

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680050125.9

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 1 月 21 日

[11] 公开号 CN 101351478A

[22] 申请日 2006.11.1

[21] 申请号 200680050125.9

[30] 优先权

[32] 2005.11.1 [33] US [31] 60/732,580

[86] 国际申请 PCT/US2006/042601 2006.11.1

[87] 国际公布 WO2007/053661 英 2007.5.10

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.30

[71] 申请人 诺华有限公司

地址 瑞士巴塞尔

共同申请人 爱克索马技术有限公司

[72] 发明人 S·L·奥科曼 M·卢克曼

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 7 页 说明书 61 页 序列表 9 页
附图 22 页

[54] 发明名称

抗 CD40 抗体的应用

[57] 摘要

本发明提供了治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病患者的方法，其中所述病人是 Fc γ RIIIa - 158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F)。也提供了抑制 Fc γ RIIIa - 158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)的 B 细胞产生抗体的方法。所述方法包括给予所述病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体。也提供了鉴定患有可用抗 CD40 抗体治疗但对利妥昔单抗(利妥昔[®])不反应或难以治疗的炎性疾病或自身免疫病病人的方法和试剂盒，以及选择用于治疗患有对利妥昔单抗(利妥昔[®])不反应或难以治疗的炎性疾病或自身免疫病病人的抗体疗法的方法和试剂盒。本发明方法可用于治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病和自身免疫病。就与细胞同时表达 CD40 和 CD20 的炎性疾病和自身免疫病而言这些方法特别有利，因为该方法可治疗

患有对其它治疗剂如抗 - CD20 抗体不反应或难以治疗的炎性疾病或自身免疫病患者。

1. 一种治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病患者的方法，其中所述病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F)，所述方法包括给予所述病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述炎性疾病或自身免疫病选自：全身性红斑狼疮(SLE)，盘状狼疮，狼疮性肾炎，结节病，炎性关节炎，包括青少年关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、莱特尔综合征、强直性脊柱炎和痛风性关节炎，器官或组织移植排斥，超急性、急性或慢性排斥和/或移植物抗宿主病，多发性硬化，高 IgE 综合征，结节性多动脉炎，原发性胆汁性肝硬化，炎性肠病，克罗恩病，腹腔疾病(谷蛋白敏感性肠病)，自身免疫肝炎，恶性贫血，自身免疫溶血性贫血，银屑病，硬皮病，重症肌无力，自身免疫血小板减少性紫癜，自身免疫甲状腺炎，格雷夫斯病，桥本甲状腺炎，免疫复合物疾病，慢性疲劳免疫功能失调综合征(CFIDS)，多肌炎和皮炎，冷球蛋白血症，血栓溶解，心肌病，寻常型天疱疮，肺间质纤维化，I 型和 II 型糖尿病，1、2、3 和 4 型迟发型超敏，过敏或过敏病症，对治疗性蛋白质不良/不想要的免疫应答，哮喘，Churg-Strauss 综合征(过敏性肉芽肿病)，特应性皮炎，过敏性和刺激性接触性皮炎，荨麻疹，IgE-介导的过敏症，动脉粥样硬化症，脉管炎，先天炎性肌病，溶血性疾病，阿尔茨海默病和慢性炎性脱髓鞘多发神经病变，肺部炎症包括但不限于肺移植排斥，哮喘，结节病，肺气肿，囊性纤维变性，特发性肺纤维变性，慢性支气管炎，过敏性鼻炎和肺部的过敏性疾病，例如超敏性肺炎、嗜酸细胞性肺炎、由于骨髓和/或肺移植或其它原因导致的闭塞性支气管炎，移植动脉粥样硬化/移植静脉硬化，以及因胶原、血管和自身免疫病，如类风湿性关节炎和红斑狼疮导致的肺纤维化。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述炎性疾病或自身免疫病是细胞表达 CD20 的炎性疾病或自身免疫病。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述炎性疾病或自身免疫病是类风湿性关节炎、银屑病、全身性红斑狼疮、克罗恩病、重症肌无力、先天性血小板减少性紫癜或舍格伦综合征。

5. 如权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 所述炎性疾病或自身免疫病是多发性硬化、移植物排斥、移植物抗宿主病、阿尔茨海默病或糖尿病。

6. 如权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 所述炎性疾病或自身免疫病是细胞表达 CD40 和 CD20 二者的炎性疾病或自身免疫病。

7. 如权利要求 6 所述的方法, 其特征在于, 所述炎性疾病或自身免疫病是类风湿性关节炎、银屑病、全身性红斑狼疮、克罗恩病、重症肌无力、先天性血小板减少性紫癜或舍格伦综合征。

8. 如权利要求 6 所述的方法, 其特征在于, 所述炎性疾病或自身免疫病是多发性硬化、移植物排斥、移植物抗宿主病、阿尔茨海默病或糖尿病。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的方法, 其特征在于, 通过胃肠道外给药途径给予所述抗 CD40 抗体。

10. 如权利要求 6 所述的方法, 其特征在于, 静脉内或皮下给予所述抗 CD40 抗体。

11. 治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体在制备治疗 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)的细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病的药物中的应用。

12. 如权利要求 11 所述的应用, 其特征在于, 所述炎性疾病或自身免疫病选自全身性红斑狼疮(SLE), 盘状狼疮, 狼疮性肾炎, 结节病, 性关节炎, 包括青少年关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、莱特尔综合征、强直性脊柱炎和痛风性关节炎, 器官或组织移植排斥, 超急性、急性或慢性排斥和/或移植物抗宿主病, 多发性硬化, 高 IgE 综合征, 结节性多动脉炎, 原发性胆汁性肝硬化, 炎性肠病, 克罗恩病, 腹腔疾病(谷蛋白敏感性肠病), 自身免疫肝炎, 恶性贫血, 自身免疫溶血性贫血, 银屑病, 硬皮病, 重症肌无力, 自身免疫血小板减少性紫癜, 自身免疫甲状腺炎, 格雷夫斯病, 桥本甲状腺炎, 免疫复合物疾病, 慢性疲劳免疫功能失调综合征(CFIDS), 多肌炎和皮肌炎, 冷球蛋白血症, 血栓溶解, 心肌病, 寻常型天疱疮, 肺间质纤维化, I 型和 II 型糖尿病, 1、2、3 和 4 型迟发型超敏, 过敏或过敏病症, 对治疗性蛋白质不良/不想要的免疫应答, 哮喘, Churg-Strauss 综合征(过敏性肉芽肿病), 特应性皮炎, 过敏性和刺激性接触性皮炎, 荨麻疹, IgE-介导的过敏症, 动脉粥样硬化

症，脉管炎，先天炎性肌病，溶血性疾病，阿尔茨海默病和慢性炎性脱髓鞘多发神经病变，肺部炎症包括但不限于肺移植排斥，哮喘，结节病，肺气肿，囊性纤维变性，特发性肺纤维变性，慢性支气管炎，过敏性鼻炎和肺部的过敏性疾病，例如超敏性肺炎、嗜酸细胞性肺炎、由于骨髓和/或肺移植或其它原因导致的闭塞性支气管炎，移植动脉粥样硬化/移植静脉硬化，以及因胶原、血管和自身免疫病，如类风湿性关节炎和红斑狼疮导致的肺纤维化。

13. 如权利要求 11 所述的应用，其特征在于，所述炎性疾病或自身免疫病是细胞表达 CD20 的炎性疾病或自身免疫病。

14. 如权利要求 13 所述的应用，其特征在于，所述炎性疾病或自身免疫病是类风湿性关节炎、银屑病、全身性红斑狼疮、克罗恩病、重症肌无力、先天性血小板减少性紫癜或舍格伦综合征。

15. 如权利要求 13 所述的应用，其特征在于，多发性硬化、移植物排斥、移植物抗宿主病、阿尔茨海默病或糖尿病。

16. 如权利要求 13 所述的应用，其特征在于，所述炎性疾病或自身免疫病是细胞表达 CD40 和 CD20 二者的炎性疾病或自身免疫病。

17. 如权利要求 16 所述的应用，其特征在于，所述炎性疾病或自身免疫病是类风湿性关节炎、银屑病、全身性红斑狼疮、克罗恩病、重症肌无力、先天性血小板减少性紫癜或舍格伦综合征。

18. 如权利要求 16 所述的应用，其特征在于，多发性硬化、移植物排斥、移植物抗宿主病、阿尔茨海默病或糖尿病。

19. 如权利要求 11-18 中任一项所述的应用，其特征在于，配制所述药物，以便通过胃肠道外给药途径给药。

20. 如权利要求 19 所述的应用，其特征在于，配制所述药物，以便进行静脉内或皮下给药。

21. 一种抑制 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)的 B 细胞产生抗体的方法，所述方法包括给予所述病人有效量的抗 CD40 抗体。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述病人患有细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病。

23. 有效量的抗 CD40 抗体在制备抑制 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人

(基因型 V/F 或 F/F)的 B 细胞产生抗体的药物中的应用。

24. 如前述任一项权利要求所述的方法或应用,其特征在于,所述抗 CD40 抗体是人单克隆抗体。

25. 如权利要求 24 所述的方法或应用,其特征在于,所述人抗 CD40 单克隆抗体包含人 IgG1 重链恒定区。

26. 如权利要求 1-25 中任一项所述的方法或应用,其特征在于所述人 IgG1 包含 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列。

27. 如前述任一项权利要求所述的方法或应用,其特征在于,所述抗 CD40 抗体基本没有激动活性。

28. 如前述任一项权利要求所述的方法或应用,其特征在于,所述抗 CD40 抗体是 CD40 表达细胞的 CD40-CD40L 信号转导拮抗剂。

29. 如前述任一项权利要求所述的方法或应用,其特征在于,所述抗 CD40 抗体选自:

a)单克隆抗体 CHIR-12.12;

b)杂交瘤细胞系 12.12 产生的单克隆抗体;

c)包含选自以下氨基酸序列的单克隆抗体: SEQ ID NO:2 所示序列、SEQ ID NO:4 所示序列、SEQ ID NO:5 所示序列、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 所示序列以及 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:5 所示序列;

d)含有选自以下核苷酸序列的核酸分子编码的氨基酸序列的单克隆抗体: SEQ ID NO:1 所示序列、SEQ ID NO:3 所示序列以及 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 所示序列;

e)能够与杂交瘤细胞系 12.12 产生的单克隆抗体表位结合的单克隆抗体;

f)结合包含 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:9 所示人 CD40 序列残基 82-87 的表位的单克隆抗体;

g)结合包含 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:9 所示人 CD40 序列残基 82-89 的表位的单克隆抗体;

h)在竞争性结合试验中与单克隆抗体 CHIR-12.12 竞争的单克隆抗体;

i)前述项目 a)所述的单克隆抗体或前述项目 c)-h)中任一项所述的单克隆抗体,所述抗体是重组产生的; 和

j)作为前述项目 a)-i)中任一项所述单克隆抗体的抗原结合片段的单克隆抗体,所述片段保持了特异性结合人 CD40 抗原的能力。

30. 如权利要求 29 所述的方法和应用,其特征在于,所述抗 CD40 抗体是单克隆抗体 CHIR-12.12。

31. 如权利要求 29 所述的方法和应用,其特征在于,所述抗原结合片段选自 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段和单链 Fv 片段。

32. 一种鉴定可用抗 CD40 抗体治疗、但用利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的炎性疾病或自身免疫病病人的方法,所述方法包括:

a)鉴定患有细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病的病人; 和

b)测定所述病人的 FcγRIIIa-158 基因型(V/V、V/F 或 F/F);

如果所述病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F),则可用抗 CD40 抗体治疗所述炎性疾病和自身免疫病。

33. 一种选择用于治疗患有用利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的炎性疾病和自身免疫病病人的抗体疗法的方法,所述方法包括:

a)鉴定患有细胞表达 CD40 但用利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的炎性疾病和自身免疫病病人; 和

b)测定所述病人的 FcγRIIIa-158 基因型(V/V、V/F 或 F/F);

如果所述病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F),那么选择抗 CD40 抗体治疗所述炎性疾病和自身免疫病。

34. 如前述任一项权利要求所述的方法或应用,其特征在于,难以治疗所述病人的炎性疾病或自身免疫病。

35. 如权利要求 34 所述的方法,其特征在于,用抗 CD20 单克隆抗体难以治疗所述病人。

36. 如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,所述病人对抗 CD20 单克隆抗体治疗有抗性。

37. 如权利要求 35 所述的方法,其特征在于,所述病人对抗 CD20 单克隆抗体治疗无反应。

38. 如权利要求 35-37 中任一项所述的方法,其特征在于,所述抗 CD20 单克隆抗体是利妥昔单抗(利妥昔®)。

39. 一种鉴定患有可用抗 CD40 抗体治疗的炎性疾病或自身免疫病的病人的试剂盒, 其装有测定病人 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。

40. 一种选择治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病病人的抗体疗法的试剂盒, 其装有测定病人 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。

41. 如权利要求 39 或 40 所述的试剂盒, 其装有一种微阵列, 该微阵列包含长度为 10 个或更多个核苷酸且序列适合测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的至少一种探针。

42. 如权利要求 39 或 40 所述的试剂盒, 其装有适合用作在聚合酶催化下扩增编码 FcγRIIIa 氨基酸 158 的基因组区域的引物的寡核苷酸。

43. 如权利要求 39 或 40 所述的试剂盒, 其装有适合测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的一种或多种限制性酶。

44. 一种治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病病人的方法, 所述方法包括给予所述病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体, 给药后所述抗 CD40 抗体不被 CD40 表达细胞明显内化。

45. 一种治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病病人的方法, 所述方法包括给予所述病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体, 给药后所述抗 CD40 抗体保持基本均一地分布在 CD40 表达细胞表面上。

46. 一种治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病病人的方法, 所述方法包括给予所述病人抗 CD40 抗体, 给药后治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体存在于所述病人的 CD40 表达细胞表面上。

47. 如权利要求 1-31 或 44-46 中任一项所述的方法或应用, 其特征在于, 所述方法或应用通过病人表达 FcγRIIIa 的自然杀伤(NK)细胞对 CD40 表达细胞产生抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

48. 如权利要求 1-31 或 44-46 中任一项所述的方法或应用, 其特征在于, 在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)试验中所述抗 CD40 抗体的效能高于利妥昔单抗(利妥昔®), 所述试验包括在相关抗体存在下将 CD40 表达细胞和 CD20 表达细胞与分离的人自然杀伤(NK)细胞一起培育。

49. 如权利要求 1-31 或 44-46 中任一项所述的方法或应用, 其特征在于, 在全身性红斑狼疮(SLE)、多发性硬化、炎症和动脉硬化症、移植或阿尔茨海

默病模型中所述抗 CD40 抗体的效能高于利妥昔单抗(利妥昔®)。

50. 如权利要求 1-31 或 44-46 中任一项所述的方法或应用, 其特征在于, 所述抗 CD40 抗体与人 CD40 结合的亲和力(K_D)为至少约 10^{-6} M—至少约 10^{-12} M。

51. 如权利要求 1-31 或 44-46 中任一项所述的方法或应用, 其特征在于, 所述抗 CD40 抗体与人 FcγRIIIa-158V 结合的亲和力(K_D)为至少约 0.5 μM。

52. 如权利要求 1-31 或 44-46 中任一项所述的方法或应用, 其特征在于, 所述抗 CD40 抗体与人 FcγRIIIa-158F 结合的亲和力(K_D)为至少约 12 μM。

53. 如权利要求 1-31 或 44-46 中任一项所述的方法或应用, 其特征在于, 所述抗 CD40 抗体与人 FcγRIIIa-158V 结合的亲和力(K_D)为至少约 0.5 μM, 与人 FcγRIIIa-158F 结合的亲和力(K_D)为至少约 12 μM。

抗 CD40 抗体的应用

本发明涉及抗 CD40 抗体的新应用，具体是治疗细胞表达 CD40 的炎症疾病和自身免疫病。

发明背景

肿瘤坏死因子(TNF)家族的许多配体成员和其对应受体能通过诱导凋亡或提高细胞存活和增殖调节正常细胞的生长。凋亡信号与存活和增殖信号之间的这种平衡维持了正常的细胞稳态。迄今为止，鉴定了至少 26 种 TNF 家族受体和 18 种 TNF 家族配体。这些受体和配体的生物活性形式是自身组装的蛋白质三聚体。已经鉴定了这些受体和配体的跨膜和可溶形式。虽然这些受体的胞内域没有序列同源性，但其胞外结构域含有 40 个氨基酸，富含半胱氨酸的重复。它们的胞质尾通过与两类主要的胞内蛋白：TNF 受体相关因子(TRAF)和含死亡结构域(DD)的蛋白质相互作用而传递信号。至少六种人 TRAF 和一些受体胞质尾上的 TRAF-结合位点之间的相互作用启动了几种信号传导途径，包括 AKT(丝氨酸/苏氨酸激酶，称为蛋白激酶 B 或 PKB)、核因子- κ B(NF- κ B)和有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径。参见例如，Younes 和 Kadin (2003) *J Clin. Oncol.* 18:3526-3534 的综述。

TNF 受体家族成员 CD40 是 50-55 kDa 的细胞表面抗原，存在于正常和恶性人 B 细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、CD8+T 细胞、内皮细胞、以及单核细胞和表皮细胞的表面上。CD40 抗原也在活化 T 细胞、活化血小板、发炎的血管平滑肌细胞、嗜曙红细胞、类风湿性关节炎的滑膜、皮肤成纤维细胞和其它非淋巴细胞类型上表达。根据 CD40 表达细胞的类型，连接可诱导细胞间粘着、分化、活化和增殖。例如，CD40 与关联配体 CD40L(也称为 CD154)结合能刺激 B 细胞增殖并分化成浆细胞、抗体产生、同种型转换和产生 B 记忆细胞。在 B 细胞分化期间，CD40 在前 B 细胞上表达，但分化成浆细胞后丢失。

CD40 配体(CD40L)也称为 CD154，它是 32-33 kDa 跨膜蛋白，也分别以

两种较小的具有生物活性的可溶形式 18 kDa 和 31 kDa 存在(Graf 等(1995) *Eur. J. Immunol.* 25:1749-1754; Mazzei 等(1995) *J Biol. Chem.* 270:7025-7028; Pietravalle 等(1996) *J. Biol. Chem.* 271: 5965-5967)。CD40L 在活化、而非静息的 CD4+T-辅助细胞上表达(Lane 等(1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2573-2578; Spriggs 等(1992) *J Exp. Med.* 176:1543-1550; 和 Roy 等(1993) *J Immunol.* 151:1-14)。已经克隆和鉴定了 CD40 和 CD40L(Stamenkovi 等(1989) *EMBO J.* 8: 1403-1410; Armitage 等(1992) *Nature* 357:80-82; Lederman 等(1992) *J Exp. Med.* 175:1091-1101; 和 Hollenbaugh 等(1992) *EMBO J.* 11:4313-4321)。也参见美国专利号 5,945,513 对人 CD40L 的描述。用 CD40L 基因转染并且表面表达 CD40L 蛋白的细胞可引发 B-细胞增殖, 与其它刺激信号一起诱导产生抗体(Armitage 等(1992) 同上; 和美国专利号 5,945,513)。自身免疫病患者的可溶性 CD40L(sCD40L)血清水平升高, 而健康对象中没有这种现象。在啮齿动物模型中, CD40L 的过度表达引起类似于系统性红斑狼疮的自身免疫病(Higuchi 等(2002) *J Immunol.* 168:9-12)。相反, 活化 T 细胞上缺少功能性 CD40L 引起 X 连锁的高-IgM 综合征(Allen 等(1993) *Science* 259:990; 和 Korthauer 等(1993) *Nature* 361:539)。而且, 在非人灵长动物模型中阻断 CD40/CD40L 相互作用可防止移植物排斥反应。参见例如, Wee 等(1992) *Transplantation* 53: 501-7。

APC 上的 CD40 表达在激活这些细胞中起重要的协同刺激作用。例如, 拮抗性抗 CD40 单克隆抗体(mAb)显示在 B 细胞激活中可模拟 T 辅助细胞的作用。当存在于表达 FcγRII 的粘附细胞上时, 这些抗体可诱导 B 细胞增殖(Banchereau 等, (1989) *Science* 251: 70)。此外, 在存在 IL-4 时, 拮抗性抗 CD40mAb 可代替 T 辅助细胞信号引起 IgM、IgG 和 IgE 分泌(Gascan 等, (1991) *J Immunol.* 147:8)。另外, 拮抗性抗-CD40mAb 可防止分离自淋巴结的 B 细胞的程序性死亡(凋亡)。

这些和其它观察结果支持 CD40 和 CD40L 相互作用在调节体液和细胞介导的免疫应答中起着关键作用的当前理论。更新的研究表明 CD40/CD40L 相互作用在各种生理和病理过程中起着更广泛的作用。

CD40 信号转导途径依赖于许多胞内因子的协同调节。与 TNF 受体家族的其他成员一样, CD40 与 CD40L(膜结合性 CD40L 或可溶性 CD40L), 包括胞

外信号调节的激酶(ERK)、c-jun 氨基末端激酶(JNK)、p38 MAPK 和 NF- κ B 结合后,能激活 TRAF,包括 TRAF-2、-3、-5 和-6,它们能上调各种信号转导途径(参见例如, YOUNES 和 Carbone(1999) *Int. J. Biol. Markers* 14:135-143; van Kooten 和 Banchereau (2000) *J. Leukoc. Biol.* 67:2-17)。

经 CD40 的信号转导显示可防止细胞凋亡(Makus 等, (2002) *J. Immunol.* 14: 973-982)。凋亡信号以协同模式为诱导程序性细胞死亡所必需。细胞死亡信号包括细胞内的内部刺激,例如内质网应力或外来刺激,例如 FasL 或 TNF α 的受体结合。信号转导途径是复杂的,涉及激活胱冬酶,例如胱冬酶 3 和 9 与聚(ADP 核糖)聚合酶(PARP)。在该级联反应中,抗凋亡信号转导蛋白,例如 Mcl-1 和 BCLx, LAP-蛋白家族的成员,例如 X-连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)受到下调(Budihardjo 等, (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 269- 90)。例如,在树突状细胞中,CD40 细胞信号可阻断 FasL 转导的凋亡信号(Bjorck 等, (1997) *Int'l Immunol.* 9: 365-372)。

因此,CD40 与 CD40L 结合然后激活 CD40 信号是正常免疫应答所必需的步骤;然而,CD40 信号的调节异常可导致疾病。CD40 信号转导途径显示参与自身免疫病(Ichikawa 等, (2002) *J. Immunol.* 169: 2781-2787 和 Moore 等, (2002) *J. Autoimmun.* 19: 139-145)。此外,CD40/CD40L 相互作用在炎性过程中起着重要作用。例如,CD40 和 CD40L 在人和实验性动脉粥样硬化病损中过度表达。CD40 刺激可诱导基质降解酶和组织因子在粥样斑相关类型细胞,例如内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞中表达。此外,CD40 刺激诱导促炎性细胞因子,例如 IL-1、IL-6 和 IL-8 和粘附分子,例如 ICAM-1、E-选凝素和 VCAM 的产生。抑制 CD40/CD40L 相互作用防止了动物模型中的动脉粥样硬化。在移植模型中,阻断 CD40/CD40L 相互作用可防止炎症。CD40/CD40L 结合已显示与阿尔茨海默淀粉样 β 肽协同作用促进了小胶质细胞激活,从而导致神经毒性。

在类风湿性关节炎(RA)患者中,关节软骨细胞的 CD40 表达增加,因此,CD40 信号可能参与破坏性细胞因子和基质金属蛋白酶的产生。参见, Gotoh 等, (2004) *J. Rheumatol.* 31: 1506-1512。此外,MAPK 与 NF κ B 通过 RA 患者的 CD14⁺滑膜细胞上的 CD40 结合而被激活,进而扩大了滑膜炎性应答(Harigai 等, (2004) *Arthritis. Rheum.* 50: 2167-2177)。在 RA 实验性模型中,抗-CD40L

抗体治疗防止了疾病诱发、关节发炎和抗-胶原抗体的产生(Durie 等, (1993) *Science* 261: 1328-1330)。最后, 临床试验表明给予利妥昔®(通常标示用于 B 细胞淋巴瘤)可消除 RA 患者的 CD20⁺阳性 B 细胞从而改善了症状(Shaw 等, (2003) *Ann. Rheum. Dis.* 62:(增刊 2) ii55-ii59)。

在抗原呈递至 T 细胞期间, 阻断 CD40/CD40L 相互作用也显示可诱导 T 细胞耐受。因此, 阻断 CD40/CD40L 相互作用可防止最初的 T 细胞激活以及可诱导对再次接触抗抗原时的长期耐受。

人抗 CD40 单克隆抗体及其诸多应用可参见公开号 WO 2005/044854、WO 2005/044304、WO 2005/044305、WO 2005/044306、WO 2005/044855、WO 2005/044307 和 WO 2005/044294 的待批专利申请。这些申请特别公开了人 IgG1 抗 CD40 单克隆抗体, 其中称为 CHIR-12.12 的单抗, 它通过免疫接种携带人 IgG1 重链基因座和人 K 轻链基因座的转基因小鼠产生(捷诺小鼠技术公司(XenoMouse® technology); 加州阿布吉尼克斯(Abgenix, California))。

如 FACS 分析所示, CHIR-12.12 能特异性结合人 CD40, 可阻断 CD40-配体(CD40L)的结合。CHIR-12.12 可竞争除去预先结合于细胞表面 CD40 的 CD40L。CHIR-12.12 单克隆抗体是一种强拮抗剂, 在体外抑制 CD40L 介导的正常和恶性 B 细胞增殖。CHIR-12.12 单克隆抗体直接抑制 CD40L 介导的正常人 B-淋巴细胞存活和信号传导途径。在体外, CHIR-12.12 通过 ADCC 杀伤 NHL 患者的原发性癌细胞。在异种移植瘤人淋巴瘤模型中观察到其剂量依赖性抗肿瘤活性。CHIR-12.12 目前处于治疗 B 细胞恶性肿瘤的 I 期临床试验中。

CD20 是 B 细胞分化早期表达的一种细胞表面抗原, 在整个 B 细胞发育过程中保持在细胞表面上表达。CD20 参与了 B 细胞激活, 在恶性 B 细胞中表达水平非常高, 是临床上认定的治疗靶点(参见例如, Hooijberg 等(1995) *Cancer Research* 55: 2627)。美国食品药品监督管理局已经批准将靶向 CD20 的抗体如利妥昔单抗(利妥昔®)用于治疗非霍奇金淋巴瘤(参见例如, Boye 等(2003) *Ann. Oncol.* 14:520)。利妥昔®已经显示能有效治疗低级、中级和高级非霍奇金淋巴瘤(NHL)(参见例如, Maloney 等(1994) *Blood* 84:2457-2466), McLaughlin 等(1998) *J Clin. Oncol* 16:2825-2833, Maloney 等(1997) *Blood* 90:2188-2195, Hainsworth 等(2000) *Blood* 95:3052-3056, Colombat 等(2001) *Blood* 97:101-106, Coiffier 等

(1998) *Blood* 92:1927-1932), Foran 等(2000) *J. Clin. Oncol.* 18:317-324, Anderson 等(1997) *Biochem. Soc. Trans.* 25:705-708, 或 Vose 等(1999) *Ann. Oncol.* 10:58a)。利妥昔®也消耗在炎症和自身免疫病中起作用的正常 B 细胞。利妥昔正处于治疗自身免疫病的临床试验中。

虽然准确的作用机制未知, 但有证据表明, 利妥昔®的抗淋巴瘤作用部分归因于其补体介导的细胞毒性(CMC)、抗体依赖细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抑制细胞增殖和最终直接诱导凋亡。然而, 一些患者逐渐对利妥昔®治疗产生耐药性(参见 Witzig 等(2002); *J Clin. Oncol.* 20:3262, Grillo-Lopez 等(1998) *J Clin. Oncol.* 16:2825, 或 Jazirehi 等(2003) *Mol. Cancer Ther.* 2:1183-1193)。例如, 在抗-CD20 抗体治疗后, 一些患者的恶性 B 细胞不表达 CD20(Davis 等(1999) *Clin. Cancer Res.* 5:611)。而且, 30%-50%低级 NHL 患者对此单克隆抗体没有临床反应(Hainsworth 等(2000) *Blood* 95:3052-3056; Colombat 等(2001) *Blood* 97:101-106)。利妥昔单抗在 NHL 中是否有临床活性也能够与患者的 FcγRIIIa 基因型相关联。FcγRIIIa 158aa 多态性 V/V 或 V/F 患者对利妥昔单抗的反应高于 F/F 多态性患者(例如, 参见 Cartron 等(2002) *Blood* 99(3):754-758 或 DalPOzzo 等, *Cancer Res.* (2004) 64:4664-4669)。对此种单克隆抗体产生耐药性的患者, 或对此抗体初次治疗有耐药性的炎性疾病或自身免疫病的患者需要采用其它形式的治疗干预。而且, 利妥昔能消耗患者的正常 B 细胞。因此, 可用它治疗 B 细胞依赖性自身免疫病和炎性疾病。

