



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112566933 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 14

(21) 申请号 201880095772.4

(22) 申请日 2018.07.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112566933 A

(43) 申请公布日 2021.03.26

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.01.19

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2018/096494 2018.07.20

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/014974 EN 2020.01.23

(73) 专利权人 祐和医药科技(北京)有限公司
地址 100176 北京市朝阳区北京经济技术
开发区荣华南路2号院5号楼1202室

(72) 发明人 杨毅 董春艳 杨放 陆程远
沈月雷 倪健 郭雅南 陈云云
谢婧书

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

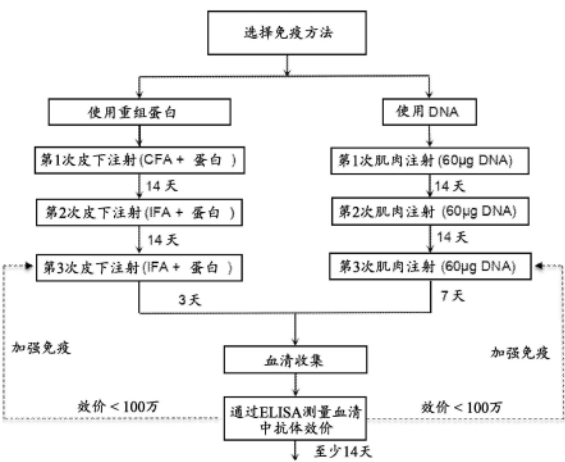
(56) 对比文件
CN 1307484 A, 2001.08.08
US 2012301488 A1, 2012.11.29
张界等. “CD40单克隆抗体的制备、筛选及功能鉴定”.《现代免疫学》.2017, 353-359.
化晓莉等. “抗人CD40功能性嵌合抗体的制备及其高效表达”.《军事医学科学院院刊》.2010, 225-229.

审查员 韩沛

权利要求书3页 说明书37页
序列表24页 附图22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。



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含:

包含互补决定区 (CDR) 1、2和3的重链可变区 (VH) 和包含CDR 1、2和3的轻链可变区 (VL),其中

VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:7、8、9所示,以及VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:10、11、12所示,所述氨基酸序列根据Kabat编号;或VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:22、23、9所示,以及VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:10、11、12所示,所述氨基酸序列根据Chothia编号。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段特异性结合人CD40。

3. 根据权利要求1或2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源化抗体或其抗原结合片段。

4. 根据权利要求1-3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单链可变片段(scFv)。

5. 一种核酸,其为编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含:

(1) 包含重链可变区 (VH) 的免疫球蛋白重链和VL的免疫球蛋白轻链,所述重链可变区 (VH) 包含氨基酸序列分别由SEQ ID NO:7、8和9所示的CDR 1、2和3,所述氨基酸序列根据Kabat编号,或所述VH包含氨基酸序列分别由SEQ ID NO:22、23、9所示的CDR 1、2和3,所述氨基酸序列根据Chothia编号,所述轻链可变区 (VL) 包含由SEQ ID NO:41、42、43或55所示的氨基酸序列,并且其中所述VH在与轻链可变区 (VL) 配对时结合CD40;或

(2) 包含VL的免疫球蛋白轻链和重链可变区 (VH) 的免疫球蛋白重链,所述VL包含氨基酸序列分别由SEQ ID NO:10、11和12所示的CDR 1、2和3,所述氨基酸序列根据Kabat编号,或所述VL包含氨基酸序列分别由SEQ ID NO:10、11和12所示的CDR 1、2和3,所述氨基酸序列根据Chothia编号,所述重链可变区 (VH) 包含由SEQ ID NO:37、38、39、40或54所示的氨基酸序列,并且其中所述VL在与所述VH配对时结合CD40。

6. 根据权利要求5所述的核酸,其中所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链,所述VH包含氨基酸序列分别由SEQ ID NO:7、8和9所示的CDR 1、2和3,所述氨基酸序列根据Kabat编号,或所述VH包含氨基酸序列分别由SEQ ID NO:22、23、9所示的CDR 1、2和3,所述氨基酸序列根据Chothia编号。

7. 根据权利要求5所述的核酸,其中所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链,所述VL包含氨基酸序列分别由SEQ ID NO:10、11和12所示的CDR 1、2和3,所述氨基酸序列根据Kabat编号,或所述VL包含氨基酸序列分别由SEQ ID NO:10、11和12所示的CDR 1、2和3,所述氨基酸序列根据Chothia编号。

8. 根据权利要求5-7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CD40,或所述VL在与VH配对时特异性结合人CD40。

9. 根据权利要求5-8中任一项所述的核酸,其中所述免疫球蛋白重链是人源化免疫球蛋白重链,并且所述免疫球蛋白轻链是人源化免疫球蛋白轻链。

10. 根据权利要求5-9中任一项所述的核酸,其中所述核酸编码单链可变片段(scFv)。

11. 根据权利要求5-10中任一项所述的核酸,其中所述核酸是cDNA。

12. 一种载体,所述载体包含根据权利要求5-11中任一项所述的核酸中的一种或多种。
13. 一种载体,所述载体包含根据权利要求5-11中任一项所述的核酸中的两种,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。
14. 一个载体对,其中每个载体包含根据权利要求5-11中任一项所述的核酸中的一种,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。
15. 一种细胞,所述细胞包含根据权利要求12或13所述的载体、或根据权利要求14所述的载体对。
16. 根据权利要求15所述的细胞,其中所述细胞是CHO细胞。
17. 一种细胞,所述细胞包含根据权利要求5-11中任一项所述的核酸中的一种或多种。
18. 一种细胞,所述细胞包含根据权利要求5-11中任一项所述的核酸中的两种。
19. 根据权利要求18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。
20. 一种产生抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括
 - (a) 在足以使根据权利要求15-19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。
21. 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含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含SEQ ID NO:37、38、39、40或54的氨基酸序列,并且所述轻链可变区(VL)包含SEQ ID NO:41、42、43或55的氨基酸序列。
22. 根据权利要求21所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含SEQ ID NO:40的序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:42的序列。
23. 根据权利要求21所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH包含SEQ ID NO:39的序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:43的序列。
24. 根据权利要求21-23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特异性结合人CD40。
25. 根据权利要求21-24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源化抗体或其抗原结合片段。
26. 根据权利要求21-25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单链可变片段(scFV)。
27. 一种抗体-药物缀合物,其包含与治疗剂共价结合的、根据权利要求1-4和21-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
28. 根据权利要求27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。
29. 治疗有效剂量的组合物在制备用于治疗患有癌症的受试者的药物中的用途,所述组合物包含根据权利要求1-4和21-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求27或28所述的抗体-药物缀合物。
30. 根据权利要求29所述的用途,其中所述受试者患有实体瘤。
31. 根据权利要求29所述的用途,其中所述癌症是黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤或恶性血液病。

32. 根据权利要求29所述的用途,其中所述癌症是淋巴瘤。

33. 根据权利要求29所述的用途,其中所述癌症是非霍奇金淋巴瘤。

34. 根据权利要求29所述的用途,其中所述癌症是慢性淋巴细胞白血病。

35. 有效剂量的组合物在制备用于降低肿瘤生长速率的药物中的用途,其中使所述肿瘤细胞与所述有效剂量的组合物接触,所述组合物包含根据权利要求1-4和21-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求27或28所述的抗体-药物缀合物。

36. 有效剂量的组合物在制备用于杀死肿瘤细胞的药物中的用途,其中使所述肿瘤细胞与所述有效剂量的组合物接触,所述组合物包含根据权利要求1-4和21-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求27或28所述的抗体-药物缀合物。

37. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1-4和21-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、以及可药用载体。

38. 一种药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求27或28所述的抗体药物缀合物、以及可药用载体。

抗CD40抗体及其用途

技术领域

[0001] 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

[0002] 癌症是目前造成人类死亡率最高的疾病之一。根据世界卫生组织的统计数据，2012年全球癌症发病和死亡病例分别达到1400万和820万。在中国，新诊断的癌症病例为307万，并且死亡人数为220万。

[0003] 抗癌抗体的最新临床和商业成功引起了对基于抗体的疗法的极大兴趣。需要开发在各种基于抗体的疗法中使用的抗癌抗体以治疗癌症。

发明内容

[0004] 本公开涉及抗CD40抗体、其抗原结合片段及其用途。

[0005] 在一个方面，本公开涉及结合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含含有互补决定区 (CDR) 1、2和3的重链可变区 (VH)，其中 VH CDR1区包含与选定的VH CDR1氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列，VH CDR2区包含与选定的VH CDR2氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列，并且VH CDR3区包含与选定的VH CDR3氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列；以及包含CDR 1、2和3的轻链可变区 (VL)，其中VL CDR1区包含与选定的VL CDR1氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列，VL CDR2区包含与选定的VL CDR2氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列，并且VL CDR3区包含与选定的VL CDR3氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列，其中所述选定的VH CDR 1、2和3氨基酸序列和选定的VL CDR 1、2和3氨基酸序列是以下之一：

[0006] (1) 所述选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:1、2、3所示，以及所述选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:4、5、6所示；

[0007] (2) 所述选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:7、8、9所示，以及所述选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:10、11、12所示；

[0008] (3) 所述选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:13、14、15所示，以及所述选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列分别由SEQ ID NO:16、17、18所示。

[0009] 在一些实施方案中，所述VH包含分别具有SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3，并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0010] 在一些实施方案中，所述VH包含分别具有SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3，并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0011] 在一些实施方案中，所述VH包含分别具有SEQ ID NO:13、14、15所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3，并且所述VL包含分别具有SEQ ID NO:16、17和18所示的氨基酸序列的CDR 1、2、3。

[0012] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段特异性结合人CD40。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是人源化抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是单链可变片段(scFV)。

[0013] 在另一个方面,本公开涉及一种核酸,其包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含:

[0014] (1) 包含重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,所述重链可变区(VH)包含分别含有由SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR)1、2和3,并且其中所述VH在与包含由SEQ ID NO:33、34、35、36或53所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合CD40;

[0015] (2) 包含VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别含有由SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中所述VL在与包含由SEQ ID NO:30、31、32或52所示的氨基酸序列的VH配对时结合CD40;

[0016] (3) 包含重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,所述重链可变区(VH)包含分别含有由SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中所述VH在与包含由SEQ ID NO:41、42、43或55所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合CD40;

[0017] (4) 包含VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别含有由SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中所述VL在与包含由SEQ ID NO:37、38、39、40或54所示的氨基酸序列的VH配对时结合CD40;

[0018] (5) 包含重链可变区(VH)的免疫球蛋白重链或其片段,所述重链可变区(VH)包含分别含有由SEQ ID NO:13、14、15所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中所述VH在与包含由SEQ ID NO:48、49、50、51或57所示的氨基酸序列的轻链可变区(VL)配对时结合CD40;

[0019] (6) 包含VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别含有由SEQ ID NO:16、17和18所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3,并且其中所述VL在与包含由SEQ ID NO:44、45、46、47或56所示的氨基酸序列的VH配对时结合CD40。

[0020] 在一些实施方案中,所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段,所述VH包含分别含有由SEQ ID NO:1、2和3所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0021] 在一些实施方案中,所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别含有由SEQ ID NO:4、5和6所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0022] 在一些实施方案中,所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段,所述VH包含分别含有由SEQ ID NO:7、8和9所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0023] 在一些实施方案中,所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别含有由SEQ ID NO:10、11和12所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0024] 在一些实施方案中,所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VH的免疫球蛋白重链或其片段,所述VH包含分别含有由SEQ ID NO:13、14和15所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0025] 在一些实施方案中,所述核酸包含编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含含有VL的免疫球蛋白轻链或其片段,所述VL包含分别含有由SEQ ID NO:16、17和18所示的氨基酸序列的CDR 1、2和3。

[0026] 在一些实施方案中,所述VH在与VL配对时特异性结合人CD40,或所述VL在与VH配对时特异性结合人CD40。

[0027] 在一些实施方案中,所述免疫球蛋白重链或其片段是人源化免疫球蛋白重链或其片段,并且所述免疫球蛋白轻链或其片段是人源化免疫球蛋白轻链或其片段。

[0028] 在一些实施方案中,所述核酸编码单链可变片段(scFv)。在一些实施方案中,所述核酸是cDNA。

[0029] 在一个方面,本公开涉及一种载体,所述载体包含如本文所述的核酸中的一种或多种。在一些实施方案中,所述载体编码VL区和VH区,所述VL区和VH区一起结合CD40。

[0030] 在一个方面,本公开提供了载体对,其中每个载体包含如本文所述的核酸中的一种,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。

[0031] 在另一个方面,本公开涉及一种细胞,所述细胞包含如本文所述的载体、或如本文所述的载体对。在一些实施方案中,所述细胞是CHO细胞。

[0032] 在一个方面,本公开还提供了一种细胞,所述细胞包含如本文所述的核酸中的一种或多种。

[0033] 在另一个方面,本公开提供了一种细胞,所述细胞包含如本文所述的核酸中的两种。在一些实施方案中,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。

[0034] 在另一个方面,本公开涉及产生抗体或其抗原结合片段的方法。所述方法包括以下步骤:

[0035] (a)在足以使如本文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

[0036] (b)收集由所述细胞产生的抗体或抗原结合片段。

[0037] 在一个方面,本公开涉及一种结合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含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)包含与选定的VH序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,并且所述轻链可变区(VL)包含与选定的VL序列具有至少90%同一性的氨基酸序列,其中所述选定的VH序列和选定的VL序列是以下之一:

[0038] (1)所述选定的VH序列是SEQ ID NO:30、31、32或52,以及所述选定的VL序列是SEQ ID NO:33、34、35、36或53;

[0039] (2)所述选定的VH序列是SEQ ID NO:37、38、39、40或54,以及所述选定的VL序列是SEQ ID NO:41、42、43或55;

[0040] (3)所述选定的VH序列是SEQ ID NO:44、45、46、47或56,以及所述选定的VL序列是SEQ ID NO:48、49、50、51或57。

[0041] 在一些实施方案中,所述VH包含SEQ ID NO:40的序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:42的序列。

[0042] 在一些实施方案中,所述VH包含SEQ ID NO:39的序列,并且所述VL包含SEQ ID NO:43的序列。

[0043] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段特异性结合人CD40。

[0044] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是人源化抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是单链可变片段(scFV)。

[0045] 在一个方面,本公开涉及一种抗体-药物缀合物,其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,所述治疗剂是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。

[0046] 在另一个方面,本公开涉及治疗患有癌症的受试者的方法。所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用治疗有效剂量的组合物,所述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。

[0047] 在一些实施方案中,所述受试者患有实体瘤(例如,晚期实体瘤)。在一些实施方案中,所述癌症是不可切除的黑色素瘤或转移性黑色素瘤。在一些实施方案中,所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、头颈癌、肾细胞癌(RCC)、黑色素瘤、膀胱癌、胃癌、尿路上皮癌、默克尔细胞癌、三阴性乳腺癌(TNBC)或结直肠癌。

[0048] 在一些实施方案中,所述癌症是黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤或血液恶性病(例如,非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤或慢性淋巴细胞白血病)。

[0049] 在一个方面,本公开涉及降低肿瘤生长速率的方法。所述方法包括以下步骤:使肿瘤细胞与有效剂量的组合物接触,所述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。

[0050] 在另一个方面,本公开涉及杀死肿瘤细胞的方法。所述方法包括以下步骤:使肿瘤细胞与有效剂量的组合物接触,所述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。

[0051] 在一个方面,本公开提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的抗体或其抗原结合片段、以及可药用载体。

[0052] 在另一个方面,本公开还提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含如本文所述的抗体药物缀合物、以及可药用载体。

[0053] 如本文所用术语“癌症”是指具有自主生长能力的细胞。此类细胞的实施例包括具有以迅速增殖细胞生长为特征的异常状态或状况的细胞。所述术语旨在包括癌性生长,例如肿瘤;致癌过程,转移性组织以及恶性转化的细胞、组织或器官,不论组织病理类型或浸润程度如何。还包括各种器官系统的恶性病,例如呼吸系统、心血管系统、肾脏系统、生殖系统、血液系统、神经系统、肝脏系统、胃肠系统和内分泌系统的恶性病;以及腺癌,其包括恶性病,例如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、肺部非小细胞癌和小肠癌。“天然产生的”癌症包括除了通过将癌细胞植入受试者而实验性诱导的癌症之外的任何癌症,并且包括例如自发产生的癌症、由患者暴露于一种或多种致癌物引起的癌症、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病。所述术语还包括癌肉瘤,癌肉瘤包括由癌性组织和肉瘤组织组成的恶性病。“腺癌”是指源自腺体组织的癌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病。术语“造血性肿瘤疾病(hematopoietic neoplastic disorder)”包括涉及造血起源的增生性细胞/肿瘤细胞的疾病。造血性肿瘤疾病可由骨髓、淋巴或红系谱系或其前体细

胞引起。

[0054] 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中的任何一个或来自免疫球蛋白重链的三个CDR中的任何一个)并且能够特异性结合表位的任何抗原结合分子。抗体的非限制性实施例包括: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,抗体可以含有人抗体的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。

[0055] 如本文所用术语“抗原结合片段”是指全长抗体的一部分,其中抗体的所述部分能够特异性结合抗原。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,重链的可变结构域或轻链的可变结构域)。抗体片段的非限制性实施例包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段。

[0056] 如本文所用术语“人抗体”是指由人体内存在的内源性核酸(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。

[0057] 如本文所用术语“嵌合抗体”是指含有在至少两种不同抗体(例如,来自两种不同哺乳动物物种的抗体,例如人抗体和小鼠抗体)中存在的序列的抗体。嵌合抗体的非限制性实施例是含有非人(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。嵌合抗体的另外的实施例描述于本文中并且是本领域已知的。

[0058] 如本文所用术语“人源化抗体”是指含有源自非人(例如,小鼠)免疫球蛋白的最小序列并且含有源自人免疫球蛋白的序列的非人抗体。在非限制性实施例中,人源化抗体是人抗体(受体抗体),其中所述受体抗体的高变区(例如CDR)残基被来自具有期望特异性、亲和力和能力的例如小鼠、大鼠或兔抗体的非人抗体(例如供体抗体)的高变区(例如,CDR)残基替代。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)免疫球蛋白残基替代。在一些实施方案中,人源化抗体可以含有在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。可以进行这些修饰以进一步改善抗体性能。在一些实施方案中,人源化抗体含有至少一个、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)免疫球蛋白的那些,并且全部或基本上全部的框架区是人免疫球蛋白的那些。人源化抗体还可以含有至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白恒定区。可以使用本领域已知的分子生物学方法产生人源化抗体。本文描述了用于产生人源化抗体的方法的非限制性实施例。

[0059] 如本文所用术语“单链抗体”是指含有能够特异性结合抗原的至少两个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实施例。

[0060] 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,多聚体抗体能够使一个靶分子(例如CD40)与哺乳动物细胞(例如人T细胞)表面上的至少一个第二靶分子(例如CTLA-4)交联。

[0061] 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对其提供治疗的动物、人或非人动物。本发明涵盖了兽医和非兽医应用。人患者可以是成年人或未成年人(例如,18岁以下的人)。除人外,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、白鼬、兔)、兔形目动物、猪(例如小猪、微型猪(miniature pig))、马、犬、猫科动物、牛科动物及其他家养动物、农场动物和动物园动物。

[0062] 如本文所用,当提及抗体时,短语“与...特异性结合”和“特异性结合...”是指抗体与其靶分子(例如,CD40)相互作用,优选与其他分子相互作用,因为所述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,试剂通常识别并结合包括特定结构的分子,而不是所有分子。可以将特异性结合靶分子的抗体称为靶标特异性抗体。例如,可以将特异性结合CD40分子的抗体称为CD40特异性抗体或抗CD40抗体。

[0063] 如本文所用术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,是指具有至少两个氨基酸的任何长度的氨基酸聚合物。

[0064] 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,是指具有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。

[0065] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域之内的普通技术人员通常所理解的相同的含义。本文描述了用于本发明的方法及材料;还可使用本领域已知的其他合适方法及材料。所述材料、方法及实施例仅为说明性而不旨在限制。本文所提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目及其他参考文献均通过引用以其全文并入本文。在出现冲突情况下,以本说明书(包括定义)为准。

[0066] 根据以下具体实施方式以及附图和权利要求书,本发明的其他特征和优点将变得明显。

附图说明

[0067] 图1是显示制备抗hCD40抗体的示例性方案的第一部分的流程图。

[0068] 图2是显示制备抗hCD40抗体的示例性方案的第二部分的流程图。

[0069] 图3是一组显示抗hCD40抗体阻断hCD40和hCD40配体之间的结合的流式细胞术图。

[0070] 图4是一组显示分析抗hCD40抗体与猴CD40(rmCD40)、小鼠CD40(mCD40)和人-鼠嵌合CD40(chiCD40)的交叉反应性的流式细胞术结果的图。NC代表阴性对照。

[0071] 图5是显示使用嵌合抗hCD40抗体6A7-mHvKv-IgG4和人CD40的表面等离子体共振(SPR)结果的图。

[0072] 图6是显示使用人源化抗hCD40抗体6A7-H1K1-IgG4和人CD40的表面等离子体共振(SPR)结果的图。

[0073] 图7是显示用小鼠抗hCD40抗体治疗的具有MC-38肿瘤细胞的人源化CD40小鼠(B-hCD40)体重随时间变化的图。PS代表生理盐水(对照)。

[0074] 图8是显示用小鼠抗hCD40抗体治疗的具有MC-38肿瘤细胞的人源化CD40小鼠(B-

hCD40) 体重百分比随时间变化的图。PS代表生理盐水(对照)。

[0075] 图9是显示用小鼠抗hCD40抗体治疗的具有MC-38肿瘤细胞的人源化CD40小鼠(B-hCD40) 肿瘤体积随时间变化的图。PS代表生理盐水(对照)。

[0076] 图10是显示用嵌合抗hCD40抗体治疗的具有MC-38肿瘤细胞的人源化CD40小鼠(B-hCD40) 体重随时间变化的图。PS代表生理盐水(对照)。

[0077] 图11是显示用嵌合抗hCD40抗体治疗的具有MC-38肿瘤细胞的人源化CD40小鼠(B-hCD40) 体重百分比随时间变化的图。PS代表生理盐水(对照)。

[0078] 图12是显示用嵌合抗hCD40抗体治疗的具有MC-38肿瘤细胞的人源化CD40小鼠(B-hCD40) 肿瘤体积随时间变化的图。PS代表生理盐水(对照)。

[0079] 图13是显示用人源化抗hCD40抗体治疗的具有MC-38肿瘤细胞的人源化CD40小鼠(B-hCD40) 体重随时间变化的图。PS代表生理盐水(对照)。

[0080] 图14是显示用人源化抗hCD40抗体治疗的具有MC-38肿瘤细胞的人源化CD40小鼠(B-hCD40) 体重百分比随时间变化的图。PS代表生理盐水(对照)。

[0081] 图15是显示用人源化抗hCD40抗体治疗的具有MC-38肿瘤细胞的人源化CD40小鼠(B-hCD40) 肿瘤体积随时间变化的图。PS代表生理盐水(对照)。

[0082] 图16列出了如由Kabat编号定义的小鼠抗hCD40抗体(03-7F10、06-6A7和07-4H6)的CDR序列以及其人源化抗hCD40抗体的CDR序列。

[0083] 图17列出了如由Chothia编号定义的小鼠抗hCD40抗体(03-7F10、06-6A7和07-4H6)的CDR序列以及其人源化抗hCD40抗体的CDR序列。

[0084] 图18列出了人CD40(hCD40)、小鼠CD40(mCD40)、猴CD40(rmCD40)和嵌合CD40(chiCD40)的氨基酸序列。

[0085] 图19列出了基于7F10的人源化抗hCD40抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0086] 图20列出了基于6A7的人源化抗hCD40抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0087] 图21列出了基于4H6的人源化抗hCD40抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0088] 图22列出了小鼠抗hCD40抗体03-7F10、06-6A7和07-4H6的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

具体实施方式

[0089] 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。

[0090] CD40和癌症

[0091] 免疫系统可以区分体内的正常细胞和被视为“外来”的那些细胞,从而使免疫系统攻击外来细胞,而使正常细胞不受影响。这种机制有时涉及被称为免疫检查点的蛋白。免疫检查点是免疫系统中的分子,其可以调高信号(共刺激分子)或调低信号。

[0092] 检查点抑制因子可以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因子。这些肿瘤细胞通过选择某些免疫检查点途径(特别是

在对肿瘤抗原具有特异性的T细胞中)来逃避免疫监视(Creelan,Benjamin C.“Update on immune checkpoint inhibitors in lung cancer.[肺癌免疫检查点抑制剂的最新进展]”Cancer Control[癌症控制]21.1(2014):80-89)。因为许多免疫检查点是由配体-受体相互作用引发的,所以它们能够容易地被针对配体和/或其受体的抗体所阻断。

[0093] CD40(也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)(如树突状细胞(DC)、巨噬细胞、B细胞和单核细胞)以及许多非免疫细胞和多种肿瘤上表达的肿瘤坏死因子受体超家族成员。在活化的T辅助细胞上与其三聚体配体CD154(也称为CD40配体或CD40L)的相互作用导致APC活化,从而诱导适应性免疫。

[0094] 在生理学上,经由APC上CD40的信号传导被认为是T细胞辅助的主要组成部分,并在很大程度上介导了辅助T细胞授权(license)APC的能力。例如,DC上CD40的结合(ligation)诱导了共刺激分子和MHC分子的表面表达增加、促炎性细胞因子的产生以及T细胞触发的增强。静息B细胞上的CD40结合增加了抗原呈递功能和增殖。

[0095] 在临床前模型中,大鼠抗小鼠CD40 mAb在CD40+B细胞淋巴瘤的治疗中显示出显著的治疗活性(其中80%-100%的小鼠治愈并以CD8 T细胞依赖性方式对再攻击具有免疫力),并且在各种CD40阴性肿瘤中也有效。这些mAb能够清除患有近末期疾病的小鼠的大部分肿瘤。已在临床试验中对CD40 mAb进行了研究,并将其用于治疗黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤、血液恶性病,尤其是非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病和晚期实体瘤。

