_a 、 K_d 和 K_D 值，並彙總於下表4中。

【0174】 結果顯示，huC1H1-V1、huC1H1-V2與嵌合抗體C1H1具有相似的人CD40結合親和力，並且其結合親和力要優於BM2。

表4. 人源化C1H1單株抗體的親和力

人源化 C1H1 單株抗體與人 CD40 結合的 Octet 動力學			
選殖株 ID#	Octet 動力學		
	人 CD40-his		
	K_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_d (s^{-1})	K_D (M)
嵌合 C1H1	1.47E+06	9.29E-04	6.33E-10
huC1H1-V1	1.41E+06	1.28E-03	9.04E-10
huC1H1-V2	1.65E+06	9.81E-04	5.96E-10
huC1H1-V3	5.23E+05	2.83E-03	5.41E-09
huC1H1-V4	4.24E+05	3.67E-03	8.66E-09
BM2	8.74E+05	9.79E-04	1.12E-09

【0175】 按照前述方法純化人源化抗體 huC1H1-V1 和 huC1H1-V2，並按照前述實施例中的方案(有些內容進行了修改，有些內容沒有修改)和下述方案，透過Biacore、捕捉ELISA、基於細胞的結合FACS、競爭ELISA、基於細胞的報導基因檢測和蛋白熱位移測定法對huC1H1-V1和huC1H1-V2進行特徵表現。

【0176】 對於捕捉ELISA，用親和純化山羊抗人IgG(F(ab')₂片段特異性，Jackson Immuno Research，產品目錄109-005-097)替代親和純化山羊抗鼠IgG (F(ab')₂片段特異性)，100 μL/孔。

【0177】 對於BIAcore，用山羊抗人IgG(GE healthcare，產品目錄BR100839，人抗體捕捉套組)替代山羊抗鼠IgG，共價連接至CM5晶片上，並且用CM5晶片替代蛋白G晶片進行BM1和BM2的親和力測定。

【0178】 對於基於細胞的結合FACS，用R-藻紅蛋白標記的親和純化山羊抗人IgG (Fcγ片段特異性，Jackson Immuno Research，產品目錄109-115-098)替代R-藻紅蛋白標記的親和純化F(ab')₂片段化山羊抗鼠IgG (H+L)，100 μL/孔。

【0179】 還對人源化抗體huC1H1-V2進行了熱穩定性測定。使用GloMelt™熱位移蛋白穩定性套組(Biotium，產品目錄33022-T)，透過蛋白熱位移分析法測定T_m(熔解溫度)。簡而言之，GloMelt™染料解凍至室溫。將含有染料的小瓶渦旋並離心。然後，將5 μL 200×染料添加到95 μL PBS中製備10×染料。反應體系中加入2 μL 10×染料和10 μg人源化抗體，並添加PBS至總反應體積為20 μL。將含有染料和抗體的離心管短暫離心，並置於實時PCR熱循環儀(Roche，LightCycler 480 II)中，該熱循環儀中Melt Curve程序的參數如表5所示。

表5. Melt Curve程序的參數

Profile 步驟	溫度	升溫速率	持續時間
Initial hold	25°C	NA	30 s
Melt curve	25-99°C	0.1°C/s	NA

【0180】 測定結果如表6和圖8-12所示。

【0181】 如表6所示，人源化抗體huC1H1-V1、huC1H1-V2與嵌合抗體C1H1具有相當的人CD40和食蟹猴CD40結合親和力。換而言之，huC1H1-V1和huC1H1-V2對人CD40和食蟹猴CD40的結合親和力，比BM1和BM2對人CD40和食蟹猴CD40的結合親和力更高。

【0182】 圖10顯示本發明的人源化抗體huC1H1-V1和huC1H1-V2能夠阻斷CD40與CD40L的結合，其阻斷活性與BM1和BM2相當或略低。

【0183】 根據圖11所示，本發明的人源化抗體huC1H1-V1和huC1H1-V2能夠阻斷人CD40與BM2的結合，表明本發明的抗體huC1H1-V1和huC1H1-V2可能與BM2結合相似的表位。

【0184】 如圖12所示，在基於細胞的報導基因檢測中，本發明的人源化抗體huC1H1-V1和huC1H1-V2的激動活性高於BM1和BM2。

表6. 人源化C1H1抗體的結合和功能活性

選殖株 ID#	Biacore 動力學						Tm (熔 解溫 度) ℃
	人 CD40-his			食蟹猴 CD40-his			
	K _a	K _d	K _D	K _a	K _d	K _D	
	(M ⁻¹ s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(M)	(M ⁻¹ s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(M)	
小鼠 C1H1	2.10E+06	8.97E-04	4.28E-10	2.29E+06	8.63E-04	3.77E-10	*
嵌合 C1H1	2.51E+06	0.002221	8.84E-10	2.54E+06	0.002147	8.46E-10	*
huC1H1-V1	2.25E+06	2.48E-03	1.10E-09	2.14E+06	0.002371	1.11E-09	*
huC1H1-V2	2.31E+06	0.002704	1.17E-09	2.56E+06	0.002735	1.07E-09	70
BM1	8.03E+05	0.007562	9.42E-09	7.64E+05	0.007397	9.68E-09	*
BM2	2.06E+05	0.001616	7.84E-09	1.73E+05	0.001508	8.73E-09	*

* 未檢測。

【0185】 儘管本發明已結合一個或多個實施方案進行了描述，應當理解的是，本發明不僅涵蓋這些實施方案，還意在涵蓋包含在所附請求項的精神和範圍內的所有可替代、修飾和等同物。本文引用的所有文獻均透過引用的方式全部併入本文。

【0186】 本申請的序列資訊總結於下表。

描述 序列/SEQ ID NO.
小鼠、嵌合和人源化抗體 C1H1 的 VH-CDR1 NYGIS (SEQ ID NO: 1)
小鼠、嵌合和人源化抗體 C1H1 的 VH-CDR2 SISSGGDNTYYPDNVKG (SEQ ID NO: 4)
小鼠、嵌合和人源化抗體 C1H1 的 VH-CDR3 AGEKAMDY (SEQ ID NO: 7)
小鼠、嵌合和人源化抗體 C1H1 的 VL-CDR1 RASQTINNNLH (SEQ ID NO: 10)
小鼠、嵌合和人源化抗體 C1H1 的 VL-CDR2 YASQSIG (SEQ ID NO: 13)
小鼠、嵌合和人源化抗體 C1H1 的 VL-CDR3 QQFSSWPLT (SEQ ID NO: 16)
小鼠和嵌合抗體 C1H1 的 VH

EVKLVESGGGLVKPGASLKLSCAASGFTFSNYGISWVRQTSDKRLEWVASIS SGGDNTYYPDNVKGRFTISRENAKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCARAGEKA MDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 19) 小鼠抗體 C1H1 的 VH GAAGTGAAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGCGT CTCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTATGGCA TATCTTGGGTTCGCCAGACTTCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTTCGCATCC ATTAGTAGTGGTGGTGATAACACCTACTATCCAGACAATGTAAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGAGAATGCCAAGAACACCCTATACCTACAAATGA GTAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGCTGGG GAGAAGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTC A (SEQ ID NO: 31) 嵌合抗體 C1H1 的 VH GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCCGGCGGGCGGCCTGGTGAAGCCTGGAGCTA GCCTGAAGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTTTCCAACCTACGGC ATCAGCTGGGTGAGGCAGACAAGCGATAAGAGGCTGGAGTGGGTGGCCA GCATCAGCAGCGGGCGGCGATAACACATACTACCCTGACAACGTGAAGGG CAGATTCACCATCAGCAGGGAGAACGCCAAGAATACCCTGTACCTGCAG ATGAGCAGCCTGAAGAGCGAGGACACCGCCCTGTACTACTGTGCCAGGG CCGGCGAGAAGGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACCGT GAGCTCC (SEQ ID NO.:32)
huC1H1-V1 和 huC1H1-V3 的 VH EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYGISWVRQAPGKGLEWVX1SI SSGGDNTYYPDNVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGEK AMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 20, X1=A) EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYGISWVRQAPGKGLEWVASIS SGGDNTYYPDNVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGEK AMDYWGQGTSLVTVSS
huC1H1-V2 和 huC1H1-V4 的 VH EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYGISWVRQAPGKGLEWVX1SI SSGGDNTYYPDNVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGEK AMDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO: 20, X1=S) EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYGISWVRQAPGKGLEWVSSIS SGGDNTYYPDNVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAGEK AMDYWGQGTSLVTVSS GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCGGACTGGTGAAGCCTGGCGGAA GCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAACCTACGGC ATCAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCA GCATCAGCAGCGGGCGGCGACAATACCTACTACCCTGACAACGTGAAGGG CAGGTTACCATCAGCAGAGACAATGCCAAGAATCCCTGTACCTGCAGA TGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATAACAGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGC CGGCGAGAAGGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTG TCCTCC (SEQ ID NO: 33)
小鼠和嵌合抗體 C1H1 的 VL