因此, 炎性疾病和自身免疫病一直需要新型治疗剂和新型治疗方案。具体说, 需要治疗抗-CD20 抗体如利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的患者的新型治疗方案。

发明概述

提供了治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病病人的方法, 其中所述病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F)。所述方法包括给予病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体。本发明也提供了治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体在制备治疗 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病中的应用。

还提供了抑制 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)的 B 细胞产生抗体的方法,该方法包括给予病人有效量的抗 CD40 抗体。本发明也提供了有效量的抗 CD40 抗体在制备抑制 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(V/F 或 F/F)的 B 细胞产生抗体的药物中的应用。

也提供了鉴定患有可用抗-CD40 抗体治疗并且用利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的炎性疾病或自身免疫病的病人的方法和试剂盒。在一些实施方式中,所述方法包括:

a)鉴定患有细胞表达 CD40 但用利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的炎性疾病或自身免疫病病人;和

b)测定该病人的 FcγRIIIa-158 基因型(Y/V, V/F 或 F/F);

如果该病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F),则可用抗 CD40 抗体治疗其炎性疾病或自身免疫病。本发明还可包括给予用此方法鉴定的病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体的步骤。能够鉴定可用抗 CD40 抗体治疗的炎性疾病或自身免疫病病人的本发明试剂盒中装有测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。

本发明也提供了选择用于治疗用利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的炎性疾病或自身免疫病病人的抗体疗法的方法和试剂盒。在一些实施方式中,所述方法包括:

a)鉴定细胞表达 CD40 但用利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的炎性疾病或自身免疫病病人;和

b)测定该病人的 FcγRIIIa-158 基因型(V/V、V/F 或 F/F);

如果该病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F),选择抗 CD40 抗体治疗其炎性疾病或自身免疫病。本发明还包括给予用此方法鉴定的病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体的步骤。用于选择治疗患有细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病病人的抗体疗法的本发明试剂盒中装有测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。

本发明还提供了治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病患者的方法,其中该方法包括给予所述病人缓慢内化的抗体。在一个这类实施方式中,给予所述病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体,给药后 CD40 表达细胞不明

显内化抗 CD40 抗体。在另一个这类实施方式中，给予所述病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体，给药后抗 CD40 抗体保持基本均一地分布在 CD40 表达细胞表面上。在另一个这类实施方式中，给予所述病人抗 CD40 抗体，给药后治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体存在于病人的 CD40 表达细胞表面上。

用于本发明的抗 CD40 抗体特异性结合 CD40 抗原。在一些实施方式中，用于本发明方法的抗 CD40 抗体，特别是单克隆抗体，与人 FcγRIIIa-158V 有强烈的结合亲和力，与人 FcγRIIIa-158F 有强烈的结合亲和力，或者与人 FcγRIIIa-158V 和 FcγRIIIa-158F 有强烈的结合亲和力。在一些实施方式中，抗 CD40 抗体可结合病人自然杀伤(NK)细胞上的两种 FcγRIIIa 氨基酸 158 同种异型之一(V 或 F)，其结合特性足以引起有效的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。合适的抗 CD40 抗体包括但不限于：无显著激动活性的抗 CD40 抗体，包括例如，能拮抗 CD40 表达细胞上 CD40-CD40L 信号转导的抗 CD40 抗体。在一些实施方式中，抗 CD40 抗体选自：

a)单克隆抗体 CHIR-12.12；

b)杂交瘤细胞系 12.12 产生的单克隆抗体；

c)包含选自以下氨基酸序列的单克隆抗体：SEQ ID NO:2 所示序列、SEQ ID NO:4 所示序列、SEQ ID NO:5 所示序列、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 所示序列以及 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:5 所示序列；

d)含有选自以下核苷酸序列的核酸分子编码的氨基酸序列的单克隆抗体：SEQ ID NO:1 所示序列、SEQ ID NO:3 所示序列以及 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 所示序列；

e)能够与杂交瘤细胞系 12.12 产生的单克隆抗体表位结合的单克隆抗体；

f)结合包含 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:9 所示人 CD40 序列残基 82-87 的表位的单克隆抗体；

g)结合包含 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:9 所示人 CD40 序列残基 82-89 的表位的单克隆抗体；

h)在竞争性结合试验中与单克隆抗体 CHIR-12.12 竞争的单克隆抗体；

i)前述项目 a)所述的单克隆抗体或前述项目 c)-h)中任一项所述的单克隆抗体，所述抗体是重组产生的；和

j)作为前述项目 a)-i)中任一项所述单克隆抗体的抗原结合片段的单克隆抗体,所述片段保持了特异性结合人 CD40 抗原的能力。

本发明方法可用于治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病。例子包括但不限于:全身性红斑狼疮(SLE),盘状狼疮,狼疮性肾炎,结节病,性关节炎,包括青少年关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、莱特尔综合征、强直性脊柱炎和痛风性关节炎,器官或组织移植排斥,超急性、急性或慢性排斥和/或移植物抗宿主病,多发性硬化,高 IgE 综合征,结节性多动脉炎,原发性胆汁性肝硬化,炎性肠病,克罗恩病,腹腔疾病(谷蛋白敏感性肠病),自身免疫肝炎,恶性贫血,自身免疫溶血性贫血,银屑病,硬皮病,重症肌无力,自身免疫血小板减少性紫癜,自身免疫甲状腺炎,格雷夫斯病,桥本甲状腺炎,免疫复合物疾病,慢性疲劳免疫功能失调综合征(CFIDS),多肌炎和皮肌炎,冷球蛋白血症,血栓溶解,心肌病,寻常型天疱疮,肺间质纤维化,I型和II型糖尿病,1、2、3和4型迟发型超敏,过敏或过敏病症,对治疗性蛋白质不良/不想要的免疫应答,哮喘,Churg-Strauss 综合征(过敏性肉芽肿病),特应性皮炎,过敏性和刺激性接触性皮炎,荨麻疹,IgE-介导的过敏症,动脉粥样硬化症,脉管炎,先天炎性肌病,溶血性疾病,阿尔茨海默病和慢性炎性脱髓鞘多发神经病变,肺部炎症包括但不限于肺移植排斥,哮喘,结节病,肺气肿,囊性纤维变性,特发性肺纤维变性,慢性支气管炎,过敏性鼻炎和肺部的过敏性疾病,例如超敏性肺炎、嗜酸细胞性肺炎、由于骨髓和/或肺移植或其它原因导致的闭塞性支气管炎,移植动脉粥样硬化/移植静脉硬化,以及因胶原、血管和自身免疫病,如类风湿性关节炎和红斑狼疮导致的肺纤维化,以及细胞表达 CD20 的炎性疾病或自身免疫病。就细胞同时表达 CD40 和 CD20 的炎性疾病或自身免疫病而言,本发明方法特别有利。以此方式,本发明能够治疗对其它治疗剂无反应或难以治疗的炎性疾病或自身免疫病患者,这些治疗剂包括用于 FcγRIIIa-158F 纯合或杂合病人(基因型 V/F 或 F/F)的抗-CD20 抗体。

附图简要说明

图 1A-1F 显示了对六种细胞系抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的分析结果。

图 2A-2D 显示了对 CLL 患者细胞(n=8)抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的分

析结果。

图 3 小结了对 CLL 患者细胞(n=9)ADCC 的分析结果。

图 4 显示了分析两位不同供者的 NK 效应细胞对 CLL 患者细胞的 ADCC 的结果。

图 5 显示了对 CLL 患者细胞和正常 B 细胞细胞表面表达 CD40 和 CD20 的定量结果。

图 6 小结了定量测定对表面表达 CD40 和 CD20 的细胞的 ADCC 活性。

图 7 是显示道迪(Daudi)和 ARH77 细胞系上细胞表面结合的 CHIR-12.12 水平的柱状图。

图 8 显示了用 FACS 分析 CLL 患者细胞中 CHIR-12.12 和利妥昔单抗内化的研究结果。

图 9 显示了用共聚焦显微镜观察 FITC 标记抗体,从而分析正常 B 细胞中 CHIR-12.12 和利妥昔单抗内化的研究结果。

图 10 显示了用共聚焦显微镜观察 Alexa488-标记抗体,从而分析 CLL 患者细胞中 CHIR-12.12 和利妥昔单抗内化的研究结果。

图 11 小结了 ADCC 活性和内化之间的关系。

图 12 是柱状图,显示了 CHIR-12.12 或利妥昔单抗介导 FcγRIIIa 基因型不同供者的纯化 NK 效应细胞特异性裂解道迪细胞的最大百分数。

图 13 是柱状图,显示了 CHIR-12.12 或利妥昔单抗介导 FcγRIIIa 基因型不同供者的纯化 NK 效应细胞对道迪细胞的 ADCC 功效(ED₅₀)。

图 14 小结了比较了 CHIR-12.12 和利妥昔单抗介导多种基因型人供者的 NK 细胞对 CLL 患者细胞(n=9)的 ADCC 活性。

发明详述

本发明者令人惊讶地发现,抗 CD40 抗体如 CHIR-12.12 能够在其它 ADCC 介导抗体效率较低或相对无效的条件下介导对表达 CD40 的靶细胞强效抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。与其它抗体如利妥昔单抗(利妥昔®)相反,本发明所用的抗 CD40 抗体可结合于病人的自然杀伤(NK)细胞上的两种 FcγRIIIa 氨基酸 158 同种异型(V 或 F),其结合特征足以引起有效 ADCC。此发现出乎意料,代

表了我们跨越整个患者层面治疗炎性疾病和自身免疫病能力的进展。

因此,除 FcγRIIIa-158V 纯合子病人(基因型 V/V)以外,抗 CD40 抗体如 CHIR-12.12 可用于治疗 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)的细胞表达 CD40 的炎性疾病和自身免疫病。

因此,本发明提供了治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病和自身免疫病病人的方法,其中所述病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F),所述方法包括给予所述病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体。本发明还提供了治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体在制备用于治疗 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)的细胞表达 CD40 的炎性疾病和自身免疫病的药物中的应用。

如上所述,利妥昔单抗在 NHL 中的临床活性与患者的 FcγRIIIa 基因型相关联。FcγRIIIa 158aa 多态性 F/F 患者对利妥昔单抗的反应低于 V/V 或 V/F 多态性患者(例如,参见 Cartron 等(2002) *Blood* 99(3): 754-758 或 Dall'Ozzo 等(2004) *Cancer Res.* 64:4664-4669)。如上所述,利妥昔®处于治疗自身免疫病的临床试验中。因此,本发明有利于治疗用抗-CD20 抗体如利妥昔单抗(利妥昔®)治疗无反应的炎性疾病和自身免疫病。而且,这种有效杀伤靶细胞而无需使用抗体-毒素偶联物的方法能产生制备成本便宜且副作用较少的药物。

除 FcγRIIIa-158V 纯合子病人(基因型 V/V)以外,抗 CD40 抗体如 CHIR-12.12 可用于抑制 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)的 B 细胞产生抗体的方法。

因此,本发明提供了抑制 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)的 B 细胞产生抗体的方法,所述方法包括给予所述病人有效量的抗 CD40 抗体,如 CHIR-12.12。本发明还提供了有效量的抗 CD40 抗体在制备抑制 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(V/F 或 F/F)的 B 细胞产生抗体的药物中的应用。

本领域技术人员没有预料到,可以抑制 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)的 B 细胞产生抗体。

本发明提供了根据患者的 FcγRIIIa-158 基因型选择患者个体的治疗方案,该治疗方案给予 ADCC 介导性抗 CD40 抗体。

本发明提供了鉴定患有可用抗 CD40 抗体治疗但用利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的炎性疾病和自身免疫病病人的方法,所述方法包括:

a)鉴定患有细胞表达 CD40 但用利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的炎性疾病和自身免疫病病人;和

b)测定所述病人的 FcγRIIIa-158 基因型(V/V、V/F 或 F/F);

如果所述病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F),则可用抗 CD40 抗体治疗其炎性疾病和自身免疫病。本发明还可包括给予用这种方法鉴定的病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体的步骤。

本领域技术人员采用合适诊断试剂盒不难用此方法鉴定患有可用抗 CD40 抗体治疗的炎性疾病和自身免疫病病人。该试剂盒应装有适合测定病人 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。因此,本发明还提供鉴定患有可用抗 CD40 抗体治疗的炎性疾病和自身免疫病病人的试剂盒,其中装有测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。在本文其它地方更详细地描述了合适的试剂盒。

本发明还提供了选择用于治疗患有可用利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的炎性疾病和自身免疫病病人的抗体疗法的方法,所述方法包括:

a)鉴定患有细胞表达 CD40 但用利妥昔单抗(利妥昔®)难以治疗的炎性疾病和自身免疫病病人;和

b)测定所述病人的 FcγRIIIa-158 基因型(V/V、V/F 或 F/F);

如果所述病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F),那么选择抗 CD40 抗体治疗其炎性疾病和自身免疫病。具体说,与用利妥昔单抗(利妥昔®)治疗相比,优先选择此种抗 CD40 抗体。本发明还包括给予用此方法鉴定的病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体的步骤。

本领域技术人员采用合适的诊断试剂盒不难用此方法选择用于治疗患有炎性疾病和自身免疫病病人的抗体疗法。该试剂盒应装有适合测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。因此,本发明还提供了选择用于治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病和自身免疫病病人的抗体疗法的试剂盒,该试剂盒装有测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。

本发明者也令人惊讶地发现,给药后抗 CD40 抗体如 CHIR-12.12 显然不会被 CD40 表达细胞内化。反之,在给药后相当长的一段时间内抗 CD40 抗体

如 CHIR-12.12 基本均一地分布在 CD40 表达细胞表面上。这与其它抗体，特别是抗-CD20 抗体，如利妥昔单抗(利妥昔®)相反。

CD40 表达细胞表面上结合的抗 CD40 抗体持续存在和在 CD40 表达细胞表面的均一分布使得抗 CD40 抗体能够通过结合 FcR 如自然杀伤(NK)细胞上的 FcγRIIIa 受体结合而介导表达 CD40 靶细胞的强效抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。

因此，本发明提供了治疗细胞表达 CD40 的炎症疾病和自身免疫病病人的方法，所述方法包括给予所述病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体，给药后抗 CD40 抗体不被 CD40 表达细胞明显内化。

本发明还提供了治疗细胞表达 CD40 的炎症疾病或自身免疫病患者的方法，所述方法包括给予所述病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体，给药后所述抗 CD40 抗体保持基本均一地分布在 CD40 表达细胞表面上。

本发明还提供了治疗细胞表达 CD40 的炎症疾病或自身免疫病患者的方法，所述方法包括给予所述病人抗 CD40 抗体，例如给药后治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体存在于所述病人的 CD40 表达细胞表面上。

因此，本发明这些方面包括给予患者“缓慢内化的”抗体。“缓慢内化的抗体”指在相当长的一段时间内保持分布在细胞表面上的抗体。本领域技术人员应明白，这种特性与认为有效治疗需要抗体-受体复合物内化的许多治疗应用的特性截然不同。在本文中所述的相当长一段时间通常指超过 3 小时，优选 6 小时，更优选 12 小时，更优选 24 小时、36 小时、48 小时、72 小时、96 小时、120 小时、144 小时、168 小时或更长时间。

在上述相当长一段时间内，最初位于 CD40 表达细胞表面上的抗体优选至少 5%、至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%或更多仍保持分布在细胞表面上。

可通过各种试验评估抗体内化。例如，可采用细胞系如道迪淋巴瘤细胞系，或 ARH77 MM 细胞系评估候选抗体结合对内化的影响。用人 IgG1(对照抗体)或候选抗体在冰上(含有 0.1%叠氮化钠以阻断内化)或在 37℃下(不含叠氮化钠)培育细胞一段时间，适合为 3 小时。用冰冷的染色缓冲液(如 PBS+1%BSA+0.1%叠氮化钠)洗涤后，用(例如)山羊抗-人 IgG-FITC 冰上染色细胞 30 分钟。然后

评估着色程度；在本实施例中，可通过(例如)FACS Calibur 记录荧光强度的几何平均值(MFI)。本领域技术人员知道其它合适试验(参见例如 <http://www.abgenix.com/documents/SBS2003%20poster.pdf>)。

在本文实施例 4 和 5 所述的实验中，叠氮化钠存在下用 CH12.12 冰上培育的细胞或不存在叠氮化钠时 37℃培育的细胞之间没有观察到 MFI 差异(参见图 7-10)。这些数据证明，结合 CD40 后，CH12.12 不内化，继续展示在细胞表面上。

可用于本发明的标准技术和方法的小结见下。应理解，本发明不限于所述的具体方法、方案、细胞系、载体和试剂。还应理解，本文所用术语只是为了描述具体实施方式，这些术语不应限制本发明的范围。本发明的范围仅受所附权利要求书的术语的限制。

本说明书中采用了核苷酸和氨基酸的标准缩写。

除非另有说明，本发明的实施将采用分子生物学、微生物学、重组 DNA 技术和免疫学的常规技术，这些技术属于本领域技术人员的知识范围。

文献中充分描述了这些技术。特别适合查阅的教科书的例子包括：Sambrook 等(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(分子克隆：试验室手册)(第 2 版)；D.N Glover 编(1985) *DNA Cloning*(DNA 克隆)，第 I 和 II 卷；M.J. Gait 编(1984) *Oligonucleotide Synthesis*(寡核苷酸合成)；B.D. Hames 和 S.J. Higgins 编(1984) *Nucleic Acid Hybridization*(核酸杂交)；B.D. Hames 和 S.J. Higgins 编(1984) *Transcription and Translation*(转录和翻译)；R.I. Freshney 编(1986) *Animal Cell Culture; Immobilized Cells and Enzymes*(动物细胞培养：固定细胞和酶)(IRL 出版社，1986)；B. Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning; the Methods in Enzymology series*(分子克隆的实践指南：酶学方法丛书)(学术出版社公司(Academic Press, Inc.)),特别是第 154 和 155 卷；J.H. Miller 和 M.P. Calos 编(1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*(哺乳动物细胞的基因转移载体)(冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory))；Mayer 和 Walker 编(1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*(细胞和分子生物学中的免疫化学方法)(学术出版社，伦敦)；Scopes (1987) *Protein Purification: Principles and Practice*(蛋白质纯化：原理和实践)(第 2 版；施普林

格出版社(Springer Verlag), 纽约); 和 D.M. Weir 和 C.C. Blackwell 编(1986) Handbook of Experimental Immunology(实验免疫学手册), 第 I-IV 卷。

本发明方法包括采用抗 CD40 抗体治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病和自身免疫病。

“CD40”、“CD40 抗原”或“CD40 受体”指肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的 50-55 kDa 跨膜糖蛋白(参见例如, 美国专利号 5,674,492 和 4,708,871; Stamenkovic 等(1989) EMBO 8:1403; Clark (1990) Tissue Antigens(组织抗原) 36:33; Barclay 等(1997) The Leucocyte Antigen Facts Book(白细胞抗原文献)(第 2 版; 学术出版社, 圣地亚哥))。已经鉴定到人 CD40 基因另路剪接的转录物变体编码的人 CD40 的两种同种型。、第一种同种型(也称为“长同种型”或“同种型 1”)表示为长 277 个氨基酸的前体多肽(SEQ ID NO:9; 首先报道为 GenBank 登录号 CAA43045, 和鉴定为 GenBank 登录号 NP_001241 的同种型 1), 它由 SEQ ID NO:8 (见 GenBank 登录号 X60592 和 NM_001250)编码, 它含有前 19 个残基代表的信号序列。第二种同种型(也称为“短同种型”或“同种型 2”)表示为长 203 个氨基酸的前体多肽(SEQ ID NO:7; GenBank 登录号 NP_690593), 它由 SEQ ID NO:6(GenBank 登录号 NM_152854)编码, 也含有前 19 个残基代表的信号序列。人 CD40 的这两种同种型的前体多肽中前 165 个残基相同(即 SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:9 的残基 1-165)。所述短同种型前体多肽(SEQ ID NO: 7 所示)由缺少一编码区段(导致翻译框移位)的转录物变体(SEQ ID NO:6)编码; 与 CD40 的长同种型所含的 C 末端(SEQ ID NO:9 的残基 166-277 中所示的 C 末端)相比, 得到的 CD40 同种型所含的 C-末端(SEQ ID NO:7 的残基 166-203)较短且不相同。出于本发明目的, 术语“CD40”或“CD40 抗原”、“CD40 细胞表面抗原”或“CD40 受体”包括 CD40 的长同种型和短同种型二者。CD40 抗原可以是完全或部分糖基化抗原。

如本文所述, 在正常和恶性人 B 细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、CDS+T 细胞、内皮细胞、单核和上皮细胞、活化 T 细胞、活化血小板、发炎的血管平滑肌细胞、嗜曙红细胞、类风湿性关节炎的滑膜、皮肤成纤维细胞和其它非淋巴细胞类型表面上发现 CD40。

本文中“CD40 表达细胞”指表达可检测水平的 CD40 抗原的任何正常或

恶性细胞。优选地，CD40 表达细胞是表达可检测水平的细胞表面 CD40 抗原的细胞。本领域熟知检测细胞中 CD40 表达的方法，包括但不限于：PCR 技术、免疫组化、流式细胞术、Western 印迹、ELISA 等。这些方法能够检测 CD40mRNA、CD40 抗原和细胞表面 CD40 抗原。可以如本文实施例 3 所述或者用其它合适方法检测细胞表面 CD40 的表达。

“CD40 配体”或“CD40L”主要指也分别以两种较小的生物活性可溶形式 18 kDa 和 31 kDa 存在的 32-33 kDa 跨膜蛋白(Graf 等(1995) *Eur. J. Immunol.* 25:1749- 1754; Mazzei 等(1995) *J Biol. Chem.* 270:7025-7028; Pietravalle 等(1996) *J Biol Chem.* 271:5965-5967)。人 CD40L 也称为 CD154 或 gp39。“CD40 配体”或“CD40L”也指可结合和激活一种或多种 CD40 信号传导途径的任何其它肽、多肽或蛋白质。因此，“CD40 配体”包括但不限于：保持足够活性具有结合和刺激 CD40 表达细胞上 CD40 信号转导功能的全长 CD40 配体蛋白及其变体和片段。对天然 CD40 配体如人 CD40L 的修饰包括但不限于：取代、缺失、截短、延长、融合蛋白、片段、肽模拟物等。

“CD40 信号转导”指由细胞表面 CD40 与 CD40 配体或其它激动剂如激动型抗体的相互作用而产生的任何生物活性。CD40 信号转导的例子是导致 CD40 表达细胞增殖和存活以及刺激 CD40 表达细胞内一种或多种 CD40-信号传导途径的信号。CD40 “信号传导途径”或“信号转导通路”指由 CD40 受体与 CD40 配体如 CD40L 相互作用产生并且能产生信号的至少一种生化反应，或一组生化反应，这些信号通过信号通路传递时，导致信号转导级联反应中的一种或多种下游分子被激活。信号转导通路包括许多信号转导分子的参与，将信号由细胞表面 CD40 受体跨越细胞质膜传递，和通过一系列信号转导分子中的一种或多种，跨越细胞质传递，在某些情况下传入细胞核内。本发明特别感兴趣的是 CD40 信号转导通路，包括 AKT 信号传导途径，导致 AKT 激活，最终通过 NF- κ B 信号传导途径激活 NF- κ B；还有促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号传导途径，包括 MEK/ERK 信号传导途径和 MEK/p38 信号传导途径，它们分别导致 ERK 和 p38 激活。

如上所述，本发明提供了治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病患者的方法，其中所述病人是 Fc γ RIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F)，

所述方法包括给予所述病人治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体。

“病人”指患有细胞表达 CD40 的任何炎性疾病或自身免疫病、处于发生该疾病风险中或该疾病复发的病人。

“细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病”指与 CD40 表达细胞有关的任何炎性疾病或自身免疫病。细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病可能是 CD40 表达细胞中 CD40 信号转导水平不良的任何炎性疾病或自身免疫病，或者所述炎性疾病或自身免疫病可能只是与 CD40 表达细胞间接相关联。“CD40 信号转导水平不良的炎性疾病或自身免疫病”指其发生和进展与 CD40 信号转导水平不良有关的炎性疾病或自身免疫病。

“CD40 信号转导水平不良”指炎性疾病或自身免疫病病人的 CD40 表达细胞中可能发生的任何生理上不良水平的 CD40 信号转导。

炎性疾病的特征是炎症和组织破坏，或其组合。“炎性疾病”包括任何炎症免疫介导过程，其中免疫应答的启动事件或靶点包括非自身抗原，包括例如异型抗原、异种抗原、病毒抗原、细菌抗原、未知抗原或变应原。

本文所用术语“自身免疫”通常应包括涉及“自身”抗原的炎性免疫接到过程。在自身免疫病中，自身抗原引发宿主免疫应答。

本发明可用于治疗与组织移植物排斥有关的炎症。“移植物排斥”或“移植排斥”指宿主对移植物(包括但不限于 HLA 抗原、血液群抗原等)产生的免疫应答。

本发明可用于治疗移植物抗宿主病，例如与骨髓移植有关的移植物抗宿主病。在移植物抗宿主病中，供体骨髓包括淋巴细胞和成熟为淋巴细胞的细胞。供体的淋巴细胞能将接受者的抗原识别为非自身抗原，并产生炎性免疫应答。因此，本文所用的“移植物抗宿主病”或“移植物抗宿主反应”指供体淋巴细胞与宿主抗原发生反应的任何 T 细胞介导的免疫应答。

可用本发明方法治疗的炎性疾病和自身免疫病包括但不限于：全身性红斑狼疮(SLE)，盘状狼疮，狼疮性肾炎，结节病，炎性关节炎，包括青少年关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、莱特尔综合征、强直性脊柱炎和痛风性关节炎，器官或组织移植排斥，超急性、急性或慢性排斥和/或移植物抗宿主病，多发性硬化，高 IgE 综合征，结节性多动脉炎，原发性胆汁性肝硬化，炎性肠

病, 克罗恩病, 腹腔疾病(谷蛋白敏感性肠病), 自身免疫肝炎, 恶性贫血, 自身免疫溶血性贫血, 银屑病, 硬皮病, 重症肌无力, 自身免疫血小板减少性紫癜, 自身免疫甲状腺炎, 格雷夫斯病, 桥本甲状腺炎, 免疫复合物疾病, 慢性疲劳免疫功能失调综合征(CFIDS), 多肌炎和皮肌炎, 冷球蛋白血症, 血栓溶解, 心肌病, 寻常型天疱疮, 肺间质纤维化, I型和II型糖尿病, 1、2、3和4型迟发型超敏, 过敏或过敏病症, 对治疗性蛋白质不良/不想要的免疫应答(参见例如, 美国专利申请号 US2002/0119151 和 Koren 等(2002) *Current. Pharm. Biotechnol.* 3: 349-60), 哮喘, Churg-Strauss 综合征(过敏性肉芽肿病), 特应性皮炎, 过敏性和刺激性接触性皮炎, 荨麻疹, IgE-介导的过敏症, 动脉粥样硬化症, 脉管炎, 先天炎性肌病, 溶血性疾病, 阿尔茨海默病和慢性炎性脱髓鞘多发神经病变等。本发明方法也可用于治疗肺部炎症, 包括但不限于: 肺移植排斥、哮喘、结节病、肺气肿、囊性纤维变性、特发性肺纤维变性、慢性支气管炎、过敏性鼻炎和肺部的过敏性疾病, 例如超敏性肺炎、嗜酸性粒细胞性肺炎、由于骨髓和/或肺移植或其它原因导致的闭塞性支气管炎、移植动脉粥样硬化/移植静脉硬化、以及因胶原、血管和自身免疫病, 如类风湿性关节炎和红斑狼疮导致的肺纤维化。

炎性疾病或自身免疫病可以是细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病。抗体依赖性自身免疫病的例子包括类风湿性关节炎、银屑病、全身性红斑狼疮、克罗恩病、重症肌无力、先天性血小板减少性紫癜或舍格伦综合征。

另外, 消耗 B 细胞或携带 CD40 的其它细胞可通过 CD40 配体结合的信号转导限制 T 细胞激活。因此, 可通过消耗 B 细胞和携带 CD40 的其它细胞治疗 T 细胞介导的自身免疫病和炎性疾病, 例如多发性硬化、移植物排斥、移植物抗宿主病、阿尔茨海默病或糖尿病。也可用于骨髓移植。

本发明对细胞表达 CD40 的炎性疾病和自身免疫病特别有利。可采用本文所述的 CHIR-12.12 治疗用其它治疗剂(包括抗 CD20 抗体, 如利妥昔®)难以治疗的炎性疾病或自身免疫病患者, 如本文其它地方更详细的描述。

本文中“治疗”定义为将抗 CD40 抗体施加或给予对象、或者将抗 CD40 抗体施加或给予对象的分离组织或细胞系, 其中所述对象患有自身免疫病和/或炎性疾病、与自身免疫病和/或炎性疾病有关的症状、或易患自身免疫病和/