[0096] 治疗性抗CD40抗体显示出不同的活性,范围从强烈的激动作用到拮抗作用。目前,对于这种异质性还没有令人满意的解释。激动性CD40 mAb的主要机制原理是激活宿主APC,以诱导患者具有临床意义的抗肿瘤T细胞响应。这些包括非T细胞依赖性、但巨噬细胞依赖性的肿瘤消退触发。CD40活化的巨噬细胞可以具有杀肿瘤性并且还可以(至少在胰腺癌中)促进肿瘤基质的消耗,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,这使得在许多临床试验中纳入患有多种肿瘤的患者是合理的。在这些策略旨在激活DC、巨噬细胞或两者的情况下,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,强激动性抗体在经过设计后不介导CMC或ADCC。

[0097] 相反,其他人CD40 mAb可以介导针对CD40+肿瘤例如几乎所有B细胞恶性病、部分黑色素瘤和某些癌的CMC和ADCC。最后,有证据表明CD40 mAb与肿瘤细胞上的CD40结合促进了细胞凋亡并且这无需参与任何免疫效应通路即可完成。这一点已经在CD40+B细胞恶性病和某些实体瘤例如CD40+癌症和黑色素瘤中得到了证明。

[0098] CD40及其功能的详细描述可见于:例如Vonderheide等人,“Agonistic CD40antibodies and cancer therapy[激动性CD40抗体和癌症治疗].”(2013):1035-1043;Beatty等人“CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans[CD40激动剂改变肿瘤基质并在小鼠和人类中显示出抗胰腺癌的功效].”Science[科学]331.6024(2011):1612-1616;Vonderheide等人“Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893,a novel CD40agonist monoclonal antibody[用新型CD40激动剂单克隆抗体CP-870,893治疗的癌症患者的临床活性和免疫调节]”Journal of Clinical Oncology[临床肿瘤学杂志]25.7(2007):876-883;将其各自通过引用以其全文并入。

[0099] 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来抑制肿瘤生长和治疗癌症的方法。

[0100] 抗体和抗原结合片段

[0101] 本公开提供了抗CD40抗体及其抗原结合片段。通常,抗体(也称为免疫球蛋白)由轻链和重链两类多肽链组成。本公开的非限制性抗体可以是包含两条重链和两条轻链的完整的四种免疫球蛋白链抗体。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。抗体可以包含轻链的两个相同拷贝和重链的两个相同拷贝。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)的重链在其恒定结构域内经由二硫键彼此结合,以形成抗体的“柄”。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)的轻链分别经由二硫键结合一条重链。每条轻链的可变区和与其结合的重链的可变区配对。轻链和重链的可变区都包含位于更保守的框架区(FR)之间的三个高变区。

[0102] 这些高变区(称为互补决定区(CDR))形成了包含抗体主要抗原结合表面的环。四个框架区主要采用 β -折叠构象,并且CDR形成环,所述环连接 β -折叠结构并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。每条链中的CDR通过框架区紧密靠近,并且与来自另一条链的CDR一起形成了抗原结合区。

[0103] 通过分析抗体的氨基酸序列来鉴定所述抗体的CDR区的方法是熟知的,并且CDR的许多定义是常用的。Kabat定义是基于序列可变性,而Chothia定义是基于结构环区域的位置。这些方法和定义描述于:例如Martin,“Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains[抗体可变结构域的蛋白质序列和结构分析]”,Antibody Engineering[抗体工程改造],Springer Berlin Heidelberg[柏林海德尔堡斯普林格出版社],2001.422-439;Abhinandan等人“Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains[Kabat的分析和改进以及抗体可变结构域的结构正确编号]”Molecular immunology[分子免疫学]45.14(2008):3832-3839;Wu,T.T.和Kabat,E.A.(1970)J.Exp.Med.[实验医学杂志]132:211-250;Martin等人,Methods Enzymol.[酶学方法]203:121-53(1991);Morea等人,Biophys Chem.[生物物理学化学]68(1-3):9-16(1997年10月);Morea等人,J Mol Biol.[分子生物学杂志]275(2):269-94(1998年1月);Chothia等人,Nature[自然]342(6252):877-83(1989年12月);Ponomarenko和Bourne,BMC Structural Biology[BMC结构生物学]7:64(2007);将其各自通过引用以其全文并入本文。除非在本公开中特别指出,否则本公开中默认使用Kabat编号。

[0104] CDR对于识别抗原表位很重要。如本文所用,“表位”是能够被抗体的抗原结合结构域特异性结合的靶分子的最小部分。表位的最小尺寸可能为约三、四、五、六或七个氨基酸,但这些氨基酸不是必须位于抗原一级结构的连续线性序列中,因为表位可能取决于基于抗原的二级和三级结构的抗原的三维构型。

[0105] 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,不同之处在于其恒定区,尤其是其铰链和CH2上部结构域。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[IgG亚类和同种异型:从结构到效应子功能].”Frontiers in immunology[免疫学前沿]5(2014);Irani等人“Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases[人IgG亚类的分子特性及其对设计针对传染性疾病的治疗性单克隆抗体的影响].”Molecular immunology[分子免疫学]67.2(2015): 171-182;Shakib,Farouk编辑,The human IgG subclasses:molecular analysis of structure,function and regulation.[人IgG亚类:结构、功能和调节的分子分析]Elsevier[爱思唯尔出版公司],2016;将其各自通过引用以其全文并入本文。

[0106] 抗体还可以是源自任何物种(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、以及包括与另一个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”是保留完整抗体的特异性结合活性的抗体部分,即抗体能够与完整抗体的靶分子上的表位特异性结合的任何部分,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,以及包括作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实施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、或来自完整抗体的重链或轻链的单独CDR。

[0107] 在一些实施方案中,抗原结合片段可以形成嵌合抗原受体(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,嵌合抗原受体还包含来自多种共刺激蛋白受体(例如,CD28、41BB、ICOS)的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包含多个信号传导结构域,例如CD3 ζ -CD28-41BB或CD3 ζ -CD28-OX40,以提高效力。因此,在一个方面,本公开进一步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)。

[0108] 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。

[0109] 抗CD40抗体和抗原结合片段

[0110] 本公开提供了特异性结合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,这些抗体可以促进CD40信号传导途径,从而增加免疫应答。在一些实施方案中,这些抗体可以启动CMC或ADCC。

[0111] 本公开提供了例如小鼠抗CD40抗体03-7F10(“7F10”)、06-6A7(“6A7”)和07-4H6(“4H6”),其嵌合抗体及其人源化抗体(例如,如表1所示的一些抗体)。

[0112] 如由Kabat编号定义的,7F10和7F10衍生的抗体(例如人源化抗体)的CDR序列包括重链可变结构域的CDR,SEQ ID NO:1-3,和轻链可变结构域的CDR,SEQ ID NO:4-6。CDR也可以由Chothia系统定义。根据Chothia编号,重链可变结构域的CDR序列由SEQ ID NO:19、20、3所示,并且轻链可变结构域的CDR序列由SEQ ID NO:4、21、6所示。

[0113] 类似地,如由Kabat编号定义的,6A7和6A7衍生的抗体的CDR序列包括重链可变结构域的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序列由SEQ ID NO:22、23、9所示,并且轻链可变结构域的CDR由SEQ ID NO:10-12所示。

[0114] 如由Kabat编号定义的,4H6和4H6衍生的抗体的CDR序列包括重链可变结构域的CDR,SEQ ID NO:13、14、15,和轻链可变结构域的CDR,SEQ ID NO:16、17、18。根据Chothia编号,重链可变结构域的CDR序列由SEQ ID NO:24、25、15所示,并且轻链可变结构域的CDR由SEQ ID NO:16、17、18所示。

[0115] 还提供了人源化抗体的重链可变区和轻可变区的氨基酸序列。由于存在使小鼠抗体人源化的不同方式(例如,可以用不同的氨基酸取代来修饰序列),抗体的重链和轻链可以具有一个以上形式的人源化序列。人源化7F10抗体的重链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:30-32所示。人源化7F10抗体的轻链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:33-36所示。这些重链可变区序列(SEQ ID NO:30-32)中的任一种均可与这些轻链可变区序列(SEQ ID NO:33-36)中的任一种进行配对。

[0116] 类似地,人源化6A7抗体的重链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:37-40所示。人源化6A7抗体的轻链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:41-43所示。这些重链可变区序列(SEQ ID NO:37-40)中的任一种均可与这些轻链可变区序列(SEQ ID NO:41-43)中的任一种进行配对。

[0117] 人源化4H6抗体的重链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:44-47所示。人源化4H6抗体的轻链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:48-51所示。这些重链可变区序列(SEQ ID NO:44-47)中的任一种均可与这些轻链可变区序列(SEQ ID NO:48-51)中的任一种进行配对。

[0118] 表1和表4中示出了一些基于7F10、6A7和4H6的嵌合和人源化抗体。

[0119] 表1

[0120]

类型	抗体名称	VH SEQ ID NO:	VI SEQ ID NO:	恒定区
基于 6A7 的	6A7-mHvKv-IgG1	54	55	人 IgG1

[0121]

嵌合抗体	6A7-mHvKv-IgG2	54	55	人 IgG2
	6A7-mHvKv-IgG4	54	55	人 IgG4
	6A7-mHvKv-IgG1-N297A	54	55	具有 N297A 突变的人 IgG1
	6A7-mHvKv-IgG1-LALA	54	55	具有 LALA 突变的人 IgG1
基于 6A7 的人源化抗体	6A7-H1K1-IgG4	37	41	人 IgG4
	6A7-H2K1-IgG4	38	41	人 IgG4
	6A7-H3K1-IgG4	39	41	人 IgG4
	6A7-H4K1-IgG4	40	41	人 IgG4
	6A7-H1K2-IgG4	37	42	人 IgG4
	6A7-H2K2-IgG4	38	42	人 IgG4
	6A7-H3K2-IgG4	39	42	人 IgG4
	6A7-H4K2-IgG2	40	42	人 IgG2
	6A7-H4K2-IgG4	40	42	人 IgG4
	6A7-H1K3-IgG4	37	43	人 IgG4
	6A7-H2K3-IgG4	38	43	人 IgG4
	6A7-H3K3-IgG2	39	43	人 IgG2
	6A7-H3K3-IgG4	39	43	人 IgG4
	6A7-H4K3-IgG4	40	43	人 IgG4
基于 4H6 的嵌合抗体	4H6-mHvKv-IgG1	56	57	人 IgG1
基于 4H6 的人源化抗体	4H6-H1K1-IgG4	44	48	人 IgG4
	4H6-H2K1-IgG4	45	48	人 IgG4
	4H6-H3K1-IgG4	46	48	人 IgG4
	4H6-H4K1-IgG4	47	48	人 IgG4
	4H6-H1K2-IgG4	44	49	人 IgG4
	4H6-H2K2-IgG4	45	49	人 IgG4
	4H6-H3K2-IgG4	46	49	人 IgG4
	4H6-H4K2-IgG4	47	49	人 IgG4
	4H6-H1K3-IgG4	44	50	人 IgG4
	4H6-H2K3-IgG4	45	50	人 IgG4
	4H6-H3K3-IgG4	46	50	人 IgG4
	4H6-H4K3-IgG4	47	50	人 IgG4
	4H6-H1K4-IgG4	44	51	人 IgG4
	4H6-H2K4-IgG4	45	51	人 IgG4
	4H6-H3K4-IgG4	46	51	人 IgG4
	4H6-H4K4-IgG4	47	51	人 IgG4
基于 7F10 的嵌合抗体	7F10-mHvKv-IgG1-N297A	52	53	具有 N297A 突变的人 IgG1
基于 7F10 的	7F10-H1K1-IgG4	30	33	人 IgG4

[0122]	人源化抗体	7F10-H1K2-IgG4	30	34	人 IgG4
		7F10-H1K3-IgG4	30	35	人 IgG4
		7F10-H1K4-IgG4	30	36	人 IgG4
		7F10-H2K1-IgG4	31	33	人 IgG4
		7F10-H2K2-IgG4	31	34	人 IgG4
		7F10-H2K3-IgG4	31	35	人 IgG4
		7F10-H2K4-IgG4	31	36	人 IgG4
		7F10-H3K1-IgG4	32	33	人 IgG4
		7F10-H3K2-IgG4	32	34	人 IgG4
		7F10-H3K3-IgG4	32	35	人 IgG4
		7F10-H3K4-IgG4	32	36	人 IgG4

[0123] 人源化百分比是指重链或轻链可变区序列与国际免疫遗传学信息系统 (IMGT) 数据库中的人抗体序列相比的同一性百分比。最高命中 (top hit) 是指相对于其他物种, 重链或轻链可变区序列更接近特定物种。例如, 与人的最高命中是指序列相比于其他物种更接近人。与人和食蟹猴 (*Macaca fascicular*) 的最高命中是指序列与人序列和食蟹猴序列具有相同的百分比同一性, 并且与其他物种的序列相比, 这些百分比同一性最高。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高命中的详细描述在本领域中是已知的, 并且描述于: 例如Jones等人 “The INNs and outs of antibody nonproprietary names [INN和抗体非专有名称的输出].” *MAbs*. [单克隆抗体] 第8卷, 第1期, Taylor&Francis [泰勒弗朗西斯集团] 2016, 其通过引用以其全文并入本文。高人源化百分比通常具有多种优势, 例如在人中更安全且更有效、人受试者更容易耐受、和/或更不容易产生副作用。

[0124] 此外, 在一些实施方案中, 本文描述的抗体或其抗原结合片段还可以含有选自下组的一个、两个或三个重链可变区CDR: SEQ ID NO: 1-3, SEQ ID NO: 7-9, SEQ ID NO: 13-15, SEQ ID NO: 19、20、3, SEQ ID NO: 22、23、9, 和SEQ ID NO: 24、25、15; 和/或选自下组的一个、两个或三个轻链可变区CDR: SEQ ID NO: 4-6, SEQ ID NO: 10-12, SEQ ID NO: 16-18, 和SEQ ID NO: 4、21、6。

[0125] 在一些实施方案中, 抗体可以具有重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 所述重链可变区包含互补决定区 (CDR) 1、2、3, 其中CDR1区包含与选定的VH CDR1氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成, CDR2区包含与选定的VH CDR2氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成, 并且CDR3区包含与选定的VH CDR3氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成; 所述轻链可变区包含CDR1、2、3, 其中CDR1区包含与选定的VL CDR1氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成, CDR2区包含与选定的VL CDR2氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成, 并且CDR3区包含与选定的VL CDR3氨基酸序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成。图16 (Kabat CDR) 和图17 (Chothia CDR) 中示出了选定的VH CDR 1、2、3氨基酸序列和选定的VL CDR 1、2、3氨基酸序列。

[0126] 在一些实施方案中, 本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链可变结构域,

所述重链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个：具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:1；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:2；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:3。

[0127] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链可变结构域，所述重链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个：具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:7；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:8；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:9。

[0128] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链可变结构域，所述重链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个：具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:13；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:14；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:15。

[0129] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链可变结构域，所述重链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个：具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:19；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:20；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:3。

[0130] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链可变结构域，所述重链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个：具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:22；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:23；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:9。

[0131] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有重链可变结构域，所述重链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个：具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:24；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:25；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:15。

[0132] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有轻链可变结构域，所述轻链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个：具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:4；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:5；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:6。

[0133] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有轻链可变结构域，所述轻链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个：具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:10；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:11；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:12。

[0134] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有轻链可变结构域，所述轻链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个：具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:16；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:17；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:18。

[0135] 在一些实施方案中，本文所述的抗体或抗原结合片段可以含有轻链可变结构域，所述轻链可变结构域含有以下的CDR中的一个、两个或三个：具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:4；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:21；具有零个、一个或两个氨基酸插入、缺失或取代的SEQ ID NO:6。

[0136] 插入、缺失和取代可以在CDR序列内,或在CDR序列的一个末端或两个末端处。

[0137] 本公开还提供了结合CD40的抗体或其抗原结合片段。抗体或其抗原结合片段含有重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区包含与选定的VH序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成,所述轻链可变区包含或与选定的VL序列具有至少80%、85%、90%或95%同一性的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中,选定的VH序列是SEQ ID NO:30、31、32或52,并且选定的VL序列是SEQ ID NO:33、34、35、36或53。在一些实施方案中,选定的VH序列是SEQ ID NO:37、38、39、40或54,并且选定的VL序列是SEQ ID NO:41、42、43或55。在一些实施方案中,选定的VH序列是SEQ ID NO:44、45、46、47或56,并且选定的VL序列是SEQ ID NO:48、49、50、51或57。

[0138] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性,出于最高比较目的对序列进行比对(例如,在第一氨基酸和第二氨基酸或第一核酸序列和第二核酸序列的一者或二者中引入缺口以用于最佳比对,并且出于比较目的,非同源序列可以忽略)。出于比较目的的比对的参考序列的长度是参考序列长度的至少80%,并且在一些实施方案中是参考序列长度的至少90%、95%或100%。然后比较相应的氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当所述第一序列中的位置被与所述第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,所述分子在所述位置处是一致的。将缺口的数量和每个缺口的长度考虑在内,两个序列之间的百分比同一性是所述序列共有的相同位置的数量的函数,需要引入所述缺口以进行两个序列的最佳比对。出于本公开的目的,两个序列的比较和两个序列之间同一性百分数的确定可以使用具有缺口罚分12、缺口延伸罚分4、以及移码缺口罚分5的Blosun 62评分矩阵实现。

[0139] 本公开还提供了包含编码多肽的多核苷酸的核酸,所述多肽包含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含如在图16或图17中所示的CDR,或具有如图19-22中所示的序列。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,所述配对的多肽结合CD40(例如,人CD40)。

[0140] 抗CD40抗体和抗原结合片段也可以是抗体或抗体片段的抗体变体(包括衍生物和缀合物)以及多特异性(例如双特异性)抗体或抗体片段。本文提供的另外的抗体是多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体(多聚体抗体,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、细胞内产生的抗体(即胞内抗体)及其抗原结合片段。所述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。

[0141] 抗体的片段适合用于所提供的方法,只要其保留了全长抗体的期望亲和力和特异性。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。此区域由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的紧密结合的二聚体组成,在自然界中可以是共价的,例如scFv。在此结构中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以确定VH-VL二聚体表面的抗原结合位点。总之,六个CDR或其子集赋予抗体抗原结合特异性。然而,甚至是一个单一可变结构域(或一个Fv的一半仅包含三个对抗原具有特异性的CDR)也具有识别并结合抗原的能力,尽管通常亲和力比整个结合位点低。

[0142] 单链Fv或(scFv)抗体片段包含抗体的VH和VL结构域(或区域),其中这些结构域存

在于单个多肽链中。通常，scFv多肽进一步包含在VH与VL结构域之间的多肽接头，所述多肽接头能够使scFv形成抗原结合期望结构。

[0143] 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，所述片段通常在其羧基端附近通过它们之间的铰链半胱氨酸来共价连接。抗体片段的其他化学偶联也是本领域已知的。

[0144] 双抗体是具有两个抗原结合位点的小抗体片段，所述片段包含同一多肽链中的VL连接VH(VH和VL)。通过使用太短而不会允许同一条链上两个结构域之间配对的接头迫使所述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。

[0145] 线性抗体包含一对串联Fd区段(VH-CH1-VH-CH1)，其与互补的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。

[0146] 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效应子功能或血清半衰期。

[0147] 抗体的多聚化可以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，一定百分比的纯化的抗体制备物(例如，纯化的IgG₁分子)自发形成含有抗体同二聚体以及其他更高阶抗体多聚体的蛋白质聚集体。

[0148] 或者，可以通过本领域已知的化学连接技术形成抗体同二聚体。例如，可以使用异双功能交联接头(包括但不限于SMCC(琥珀酰亚胺基4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯)和SATA(N-琥珀酰亚胺基S-乙硫基-乙酸酯))来形成抗体多聚体。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.[美国国家科学院院刊]94:7509-7514,1997)。可以通过用胃蛋白酶消化将抗体同二聚体转化为Fab'₂同二聚体。形成抗体同二聚体的另一种方式是通过使用描述于以下中的自体(autophilic)T15肽：Zhao等人(J.Immunol.[免疫学杂志]25:396-404,2002)。

[0149] 在一些实施方案中，多特异性抗体是双特异性抗体。可通过将一对抗体分子之间的界面工程改造以使从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化来制备双特异性抗体。例如，界面可以含有抗体恒定结构域的CH3结构域的至少一部分。在此方法中，来自第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链被较大的侧链(例如，酪氨酸或色氨酸)替代。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替代大氨基酸侧链，在第二抗体分子的界面上产生与一个或多个大侧链相同或相似大小的补偿“腔”。这提供了用于增加异二聚体相对于其他不需要的终产物(如同二聚体)的产量的机制。此方法描述于例如W0 96/27011中，其通过引用以其全文并入。

[0150] 双特异性抗体包括交联的或“异缀合物(heteroconjugate)”抗体。例如，异缀合物中的抗体中的一个可以偶联至亲和素，而另一个可以偶联至生物素。异缀合物抗体也可以使用任何常规的交联方法制备。合适的交联剂和交联技术在本领域中是熟知的，并且公开于美国专利号4,676,980中，其通过引用及其全文并入本文。

[0151] 由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，可以使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan等人(Science[科学]229:81,1985)描述了一种程序，其中通过对完整抗体进行蛋白水解裂解以生成F(ab')₂片段。在二硫醇络合剂亚砷酸钠的存在下还原这些片段以稳定邻位二硫醇并防止分子间二硫键形成。然后将生成的Fab'片段转化为硫代硝基苯甲酸(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原将一种Fab' TNB衍生物转化为

Fab' 硫醇,并与等摩尔量的另一种Fab' TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。

[0152] 本文所述的任何抗体或抗原结合片段可与稳定分子(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)缀合。稳定分子的非限制性实施例包括:聚合物(例如聚乙二醇)或蛋白质(例如血清白蛋白,如人血清白蛋白)。稳定分子的缀合可以在体外(例如,在组织培养中或当以药物组合物形式存储时)或在体内(例如,在人体内)增加抗体或抗原结合片段的半衰期或延长抗体或抗原结合片段的生物学活性。

[0153] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段可以与治疗剂缀合。包含抗体或其抗原结合片段的抗体-药物缀合物可以共价或非共价结合治疗剂。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(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽菌素、美登素类(maytansinoid)(例如DM-1和DM-4)、二酮类、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)。

[0154] 抗体特征

[0155] 本文所述的抗体或其抗原结合片段可以阻断CD40和CD40配体(例如,CD154)之间的结合。

[0156] 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,抗体可以抑制CD40信号传导途径。在一些实施方案中,抗体可以上调免疫应答或下调免疫应答。

[0157] 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以将免疫细胞(例如,T细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、巨噬细胞、抗原呈递细胞)的免疫应答、活性或数量提高至少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以将免疫细胞(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。

[0158] 在一些实施方式中,抗体(或其抗原结合片段)特异性结合CD40(例如,人CD40、猴CD40(例如,恒河猴、食蟹猴)、小鼠CD40、和/或嵌合CD40),其中解离速率(k_{off})小于 $0.1s^{-1}$ 、小于 $0.01s^{-1}$ 、小于 $0.001s^{-1}$ 、小于 $0.0001s^{-1}$ 或小于 $0.00001s^{-1}$ 。在一些实施方案中,所述解离速率(k_{off})大于 $0.01s^{-1}$ 、大于 $0.001s^{-1}$ 、大于 $0.0001s^{-1}$ 、大于 $0.00001s^{-1}$ 或大于 $0.000001s^{-1}$ 。

[0159] 在一些实施方案中,缔合速率(k_{on})大于 $1 \times 10^2/Ms$ 、大于 $1 \times 10^3/Ms$ 、大于 $1 \times 10^4/Ms$ 、大于 $1 \times 10^5/Ms$ 或大于 $1 \times 10^6/Ms$ 。在一些实施方案中,缔合速率(k_{on})小于 $1 \times 10^5/Ms$ 、小于 $1 \times 10^6/Ms$ 或小于 $1 \times 10^7/Ms$ 。

[0160] 可以从动力学速率常数的商($KD=k_{off}/k_{on}$)推导亲和力。在一些实施方案中, KD 小于 $1 \times 10^{-6}M$ 、小于 $1 \times 10^{-7}M$ 、小于 $1 \times 10^{-8}M$ 、小于 $1 \times 10^{-9}M$ 或小于 $1 \times 10^{-10}M$ 。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 $1 \times 10^{-7}M$ 、大于 $1 \times 10^{-8}M$ 、大于 $1 \times 10^{-9}M$ 、大于 $1 \times 10^{-10}M$ 、大于 $1 \times 10^{-11}M$ 或大于 $1 \times 10^{-12}M$ 。在一些实施方案中,抗体结合人CD40,其中 KD 小于或等于约6nM。

[0161] 用于测量抗体对抗原的亲合力的通用技术包括例如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:26)、猴CD40 (例如,恒河猴CD40, SEQ ID NO:28)、嵌合CD40 (SEQ ID NO:29)、和/或小鼠CD40 (SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,抗体不结合人CD40 (SEQ ID NO:26)、猴CD40 (例如,恒河猴CD40, SEQ ID NO:28; 食蟹猴CD40)、嵌合CD40 (SEQ ID NO:29)、和/或小鼠CD40 (SEQ ID NO:27)。

[0162] 在一些实施方案中,确定了热稳定性。如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 T_m 。在一些实施方案中, T_m 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℃。

[0163] 在一些实施方案中,抗体的肿瘤生长抑制百分比 (TGI%) 大于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%。在一些实施方案中,抗体的肿瘤生长抑制百分比小于60%、70%、80%、90%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%。例如,在治疗开始后3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、或30天,或治疗开始后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、或12个月,可以确定TGI%。如本文所用,使用以下公式计算肿瘤生长抑制百分比 (TGI%):