DIVLTQSPVTLSTPTGDSVSLSCRASQTINNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQ SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGIYFCQQFSSWPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 23) 小鼠抗體 C1H1 的 VL GATATTGTACTAACTCAGTCTCCAGTCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGAT AGCGTCAGTCTTTCCTGCAGGGGCCAGCCAACTATTAACAACAACCTACA CTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAGTATG CTTCCCAGTCCATCTCTGCGGATCCCCTCCAGGTTTCTGAGTGGCAGTGGATCA GGGACAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAGACTGAAGATTTTGG AATATATTTCTGTCAACAGTTTAGCAGCTGGCCTCTTACGTTTCGGTGCTGG GACTAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 34) 嵌合抗體 C1H1 的 VL GATATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGTGACCCTGAGCGTGACACCCGGCGA CAGCGTGAGCCTGTCCTGCAGAGCCAGCCAGACCATCAACAACAATCTGC ACTGGTATCAACAGAAGAGCCACGAGAGCCCCAGGCTGCTGATCAAGTA CGCCAGCCAGAGCATCTCCGGCATCCCTAGCAGATTCAGCGGCTCCGGCT CCGGCACAGACTTTACCCTGAGCATCAACAGCGTGGAGACCGAGGATTTC GGCATCTACTTTTGCCAGCAGTTTTCCTCCTGGCCTCTGACATTCGGCGCC GGCACAAAGCTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 35)
huC1H1-V1 和 huC1H1-V2 的 VL EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTINNNLHWYQQKPGQAPRLLIX1YAS QSISGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYX2CQQFSSWPLTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 24, X1=K, X2=F) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTINNNLHWYQQKPGQAPRLLIKYASQ SISGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYFCQQFSSWPLTFGGGTKVEIK GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCTGGAGA GAGGGCCACCCTGTCCTGCAGGGCCTCCCAGACAATCAATAATAATCTGC ACTGGTATCAACAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCAGGCTGCTGATCAAGTAC GCCAGCCAGTCCATCAGCGGCATCCCTGCCAGGTTCTCCGGCAGCGGCAG CGGAACAGACTTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGGAGCCTGAGGACTTTG CCGTGTACTTTTGCCAGCAGTTCTCCAGCTGGCCTCTGACCTTTGGCGGCG GCACCAAGGTGGAGATCAAG (SEQ ID NO:36)
huC1H1-V3 和 huC1H1-V4 的 VL EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTINNNLHWYQQKPGQAPRLLIX1YAS QSISGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYX2CQQFSSWPLTFGGGTKVEI K (SEQ ID NO: 24, X1=Y, X2=Y) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTINNNLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQ SISGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQFSSWPLTFGGGTKVEIK
小鼠和嵌合抗體 1A3 的 VH-CDR1 GYYLH (SEQ ID NO: 2)
小鼠和嵌合抗體 1A3 的 VH-CDR2 YISCHDGTIIYNQKFKG (SEQ ID NO: 5)
小鼠和嵌合抗體 1A3 的 VH-CDR3

FLNYYGSNYAMDY (SEQ ID NO: 8)
小鼠和嵌合抗體 1A3 的 VL-CDR1 KASQDVGPAA (SEQ ID NO: 11)
小鼠和嵌合抗體 1A3 的 VL-CDR2 WASTRHT (SEQ ID NO: 14)
小鼠和嵌合抗體 1A3 的 VL-CDR3 QQYFTYPLT (SEQ ID NO: 17)
小鼠和嵌合抗體 1A3 的 VH EVQLQQSGPELVKTGASVKISCKASGYSGFYGLHWVKQSLGKGLEWIGYIS CHDGTIIYNQKFKGKATFTLDTSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYFCARFLNYYGS NYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 21)
小鼠和嵌合抗體 1A3 的 VL DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGPAAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRHTGVPDRFTGSGYGTDFTLTINNVQSEDLADYFCQQYFTYPLTFGGGTK LEIK (SEQ ID NO: 25)
小鼠和嵌合抗體 1D1 的 VH-CDR1 DYVMH (SEQ ID NO: 3)
小鼠和嵌合抗體 1D1 的 VH-CDR2 YINPYNDGTTYNEKFKG (SEQ ID NO: 6)
小鼠和嵌合抗體 1D1 的 VH-CDR3 GFLRESWFGY (SEQ ID NO: 9)
小鼠和嵌合抗體 1D1 的 VL-CDR1 RSSQNIVHSNGNTYLD (SEQ ID NO: 12)
小鼠和嵌合抗體 1D1 的 VL-CDR2 KVSNRFS (SEQ ID NO: 15)
小鼠和嵌合抗體 1D1 的 VL-CDR3 FQGSHPPT (SEQ ID NO: 18)
小鼠和嵌合抗體 1D1 的 VH EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVMHWVKQKPGQGLECIGYI NPYNDGTTYNEKFKGKATLTSDKSSNAAYLELSSLTSEDSAVYYCARGFLRE SWFGYWGQGTSLTVSA (SEQ ID NO: 22)
小鼠和嵌合抗體 1D1 的 VL DVLLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSNGNTYLDWYLQKPGQSPKLLI YKVSNRFSQVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPPTFGGG TKLELK (SEQ ID NO:26)
嵌合抗體的重鏈恆定區 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH

EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO.: 27)
GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG
CACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG
CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA
ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC
CAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC
TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT
ACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
CACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG
CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
(SEQ ID NO:37)

人源化抗體的重鏈恆定區
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVE
CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMSHEALH
NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO.:28)
GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAG
CACCTCTGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC
CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAA
CGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC
AAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGACC
GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG
GACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCC
GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA
AGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC
AAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT

CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO:38)
嵌合和人源化抗體的輕鏈恆定區 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO.: 29) CGTACGGTGGCGGGCGCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC CAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT AACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA (SEQ ID NO:39)
人 CD40 , uniprot #P25942-1 MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCT EFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT CEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSA FEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILL VLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVT QEDGKESRISVQERQ (SEQ ID NO:30)
Dacetuzumab 的重鏈 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYYIHWVRQAPGKGLEWVARV IPNAGGTSYNQKFKGRFTLSVDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGIY WWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:40)
Dacetuzumab 的輕鏈 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPGKAPKLLI YTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCSQTTHVPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:41)
Selicrelumab 的重鏈 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMG WINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQ PLGYCTNGVCSYFDYWQGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG

CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQ TYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:42)
Selicrelumab 的輕鏈 DIQMTQSPSSVSASVGDRVTTITCRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC (SEQ ID NO:43)

【0187】 已經詳細描述了本發明的優選實施方案，應當理解的是，以上各段落定義的本發明並不局限於以上描述中闡述的特定細節，因為本發明的許多明顯變化是可能的，且不會脫離本發明的精神或範圍。

【序列表】

<110> 大陸商正大天晴藥業集團股份有限公司

<120> 結合CD40的抗體及其用途

<150> 63/001,612

<151> 2020-03-30

<160> 43

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 1

Asn Tyr Gly Ile Ser

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 2

Gly Tyr Tyr Leu His

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 3

Asp Tyr Val Met His

1 5

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 4

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 5

Tyr Ile Ser Cys His Asp Gly Thr Ile Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 6

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 7

Ala Gly Glu Lys Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 8

Phe Leu Asn Tyr Tyr Gly Ser Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 9

Gly Phe Leu Arg Glu Ser Trp Phe Gly Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 10

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

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 11

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Pro Ala Val Ala

1 5 10

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 12

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asp

1 5 10 15

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 13

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 14

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 15

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 16

Gln Gln Phe Ser Ser Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 17

Gln Gln Tyr Phe Thr Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 18

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 19

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 19

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Thr Ser Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

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

- <210> 20
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> 人工的序列
- <220>
- <221> 不確定
- <222> (49)
- <223> Xaa可以是Ala或Ser

<400> 20
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

- <210> 21
- <211> 122
- <212> PRT
- <213> 人工的序列
- <400> 21

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ile Gly Tyr
20 25 30

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

<210> 22
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的序列
<400> 22

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Asn Ala Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Phe Leu Arg Glu Ser Trp Phe Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工的序列
<400> 23

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Ser Ser Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

 $\langle 210 \rangle$ 24

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工的序列

 $\langle 220 \rangle$

<221> 不確定

$$\langle 222 \rangle \quad (49)$$

<223> Xaa可以是Lys或Tyr

 $\langle 220 \rangle$

<221> 不確定

$$\langle 222 \rangle \quad (87)$$

<223> Xaa可以是Phe或Tyr

<400> 24

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工的序列
<400> 25

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Phe Thr Tyr Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 26
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工的序列
<400> 26

Asp Val Leu Leu Thr Gln Thr 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 His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser 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 Gly

85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 27

<211> 330

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
115				120				125							
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
130				135				140							
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145				150				155				160			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
165				170				175							
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
180				185				190							
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
195				200				205							
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
210				215				220							
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225				230				235				240			
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
245				250				255							
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
260				265				270							
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
275				280				285							
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
290				295				300							

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 28

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
115				120				125							
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
130				135				140							
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145				150				155				160			
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
165				170				175							
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
180				185				190							
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
195				200				205							
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
210				215				220							
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225				230				235				240			
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
245				250				255							
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
260				265				270							
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
275				280				285							
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
290				295				300							

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 29

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 30
<211> 277
<212> PRT
<213> 智慧人
<400> 30