或炎性疾病，给药的目的是为治愈、治疗、缓解、减轻、改变、补救、改善、消除或影响自身免疫病和/或炎性疾病、自身免疫病和/或炎性疾病相关的任何症状、或患自身免疫病和/或炎性疾病的易感性。“治疗”也指将含有抗-CD40抗体的药物组合物施用于或给予对象，或将含有抗-CD40抗体的药物组合物施用于或给予对象的分离的组织或细胞系，所述对象患有自身免疫病和/或炎性疾病，与自身免疫病和/或炎性疾病相关的症状，或易于患自身免疫病和/或炎性疾病，给药的目的是为治愈、治疗、缓解、减轻、改变、补救、改善、消除或影响自身免疫病和/或炎性疾病、自身免疫病和/或炎性疾病相关的任何症状、或患自身免疫病和/或炎性疾病的易感性。

“抗-炎症活性”指降低或防止炎症。用本文他处定义的抗-CD40抗体治疗可导致有利于治疗自身免疫病和/或炎性疾病相关的生理应答，所述疾病涉及表达CD40抗原的细胞。应该知道本发明方法可用于预防细胞表型，例如增殖、激活等的变化。

在本发明的治疗方法中，用至少一种本文他处定义的抗CD40抗体提高对炎性疾病或自身免疫病的有益治疗应答。

对炎性疾病或自身免疫病的“有益治疗应答”指与抗体抗炎活性有关的疾病改善，和/或与疾病有关的症状改善。即，可观察到抗增殖作用，防止CD40表达细胞进一步增殖，炎症反应减轻，包括但不限于炎性细胞因子、粘附分子、蛋白酶、免疫球蛋白(如携带CD40的细胞是B细胞时)、它们的组合等的分泌减少，抗炎蛋白产量增加、自身反应细胞数量减少、免疫耐受程度提高、自身反应细胞存活被抑制、和/或刺激CD40表达细胞介导的一种或多种症状减轻。这类阳性治疗反应不限制给药途径，可包括给以供体、供体组织(如器官灌注)、宿主、其组合等。

可利用以下筛选技术来评价临床应答：例如磁共振成像(MRI)扫描、x-射线照相成像、计算机化断层显像(CT)扫描、流式细胞术或荧光激活细胞分选(FACS)分析、组织学、总病理学和血液化学，包括但不限于用ELISA、RIA、层析等检测发生的变化。除了这些有益的治疗性应答以外，用抗-CD40抗体的有益作用是治疗对象的疾病相关症状得以改善。

“治疗或预防有效剂量”或“治疗或预防有效量”指给予抗-CD40抗体的

量可导致细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病治疗相关的有益治疗性应答。在本文他处更详细地描述了合适剂量。如本文他处所详述，治疗方法可包括一次给予或多次给予治疗有效剂量的抗-CD40 抗体。

本发明方法尤其可用于治疗用一种或多种炎性疾病或自身免疫病的已知疗法难以治疗的炎性疾病或自身免疫病，包括上述疾病。这类疗法包括但不限于：外科或手术方法(例如，脾切除术、淋巴结切除术、甲状腺切除术、血浆去除术、白细胞去除术(leukopheresis)、细胞、组织或器官移植、肠手术(intestinal procedures)、器官灌注等)、放疗、例如类固醇治疗和非类固醇治疗、激素治疗、细胞因子治疗、使用皮肤药物(例如，用于治疗皮肤病症，如过敏、接触性皮炎和银屑病的局部药物)的治疗、免疫抑制治疗和其它抗炎性单克隆抗体治疗等，如本文他处所详述。“难治”指特定的炎性疾病或自身免疫病对具体疗法有抗性或无反应。可能是在具体疗法一开始治疗时即用该具体疗法难以治疗(即对初次接触该疗法无反应)，或者先用该疗法治疗一段时间或在该疗法的后续治疗期间对该疗法产生抗性。因此，病人对该疗法有抗性或无反应时，可利用本发明治疗用该疗法难以治疗的病人。

本发明方法包括使用抗 CD40 抗体。“抗体”通常是约 150,000 道尔顿的异质四聚体糖蛋白，由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成。每条轻链经一个共价二硫键与重链相连，而二硫键的数目视不同免疫球蛋白同种型的重链而不同。每条重链和轻链也含有规律性隔开的链内二硫桥。每条重链的一端为可变区(V_H)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端为可变区(V_L)，在另一端为恒定区；轻链的恒定区与重链的第一恒定区相对，轻链可变区与重链的可变区相对。认为由特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。

术语“可变”指抗体之间可变区的某些部分序列差别很大。可变区赋予抗原结合特异性。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但具有各种效应物功能，如 Fc 受体(FcR)结合、参与抗体依赖性细胞毒性、启动补体依赖性细胞毒性和肥大细胞脱粒。

可根据恒定区氨基酸序列将脊椎动物种类的抗体(免疫球蛋白)“轻链”分为两种明显不同的类型称为 κ 和 λ 轻链。

根据“重链”恒定区的氨基酸序列，免疫球蛋白可分为不同类型。人免疫

球蛋白主要有五类：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其中几类可进一步分为亚类(同种型)，如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。不同类免疫球蛋白对应的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚基结构和三维构型已知。不同同种型具有不同的效应物功能。例如，人 IgG1 和 IgG3 同种型具有 ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)活性。IgG1 抗体，具体是人 IgG1 抗体，特别可用于本发明方法。

“人效应细胞”是表达一种或多种 FcR 并具有效应物功能的白细胞。优选地，该细胞至少表达 Fc γ RIII，并具有抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)效应物功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单核细胞(PBMC)、自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性白细胞和中性粒细胞，优选 PBMC 和 NK 细胞。具有 ADCC 活性的抗体一般是 IgG1 或 IgG3 同种型。需要注意，除分离得到 IgG1 和 IgG3 抗体以外，可通过工程改造非 ADCC 抗体的可变区或可变区片段与 IgG1 或 IgG3 同种型恒定区相连来制备这类 ADCC 介导抗体。

术语“Fc 受体”或“FcR”用于描述能结合抗体 Fc 区域的受体。优选的 FcR 是天然序列的人 FcR。此外，优选的 FcR 可结合 IgG 抗体(γ 受体)，包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体，包括这些受体的等位基因变体或者另路剪接形式。Fc γ RII 受体包括具有相似氨基酸序列、主要在于胞质结构域不同的 Fc γ IIA (“活化性受体”)和 Fc γ IIB (“抑制性受体”)。活化性受体 Fc γ IIA 在其胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。抑制性受体 Fc γ IIB 在其胞质结构域中含有免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)(参见 Daeron (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234)。FcR 综述见 Ravetch 和 Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-492 (1991); Capel 等, (1994) *Immunomethods* 4: 25-34 和 de Haas 等, (1995) *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-341。本文的术语“FcR”包括其它 FcR，包括将来鉴定到的 FcR。该术语也包括负责将成熟 IgG 转移给胎儿的新生受体，FcRn(Guyer 等, (1976) *J. Immunol.* 117:587 和 Kim 等, (1994) *J. Immunol.* 24: 249 (1994))。

术语“抗体”广义包括全装配的抗体、能特异性结合 CD40 抗原的抗体片段(如 Fab、F'(ab)₂、Fv 和其它片段)、单链抗体、双抗体、抗体嵌合物、杂交

抗体、双特异性抗体、人源化抗体等)和含有上述物质的重组肽。术语“抗体”涵盖多克隆和单克隆抗体。

本文所用“抗 CD40 抗体”包括能特异性识别 CD40 抗原的任何抗体。在一些实施方式中,用于本发明方法的抗 CD40 抗体,特别是单克隆抗 CD40 抗体对 CD40 抗原具有强烈的单位点结合亲和力。用标准试验如 Biacore™测定时,这类单克隆抗体与 CD40 的亲和力(K_D)为至少 10^{-5} M、至少 3×10^{-5} M,优选至少 10^{-6} M 或至少 10^{-7} M,更优选至少 10^{-8} M 或至少 10^{-12} M。本领域已知 Biacore 分析,“BIA 应用手册”中提供了详细内容。可采用 WO 01/27160 所述的方法调节结合亲和力。

“特异性识别”或“特异性结合”指抗 CD40 抗体不结合无关抗原,如 CD20 抗原。

在一些实施方式中,用于本发明方法的抗 CD40 抗体,具体是单克隆抗体,与人 FcγRIIIa-158V 有强烈的结合亲和力。优选地,用标准试验如 Biacore™测定时,用于本发明方法的抗 CD40 抗体能结合人 FcγRIIIa-158V,其亲和力(K_D)为至少约 0.5 μM。如本文实施例 6 所述,CHIR-12.12 抗体能结合人 FcγRIIIa-158V,亲和力(K_D)为 492 nM。

在一些实施方式中,用于本发明方法的抗 CD40 抗体,具体是单克隆抗体,与人 FcγRIIIa-158F 有强烈的结合亲和力。优选地,用标准试验如 Biacore™测定时,用于本发明方法的抗 CD40 抗体能结合人 FcγRIIIa-158F,其亲和力(K_D)为至少约 12 μM。优选地,本发明方法所用的抗 CD40 抗体能结合人 FcγRIIIa-158F,亲和力(K_D)为至少约 10μM、至少约 8μM、至少约 6μM、至少约 5μM、至少约 4μM 或至少约 3μM。如本文实施例 6 所述,CHIR-12.12 抗体能结合人 FcγRIIIa-158F,亲和力(K_D)为 2.8 μM。

在一些实施方式中,用于本发明方法的抗 CD40 抗体,具体是单克隆抗体,与人 FcγRIIIa-158V 和 FcγRIIIa-158F 有强烈的结合亲和力。优选地,用标准试验如 Biacore™测定时,用于本发明方法的抗 CD40 抗体能结合人 FcγRIIIa-158V,其亲和力(K_D)为至少约 0.5 μM;还能结合人 FcγRIIIa-158F,其亲和力(K_D)为至少约 12 μM。

可以采用本领域技术人员已知的合适抗体生产方法产生用于本发明方法

的抗体。

用于本发明方法的抗 CD40 抗体可以是多克隆抗体。因此,可通过常规方法制备多克隆血清。通常,先用含有感兴趣抗原(在这种情况下是 CD40 抗原)的溶液免疫合适动物,优选小鼠、大鼠、兔或山羊。由于可获得的血清体量和标记的抗-兔和抗-山羊抗体的可获得性,优选采用兔或山羊制备多克隆血清。

可筛选免疫动物血清对接种抗原的抗体反应。可由淋巴结或脾细胞中分离淋巴细胞,还可选择 CD138-阴性和 CD19-阳性的 B 细胞。在一个方面,可以如本文所述将这类 B 细胞培养物(BCC)与骨髓瘤细胞融合产生杂交瘤。

可在转基因动物,优选在携带人免疫球蛋白基因座的小鼠中制备多克隆血清。在一优选的实施方案中,表达感兴趣蛋白(在这种情况下是 CD40 抗原)的 Sf9 细胞用作免疫原。也可用盐水,优选用佐剂如弗氏完全佐剂混合或乳化含有抗原的溶液,经胃肠外(通常是皮下或肌肉内)注射该混合液或乳液进行免疫。每次注射 50-200 μg 的剂量一般足够。通常在 2-6 周后注射用盐水配制,优选用不完全弗氏佐剂配制的蛋白质加强免疫一次或多次。或者可用本领域已知的方法体外免疫产生抗体,就本发明目的而言体外与体内免疫等效。将免疫动物的血液放入玻璃或塑料容器 25°C 孵育 1 小时,然后 4°C 孵育 2-18 小时分离多克隆抗血清。离心(例如, 1,000 $\times$ g 10 分钟)回收该血清。每次放血可自家兔获得约 20-50 ml 血清。

Sf9(草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*))细胞的制备方法见纳入本文作为参考的美国专利号 6,004,552 中所述。在 CD40 的情况下,简言之,将编码人 CD40 的序列用转移载体重组引入杆状病毒中。将质粒与野生型杆状病毒 DNA 共同转染入 Sf9 细胞。鉴定感染重组杆状病毒的 Sf9 细胞并克隆纯化。

用于本发明方法的抗 CD40 抗体可以是单克隆抗体。本文所用术语“单克隆抗体”(和“mAb”)指获自基本均一的抗体群体的抗体,即,该群体中的各个抗体相同,除了可能存在少量天然产生的突变。该术语不限制产生抗体的物种,并且不需要通过任何具体方法产生抗体。

与一般包含不同抗原决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,各种单克隆抗体只针对抗原上的一个决定簇(表位)。

“表位”指诱导产生抗体和抗体结合的抗原分子的那部分。表位可包含线

性氨基酸残基(即表位中的残基以线性方式依次排列)、非线性氨基酸残基(本文中称为“非线性表位”;这些表位不是依次排列的)、或包含线性和非线性氨基酸残基。适用于本发明方法的抗 CD40 单克隆抗体能特异性结合人细胞表面上表达的人 CD40 抗原上的表位,即接触细胞外部的表位。

用于本发明的单克隆抗体可先用 Kohler 等(1975) *Nature* 256:495 描述的杂交瘤方法制备,或者可用重组 DNA 方法(参见例如,美国专利号 4,816,567)制备。也可从例如 McCafferty 等(1990) *Nature* 348:552-554 (1990)和美国专利号 5,514,548 所述技术产生的抗体噬菌体文库分离单克隆抗体。Clackson 等(1991) *Nature* 352:624-628 和 Marks 等(1991) *J Mol. Biol.* 222:581-597 分别描述了用噬菌体文库分离鼠和人抗体。后续发表物描述了通过链改组(Marks 等(1992) *Bio/Technology* 10:779-783),以及组合感染和体内重组产生高亲和力(nM 级)人抗体,作为构建非常大的噬菌体文库的方案(Waterhouse 等(1993) *Nucleic Acids Res.* 21:2265-2266)。因此,这些技术是分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方式。

在 Kohler 等(1975) *Nature* 256:495-496 的传统方法中,一般用含有抗原的溶液免疫小鼠。可在盐水中,优选在佐剂如弗氏完全佐剂中混合或乳化含有抗原的溶液,并经胃肠道外注射该混合液或乳液进行免疫。可采用本领域已知的任何免疫方法获得本发明单克隆抗体。免疫动物后,取出脾脏(和任选的几个大淋巴结),并分离成单个细胞。可将细胞悬浮液加入用感兴趣抗原包被的平板或孔来筛选脾细胞。表达抗原特异性膜结合免疫球蛋白的 B 细胞能结合该平板,而不会被冲洗掉。然后,诱导得到的 B 细胞或所有分离的脾细胞与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤,在选择性培养基中培养。用连续稀释法接种得到的细胞,测定是否产生了特异性结合感兴趣抗原(且不结合无关抗原)的抗体。然后在体外(例如,用组织培养瓶或中空的纤维反应器)或体内(如小鼠腹水)培养所选的单克隆抗体(mAb)-分泌性杂交瘤。

在另一方面,优选进一步筛选 B 细胞培养物对原始抗原的反应性。这类筛选包括采用靶蛋白/抗原蛋白的酶联免疫吸附试验(ELISA),它是结合感兴趣抗原和体外结合于表达靶抗原的瞬时转染 CHO 或其它细胞的已知抗体的竞争性试验。

采用重组 DNA 法制备用于本发明方法的抗 CD40 抗体时,用常规方法不难分离和测序编码单克隆抗体的 DNA(例如,采用能够特异性结合小鼠抗体重链和轻链的编码基因的寡核苷酸探针)。本文所述的杂交瘤细胞用作这类 DNA 的优选来源。一旦分离后,可将该 DNA 放入表达载体中,然后转染到本身不产生免疫球蛋白的宿主细胞如大肠杆菌(*E. coli*)细胞、猿 COS 细胞、中华仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中,以便在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。有关在含有编码抗体的 DNA 的细菌中重组表达的综述文献包括 Skerra 等(1993) *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256 和 Phickthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151。或者,可以在细胞系如 CHO 细胞系中产生抗体,如纳入本文作参考的美国专利号 5,545,403; 5,545,405; 和 5,998,144 所述。简言之,用能够表达轻链和重链的载体分别转染该细胞系。可将两种蛋白质转染不同载体而产生嵌合抗体。另一优点是抗体可正确糖基化。

本文所用“宿主细胞”指培养成单细胞实体的微生物或者真核细胞或细胞系,它们可能是、或已经用作重组载体或其它转运多核苷酸的接受体,包括已转染的原始细胞的后代。应理解,由于存在天然、偶发性或有意的突变,单个细胞的后代与其初始亲本细胞的形态或者基因组或总 DNA 组成不一定完全相同。

在一些实施方式中,可采用以谷氨酰胺合成酶作为标记的 GS 基因表达系统(伦泽生物科技公司(Lonza Biologies),新罕布什尔州朴次茅斯(Portsmouth, New Hampshire))在 CHO 细胞中生产抗 CD40 抗体,如 CHIR-12.12 抗体。也参见美国专利号 5,122,464; 5,591,639; 5,658,759; 5,770,359; 5,827,739; 5,879,936; 5,891,693; 和 5,981,216; 将其全部内容纳入本文作参考。

本领域已知 CD40 的单克隆抗体。参见例如,McMichael 编(1987; 1989) *Leukocyte Typing III and IV*(白细胞分型 III 和 IV)(牛津大学出版社,纽约)中关于 B 细胞抗原的章节;美国专利号 5,674,492; 5,874,082; 5,677,165; 6,056,959; WO 00/63395; 国际公开号 WO 02/28905 和 WO 02/28904; Gordon 等(1988) *J. Immunol.* 140:1425; Valle 等(1989) *Eur. J. Immunol.* 19:1463; Clark 等(1986) *PNAS* 83:4494; Paulie 等(1989) *J. Immunol.* 142:590; Gordon 等(1987) *Eur. J. Immunol.* 17:1535; Jabara 等(1990) *J. Exp. Med.* 172:1861; Zhang 等(1991) *J.*

Immunol. 146:1836; Gascan 等(1991) *J. Immunol.* 147:8; Banchereau 等(1991) *Clin. Immunol. Spectrum* 3:8; 和 Banchereau 等(1991) *Science* 251:70; 将所有这些文献纳入本文作参考。

如上所述, 本文所用术语“抗体”包括嵌合抗体。“嵌合”抗体指最优选用重组脱氧核糖核酸技术产生的包含人(包括免疫“相关”物种, 如黑猩猩)和非人组分的抗体。因此, 嵌合抗体恒定区最优选与天然人抗体恒定区基本相同; 嵌合抗体可变区最优选衍生自对感兴趣抗原(CD40)有所需抗原特异性的非人来源的抗体。非人来源可以是可用来产生 CD40 抗原的抗体的任何脊椎动物来源。这种非人来源包括但不限于: 啮齿类(例如, 家兔、大鼠、小鼠等; 参见, 例如, 纳入本文作为参考的美国专利号 4,816,567)和非人灵长类(例如, 古猴(Old World Monkey)、类人猿等; 参见例如纳入本文作为参考的美国专利号 5,750,105 和 5,756,096)。

如上所述, 本文所用术语“抗体”包括人源化抗体。“人源化”指含有的非人免疫球蛋白序列最少的抗体形式。人源化抗体的大部分序列是人免疫球蛋白(接受者抗体), 但该接受者抗体的超变区(也称为互补决定区或 CDR)残基被具有所需特异性、亲和力或活性的非人动物(供者抗体), 例如小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类的超变区残基取代。短语“互补决定区”指共同确定了天然免疫球蛋白结合位点 Fv 区结合亲和力和特异性的氨基酸序列。参见例如, Chothia 等, (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Kabat 等, (1991) 美国健康与人类服务部(U. S. Dept. of Health and Human Services), NIH 公布号 91-3242)。短语“恒定区”指抗体分子中赋予效应器功能的那部分。在以前制备用于治疗人疾病的无免疫原性抗体的研究中, 小鼠恒定区被人恒定区取代。这些人源化抗体的恒定区衍生自人免疫球蛋白。然而, 这些人源化抗体仍能在人中引发不良且可能危险的免疫应答并且损失了亲和力。

人源化可根据 Winter 及其同事(Jones 等, (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann 等, (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen 等, (1988) *Science* 239: 1534-1536)的方法用啮齿类或突变型啮齿类 CDR 或 CDR 序列取代人抗体的相应序列。也参见纳入本文作为参考的美国专利号 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762 和 5,859,205。在一些例子中, 人免疫球蛋白的一个或

多个可变区的框架区内的残基为对应的非人残基所取代(参见, 例如美国专利号 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762 和 6,180,370)。此外, 人源化抗体可含有在受者抗体或供者抗体中没发现的残基。制备这些修饰可进一步精制抗体的性能(例如, 获得所需的亲和力)。总体上, 人源化抗体所含的所有可变区、至少一个, 通常两个可变区中所有或基本上所有的超变区是对应的非人免疫球蛋白序列, 所有或基本上所有的框架区是对应的人免疫球蛋白序列。人源化抗体也任选包含免疫球蛋白恒定区(Fc), 通常是人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。更多的细节见引作参考的 Jones 等, (1986) *Nature* 331: 522-525; Riechmann 等, (1988) *Nature* 332: 323-329; 和 Presta (1992) *Curr.Op.Struct.Biol.* 2: 593-596。因此, 这种“人源化”抗体可包括基本上不是整个人可变区被非人种类的相应序列取代的抗体。实际上, 人源化抗体通常是其中一些 CDR 残基和可能的一些框架残基被啮齿类抗体中类似位点的残基取代的人抗体。参见, 例如美国专利号 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 5,859,205。也参见美国专利号 6,180,370, 和国际公布号 WO 01/27160, 其中公开了人源化抗体和如何产生对预定抗原具有改进亲和力的人源化抗体的方法。

也可采用人类工程改造(人 Engineering™)技术(索马公司(Xoma Ltd.), 加州伯克利(Berkeley, California))产生人源化抗 CD40 抗体。

人源化抗 CD40 单克隆抗体包括抗体如 SGN-40 (Tai 等(2004) *Cancer Res.* 64:2846-52; 美国专利号 6,838,261), 它是鼠抗 CD40 抗体 SGN-14 的人源化形式 (Francisco 等(2000) *Cancer Res.* 60:3225-31) 和美国专利申请公开号 2004/0120948 所述的抗体; 将其全文纳入本文作参考。

也可采用非人哺乳动物宿主, 更具体说是以灭活的内源性免疫球蛋白(Ig)基因座为特征的转基因小鼠产生的异种或修饰的抗-CD40 抗体来实施本发明。这种转基因动物原先表达宿主免疫球蛋白轻链和重链的活性内源性基因失去功能而被同类人免疫球蛋白基因座取代。这些转基因动物产生基本上没有宿主免疫球蛋白轻或重链亚基的人抗体。参见, 例如纳入本文作为参考的美国专利号 5,877,397 和 5,939,598。

因此, 在一些实施方式中, 通过(例如)免疫转基因小鼠获得抗 CD40 的完

全人抗体。用捷诺小鼠(XenoMouse[®])技术(阿布吉尼克斯公司(Abgenix); 加州弗里蒙特(Fremont, California))获得一只这类小鼠, 参见美国专利号 6,075,181、6,091,001 和 6,114,598, 将所有内容纳入本文作参考。例如, 为了产生 CHIR-12.12 抗体, 用表达人 CD40 的 Sf9 细胞免疫含有人 IgG1 重链基因座和人 κ 轻链基因座的转基因小鼠。小鼠也可转入其它同种型的基因。用于本发明方法的完全人抗 CD40 抗体的特征是结合特性与 CHIR-12.12 单克隆抗体相似。

如上所述, 本文所用术语“抗体”也包括可结合抗原的抗体片段。“抗体片段”指完整抗体的一部分, 优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab₂、F(ab')₂ 和 Fv 片段; 双抗体; 线性抗体(Zapata 等(1995) *Protein Eng.* 10:1057- 1062); 单链抗体分子; 和抗体片段形成的多特异性抗体。用木瓜蛋白酶消化抗体产生了各自含有一个抗原-结合位点的两种相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段)和残留的“Fc”片段, 此名称反映了易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生含有两个抗原结合位点仍能交联抗原的 F(ab')₂ 片段。

“Fv”是含有完整的抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该区由非共价紧密结合的一条重链可变区和一条轻链可变区的二聚体组成。每个可变区的 3 个 CDR 正是以这种构型相互作用而确定了 V_H-V_L 二聚体表面上的抗原结合位点。6 个 CDR 共同赋予了该抗体的抗原结合特异性。然而, 即使一个可变区(或仅含有 3 个抗原特异性 CDR 的半个 Fv)也能识别并结合抗原, 虽然亲和力低于完整的结合位点。

Fab 片段也含有轻链恒定区和重链第一恒定区(C_H1)。Fab 片段因在重链 C_H1 结构域的羧基末端多几个残基(包括抗体绞链区的一个或多个半胱氨酸残基)而不同于 Fab' 片段。本文称为 Fab'-SH 的是恒定区半胱氨酸残基带有一个游离巯基的 Fab'。通过还原 F(ab')₂ 片段的重链二硫桥键产生 Fab' 片段。抗体片段的其它化学偶联反应也是已知的。

抗 CD40 抗体片段适用于本发明方法, 只要它们保持全长抗体的所需亲和力。因此, 例如, 抗 CD40 抗体片段将保持结合 CD40 抗原的能力。这类片段的特征是特性类似于对应的全长抗体。因此, 例如, 全长拮抗性抗 CD40 抗体的片段优选能够特异性结合人细胞表面上表达的人 CD40 抗原, 并且在结合于人 CD40 表达细胞上的 CD40 抗原时没有显著的激动活性, 但具有拮抗活性。

在本文中将这类片段称为“抗原结合”片段。用于本发明方法的抗 CD40 抗体片段优选保持了结合相关 FcR 的能力。因此，例如，抗 CD40 抗体片段可以保持结合 FcγRIIIa 的能力。因此，例如，全长抗 CD40 抗体的片段既能够特异性结合细胞表面 CD40 抗原，也能结合人效应细胞，如自然杀伤(NK)细胞上的 FcγRIIIa。在本文中将这类片段称为“FcR 结合”片段。这类片段通常包含重链恒定区的至少一部分。

已经开发了产生抗体片段的各种技术。传统上，通过蛋白酶水解消化完整抗体产生这些片段(参见例如，Morimoto 等(1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)和 Brennan 等(1985) *Science* 229:81)。然而，现在可通过重组宿主细胞直接产生这些片段。例如，可由上述抗体噬菌体文库分离这种抗体片段。或者，可由大肠杆菌直接回收 Fab'-SH 片段，并化学偶联形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等(1992) *Bio/Technology* 10:163-167)。按照另一种方法，可由重组宿主细胞培养物直接分离 F(ab')₂ 片段。本领域技术人员明白产生抗体片段的其它技术。

抗体的合适抗原结合片段包含全长抗体的一部分，通常是它的抗原结合区或可变区。抗体片的例子包括但不限于：Fab、F(ab')₂ 和 Fv 片段和单链抗体分子。“Fab”指由轻链和部分重链组成的免疫球蛋白的单价抗原结合片段。F(ab')₂ 指含有两条轻链和两条重链的一部分的免疫球蛋白的二价抗原结合片段。“单链 Fv”或“sFv”抗体片段指含有抗体的 V_H 和 V_L 结构域的片段，其中这些结构域以一条多肽链的形式存在。参见，例如纳入本文作为参考的美国专利号 4,946,778；5,260,203；5,455,030 和 5,856,456。Fv 多肽通常在 V_H 和 V_L 结构域之间还含有一多肽接头使 sFv 形成能与抗原结合所需的结构。sFv 的综述见 Pluckthun (1994) 《单克隆抗体的药理学》(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies)，第 113 卷，Rosenburg 和 Moore 编，(Springer-Verlag, New York)，269-315 页。如下文所述，本文公开的拮抗性抗-CD40 抗体的抗原结合片段也可与细胞毒素偶连以杀伤靶细胞，如本文以下的描述。

在本发明的一些实施方式中，抗 CD40 抗体是拮抗性抗 CD40 抗体。当这种抗体结合人细胞如人 B 细胞表面上展示的 CD40 时，它们不会产生显著的拮

抗活性。在一些实施方式中，它们与人细胞表面上展示的 CD40 结合导致抑制了这些人细胞的增殖和分化。适用于本发明方法的抗 CD40 抗体包括可能对细胞表面表达 CD40 抗原的正常和恶性人细胞有拮抗活性的抗体。

“激动活性”指某物质的功能是激动剂。激动剂与细胞上的受体结合，并启动与受体天然配体相似或相同的反应或活性。CD40 激动剂能诱导以下反应(但不限于此)中的任何或所有反应：B 细胞增殖和/或分化；通过诸如 ICAM-1、E-选择素、VCAM 等分子上调细胞间粘附；分泌促炎细胞因子如 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、TNF 等；通过 CD40 受体经由 TRAF(如 TRAF2 和/或 TRAF3)、MAP 激酶如 NIK(NF- κ B 诱导激酶)、I- κ B 激酶(IKK α/β)、转录因子 NF- κ B、Ras 和 MEK/ERK 途径、PI3K/AKT 途径、P38 MAPK 途径等进行信号转导；通过诸如 XIAP、mcl-1、bcl-x 等分子转导抗凋亡信号；产生 B 和/或 T 记忆细胞；B 细胞产生抗体；B 细胞同种型转换，II 类 MHC 和 CD80/86 的细胞表面表达上调等。