[0164]
$$TGI(\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$$

[0165] T_i 是治疗组在第*i*天的平均肿瘤体积。 T_0 是治疗组在第零天的平均肿瘤体积。 V_i 是对照组在第*i*天的平均肿瘤体积。 V_0 是对照组在第零天的平均肿瘤体积。

[0166] 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。

[0167] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以增强APC (例如,DC细胞) 功能,例如,诱导共刺激分子和MHC分子的表面表达、诱导促炎性细胞因子的产生、和/或增强T细胞触发功能。

[0168] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以结合表达CD40的肿瘤细胞。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以诱导补体介导的细胞毒性 (CMC) 和/或抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC), 并杀死肿瘤细胞。

[0169] 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的细胞介导的细胞毒性作用 (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。

[0170] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段可以诱导补体介导的细胞毒性 (CMC)。

[0171] 在一些实施方案中,Fc区是人IgG1、人IgG2、人IgG3或人IgG4。

[0172] 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 (以EU编号的L234A和L235A突变)、或LALA-PG突变 (以EU编号的L234A、L235A、P329G突变)。

[0173] 制备抗CD40抗体的方法

[0174] 可以使用多克隆和单克隆抗体制备的标准技术,将人CD40的分离片段用作免疫原以产生抗体。可以通过多次注射(例如皮下或腹腔注射)抗原肽或蛋白质而在动物中产生多克隆抗体。在一些实施方案中,将抗原肽或蛋白质与至少一种佐剂一起注射。在一些实施方案中,可以将抗原肽或蛋白质与待免疫物种中具有免疫原性的药剂缀合。可以向动物注射抗原肽或蛋白质超过一次(例如两次、三次或四次)。

[0175] 可以使用全长多肽或蛋白质;或者,其抗原肽片段可以用作免疫原。蛋白质的抗原肽包含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,并且包含蛋白质的表位,使得产生的针对所述肽的抗体与所述蛋白质形成特异性免疫复合物。如上所述,人CD40的全长序列是本领域已知的(SEQ ID NO:26)。

[0176] 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。合适的免疫原性制剂可以含有例如重组表达的多肽或化学合成的多肽(例如人CD40的片段)。制剂可以进一步包含佐剂,例如弗氏完全或不完全佐剂、或类似的免疫刺激剂。

[0177] 如上所述,可以通过用CD40多肽或其抗原肽(例如,CD40的一部分)作为免疫原来免疫合适的受试者以制备多克隆抗体。可以通过标准技术(例如使用固定化的CD40多肽或肽的酶联免疫吸附测定(ELISA))监测经免疫的受试者的抗体效价随时间的变化。如果需要,可以将抗体分子从哺乳动物(例如从血液)分离,并通过熟知的技术(例如蛋白G或蛋白A色谱法)进一步纯化以获得IgG部分。在免疫后的合适时间,例如当特异性抗体效价最高时,产生抗体的细胞可以从受试者获得并通过以下标准技术用于制备单克隆抗体:例如最初由Kohler等人(Nature[自然]256:495-497,1975)描述的杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人,Immunol.Today[当代免疫]4:72,1983)、EBV杂交瘤技术(Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy[单克隆抗体和癌症治疗],Alan R.Liss, Inc.[艾伦利斯有限公司],第77-96页,1985)、或三源杂交瘤(trioma)技术。用于产生杂交瘤的技术是熟知的(通常参见Current Protocols in Immunology[当代免疫学方案],1994,Coligan等人(编辑),John Wiley&Sons, Inc.[约翰·威利父子出版公司],New York, NY[纽约])。例如使用标准ELISA测定法筛选杂交瘤培养物上清液中结合感兴趣的多肽或表位的抗体,检测产生单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0178] 可以通过将适当的核苷酸变化引入编码本文所述的人抗体、人源化抗体或嵌合抗体、或其抗原结合片段的DNA中或通过肽合成来制备本文所述的抗体或其抗原结合片段的变体。此类变体包括例如组成抗体的抗原结合位点或抗原结合结构域的氨基酸序列内残基的缺失、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)具有提高的亲和力。可以对缺失、插入和/或组合进行任意组合,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。引入到抗体或抗原结合片段中的氨基酸变化还可以改变新的翻译后修饰或将新的翻译后修饰引入抗体或抗原结合片段中,例如改变(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,使得细胞中存在的酶连接不同的糖)、或引入新的糖基化位点。

[0179] 本文公开的抗体可以来源于任何动物物种,包括哺乳动物。天然抗体的非限制性实施例包括来源于人、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)的抗体,包括经过基因工程改造

以产生人抗体的转基因啮齿动物。

[0180] 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(或具有与来源于人种系免疫球蛋白序列的氨基酸序列相同的氨基酸序列)的抗体。人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变而引入的突变),例如在CDR中。

[0181] 人源化抗体通常具有移植了非人CDR的人框架(FR)。因此,人源化抗体具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸序列。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入”残基,它们通常取自一种“输入”可变结构域。人源化基本上可以通过将例如啮齿动物CDR或CDR序列替代为人抗体的相应序列来进行。这些方法描述于:例如,Jones等人,Nature[自然],321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature[自然],332:323-327(1988);Verhoeyen等人,Science[科学],239:1534-1536(1988);将其各自通过引用以其全文并入本文。因此,“人源化”抗体是嵌合抗体,其中基本上少于完整的人V结构域被来自非人物种的相应序列取代。在实践中,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。

[0182] 选择用于制备人源化抗体的人VH和VL结构域对于降低免疫原性非常重要。根据所谓的“最高拟合(best-fit)”方法,可针对已知人结构域序列的整个文库来筛选小鼠抗体的V结构域的序列。然后接受与小鼠序列最接近的人序列作为人源化抗体的人FR(Sims等人,J.Immunol.[免疫学杂志],151:2296(1993);Chothia等人,J.Mol.Biol.[分子生物学杂志],196:901(1987))。

[0183] 进一步重要的是将抗体人源化,同时保留对抗原的高特异性和亲和力以及其他有利的生物学特性。为了实现这个目标,可以通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型,分析亲本序列和多种概念性人源化产物的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可得到的,并且对于本领域普通技术人员而言是熟悉的。说明并展示选定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是可获得的。对这些显示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列发挥功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方式,可以从受体序列和输入序列选出并且组合FR残基,从而达到所需的抗体特征,如对一种或多种靶抗原亲和力增加。

[0184] 通常,人抗CD40抗体、人源化抗CD40抗体或嵌合抗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%百分比同一性的氨基酸序列。

[0185] 关于原始序列的同一性或同源性通常是在比对序列并引入缺口(必要时)以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代作为序列同一性的一部分后,候选序列中存在的氨基酸残基与人抗CD40抗体、人源化抗CD40抗体或嵌合抗CD40抗体或片段中存在的序列相同的氨基酸残基的百分比。

[0186] 可以对抗CD40抗体或抗原结合片段进行额外的修饰。例如,可以将一个或多个半胱氨酸残基引入Fc区,从而在所述区域中形成链间二硫键。由此产生的同二聚体抗体可以具有任何增加的体外和/或体内半衰期。还可以使用如例如Wolff等人(Cancer Res.[癌症研究]53:2560-2565,1993)描述的异双功能交联接头来制备具有增加的体外和/或体内半衰期的同二聚体抗体。或者,可以将具有两个Fc区的抗体进行工程改造(参见例如,

Stevenson等人, *Anti-Cancer Drug Design* [抗癌药物设计] 3:219-230, 1989)。

[0187] 在一些实施方案中, 可以对抗CD40抗体或其抗原结合片段进行共价修饰。这些共价修饰可以通过化学合成或酶促合成、或通过酶促裂解或化学裂解来进行。抗体或抗体片段的其他类型的共价修饰通过使抗体或片段的靶向氨基酸残基与能够与选定侧链或N-末端或C-末端残基反应的有机衍生剂进行反应而引入分子中。

[0188] 在一些实施方案中, 提供了具有碳水化合物结构的抗体变体, 所述碳水化合物结构缺少(直接或间接)衔接至Fc区的岩藻糖。例如, 此种抗体中的岩藻糖的量可以为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。例如, 如WO 2008/077546中所述, 计算相对于通过MALDI-TOF质谱测量的与Asn 297衔接的所有糖结构(例如, 络合、杂合和高甘露糖结构)的总和的Asn297糖链内岩藻糖的平均量来确定的岩藻糖的量。Asn297是指位于Fc区中约297位的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号, 或以Kabat编号的314位); 然而, 由于抗体中的微小序列变化, Asn297也可位于位置297上游或下游约3个氨基酸, 即在位置294和300之间。这类岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。在一些实施方案中, 为了降低聚糖异质性, 可以将抗体的Fc区进一步工程改造以用丙氨酸代替297位的天冬酰胺(N297A)。

[0189] 在一些实施方案中, 为了通过避免Fab-臂交换来提高生产效率, 将抗体的Fc区进一步工程改造, 以用脯氨酸代替IgG4的228位(EU编号)的丝氨酸(S228P)。关于S228突变的详细描述在以下中进行了描述: 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.* [如使用新型定量免疫测定法和生理基质制备的组合所证明的, S228P突变阻止了体内和体外IgG4Fab-臂的交换]”*Journal of Biological Chemistry* [生物化学杂志] 290.9 (2015): 5462-5469, 其通过引用以其全文并入。

[0190] 重组载体

[0191] 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)、引入了重组载体的宿主细胞(即, 使得所述宿主细胞含有多核苷酸和/或含多核苷酸的载体)、以及通过重组技术产生重组抗体多肽或其片段。

[0192] 如本文所用, “载体”是当载体被引入宿主细胞时能够将一个或多个感兴趣的多核苷酸递送至所述宿主细胞的任何构建体。“表达载体”能够在已引入表达载体的宿主细胞中递送和表达一个或多个感兴趣的多核苷酸作为编码的多肽。因此, 在表达载体中, 感兴趣的多核苷酸通过与调控元件诸如启动子、增强子和/或多聚腺苷酸尾可操作地连接而定位于载体中表达, 所述调控元件位于载体内或宿主细胞的基因组中的感兴趣的多核苷酸的整合位点处或所述整合位点附近或所述整合位点两侧, 使得感兴趣的多核苷酸将在引入了所述表达载体的宿主细胞中得以翻译。

[0193] 可以通过本领域已知的方法, 例如电穿孔、化学转染(例如DEAE-葡聚糖)、转化、转染以及感染和/或转导(例如用重组病毒)将载体引入到宿主细胞中。因此, 载体的非限制性实施例包括病毒载体(可用于产生重组病毒)、裸DNA或RNA、质粒、粘粒、噬菌体载体以及与阳离子缩合剂相关的DNA或RNA表达载体。

[0194] 在一些实施方式中, 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),这可能涉及使用非致病性(缺陷型)、可复制型病毒,或可以使用复制缺陷性病毒。在后一种情况下,病毒繁殖通常仅发生在互补的病毒包装细胞中。合适的系统公开于:例如Fisher-Hoch等人,1989, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]86:317-321;During等人,1989,Ann.N.Y Acad.Sci.[纽约科学院年鉴]569:86-103;Flexner等人,1990,Vaccine[疫苗]8:17-21;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[伯克纳生物技术],6:616-627,1988;Rosenfeld等人,1991Science[科学],252:431-434;Kolls等人,1994, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]91:215-219;Kass-Eisler等人,1993, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:11498-11502;Guzman等人,1993, Circulation[循环],88:2838-2848;以及Guzman等人,1993,Cir.Res.[循环研究]73:1202-1207。将DNA整合到此类表达系统的技术是本领域普通技术人员所熟知的。DNA也可以是“裸的”,如例如描述于Ulmer等人,1993,Science[科学],259:1745-1749好,和Cohen,1993, Science[科学],259:1691-1692。可以通过将DNA包覆在可生物降解的珠粒上来增加裸DNA的摄取,所述珠粒可有效地转运到细胞中。

[0195] 为了表达,可以将本文公开的包含编码抗体或编码多肽的多核苷酸的DNA插入序列可操作地连接至合适的启动子(例如异源启动子),例如噬菌体 λ PL启动子、大肠杆菌lac启动子、大肠杆菌trp启动子和大肠杆菌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,仅举几例。其他合适的启动子是技术人员已知的。表达构建体可以进一步含有用于转录起始、终止的位点,以及(在转录区中)用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的成熟转录的编码部分可以包括在开始处的翻译起始密码子和适当地位于待翻译多肽末端的终止密码子(UAA、UGA或UAG)。

[0196] 如所指出的,表达载体可以包括至少一种可选择标记。此类标记包括用于真核细胞培养的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性,以及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。合适宿主的代表性实施例包括但不限于细菌细胞,例如大肠杆菌(E.coli)细胞、链霉菌属(Streptomyces)细胞和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)细胞;真菌细胞,例如酵母细胞;昆虫细胞,例如果蝇(Drosophila)S2细胞和夜蛾(Spodoptera)Sf9细胞;动物细胞,例如CHO细胞、COS细胞、鲍斯(Bowes)黑色素瘤细胞和HK 293细胞;以及植物细胞。用于本文所述的宿主细胞的适当培养基和条件是本领域已知的。

[0197] 用于细菌的非限制性载体包括可获得自凯杰公司(Qiagen)的pQE70、pQE60和pQE-9;可获得自斯曲杰公司(Stratagene)的pBS载体、Phagescript载体、Bluescript载体、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A;以及可获得自法玛西亚公司(Pharmacia)的ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5。非限制性真核载体包括可获得自斯曲杰公司(Stratagene)的pWLNE0、pSV2CAT、pOG44、pXT1和pSG;以及可获得自法玛西亚公司(Pharmacia)的pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL。其他合适的载体对于技术人员将是显而易见的。

[0198] 适用的非限制性细菌启动子包括大肠杆菌lacI启动子和lacZ启动子、T3和T7启动子、gpt启动子、 λ PR和PL启动子、以及trp启动子。合适的真核启动子包括CMV即早期启动子(immediate early promoter)、HSV胸苷激酶启动子、SV40早期和晚期启动子、逆转录病毒

LTR的启动子,例如劳斯肉瘤病毒(RSV)的启动子、以及金属硫蛋白启动子,例如小鼠金属硫蛋白-I启动子。

[0199] 在酵母酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,可以使用多种含有组成型或诱导型启动子如 α 因子、醇氧化酶和PGH的载体。对于综述参见Ausubel等人(1989) *Current Protocols in Molecular Biology* [现代分子生物学方法], John Wiley&Sons [约翰·威利父子出版公司], New York, N.Y [纽约]; 和Grant等人, *Methods Enzymol.* [酶学方法], 153: 516-544 (1997)。

[0200] 可以通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他方法将构建体引入宿主细胞中。此类方法描述于许多标准实验室手册中,例如Davis等人, *Basic Methods In Molecular Biology* [分子生物学基础方法] (1986), 其通过引用以其全文并入本文。

[0201] 可以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抗体的DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常约10至300bp,在给定宿主细胞类型中起到增加启动子转录活性的作用。增强子的实施例包括SV40增强子(其位于碱基对100至270的复制起点的后侧)、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点后侧的多瘤病毒增强子、和腺病毒增强子。

[0202] 为了将翻译的蛋白质分泌到内质网腔、周质间隙或细胞外环境中,可以将适当的分泌信号整合到表达的多肽中。信号可以是多肽内源信号,也可以是异源信号。

[0203] 多肽(例如抗体)可以以修饰形式,例如融合蛋白(例如GST融合物)或具有组氨酸标签表达,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,可以将另外的氨基酸(特别是带电荷的氨基酸)的区域添加到多肽的N-末端,以改善在纯化期间或在随后的处理和储存期间在宿主细胞中的稳定性和持久性。同样,可以将肽部分添加到多肽中以促进纯化。可以在最终制备多肽之前除去此类区域。向多肽中添加肽部分以引起分泌或排泄,从而提高稳定性并促进纯化,这尤其是本领域熟悉和常规的技术。

[0204] 治疗方法

[0205] 本公开的抗体或其抗原结合片段可以用于多种治疗目的。

[0206] 在一个方面,本公开提供了用于治疗受试者癌症的方法、降低受试者肿瘤体积随时间增加的速率的方法、降低发生转移的风险的方法、或降低受试者发生另外转移的风险的方法。在一些实施方案中,治疗可以停止、减慢、延缓或抑制癌症的进展。在一些实施方案中,治疗可导致受试者癌症的一个或多个症状的数量、严重程度和/或持续时间减少。

[0207] 在一个方面,本公开的特征在于如下方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效剂量的本文公开的抗体或其抗原结合片段(例如,患有、或鉴定为患有或诊断为患有癌症),例如,乳腺癌(例如,三阴性乳腺癌)、类癌、宫颈癌、子宫内膜癌、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、或血液恶性病。在一些实施方案中,所述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,所述受试者患有实体瘤。在一些实施方案中,所述癌症是头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、肾细胞癌(RCC)、三阴性乳腺癌(TNBC)或结直肠癌。在一些实施方案中,所述受试者患有霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,所述受试者患

有三阴性乳腺癌(TNBC)、胃癌、尿路上皮癌、默克尔细胞癌、或头颈癌。在一些实施方案中,所述癌症是黑色素瘤、胰腺癌、间皮瘤、血液恶性病,尤其是非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病或晚期实体瘤。

[0208] 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。可以用本领域已知的多种方法来鉴定患有癌症的患者。

[0209] 在一个方面,本公开提供了例如通过影响APC细胞的功能特性(例如,通过阻断CD40与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障碍(例如自身免疫性障碍)或降低其发展风险的方法。这些自身免疫性障碍包括但不限于斑秃、狼疮、强直性脊柱炎、美尼尔氏病、抗磷脂综合征、混合性结缔组织病、自身免疫性爱迪生氏病、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、寻常型天疱疮、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、多腺综合征、慢性疲劳综合症(CFIDS)、风湿性多肌痛、慢性炎性脱髓鞘病、多发性肌炎以及皮炎、慢性炎性多发性神经病、原发性无丙种球蛋白血症、丘-施二氏综合征(Churg-Strauss syndrome)、原发性胆汁性肝硬化、瘢痕性类天疱疮、牛皮癣、CREST综合征、雷诺氏现象、冷凝集素病、莱特尔氏综合征、克罗恩氏病、风湿热、盘状狼疮、类风湿性关节炎、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、吉兰-巴雷病、僵人综合症、桥本甲状腺炎、高安氏动脉炎(Takayasu arteritis)、特发性肺纤维化、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎、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)、血管炎、扁平苔藓和白癜风。还可以向受试者施用抗CD40抗体或其抗原结合片段以治疗、预防与跟细胞、组织或器官移植(例如肾移植、肝移植和心脏移植)有关的异常或不期望的免疫应答相关的障碍,例如移植物抗宿主疾病(GVHD),或降低其发展风险,或防止同种异体移植物排斥。在一些实施方案中,受试者患有克罗恩氏病、溃疡性结肠炎或I型糖尿病。

[0210] 如本文所用,“有效剂量”是指足以实现有益或期望结果(包括停止、减慢、延缓或抑制疾病(例如自身免疫性疾病或癌症)的进展)的量或剂量。有效剂量将取决于例如待施用抗体、抗原结合片段、编码抗体的多核苷酸、包含多核苷酸的载体和/或其组合物的受试者的年龄和体重,症状的严重程度和施用途径,因此可以根据个体情况确定施用。

[0211] 有效剂量能够一次或多次给药来施用。例如,抗体或抗原结合片段的有效剂量是足以改善、终止、稳定、逆转、抑制、减缓和/或延缓患者自身免疫性疾病或癌症进展的量,或者是足以改善、停止、稳定、逆转、减慢和/或延缓体外细胞(例如,活检细胞、本文所述的任何癌细胞、或细胞系(例如,癌细胞系))增殖的量。如本领域所理解的,抗体或抗原结合片段的有效剂量可能有所不同,具体可以取决于患者病史以及其他因素,例如所用抗体的类型(和/或剂量)。

[0212] 可以凭经验确定施用本文公开的抗体、编码抗体的多核苷酸和/或组合物的有效剂量和方案,并且进行此类确定在本领域技术范围内。本领域技术人员将理解,必须施用的剂量将取决于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,施用途径,使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/或组合物的特定类型,以及向哺乳动物施用的其他药物。选择抗体或抗原结合片段的合适剂量的指南可见于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[单克隆抗体手册],Ferrone等人编辑,Noges Publications[诺格斯出版公

司], Park Ridge, N.J. [帕克里奇, 新泽西州], 1985, 第22章和第303-357页; Smith等人, *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy* [人诊断和治疗中的抗体], Haber等人编辑, Raven Press [雷文出版社], New York [纽约], 1977, 第365-389页。

[0213] 有效剂量的抗体的典型日剂量是0.01mg/kg至100mg/kg。在一些实施方案中, 剂量可以小于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, 剂量可以大于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, 剂量约为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。

[0214] 在本文描述的任何方法中, 可以至少每周一次 (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) 向受试者施用至少一种抗体、其抗原结合片段或药物组合物 (例如, 本文描述的任何抗体、抗原结合片段或药物组合物) 以及任选地至少一种另外的治疗剂。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, 所述至少一种抗体或抗原结合片段以及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, 所述至少一种另外的治疗剂以丸剂、片剂或胶囊的形式施用。在一些实施方案中, 所述至少一种另外的治疗剂以持续释放的口服配制品施用。

[0215] 在一些实施方案中, 可以在施用所述至少一种抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物 (例如, 本文所述的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物) 之前或之后向受试者施用所述一种或多种另外的治疗剂。在一些实施方案中, 向受试者施用所述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, 本文所述的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物), 使得受试者中所述一种或多种另外的治疗剂和所述至少一种抗体或抗原结合片段 (例如, 本文所述的任何抗体或抗原结合片段) 的生物活性期重叠。

[0216] 在一些实施方案中, 可以在延长的时间段内 (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, 本文所述的任何抗体、抗原结合抗体片段或药物组合物)。熟练的医学专业人员可以使用本文所述的任何用于诊断或跟进治疗有效性 (例如, 观察到至少一种癌症症状) 的方法来确定治疗期的长短。如本文所述, 熟练的医学专业人员还可以改变向受试者施用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) 的类型和数量 (例如, 增加或减少), 并且还可以根据治疗有效性的评估 (例如, 使用本文所述的和本领域已知的任何方法) 来调整 (例如, 增加或减少) 向受试者施用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。

[0217] 在一些实施方案中, 可以向受试者施用一种或多种另外的治疗剂。另外的治疗剂可以包含选自由以下组成的组的一种或多种抑制剂: 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(Bruton)酪氨酸激酶(BTK)抑制剂)、以及异柠檬酸脱氢酶1(IDH1)抑制剂和/或异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)抑制剂。在一些实施方案中,另外的治疗剂是吡咯胺2,3-双加氧酶-1(IDO1)抑制剂,例如艾卡噪司他(epacadostat)。

[0218] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以包含选自以下组成的组的一种或多种抑制剂: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抑制剂、和选择性降解雌激素受体的药剂。

[0219] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以包含选自以下组成的组的一种或多种治疗剂:曲贝替定(Trabectedin)、白蛋白结合型紫杉酚(Nab-paclitaxel)、曲班尼布(trebananib)、帕唑帕尼、西地尼布、帕博西尼、依维莫司、氟嘧啶、IFL、瑞格拉非尼、Reolysin、爱宁达、色瑞替尼、舒尼替尼、西罗莫司(temsirolimus)、阿昔替尼、依维莫司、索拉非尼、沃特瑞特(Votrient)、帕唑帕尼、IMA-901、AGS-003、卡博替尼、长春氟宁、Hsp90抑制剂、Ad-GM-CSF、替莫唑胺(Temazolomide)、IL-2、IFN α 、长春碱、沙利度胺、达卡巴嗪、环磷酸胺、来那度胺、氮杂胞苷、来那度胺、硼替佐米(bortezomid)、氨柔比星(amrubicine)、卡非佐米、普拉曲沙和恩扎妥林(enzastaurin)。

[0220] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以包含选自以下组成的组的一种或多种治疗剂: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激动剂和选择激动剂。

[0221] 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、FOLFOLX或FOLFIRI。

[0222] 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抗体或抗GITR抗体。

[0223] 药物组合物和施用途径

[0224] 本文还提供了含有本文所述的抗体或抗原结合片段中的至少一种(例如,一种、两种、三种或四种)的药物组合物。本文所述的任何抗体或抗原结合片段中的两种或更多种(例如,两种、三种或四种)可以以任何组合存在于药物组合物中。可以以本领域已知的任何方式配制药物组合物。

[0225] 将药物组合物配制成与其预期施用途径(例如静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下或腹腔)相容。组合物可以包括无菌稀释剂(例如无菌水或无菌盐水)、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂、抗菌剂或抗真菌剂(例如苯甲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(例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠)、螯合剂(例如乙二胺四乙酸)、缓冲剂(例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐)以及等渗剂(例如糖,如葡萄糖)、多元醇(例如甘露醇或山梨糖醇)或盐(例如氯化钠)或其任何组合。脂质体悬浮液也可用作可药用载体(参见例如美国专利号4,522,811)。可以配制组合物的制剂并将其封装在安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。如果需要(例如,以可注射配制品形式),可以通过例如使用包衣(如卵磷脂或表面活性剂)来保持适当的流动性。可以通过整合延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来延长抗体或其抗原结合片段的吸收。或者,可以通过植入物和微胶囊化的

递送系统(可以包括可生物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、胶原、聚原酸酯和聚乳酸; 阿尔扎公司(Alza Corporation)和诺瓦制药公司(Nova Pharmaceutical, Inc.))来实现控释。

[0226] 含有本文所述的任何抗体或抗原结合片段中的一种或多种的组合物可以配制为以剂量单位形式(即, 含有预定量活性化合物的物理离散单位, 以便于施用和剂量均匀)进行肠胃外(例如静脉内、动脉内、肌内、皮内、皮下或腹腔)施用。

[0227] 组合物的毒性和治疗功效可以通过标准制药学程序在细胞培养物或实验动物(例如猴)中测定。例如, 可以测定LD50(对50%群体的致死剂量)和ED50(对50%群体的治疗有效剂量): 治疗指数是LD50:ED50的比率。表现出高治疗指数的药剂是优选的。当药剂表现出不良副作用时, 应注意将潜在损害降到最低(即减少不期望的副作用)。毒性和治疗功效可通过其他标准制药学程序确定。