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

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160
Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
 165 170 175
Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
 180 185 190
Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
 195 200 205
Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
 210 215 220
Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240
Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
 245 250 255
Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
 260 265 270
Val Gln Glu Arg Gln
 275

- <210> 31
- <211> 351
- <212> DNA
- <213> 人工的序列
- <400> 31

gaagtgaaac tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagcgtc tctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatggca tatcttgggt tcgccagact 120
tcagacaaga ggctggagtg ggtcgcatcc attagtagtg gtggtgataa cacctactat 180
ccagacaatg taaagggccg attcaccatc tccagagaga atgccaagaa caccctatac 240
ctacaaatga gtagtctgaa gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagagctggg 300
gagaaggcta tggactactg ggggtcaagga acctcagtc ccgctctctc a 351

<210> 32
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工的序列
<400> 32

gaggtgaagc tgggtggagtc cggcggcggc ctggtgaagc ctggagctag cctgaagctg 60
agctgcgccg ccagcggctt caccttttcc aactacggca tcagctgggt gaggcagaca 120
agcgataaga ggctggagtg ggtggccagc atcagcagcg gcggcgataa cacatactac 180
cctgacaacg tgaagggcag attcaccatc agcagggaga acgccaagaa taccctgtac 240
ctgcagatga gcagcctgaa gagcgaggac accgccctgt actactgtgc cagggccggc 300
gagaaggcca tggactactg gggccagggc acctccgtga cctgagctc c 351

<210> 33
<211> 351
<212> DNA
<213> 人工的序列
<400> 33

gaggtgcagc tgggtggagag cggcggcgga ctggtgaagc ctggcggaag cctgagactg 60
agctgcgccg cctccggctt caccttctcc aactacggca tcagctgggt gaggcaggcc 120
cccggaaagg gcctggagtg ggtgagcagc atcagcagcg gcggcgacaa tacctactac 180
cctgacaacg tgaagggcag gttcaccatc agcagagaca atgccaagaa ttccctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggat acagccgtgt actactgtgc cagagccggc 300
gagaaggcca tggattactg gggccagggc accctggtga ccgtgtcctc c 351

<210> 34
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工的序列
<400> 34

gatattgtac taactcagtc tccagtcacc ctgtctgtga ctccaggaga tagcgtcagt 60
ctttcctgca gggccagcca aactattaac aacaacctac actggtatca acaaaaatca 120
catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatccccctc 180
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttactctca gtatcaacag tgtggagact 240
gaagattttg gaatatatit ctgtcaacag tttagcagct ggctctttac gttcggtgct 300
gggactaagc tggagctgaa a 321

<210> 35
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工的序列
<400> 35

gatatcgtgc tgacctagag ccccgtagc ctgagcgtga caccggcgga cagcgtgagc 60
ctgtcctgca gagccagcca gaccatcaac aacaatctgc actgggtatca acagaagagc 120
cacgagagcc ccaggctgct gatcaagtac gccagccaga gcatctccgg catccctagc 180
agattcagcg gctccggctc cggcacagac ttaccctga gcatcaacag cgtggagacc 240
gaggatttcg gcatctactt ttgccagcag ttttctctct ggctcttgac attcggcgcc 300
ggcacaagc tggagctgaa g 321

<210> 36
<211> 321
<212> DNA
<213> 人工的序列
<400> 36

gagatcgtgc tgacctagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggaga gagggccacc 60
ctgtcctgca gggcctccca gacaatcaat aataatctgc actgggtatca acagaagccc 120
ggccaggccc ccaggctgct gatcaagtac gccagccagt ccatcagcgg catccctgcc 180
aggttctccg gcagcggcag cggaacagac ttaccctga ccatctcttc cctggagcct 240
gaggactttg ccgtgtactt ttgccagcag ttctccagct ggctcttgac ctttggcggc 300
ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 37
<211> 993
<212> DNA
<213> 人工的序列
<400> 37

gctagcacca agggcccatac ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagcgg ccttgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca	180
ggactctact ccttcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttgtg aaaaaactca cacatgcccc cctgtcccag cacctgaact cctgggggga	360
ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct	420
gaggtcacat gcgtgggtgtt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gtccaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540
agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gcaaggctctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatac ccgggaggag	720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840
ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gacgaggtgg	900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga	993

- <210> 38
- <211> 981
- <212> DNA
- <213> 人工的序列
- <400> 38

gcctccacca agggcccatac ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctctgag	60
--	----

agcacagcgg cctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg	120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgctg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca	180
ggactctact ccttcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc	300
aaatgtttgtg tcgagtgtccc accgtgtccca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc	360
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacgtgc	420
gtgggtgggtg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc	480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt	540
gtggtcagcg tcttcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg	660
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatgc cgtggagtgg	780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac	840
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	960
tccctgtctc cgggtaaatg a	981

- <210> 39
- <211> 324
- <212> DNA
- <213> 人工的序列
- <400> 39

cgtacgggtg cggcgccatc tgtcttcac tccccccat ctgatgagca gttgaaatct	60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag	120

tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg ttga 324

<210> 40
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工的序列
<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 41
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工的序列
<400> 41

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	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser
				20						25					30
Asn	Gly	Asn	Thr	Phe	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala
				35						40					45
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
				50						55					60
Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile
65										70					75
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Thr
										85					90
Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
										100					105
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
										115					120
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
										130					135
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
										145					150
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
										155					160
										165					170
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu
										175					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> 42

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 42

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 Asp 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 Asn Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Gln Pro Leu Gly Tyr Cys Thr Asn Gly Val Cys Ser Tyr

100 105 110

Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser
115				120				125							
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr
130				135				140							
Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro
145				150				155				160			
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val
165				170				175							
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser
180				185				190							
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr
195				200				205							
Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val
210				215				220							
Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val
225				230				235				240			
Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
245				250				255							
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
260				265				270							
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
275				280				285							
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr
290				295				300							

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400
Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
Ser Pro Gly Lys
450

<210> 43
<211> 214
<212> PRT

<213> 人工的序列

<400> 43

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

【發明申請專利範圍】

- 【請求項1】 一種分離的單株抗體或其抗原結合部分，所述單株抗體或其抗原結合部分結合CD40，其包含：(i)重鏈可變區，所述重鏈可變區包含VH CDR1區、VH CDR2區和VH CDR3區，其中VH CDR1區、VH CDR2區和VH CDR3區分別包含：SEQ ID NOs: 1、4和7所示的胺基酸序列；和(ii)輕鏈可變區，所述輕鏈可變區包含VL CDR1區、VL CDR2區和VL CDR3區，其中VL CDR1區、VL CDR2區和VL CDR3區分別包含：SEQ ID NOs: 10、13和16所示的胺基酸序列。
- 【請求項2】 根據請求項1所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分，其中所述重鏈可變區包含SEQ ID NOs: 19或20 (X1=A或S)所示的胺基酸序列。
- 【請求項3】 根據請求項1所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分，其中所述輕鏈可變區包含SEQ ID NOs: 23或24 (X1=K、X2=F；或X1=Y、X2=Y)所示的胺基酸序列。
- 【請求項4】 根據請求項1所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分，其中重鏈可變區和輕鏈可變區包含：(1)SEQ ID NOs: 19和23所示的胺基酸序列；(2)SEQ ID NOs: 20 (X1=A)和24 (X1=K、X2=F)所示的胺基酸序列；(3)SEQ ID NOs: 20 (X1=S)和24 (X1=K、X2=F)所示的胺基酸序列；(4)SEQ ID NOs: 20 (X1=A)和24 (X1=Y、X2=Y)所示的胺基酸序列；或(5)SEQ ID

NOs: 20(X1=S)和24 (X1=Y、X2=Y)所示的胺基酸序列。

【請求項5】 根據請求項1所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分，其中重鏈可變區和輕鏈可變區包含：SEQ ID NOs: 20 (X1=S)和24 (X1=K、X2=F)所示的胺基酸序列

【請求項6】 根據請求項1所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分，所述單株抗體或其抗原結合部分包含連接至所述重鏈可變區的重鏈恆定區，和連接至所述輕鏈可變區的輕鏈恆定區，所述重鏈恆定區具有如SEQ ID NOs: 27或28所示的胺基酸序列，所述輕鏈恆定區具有如SEQ ID NO: 29所示的胺基酸序列。

【請求項7】 根據請求項5所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分，所述單株抗體或其抗原結合部分包含連接至所述重鏈可變區的重鏈恆定區，和連接至所述輕鏈可變區的輕鏈恆定區，所述重鏈恆定區具有如SEQ ID NO: 28所示的胺基酸序列，所述輕鏈恆定區具有如SEQ ID NO: 29所示的胺基酸序列。

【請求項8】 根據請求項1所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分，所述單株抗體或其抗原結合部分(a)結合人CD40；(b)結合猴CD40；(c)阻斷CD40與CD40L的相互作用；和/或(c)活化CD40信號轉導。

【請求項9】 根據請求項1所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分，所述單株抗體或其抗原結合部分是小鼠、嵌合或人源化抗體。