“显著性”激动活性指经过 B 细胞应答试验测定，比中性物质或阴性对照诱导的激动活性高至少 30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 100%的激动活性。优选地，“显著性”激动活性是经过 B 细胞应答试验测定，比中性物质或阴性对照诱导的激动活性高至少 2 倍或至少 3 倍的激动活性。因此，例如，当感兴趣的 B 细胞应答是 B 细胞增殖时，“显著性”激动活性是诱导比中性物质或阴性对照诱导的 B 细胞增殖水平高至少 2 倍或至少 3 倍的 B 细胞增殖水平。在一个实施方式中，不结合 CD40 的非特异性免疫球蛋白如 IgG1 用作阴性对照。经过 B 细胞应答试验测定，“无显著激动活性”的物质的激动活性比中性物质或阴性对照诱导的激动活性高不超过约 25%，优选不超过约 20%、15%、10%、5%、1%、0.5%，或者甚至比中性物质或阴性对照诱导的激动活性高不超过约 0.1%。

“拮抗活性”指某物质的功能是拮抗剂。CD40 的拮抗剂防止或降低了 CD40 受体与激动剂配体(具体是 CD40L)结合所诱导的任何反应。拮抗剂可能使对激动剂结合所诱导的任何一种或多种应答降低 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%，优选 40%、45%、50%、55%、60%，更优选降低 70%、80%、85%，最优选 90%、95%、99%或 100%。测定抗 CD40 治疗剂如本领域已知抗 CD40

抗体的 CD40 配体结合特异性和拮抗活性的方法包括但不限于：标准竞争性结合试验、监测 B 细胞分泌免疫球蛋白的试验、B 细胞增殖试验、Banchereau 样-B 细胞增殖试验、抗体产生的 T 辅助细胞试验、共同刺激 B 细胞增殖试验和上调 B 细胞激活标记的试验。参见例如，纳入本文作参考的 WO 00/75348 和美国专利号 6,087,329 所述的试验。也参见 WO 2005/044854、WO 2005/044304、WO 2005/044305、WO 2005/044306、WO 2005/044855、WO 2005/044307 和 WO 2005/044294WO，将其全部内容纳入本文作参考。

可通过证明 CHIR-12.12 缺少激动活性的试验评估拮抗剂/缺少激动活性。US 5677165(希龙公司(Chiron Corporation))描述的试验中显示了合适的试验。

在本发明的一个实施方式中，拮抗性抗 CD40 抗体在一种细胞应答中没有显著的激动活性。在本发明的另一实施方式中，拮抗性抗 CD40 抗体在一种以上细胞应答(例如，增殖和分化，或者增殖、分化和 B 细胞的抗体生产)反应试验中没有显著的激动活性。

特别感兴趣的是结合人 B 细胞 CD40 抗原时没有本文所述的显著性激动活性，但具有拮抗活性的拮抗性抗 CD40 抗体。在本发明的一个实施方式中，拮抗性抗 CD40 抗体在一种 B 细胞应答中没有显著的激动活性。在本发明的另一实施方式中，拮抗性抗 CD40 抗体在一种以上 B 细胞应答(如增殖和分化，或者增殖、分化和抗体生产)的试验中没有显著的激动活性。

可采用本领域已知的任何试验确定抗 CD40 抗体是否可用作一种或多种 B 细胞应答的拮抗剂。在一些实施方式中，抗 CD40 抗体用作选自以下至少一种 B 细胞应答的拮抗剂：B 细胞增殖、B 细胞分化、抗体生产、细胞间粘附、产生记忆 B 细胞、同种型转换、上调 II 类 MHC 和 CD80/86 的细胞表面表达和分泌促炎细胞因子如 IL-8、IL-12 和 TNF。特别感兴趣的是结合于人 B 细胞表面 CD40 抗原时对 B 细胞增殖无显著激动活性的拮抗性抗 CD40 抗体。

在一个这类实施方式中，抗 CD40 抗体是经 B 细胞增殖试验测定，可溶性或细胞表面 CD40L 诱导的 B 细胞增殖的拮抗剂。本领域了解合适的 B 细胞增殖试验。优选地，拮抗性抗 CD40 抗体刺激 B 细胞增殖的水平不到中性物质或阴性对照诱导的 B 细胞增殖的约 25%，优选不到约 20%、15%、10%、5%、1%、0.5%，或者甚至不到中性物质或阴性对照诱导的 B 细胞增殖高的约 0.1%。

在其它实施方式中,所述抗 CD40 抗体是经过 B 细胞增殖测定,另一抗 CD40 抗体,如 S2C6 抗 CD40 抗体诱导的 B 细胞增殖的拮抗剂,在拮抗性抗 CD40 抗体存在下其它抗 CD40 抗体刺激的 B 细胞增殖水平不到没有拮抗性抗 CD40 抗体时其它抗 CD40 抗体诱导的 B 细胞增殖的约 25%(即至少抑制 75%),优选不到约 20%、15%、10%、5%、1%、0.5%,或者甚至不到没有拮抗性抗 CD40 抗体时其它抗 CD40 抗体诱导的 B 细胞增殖的约 0.1%。

在其它实施方式中,抗 CD40 抗体是经 B 细胞活化试验测定,细胞系 EL4B5 诱导的 B 细胞增殖的拮抗剂,在拮抗性抗 CD40 抗体存在下 EL4B5 细胞系刺激的 B 细胞增殖水平不到没有拮抗性抗 CD40 抗体时此细胞系诱导 B 细胞增殖的约 25%(即至少抑制 75%),优选不到约 20%、15%、10%、5%、1%、0.5%,或者甚至不到没有拮抗性抗 CD40 抗体时这一细胞系诱导的 B 细胞增殖的约 0.1%。

在其它实施方式中,所述抗 CD40 抗体如用人 T 细胞辅助人 T 细胞产生抗体试验测定那样,是人 T 细胞诱导抗体产生的拮抗剂。以此方式,不存在拮抗性抗 CD40 抗体时,IgG 抗体产生 IgM 抗体或者产生 IgG 和 IgM 抗体的水平不到缺乏该拮抗性抗 CD40 抗体时 T 细胞刺激 B 细胞产生各种抗体的约 50%(即至少抑制了 75%),优选不到约 25%、20%、15%、10%、5%、1%、0.5%,或者甚至更优选不到缺乏该拮抗性抗 CD40 抗体时 T 细胞刺激 B 细胞产生各种抗体的约 0.1%。其它拮抗性抗 CD40 抗体包括称为 5D12、3A8 和 3C6 的单克隆抗体,分别由 ATCC 登录号 HB 11339、HB 12024 和 HB 11340 的杂交瘤分泌。参见例如,美国专利号 6,315,998,将其全文纳入本文作参考。

本领域已知拮抗性抗 CD40 抗体。参见例如,美国专利申请公开号 20020142358 和 20030059427 公开的称为 F4-465 的杂交瘤产生的人抗 CD40 抗体;将其全文纳入本文作参考。F4-465 获自 HAC 小鼠(Kuroiwa 等(2000) *Nature Biotech* 10:1086 (2000)),因此表达人 λ 轻链。也参见 WO 2005/044854、WO 2005/044304、WO 2005/044305、WO 2005/044306、WO 2005/044855、WO 2005/044307 和 WO 2005/044294 WO,将其全部内容纳入本文作参考。

除拮抗活性外,用于本发明方法的抗 CD40 抗体优选具有另一种作用于靶细胞的机制。例如,抗 CD40 抗体优选具有 ADCC 活性。或者,可以在具有

ADCC活性的另一抗体同种型上表达抗CD40抗体的可变区。也可能将抗CD40抗体的天然形式、重组形式或抗原结合片段偶联于细胞毒素、治疗剂或放射性金属离子或同位素，如本文其它地方所述的那样。

如本文其它地方所述，本发明者惊讶地发现，与其它抗体相反，抗CD40抗体如CHIR-12.12能够通过结合于病人自然杀伤(NK)细胞上两种FcγRIIIa氨基酸158同种异型(V或F)之一介导对表达CD40的靶细胞强效抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。因此，除FcγRIIIa-158V纯合子病人(基因型V/V)外，抗CD40抗体如CHIR-12.12可用于治疗FcγRIIIa-158F杂合或纯合子病人(基因型V/F或F/F)细胞表达CD40的炎性疾病和自身免疫病。对利妥昔单抗(利妥昔®)治疗无反应的炎性疾病和自身免疫病的治疗而言，本发明特别有利，因为已证明NHL中利妥昔单抗的临床活性与患者的FcγRIIIa基因型相关联。

因此，用于本发明方法的特别优选的抗CD40抗体是除拮抗活性以外，能够介导表达FcγRIIIa的人效应细胞如自然杀伤细胞(NK细胞)对CD40表达细胞的ADCC作用的抗CD40抗体。最优选如本文其它地方所述能够以高亲和力结合FcγRIIIa-158F和FcγRIIIa-158V的抗CD40抗体。

特别优选如WO 2005/044854、WO 2005/044304、WO 2005/044305、WO 2005/044306、WO 2005/044855、WO 2005/044307和WO 2005/044294WO所述的抗CD40抗体，将其全部内容纳入本文作参考。

本发明特别感兴趣的是共享WO 2005/044854、WO 2005/044304、WO 2005/044305、WO 2005/044306、WO 2005/044855、WO 2005/044307和WO 2005/044294所述的CHIR-12.12单克隆抗体结合特性的拮抗性抗CD40抗体。这类抗体包括但不限于：

- a)单克隆抗体CHIR-12.12；
- b)杂交瘤细胞系12.12产生的单克隆抗体；
- c)包含选自以下氨基酸序列的单克隆抗体：SEQ ID NO:2所示序列、SEQ ID NO:4所示序列、SEQ ID NO:5所示序列、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4所示序列以及SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:5所示序列；
- d)具有含有选自以下核苷酸序列的核酸分子编码的氨基酸序列的单克隆抗体：SEQ ID NO:1所示序列、SEQ ID NO:3所示序列以及SEQ ID NO:1和

SEQ ID NO:3 所示序列;

e)能够与杂交瘤细胞系 12.12 产生的单克隆抗体表位结合的单克隆抗体;

f)结合含有 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:9 所示的人 CD40 序列残基 82-87 的表位的单克隆抗体;

g)结合含有 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:9 所示的人 CD40 序列残基 82-89 的表位的单克隆抗体;

h)在竞争性结合试验中与单克隆抗体 CHIR-12.12 竞争的单克隆抗体;

i)前述项目 a)所述的单克隆抗体或前述项目 c)-h)中任一项所述的单克隆抗体,所述抗体是重组产生的;和

j)作为前述项目 a)-i)中任一项所述单克隆抗体的抗原结合片段的单克隆抗体,所述片段保持了特异性结合所述人 CD40 抗原的能力。

单克隆抗体 CHIR-12.12 特别优选用于本发明方法。

单克隆抗体 CHIR-12.12 的详细描述见 WO 2005/044854、WO 2005/044304、WO 2005/044305、WO 2005/044306、WO 2005/044855、WO 2005/044307 和 WO 2005/044294。CHIR-12.12 抗体是杂交瘤细胞系 153.8E2.D10.D6.12.12 (称为细胞系 12.12)产生的 IgG1 同种型的完全人抗 CD40 单克隆抗体。利用含有人 IgG1 重链基因座和人 κ 链基因座的免疫的异种型小鼠(捷诺小鼠®技术;阿布吉尼克斯公司;加州弗里蒙特)的脾细胞产生该细胞系。将此脾细胞与小鼠骨髓瘤 SP2/0 细胞(斯拉生物来源公司(Sierra BioSource))融合。多次亚克隆得到的杂交瘤,才得到稳定的单克隆细胞系 12.12。如本文其它地方所述,类似地可采用经人免疫球蛋白基因座转基因的小鼠制备适用于本发明方法的其它抗体。

通过流式细胞术测定,在 ELISA 型试验中 CHIR-12.12 单克隆抗体能结合可溶性 CD40,防止 CD40-配体与细胞表面 CD40 结合,并取代预先结合的 CD40-配体。抗体 CHIR-5.9 和 CHIR-12.12 互相竞争性结合 CD40,但不与 15B8 竞争,15B8 是 2000 年 10 月 2 日提交的题为“人抗 CD40 抗体”(Human Anti-CD40 Antibodies)的美国临时申请序列号 60/237,556 和 2001 年 10 月 2 日提交的题为“人抗 CD40 抗体”(Human Anti-CD40 Antibodies)并公开为 WO 2002/028904 的 PCT 国际申请号 PCT/US01/30857(律师案卷号 PP 16092.003)所述的抗 CD40

单克隆抗体，将上面两篇文献全文纳入本文作参考。体外检测对正常人 B 细胞增殖的影响时，CHIR-12.12 用作拮抗性抗 CD40 抗体。而且，CHIR-12.12 不诱导正常人淋巴细胞强烈增殖。该抗体能够通过抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)杀伤表达 CD40 的靶细胞。经 Biacore™试验测定，CHIR-12.12 对人 CD40 的结合亲和力为 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 。

本文提供了 CHIR-12.12 抗体可变区的核苷酸和氨基酸序列。更具体说，mAb CHIR-12.12 的轻链和重链的前导区、可变区和恒定区的氨基酸序列见 SEQ ID NO:2 (mAb CHIR-12.12 轻链的完整序列)、SEQ ID NO:4 (mAb CHIR-12.12 重链的完整序列)和 SEQ ID NO: 5 (SEQ ID NO:4 所列的 mAb CHIR-12.12 重链变体的完整序列，该变体中用丝氨酸取代了 SEQ ID NO: 4 位置 153 上的丙氨酸残基)。编码 mAb CHIR-12.12 轻链和重链的核苷酸序列见 SEQ ID NO: 1(mAb CHIR-12.12 轻链的编码序列)和 SEQ ID NO:3 (mAb CHIR-12.12 重链的编码序列)。表达 CHIR-12.12 抗体的杂交瘤保藏在 ATCC，专利保藏号为 PTA-5543。

用于本发明方法的抗 CD40 抗体包括与 CHIR-12.12 单克隆抗体不同但仍保持 CDR 的抗体，和加入、缺失或取代了一个或多个氨基酸的抗体。用于本发明方法的抗 CD40 抗体也可以是去免疫的(de-immunized)抗体，特别是去免疫的拮抗性抗 CD40 抗体，可以如纳入本文作参考的国际公开号 WO 98/52976 和 WO 0034317 所述制备这种抗体。以此方式修饰本发明拮抗性抗 CD40 抗体内的残基，以使该抗体对人无免疫原性或免疫原性较低，同时保持其对人 CD40 表达细胞的拮抗活性，这种活性可通过本文其它地方描述的试验测定。本发明范围还包括含有感兴趣抗体，如拮抗性抗 CD40 抗体或拮抗性抗 CD40L 抗体或其片段的融合蛋白，本领域众所周知，可以合成该融合蛋白或由对应的多核苷酸载体表达。本文其它地方有关抗体偶联的描述中介绍了这种融合蛋白。

可能含有以下文献所述方法产生具有感兴趣结合特异性的序列变异的任何已知抗体，这些文献是(例如)专利公开号 EP 0983303 A1、WO 00/34317 和 WO 98/52976，纳入本文作参考。例如，已证明 CDR 内的序列可导致抗体结合于 II 类 MHC 并引发不良的 T 辅助细胞反应。保守取代可能使抗体保持结合活性，但除去其引发不良 T 细胞反应的能力。可以用本领域公知的方法进行

这类保守或非保守取代,如本文其它地方所述,得到的抗体也可用于本发明方法。通常可用本文所述方法检测变异抗体有无特定活性,例如,拮抗活性、亲和力和特异性。

例如,可通过突变编码感兴趣抗体的克隆的DNA序列制备拮抗性抗CD40抗体,如CHIR-12.12单克隆抗体的氨基酸序列变体。本领域熟知诱变和改变核苷酸序列的方法。参见例如, Walker 和 Gastra 编(1983) *Techniques in Molecular Biology*(分子生物学技术)(麦克米兰出版公司(MacMillan Publishing Company), 纽约); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel 等(1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382; Sambrook 等(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(分子克隆: 试验室手册) (冷泉港, 纽约); 美国专利号 4,873,192; 和其中引用的参考文献; 纳入本文作参考。不影响感兴趣多肽的生物学活性的合适氨基酸取代的指南可参见纳入本文作为参考的 Dayhoff 等, (1978) 《蛋白质序列和结构图》(Atlas of Protein Sequence and Structure), (Natl. Biomed. Res. Found., 华盛顿特区)中的模型。优选保守取代,例如用具有相似特性的另一氨基酸取代一个氨基酸。保守取代的例子包括,但不限于 Gly↔Ala、Val↔Ile↔Leu、Asp↔Glu、Lys↔Arg、Asn↔Gln 和 Phe↔Trp↔Tyr。

在构建感兴趣抗体,如感兴趣拮抗性抗-CD40抗体多肽的变体过程中,进行修饰使变体继续具有所需活性,即相似的结合亲和力并且对于拮抗性抗CD40抗体而言是能否特异性地结合人细胞表面表达的CD40抗原,当与人CD40表达细胞的CD40抗原结合时无明显激动活性而显示拮抗活性。显然,编码这种变体多肽的DNA中的任何突变都必须不能将其序列置于读码框外并且优选不生成可能产生二级mRNA结构的互补区。参见欧洲专利公布号 75,444。

此外,可以许多方式使拮抗性抗-CD40抗体的恒定区突变而改变其效应器功能。例如,参见美国专利号 6,737,056B1 和美国专利申请公布号 2004/0132101A1 所述Fc突变能优化抗体与Fc受体结合。

优选地,参比抗体如拮抗性抗CD40抗体的变体的氨基酸序列与参比抗体如拮抗性抗CD40抗体分子(如本文所述CHIR-12.12单克隆抗体)或者参比抗体

分子的较短部分的序列相同性为至少 70%或 75%，优选至少 80%或 85%，更优选至少 90%、91%、92%、93%、94%或 95%。更优选地，这些分子共享至少 96%、97%、98%或 99%的序列相同性。出于本发明的目的，可使用 Smith-Waterman 所述的同源性检索算法以相关空格(affine gap)检索确定序列相同性百分比，所用参数为空格开放罚分 12、空格延伸罚分 2 和 BLOSUM 矩阵 62。Smith-Waterman 同源性检索算法的说明见 Smith 和 Waterman, (1981), *Adv. Appl. Math.* 2:482-489。例如，变体与参比抗体如拮抗性抗-CD40 抗体有少至 1-15 个氨基酸残基、少至 1-10 个氨基酸残基，如 6-10，少至 5 个、少至 4 个、3 个、2 个、甚至 1 个氨基酸残基的不同。

就两条氨基酸序列的最佳比对而言，与参比氨基酸序列相比，变体氨基酸序列的毗连区段可具有添加的氨基酸残基或删除的氨基酸残基。用于和参比氨基酸序列比较的毗连区段包括至少 20 个毗连氨基酸残基，可以是 30、40、50 或更多个氨基酸残基。可对与保守残基取代或空格相关的序列相同性进行校正(参见 Smith-Waterman 同源性检索算法)。

能特异性结合 CD40 并保留拮抗活性的多肽（特别是当与靶细胞上的 CD40 抗原结合时）的精确化学结构取决于许多因素。由于分子中存在可电离的氨基和羧基，获得的特定多肽可以是酸性盐或碱性盐，或中性盐形式。能在合适的环境中保留它们的生物活性的所有这种制剂包括在本文所用的拮抗性抗-CD40 抗体的定义中。此外，可通过使用糖组分衍生(糖基化)或其它补充分子，例如脂质、磷酸、乙酰基等加强该多肽的一级氨基酸序列。也可通过与糖偶联来增加。这种增加的某些方面内容可通过生产宿主的翻译后加工系统来实现；可在体外引入其它这种修饰。在任何情况中，只要抗-CD40 抗体的拮抗性能未遭破坏，这种修饰就包括在本文所用的抗-CD40 抗体的定义中。在各种试验中，期望这种修饰可通过提高或降低该多肽的活性来定量或定性地影响其活性。此外，可通过氧化、还原或其它衍生方式来修饰链中的各个氨基酸残基，可切割该多肽得到保留活性的片段。这种不破坏拮抗活性的改变未将该多肽序列排除在本文所用感兴趣的抗-CD40 抗体的定义之外。

本领域提供了关于多肽变体的制备和使用的基本指南。在制备抗-CD40

抗体变体过程中，本领域的技术人员不难确定对天然蛋白核苷酸或氨基酸序列的哪种修饰将导致产生适合本发明方法药物组合物中所用的治疗性活性组分的变体。

用于本发明方法的抗 CD40 抗体在体外和/或体内优选具有至少一种以下生物学活性：抑制 T 细胞刺激的正常人外周 B 细胞分泌免疫球蛋白；抑制 CD40L 表达细胞或可溶性 CD40 配体(sCD40L)刺激的正常人外周 B 细胞的存活和/或增殖；抑制 Jurkat T 细胞刺激的正常人外周 B 细胞的存活和/或增殖；抑制 sCD40L 或固相 CD40L 刺激的任何细胞产生“存活”性抗-凋亡胞内信号；抑制与 sCD40L 或固相 CD40L 连接、缺失、无反应(anergy)和/或诱导携带 CD40 的靶细胞或携带 CD40 相关配体的细胞(包括但不限于 T 细胞和 B 细胞)耐受时任何细胞中的 CD40 信号转导，诱导 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的扩增和激活(参见例如，供者同种抗原通过 CD40-CD40L 干扰的-特异性组织排斥，van Maurik 等(2002) *J. Immunol.* 169:5401-5404)，通过任何机制(包括但不限于：抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)、下调增殖、和/或靶细胞凋亡)发生的细胞毒性、调节靶细胞细胞因子分泌和/或细胞表面分子表达和它们的组合。

可以如本文所述和以下文献所述，进行这些生物学活性的试验，这些文献是(如)2003 年 11 月 4 日、2003 年 11 月 6 日和 2004 年 4 月 27 日提交的题为“拮抗性抗 CD40 单克隆抗体和其使用方法”(Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use)的临时申请，以及美国专利申请 60/517,337 (律师案卷号 PP20107.001 (035784/258442))、60/525,579 (律师案卷号 PP20107.002 (035784/271525))和 60/565,710 (律师案卷号 PP20107.003 (035784/277214))；以及 2004 年 11 月 4 日提交的题为“拮抗性抗 CD40 单克隆抗体和其使用方法”(Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use)公开为 WO 2005/044854 的国际专利申请 PCT/US2004/037152 (律师案卷号 PP20107.004 (035784/282916))；将这些文献的全部内容纳入本文作参考。也参见纳入本文作参考的 Schultze 等(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8200-8204；Denton 等(1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6-15；Evans 等(2000) *J. Immunol.* 164:688- 697；Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-22；Lederman

等(1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3:77-86; Coligan 等(1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwekkeboom 等(1993) *Immunology* 79:439-444; 和美国专利号 5,674,492 和 5,847,082 所述的试验。

检测本文鉴定的 CD40-抗原表位的特异性拮抗性抗 CD40 抗体的代表性试验是“竞争性结合试验”。竞争性结合试验是通过未知物抑制标记的已知配体和其特异性抗体结合的能力来检测和定量未知物的血清学试验。也称为竞争性抑制试验。在代表性的竞争性结合试验中,标记的 CD40 多肽被样品中的候选抗体沉淀,例如与针对本发明单克隆抗体的一种或多种表位而制备的单克隆抗体结合而沉淀。可通过筛选针对 CD40 蛋白或含有感兴趣 CD40 蛋白特定表位的蛋白片段而制备的一系列抗体来鉴定能与感兴趣表位发生特异性反应的抗-CD40 抗体。例如,就人 CD40 而言,感兴趣表位包括含有以下同种型的线性和/或非线性氨基酸残基的表位:人 CD40 的短同种型(参见由 SEQ ID NO:9 所列序列编码的 SEQ ID NO: 10 所列的 GenBank 登录号 NP_690593; 也参见 GenBank 登录号 NM_152854), 或人 CD40 的长同种型(参见由 SEQ ID NO:11 所列序列编码的 SEQ ID NO: 12 所列的 GenBank 登录号 CAA43045 和 NP_001241; 参见 GenBank 登录号 X60592 和 NM_001250)。或者,可用以前鉴定的合适的拮抗性抗-CD40 抗体进行竞争性结合试验来选择与以前鉴定的抗体相当的单克隆抗体。

这种免疫试验采用的抗体可以是标记的或未标记的。未标记的抗体可用于凝集试验; 采用各种各样标记物的标记抗体可用于各种试验。使抗体与可检测物质结合有助于检测抗-CD40 抗体与感兴趣表位之间形成的抗体-抗原复合物。合适的检测方式包括使用例如放射性核素、酶、辅酶、荧光剂、化学发光剂、色原、酶底物或辅助因子、酶抑制剂、辅基复合物、自由基、颗粒、染料等标记。酶合适例子包括: 辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶; 合适的辅基复合物例子包括: 链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素; 合适的荧光物质例子包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白; 发光物质的例子是鲁米诺; 生物发光物质的例子包括萤光素酶、萤光素和水母蛋白; 合适的放射性物质的例子包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。这种标记的试

剂可用于各种熟知的试验，例如放射性免疫试验，酶免疫试验如 ELISA、荧光免疫试验等。参见，例如美国专利号 3,766,162；3,791,932；3,817,837 和 4,233,402。

也可工程改造抗体，以提高其 ADCC 活性。具体说，CH2 结构域的羧基端一半对 FcRIII 受体介导的 ADCC 至关重要。由于 CH2 和绞链区对效应物功能有重要作用，所以可制备含有额外 CH2 和/或绞链区的一系列多结构域抗体，并研究其效应物功效的改变(参见 Greenwood, J., Gorman, S.D., Routledge, E.G., Lloyd, L.S. & Waldmann, H., *The Immunol.* 1994 年 10 月; 1(5):247-55)。另一种方法是平行工程改造额外结构域，例如，将半胱氨酸工程改造加入到嵌合 Ig 的 H 链中以产生二聚体(参见 Shopes B.(1992) *J. Immunol.* 1992 1; 148(9): 2918-22)。而且，可将突变引入 Fc 区(参见例如，US 6,737,056 B1)、在岩藻糖基转移酶缺陷细胞系的细胞中表达(参见例如，US2003/0115614)，或对抗体糖基化实施其它改变(参见例如，US 6,602,684)经工程改造而提高 ADCC 活性。

本发明的特别优点是能治疗细胞表达 CD20 的炎症疾病和自身免疫病，特别是利妥昔®抗性患者，更特别是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)。

本文所用“抗-CD20 抗体”包括特异性识别 CD20 细胞表面抗原的任何抗体，包括保持了抗 CD20 母抗体的抗原结合功能的多克隆抗体、单克隆抗体、单链抗体和其片段，如 Fab、F(ab')₂、Fv 和其它片段。本发明方法中特别感兴趣的是具有 IDEC-C2B8 单克隆抗体(拜基 IDEC 公司(Biogen IDEC Inc.)，马萨诸塞州剑桥(Cambridge, MA))的结合特性的抗-CD20 抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方式中，在合适的试验模型中用等量的这些抗体测定治疗活性时，用于本发明方法的抗 CD40 抗体的治疗活性高于嵌合抗-CD20 单克隆抗体 IDEC-C2B8。IDEC-C2B8 (IDEC 制药公司，加州圣地亚哥；以商品名利妥昔®在市场上销售，也称为利妥昔单抗)是含有人 IgG1 和 κ 恒定区以及分离自鼠抗-CD20 单克隆抗体 IDEC-2B8 的可变区的嵌合抗-CD20 单克隆抗体(Reff 等 (1994) *Blood* 83:435-445)。利妥昔®被批准用于治疗复发性 B 细胞低级瘤或滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)，并且处于治疗自身免疫病的临床试验中。发现与利妥昔单抗相比治疗活性优异的抗体可显著改进炎症疾病和自身免疫病的治疗

方法。

存在用于检测对全身性红斑狼疮(SLE)、多发性硬化、炎症和动脉硬化症、移植和阿尔茨海默病(如下所述)的活性的合适模型。

例如,为了检测对人类全身性红斑狼疮(SLE)的功效,将 SLE 患者的外周血单核细胞(PMBC)移植到 SCID 小鼠中。参见例如, Duchosal 等(1990) *J. Exp. Med.* 172: 985-8 所述的模型。将 SLE 患者的 PBMC 转移到 SCID 小鼠中后,测定治疗能否影响 T 淋巴细胞对自身抗原的反应和自身抗体的产生,以及疾病表现如肾小球肾炎。

绒猴实验性自身免疫性脑炎(EAE)是人多发性硬化症的一种模型。参见,例如 Raine 等, (1999), *Ann. Neurol.* 46: 144-60 和 Hart 等, (2004), *Lancet Neurol.* 3:588-97 所述的模型。

体外测试了抗体抑制 CD40L-诱导的基质降解酶的产生、组织因子表达、促炎性细胞因子和上调粘附分子的能力。随后的研究利用表达人 CD40 和/或 CD20 分子的转基因小鼠测试了抗体体内抗炎活性的能力。参见,例如 Yasui, (2002), *Int. Immunol.* 14: 319-29 所述的模型。