[0228] 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在受试者(例如人)中使用的任何给定药剂。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, 本文所述的任何抗体或抗体片段)的治疗有效剂量将是在受试者(例如, 被鉴定为患有癌症的人受试者或被鉴定为处于发展疾病风险中的受试者, 例如先前患有癌症但现在已经治愈的受试者)中治疗受试者的疾病(例如, 杀死癌细胞), 降低受试者(例如, 人)的一个或多个症状的严重程度、频率和/或持续时间的量。可以使用本领域已知的方法, 以及通过观察受试者(例如人)的一个或多个症状, 由医疗保健专业人员或兽医专业人员确定本文所述的任何抗体或抗原结合片段的有效性和给药。某些因素(例如疾病或障碍的严重程度、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄、以及存在的其他疾病)可以影响有效治疗受试者所需的剂量和时程。

[0229] 示例性剂量包括本文所述的任何抗体或抗原结合片段的毫克或微克量/千克受试者体重(例如, 约1 μ g/kg至约500mg/kg; 约100 μ g/kg至约500mg/kg; 约100 μ g/kg至约50mg/kg; 约10 μ g/kg至约5mg/kg; 约10 μ g/kg至约0.5mg/kg; 或约1 μ g/kg至约50 μ g/kg)。尽管这些剂量覆盖范围广, 但是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)在其功效方面不同, 并且可以通过本领域已知的方法确定有效剂量。通常, 首先施用相对较低的剂量, 并且主治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(在仍处于发展阶段时)可以随后并逐步增加剂量, 直到获得适当的响应。此外, 应理解, 针对任何具体受试者的特定剂量水平将取决于多种因素, 包括所用的特定化合物的活性, 受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和受试者的饮食, 施用时间, 施用途径, 排泄速率以及抗体或抗体片段的体内半衰期。

[0230] 药物组合物可以同施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。本公开还提供了制造用于本文所述的多种用途的抗体或其抗原结合片段的方法。

[0231] 实施例

[0232] 在以下实施例中进一步描述本发明, 所述实施例不限制权利要求中所描述的本发明的范围。

[0233] 实施例1. 产生小鼠抗hCD40抗体

[0234] 为了产生针对人CD40(hCD40; SEQ ID NO:26)的小鼠抗体, 用人CD40免疫6-8周龄的雌性BALB/c小鼠。通过如下所述的以及图1和图2中所示的方法收集抗hCD40抗体。

[0235] 小鼠免疫

[0236] 以浓度为100 μ g/ml的用His标记的人CD40蛋白以20 μ g/小鼠免疫6-8周龄的雌性BALB/c小鼠。用佐剂将His标记的人CD40蛋白乳化,并将其注射到小鼠背部的四个位置。对于第一次皮下注射(s.c.),将稀释的抗原用等体积的完全弗氏佐剂(CFA)乳化。在随后的皮下注射中,将蛋白用等体积的不完全弗氏佐剂(IFA)乳化。第三次注射或加强免疫后三天,收集血液(血清)并使用ELISA分析其抗体效价。

[0237] 在另一个实验中,通过将编码人CD40的表达质粒注射到小鼠中对6-8周龄的雌性BALB/c小鼠进行免疫。以1000 μ g/ μ l的浓度,按照60 μ g/小鼠,使用基因枪将编码抗原的质粒注射到小鼠的胫骨前肌中(肌肉注射;i.m.注射)。进行至少四次注射,其中两次注射之间至少间隔14天。在最后一次免疫后七天收集血液(血清),并通过ELISA测试血清的抗体效价。

[0238] 此外,在先前免疫(通过注射质粒或注射蛋白质)后至少十四天进行增强免疫的程序。通过尾静脉,向小鼠静脉内注射在表面表达CD40抗原的CHO细胞。然后在注射四天后收集脾脏。

[0239] SP2/0细胞与脾细胞的融合物

[0240] 将脾组织磨碎。首先通过CD3 ϵ 微珠和抗小鼠IgM微珠选择脾细胞,然后将其与SP2/0细胞融合。然后将细胞与次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶(HAT)培养基一起接种在96孔板中。

[0241] 杂交瘤的初步筛选

[0242] 根据标准程序,使用荧光激活细胞分选术(FACS)对96孔板中的杂交瘤上清液进行初步筛选。在筛选之前,将中国仓鼠卵巢(CHO)细胞添加到96孔板中(2×10^4 个细胞/孔)。使用50 μ l上清液。实验中使用的抗体是

[0243] (1)缀合有荧光素(FITC)的AffiniPure F(ab)₂片段山羊抗小鼠IgG,Fc γ 片段特异性,以及

[0244] (2)缀合有Alexa Fluor®647的AffiniPure F(ab)₂片段山羊抗人IgG,Fc γ 片段特异性。

[0245] 亚克隆

[0246] 使用ClonePix2进行亚克隆。简言之,将在初步筛选期间鉴定的阳性孔转移到半固体培养基中,并且鉴定和测试IgG阳性克隆。使用FITC抗小鼠IgG Fc抗体。

[0247] 腹水抗体

[0248] 将 1×10^6 个阳性杂交瘤细胞腹腔注射到B-NDGTM小鼠中(北京百奥赛图基因生物技术有限公司(Beijing Biocytogen),中国北京;目录号B-CM-002)。通过在小鼠腹膜腔内生长杂交瘤细胞而产生单克隆抗体。杂交瘤细胞在小鼠腹部繁殖并产生腹水。液体中含有高浓度的抗体,可将其收集供以后使用。

[0249] 抗体的纯化

[0250] 使用GE AKTA蛋白色谱法(通用电气医疗集团(GE Healthcare),芝加哥,伊利诺伊州,美国)纯化腹水中的抗体。03-7F10(“7F10”)、06-6A7(“6A7”)、07-4H6(“4H6”)、03-9D7(“9D7”)、03-2A7(“2A7”)和03-9E11(“9E11”)是通过上文所述的方法产生的小鼠抗体。

[0251] 确定抗体的VH、VL和CDR区。7F10的重链CDR1、CDR2、CDR3和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列示于SEQ ID NO:1-6(Kabat编号)或SEQ ID NO:19、20、3、4、21、6(Chothia编

号)。

[0252] 6A7的重链CDR1、CDR2、CDR3和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列示于SEQ ID NO: 7-12(Kabat编号)或SEQ ID NO:22、23、9、10、11、12(Chothia编号)。

[0253] 4H6的重链CDR1、CDR2、CDR3和轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列示于SEQ ID NO: 13-18(Kabat编号)或SEQ ID NO:24、25、15、16、17、18(Chothia编号)。

[0254] 实施例2. 小鼠抗体的人源化

[0255] 人源化的起点是小鼠抗体(例如, 7F10、6A7和4H6)。测定了这些小鼠抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

[0256] 构建7F10的三种人源化重链可变区变体(SEQ ID NO:30-32)和四种人源化轻链可变区变体(SEQ ID NO:33-36), 其含有不同的修饰或取代。

[0257] 构建6A7的四种人源化重链可变区变体(SEQ ID NO:37-40)和三种人源化轻链可变区变体(SEQ ID NO:41-43), 其含有不同的修饰或取代。

[0258] 构建4H6的四种人源化重链可变区变体(SEQ ID NO:44-47)和四种人源化轻链可变区变体(SEQ ID NO:48-51), 其含有不同的修饰或取代。

[0259] 这些人源化重链可变区变体可以与基于同一小鼠抗体的任何轻链可变区变体组合。例如, 可以将6A7-H4(SEQ ID NO:40)与基于同一小鼠抗体6A7(例如6A7-K2(SEQ ID NO:42))的任何人源化轻链可变区变体组合, 并且所述抗体被相应地标记(例如6A7-H4K2)。

[0260] 实施例3. 小鼠抗hCD40抗体的体外测试: 阻断人CD40(hCD40)和人CD40配体(hCD40L)的结合

[0261] 进行阻断测定以确定抗hCD40抗体是否可以阻断hCD40与其配体hCD40L之间的结合。

[0262] 从小鼠腹水收集抗hCD40抗体, 并通过色谱法进行纯化。将用人CD40瞬时转染的25 μ l CHO细胞添加到平板中的每个孔中。将纯化的抗体滴定至最终浓度为50、5、0.5、0.05和0.005 μ g/ml。在4℃下, 将滴定的抗体以25 μ l/孔添加到每个孔中, 并孵育30分钟。

[0263] hCD40配体-hFc由H293T细胞表达。将50 μ l的hCD40L-hFc添加到每个孔中(1:500)。将具有hCD40L-hFc的细胞以及抗体在4℃下孵育15分钟。

[0264] 用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤两次后, 将50 μ l以1:500稀释的PE标记的抗小鼠IgG Fc抗体(抗mIgG Fc-PE)和以1:100稀释的FITC标记的抗人IgG Fc抗体(抗hIgG Fc-FITC)添加到每个孔中, 并在4℃下孵育30分钟, 然后用PBS洗涤。通过流式细胞术确定FITC和PE的信号。

[0265] 如图3所示, 当小鼠抗hCD40抗体03-7F10、06-6A7和07-4H6的浓度增加时, 与hCD40L结合的细胞的信号降低(y轴), 而与小鼠抗hCD40抗体结合的细胞的信号增加, 这表明抗hCD40抗体阻断人CD40和人CD40L之间的结合。

[0266] 实施例4. 抗hCD40抗体针对猴、小鼠和人-小鼠嵌合CD40的交叉反应性

[0267] 在每个实验中, 用小鼠CD40(mCD40, SEQ ID NO:27)、猴(恒河猴)CD40(rmCD40, SEQ ID NO:28)或嵌合(小鼠和人)CD40(chiCD40, SEQ ID NO:29)转染CHO细胞。

[0268] 将25 μ l CHO细胞添加到每个孔中。将25 μ l纯化的抗hCD40抗体(1 μ g/ml)(7F10、6A7或4H6)添加到每个孔中, 并在4℃下孵育30分钟。

[0269] 用PBS(1200rpm, 5min)洗涤两次后, 将50 μ l的FITC标记的抗小鼠IgG Fc抗体(抗

mIgG Fc-FITC)添加到每个孔中(以1:100稀释),然后在4℃下孵育30分钟,然后用PBS洗涤(1200rpm,5min)。通过流式细胞术检测FITC的信号。

[0270] 如图4所示,7F10、6A7和4H6不与小鼠CD40交叉反应,但与rmCD40和嵌合CD40有很强的交叉反应性。在图4中,NC代表阴性对照。

[0271] 实施例5.抗hCD40抗体的结合亲和力

[0272] 抗hCD40抗体的结合亲和力通过表面等离子体共振 (SPR) 用装备有预先固定的蛋白A传感器芯片的Biacore (Biacore, INC, Piscataway N.J.) T200生物传感器测量。

[0273] 通过转染CHO-S细胞收集抗hCD40抗体,然后将其纯化。将抗体(1μg/mL)按照10μL/min注射到Biacore T200生物传感器中约24-33秒,以达到期望蛋白质密度(约44-57响应单位(RU))。然后将组氨酸标记的人CD40蛋白(hCD40-His)以800、200、50、12.5、3.125、0.78125nM的浓度、按照30μL/min注射300秒。监测解离300秒。在每种甘氨酸滴定(pH 2.0, 30μL/min,持续12秒)的最后一次注射后芯片再生。图5示出了6A7-mHvKv-IgG4的结果。

[0274] 通过使用Biacore T200评估软件3.0将数据整体拟合为1:1朗缪尔(Langmuir)结合模型(Karlsson,R.Roos,H.Fagerstam,L.Petersson,B.,1994.Methods Enzymology[酶学方法]6.99-110),从而同时获得缔合速率(kon)和解离速率(koff)。从动力学速率常数的商(KD=koff/kon)推导亲和力。

[0275] 如本领域普通技术人员理解的,对每种测试的抗体进行相同的方法,其中将参数(例如抗体浓度)做适当调整。例如,图6示出了显示6A7-H1K1-IgG4的结果的图。下表总结了测试的抗体的结果。出于比较目的,还包括了达塞妥珠单抗(Dacetuzumab)的结果。

[0276] 表2

[0277]

抗 hCD40 抗体	缔合速率 k_{on} (1/Ms)	解离速率 k_{off} (1/s)	亲和力 $KD(M)$
达塞妥珠单抗	4.17E + 05	8.33E - 03	2.00E - 08
6A7-mHvKv-IgG4	9.94E + 04	2.59E - 04	2.60E - 09
6A7-H1K1-IgG4	2.04E + 04	5.71E - 03	2.80E - 07
6A7-H2K1-IgG4	2.37E + 04	7.08E - 03	2.98E - 07
6A7-H3K1-IgG4	2.76E + 04	5.74E - 04	2.08E - 08
6A7-H4K1-IgG4	2.39E + 04	5.72E - 04	2.39E - 08
6A7-H1K2-IgG4	2.06E + 04	3.86E - 03	1.87E - 07
6A7-H2K2-IgG4	2.63E + 04	4.96E - 03	1.89E - 07
6A7-H3K2-IgG4	6.46E + 04	3.71E - 04	5.74E - 09
6A7-H4K2-IgG4	1.05E + 05	3.22E - 04	3.06E - 09
6A7-H1K3-IgG4	2.87E + 04	3.90E - 03	1.36E - 07
6A7-H2K3-IgG4	4.53E + 04	5.05E - 03	1.11E - 07
6A7-H3K3-IgG4	1.23E + 05	3.56E - 04	2.90E - 09
6A7-H4K3-IgG4	1.07E + 05	3.73E - 04	3.49E - 09
4H6-mHvKv-IgG1	5.612E + 5	2.050E - 02	3.652E - 8
4H6-H1K1-IgG4	2.167E + 04	1.673E - 01	7.723E - 06
4H6-H2K1-IgG4	5.074E + 05	2.269E - 01	4.472E - 07
4H6-H3K1-IgG4	8.270E + 04	3.420E - 02	4.130E - 07
4H6-H4K1-IgG4	1.850E + 05	2.690E - 02	1.450E - 07
4H6-H1K2-IgG4	3.856E + 05	6.319E - 02	1.639E - 07
4H6-H2K2-IgG4	4.138E + 05	5.700E - 02	1.378E - 07
4H6-H3K2-IgG4	4.014E + 05	2.152E - 02	5.361E - 08
4H6-H4K2-IgG4	3.918E + 05	1.907E - 02	4.866E - 08
4H6-H1K3-IgG4	2.420E + 05	5.540E - 02	2.290E - 07
4H6-H2K3-IgG4	2.600E + 05	6.590E - 02	2.530E - 07
4H6-H3K3-IgG4	3.120E + 05	2.860E - 02	9.160E - 08
4H6-H4K3-IgG4	3.266E + 05	2.574E - 02	7.881E - 08
4H6-H1K4-IgG4	1.490E + 05	6.950E - 02	4.650E - 07
4H6-H2K4-IgG4	1.960E + 05	7.420E - 02	3.780E - 07
4H6-H3K4-IgG4	2.980E + 05	2.820E - 02	9.480E - 08
4H6-H4K4-IgG4	3.125E + 05	2.778E - 02	8.891E - 08
7F10-mHvKv-IgG1-N297A	1.504E + 05	2.924E - 02	1.944E - 07
7F10-H1K1-IgG4	1.769E + 05	5.144E - 02	2.908E - 07
7F10-H1K2-IgG4	8.277E + 04	4.915E - 02	5.938E - 07
7F10-H1K3-IgG4	7.312E + 04	3.913E - 02	5.351E - 07
7F10-H1K4-IgG4	1.153E + 05	3.208E - 02	2.782E - 07
7F10-H2K1-IgG4	1.205E + 05	6.505E - 02	5.397E - 07
7F10-H2K2-IgG4	1.056E + 05	5.337E - 02	5.053E - 07
7F10-H2K3-IgG4	1.720E + 05	3.126E - 02	1.817E - 07

[0278]

7F10-H2K4-IgG4	1.880E + 05	3.801E - 02	2.021E - 07
7F10-H3K1-IgG4	1.320E + 05	5.679E - 02	4.302E - 07
7F10-H3K2-IgG4	1.266E + 05	4.817E - 02	3.805E - 07
7F10-H3K3-IgG4	1.320E + 05	3.137E - 02	2.376E - 07
7F10-H3K4-IgG4	1.487E + 05	2.737E - 02	1.841E - 07

[0279] 在这些测试的抗体中, 6A7-mHvKv-IgG4、4H6-mHvKv-IgG1和7F10-mHvKv-IgG1-N297A是嵌合抗hCD40抗体。嵌合抗体具有来自相应小鼠抗hCD40抗体的重链可变结构域和轻链可变结构域, 并具有来自人抗体的恒定结构域(包括例如CL、CH1、CH2和CH3结构域)。术

语mHvKv表示小鼠重链可变区和小鼠轻链可变区。

[0280] 测试的抗体还包括人源化抗体。这些测试的人源化抗体具有人IgG4抗体恒定结构域(包括例如CL、CH1、CH2和CH3结构域)。将重链的人源化可变结构域编号为H1、H2、H3等;并且将轻链的人源化可变结构域编号为K1、K2、K3等。图19-21总结了人源化可变结构域的序列。例如,7F10-H1K1-IgG4是基于小鼠抗体7F10并具有人源化重链可变结构域H1 (SEQ ID NO:30) 和人源化轻链可变结构域K1 (SEQ ID NO:33)。类似地,6A7-H3K2-IgG4是基于小鼠抗体6A7并具有人源化重链可变结构域H3 (SEQ ID NO:39) 和人源化6A7轻链可变结构域K2 (SEQ ID NO:42)。

[0281] 表1总结了嵌合抗CD40抗体和人源化抗CD40抗体的名称和序列。几种测试的抗体在Fc区具有N297A突变(EU编号)。N297A突变可导致在N297处缺失糖基化,从而丧失效应子功能。

[0282] 实施例6. 抗hCD40抗体与mfCD40的结合亲和力

[0283] 抗hCD40抗体与mfCD40(食蟹猴)的结合亲和力通过表面等离子体共振 (SPR) 用装备有预先固定的蛋白A传感器芯片的Biacore (Biacore, INC, Piscataway N.J.) T200生物传感器测量。

[0284] 纯化抗hCD40抗体。将抗体 (0.5 μ g/mL) 按照10 μ L/min注射到Biacore T200生物传感器中约18-26秒,以达到期望蛋白质密度(约44-58响应单位(RU))。然后将组氨酸标记的mfCD40蛋白(mfCD40-His) (Acrobiosystems公司,目录号CD0-C52H6)以200、50、12.5、3.125nM的浓度、按照30 μ L/min注射180秒。监测解离300-600秒。在每种甘氨酸滴定(pH 2.0, 30 μ L/min,持续12秒)的最后一次注射后芯片再生。

[0285] 通过使用Biacore T200评估软件3.0将数据整体拟合为1:1朗缪尔(Langmuir)结合模型,从而同时获得缔合速率(kon)和解离速率(koff)。从动力学速率常数的商(KD=koff/kon)推导亲和力。

[0286] 下表总结了测试的抗体的结果。

[0287] 表3

	抗 hCD40 抗体	缔合速率 kon (1/Ms)	解离速率 koff (1/s)	与 mfCD40 的亲和力 KD (M)
[0288]	4H6-H3K2-IgG4	5.700E + 05	1.918E - 02	3.365E - 08
	4H6-H4K2-IgG4	5.683E + 05	1.688E - 02	2.970E - 08
	6A7-H3K3-IgG4	2.308E + 05	2.010E - 04	8.705E - 10
	6A7-H4K2-IgG4	1.988E + 05	7.874E - 04	3.960E - 09

[0289] 实施例7. 抗hCD40抗体的热稳定性

[0290] 使用Protein Thermal ShiftTM染料试剂盒(Thermo Fisher Scientific)和QuantStudioTM5实时PCR系统(Thermo Fisher Scientific)进行Thermofluor测定。所述测定使用与蛋白质展开时暴露的疏水性补丁(hydrophobic patch)结合的荧光染料测量热稳定性。

[0291] 根据制造商的方案进行实验。在步骤1中,将样品以1.6 $^{\circ}$ C/秒加热到25 $^{\circ}$ C。在步骤2中,将样品以0.05 $^{\circ}$ C/秒加热到99 $^{\circ}$ C。

[0292] 下表总结了测试的人源化抗hCD40抗体的Tm。出于比较目的,还包括了达塞妥珠单抗的结果。

[0293] 表4

抗体	可变结构域	类型（恒定结构域）	热稳定性（T _m °C）
4H6-H3K2-IgG4	4H6 H3K2	人 IgG4	75.03
4H6-H4K2-IgG4	4H6 H4K2	人 IgG4	77.92
4H6-H3K3-IgG4	4H6 H3K3	人 IgG4	75.21
4H6-H3K4-IgG4	4H6 H3K4	人 IgG4	74.62
4H6-H4K3-IgG4	4H6 H4K3	人 IgG4	76.91
4H6-H4K4-IgG4	4H6 H4K4	人 IgG4	74.47
4H6-mHvKv-IgG1	4H6 mHvKv	人 IgG1	76.25
4H6-mHvKv-IgG4	4H6 mHvKv	人 IgG4	75.73
4H6-mHvKv-IgG1-N 297A	4H6 mHvKv	具有 N297A 突变的人 IgG1	75.88
4H6-H3K2-IgG2	4H6 H3K2	人 IgG2	75.22
4H6-H4K2-IgG2	4H6 H4K2	人 IgG2	76.55
6A7-H3K2-IgG4	6A7 H3K2	人 IgG4	77.77
6A7-H3K3-IgG4	6A7 H3K3	人 IgG4	78.58
6A7-H4K2-IgG4	6A7 H4K2	人 IgG4	76.66
6A7-H4K3-IgG4	6A7 H4K3	人 IgG4	78.88
6A7-mHvKv-IgG1	6A7 mHvKv	人 IgG1	76.95
6A7-mHvKv-IgG2	6A7 mHvKv	人 IgG2	77.25
6A7-mHvKv-IgG4	6A7 mHvKv	人 IgG4	76.73
6A7-mHvKv-IgG1-L ALA	6A7 mHvKv	具有 LALA 突变（以 EU 编号的 L234A 和 L235A 突变）的人 IgG1	76.95
6A7-H3K3-IgG2	6A7 H3K3	人 IgG2	79.07
A7-H4K2-IgG2	6A7 H4K2	人 IgG2	78.48
7F10-H1K1-IgG4	7F10 H1K1	人 IgG4	74.36
7F10-H1K2-IgG4	7F10 H1K2	人 IgG4	76.28
7F10-H1K3-IgG4	7F10 H1K3	人 IgG4	75.10
7F10-H1K4-IgG4	7F10 H1K4	人 IgG4	74.73
7F10-H2K1-IgG4	7F10 H2K1	人 IgG4	73.99
7F10-H2K2-IgG4	7F10 H2K2	人 IgG4	75.54
7F10-H2K3-IgG4	7F10 H2K3	人 IgG4	74.36
7F10-H2K4-IgG4	7F10 H2K4	人 IgG4	74.13
7F10-H3K1-IgG4	7F10 H3K1	人 IgG4	73.62
7F10-H3K2-IgG4	7F10 H3K2	人 IgG4	74.95
7F10-H3K3-IgG4	7F10 H3K3	人 IgG4	74.65
7F10-H3K4-IgG4	7F10 H3K4	人 IgG4	73.99
7F10-mHvKv-IgG1	7F10 mHvKv	人 IgG1	75.54
7F10-mHvKv-IgG1-N 297A	7F10 mHvKv	具有 N297A 突变的人 IgG1	76.21
7F10-mHvKv-IgG2	7F10 mHvKv	人 IgG2	75.84
7F10-mHvKv-IgG4	7F10 mHvKv	人 IgG4	75.02
达塞妥珠单抗	NA	人 IgG1	77.46

[0296] 实施例8. 小鼠和嵌合抗hCD40抗体的体内测试

[0297] 为了在体内测试抗hCD40抗体并预测这些抗体在人体中的作用,产生了人源化CD40小鼠模型。将人源化CD40小鼠模型工程改造以表达嵌合CD40蛋白 (SEQ ID NO:29),其中所述小鼠CD40蛋白的一部分胞外区被相应的人CD40胞外区替代。小鼠CD40 (SEQ ID NO:27)的氨基酸残基20-192被人CD40 (SEQ ID NO:26)的氨基酸残基20-192替代。人源化小鼠模型 (B-hCD40小鼠)通过显著降低人和表达小鼠CD40的普通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性治疗的新工具。关于人源化CD40小鼠模型的详细描述可见于PCT/CN 2018/091845中,其通过引用以其全文并入本文。

[0298] 在结肠癌模型中测试了抗hCD40抗体对体内肿瘤生长的作用。将MC-38癌肿瘤细胞(结肠腺癌细胞)皮下注射到B-hCD40小鼠中。当小鼠的肿瘤体积达到100-150mm³时,根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组(每组五只小鼠)。

[0299] 然后通过腹腔给药向小鼠注射生理盐水(PS)和抗hCD40抗体。在每周的第一天和第四天给予抗体,持续3周(共注射6次)。

[0300] 以3mg/kg根据小鼠的体重计算注射量。测量肿瘤的长轴和短轴的长度,并将肿瘤的体积计算为 $0.5 \times (\text{长轴}) \times (\text{短轴})^2$ 。在注射之前、将小鼠分成不同的组时(第一次抗体注射之前)、在抗体注射期间每周两次、以及在安乐死之前测量小鼠的体重。

[0301] 使用以下公式计算肿瘤生长抑制百分比(TGI%): $TGI(\%) = [1 - (Ti - T0) / (Vi - V0)] \times 100$ 。Ti是治疗组在第i天的平均肿瘤体积。T0是治疗组在第零天的平均肿瘤体积。Vi是对照组在第i天的平均肿瘤体积。V0是对照组在第零天的平均肿瘤体积。