- 【請求項10】 根據請求項1所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分，所述單株抗體或其抗原結合部分是IgG1、IgG2或IgG4同種型。
- 【請求項11】 一種核苷酸，其編碼請求項1-10中任一項所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分。
- 【請求項12】 一種表現載體，其包含請求項11所述的核苷酸。
- 【請求項13】 一種宿主細胞，其包含請求項11所述的核苷酸或請求項12所述的表現載體。
- 【請求項14】 一種雙特異性分子，其包含請求項1-10中任一項所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分。
- 【請求項15】 一種免疫綴合物，其包含請求項1-10中任一項所述的分離的單株抗體或其抗原結合部分。
- 【請求項16】 一種藥物組成物，其包含請求項1-10中任一項所述的單株抗體或其抗原結合部分，以及藥學上可接受的載劑。
- 【請求項17】 根據請求項16所述的藥物組成物，其進一步包含抗腫瘤劑和/或細胞激素。
- 【請求項18】 一種根據請求項16所述的藥物組成物在製備治療有需要的受試者的癌症的藥物中的用途。
- 【請求項19】 根據請求項18所述的用途，其中所述癌症是實體瘤或非實體瘤。
- 【請求項20】 根據請求項18所述的用途，其中所述癌症選自由B細胞淋巴瘤、慢性淋巴細胞白血病、多發性骨髓瘤、黑色素瘤、結腸腺癌、胰腺癌、結腸癌、胃腸癌、前列腺癌、