可以在非人灵长类模型中测试抗体防止移植排斥的能力。用抗体处理猕猴肾同种异体移植受者来证明用或不用其它免疫抑制药物,例如环孢菌素、FK506、雷帕霉素、皮质类固醇、CTLA4-Ig 和抗-B 淋巴细胞刺激抗体等时对移植物接受的作用。参见例如, Wee 等, (1992), *Transplantation* 53: 501-7 所述的模型。

在阿尔茨海默病中,可以先在体外测试抗体阻断小胶质细胞激活的能力。在表达人 CD40 和/或 CD20 分子和过度产生淀粉样- β 肽的双重转基因小鼠中进行抗体体内效力研究。参见例如, Tan 等, (2002) *Nat. Neurosci.* 5: 1288-93 所述的模型。

“等当量”的本发明抗 CD40 抗体和利妥昔[®]指每单位体重给予相同或更少的毫克剂量。因此,以用于模型的 0.01 mg/kg 小鼠体重给予抗 CD40 抗体时,也以 0.01 mg/kg 小鼠体重给予利妥昔[®]。相似地,以用于模型的 0.1、1 或 10 mg/kg 小鼠体重给予抗 CD40 抗体时,也分别以 0.1、1 或 10 mg/kg 小鼠体重给予利妥昔[®]。

抗体效力的另一种差异是在体外测定 NK 细胞存在时获得靶细胞最大裂解的抗体浓度。例如，本发明抗 CD40 抗体使道迪细胞达到最大裂解的 EC50 低于利妥昔®浓度的 1/2，优选低于 1/4，最优选低于 1/10。本文的实施例也描述了这种测定类型。

在上述试验中，效能显著高于等量利妥昔®的抗 CD40 抗体可包括：

a)单克隆抗体 CHIR-12.12；

b)杂交瘤细胞系 12.12 产生的单克隆抗体；

c)包含选自以下氨基酸序列的单克隆抗体：SEQ ID NO:2 所示序列、SEQ ID NO:4 所示序列、SEQ ID NO:5 所示序列、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:4 所示序列以及 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:5 所示序列；

d)含有选自以下核苷酸序列的核酸分子编码的氨基酸序列的单克隆抗体：SEQ ID NO:1 所示序列、SEQ ID NO:3 所示序列以及 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:3 所示序列；

e)能够与杂交瘤细胞系 12.12 产生的单克隆抗体表位结合的单克隆抗体；

f)结合含有 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:9 所示的人 CD40 序列残基 82-87 的表位的单克隆抗体；

g)结合含有 SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:9 所示的人 CD40 序列残基 82-89 的表位的单克隆抗体；

h)在竞争性结合试验中与单克隆抗体 CHIR-12.12 竞争的单克隆抗体；

i)前述项目 a)所述的单克隆抗体或前述项目 c)-h)中任一项所述的单克隆抗体，所述抗体是重组产生的；和

j)作为前述项目 a)-i)中任一项所述单克隆抗体的抗原结合片段的单克隆抗体，所述片段保持了特异性结合所述人 CD40 抗原的能力。

本发明提供了鉴定可用抗 CD40 抗体治疗的炎性疾病或自身免疫病病人的方法，所述方法包括：

a)鉴定患有细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病病人；和

b)鉴定所述病人的 FcγRIIIa-158 基因型(V/V、V/F 或 F/F)；

如果所述病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F)，则可用抗 CD40 抗体治疗其炎性疾病或自身免疫病。所述炎性疾病或自身免疫病可能

用利妥昔单抗(利妥昔[®])难以治疗。

一旦鉴定到病人患有可用抗 CD40 抗体治疗的炎性疾病或自身免疫病,就可用抗 CD40 抗体治疗该病人。因此,所述方法还可包括步骤(c),给予鉴定为 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体。

本领域技术人员采用合适的诊断试剂盒不难进行这种鉴定患有可用抗 CD40 抗体治疗的炎性疾病或自身免疫病病人的方法。该试剂盒应装有适合测定病人 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。因此,本发明还提供了鉴定患有可用抗 CD40 抗体治疗的炎性疾病或自身免疫病病人的试剂盒,所述试剂盒装有测定病人 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。本文其它地方更详细地描述了合适的试剂盒。

本发明还提供了选择用于治疗患有炎性疾病或自身免疫病病人的抗体疗法的方法,所述方法包括:

- a)鉴定患有细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病病人;和 ‘
- b)测定所述病人的 FcγRIIIa-158 基因型(V/V、V/F 或 F/F);

如果所述病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F),则选择抗 CD40 抗体治疗所述炎性疾病或自身免疫病。用利妥昔单抗(利妥昔[®])可能难以治疗这种炎性疾病或自身免疫病。

一旦选择了抗 CD40 抗体治疗炎性疾病或自身免疫病病人,则可用抗 CD40 抗体治疗该病人。因此,所述方法可包括额外步骤(c),给予鉴定为 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体。

本领域技术人员采用合适的诊断试剂盒也不难进行此方法选择用于治疗患有炎性疾病或自身免疫病病人的抗体疗法。该试剂盒应装有适合测定病人 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。因此,本发明还提供了选择用于治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病病人的抗体疗法的试剂盒,其装有测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的试剂。

“可用抗 CD40 抗体治疗”指用抗 CD40 抗体治疗时,病人(即患有炎性疾病或自身免疫病的个体)将获益于准备治疗的炎性疾病或自身免疫病的“正面治疗反应”(如本文其它地方所定义)。

考虑了用获自病人的生物样品测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的任何方法。

例如,本发明提供了用于测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的试剂盒,其装有一种微阵列,该微阵列包含长度为 10 个或更多个核苷酸且序列适合测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的至少一种探针。将标记的 RNA 或 DNA 与该阵列上的互补探针杂交,然后用激光扫描检测。测定阵列上各探针的杂交强度,将其转变为代表相对基因表达水平的定量值。本领域技术人员不难选择探针的序列和长度。已知编码 FcγRIIIa-158 F 和 V 同种异型的人基因和 mRNA 的核苷酸序列。因此,本领域技术人员可选择在合适的试验条件下能够测定靶序列的 FcγRIIIa-158 基因型的探针。

美国专利号 5,384,261(全文纳入本文作参考)描述了采用机械合成法合成这些阵列的技术。虽然优选平坦阵列表面,但可以在基本上任何形状的表面,甚至多个表面上制备该阵列。阵列可以是珠、凝胶、聚合物表面、纤维如光纤、玻璃或任何其它合适基材上的肽或核酸,参见美国专利号 5,770,358、5,789,162、5,708,153、6,040,193 和 5,800,992,各自全文纳入本文用于所有目的。可以某种方式包装阵列,以便用于诊断或全部装置的其它操作。参见例如,美国专利号 5,856,174 和 5,922,591,纳入本文作参考。

例如,本发明还提供了用于测定病人 FcγRIIIa-158 基因型的试剂盒,其装有适合用作在聚合酶催化下扩增编码 FcγRIIIa 氨基酸 158 的基因组或 mRNA 区域的引物的寡核苷酸。本领域技术人员不难选择引物的序列和长度。编码 FcγRIIIa-158 F 和 V 同种异型的人基因和 mRNA 的核苷酸序列已知。因此,本领域技术人员可选择在合适的试验条件下能扩增编码 FcγRIIIa 氨基酸 158 的基因或 mRNA 区域的引物。接着,可用已知方法测序扩增序列,以确定患者的 FcγRIIIa-158 基因型。

测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的另一种方法是使用基于核酸的方法检测 DNA 片段化,它是病人的 FcγRIIIa-158 基因型的特征。用琼脂糖凝胶电泳分析时,各 FcγRIIIa-158 基因型的 DNA 具有特征性图案。因此,本发明还提供了用于测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的试剂盒,其装有适用于测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的一种或多种限制性酶。本领域已知合适的限制性酶(参见

例如 Koene 等(1997) *Blood*, 1997, 第 90 卷, 第 3 期, 第 1109-1114 页)。

本发明试剂盒也可装有说明如何使用该试剂盒测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的说明书。该试剂盒也可包括(如)缓冲剂、防腐剂或蛋白质稳定剂。试剂盒的各个组分通常包装在单独容器中, 将所有这些容器和指出如何使用该试剂盒测定病人的 FcγRIIIa-158 基因型的说明书一起装到一个包装中。

本发明提供了抗 CD40 抗体在制备治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病的药物中的应用, 如本文其它地方所述。

以治疗上有效预防或治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病的浓度给予本发明抗 CD40 抗体。为了实现这一目标, 可用本领域已知的各种可接受的运载体和/或赋形剂配制该抗体。可通过胃肠道外给药途径给予抗 CD40 抗体。一般通过静脉内或皮下注射给予该抗体。本领域普通技术人员已知进行这种给药的方法。

优选通过在一段时间内输注进行静脉内给药, 所述时间约为半小时至 1 小时至 10 小时(小于 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 小时)。可在一段时间后给予后续输注, 所述一段时间约为小于 1 小时至 6 小时, 包括例如, 约 1—4 小时, 约 1—3 小时, 或者约 1—2 小时或小于 1 小时。或者, 可皮下给予抗 CD40 抗体, 如 CHIR-12.12。

配制本发明药物组合物, 以使其与所需的给药途径相容。用于胃肠道外用药的溶液或悬液可包含以下组分: 无菌稀释剂如注射用水、盐水溶液; 抗菌剂如苄基醇或对羟基苯甲酸甲酯; 抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠; 螯合剂如乙二胺四乙酸; 缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐以及调节强度的物质如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱如盐酸或氢氧化钠调节 pH。可将胃肠道外制剂包装到安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制成的多剂量药瓶中。

一般通过标准技术以药学上可接受的缓冲液, 如无菌盐水、无菌缓冲液或其组合等提供抗 CD40 抗体。制备胃肠道外给药药物的方法参见 Remington's *Pharmaceutical Sciences* (雷明顿药物科学)(第 18 版; 麦克出版公司(Mack Publishing Company), 宾夕法尼亚州伊顿(Eaton, Pennsylvania), 1990), 纳入本文作参考。也参见例如 WO 98/56418, 它描述了适用于本发明方法的稳定抗体药物制剂。

本领域普通技术人员无需过多实验,即可确定至少一种抗 CD40 抗体的给药量。影响给药方式和至少一种抗 CD40 抗体的给药量的因素包括但不限于:疾病严重程度、所给个体的病史、年龄、身高、体重、健康状况和身体状况。相似地,抗 CD40 抗体的给药量将取决于给药方式和单剂量或多剂量给予此种抗肿瘤药物。通常,随着所治疗的对象体重增加,优选更高剂量的抗 CD40 抗体。

给予抗 CD40 抗体的剂量范围是约 0.003 mg/kg—50 mg/kg、约 0.01 mg/kg—40 mg/kg、约 0.01 mg/kg—30 mg/kg、约 0.1 mg/kg—30 mg/kg、约 0.5 mg/kg—30 mg/kg、约 1 mg/kg—30 mg/kg、约 3 mg/kg—30 mg/kg、约 3 mg/kg—25 mg/kg、约 3 mg/kg—20 mg/kg、约 5 mg/kg—15 mg/kg、或约 7 mg/kg—12 mg/kg。

因此,例如,该剂量可以是 0.3 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、5 mg/kg、7 mg/kg、10 mg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、25 mg/kg、30 mg/kg、35 mg/kg、40 mg/kg、45 mg/kg 或 50 mg/kg,或者落入约 0.3 mg/kg—50 mg/kg 范围内的其它剂量。

用治疗有效量的抗体治疗对象包括一次治疗,或者优选包括一系列治疗。因此,在本发明的另一实施方式中,该方法包括给予多次剂量的抗 CD40 抗体。该方法包括给予 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40 或更多次治疗有效剂量的含有抗 CD40 抗体的药物组合物。本领域技术人员无需过多试验即可确定给予多剂量含抗 CD40 抗体的药物组合物的频率和持续时间。在疗程中可以给予相同治疗有效剂量的抗 CD40 抗体。或者,在疗程中可以给予不同治疗有效剂量的抗 CD40 抗体。

在一个优选实施例中,用抗 CD40 抗体治疗对象,剂量范围是约 0.1—20 mg/kg 体重,在约 1—10 周,优选约 2—8 周,更优选约 3—7 周,更优选约 4、5 或 6 周中每周给药一次。可以每半年或每年治疗一次以防止复发,或者一旦出现复发迹象立即给药。应理解,在具体疗程中可能提高或降低用于治疗抗体有效剂量。可改变剂量,视本文所述的诊断试验结果而改变。

因此,在一个实施方式中,给药方案包括首先在治疗期间的第 1、8、15 和 22 天给予治疗有效剂量的至少一种抗 CD40 抗体。

在另一实施方式中,给药方案包括首先在治疗期间每天,或一周的第 1、

3、5 和 7 天给予治疗有效剂量的至少一种抗 CD40 抗体；包括首先在治疗期间一周的第 1 和 3-4 天给予治疗有效剂量的至少一种抗 CD40 抗体的给药方案；和首先在治疗期间一周的第 1 天给予治疗有效剂量的至少一种抗 CD40 抗体的优选给药方案。治疗时间可包括 1 周、2 周、3 周、1 个月、2 个月、3 个月、6 个月或 1 年。治疗时间可以是连续的，或者互相间隔 1 周、2 周、1 个月、3 个月、6 个月或 1 年。

在其它实施方式中，如本文所述抗 CD40 抗体的初始治疗有效剂量可用较低剂量范围(即约 0.003 mg/kg—20 mg/kg)，后续剂量用较高剂量范围(即约 20 mg/kg—50 mg/kg)。

在其它实施方式中，如本文所述抗 CD40 抗体的初始治疗有效剂量可用较高的剂量范围(即约 20 mg/kg—50 mg/kg)，后续剂量用较低剂量范围(即 0.003 mg/kg—约 20 mg/kg)。因此，在本发明的一些实施方式中，可通过将“加载剂量”的抗体给予需要治疗的对象启动抗 CD40 抗体治疗。“加载剂量”指给予对象的抗 CD40 抗体的初始剂量，而所给抗体的剂量落入较高剂量范围(即约 20 mg/kg—50 mg/kg)。可通过一次给药(例如 IV 给予该抗体时一次输注)或多次给药(例如 IV 给予该抗体时多次输注)给予“加载剂量”，只要在约 24 小时内给予所有“加载剂量”。给予“加载剂量”后，再向该对象给予一次或多次治疗有效剂量的抗 CD40 抗体。可按照每周给药方案，或者每两周一次、每三周一次或每四周一次给予后续治疗有效剂量。在这类实施方式中，后续治疗有效剂量通常落入较低剂量范围(即 0.003 mg/kg—约 20 mg/kg)。

或者，在一些实施方式中，在“加载剂量”后按照“维持方案”给予后续治疗有效剂量的抗 CD40 抗体，所述治疗有效剂量的抗体每月给予一次、每 6 周给予一次、每两个月给予一次、每 10 周给予一次、每三个月给予一次、每 14 周给予一次、每 4 个月给予一次、每 18 周给予一次、每 5 个月给予一次、每 22 周给予一次、每六个月给予一次、每 7 个月给予一次、每 8 个月给予一次、每 9 个月给予一次、每 10 个月给予一次、每 11 个月给予一次或者每 12 个月给予一次。在这类实施方式中，抗 CD40 抗体的治疗有效剂量为较低剂量范围(即 0.003 mg/kg—约 20 mg/kg)，特别是以频率较高的间隔(如每 2 周一次至每月一次)给予后续剂量时，或者落入较高剂量范围(即约 20 mg/kg—约 50

mg/kg)，特别是以频率较低的间隔(如给药间隔约为1个月—12个月)给予后续剂量时。

用于本发明方法的本文所述药物组合物中存在的抗 CD40 抗体可能是天然抗体，或重组技术获得的抗体，也可来自任何来源，包括哺乳动物来源，如，小鼠、大鼠、兔、灵长动物、猪和人。这类多肽优选衍生自人来源，更优选是来自杂交瘤细胞系的重组人蛋白。

用于本发明方法的药物组合物可包含本发明拮抗性抗 CD40 抗体的生物活性变体，如本文其它地方所述。

本发明方法可采用含有作为治疗活性组分的具有本文所述结合特性的抗 CD40 抗体的任何药物组合物。因此，可将含有一种或多种抗 CD40 抗体的液体、冻干或喷雾干燥的组合物制备成水性或非水性的溶液或悬液，以便随后按照本发明方法给予对象。这些组合物各自包含至少一种抗 CD40 抗体，作为治疗或预防活性组分。“治疗或预防活性组分”指将抗 CD40 抗体特地掺入组合物，以便产生所需的治疗或预防反应，从而在将该药物组合物给予对象时治疗、预防或诊断该对象的疾病或病症。所述药物组合物优选包含合适的稳定剂、填充剂或二者，以最大程度减少与制备和储存期间损失蛋白质稳定性和生物学活性有关的问题。

可将配制剂(formulant)加入含有本发明抗 CD40 抗体的药物组合物中。这些配制剂可包括但不限于：油、聚合物、维生素、糖、胺酸、盐、缓冲剂、清蛋白、表面活性剂或填充剂。糖优选包括糖或糖醇，如单糖、二糖或多糖，或者水溶性葡聚糖。糖或葡聚糖可包括果糖、葡萄糖、甘露糖、山梨糖、木糖、麦芽糖、蔗糖、右旋糖苷、支链淀粉、糊精、 α 和 β 环式糊精、可溶性淀粉、羟乙基淀粉和羧甲基纤维素，或它们的混合物。“糖醇”定义为含有羟基的 C4-C8 烃，包括半乳糖醇、肌醇、甘露醇、木糖醇、山梨糖醇、甘油和阿拉伯糖醇。这些糖或糖醇可单独或联合使用。糖或糖醇浓度为 1.0%-7% w/v，更优选为 2.0%-6.0% w/v。氨基酸优选包括肉毒碱、精氨酸和甜菜碱的左旋(L)形式；然而，可加入其它氨基酸。优选的聚合物包括平均分子量为 2,000-3,000 的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)，或平均分子量为 3,000-5,000 的聚乙二醇(PEG)。可加入该制剂的表面活性剂见 EP 号 270,799 和 268,110。

此外, 可通过共价偶联于聚合物来化学修饰抗体, 以提高其循环半衰期。例如, 全文纳入本文作参考的美国专利号 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285; 和 4,609,546 描述了使抗体与肽连接所用的优选聚合物和方法。优选的聚合物是聚氧乙烯多元醇和聚乙二醇(PEG)。PEG 在室温下可溶于水, 通式为: $R(O-CH_2-CH_2)_n O-R$, 其中 R 可以是氢, 或保护基如烷基或烷醇基。保护基优选含有 1-8 个碳, 更优选甲基。符号 n 是正整数, 优选为 1-1,000, 更优选 2-500。PEG 的平均分子量优选为 1,000-40,000, 更优选 2,000-20,000, 最优选 3,000-12,000。PEG 优选含有至少一个羟基, 更优选是末端羟基。优选活化这种羟基, 以便与抑制剂上的游离氨基反应。然而应理解, 可改变反应性基团的类型和数量, 以获得本发明共价偶联的 PEG/抗体。

水溶性聚氧乙烯多元醇也可用于本发明。它们包括聚氧乙烯化的山梨糖醇、聚氧乙烯葡萄糖、聚氧乙烯甘油(POG)等。优选 POG。一个原因是因为聚氧乙烯甘油的甘油主链与(例如)动物和人的甘油一酯、甘油二酯、甘油三酯中天然产生的主链相同。因此, 在体内这种分支不一定被视为外来物质。POG 的优选分子量范围与 PEG 相同。Knauf 等(1988) *J Bio. Chem.* 263:15064-15070 显示了 POG 的结构, 关于 POG/IL-2 偶联物的讨论参见美国专利号 4,766,106, 将这两篇文献全文纳入本文作参考。

提高循环半衰期的另一种药物递送系统是脂质体。制备脂质体递送系统的方法参见 Gabizon 等(1982) *Cancer Research* 42:4734; Cafiso (1981) *Biochem Biophys Acta* 649:129; 和 Szoka (1980) *Ann. Rev. Biophys. Eng.* 9:467。本领域已知其它药物递送系统, 参见例如 Poznansky 等(1980) *Drug Delivery Systems*(药物递送系统) (R.L. Miano 编, 纽约州牛津) 第 253-315 页; Poznansky (1984) *Pharm Revs* 36:277。

掺入药物组合物的配制剂应该为抗 CD40 抗体提供稳定作用。即, 抗 CD40 抗体应该保持其物理和/或化学稳定性, 并具有所需的生物学活性, 即上文中定义的一种或多种拮抗活性, 包括但不限于: 抑制 T 细胞刺激正常人外周 B 细胞分泌免疫球蛋白; 抑制 Jurkat T 细胞刺激正常人外周 B 细胞存活和/或增殖; 抑制 CD40L 表达细胞或可溶性 CD40 配体(sCD40L)刺激正常人外周 B 细胞存活和/或增殖; 抑制 sCD40L 或固相 CD40L 刺激任何细胞中的“存活”抗-凋亡胞

内信号；抑制与 sCD40L 或固相 CD40L 连接后任何细胞中的 CD40 信号转导；和抑制本文其它地方所述的人恶性 B 细胞增殖。

本领域熟知监测蛋白质稳定性的方法。参见例如，Jones (1993) *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90；Lee 编(1991) *Peptide and Protein Drug Delivery*(肽和蛋白质药物递送)(马赛代克公司(Marcel Dekker, Inc.)，纽约州纽约)；以及下文所述的稳定性试验。通常，测定蛋白质在所选温度下一段时间的稳定性。在优选实施方式中，室温(约 25℃)下储存稳定的抗体药物制剂提供的抗 CD40 抗体稳定性至少 1 个月、至少 3 个月或至少 6 个月，和/或在约 2-8℃稳定至少 6 个月、至少 9 个月、至少 12 个月、至少 18 个月、至少 24 个月。

配制在药物组合物中时，如果在给定时间点该药物组合物不出现沉淀、聚集和/或变性现象(如褪色或不澄清)或可检测迹象(例如，用分子大小排阻层析(SEC)或 UV 光散射检测)，则认为该蛋白质如抗体保持了它的物理稳定性。就化学稳定性而言，如果配制在药物组合物中时，在给定时间点上化学稳定性的测定表明该蛋白质(即抗体)在药物组合物中保持了感兴趣的生物学活性，则认为该蛋白质如抗体保持了它的化学稳定性。监测化学稳定性改变的方法是本领域众所周知的，包括但不限于：检测蛋白质化学形式改变的方法，例如采用(如)SDS-PAGE、SEC 和/或基质辅助激光解吸电离/飞行时间质谱检测蛋白质剪切的结果；和采用(如)离子交换色谱检测与分子电荷改变有关(例如，与脱酰胺有关)的降解。参见例如，下文所述方法。

配制在药物组合物中时，如果经过所需生物学活性的合适试验测定，在给定时间点上所需生物学活性是药物组合物制备时的所需生物学活性的约 30%、优选约 20%以内，则认为抗 CD40 抗体保持了所需的生物学活性。可以如本文实施例所述测定抗 CD40 抗体的所需生物学活性。也参见 Schultze 等(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8200-8204；Denton 等(1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6-15；Evans 等(2000) *J. Immunol.* 164:688-697；Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-22；Lederman 等(1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3:77-86；Coligan 等(1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12；Kwekkeboom 等(1993) *Immunology* 79:439-444；和美国专利号 5,674,492 和 5,847,082 所述的试验；纳入本文作参考。

在本发明的一些实施方式中，将抗 CD40 抗体配制成液体药物制剂。可采用本领域已知方法，包括上文公开的方法制备抗 CD40 抗体。在一个实施方式中，在 CHO 细胞系中重组产生抗 CD40 抗体。

在配制成制剂之前储存抗 CD40 抗体时，可冻存(如 $\leq 20^{\circ}\text{C}$)该抗体，然后在室温下融化，用于进一步配制制剂。所述液体药物组合物包含治疗有效量的抗 CD40 抗体。制剂中存在的抗体量需要考虑给药途径和所需的剂量体积。

以此方式，该液体药物组合物包含浓度为约 0.1 mg/ml—50.0 mg/ml、约 0.5 mg/ml—40.0 mg/ml、约 1.0 mg/ml—30.0 mg/ml、约 5.0 mg/ml—25.0 mg/ml、约 5.0 mg/ml—20.0 mg/ml 或约 15.0 mg/ml—25.0 mg/ml 的抗 CD40 抗体。在一些实施方式中，该液体药物组合物包含浓度为约 0.1 mg/ml—5.0 mg/ml、约 5.0 mg/ml—10.0 mg/ml、约 10.0 mg/ml—15.0 mg/ml、约 15.0 mg/ml—20.0 mg/ml、约 20.0 mg/ml—25.0 mg/ml、约 25.0 mg/ml—30.0 mg/ml、约 30.0 mg/ml—35.0 mg/ml、约 35.0 mg/ml—40.0 mg/ml、约 40.0 mg/ml—45.0 mg/ml 或约 45.0 mg/ml—50.0 mg/ml 的抗 CD40 抗体。在其它实施方式中，该液体药物组合物包含浓度为约 15.0 mg/ml、约 16.0 mg/ml、约 17.0 mg/ml、约 18.0 mg/ml、约 19.0 mg/ml、约 20.0 mg/ml、约 21.0 mg/ml、约 22.0 mg/ml、约 23.0 mg/ml、约 24.0 mg/ml 或约 25.0 mg/ml 的抗 CD40 抗体。该液体药物组合物包含抗 CD40 抗体和将该制剂的 pH 维持在约 pH 5.0—pH 7.0 的范围，包括约 pH 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0 和约 pH 5.0—pH 7.0 范围内的其它值的缓冲剂。在一些实施方式中，该缓冲液将该制剂的 pH 保持在约 pH 5.0—pH 6.5、约 pH 5.0—pH 6.0、约 pH 5.0—pH 5.5、约 pH 5.5—7.0、约 pH 5.5—pH 6.5 或约 pH 5.5—pH 6.0 的范围内。

该制剂中可采用将液体抗 CD40 抗体制剂的 pH 维持在约 pH 5.0—pH 7.0 的范围内的任何合适缓冲剂，只要如上所述保持该抗体的物理化学稳定性和所需生物学活性。合适缓冲剂包括但不限于：常用酸和其盐，其中抗衡离子可以是(例如)钠、钾、铵、钙或镁。可用于缓冲该药物液体制剂的常用酸和其盐的例子包括但不限于：琥珀酸或琥珀酸盐、柠檬酸或柠檬酸盐、乙酸或乙酸盐、酒石酸或酒石酸盐、磷酸或磷酸盐、葡糖酸或葡糖酸盐、谷氨酸或谷氨酸盐、天冬氨酸或天冬氨酸盐、马来酸或马来酸盐以及苹果酸或苹果酸盐缓冲剂。该

制剂内的缓冲液浓度可以是约 1 mM—50 mM，包括约 1 mM、2 mM、5 mM、8 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM、50 mM 或者约 1 mM—50 mM 范围内的其它值。在一些实施方式中，该制剂内的缓冲液浓度为约 5 mM—15 mM，包括约 5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15 mM，或者约 5 mM—15 mM 范围内的其它值。

在本发明的一些实施方式中，液体药物制剂包含治疗有效量的抗 CD40 抗体和浓度能使制剂 pH 维持在约 pH 5.0—pH 7.0，优选约 pH 5.0—pH 6.5 范围内的琥珀酸盐缓冲剂或柠檬酸盐缓冲剂。“琥珀酸盐缓冲液”或“柠檬酸盐缓冲液”指分别指含有琥珀酸盐或柠檬酸盐的缓冲液。在优选实施方式中，琥珀酸或柠檬酸盐抗衡离子是钠阳离子，因此该缓冲液分别是琥珀酸钠或柠檬酸钠。然而，预计任何阳离子均有效。其它可能的琥珀酸盐或柠檬酸盐阳离子包括但不限于：钾、铵、钙和镁。如上所述，该制剂内琥珀酸盐或柠檬酸盐缓冲液浓度可以为约 1 mM—50 mM，包括约 1 mM、2 mM、5 mM、8 mM、10 mM、15 mM、20 mM、25 mM、30 mM、35 mM、40 mM、45 mM、50 mM 或约 1 mM—50 mM 范围内的其它值。在一些实施方式中，该制剂内的缓冲液浓度为约 5 mM—15 mM，包括约 5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM 或约 15 mM。在其它实施方式中，该液体药物制剂包含抗 CD40 抗体，其浓度为约 0.1 mg/ml—50.0 mg/ml 或约 5.0 mg/ml—25.0 mg/ml，和琥珀酸盐或柠檬酸盐缓冲液，如琥珀酸钠或柠檬酸钠缓冲液，其浓度为约 1 mM—20 mM、约 5 mM—15 mM，优选约 10 mM。

理想地，该液体药物制剂接近等渗时，含有抗 CD40 抗体和缓冲液的液体药物制剂还可包含使该制剂接近等渗的足量等渗剂。“接近等渗”指水性制剂的渗透压为约 240 mmol/kg—360 mmol/kg，优选约 240—340 mmol/kg，更优选约 250—330 mmol/kg，更优选约 260—320 mmol/kg，更优选约 270—310 mmol/kg。本领域技术人员了解测定溶液等渗的方法。参见例如，Setnikar 等 (1959) *J Am. Pharm. Assoc.* 48:628。