[0302] 进行T检验用于统计分析。TGI%高于60%指示肿瘤生长受到显著抑制。P<0.05是指示具有显著差异的阈值。

[0303] 小鼠抗hCD40抗体的体内结果

[0304] 在七个组(G1-G7)的每个组中,将B-hCD40小鼠注射生理盐水(PS)作为对照(G1)、小鼠抗hCD40抗体03-9D7(G2;3mg/kg)、小鼠抗hCD40抗体03-2A7(G3;3mg/kg)、小鼠抗hCD40抗体03-9E11(G4;3mg/kg)、小鼠抗hCD40抗体06-6A7(G5;3mg/kg)、小鼠抗hCD40抗体07-4H6(G6;3mg/kg)或小鼠抗hCD40抗体03-7F10(G7;3mg/kg)。

[0305] 在整个治疗期间监测小鼠的体重(图7和图8)。在这些组中,观察到体重差异不大。结果显示03-7F10、06-6A7和07-4H6耐受性良好并且对小鼠无毒。

[0306] 与对照组(图9)和其他抗体治疗组相比,用03-7F10、06-6A7和07-4H6治疗的组中肿瘤体积的增加程度较小。

[0307] 如下表所示,还计算了第25天(分组后25天)的TGI%。

[0308] 表5

		肿瘤体积 (mm ³)				存活	TGI _{TV} %	P 值	
		第 0 天	第 11 天	第 21 天	第 25 天			体重	肿瘤体积
[0309]	对照 G1	121 ± 7	457 ± 35	1391 ± 235	2311 ± 531	4/5	n.a.	n.a.	n.a.
	G2	124 ± 9	407 ± 79	1174 ± 300	1979 ± 488	5/5	15.29%	0.456	0.660
	03-9D7								
	G3	121 ± 8	327 ± 34	1087 ± 125	1696 ± 129	5/5	28.13%	0.256	0.248
	03-2A7								
	G4	121 ± 10	347 ± 64	880 ± 98	1254 ± 169	5/5	48.28%	0.129	0.074
	03-9E11								
	G5	120 ± 8	238 ± 26	293 ± 43	434 ± 59	5/5	85.65%	0.419	0.005
治疗	06-6A7								
	G6	119 ± 8	274 ± 25	440 ± 120	647 ± 172	5/5	75.90%	0.118	0.013
	07-4H6								
	G7	123 ± 10	286 ± 43	476 ± 108	809 ± 227	5/5	68.67%	0.495	0.131
	03-7F10								

[0310] 嵌合抗hCD40抗体的体内结果

[0311] 通过腹腔给药,向B-hCD40小鼠(人源化CD40小鼠)施用嵌合抗hCD40抗体6A7-mHvKv-IgG1(G2)、6A7-mHvKv-IgG2(G3)、6A7-mHvKv-IgG4(G4)、6A7-mHvKv-IgG1-N297A(G5)和6A7-mHvKv-IgG1-LALA(G6)。注射生理盐水作为对照(第1组,G1)。出于比较目的,还包括了达塞妥珠单抗(人源化抗CD40单克隆抗体,其旨在治疗血液恶性病)(G7)。

[0312] 以3mg/kg根据小鼠的体重计算抗体的注射量。在每周的第一天和第四天给予抗体(共注射6次)。

[0313] 在整个治疗期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠的体重全部增加(图10和图11)。在不同组中,没有观察到明显的体重差异。结果显示抗hCD40抗体耐受性良好并且对小鼠无毒。

[0314] 与对照组相比,在用某些嵌合抗体治疗的组中肿瘤体积显示出显著差异(图12)。

[0315] 如下表所示,计算了每个治疗组在第21天(分组后21天)的TGI%。

[0316] 表6

	肿瘤体积 (mm ³)					存活 TGI _{TV} %		P 值		
	第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	体重			肿瘤 体积		
[0317]	对照	G1	153 ± 18	567 ± 98	1465 ± 275	2995 ± 714	75	n.a.	n.a.	n.a.
		G2	153 ± 19	585 ± 120	1646 ± 377	3214 ± 732	75	-7.70%	0.371	0.836
		G3	153 ± 22	341 ± 18	672 ± 114	1072 ± 238	75	67.67%	0.042	0.034
	治疗	G4	151 ± 32	583 ± 109	1343 ± 484	1875 ± 164	4/5	39.32%	0.415	0.215
		G5	152 ± 33	568 ± 61	1686 ± 308	3466 ± 719	75	-16.59%	0.772	0.655
		G6	151 ± 26	562 ± 50	1385 ± 104	2670 ± 242	75	11.37%	0.390	0.678
		G7	154 ± 22	371 ± 62	1180 ± 164	2606 ± 395	75	13.73%	0.585	0.646

[0318] 结果表明,嵌合抗体6A7-mHvKv-IgG2显著抑制肿瘤生长。在这些抗体中,6A7-mHvKv-IgG4(G4)和6A7-mHvKv-IgG1-LALA(G6)也具有肿瘤抑制作用。

[0319] 实施例9.人源化抗hCD40抗体的体内测试

[0320] 在CD40人源化小鼠(B-hCD40)中测试了人源化抗hCD40抗体,以证明其对体内肿瘤生长的作用。

[0321] 将MC-38癌肿瘤细胞(结肠腺癌细胞)皮下注射到B-hCD40小鼠中。当小鼠的肿瘤体积达到150±50mm³时,根据肿瘤的体积将小鼠随机分为不同的组(每组五只小鼠)。

[0322] 然后向小鼠注射生理盐水作为对照(G1)、人源化抗CD40抗体6A7-H3K3-IgG2(G2)、人源化抗CD40抗体6A7-H4K2-IgG2(G3)、人源化抗CD40抗体6A7-H3K3-IgG4(G4)、或人源化抗CD40抗体6A7-H4K2-IgG4(G5)。

[0323] 在每周第二天和第五天以3mg/kg通过腹腔注射来给予抗体,持续3周(共注射6次)。

[0324] 在整个治疗期间监测小鼠的体重。不同组中小鼠的体重全部增加(图13和图14)。结果显示抗hCD40抗体耐受性良好并且对小鼠无毒。

[0325] 在用抗hCD40抗体治疗的组中肿瘤体积显示出显著差异(图15)。特别地,G3中的肿瘤体积小于G1(P=0.15)。

[0326] 如下表所示,还计算了每个治疗组在第21天(分组后21天)的TGI%。

[0327] 表7

[0328]

		肿瘤体积 (mm ³)				存活 TGI _{TV} %		P 值		
		第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天			体重	肿瘤 体积	
	对照	G1	137 ± 4	424 ± 45	916 ± 127	1453 ± 310	4/5	n.a.	n.a.	n.a.
		G2	137 ± 7	376 ± 22	602 ± 118	871 ± 276	75	44.26%	0.105	0.203
	治疗	G3	137 ± 7	414 ± 26	484 ± 65	544 ± 67	75	69.10%	0.002	0.015
		G4	137 ± 5	523 ± 28	1303 ± 158	1925 ± 198	75	-35.88%	0.177	0.223
		G5	137 ± 5	420 ± 32	1081 ± 99	1778 ± 121	75	-24.72%	0.720	0.321

[0329] 以上结果表明,一些人源化抗hCD40抗体可以抑制肿瘤生长。其中,6A7-H4K2-IgG2 (G3)具有最高肿瘤生长抑制百分比(TGI%)。

[0330] 其他实施方案

[0331] 应当理解,虽然已经结合具体实施方式对本发明进行了描述,但前面的描述旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附的权利要求书的范围限定。其他方面、优点以及修改在以下权利要求的范围内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 祐和医药科技(北京)有限公司(Eucure (Beijing) Biopharma Co., Ltd)
- [0003] <120> 抗CD40抗体及其用途
- [0004] <130> 1
- [0005] <160> 57
- [0006] <170> PatentIn 3.5版
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 5
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] Asp Tyr Tyr Met Tyr
- [0013] 1 5
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 17
- [0016] <212> PRT
- [0017] <213> 人工序列
- [0018] <400> 2
- [0019] Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Asp Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Thr Val Arg
- [0020] 1 5 10 15
- [0021] Gly
- [0022] <210> 3
- [0023] <211> 12
- [0024] <212> PRT
- [0025] <213> 人工序列
- [0026] <400> 3
- [0027] Pro Ala Pro Ser Ala His Ser Tyr Tyr Leu Asp Tyr
- [0028] 1 5 10
- [0029] <210> 4
- [0030] <211> 11
- [0031] <212> PRT
- [0032] <213> 人工序列
- [0033] <400> 4
- [0034] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
- [0035] 1 5 10
- [0036] <210> 5
- [0037] <211> 8
- [0038] <212> PRT

[0039]	<213>	人工序列
[0040]	<400>	5
[0041]	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser	
[0042]	1	5
[0043]	<210>	6
[0044]	<211>	9
[0045]	<212>	PRT
[0046]	<213>	人工序列
[0047]	<400>	6
[0048]	Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe Thr	
[0049]	1	5
[0050]	<210>	7
[0051]	<211>	5
[0052]	<212>	PRT
[0053]	<213>	人工序列
[0054]	<400>	7
[0055]	Ser Tyr Tyr Ile Tyr	
[0056]	1	5
[0057]	<210>	8
[0058]	<211>	17
[0059]	<212>	PRT
[0060]	<213>	人工序列
[0061]	<400>	8
[0062]	Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys	
[0063]	1	5 10 15
[0064]	Ser	
[0065]	<210>	9
[0066]	<211>	6
[0067]	<212>	PRT
[0068]	<213>	人工序列
[0069]	<400>	9
[0070]	His Gly Asn Gly Val Tyr	
[0071]	1	5
[0072]	<210>	10
[0073]	<211>	16
[0074]	<212>	PRT
[0075]	<213>	人工序列
[0076]	<400>	10
[0077]	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His	

[0078]	1	5	10	15
[0079]	<210> 11			
[0080]	<211> 7			
[0081]	<212> PRT			
[0082]	<213> 人工序列			
[0083]	<400> 11			
[0084]	Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser			
[0085]	1	5		
[0086]	<210> 12			
[0087]	<211> 9			
[0088]	<212> PRT			
[0089]	<213> 人工序列			
[0090]	<400> 12			
[0091]	Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr			
[0092]	1	5		
[0093]	<210> 13			
[0094]	<211> 5			
[0095]	<212> PRT			
[0096]	<213> 人工序列			
[0097]	<400> 13			
[0098]	Ser Gly Tyr Trp Asn			
[0099]	1	5		
[0100]	<210> 14			
[0101]	<211> 16			
[0102]	<212> PRT			
[0103]	<213> 人工序列			
[0104]	<400> 14			
[0105]	Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser Leu Lys Ser			
[0106]	1	5	10	15
[0107]	<210> 15			
[0108]	<211> 10			
[0109]	<212> PRT			
[0110]	<213> 人工序列			
[0111]	<400> 15			
[0112]	Phe Arg Arg Tyr Asp Asp Gly Val Asp Tyr			
[0113]	1	5	10	
[0114]	<210> 16			
[0115]	<211> 11			
[0116]	<212> PRT			

[0117]	<213>	人工序列
[0118]	<400>	16
[0119]	Arg Ala Ser His Glu Ile Ser Gly Tyr Leu Ser	
[0120]	1	5 10
[0121]	<210>	17
[0122]	<211>	7
[0123]	<212>	PRT
[0124]	<213>	人工序列
[0125]	<400>	17
[0126]	Ala Ala Ser Thr Leu Ala Ser	
[0127]	1	5
[0128]	<210>	18
[0129]	<211>	9
[0130]	<212>	PRT
[0131]	<213>	人工序列
[0132]	<400>	18
[0133]	Leu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr	
[0134]	1	5
[0135]	<210>	19
[0136]	<211>	10
[0137]	<212>	PRT
[0138]	<213>	人工序列
[0139]	<400>	19
[0140]	Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Tyr	
[0141]	1	5 10
[0142]	<210>	20
[0143]	<211>	6
[0144]	<212>	PRT
[0145]	<213>	人工序列
[0146]	<400>	20
[0147]	Ser Tyr Gly Gly Asp Ser	
[0148]	1	5
[0149]	<210>	21
[0150]	<211>	7
[0151]	<212>	PRT
[0152]	<213>	人工序列
[0153]	<400>	21
[0154]	Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser	
[0155]	1	5

[0156]	<210>	22
[0157]	<211>	10
[0158]	<212>	PRT
[0159]	<213>	人工序列
[0160]	<400>	22
[0161]	Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr Tyr Ile Tyr	
[0162]	1	5 10
[0163]	<210>	23
[0164]	<211>	6
[0165]	<212>	PRT
[0166]	<213>	人工序列
[0167]	<400>	23
[0168]	Asn Pro Arg Asn Gly Gly	
[0169]	1	5
[0170]	<210>	24
[0171]	<211>	10
[0172]	<212>	PRT
[0173]	<213>	人工序列
[0174]	<400>	24
[0175]	Gly Asp Ser Val Ser Ser Gly Tyr Trp Asn	
[0176]	1	5 10
[0177]	<210>	25
[0178]	<211>	5
[0179]	<212>	PRT
[0180]	<213>	人工序列
[0181]	<400>	25
[0182]	Ser Tyr Ser Gly Ser	
[0183]	1	5
[0184]	<210>	26
[0185]	<211>	277
[0186]	<212>	PRT
[0187]	<213>	human
[0188]	<400>	26
[0189]	Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr	
[0190]	1	5 10 15
[0191]	Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu	
[0192]		20 25 30
[0193]	Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val	
[0194]		35 40 45

[0195]	Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu		
[0196]	50	55	60
[0197]	Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His		
[0198]	65	70	75
[0199]	Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr		
[0200]	85	90	95
[0201]	Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr		
[0202]	100	105	110
[0203]	Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly		
[0204]	115	120	125
[0205]	Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu		
[0206]	130	135	140
[0207]	Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys		
[0208]	145	150	155
[0209]	Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln		
[0210]	165	170	175
[0211]	Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu		
[0212]	180	185	190
[0213]	Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile		
[0214]	195	200	205
[0215]	Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn		
[0216]	210	215	220
[0217]	Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp		
[0218]	225	230	235
[0219]	Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His		
[0220]	245	250	255
[0221]	Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser		
[0222]	260	265	270
[0223]	Val Gln Glu Arg Gln		
[0224]	275		
[0225]	<210> 27		
[0226]	<211> 289		
[0227]	<212> PRT		
[0228]	<213> Mouse		
[0229]	<400> 27		
[0230]	Met Val Ser Leu Pro Arg Leu Cys Ala Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr		
[0231]	1	5	10
[0232]	Ala Val His Leu Gly Gln Cys Val Thr Cys Ser Asp Lys Gln Tyr Leu		
[0233]	20	25	30

[0234]	His Asp Gly Gln Cys Cys Asp Leu Cys Gln Pro Gly Ser Arg Leu Thr
[0235]	35 40 45
[0236]	Ser His Cys Thr Ala Leu Glu Lys Thr Gln Cys His Pro Cys Asp Ser
[0237]	50 55 60
[0238]	Gly Glu Phe Ser Ala Gln Trp Asn Arg Glu Ile Arg Cys His Gln His
[0239]	65 70 75 80
[0240]	Arg His Cys Glu Pro Asn Gln Gly Leu Arg Val Lys Lys Glu Gly Thr
[0241]	85 90 95
[0242]	Ala Glu Ser Asp Thr Val Cys Thr Cys Lys Glu Gly Gln His Cys Thr
[0243]	100 105 110
[0244]	Ser Lys Asp Cys Glu Ala Cys Ala Gln His Thr Pro Cys Ile Pro Gly
[0245]	115 120 125
[0246]	Phe Gly Val Met Glu Met Ala Thr Glu Thr Thr Asp Thr Val Cys His
[0247]	130 135 140
[0248]	Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Gln Ser Ser Leu Phe Glu Lys
[0249]	145 150 155 160
[0250]	Cys Tyr Pro Trp Thr Ser Cys Glu Asp Lys Asn Leu Glu Val Leu Gln
[0251]	165 170 175
[0252]	Lys Gly Thr Ser Gln Thr Asn Val Ile Cys Gly Leu Lys Ser Arg Met
[0253]	180 185 190
[0254]	Arg Ala Leu Leu Val Ile Pro Val Val Met Gly Ile Leu Ile Thr Ile
[0255]	195 200 205
[0256]	Phe Gly Val Phe Leu Tyr Ile Lys Lys Val Val Lys Lys Pro Lys Asp
[0257]	210 215 220
[0258]	Asn Glu Ile Leu Pro Pro Ala Ala Arg Arg Gln Asp Pro Gln Glu Met
[0259]	225 230 235 240
[0260]	Glu Asp Tyr Pro Gly His Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu
[0261]	245 250 255
[0262]	His Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile
[0263]	260 265 270
[0264]	Ser Val Gln Glu Arg Gln Val Thr Asp Ser Ile Ala Leu Arg Pro Leu
[0265]	275 280 285
[0266]	Val
[0267]	<210> 28
[0268]	<211> 278
[0269]	<212> PRT
[0270]	<213> Monkey
[0271]	<400> 28
[0272]	Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr

[0273]	1	5	10	15
[0274]	Ala Val Tyr Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu			
[0275]	20	25	30	
[0276]	Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val			
[0277]	35	40	45	
[0278]	Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Ser Glu			
[0279]	50	55	60	
[0280]	Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr Arg Cys His Gln His			
[0281]	65	70	75	80
[0282]	Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr			
[0283]	85	90	95	
[0284]	Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Leu His Cys Met			
[0285]	100	105	110	
[0286]	Ser Glu Ser Cys Glu Ser Cys Val Pro His Arg Ser Cys Leu Pro Gly			
[0287]	115	120	125	
[0288]	Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu			
[0289]	130	135	140	
[0290]	Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys			
[0291]	145	150	155	160
[0292]	Cys Arg Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln			
[0293]	165	170	175	
[0294]	Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Gln			
[0295]	180	185	190	
[0296]	Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Cys Leu Gly Ile Leu Phe Val Ile			
[0297]	195	200	205	
[0298]	Leu Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Asn			
[0299]	210	215	220	
[0300]	Asp Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Leu			
[0301]	225	230	235	240
[0302]	Asp Asp Leu Pro Gly Ser Asn Pro Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu			
[0303]	245	250	255	
[0304]	His Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile			
[0305]	260	265	270	
[0306]	Ser Val Gln Glu Arg Gln			
[0307]	275			
[0308]	<210> 29			
[0309]	<211> 289			
[0310]	<212> PRT			
[0311]	<213> 人工序列			

[0312]	<400> 29																
[0313]	Met	Val	Ser	Leu	Pro	Arg	Leu	Cys	Ala	Leu	Trp	Gly	Cys	Leu	Leu	Thr	
[0314]	1				5					10					15		
[0315]	Ala	Val	His	Pro	Glu	Pro	Pro	Thr	Ala	Cys	Arg	Glu	Lys	Gln	Tyr	Leu	
[0316]				20					25					30			
[0317]	Ile	Asn	Ser	Gln	Cys	Cys	Ser	Leu	Cys	Gln	Pro	Gly	Gln	Lys	Leu	Val	
[0318]			35					40					45				
[0319]	Ser	Asp	Cys	Thr	Glu	Phe	Thr	Glu	Thr	Glu	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Glu	
[0320]		50					55				60						
[0321]	Ser	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Trp	Asn	Arg	Glu	Thr	His	Cys	His	Gln	His	
[0322]	65					70				75					80		
[0323]	Lys	Tyr	Cys	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr	
[0324]				85					90						95		
[0325]	Ser	Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Cys	Thr	Cys	Glu	Glu	Gly	Trp	His	Cys	Thr	
[0326]				100					105					110			
[0327]	Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Cys	Val	Leu	His	Arg	Ser	Cys	Ser	Pro	Gly	
[0328]			115					120					125				
[0329]	Phe	Gly	Val	Lys	Gln	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Ser	Asp	Thr	Ile	Cys	Glu	
[0330]		130					135				140						
[0331]	Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Ala	Phe	Glu	Lys	
[0332]	145					150				155					160		
[0333]	Cys	His	Pro	Trp	Thr	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Val	Val	Gln	Gln	
[0334]				165					170						175		
[0335]	Ala	Gly	Thr	Asn	Lys	Thr	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu	
[0336]				180					185					190			
[0337]	Arg	Ala	Leu	Leu	Val	Ile	Pro	Val	Val	Met	Gly	Ile	Leu	Ile	Thr	Ile	
[0338]			195					200					205				
[0339]	Phe	Gly	Val	Phe	Leu	Tyr	Ile	Lys	Lys	Val	Val	Lys	Lys	Pro	Lys	Asp	
[0340]		210					215				220						
[0341]	Asn	Glu	Ile	Leu	Pro	Pro	Ala	Ala	Arg	Arg	Gln	Asp	Pro	Gln	Glu	Met	
[0342]	225					230				235					240		
[0343]	Glu	Asp	Tyr	Pro	Gly	His	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Thr	Leu	
[0344]				245					250						255		
[0345]	His	Gly	Cys	Gln	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Ser	Arg	Ile	
[0346]				260					265					270			
[0347]	Ser	Val	Gln	Glu	Arg	Gln	Val	Thr	Asp	Ser	Ile	Ala	Leu	Arg	Pro	Leu	
[0348]			275					280					285				
[0349]	Val																
[0350]	<210> 30																

51

[0390]	Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
[0391]	115 120
[0392]	<210> 32
[0393]	<211> 121
[0394]	<212> PRT
[0395]	<213> 人工序列
[0396]	<400> 32
[0397]	Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0398]	1 5 10 15
[0399]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[0400]	20 25 30
[0401]	Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
[0402]	35 40 45
[0403]	Ala Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Asp Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Thr Val
[0404]	50 55 60
[0405]	Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
[0406]	65 70 75 80
[0407]	Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0408]	85 90 95
[0409]	Ala Arg Pro Ala Pro Ser Ala His Ser Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
[0410]	100 105 110
[0411]	Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[0412]	115 120
[0413]	<210> 33
[0414]	<211> 107
[0415]	<212> PRT
[0416]	<213> 人工序列
[0417]	<400> 33
[0418]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0419]	1 5 10 15
[0420]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[0421]	20 25 30
[0422]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile
[0423]	35 40 45
[0424]	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Leu Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0425]	50 55 60
[0426]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0427]	65 70 75 80
[0428]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe

[0429]		85		90		95
[0430]	Thr Phe Ala Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0431]		100		105		
[0432]	<210> 34					
[0433]	<211> 107					
[0434]	<212> PRT					
[0435]	<213> 人工序列					
[0436]	<400> 34					
[0437]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
[0438]	1	5		10		15
[0439]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr					
[0440]		20		25		30
[0441]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile					
[0442]		35		40		45
[0443]	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Leu Pro Ser Arg Phe Ser Gly					
[0444]	50		55		60	
[0445]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro					
[0446]	65		70		75	80
[0447]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe					
[0448]		85		90		95
[0449]	Thr Phe Ala Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
[0450]		100		105		
[0451]	<210> 35					
[0452]	<211> 107					
[0453]	<212> PRT					
[0454]	<213> 人工序列					
[0455]	<400> 35					
[0456]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly					
[0457]	1	5		10		15
[0458]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr					
[0459]		20		25		30
[0460]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile					
[0461]		35		40		45
[0462]	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Leu Pro Ser Arg Phe Ser Gly					
[0463]	50		55		60	
[0464]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln					
[0465]	65		70		75	80
[0466]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe					
[0467]		85		90		95

[0468]	Thr Phe Ala Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0469]	100 105
[0470]	<210> 36
[0471]	<211> 107
[0472]	<212> PRT
[0473]	<213> 人工序列
[0474]	<400> 36
[0475]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0476]	1 5 10 15
[0477]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
[0478]	20 25 30
[0479]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
[0480]	35 40 45
[0481]	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Leu Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0482]	50 55 60
[0483]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Gln
[0484]	65 70 75 80
[0485]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe
[0486]	85 90 95
[0487]	Thr Phe Ala Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0488]	100 105
[0489]	<210> 37
[0490]	<211> 115
[0491]	<212> PRT
[0492]	<213> 人工序列
[0493]	<400> 37
[0494]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0495]	1 5 10 15
[0496]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr
[0497]	20 25 30
[0498]	Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0499]	35 40 45
[0500]	Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
[0501]	50 55 60
[0502]	Lys Ser Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0503]	65 70 75 80
[0504]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0505]	85 90 95
[0506]	Ala Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr

[0507]	100	105	110
[0508]	Val Ser Ser		
[0509]	115		
[0510]	<210> 38		
[0511]	<211> 115		
[0512]	<212> PRT		
[0513]	<213> 人工序列		
[0514]	<400> 38		
[0515]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[0516]	1 5 10 15		
[0517]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr		
[0518]	20 25 30		
[0519]	Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0520]	35 40 45		
[0521]	Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe		
[0522]	50 55 60		
[0523]	Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
[0524]	65 70 75 80		
[0525]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0526]	85 90 95		
[0527]	Ala Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr		
[0528]	100 105 110		
[0529]	Val Ser Ser		
[0530]	115		
[0531]	<210> 39		
[0532]	<211> 115		
[0533]	<212> PRT		
[0534]	<213> 人工序列		
[0535]	<400> 39		
[0536]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
[0537]	1 5 10 15		
[0538]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr		
[0539]	20 25 30		
[0540]	Tyr Ile Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0541]	35 40 45		
[0542]	Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe		
[0543]	50 55 60		
[0544]	Lys Ser Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr		
[0545]	65 70 75 80		

[0546]	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0547]					85					90					95	
[0548]	Thr	Arg	His	Gly	Asn	Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr
[0549]					100					105					110	
[0550]	Val	Ser	Ser													
[0551]					115											
[0552]	<210>	40														
[0553]	<211>	115														
[0554]	<212>	PRT														
[0555]	<213>	人工序列														
[0556]	<400>	40														
[0557]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
[0558]	1				5					10					15	
[0559]	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ile	Ser	Tyr
[0560]					20					25					30	
[0561]	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[0562]					35					40					45	
[0563]	Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Arg	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Asn	Glu	Lys	Phe
[0564]					50					55					60	
[0565]	Lys	Ser	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0566]	65					70					75					80
[0567]	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0568]					85					90					95	
[0569]	Thr	Arg	His	Gly	Asn	Gly	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr
[0570]					100					105					110	
[0571]	Val	Ser	Ser													
[0572]					115											
[0573]	<210>	41														
[0574]	<211>	112														
[0575]	<212>	PRT														
[0576]	<213>	人工序列														
[0577]	<400>	41														
[0578]	Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Gly
[0579]	1				5					10					15	
[0580]	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
[0581]					20					25					30	
[0582]	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
[0583]					35					40					45	
[0584]	Pro	Arg	His	Leu	Ile	Tyr	Gln	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro

[0585]	50	55	60
[0586]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0587]	65	70	75
[0588]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr		
[0589]	85	90	95
[0590]	Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0591]	100	105	110
[0592]	<210> 42		
[0593]	<211> 112		
[0594]	<212> PRT		
[0595]	<213> 人工序列		
[0596]	<400> 42		
[0597]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly		
[0598]	1	5	10
[0599]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser		
[0600]	20	25	30
[0601]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
[0602]	35	40	45
[0603]	Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
[0604]	50	55	60
[0605]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
[0606]	65	70	75
[0607]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr		
[0608]	85	90	95
[0609]	Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0610]	100	105	110
[0611]	<210> 43		
[0612]	<211> 112		
[0613]	<212> PRT		
[0614]	<213> 人工序列		
[0615]	<400> 43		
[0616]	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly		
[0617]	1	5	10
[0618]	Asp Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser		
[0619]	20	25	30
[0620]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser		
[0621]	35	40	45
[0622]	Pro Asn His Leu Ile Tyr Gln Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
[0623]	50	55	60

[0624]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0625]	65 70 75 80
[0626]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
[0627]	85 90 95
[0628]	Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0629]	100 105 110
[0630]	<210> 44
[0631]	<211> 118
[0632]	<212> PRT
[0633]	<213> 人工序列
[0634]	<400> 44
[0635]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0636]	1 5 10 15
[0637]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Gly
[0638]	20 25 30
[0639]	Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp Ile
[0640]	35 40 45
[0641]	Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
[0642]	50 55 60
[0643]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
[0644]	65 70 75 80
[0645]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0646]	85 90 95
[0647]	Arg Phe Arg Arg Tyr Asp Asp Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0648]	100 105 110
[0649]	Leu Val Thr Val Ser Ser
[0650]	115
[0651]	<210> 45
[0652]	<211> 118
[0653]	<212> PRT
[0654]	<213> 人工序列
[0655]	<400> 45
[0656]	Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
[0657]	1 5 10 15
[0658]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Gly
[0659]	20 25 30
[0660]	Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp Ile
[0661]	35 40 45
[0662]	Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser Leu Lys

[0663]	50	55	60
[0664]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu		
[0665]	65	70	75 80
[0666]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
[0667]	85	90	95
[0668]	Arg Phe Arg Arg Tyr Asp Asp Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
[0669]	100	105	110
[0670]	Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0671]	115		
[0672]	<210> 46		
[0673]	<211> 118		
[0674]	<212> PRT		
[0675]	<213> 人工序列		
[0676]	<400> 46		
[0677]	Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
[0678]	1	5	10 15
[0679]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Gly		
[0680]	20	25	30
[0681]	Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Lys His Pro Gly Lys Lys Leu Glu Tyr Met		
[0682]	35	40	45
[0683]	Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Thr Pro Ser Leu Lys		
[0684]	50	55	60
[0685]	Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu		
[0686]	65	70	75 80
[0687]	Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala		
[0688]	85	90	95
[0689]	Arg Phe Arg Arg Tyr Asp Asp Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
[0690]	100	105	110
[0691]	Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0692]	115		
[0693]	<210> 47		
[0694]	<211> 118		
[0695]	<212> PRT		
[0696]	<213> 人工序列		
[0697]	<400> 47		
[0698]	Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
[0699]	1	5	10 15
[0700]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Gly		
[0701]	20	25	30

[0702]	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Lys	Phe	Pro	Gly	Lys	Lys	Leu	Glu	Tyr	Met
[0703]			35					40					45			
[0704]	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys
[0705]			50					55					60			
[0706]	Ser	Arg	Ile	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
[0707]	65						70				75					80
[0708]	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala
[0709]					85					90					95	
[0710]	Arg	Phe	Arg	Arg	Tyr	Asp	Asp	Gly	Val	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
[0711]				100					105					110		
[0712]	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
[0713]				115												
[0714]	<210>	48														
[0715]	<211>	107														
[0716]	<212>	PRT														
[0717]	<213>	人工序列														
[0718]	<400>	48														
[0719]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Met	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[0720]	1				5					10					15	
[0721]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	His	Glu	Ile	Ser	Gly	Tyr
[0722]				20					25					30		
[0723]	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gly	Val	Ile	Lys	Arg	Leu	Ile
[0724]			35					40					45			
[0725]	Asn	Ala	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[0726]		50					55					60				
[0727]	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
[0728]	65					70					75					80
[0729]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Ser	Ser	Tyr	Pro	Trp
[0730]					85					90					95	
[0731]	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
[0732]				100						105						
[0733]	<210>	49														
[0734]	<211>	107														
[0735]	<212>	PRT														
[0736]	<213>	人工序列														
[0737]	<400>	49														
[0738]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ala	Met	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[0739]	1				5					10					15	
[0740]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	His	Glu	Ile	Ser	Gly	Tyr

[0741]	20	25	30
[0742]	Leu Ser Trp Ile Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile		
[0743]	35	40	45
[0744]	Asn Ala Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0745]	50	55	60
[0746]	Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0747]	65	70	75
[0748]	Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp		
[0749]	85	90	95
[0750]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0751]	100	105	
[0752]	<210> 50		
[0753]	<211> 107		
[0754]	<212> PRT		
[0755]	<213> 人工序列		
[0756]	<400> 50		
[0757]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly		
[0758]	1	5	10
[0759]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser His Glu Ile Ser Gly Tyr		
[0760]	20	25	30
[0761]	Leu Ser Trp Ile Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile		
[0762]	35	40	45
[0763]	Asn Ala Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0764]	50	55	60
[0765]	Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0766]	65	70	75
[0767]	Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp		
[0768]	85	90	95
[0769]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0770]	100	105	
[0771]	<210> 51		
[0772]	<211> 107		
[0773]	<212> PRT		
[0774]	<213> 人工序列		
[0775]	<400> 51		
[0776]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly		
[0777]	1	5	10
[0778]	Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser His Glu Ile Ser Gly Tyr		
[0779]	20	25	30

[0780]	Leu Ser Trp Ile Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
[0781]	35 40 45
[0782]	Asn Ala Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[0783]	50 55 60
[0784]	Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[0785]	65 70 75 80
[0786]	Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp
[0787]	85 90 95
[0788]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0789]	100 105
[0790]	<210> 52
[0791]	<211> 121
[0792]	<212> PRT
[0793]	<213> 人工序列
[0794]	<400> 52
[0795]	Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0796]	1 5 10 15
[0797]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[0798]	20 25 30
[0799]	Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
[0800]	35 40 45
[0801]	Ala Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Asp Ser Thr Phe Tyr Pro Asp Thr Val
[0802]	50 55 60
[0803]	Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
[0804]	65 70 75 80
[0805]	Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0806]	85 90 95
[0807]	Ala Arg Pro Ala Pro Ser Ala His Ser Tyr Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
[0808]	100 105 110
[0809]	Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[0810]	115 120
[0811]	<210> 53
[0812]	<211> 107
[0813]	<212> PRT
[0814]	<213> 人工序列
[0815]	<400> 53
[0816]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
[0817]	1 5 10 15
[0818]	Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

[0819]	20	25	30
[0820]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile		
[0821]	35	40	45
[0822]	Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Leu Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0823]	50	55	60
[0824]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln		
[0825]	65	70	75
[0826]	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys Thr Leu Pro Phe		
[0827]	85	90	95
[0828]	Thr Phe Ala Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0829]	100	105	
[0830]	<210> 54		
[0831]	<211> 115		
[0832]	<212> PRT		
[0833]	<213> 人工序列		
[0834]	<400> 54		
[0835]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0836]	1	5	10
[0837]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr		
[0838]	20	25	30
[0839]	Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0840]	35	40	45
[0841]	Gly Gly Ile Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe		
[0842]	50	55	60
[0843]	Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0844]	65	70	75
[0845]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0846]	85	90	95
[0847]	Thr Arg His Gly Asn Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr		
[0848]	100	105	110
[0849]	Val Ser Ser		
[0850]	115		
[0851]	<210> 55		
[0852]	<211> 112		
[0853]	<212> PRT		
[0854]	<213> 人工序列		
[0855]	<400> 55		
[0856]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly		
[0857]	1	5	10

[0858]	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
[0859]				20				25					30			
[0860]	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
[0861]				35				40					45			
[0862]	Pro	Asn	His	Leu	Ile	Tyr	Gln	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro
[0863]				50				55					60			
[0864]	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
[0865]	65					70					75				80	
[0866]	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Thr
[0867]					85					90					95	
[0868]	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys
[0869]				100					105						110	
[0870]	<210> 56															
[0871]	<211> 118															
[0872]	<212> PRT															
[0873]	<213> 人工序列															
[0874]	<400> 56															
[0875]	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Ser	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
[0876]	1				5				10					15		
[0877]	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Asp	Ser	Val	Ser	Ser	Gly
[0878]					20				25					30		
[0879]	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Lys	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Tyr	Met
[0880]				35				40					45			
[0881]	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys
[0882]				50				55					60			
[0883]	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Tyr	Leu
[0884]	65					70					75				80	
[0885]	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala
[0886]					85					90					95	
[0887]	Arg	Phe	Arg	Arg	Tyr	Asp	Asp	Gly	Val	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
[0888]					100					105					110	
[0889]	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser										
[0890]					115											
[0891]	<210> 57															
[0892]	<211> 107															
[0893]	<212> PRT															
[0894]	<213> 人工序列															
[0895]	<400> 57															
[0896]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly

[0897]	1	5	10	15
[0898]	Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser His Glu Ile Ser Gly Tyr			
[0899]	20	25	30	
[0900]	Leu Ser Trp Ile Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile			
[0901]	35	40	45	
[0902]	Asn Ala Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly			
[0903]	50	55	60	
[0904]	Ser Arg Ser Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ser			
[0905]	65	70	75	80
[0906]	Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp			
[0907]	85	90	95	
[0908]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0909]	100	105		