膀胱癌、腎癌、卵巢癌、子宮頸癌、乳腺癌、肺癌和鼻咽癌組成的組。

【請求項21】 根據請求項18-20中任一項所述的用途，其中所述藥物組成物與一種或多種可有效抑制受試者腫瘤生長的其他抗體或非抗體藥物共同施用。

【請求項22】 一種根據請求項16所述的藥物組成物在製備治療有需要的受試者的傳染病的藥物中的用途。

【請求項23】 一種根據請求項16所述的藥物組成物在製備治療有需要的受試者的自體免疫性疾病的藥物中的用途。

【發明圖式】

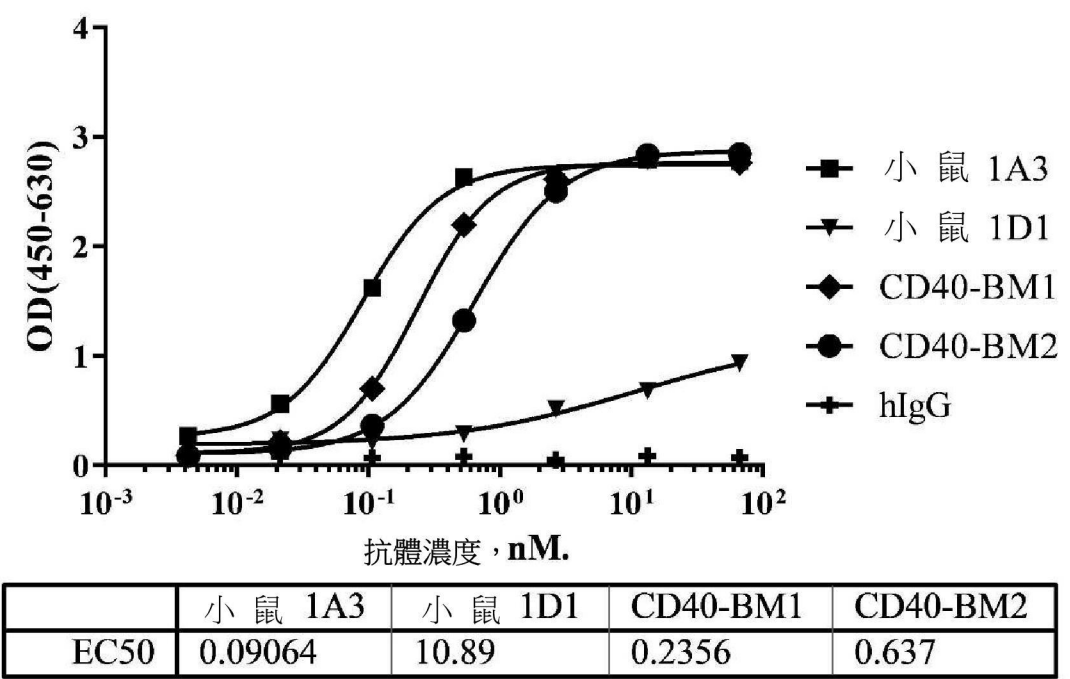


圖 1A

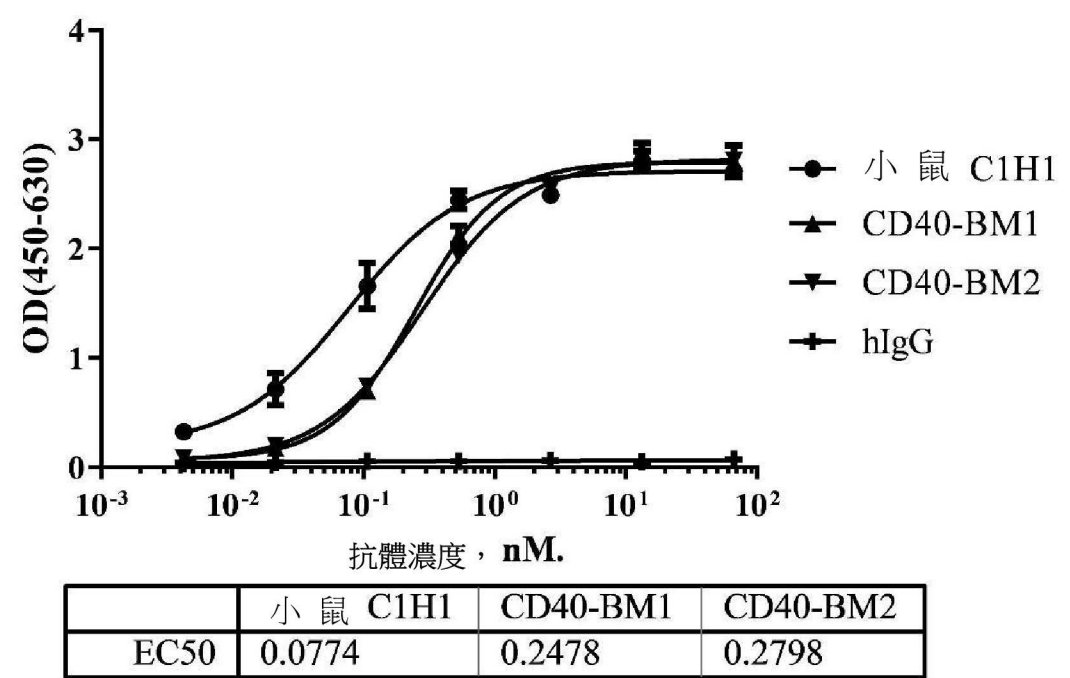


圖 1B