本领域技术人员熟悉用于使药物组合物等渗的各种药学上可接受的溶质。等渗剂可以是能将本发明液体药物制剂的渗透压调节至接近与体液相同的值

的任何试剂。需要使用生理上可接受的等渗剂。因此，含有治疗有效量的抗 CD40 抗体和缓冲液的液体药物制剂还可包含可用于提供等渗性的组分，如氯化钠；氨基酸如丙氨酸、缬氨酸和甘氨酸；糖和糖醇(多元醇)，包括但不限于：葡萄糖、右旋糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、海藻糖、甘油、山梨糖醇和木糖醇；乙酸、其它有机酸或其盐，以及相对少量的柠檬酸盐或磷酸盐。本领域普通技术人员知道适用于提供液体制剂的最优等渗强度的其它物质。

在一些优选实施方式中，含有抗 CD40 抗体和缓冲液的液体药物制剂还含有氯化钠作为等渗剂。该制剂中的氯化钠浓度取决于其它组分对渗透性的贡献。在一些实施方式中，氯化钠浓度为约 50 mM—300 mM、约 50 mM—250 mM、约 50 mM—200 mM、约 50 mM—175 mM、约 50 mM—150 mM、约 75 mM—175 mM、约 75 mM—150 mM、约 100 mM—175 mM、约 100 mM—200 mM、约 100 mM—150 mM、约 125 mM—175 mM、约 125 mM—150 mM、约 130 mM—170 mM、约 130 mM—160 mM、约 135 mM—155 mM、约 140 mM—155 mM 或约 145 mM—155 mM。在一个这类实施方式中，氯化钠浓度为约 150 mM。在其它这类实施方式中，氯化钠浓度为约 150 mM，缓冲液是浓度约为 5 mM—15 mM 的琥珀酸钠或柠檬酸钠缓冲液，该液体药物制剂含有治疗有效量的抗 CD40 抗体，该制剂的 pH 为约 pH 5.0—pH 7.0、约 pH 5.0—pH 6.0 或约 pH 5.5—pH 6.5。在其它实施方式中，该液体药物制剂含有浓度为约 0.1 mg/ml—50.0 mg/ml 或约 5.0 mg/ml—25.0 mg/ml 的抗 CD40 抗体、约 150 mM 氯化钠和约 10 mM 琥珀酸钠或柠檬酸钠，pH 为约 pH 5.5。

可将表面活性剂掺入本发明液体药物制剂，以降低溶液-空气界面上的表面张力，从而抑制加工该制剂期间冻融或机械剪切引起的蛋白质降解。因此，在一些实施方式中，该液体药物制剂含有治疗有效量的抗 CD40 抗体、缓冲液，还包含表面活性剂。在其它实施方式中，该液体药物制剂含有抗 CD40 抗体、缓冲液、等渗剂，还含有表面活性剂。

所用的表面活性剂一般是非离子型表面活性剂，包括聚氧乙烯山梨糖醇酯，如聚山梨酯 80(吐温 80)和聚山梨酯 20(吐温 20)；聚氧丙烯-聚氧乙烯酯如普朗尼克 F68；聚氧乙烯醇如 Brij 35；西甲硅油；聚乙二醇如 PEG400；溶血磷脂酰胆碱；和聚氧乙烯-对-叔-辛基酚如 Triton X-100。通过表面活性剂或乳

化剂使药物稳定的经典方法参见例如,Levine等(1991) *J Parenteral Sci. Technol.* 45(3):160-165, 纳入本文作参考。用于实施本发明的优选表面活性剂是聚山梨酯 80。当包含表面活性剂时,加入量一般为约 0.001 %—1.0% (w/v)、约 0.001%—0.5%、约 0.001%—0.4%、约 0.001%—0.3%、约 0.001%—0.2%、约 0.005%—0.5%、约 0.005%—0.2%、约 0.01%—0.5%、约 0.01%—0.2%、约 0.03%—0.5%、约 0.03%—0.3%、约 0.05%—0.5%或约 0.05%—0.2%。

因此,在一些实施方式中,该液体药物制剂含有治疗有效量的抗 CD40 抗体,和浓度为约 1 mM—50 mM、约 5 mM—25 mM 或约 5 mM—15 mM 的琥珀酸钠或柠檬酸钠缓冲液;该制剂的 pH 为约 pH 5.0—pH 7.0、约 pH 5.0—pH 6.0 或约 pH 5.5—pH 6.5;该制剂还包含含量为约 0.001%—1.0%或约 0.001%—0.5% 的表面活性剂,如聚山梨酯 80。这类制剂可任选地含有等渗剂,如浓度为约 50 mM—300 mM、约 50 mM—200 mM 或约 50 mM—150 mM 的氯化钠。在其它实施方式中,该液体药物制剂含有浓度为约 0.1 mg/ml—50.0 mg/ml 或约 5.0 mg/ml—25.0 mg/ml,包括约 20.0 mg/ml 的抗 CD40 抗体;约 50 mM—200 mM 氯化钠,包括约 150 mM 氯化钠;约 5 mM—20 mM 的琥珀酸钠或柠檬酸钠,包括约 10 mM 琥珀酸钠或柠檬酸钠;浓度为约 50 mM—200 mM,包括约 150 mM 的氯化钠;和任选的表面活性剂,如含量为约 0.001%—1.0%,包括约 0.001%—0.5% 聚山梨酯 80;该液体药物制剂的 pH 为约 pH 5.0—pH 7.0、约 pH 5.0—pH 6.0、约 pH 5.0—pH 5.5、约 pH 5.5—pH 6.5 或约 pH 5.5—pH 6.0。

该液体药物制剂可基本不含如上所述的任何防腐剂和其载体、赋形剂或稳定剂。或者,该制剂可含有一种或多种防腐剂,例如,上文所述的抗菌剂、药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,只要它们不会对抗 CD40 抗体的物理化学稳定性造成不良影响。可接受的载体、赋形剂和稳定剂的例子包括但不限于:其它缓冲剂、助溶剂、表面活性剂、抗氧化剂(包括抗坏血酸和甲硫氨酸)、螯合剂如 EDTA、金属络合物(如锌-蛋白质络合物)和可生物降解的聚合物如聚酯。关于药学上可接受的载体、稳定剂和等渗剂(isomolyte)的配方和选择的充分讨论可参见 Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药物科学)(第 18 版;麦克出版公司(Mack Publishing Company),宾夕法尼亚州伊顿,1990),纳入本文作参考。

本文所用的“运载体”包括在所用剂量和浓度下对接触的细胞或哺乳动物无毒的药理学上可接受的运载体、赋形剂或稳定剂。生理上可接受的运载体常常是 pH 缓冲水溶液。生理上可接受的运载体的例子包括缓冲剂如磷酸、柠檬酸、琥珀酸和其它有机酸；抗氧化剂包括抗坏血酸；低分子量(小于约 10 个残基)多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它糖，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂如 EDTA；糖醇如甘露醇或山梨糖醇；形成盐的抗衡离子如钠；和/或非离子型表面活性剂如吐温、聚乙二醇(PEG)和普朗尼克。

与一种或多种其它疗法“联合”给药包括同时和以任何顺序依次给药。

制备本文所述的液体药物制剂或其它药物组合物后，可将其冻干以防止降解。本领域普通技术人员已知冻干液体组合物的方法。临用前，可用无菌稀释液(如林格氏溶液、蒸馏水或无菌盐水)重建该组合物，所述无菌稀释液可能含有其它成分。重建后，优选本领域技术人员已知的方法将该组合物给予对象。

在一些实施方式中，抗 CD40 抗体可与炎症性疾病和/或自身免疫病的至少一种其它已知疗法联合给药。这类疗法包括但不限于：外科或手术方法(例如，脾切除术、淋巴结切除术、甲状腺切除术、血浆去除术、白细胞去除术、细胞、组织或器官移植、肠手术、器官灌注等)、放疗、例如类固醇治疗和非类固醇治疗、激素治疗、细胞因子治疗、使用皮肤药物(例如，用于治疗皮肤病症，如过敏、接触性皮炎和银屑病的局部药物)的治疗、免疫抑制治疗和其它抗炎性单克隆抗体治疗等。本发明方法包括联合治疗方案时，可同时给予这些治疗剂，即拮抗性抗 CD40 抗体或其抗原结合片段与其它疗法同时给予或在相同的时间框内给予(即，同时进行治疗，但抗-CD40 抗体或其抗原结合片段不需要与其它疗法在正好相同的时间给予)。或者，本发明的拮抗性抗-CD40 抗体或其抗原结合片段也可在其它疗法之前或之后给予。可依次给予不同的疗法而不论受治疗的对象是否对第一疗程有所反应而降低缓解 (remission) 或复发的可能性。

以此方式，抗 CD40 抗体与至少一种其它疗法联合给药，这类疗法包括但不限于：手术、器官灌注、放疗、类固醇治疗、非类固醇治疗、抗生素治疗、

抗真菌治疗、激素治疗、细胞因子治疗、使用皮肤药物(例如,用于治疗皮肤病症,如过敏、接触性皮炎和银屑病的局部药物)的治疗、免疫抑制治疗、其它抗炎性单克隆抗体治疗,它们的组合等。因此,当联合治疗包括联合给予抗CD40抗体和另一种治疗剂(如类固醇)时,本发明方法包括同时给药、使用分离的制剂或单一药物制剂、以任意顺序连续给药。

可与抗CD40抗体联合给药的免疫抑制药物的例子包括但不限于:氨甲喋呤、环磷酰胺、优青糖苷、瘤可宁、环孢菌素,例如气溶胶化的环孢菌素(参见,例如全文纳入本文作为参考的美国专利申请公布号US20020006901)、他利莫斯(FK506; ProGrafTM)、霉酚酸吗啉乙酯(mycophenolate mofetil)、依木兰(6-巯基嘌呤)、昔洛利莫斯(sirolimus)(雷帕霉素)、脱氧精胍啉(deoxyspergualin)、来氟米特(leflunomide)及其马龙尼酰胺(malononitriloamide)类似物;和免疫抑制蛋白。

可与抗CD40抗体联合给药的合适抗炎药物的例子包括但不限于:皮质类固醇,例如氯倍他索、鲁倍他索、氢化可的松、曲安西龙、倍他米松、氟昔诺(fluocinole)、醋酸氟轻松(fluocinonide)、强的松、氢化泼尼松、甲基泼尼松;非类固醇抗炎药物(NSAID),例如柳氮磺胺吡啶、含有氨水杨酸的药物(称为5-ASA药物)、塞来昔布(celecoxib)、双氯酚酸、依托度酸、非诺洛芬、氟吡洛芬、布洛芬、酮基布洛芬、美洛法美(meclofamate)、美洛昔康、萘丁美酮、萘普生、噁内嗪、吡罗昔康、罗非考昔(rofecoxib)、水杨酸盐、舒林酸和托美汀; Enbrel®(可溶性TNF受体), 抗炎性抗体, 例如阿达木单抗(adalimumab)(HUMERA[®]; TNF- α 拮抗剂)和英利昔单抗(infliximab)(Remicade[®]; TNF- α 拮抗剂)等。

移植排异和移植物抗宿主病可是超急性(体液)、急性(T细胞介导的)或慢性(病因未知)疾病或它们的组合。因此,在一些实施方案中,本发明的抗-CD40抗体可用于防止和/或缓解排异和/或与组织的超急性、急性和/或慢性移植排异有关的症状,所述组织包括但不限于:肝、肾、胰、胰岛细胞、小肠、肺、心脏、角膜、皮肤、血管、骨骼、异源或自体骨髓等。移植组织可得自供体并移植入受者宿主,因此该移植方法包括将动物组织移植入人体(例如,异种移植)、

将人的组织移植入另一个人(例如,同种异体移植)和/或将人身体一部分的组织移植入另一部分(例如,自体移植)。用本发明的抗体治疗也可减少移植后遗症,例如发烧、厌食、血液动力学异常、白细胞减少症、移植器官/组织的白细胞渗出以及机会感染。

在本发明抗 CD40 抗体用于治疗移植物排斥、类风湿性关节炎或多发性硬化的实施方式中,所述抗体可与本文所述的合适免疫抑制药物联合使用。

因此,本发明提供了治疗或预防有效量的抗 CD40 抗体在制备治疗 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子病人(基因型 V/F 或 F/F)的细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病的药物中的应用,其中所述药物与至少一种其它疗法的治疗协调作用。

“协调”指在用至少一种其它疗法治疗对象之前、期间或之后使用含有抗 CD40 抗体的药物。

本发明还提供了抗 CD40 抗体在制备治疗细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病患者的药物中的应用,其中所述病人是 FcγRIIIa-158F 杂合或纯合子(基因型 V/F 或 F/F),曾用至少一种其它治疗剂预先治疗过。

“预先治疗过”或“预先治疗”指在接受包含抗-CD40 抗体的药物之前,对象已接受过一种或多种其它疗法(即,已用至少一种其它疗法治疗过)。

“预先治疗过”或“预先治疗”包括在用包含抗-CD40 抗体的药物治疗开始前的以下时间内:2年、18个月、1年、6个月、2个月、6周、1个月、4周、3周、2周、1周、6天、5天、4天、3天、2天或甚至1天,曾采用至少一种其它疗法治疗过的对象。所述对象无需对先前一种或多种疗法产生反应。因此,接受包含拮抗性抗-CD40 抗体的药物的对象可以对先前疗法或者一种或多种先前疗法(当预先治疗由多种疗法组成时)的预先治疗已产生反应或未产生反应(即该疾病是难治性疾病)。对象在接受包含抗-CD40 抗体的药物之前曾接受过的其它疗法的例子包括但不限于本文他处所述的炎性疾病或自身免疫病的疗法。

本文将协调使用本文所述药物与一种或多种其它疗法的“治疗”定义为将所述药物或其它疗法应用于或给予对象,或将所述药物或其它疗法应

用于或给予对象的分离的组织或细胞系，所述对象患有细胞表达 CD40 的炎性疾病或自身免疫病、与这类疾病有关的症状或对这类疾病易感，治疗目的是为治愈、治疗、缓解、减轻、改变、补救、改善、消除或影响该疾病、该疾病相关症状或该疾病的易感性。

在一些实施方式中，相对于单独给予的各治疗剂，联合治疗协同改善了疗效。用术语“协同”描述两种或多种活性药物的联用的效力大于各活性药物单用之和。因此，当两种或多种药物的联用导致某活性或过程的“协同抑制”时，则指对该活性或过程的抑制作用大于各活性药物的抑制作用之和。术语“协同疗效”指两种或多种治疗联用时观察到的疗效(通过任一参数测定)大于用各自治疗观察到的各自疗效之和。

现在，只通过举例的方式更详细地描述本发明的各个方面和实施方式。应理解，可对细节进行修改，而不会背离本发明范围。

实验

用于以下实施例的抗 CD40 抗体是 CHIR-12.12。CHIR-12.12 抗体的产生、测序和鉴定详见国际专利申请公开号 WO 2005/044854、WO 2005/044304、WO 2005/044305、WO 2005/044306、WO 2005/044855、WO 2005/044307 和 WO 2005/044294。将表达 CHIR-12.12 抗体的杂交瘤细胞系 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC#12056)保藏到美国典型培养物保藏中心[ATCC; 大学大道 10801 号，弗吉尼亚州马纳萨斯(Manassas, Virginia)20110-2209 (USA)]，专利保藏号为 PTA-5543。

若干以下实施例基于 CHIR-12.12 与癌细胞系和癌症患者细胞的结合。然而，所有以下实施例与使用 CHIR-12.12 治疗炎性疾病和/或自身免疫病直接相关，因为它们说明了 CHIR-12.12 抗体的特征，与用抗-CD40 抗体治疗炎性疾病和/或自身免疫病相等同。

实施例 1：分析细胞系的 ADCC

比较了 CHIR-12.12 和利妥昔单抗对同时表达 CD40 和 CD20 抗原的各种恶性 B 细胞系的相对 ADCC 活性，这些细胞系包括淋巴瘤细胞系(道迪、纳玛

细胞系)、多发性骨髓瘤细胞系(ARH77、IM-9)、B-ALL 细胞系(CCRF-SB)和 B-CLL 细胞系(EHEB)。

分别测定最大裂解百分数和 ED_{50} ，比较 CHIR-12.12 和利妥昔单抗的 ADCC 效能和强度。这些试验的结果见图 1A-1F。在所有靶细胞系中，与利妥昔单抗相比，CHIR-12.12 是强度和效能更高的 ADCC 介导物。在这六种检测的细胞系中，每个细胞表面的 CD20 分子数比 CD40 分子数高 2.6-30.8 倍。这些数据证明，尽管与 CD20 相比展示的 CD40 分子较少，但与利妥昔单抗相比 CHIR-12.12 能更有效地裂解恶性 B-细胞系。

实施例 2：分析 CLL 患者细胞的 ADCC

比较了 CHIR-12.12 和利妥昔单抗对 8 名患者的离体原代 CLL 细胞的相对 ADCC 活性。与利妥昔单抗相比，CHIR-12.12 对所有患者 CLL 的 ADCC 活性更高(参见图 2A-D 和图 3)。结果见图 3。CHIR-12.12 的效能高于利妥昔单抗。

抗体依赖性细胞毒性(ADCC)试验设计

靶细胞：CLL 患者细胞，5000 个/孔。效应细胞：纯化的正常人 NK 细胞，50,000 个/孔。E:T 比：10。抗体浓度：0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 。培育时间：4 小时。培养基：RPMI (不含酚红)+10% FBS+1% P/S。培养装置：96 孔圆底平板。读数：用 485nm 激发光/535 nm 发射光以任意荧光单位(AFU)测定释放的钙黄绿荧光 AM。计算： $\% \text{特异性裂解} = 100 \times (\text{AFU 检测值} - \text{AFU 自发性释放值}) / (\text{AFU 最大释放值} - \text{AFU 自发性释放值})$ 。阴性对照：没有抗体或 NK 细胞时靶细胞释放的钙黄绿荧光。阳性对照：用去污剂(1% NP40)裂解后靶细胞释放的钙黄绿荧光。

图 2 和 3 所示结果表明，CHIR-12.12 对 CLL 患者细胞介导的 ADCC 高于利妥昔单抗。ADCC 差异的大小可能取决于靶细胞或 NK 供者细胞，但在所有患者样品中均能观察到。用两位不同供者的 NK 检测一位患者的 CLL 细胞时，CHIR-12.12 介导的二供者 NK 细胞的 ADCC 高于利妥昔单抗，但 ADCC 强度差异不同(见图 4)。这种优异 ADCC 的机制基础可能包括靶抗原(CD20 和 CD40)的相对表达水平、抗体内化程度和抗体对 NK 细胞 $\text{Fc}\gamma\text{IIIa}$ 受体的亲和力。因

此,研究了这些因素对 CHIR-12.12 和利妥昔单抗的 ADCC 活性的影响。

实施例 3: 细胞表面 CD40 和 CD20 分子的定量

定量研究了 CLL 细胞的 CD20 和 CD40 密度(实施例 3)和抗体内化程度(实施例 4),因为它们可能是上述 ADCC 活性差异的原因。

CHIR-12.12 的 ADCC 活性和效能较高并不依赖细胞表面 CD40 分子的较高密度,因为细胞表面上 CD20 分子数比 CD40 分子多 1.3-14 倍(参见图 5 和图 6)。

方法

用染色缓冲液(含有 1% BSA、0.1%叠氮化钠的 PBS)配制的 1 mg/ml 人 IgG1 预先培育细胞,以封闭非特异性结合位点。4℃(冰上)培育 30 分钟。然后加入 100、10、1、0.1 µg/ml 的 FITC 偶联的人 IgG1 同种型对照、FITC 偶联的 CHIR-12.12 或 FITC 偶联的利妥昔单抗,4℃(冰上)培育细胞 30 分钟。用染色缓冲液(PBS+1%FBS+0.1%叠氮化钠)洗涤细胞,并通过 FACS Calibur 进行分析。

用 FACS 测定荧光强度的几何平均值。然后根据校正的 FITC 珠建立的标准曲线计算等效可溶荧光色素分子(MESF)。

实施例 4: 结合细胞系的 CD40 后 CH12.12 不诱导内化

用淋巴瘤细胞道迪细胞系和 MM 细胞系 ARH77 评价 CH12.12 结合对内化的影响。用 1 µg/mL 的人 IgG1(对照抗体)或 CH12.12 在冰上培育细胞(含有 0.1%叠氮化钠以阻断内化)或 37℃(无叠氮化钠)培育 3 小时。用冰冷的染色缓冲液(PBS+1%BSA+0.1%叠氮化钠)洗涤后,用山羊抗-人 IgG-FITC 在冰上染色细胞 30 分钟。通过 FACS Calibur 记录荧光强度的几何平均数(MFI)。在存在叠氮化钠时用 CH 12.12 冰上培育的细胞或没有叠氮化钠时 37℃培育的细胞的 MFI 没有差异(图 7)。这些数据证明,结合 CD40 后 CH12.12 不内化,并且继续展示在细胞表面上。

实施例 5: 结合 CLL 患者细胞后 CHIR-12.12 和利妥昔单抗的内化: FACS 和共聚焦显微术

FACS 方法

用 10 µg/ml 的 huIgG1、CHIR-12.12 或利妥昔单抗 40℃(含有 0.1%叠氮化钠)或 37℃(不含叠氮化钠)培育细胞 3 小时。用染色缓冲液(PBS+1%FBS+0.1%叠氮化钠)洗涤细胞, 然后加入 FITC-山羊抗人 IgG, 接着 40℃培育细胞 30 分钟, 用 FACS Calibur 进行分析。

共聚焦显微术

用 10 µg/ml Alexa 488 或 FITC 偶联的 CHIR-12.12、利妥昔单抗和 IgG1 40℃(含有 0.1%叠氮化钠)或 37℃(不含叠氮化钠)培育细胞 3 小时。然后洗涤细胞, 用 2%甲醛室温固定 5 分钟。然后洗涤细胞, 放在聚-L-赖氨酸包被的玻片上, 固定并密封, 然后通过共聚焦成像分析。

结果

这些实验的结果见图 8(FACS)以及图 9 和 10 (共聚焦显微镜)。图 11 中小结了这些实验的结果。通过流式细胞术和共聚焦显微术, 采用原代 CLL 细胞研究这些抗体内化显示, 37℃结合 CD40 后, CHIR-12.12 仍然均一地分布在细胞表面上(即使经过 3 小时)。相反, 37℃结合后, 利妥昔单抗再次分布于帽内, 并内化。这些数据表明, CHIR-12.12 的强效 ADCC 活性可能与其能够将自身均一地展示在靶细胞表面上, 以便与效应细胞发生最优相互作用有关。这些结果表明, CHIR-12.12 可能在体内介导对 CLL 细胞的强效 ADCC 作用。

实施例 6: 用 Biacore 分析利妥昔和 CHIR-12.12 与 FcγRIIIa 的结合

通过标准 Biacore®分析比较了 FcγRIIIa aa158F 和 aa158V 等位基因对 CHIR-12.12 和利妥昔单抗的亲和力。CHIR-12.12 与 aa158F 等位基因的结合亲和力比利妥昔单抗高 4.6 倍(K_D 分别为 2.8 µM 和 13 µM)。下表中小结了这些试验的结果。

	K_D (nM)	
	CHIR-12.12	利妥昔单抗
FcγRIIIa aa158V	492	466
FcγRIIIa aa158F	2800	13000

实施例 7: FcγRIIIa 多态性对 NK 效应细胞 ADCC 的影响

抗体依赖性细胞毒性(ADCC)是许多市售和研究的单克隆抗体的主要作用机制。认为销售的用于治疗滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)的利妥昔单抗(利妥昔

®)对其它 B 细胞恶性肿瘤也有活性,其主要作用机制之一 ADCC。显然,已证明利妥昔单抗在 NHL 中的临床活性与 FcγRIIIa 基因型相关联。与 F/F 患者相比,具有 V/V 或 V/F 的 FcγRIIIa 158aa 多态性的患者对利妥昔单抗的反应性更好(参见例如 Cartron 等(2002), Blood, 99(3): 754-758 或 Dall'Ozzo 等(2004), Cancer Res. 64:4664-4669)。

在这些实验中,用人淋巴瘤道迪细胞系作为靶细胞评价由多位人供者纯化的表达不同 FcγRIIIa aa158 多态性的 NK 效应细胞(见图 12 和 13)。如图所示,CHIR-12.12 能诱导所有三种基因型 NK 细胞的强效 ADCC。CHIR-12.12 裂解 F/F、V/F 和 V/V 的道迪细胞系的 ED₅₀ 分别为 4、2 和 0.4 pM(图 13)。利妥昔单抗裂解 F/F、V/F 和 V/V 的道迪细胞系的 ED₅₀ 分别为 53、21 和 9 pM(图 13)。

还用 CLL 患者细胞作为靶细胞评价由多位人供者纯化的表达不同 FcγRIIIa aa158 多态性的 NK 效应细胞(见图 14)。发现与利妥昔单抗相比,CHIR-12.12 对所有检测的 CLL 患者细胞是更强效的 ADCC 介导体(图 14)。这些数据表明,利妥昔单抗相比,CHIR-12.12 是更强效的 ADCC 介导体,即使对 aa158 V/F 或 F/F 基因型的 NK 细胞而言也是如此。

这些发现令人惊讶,因为与 V/V 相比,预期使用具有 F/F 或 V/F FcγRIIIa 158aa 多态性 NK 细胞的 ADCC 试验中 CHIR-12.12 的强度显然较低。再一次证明,利妥昔单抗在 NHL 中的临床活性与 FcγRIIIa 基因型有关。与 F/F 相比,具有 V/V 或 V/F 的 FcγRIIIa 158aa 多态性的患者对利妥昔单抗的反应更强。利妥昔单抗也是结合 B 细胞表面表达抗原的 IgG1 单克隆抗体,因此预计 CHIR-12.12 会同样偏爱 FcγRIIIa-158V 多态性。然而,发现 CHIR-12.12 诱导所有三种基因型 NK 细胞的强效 ADCC。

本发明所属领域的技术人员可从前文描述和相关附图中获益进而想出这些发明的许多改进形式和其它实施方案。因此,应该理解本发明不仅限于所公开的具体实施方案,这些改进形式和其它实施方案均包括在所附权利要求书的范围内。虽然本文使用了特定的术语,但它们仅是一般性和描述性地使用并非出于限制的目的。

将说明书中述及的所有出版物和专利申请全部纳入本文作参考,如同将每篇单独的出版物或专利申请特别和单独地纳入本文用作参考一样。

<110> S.L.奥科曼(Aukerman, Sharon Lea)
M.卢克曼(Luqman, Mohammad)

<120> 抗 CD40 抗体的应用

<130> PP028185.0002(319124)

<150> 60/732,580

<151> 2005-11-01

<160> 9

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 12.12 人抗-CD40 抗体轻链的编码序列

<221> CDS

<222> (1)...(720)

<400> 1

atg gcg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct	48
Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser	
1 5 10 15	
gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg acc	96
Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr	
20 25 30	
gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tcc agt cag agc	144
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	
35 40 45	
ctc ctg tat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag	192
Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys	
50 55 60	
cca ggg cag tct cca cag gtc ctg atc tct ttg ggt tct aat cgg gcc	240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala	
65 70 75 80	
tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	
85 90 95	
aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac	336
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	
100 105 110	
tgc atg caa gct cga caa act cca ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa	384
Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys	
115 120 125	
gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg	432
Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	
130 135 140	
cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg	480

Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	
145					150					155					160	
ctg	aat	aac	ttc	tat	ccc	aga	gag	gcc	aaa	gta	cag	tgg	aag	gtg	gat	528
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	
			165					170						175		
aac	gcc	ctc	caa	tcg	ggg	aac	tcc	cag	gag	agt	gtc	aca	gag	cag	gac	576
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	
		180						185					190			
agc	aag	gac	agc	acc	tac	agc	ctc	agc	agc	acc	ctg	acg	ctg	agc	aaa	624
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	
		195					200					205				
gca	gac	tac	gag	aaa	cac	aaa	gtc	tac	gcc	tgc	gaa	gtc	acc	cat	cag	672
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	
	210					215					220					
ggc	ctg	agc	tcg	ccc	gtc	aca	aag	agc	ttc	aac	agg	gga	gag	tgt	tag	720
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	*	
225					230					235						

<210> 2
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 12.12 人抗 CD40 抗体轻链

Met	Ala	Leu	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Trp	Val	Ser	
1				5					10					15		
Gly	Ser	Ser	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Thr	
			20					25					30			
Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	
		35					40				45					
Leu	Leu	Tyr	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	
	50				55					60						
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Val	Leu	Ile	Ser	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala	
	65				70				75					80		
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	
			85					90						95		
Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	
			100					105					110			
Cys	Met	Gln	Ala	Arg	Gln	Thr	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	
		115					120					125				
Val	Asp	Ile	Arg	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	
	130					135					140					
Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	
	145				150					155					160	
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	
			165					170						175		
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	
		180						185					190			
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	
		195					200					205				
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	
	210					215					220					
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys		
225					230					235						