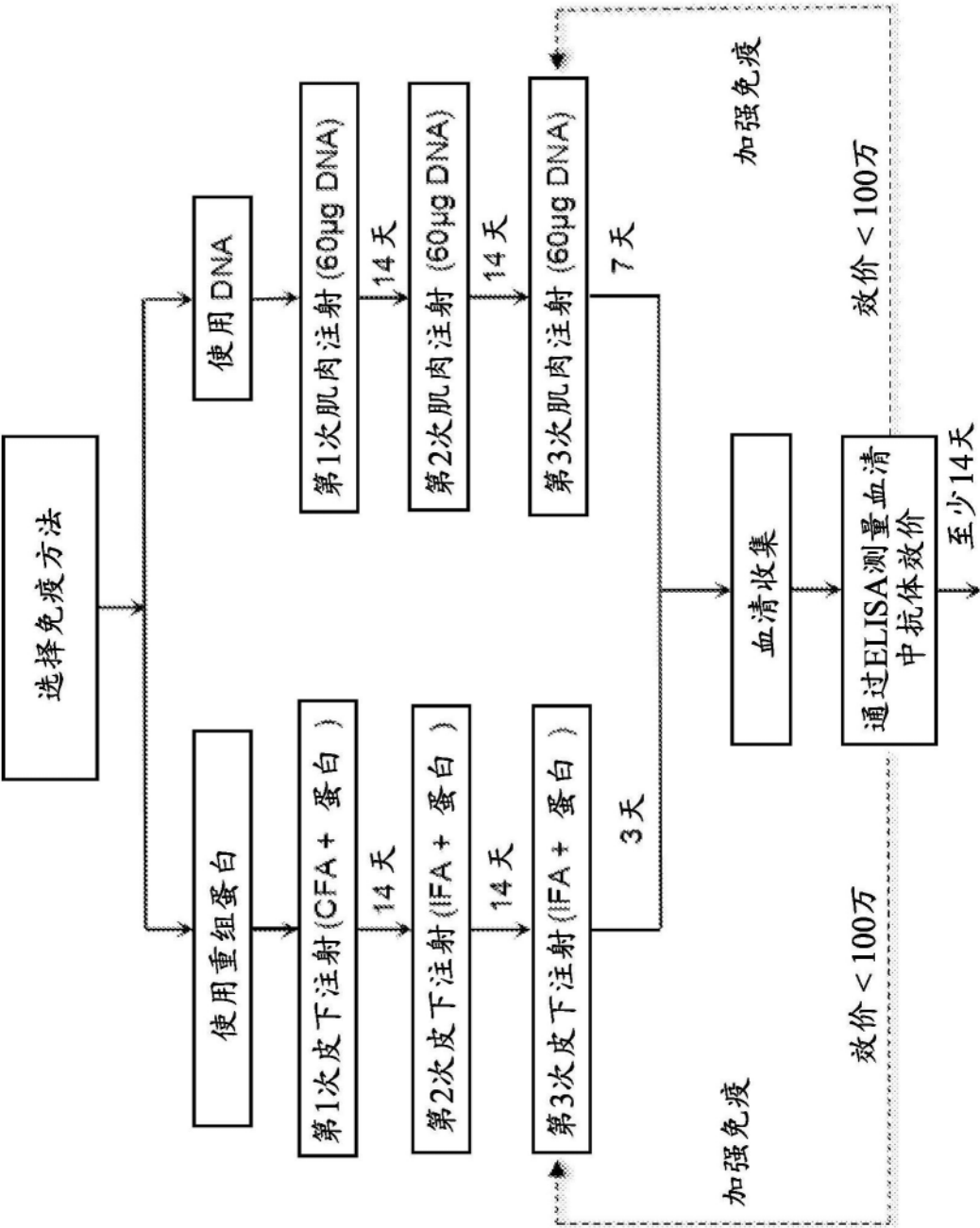


图1

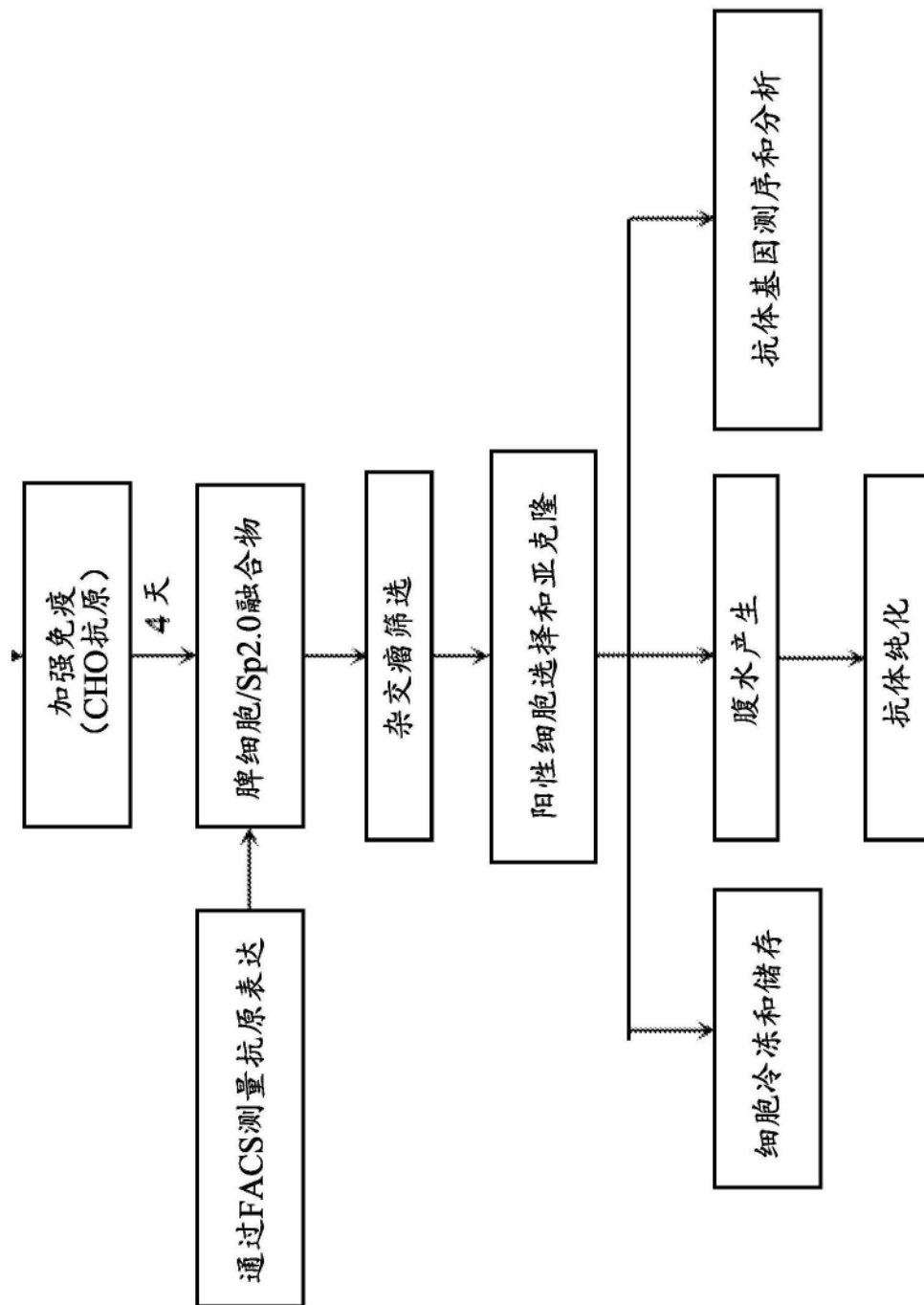


图2

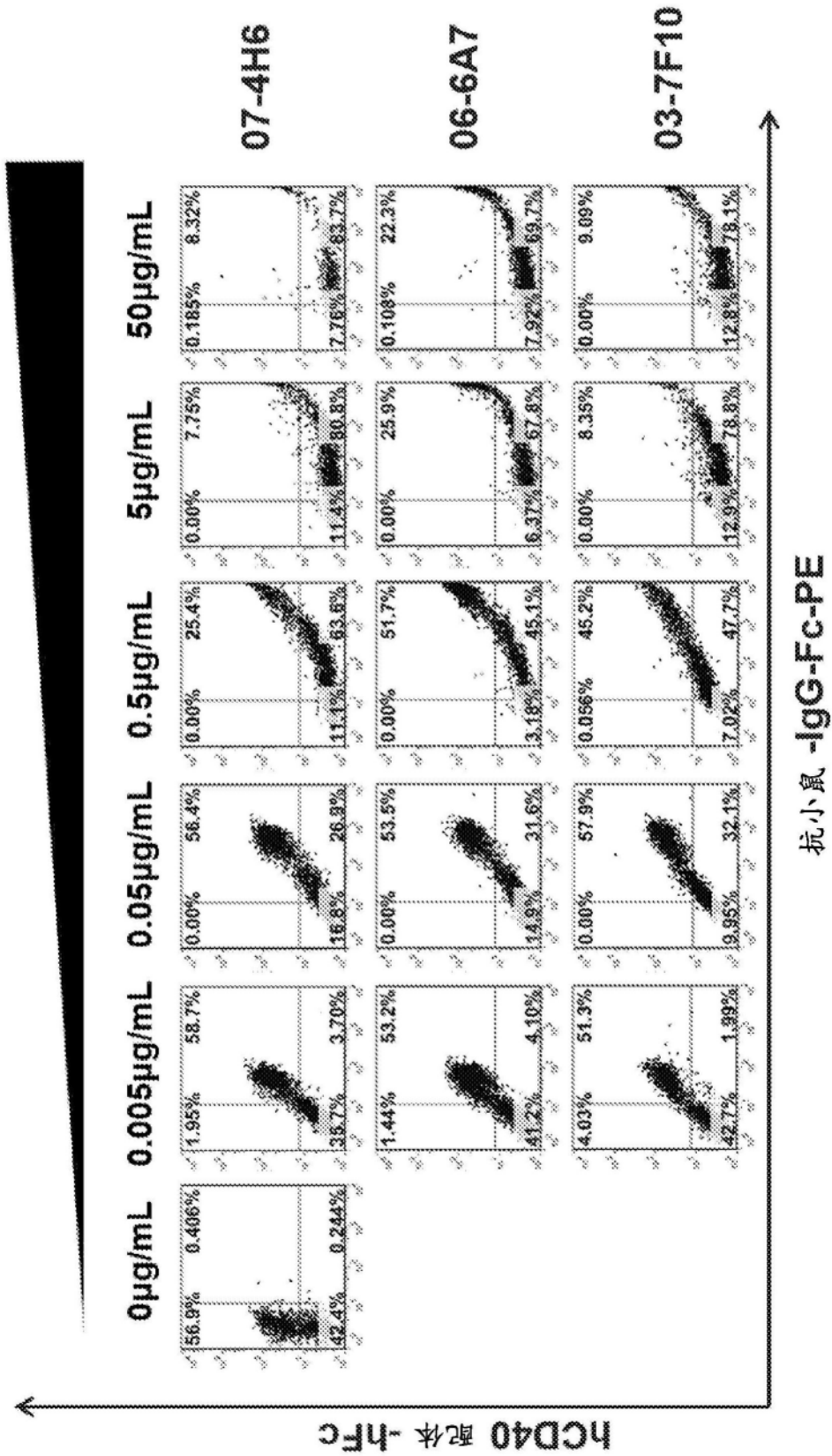


图3

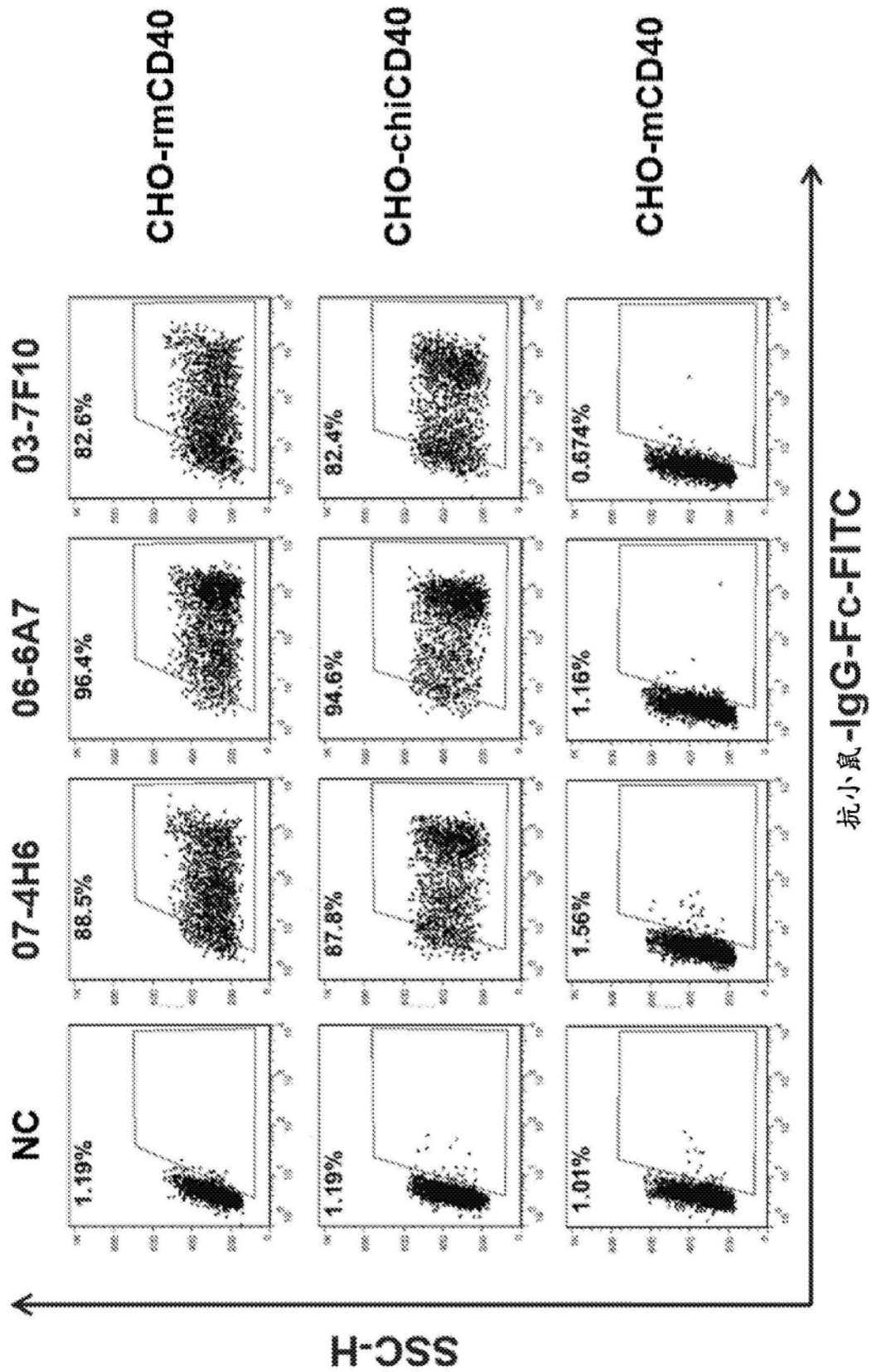


图4

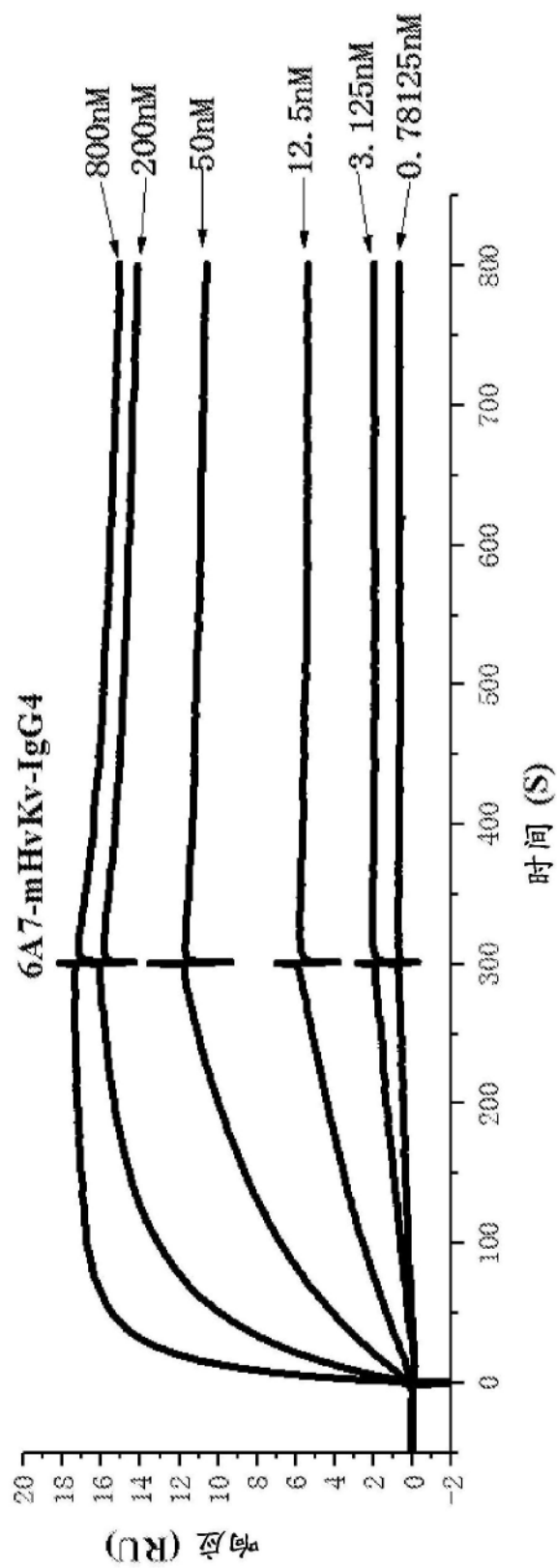


图5

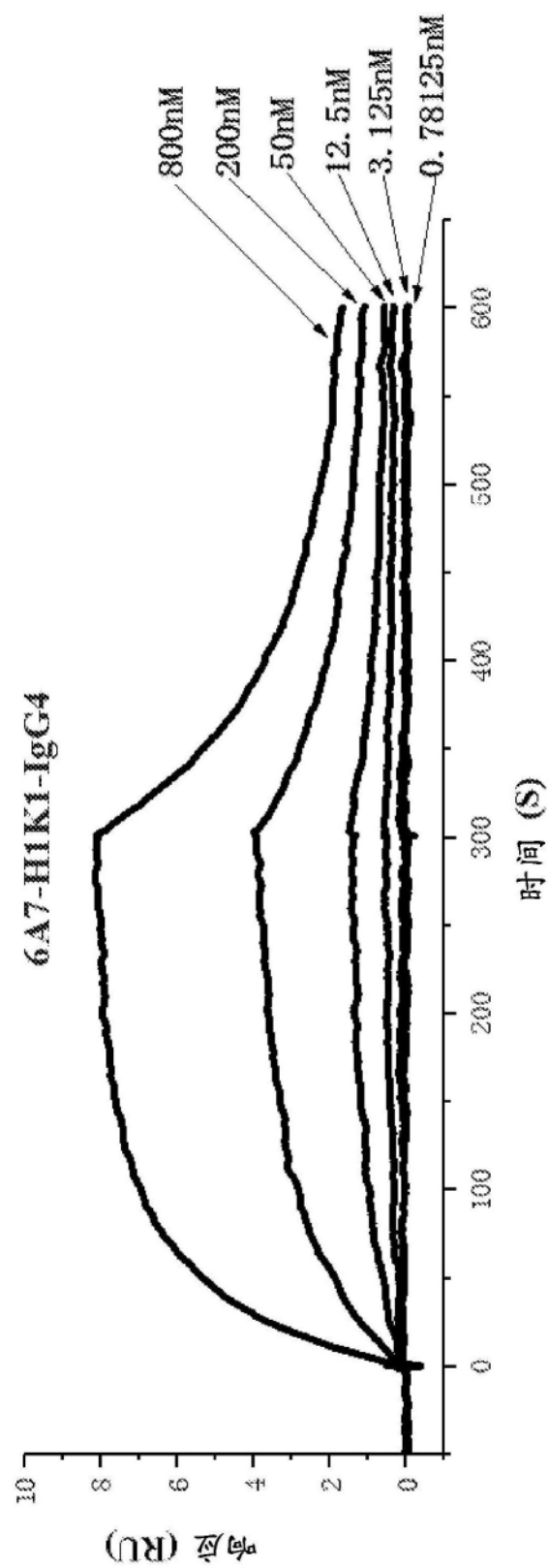


图6

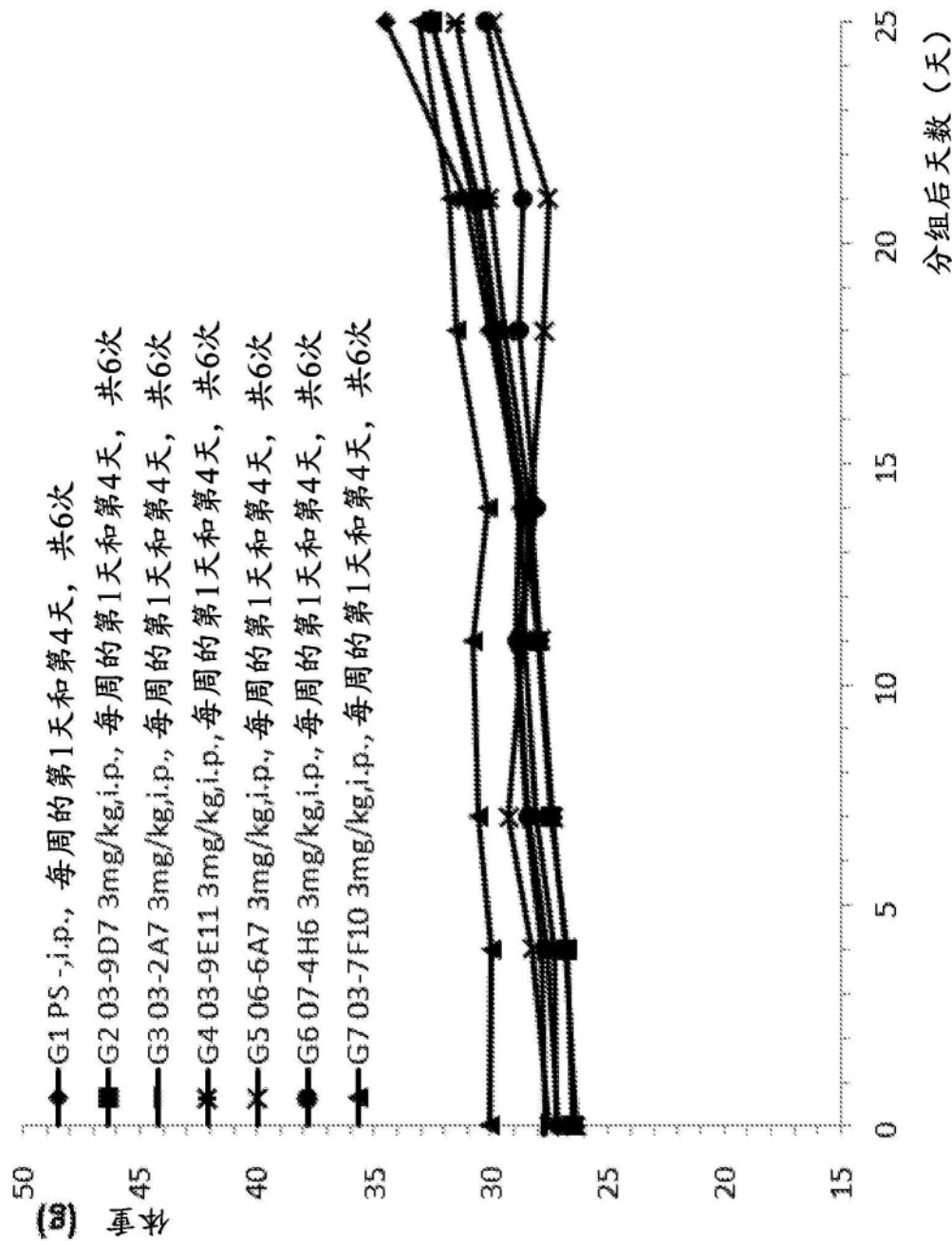


图7

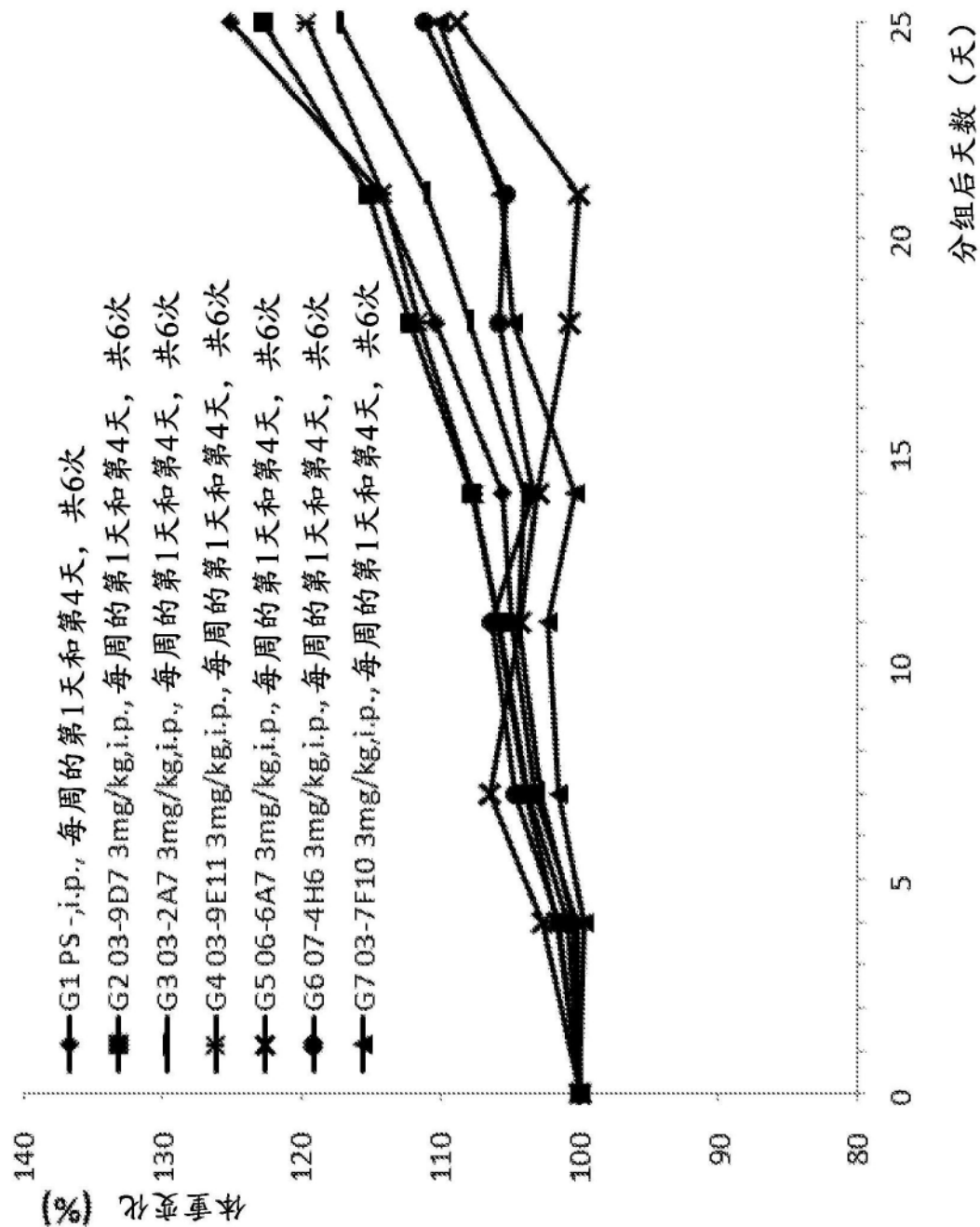


图8

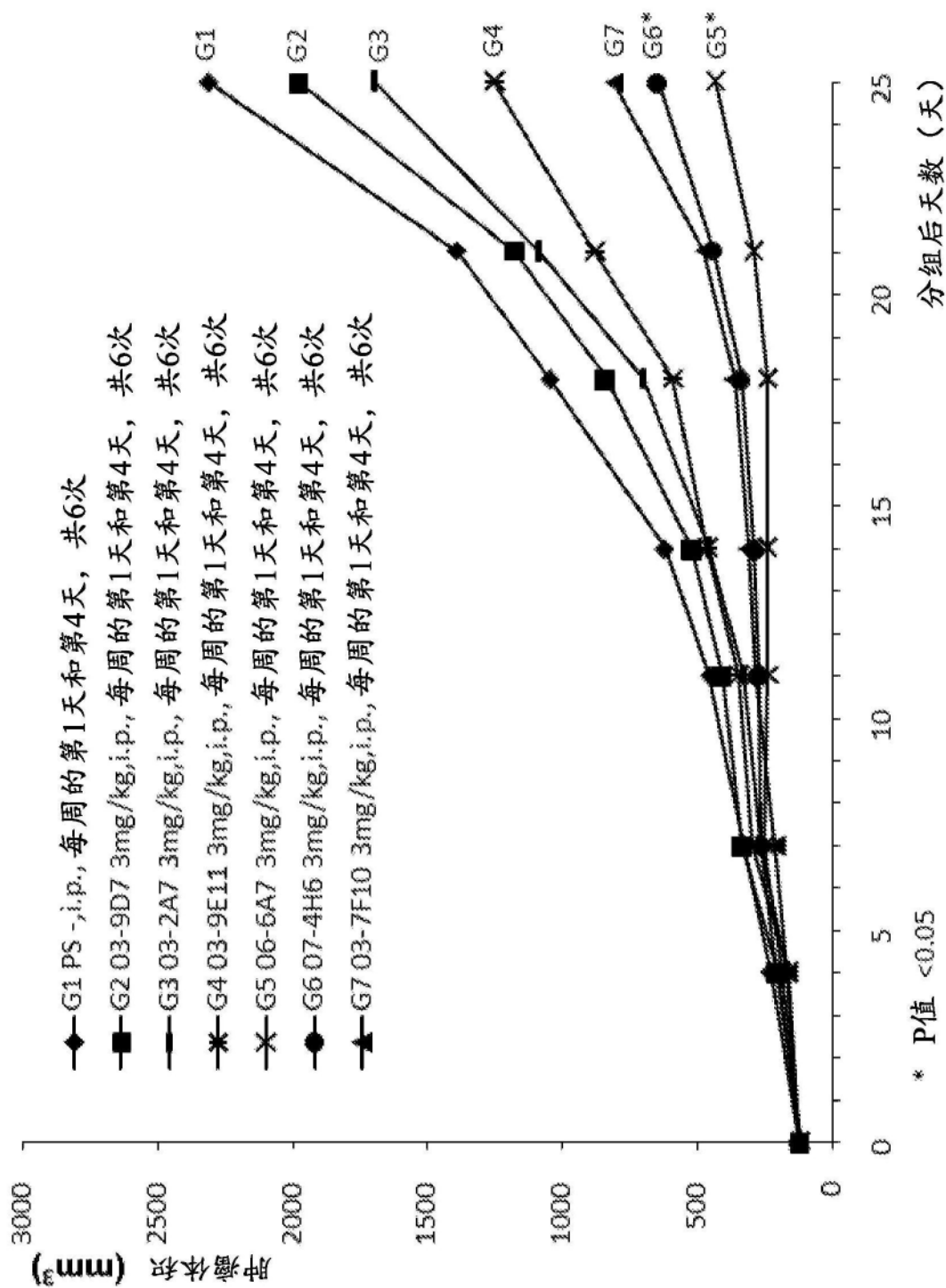


图9

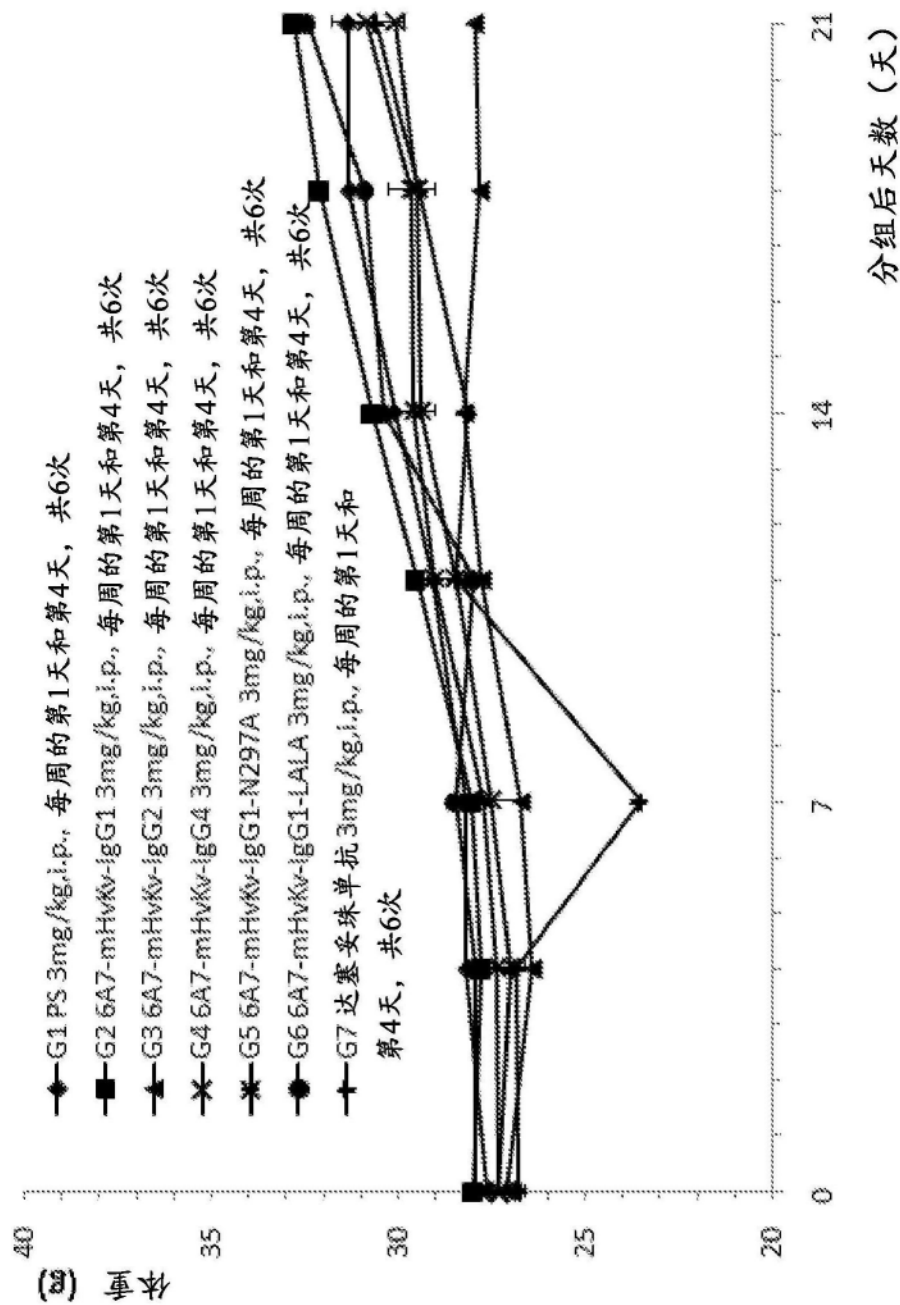


图10

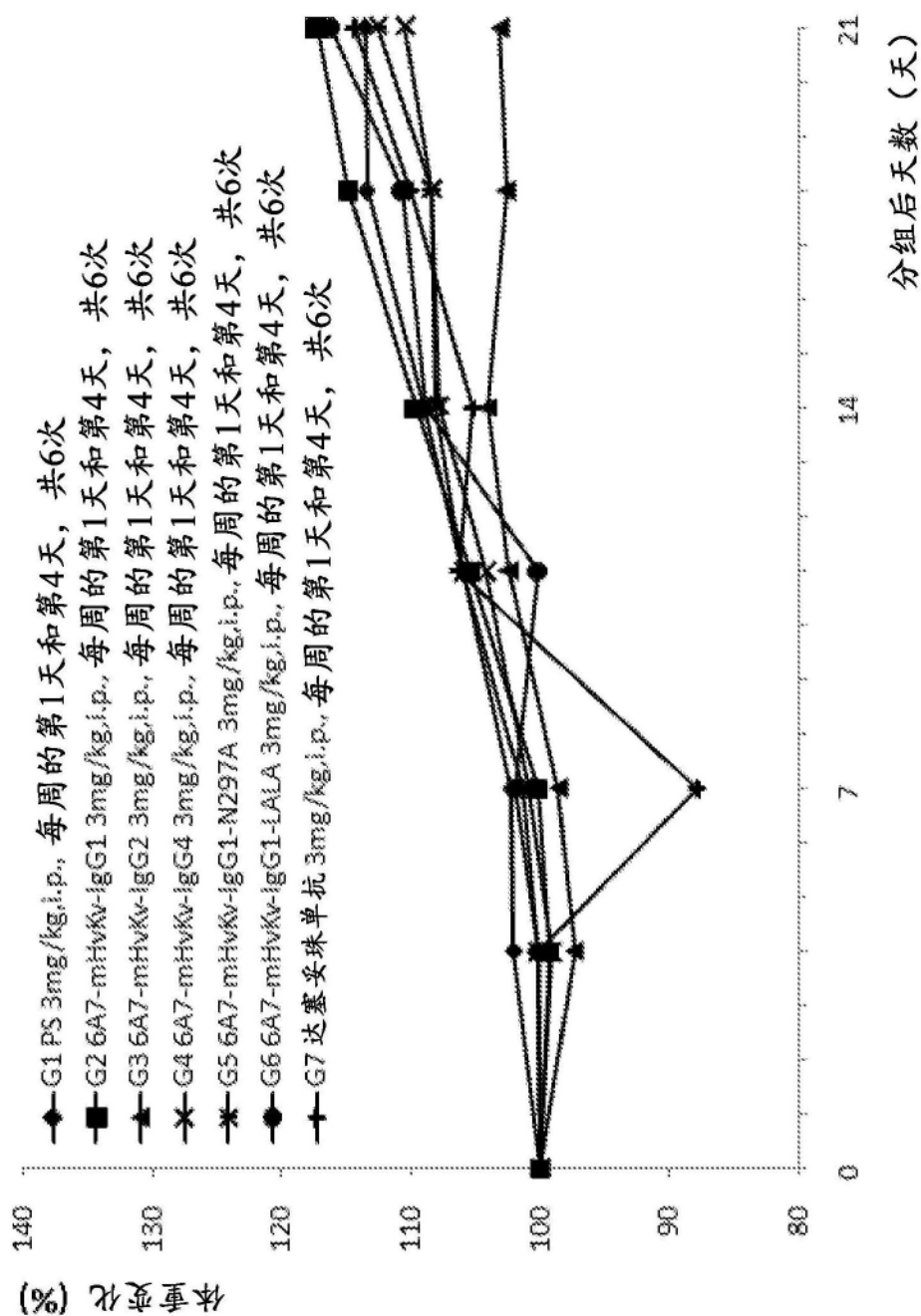


图11

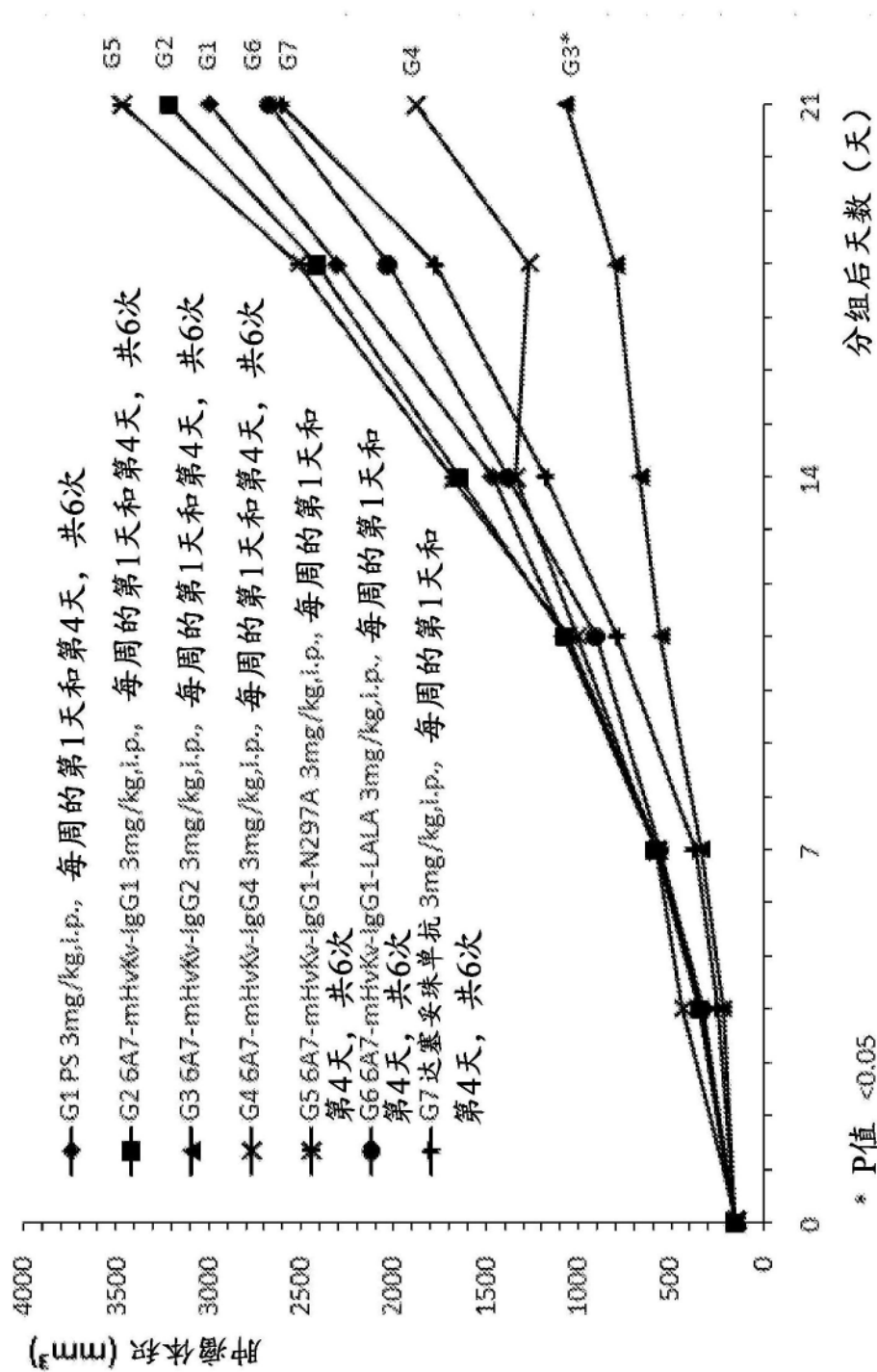


图12

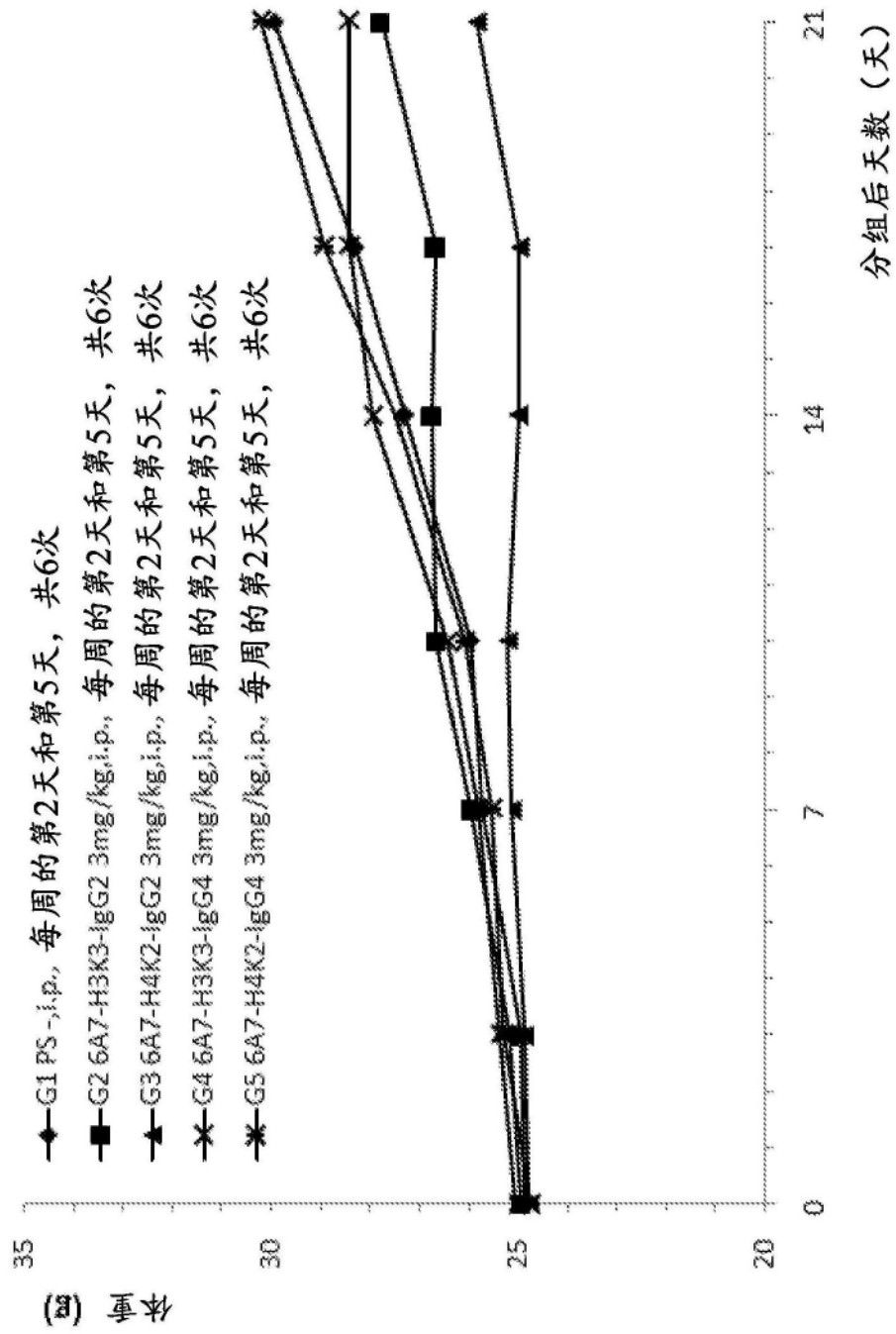


图13

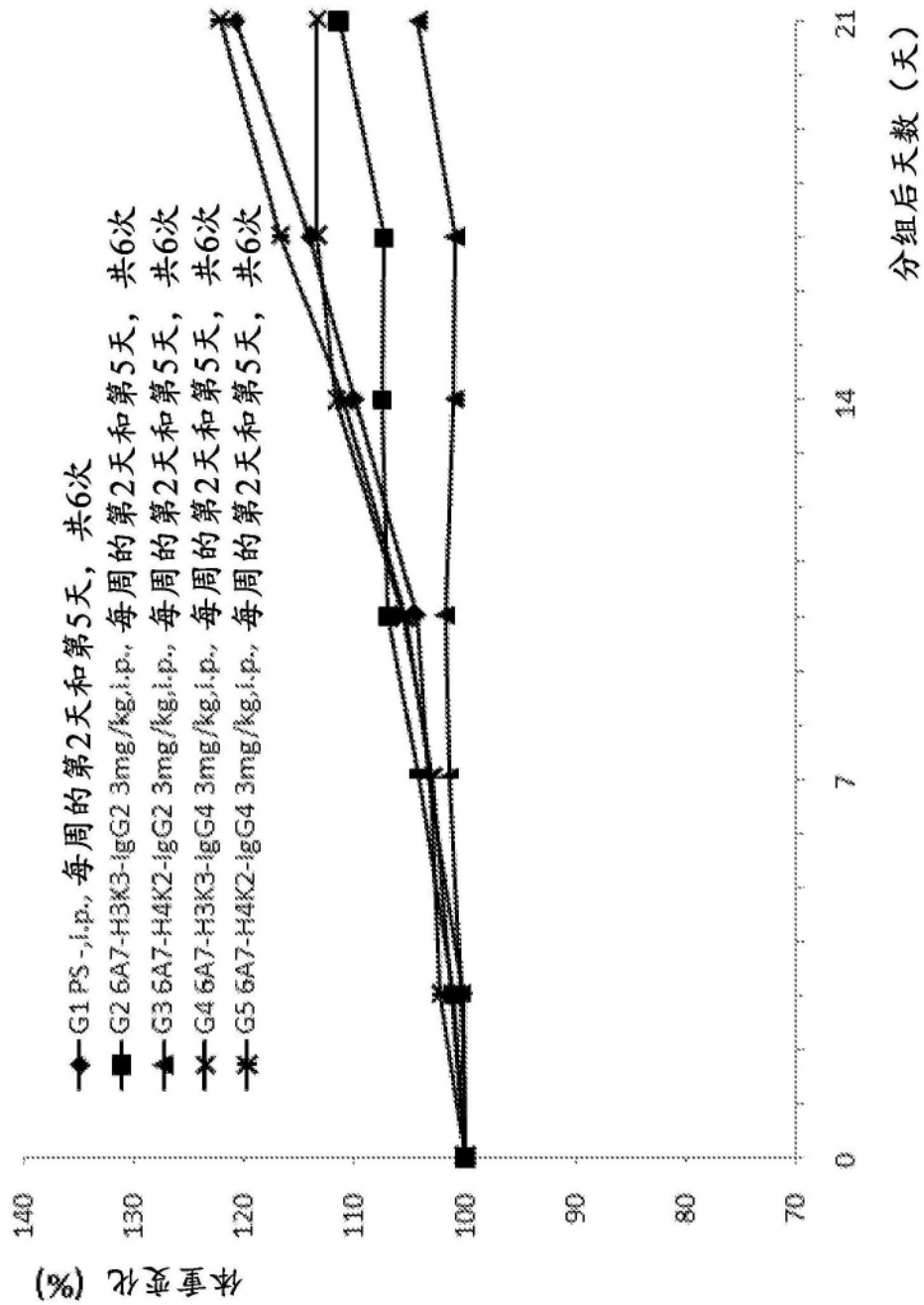


图14

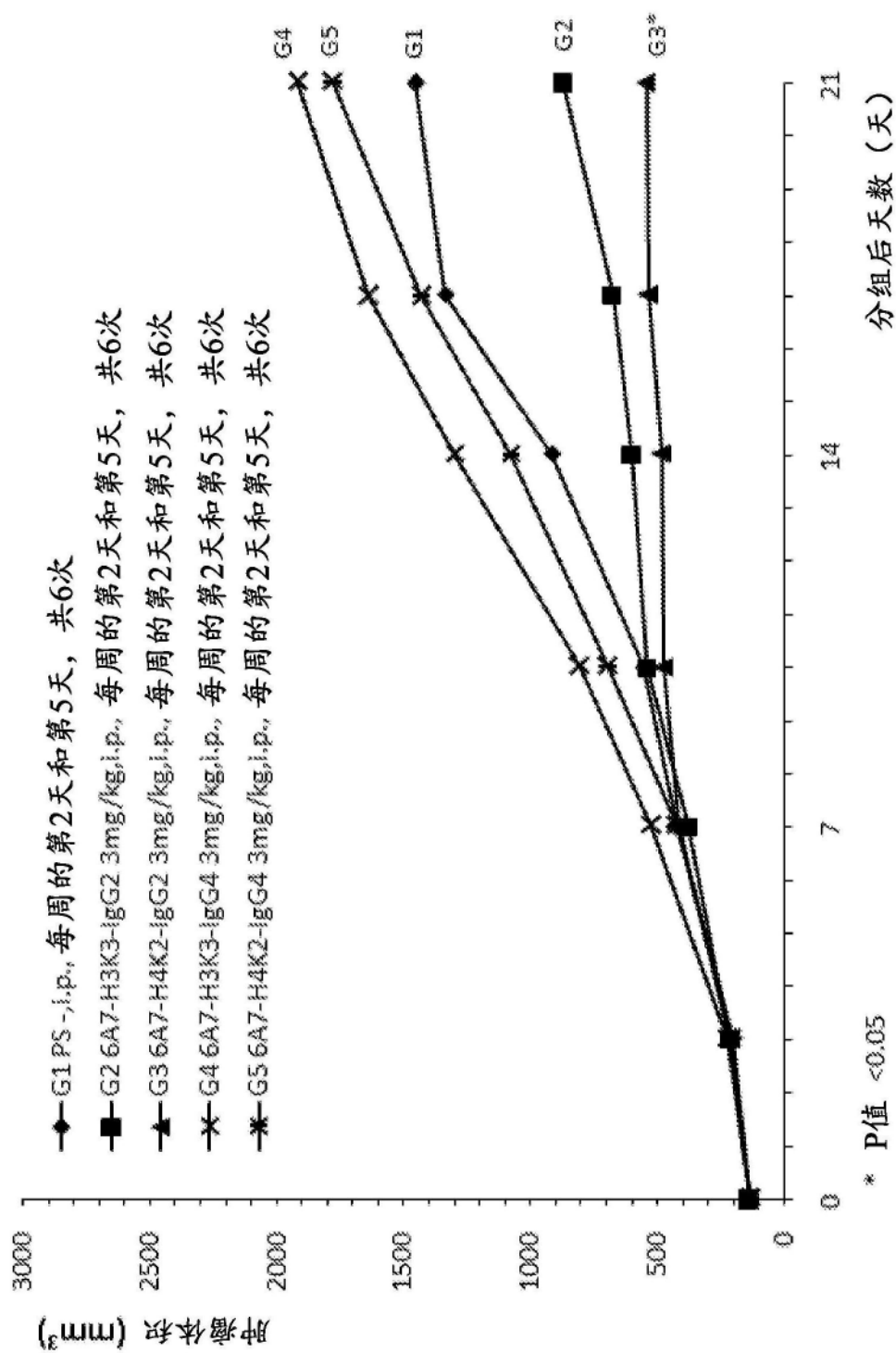


图15

Kabat CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
03-7F10 或人源化 03-7F10	DYYM Y	1	YISYGGDSTFYPD TVRG	2	PAPSAHSYV LDY	3	RASQDISNYLN	4	YYTSRLHS	5	QQGKTLP FT	6
06-6A7 或人源化 06-6A7	SYVIY	7	GINPRNGGTNFN EKFKS	8	HGNGVY	9	RSSQSLLHSNG NTYLH	10	QVSNRES	11	SQTTHVP WT	12
07-4H6 或人源化 07-4H6	SGYW N	13	FISYSGSTYYTPSL KS	14	FRRYDDGVD Y	15	RASHEISGYLS	16	AASTLAS	17	LQYSSYP WT	18

图16

Chothia CDR

Ab	VH CDR1	SEQ ID:	VH CDR2	SEQ ID:	VH CDR3	SEQ ID:	VL CDR1	SEQ ID:	VL CDR2	SEQ ID:	VL CDR3	SEQ ID:
03-7F10 或人源化 03-7F10	GTFFSD YYMY	19	SYGGDS	20	PAPSAHSYY LDY	3	RASQDISNYLN	4	YTSRLHS	21	QQGKTLP FT	6
06-6A7 或人源化 06-6A7	GYTFISY YIY	22	NPRNGG	23	HGNGVY	9	RSSQSLLSHNG NTYLH	10	QVSNRFS	11	SQTTHVP WT	12
07-4H6 或人源化 07-4H6	GDSVSS GYWN	24	SYSGS	25	FRRYDDGVD Y	15	RASHEISGYLS	16	AASTLAS	17	LQYSSYP WT	18

图17

蛋白质	氨基酸序列	SEQ ID NO:
人 CD40 (hCD40) NP_001241.1	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTETETEC LPCGESEFL DTWNRETHCHQH K YCDPNLGLRVQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESC V LHRSCSPGFGVKQIAT GVSDTICEPCPVGFFSNVSSAF EKCHPWTSCETKDLVVQAGTNKTDVVC GPQDR L RALVVIPIIFGI LFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEI NFPDDLPGSNTAAPVQETLHG CQPV TQEDGKESRIS VQERQ	26
小鼠 CD40 (mCD40) NP_035741.2	MVSLPRLCALWGCLLTAVHLGQCVTCSDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSHCTALEKTQCHPCDSGEFS AQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAE S DTVCTCKEGQHCTSKDCEACAQHTPCIPGFGVMEMAT ETTDTVCHPCPVGFFSNQSSLF EKCYPWTSCEDKNLEVLQKGT SQTNNVICGLKSRMRALLVIPVVMGI LITIFGVFLYIKKVVKPKDNEILPPAARRQDPQEMEDYPGHNTAAPVQETLHG CQPV TQEDGKESRI SVQERQVTD SIALRPLV	27
猴 CD40 (rmCD40) NP_001252791.1	MVRLPLQCVL WGCLLTAVYP EPPTACREKQ YLINSQCCSL CQPGQKLVS D CTEFTETEC L PCSESEFLDT WNRETRCHQH KYCDPNLGLR VQKGTSETD TICTCEEGLH CMSESCESC V PHRSCLPGFG VKQIATGVSD TICEPCPVGF FSNVSSAF EK CRPWTSCETK DLVVQQAGTN KTDVVCGPQD RQRALVVIPI CLGILFVILL LVLVFIKKVA KKPNDKAPHP KQEPQEI NFL DDLPGSNPAA PVQETLHG CQ PV TQEDGKES RISVQERQ	28
嵌合 (chiCD40) (人源化 CD40)	MVSLPRLCALWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTETETEC LPCGESEFL DTWNRETHCHQH K YCDPNLGLRVQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESC V LHRSCSPGFGVKQIAT GVSDTICEPCPVGFFSNVSSAF EKCHPWTSCETKDLVVQAGTNKTDVVC GPQDR L RALVVIPIVVMGI LITIFGVFLYIKKVVKPKDNEILPPAARRQDPQEMEDYPGHNTAAPVQETLHG CQPV TQEDGKESRI SVQERQVTD SIALRPLV	29

图18

人源化抗体可变结构域	说明	氨基酸序列	SEQ ID NO:
基于7F10的人源化重链可变结构域(H1)	HuVHv1: 人源化百分比 84.7%; 不是与人和食蟹猴的最高命中	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYYMYWVRQAPGK RLEWVAIYISYGGDSTFYPDYVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSL RAEDTAVYYCARPAPSAHSYYLDYWGQGTLTSSVSS	30
基于7F10的人源化重链可变结构域(H2)	HuVHv2: 人源化百分比 82.7%; 不是与人和食蟹猴的最高命中	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYYMYWVRQAPGK RLEWVAIYISYGGDSTFYPDYVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSSL KAEDTAVYYCARPAPSAHSYYLDYWGQGTLTSSVSS	31
基于7F10的人源化重链可变结构域(H3)	HuVHv3: 人源化百分比 78.6%; 不是与人和食蟹猴的最高命中	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYYMYWVRQAPGK RLEWVAIYISYGGDSTFYPDYVRGRFTISRDNAKNALYLQMSRL KAEDTAVYYCARPAPSAHSYYLDYWGQGTLTSSVSS	32
基于7F10的人源化轻链可变结构域(K1)	HuVLv1: 85.3%; 与人和食蟹猴的最高命中	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDISNYLNWYQQKPGGA VKLLIYYTSRLHSGLPFRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDDIATY YCQQGKTLPTTFASGTKLEIK	33
基于7F10的人源化轻链可变结构域(K2)	HuVLv2: 人源化百分比 84.2%; 不是与人和食蟹猴的最高命中	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDISNYLNWYQQKPGGA VKLLIYYTSRLHSGLPFRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDDIATY YCQQGKTLPTTFASGTKLEIK	34
基于7F10的人源化轻链可变结构域(K3)	HuVLv3: 人源化百分比 82.1%; 不是与人和食蟹猴的最高命中	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDISNYLNWYQQKPGGA VKLLIYYTSRLHSGLPFRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDDIATY YCQQGKTLPTTFASGTKLEIK	35