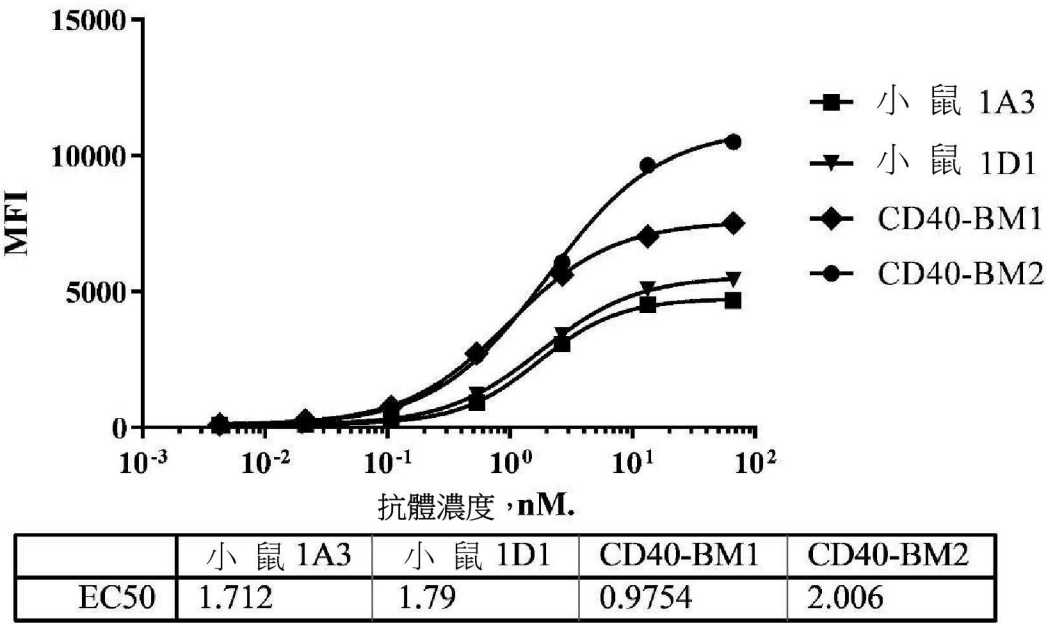


圖 2A

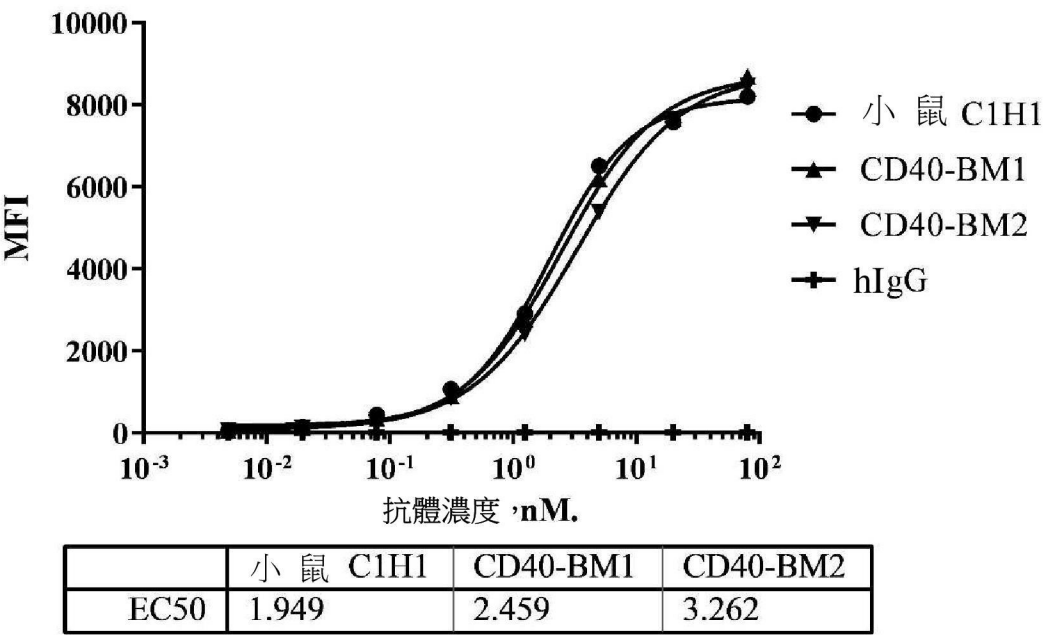


圖 2B

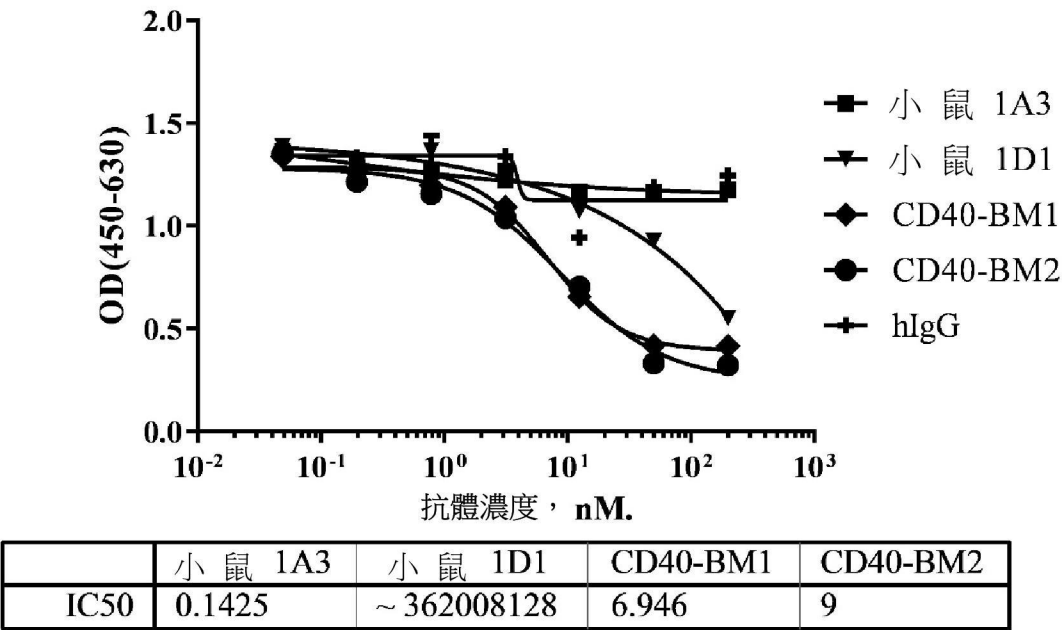


圖 3A

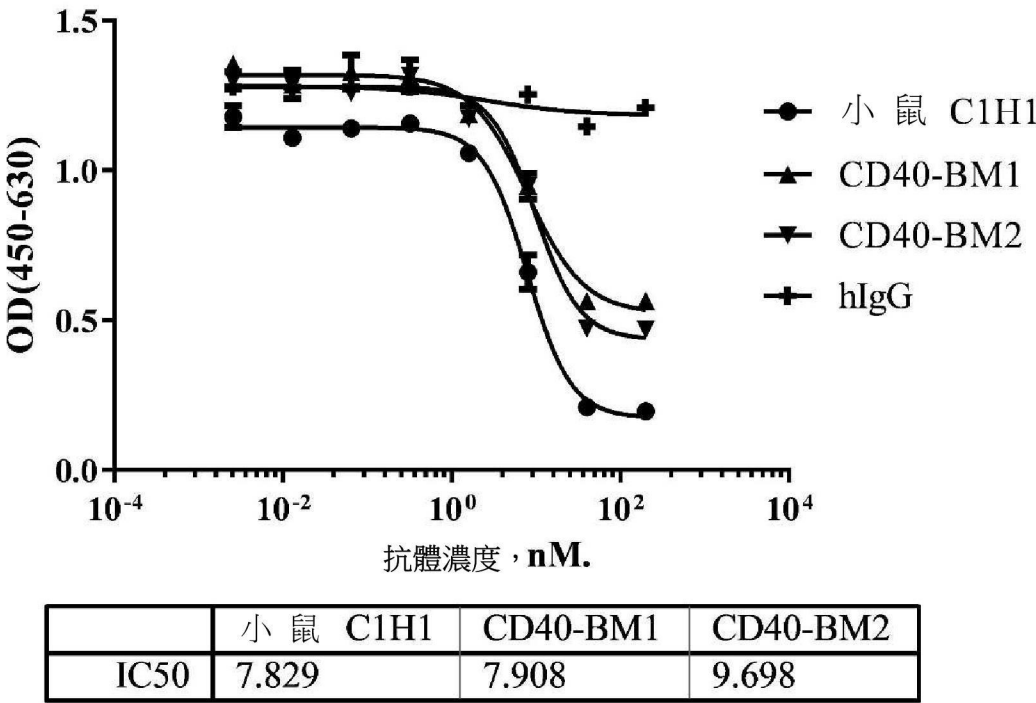


圖 3B

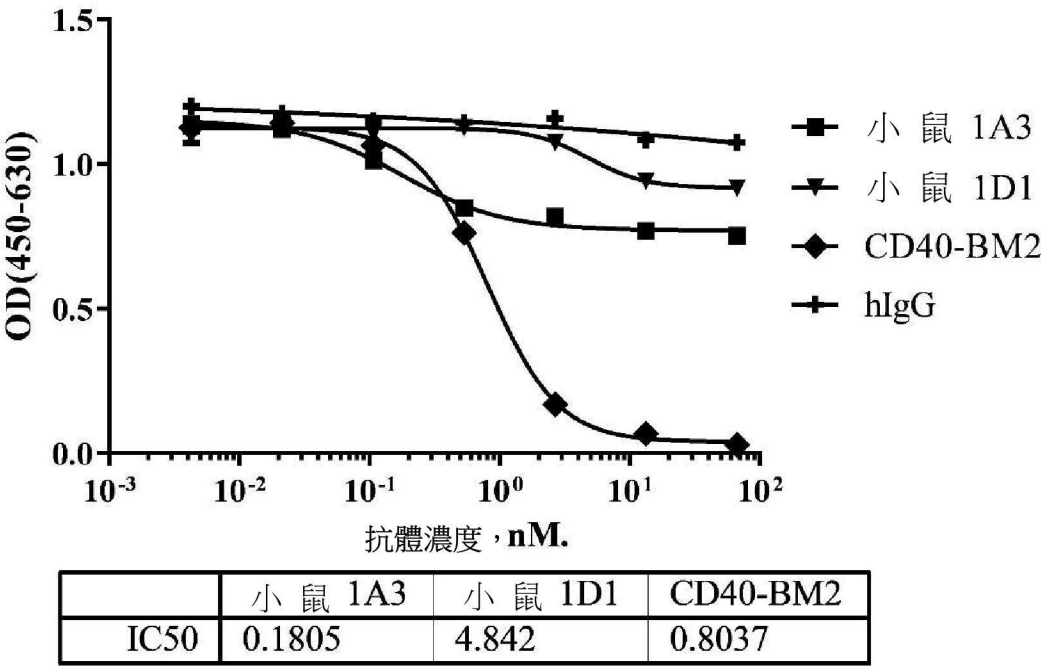


圖 4A

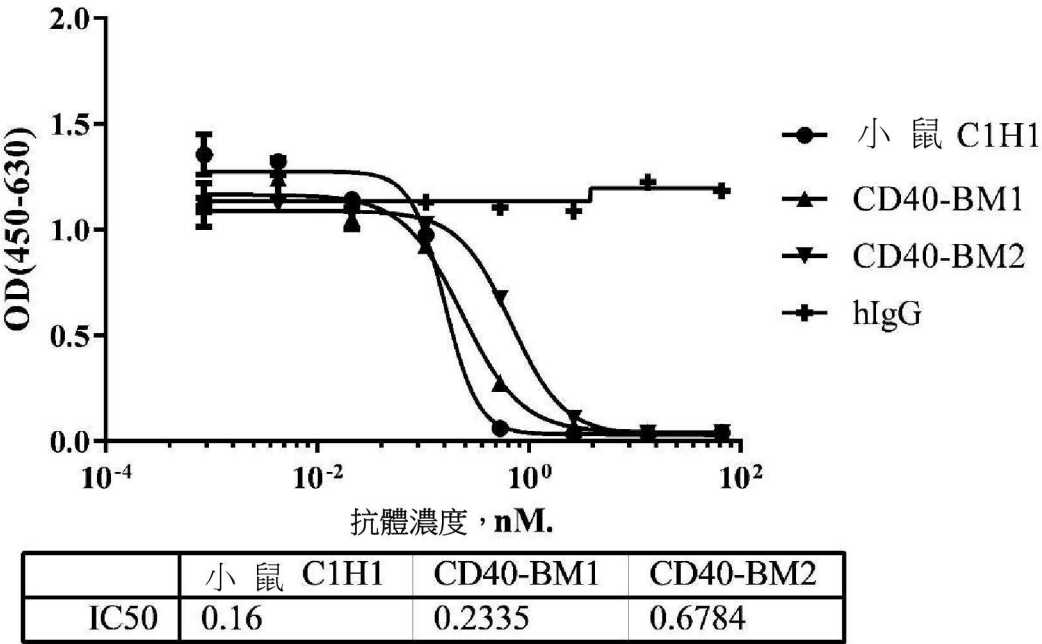


圖 4B

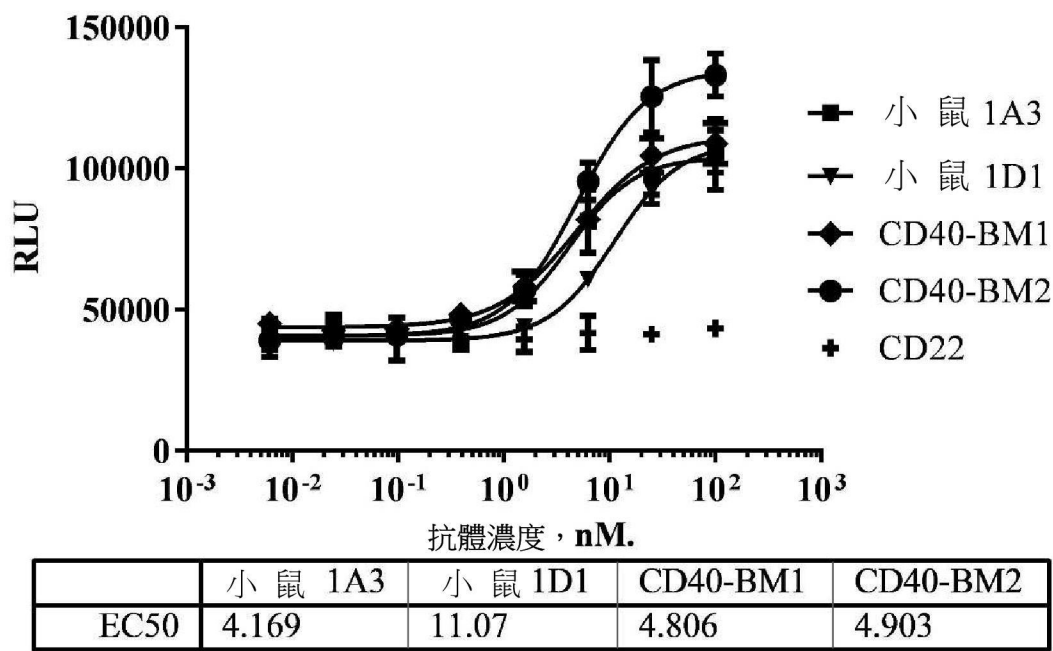


圖 5A