<210> 3
 <211> 2016

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 12.12 人抗-CD40 抗体重链的编码序列(含内含子)

<400> 3

```

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctt gtt gct att tta aga ggt 48
gtc cag tgt cag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc 144
agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192
gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gag gaa agt aat aga tac cat gca 240
gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag atc 288
acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctc aga act gag gac acg gct gtg 336
tat tac tgt gcg aga gat ggg ggt ata gca gca cct ggg cct gac tac 384
tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gca agt acc aag ggc 432
cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc gct agc aag agc acc tct ggg ggc 480
aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg 528
acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc 576
ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg 624
acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg 672
aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt ggt gag agg 720
cca gca cag gga ggg agg gtg tct gct gga agc cag gct cag cgc tcc 768
tgc ctg gac gca tcc cgg cta tgc agt ccc agt cca ggg cag caa ggc 816
agg ccc cgt ctg cct ctt cac ccg gag gcc tct gcc cgc ccc act cat 864
gct cag gga gag ggt ctt ctg gct ttt tcc cca ggc tct ggg cag gca 912
cag gct agg tgc ccc taa ccc agg ccc tgc aca caa agg ggc agg tgc 960
tgg gct cag acc tgc caa gag cca tat ccg gga gga ccc tgc ccc tga 1008
cct aag ccc acc cca aag gcc aaa ctc tcc act ccc tca gct cgg aca 1056
cct tct ctc ctc cca gat tcc agt aac tcc caa tct tct ctc tgc aga 1104
gcc caa atc ttg tga caa aac tca cac atg ccc acc gtg ccc agg taa 1152
gcc agc cca ggc ctc gcc ctc cag ctc aag gcg gga cag gtg ccc tag 1200
agt agc ctg cat cca ggg aca ggc ccc agc cgg gtg ctg aca cgt cca 1248
cct cca tct ctt cct cag cac ctg aac tcc tgg ggg gac cgt cag tct 1296
tcc tct tcc ccc caa aac cca agg aca ccc tca tga tct ccc gga ccc 1344
ctg agg tca cat gcg tgg tgg tgg acg tga gcc acg aag acc ctg agg 1392
tca agt tca act ggt acg tgg acg gcg tgg agg tgc ata atg cca aga 1440
caa agc cgc ggg agg agc agt aca aca gca cgt acc gtg tgg tca gcg 1488
tcc tca ccg tcc tgc acc agg act ggc tga atg gca agg agt aca agt 1536
gca agg tct cca aca aag ccc tcc cag ccc cca tcg aga aaa cca tct 1584
cca aag cca aag gtg gga ccc gtg ggg tgc gag ggc cac atg gac aga 1632
ggc cgg ctc ggc cca ccc tct gcc ctg aga gtg acc gct gta cca acc 1680
tct gtc cct aca ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 1728
cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 1776
gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 1824
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1872
gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1920
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1968
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 2016

```

<210> 4

<211> 469

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12.12 人抗-CD40 抗体重链

<400> 4

```

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

```

```

      50      55      60
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
65      70      75      80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
      85      90      95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
      100      105      110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
      115      120      125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
      130      135      140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145      150      155      160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
      165      170      175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
      180      185      190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
      195      200      205
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
210      215      220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
225      230      235      240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
      245      250      255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
      260      265      270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275      280      285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290      295      300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305      310      315      320
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
      325      330      335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
      340      345      350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
      355      360      365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
370      375      380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385      390      395      400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
      405      410      415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
      420      425      430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
      435      440      445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450      455      460
Leu Ser Pro Gly Lys
465

```

<210> 5

<211> 469

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 12.12 人抗-CD40 抗体变体的重链

<400> 5

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
 1      5      10      15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
      20      25      30

```

```

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
   35         40         45
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
   50         55         60
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
   65         70         75         80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
   85         90         95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
  100        105        110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
  115        120        125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
  130        135        140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
  145        150        155        160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
  165        170        175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
  180        185        190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
  195        200        205
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
  210        215        220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
  225        230        235        240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
  245        250        255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
  260        265        270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
  275        280        285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
  290        295        300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
  305        310        315        320
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
  325        330        335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
  340        345        350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
  355        360        365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
  370        375        380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
  385        390        395        400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
  405        410        415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
  420        425        430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
  435        440        445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
  450        455        460
Leu Ser Pro Gly Lys
  465

```

<210> 6

<211> 612

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(612)

<221> misc_feature

<222> (0)...(0)

<223> 人 CD40 短同种型的编码序列

<400> 6

```

atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc 48
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15

gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta 96
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20 25 30

ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg 144
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
35 40 45

agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa 192
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
50 55 60

agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac 240
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65 70 75 80

aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc 288
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95

tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg 336
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110

agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc 384
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125

ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag 432
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140

ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa 480
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160

tgt cac cct tgg aca agg tcc cca gga tcg gct gag agc cct ggt ggt 528
Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
165 170 175

gat ccc cat cat ctt cgg gat cct gtt tgc cat cct ctt ggt gct ggt 576
Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
180 185 190

ctt tat caa aaa ggt ggc caa gaa gcc aac caa taa 612
Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln *
195 200

```

<210> 7

<211> 203

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7

```

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20 25 30
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val

```

```

      35      40      45
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
  50      55      60
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
  65      70      75      80
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
      85      90      95
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
      100      105      110
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
      115      120      125
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
      130      135      140
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
      145      150      155      160
Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
      165      170      175
Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
      180      185      190
Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln
      195      200

```

<210> 8
 <211> 834
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(834)
 <221> misc_feature
 <222> (0)...(0)
 <223> 人CD40 长同种型的编码序列

```

<400> 8
atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc 48
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
  1      5      10      15

gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta 96
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
      20      25      30

ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg 144
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
      35      40      45

agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa 192
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
      50      55      60

agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac 240
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
      65      70      75      80

aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc 288
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
      85      90      95

tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg 336
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
      100      105      110

agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc 384
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
      115      120      125

```

```

ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag 432
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140

ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa 480
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160

tgt cac cct tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag 528
Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln
165 170 175

gca ggc aca aac aag act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg ctg 576
Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
180 185 190

aga gcc ctg gtg gtg atc ccc atc atc ttc ggg atc ctg ttt gcc atc 624
Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala Ile
195 200 205

ctc ttg gtg ctg gtc ttt atc aaa aag gtg gcc aag aag cca acc aat 672
Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn
210 215 220

aag gcc ccc cac ccc aag cag gaa ccc cag gag atc aat ttt ccc gac 720
Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp
225 230 235 240

gat ctt cct ggc tcc aac act gct gct cca gtg cag gag act tta cat 768
Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His
245 250 255

gga tgc caa ccg gtc acc cag gag gat ggc aaa gag agt cgc atc tca 816
Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser
260 265 270