基于7F10的人源化轻链可变结构域(K4)	HuVLv4: 人源化百分比 80%; 不是与人和食蟹猴的最高命中	DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDISNYLNWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGLPFRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDDIATY YCQQGKTLPTTFASGTKLEIK	36

图19

人源化抗体可变结构域	说明	氨基酸序列	SEQ ID NO:
基于6A7的人源化重链可变结构域(H1)	HuVHv1: 人源化百分比 84.7%; 与人和食蟹猴的最高命中	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFISYIYWVRQAPGQ GLEWMGGINPRNGGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMELSRL RSEDTAVYYCARHGNGVYWGQGTITVTVSS	37
基于6A7的人源化重链可变结构域(H2)	HuVHv2: 人源化百分比 82.7%; 与人和食蟹猴的最高命中	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFISYIYWVRQAPGQ GLEWIGGINPRNGGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMELSRL RSEDTAVYYCARHGNGVYWGQGTITVTVSS	38
基于6A7的人源化重链可变结构域(H3)	HuVHv3: 人源化百分比 81.6%; 与人和食蟹猴的最高命中	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFISYIYWVRQAPGQ GLEWIGGINPRNGGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMELSRL RSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTITVTVSS	39
基于6A7的人源化重链可变结构域(H4)	HuVHv4: 人源化百分比 79.6%; 与人和食蟹猴的最高命中	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLCKASGYTFISYIYWVRQAPGQ GLEWIGGINPRNGGTNFNEKFKSRATLTVDTSISTAYMELSRL RSEDTAVYYCTRHGNGVYWGQGTITVTVSS	40
基于6A7的人源化轻链可变结构域(K1)	HuVLv1: 人源化百分比 91%; 与人和食蟹猴的最高命中	DVVMTQsPLSLPVTLGpASISCRSSQSLHNSNGNTYLHWfQQ rPGQSPrHLIYQVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DvGVYyCSQTTTHVPWTFGGGTkVEIK	41
基于6A7的人源化轻链可变结构域(K2)	HuVLv2: 人源化百分比 88%; 不是与人和食蟹猴的最高命中	DVVMTQsPLSLPVTLGpASISCRSSQSLHNSNGNTYLHWYQQ rPGQSPNHLIYQVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGvYfCSQTTTHVPWTFGGGTkVEIK	42
基于6A7的人源化轻链可变结构域(K3)	HuVLv3: 人源化百分比 87%; 不是与人和食蟹猴的最高命中	DVVMTQsPLSLPVTLGDPASISCRSSQSLHNSNGNTYLHWYQQ rPGQSPNHLIYQVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGvYfCSQTTTHVPWTFGGGTkLEIK	43

图20

人源化抗体可变结构域	说明	氨基酸序列	SEQ ID NO:
基于4H6的人源化重链可变结构域(H1)	HuVHv1: 人源化百分比 88.9%; 与人和食蟹猴的最高命中	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVSGDSVSSGYWNWIRKHPG KKLEWIGFISYSGSTYYTPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARFRYYDDGVDYWGQGLVTVSS	44
基于4H6的人源化重链可变结构域(H2)	HuVHv2: 人源化百分比 87.9%; 与人和食蟹猴的最高命中	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVSGDSVSSGYWNWIRKHPG KKLEWIGFISYSGSTYYTPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARFRYYDDGVDYWGQGLVTVSS	45
基于4H6的人源化重链可变结构域(H3)	HuVHv3: 人源化百分比 83.8%; 与人和食蟹猴的最高命中	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVSGDSVSSGYWNWIRKHPG KKLEYMGFISYSGSTYYTPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYFCARFRYYDDGVDYWGQGLVTVSS	46
基于4H6的人源化重链可变结构域(H4)	HuVHv4: 人源化百分比 82.8%; 与人和食蟹猴的最高命中	EVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCTVSGDSVSSGYWNWIRKFPF KKLEYMGFISYSGSTYYTPSLKSRITISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYFCARFRYYDDGVDYWGQGLVTVSS	47
基于4H6的人源化轻链可变结构域(K1)	HuVLv1: 人源化百分比 87.4%; 与人和食蟹猴的最高命中	DIQMTQSPSAMSASvGdRVtiTCRASHEISGYLSWfQQKPgG vIKRLINAAASTLASGVPSRFSGSRSGtEftLTIsSLqpEDFA tYYCLQYSSYPWTFGGGTKLEIK	48
基于4H6的人源化轻链可变结构域(K2)	HuVLv2: 人源化百分比 84.2%; 与人和食蟹猴的最高命中	DIQMTQSPSAMSASVGDRTVITCRASHEISGYLSWIQQKPGG TIKRLINAAASTLASGVPSRFSGSRSGTEFTLTISSLQPEDFA DYYCLQYSSYPWTFGGGTKLEIK	49
基于4H6的人源化轻链可变结构域(K3)	HuVLv3: 人源化百分比 83.2%; 与人和食蟹猴的最高命中	DIQMTQSPSAMSASVGDRTVITCRASHEISGYLSWIQQKPGG TIKRLINAAASTLASGVPSRFSGSRSGTEYTLTISSLQPEDFA DYYCLQYSSYPWTFGGGTKLEIK	50
基于4H6的人源化轻链可变结构域(K4)	HuVLv4: 人源化百分比 82.1%; 不是与人和食蟹猴的最高命中	DIQMTQSPSAMSASVGDRTVITCRASHEISGYLSWIQQKPGG TIKRLINAAASTLASGVPSRFSGSRSGTEYTLTISSLQPEDFA DYYCLQYSSYPWTFGGGTKLEIK	51

图21

03-7F10 ("7F10") **重链可变区** (SEQ ID NO: 52)
 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSKATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVAYISYGGDSTFYPDIVRGRFTISRDNAKNALYLQMSRLKSEDTAVYYCAR
 PPSAHSYYLDYWGGTTLTVSS

03-7F10 ("7F10") **轻链可变区** (SEQ ID NO: 53)
 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTIVKLLIYYTSRLHSGLPSPRFSGGSGGTDYSLTISNLEQEDIAIYYCQQGKTLPTTF
 ASGTKLEIK

06-6A7 ("6A7") **重链可变区** (SEQ ID NO: 54)
 QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFISYYIYWVKQRPQGQGLEWIGGINPRNGGTNFEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSLTSSEDSAVYYCTR
 HNGVYWGQGTTLTVSS

06-6A7 ("6A7") **轻链可变区** (SEQ ID NO: 55)
 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLHHSNGNTYLNHWYLVKQPGQSPNHLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTTH
 VPWTFGGGTKLEIK

07-4H6 ("4H6") **重链可变区** (SEQ ID NO: 56)
 EVKLQESGPSLVKPSQTLTLTCSVTGDSVSSGYWNWIRKFPGNKLEYMGFISYSGSTYYTPSLKSRISITRDTSKNQFYQLNSVTTEDTATYFCARF
 RRYDDGVDYWGGTTLTVSS

07-4H6 ("4H6") **轻链可变区** (SEQ ID NO: 57)
 DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASHEISGYLSWVQQKPDGTIKRLINAASTLASGVPKRFSGSRGSEYSLTINSLESEDFADYYCLQYSSYPWTF
 GGGTKLEIK

图22