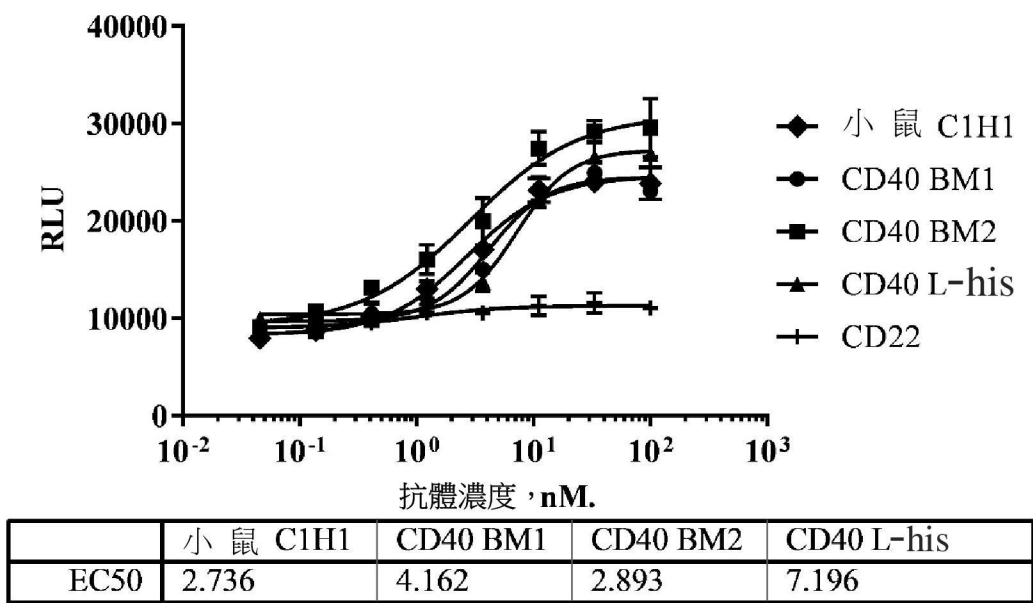


圖 5B

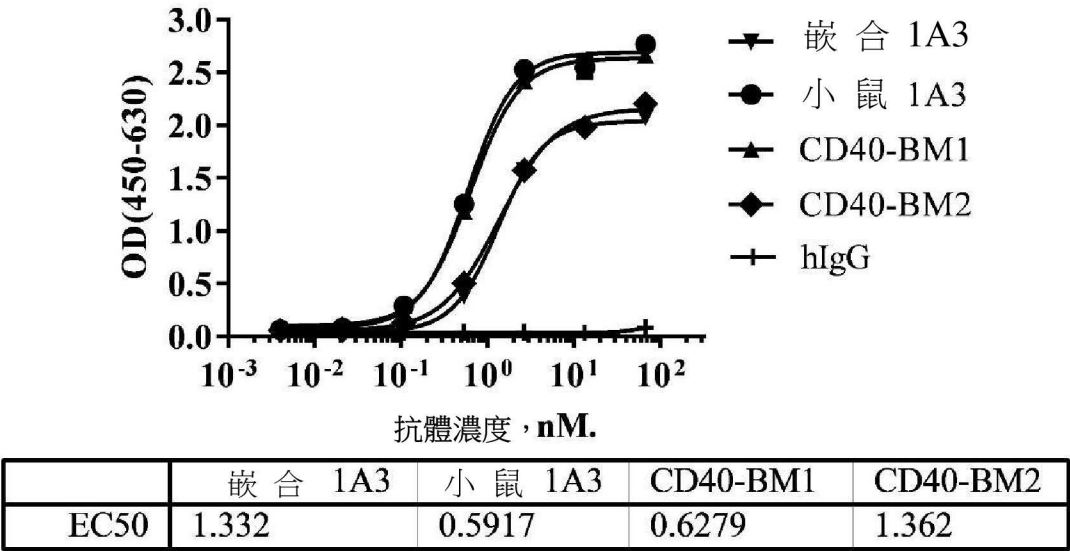


圖 6A

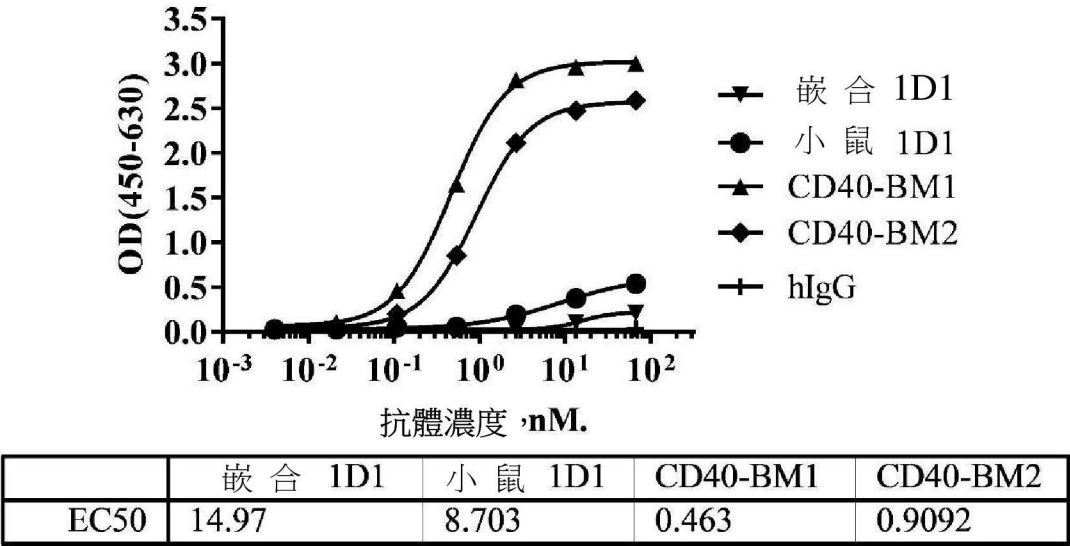


圖 6B

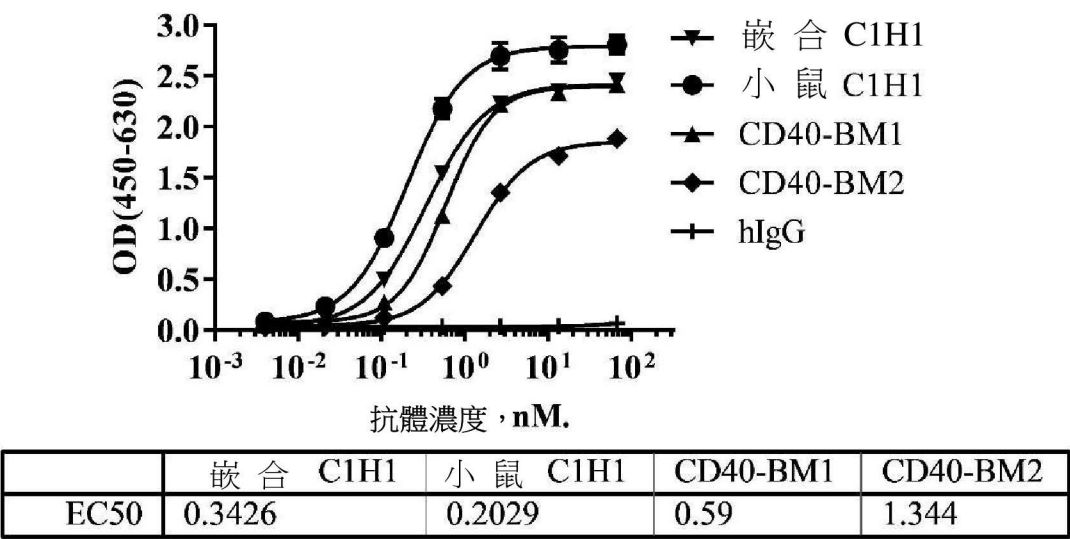


圖 6C

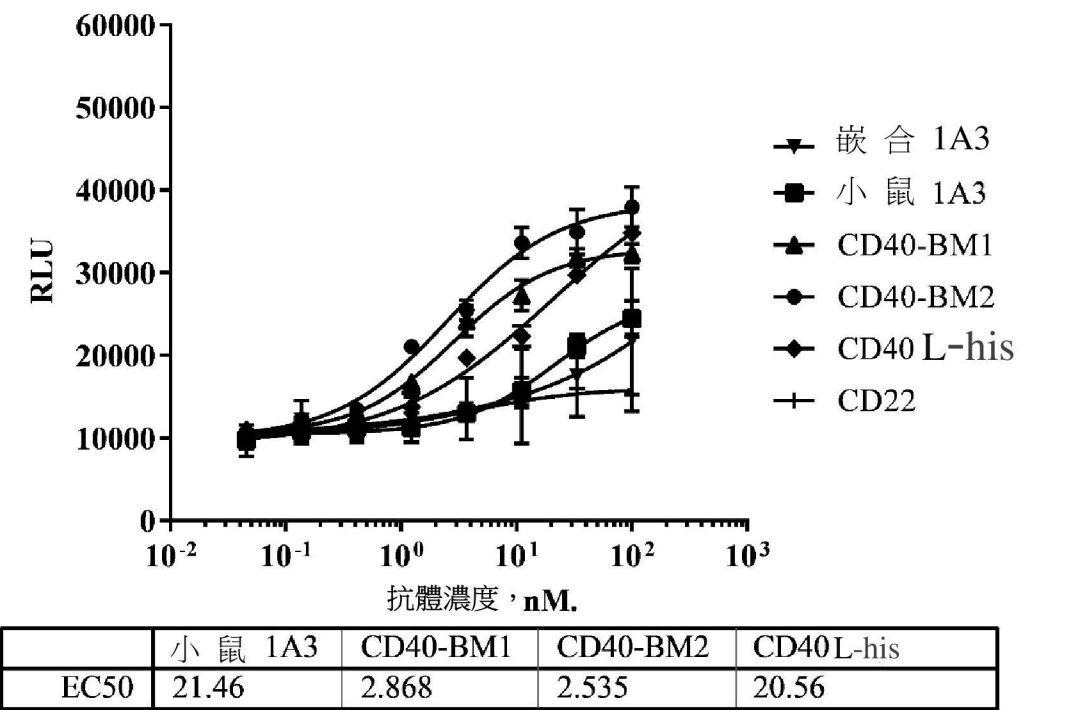


圖 7A

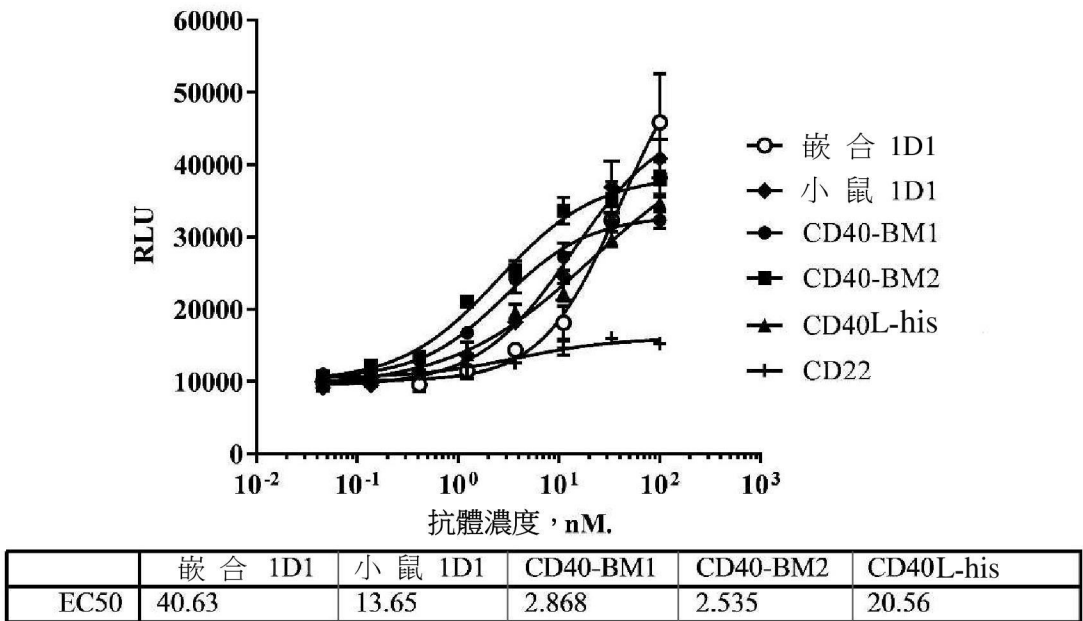


圖 7B

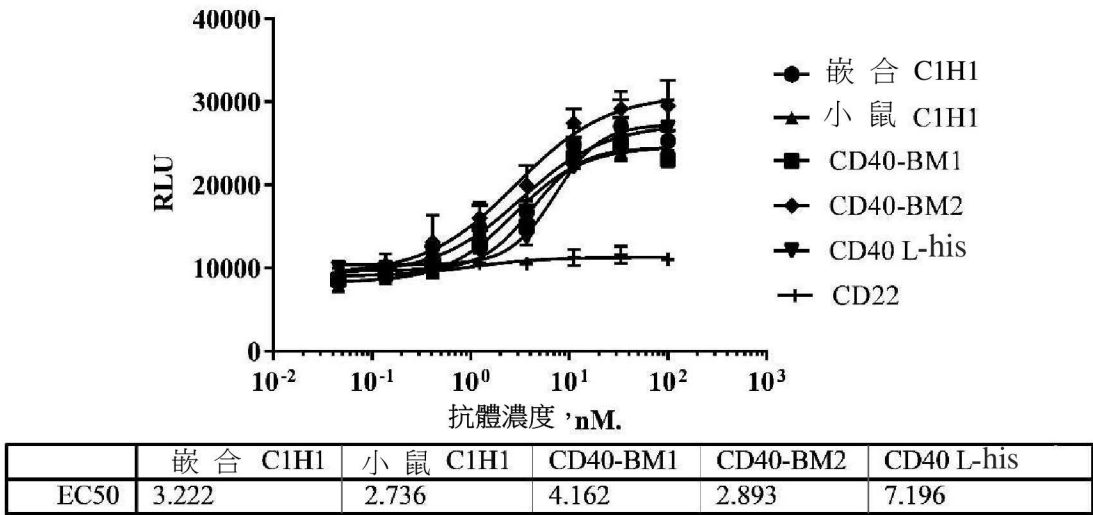


圖 7C

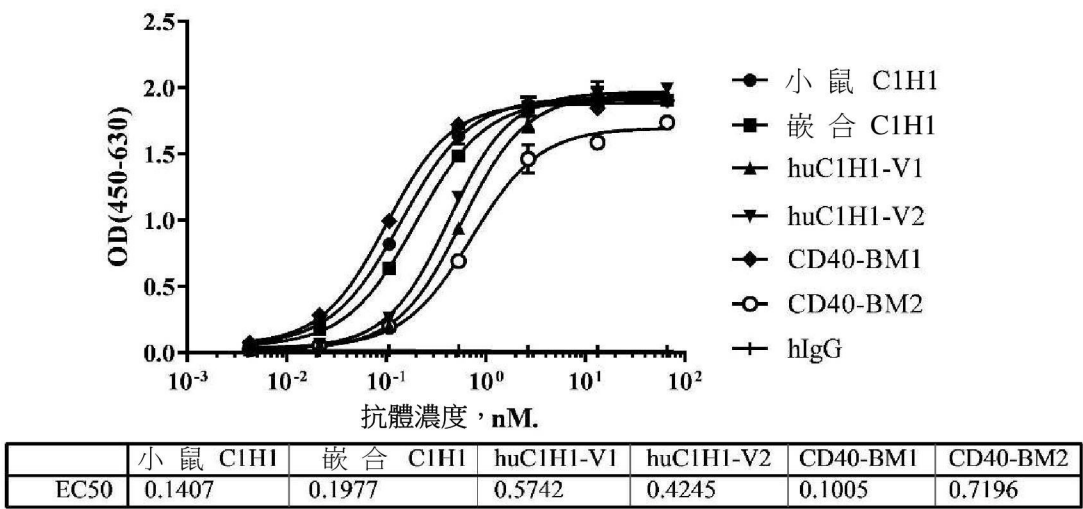


圖 8

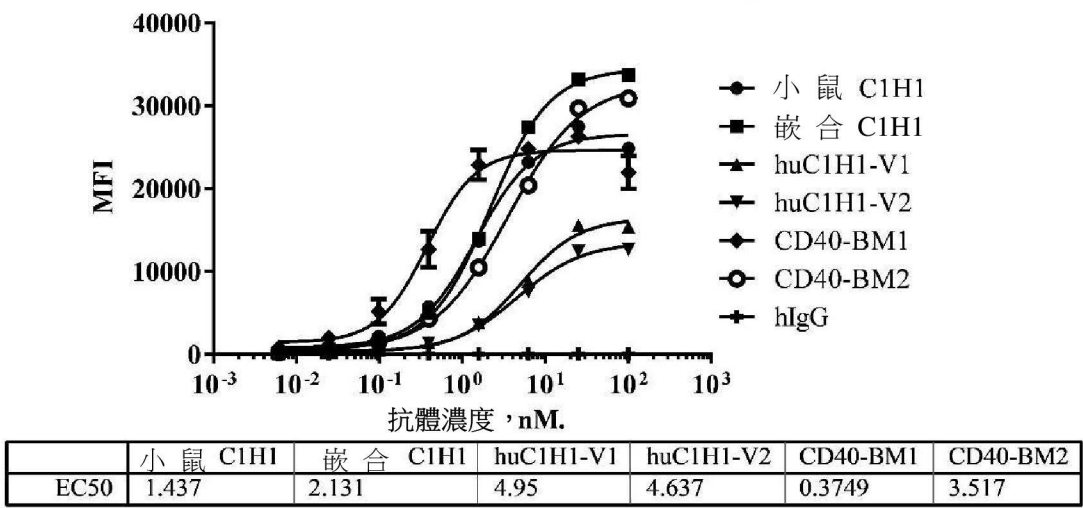


圖 9

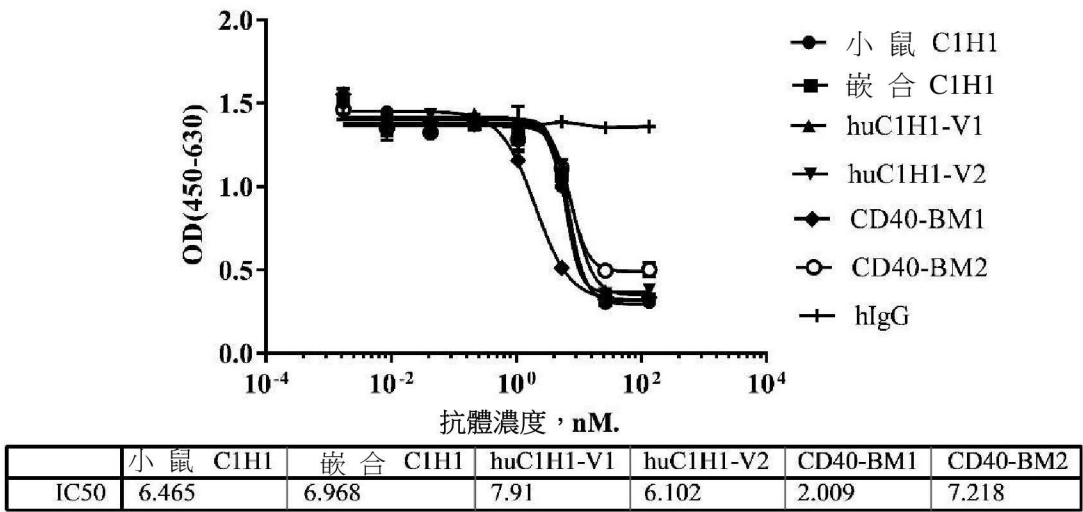


圖 10

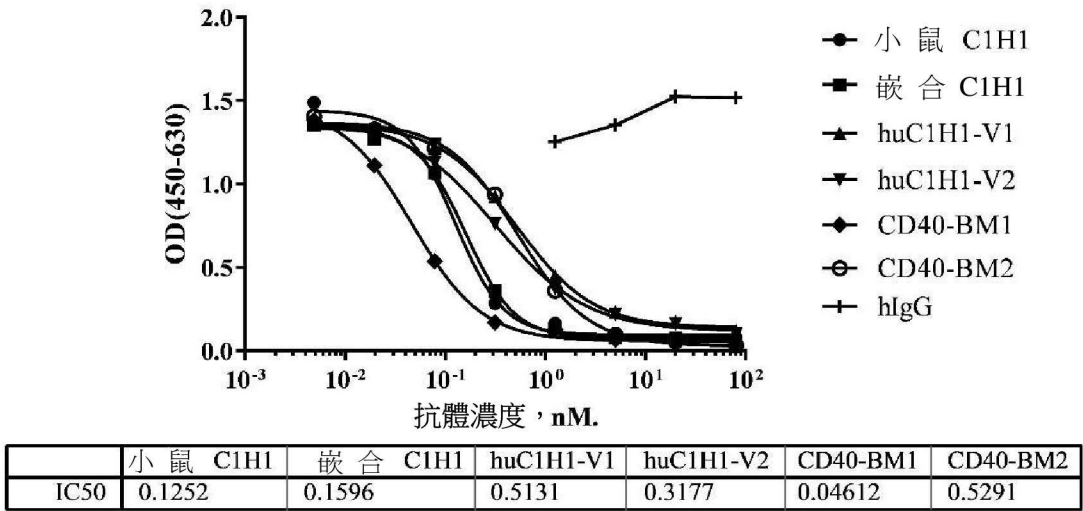
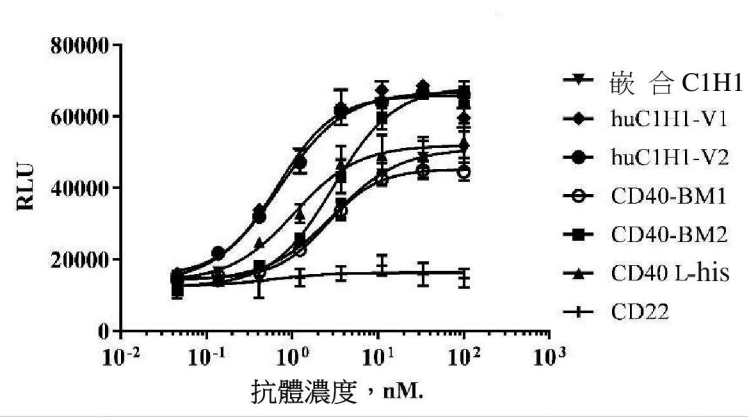


圖 11



	嵌合 C1H1	huC1H1-V1	huC1H1-V2	CD40-BM1	CD40-BM2	CD40 L-his
EC50	3.044	0.679	0.7168	2.546	3.025	1.054

圖 12