gtg cag gag aga cag tga 834
Val Gln Glu Arg Gln *
275

```

```

<210> 9
<211> 277
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

```

```

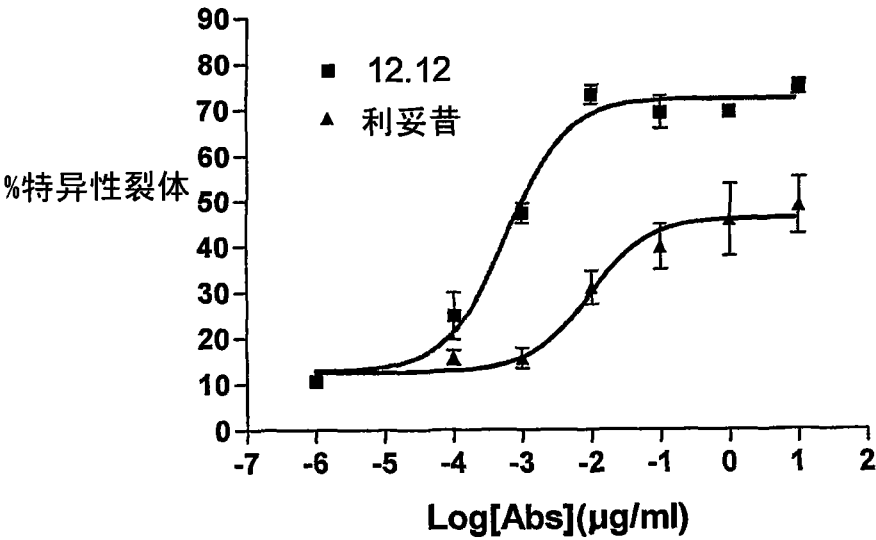
<400> 9
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20 25 30
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
35 40 45
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
50 55 60
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
65 70 75 80
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160

```

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

ADCC-029 (道迪淋巴瘤细胞系)

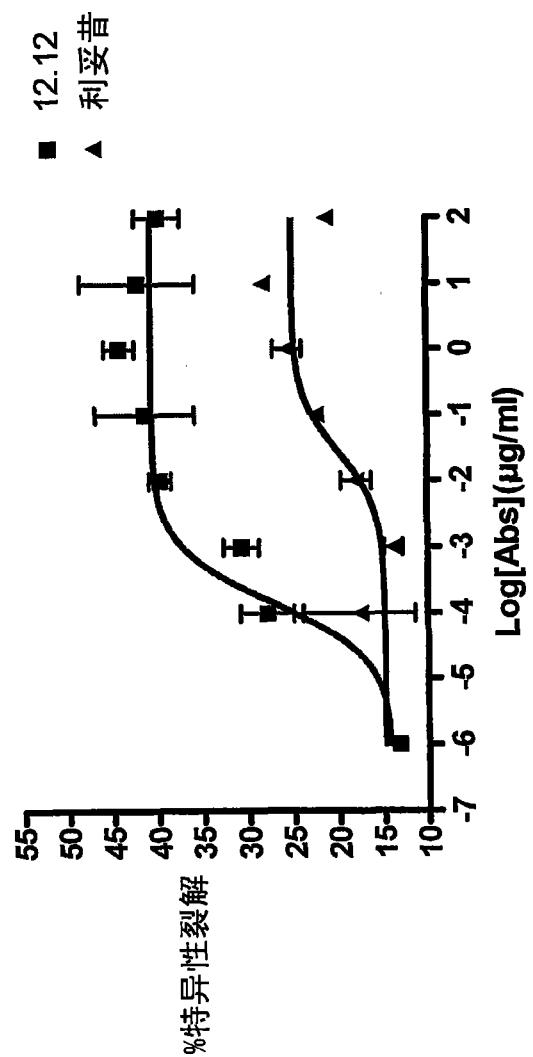
抗CD40抗体杀道迪细胞，EC50为pM级



12.12的EC50为4.07pM; 利妥昔为66.93pM

图 1A

ADCC-036 (纳玛淋巴瘤细胞系)
抗CD40抗体对纳玛细胞的ADCC杀伤活性, EC50为pM级



12.12的EC50为1.01pM; 利妥昔为189.72pM

图 1B

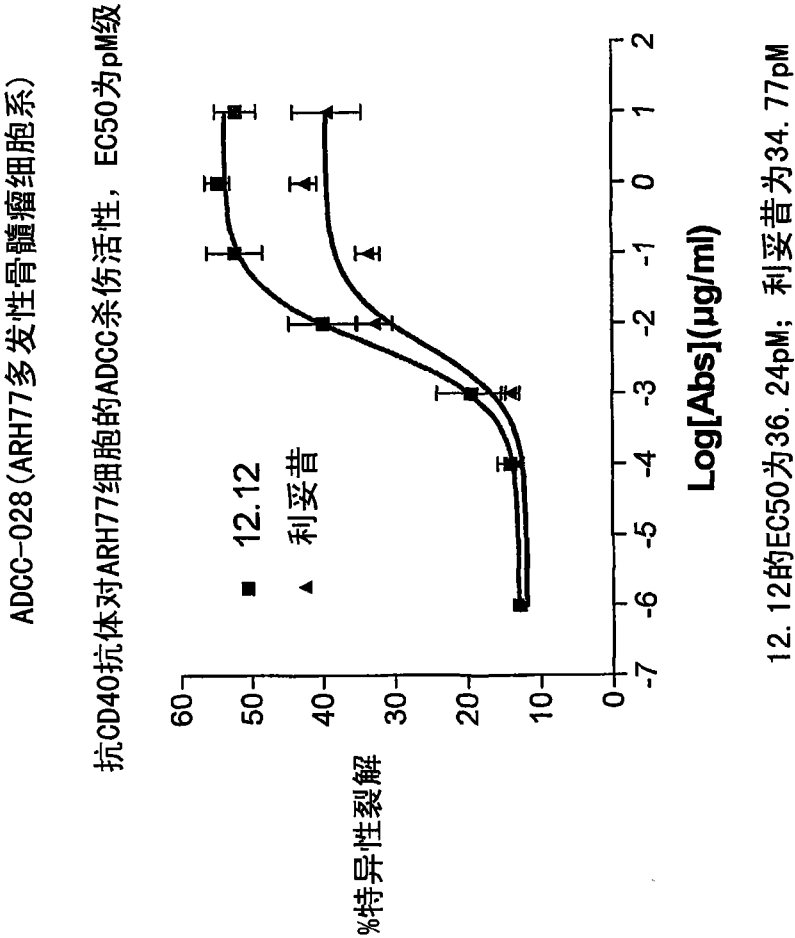


图 1C

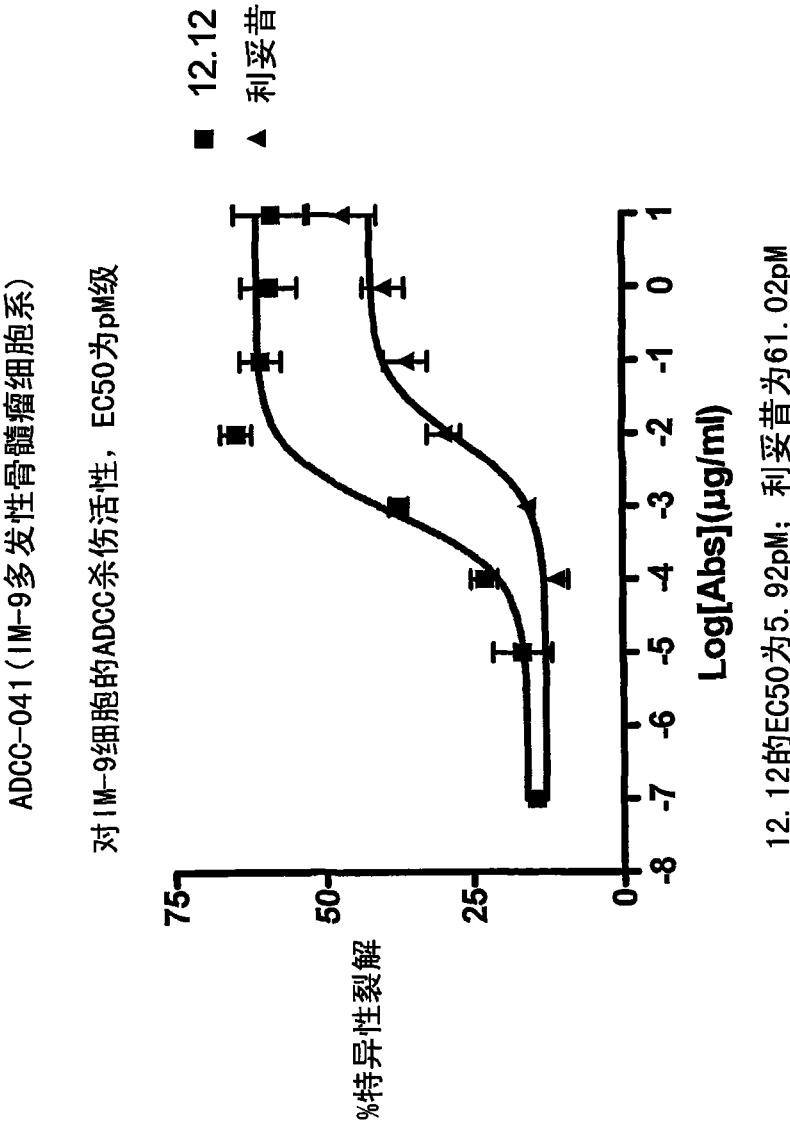
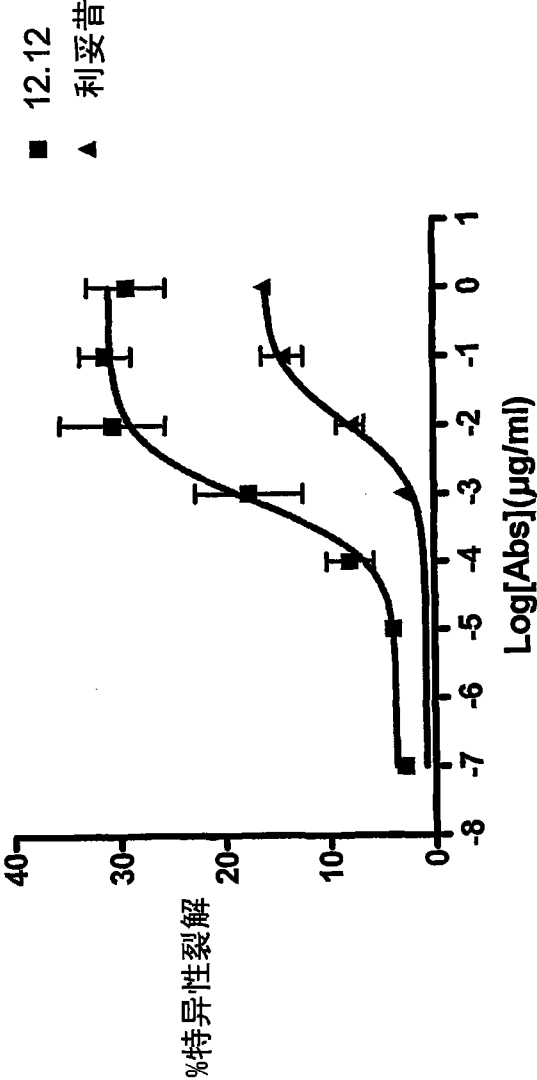


图 1D

ADCC-056 (EHEB, B-CLL细胞系)
对EHEB细胞的ADCC活性, EC50为pM级



12.12的EC50为5.56pM; 利妥昔为76.43pM

图 1E

ADCC-069 (CCR5-SB, B-ALL细胞系)
对CCR5-SB细胞的ADCC杀伤活性, EC50为pM级

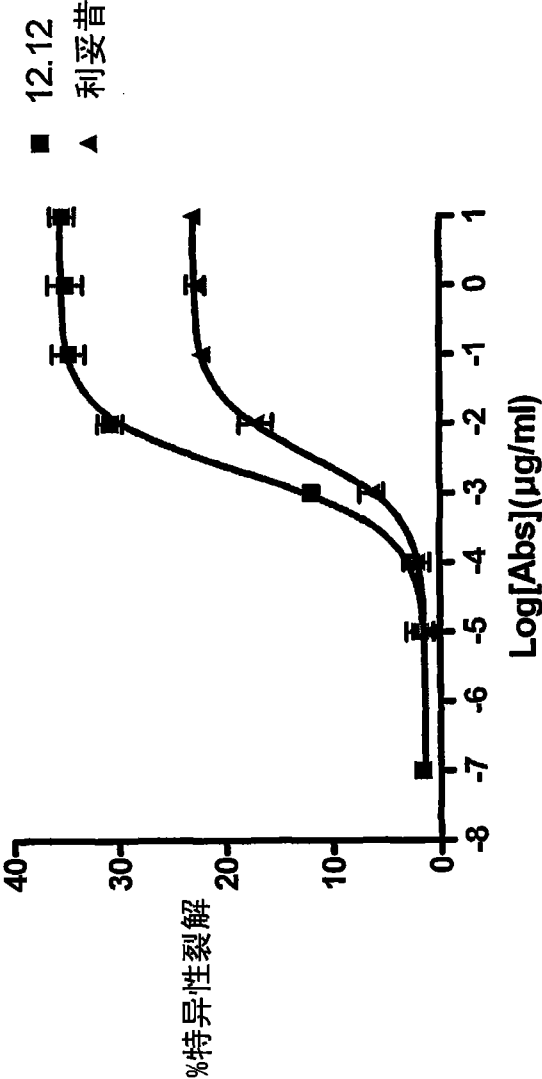
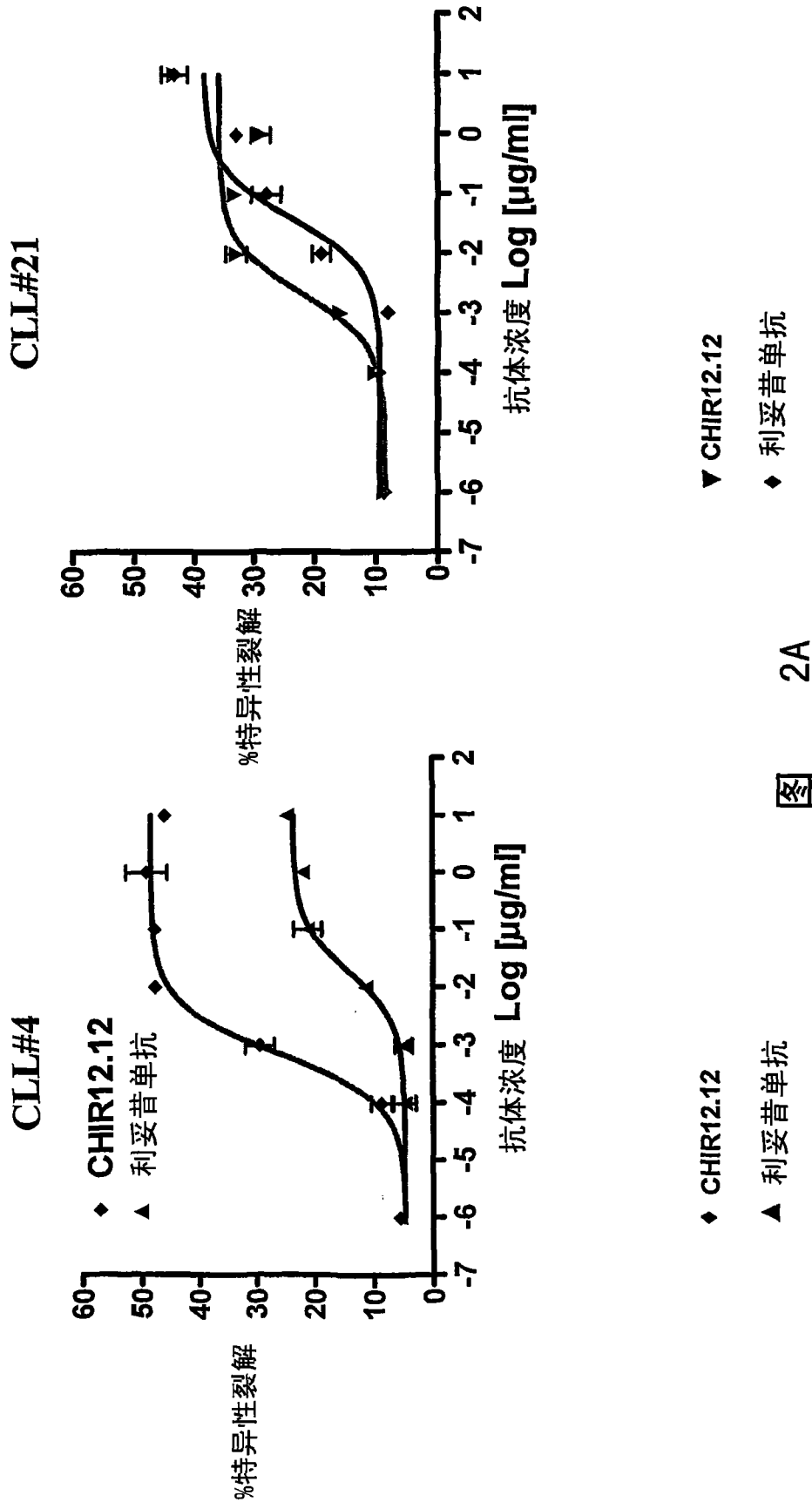


图 1F

12.12的EC50为14.06pM; 利妥昔为24.11pM

对CLL患者细胞CHIR-12.12介导的ADCC高于利妥昔单抗



图

2A

对CLL患者细胞CHIR-12.12介导的ADCC高于利妥昔单抗

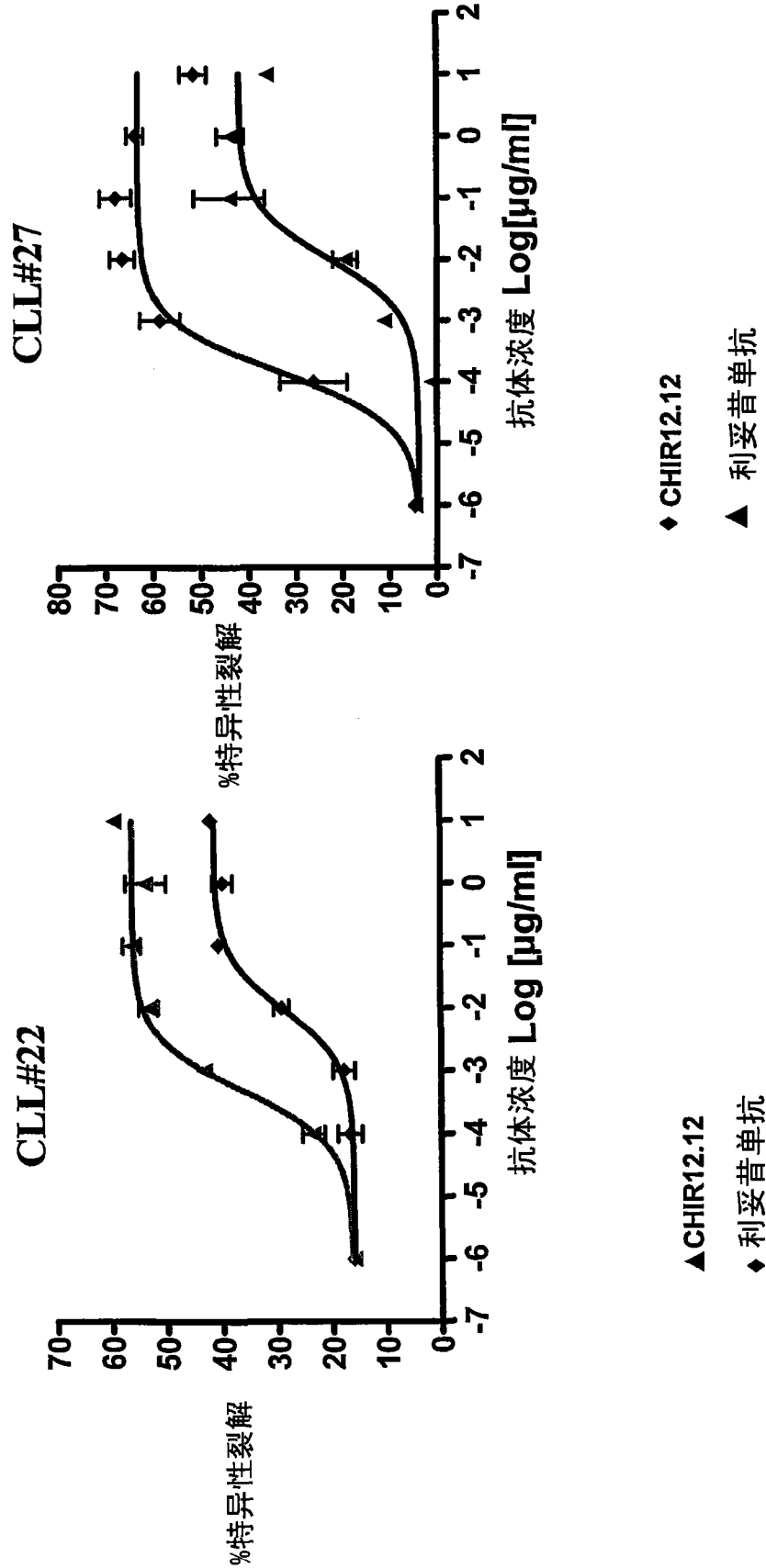
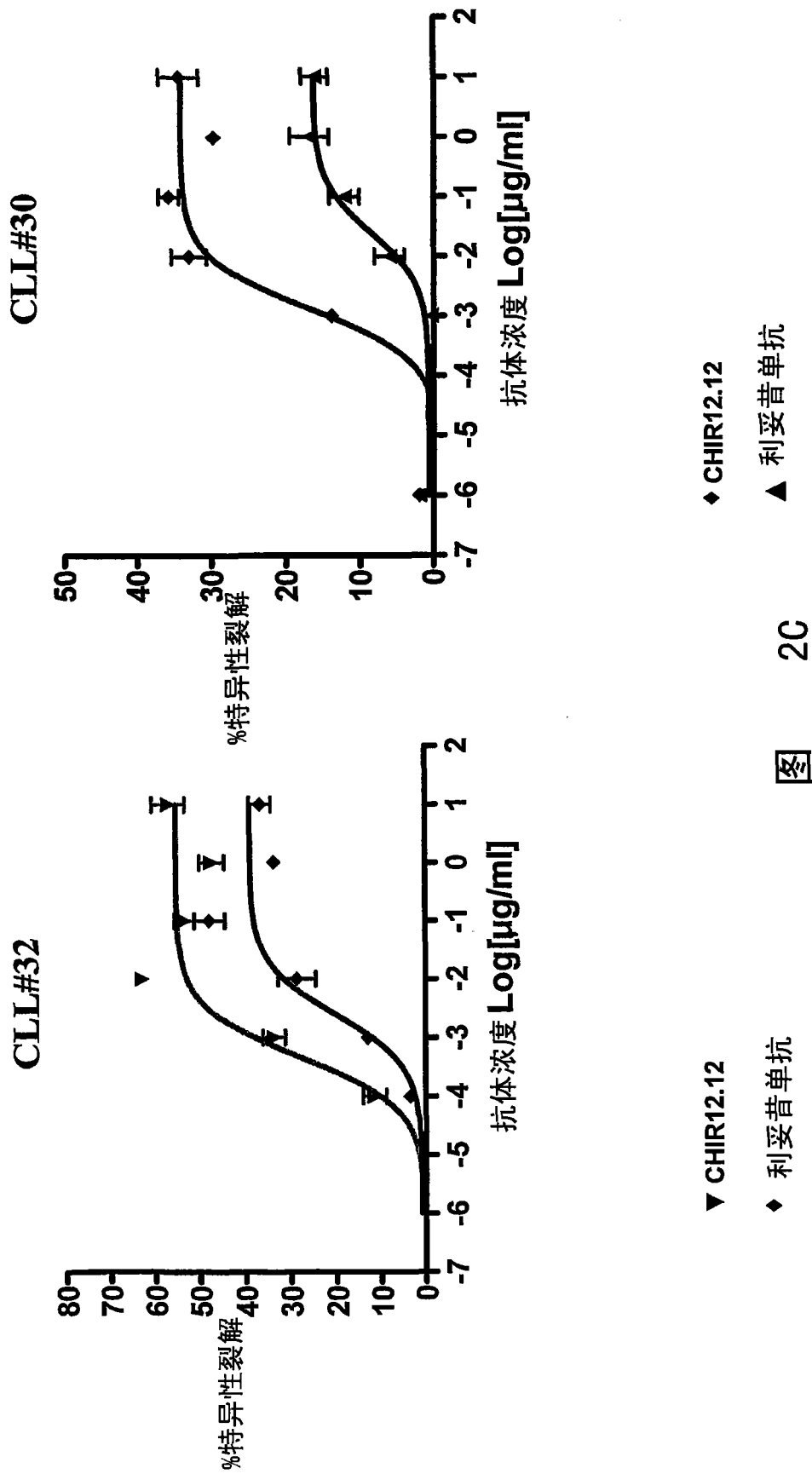
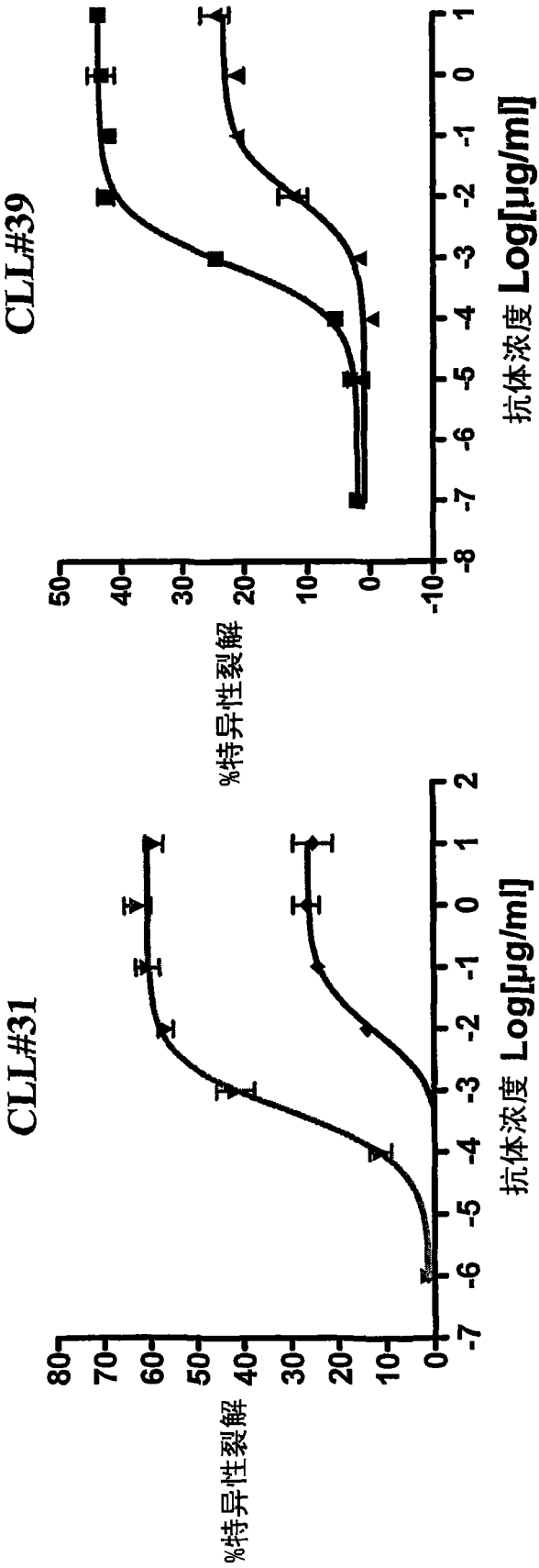


图 2B

对CLL患者细胞CHIR-12.12介导的ADCC高于利妥昔单抗



对CLL患者细胞CHIR-12.12介导的ADCC高于利妥昔单抗



▼ CHIR12.12 ▲ 利妥昔单抗

◆ 利妥昔单抗 ■ CHIR12.12

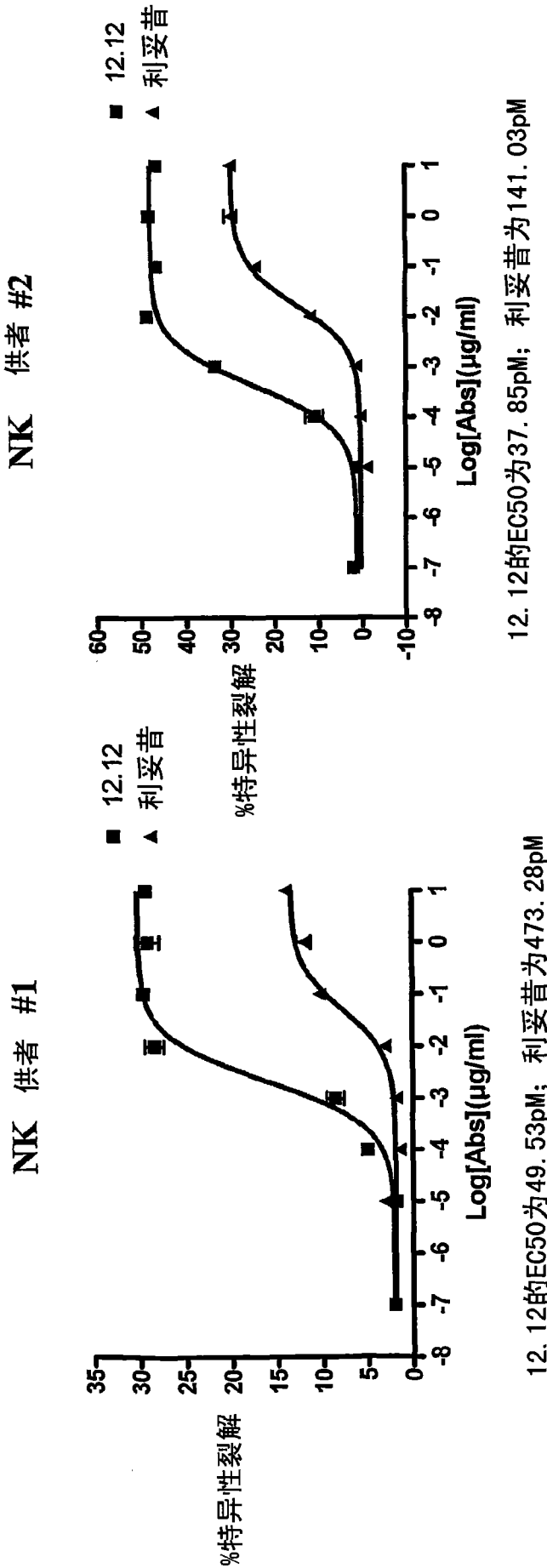
图 2D

比较CHIR-12.12与利妥昔单抗介导的多位供者人NK细胞杀伤CLL患者癌细胞(n=9)的ADCC

抗体浓度 (ug/ml)	相对于CHIR-12.12, 利妥昔 单抗介导裂解的比例	CHIR-12.12 EC50 (pM)	利妥昔单抗 EC50(pM)
10	0.57 ± 0.18	13.25 ± 16.73	147.22 ± 135.6
1	0.62 ± 0.24		
0.1	0.56 ± 0.21		
0.01	0.29 ± 0.14		
0.001	0.14 ± 0.11		
0.0001	0.71 ± 2.18		
0.00001	-0.45 ± 0.49		

图 3

对相同的靶细胞NK供者ADCC活性的差异



图

4

对CLL患者细胞和正常B细胞表达CD40和CD20分子的定量测定

CLL 患者 #	CHIR-12.12	利妥昔单抗
	CD40 分子	CD20 分子
30	684 ± 8	9584 ± 44
31	1590 ± 79	6838 ± 135
27	1158 ± 57	1455 ± 126
32	2860 ± 38	28494 ± 547
33	1421 ± 201	5799 ± 160
入B细胞 (n=2)	4067 ± 438	68358 ± 22830

图 5

CLL患者细胞CD40和CD20分子的相对表达与ADCC活性

CLL 患者 #	最大裂解%			靶分子CD20/ CD40之比
	CHIR-12.12	利妥昔单抗	CHIR-12, 12与利妥昔 单抗的差异	
4	46.35	20.15	26.2	N/A
21	32.9	32.8	0.1	N/A
22	46.65	31.08	15.57	N/A
27	79.87	56.04	23.83	1.26
32	56.92	49.97	6.95	9.96
30	37.6	21.33	16.27	14.01
31	63.4	27.27	36.13	4.3
33(1)	27.71	12.33	15.38	
33(2)	48.57	28.63	19.94	4.08
39	44.18	21.13	23.05	N/A
平均值	48.42	30.07		
SD	15.27	13.57		

图 6

4°C和37°C培育3小时后细胞表面结合的CHIR-12, 12的水平
(通过荧光强度测定)

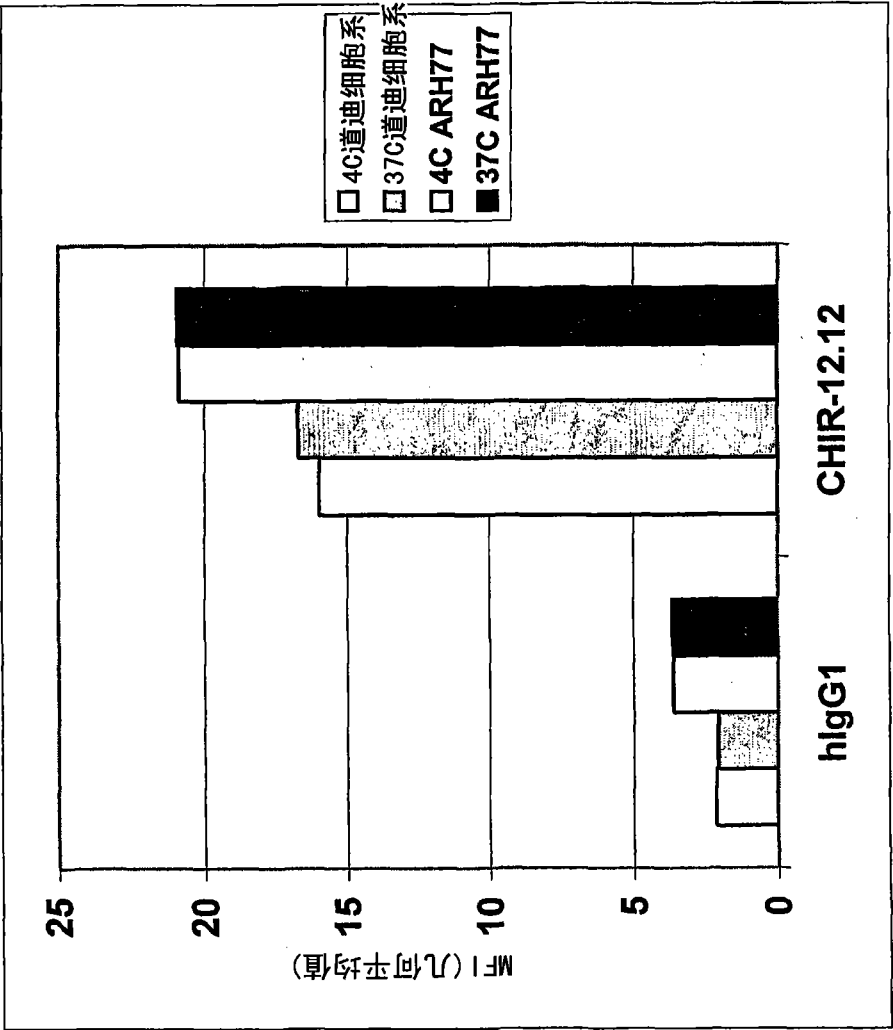
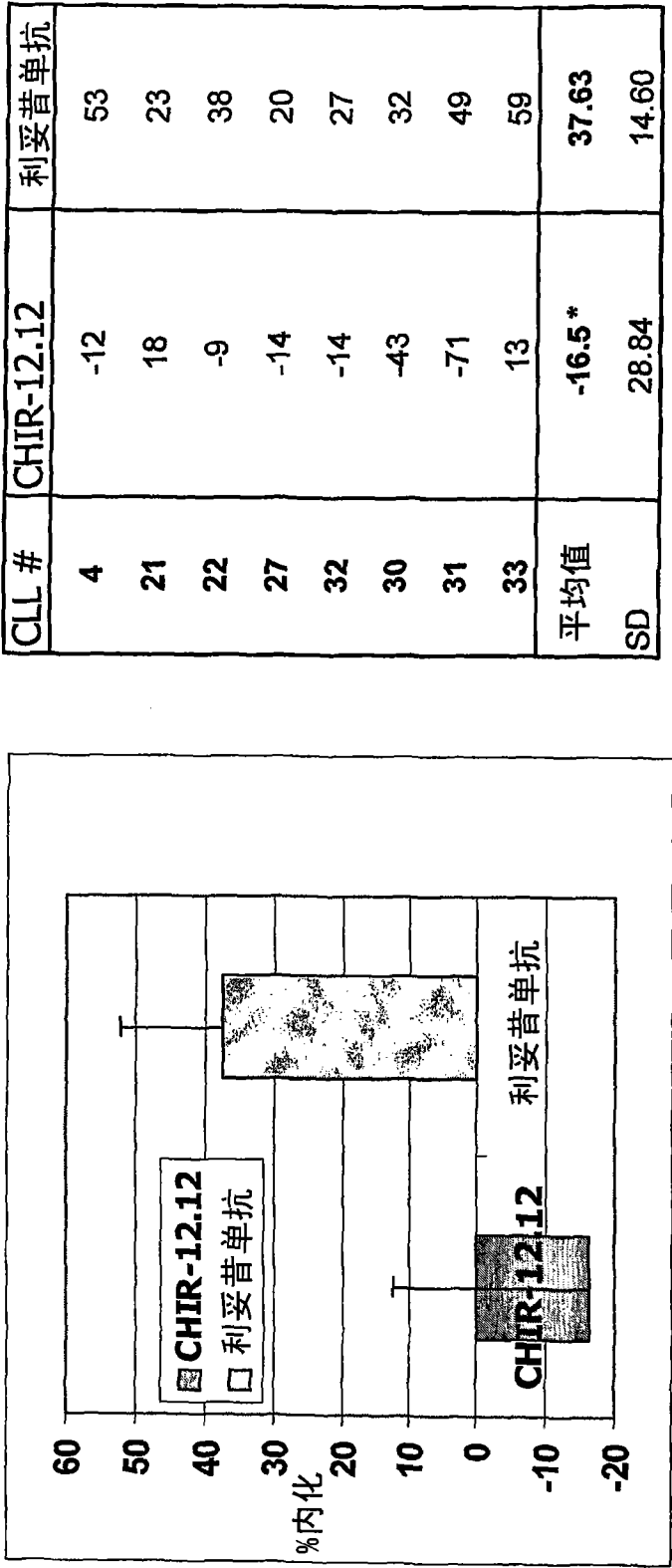


图 7

CLL患者细胞 (n=8) 内化CHIR-12.12和利妥昔单抗的百分比: FACS



内化% = $100 * \{ (4^{\circ}\text{C} \text{ 测试抗体的GMF} - 4^{\circ}\text{C} \text{ 同种型抗体的GMF}) - (37^{\circ}\text{C} \text{ 测试抗体的GMF} - 37^{\circ}\text{C} \text{ 同种型抗体的GMF}) \} / (4^{\circ}\text{C} \text{ 测试抗体的GMF} - 4^{\circ}\text{C} \text{ 同种型抗体的GMF})$

GMF: 荧光强度的几何平均值

*内化%为负表明与4℃相比37℃时CHIR-12.12的结合水平较高

图 8

正常人B细胞中CHIR-12.12和利妥昔单抗的内化：共聚焦显微镜

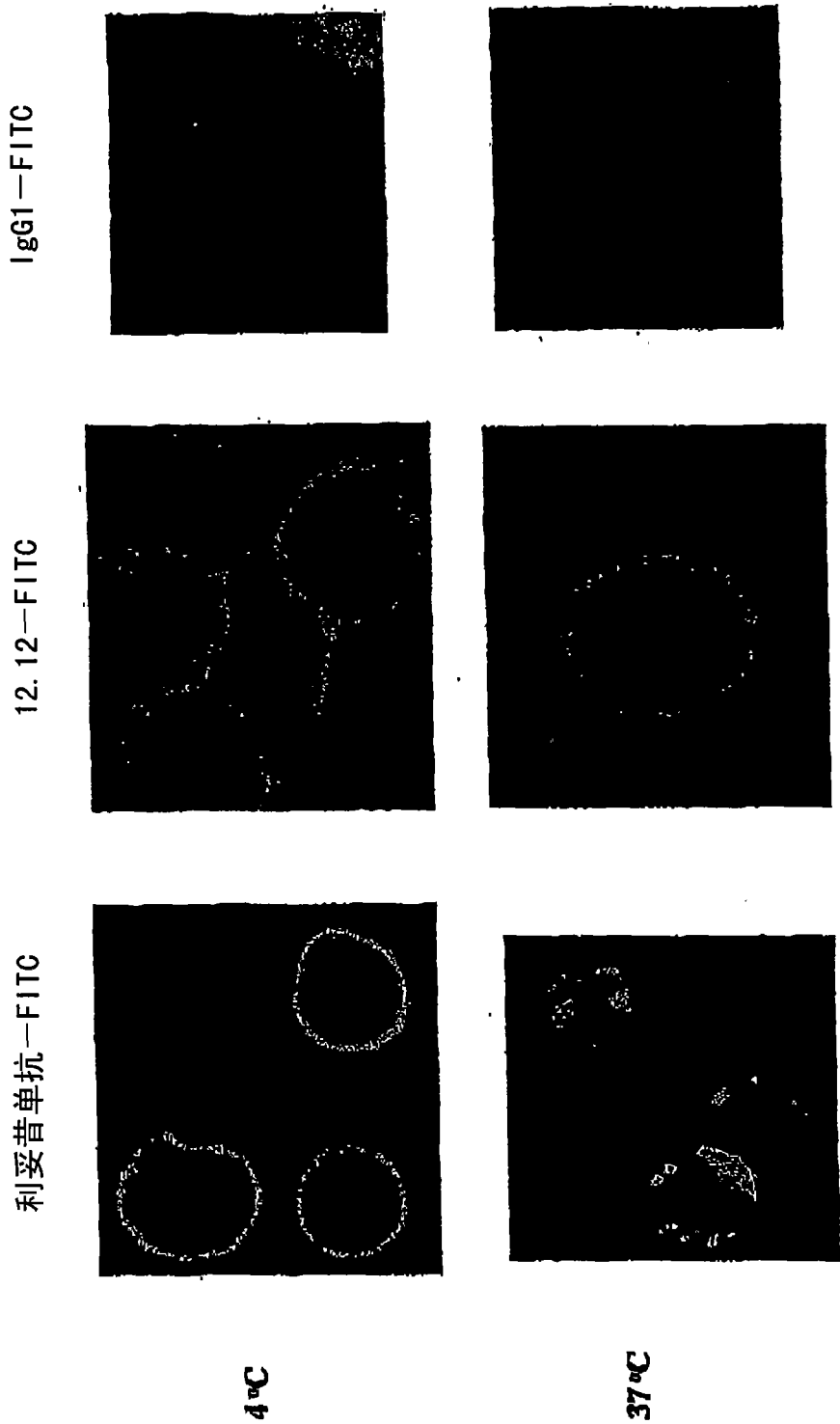


图 9

CLL#33患者细胞中CHIR-12.12和利妥昔单抗的内化：共聚焦显微镜

利妥昔单抗—Alexa488 12.12—Alexa488 IgG1—Alexa488

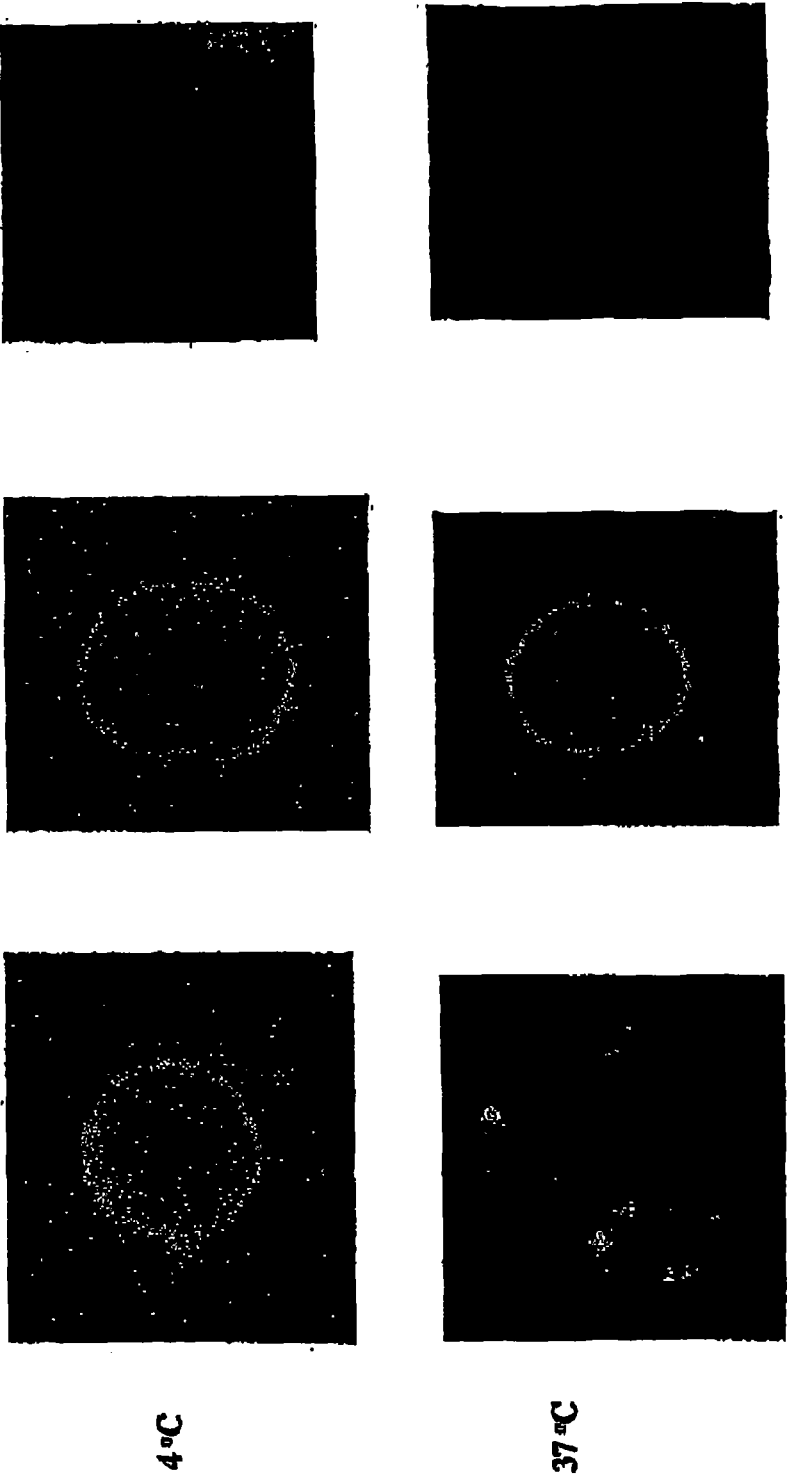
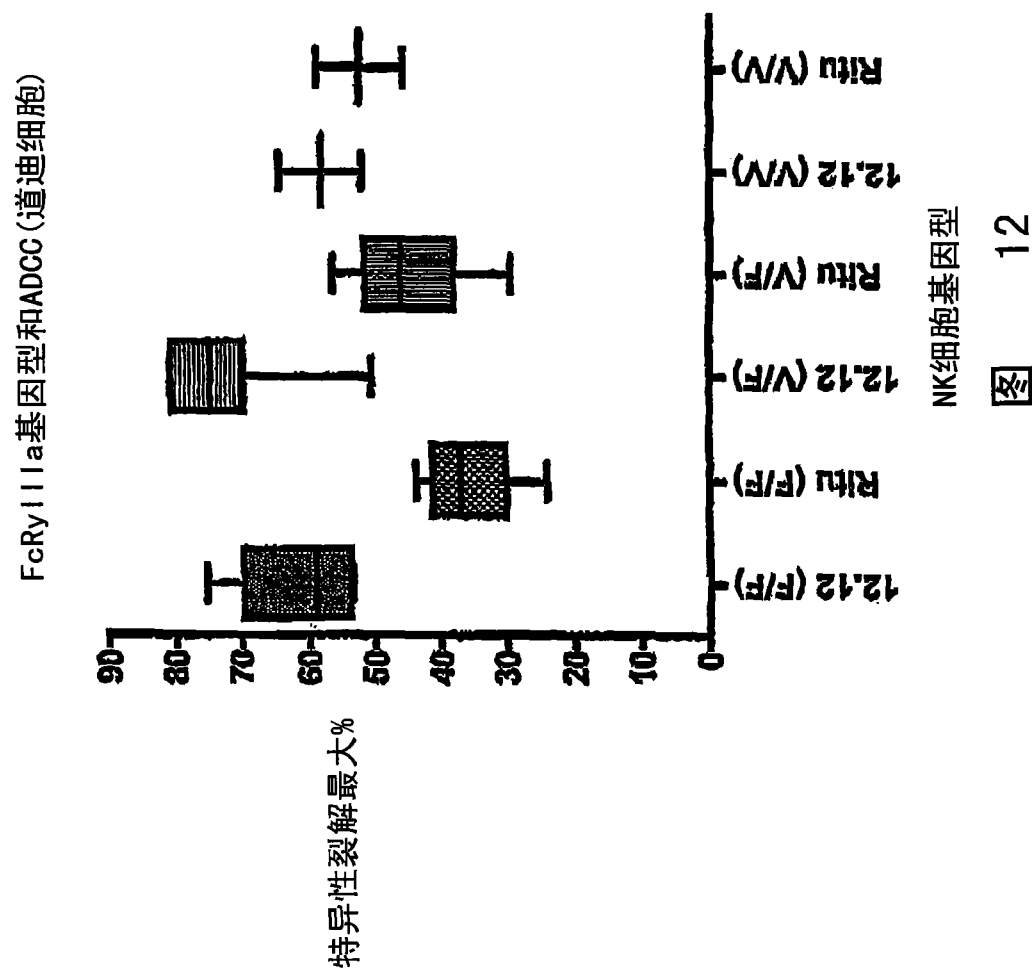


图 10

ADCC活性与内化之间的关系

CLL 患者 #	最大裂解%			%内化	
	CHIR-12.12	利妥昔单抗	CHIR-12, 12与利妥昔单抗的差异	CHIR-12.12	利妥昔单抗
4	46.35	20.15	26.2	No	53
21	32.9	32.8	0.1	18	23
22	46.65	31.08	15.57	No	38
27	79.87	56.04	23.83	No	20
32	56.92	49.97	6.95	No	27
30	37.6	21.33	16.27	No	32
31	63.4	27.27	36.13	No	49
33(1)	27.71	12.33	15.38		
33(2)	48.57	28.63	19.94	13	59
39	44.18	21.13	23.05	N/A	N/A

图 11



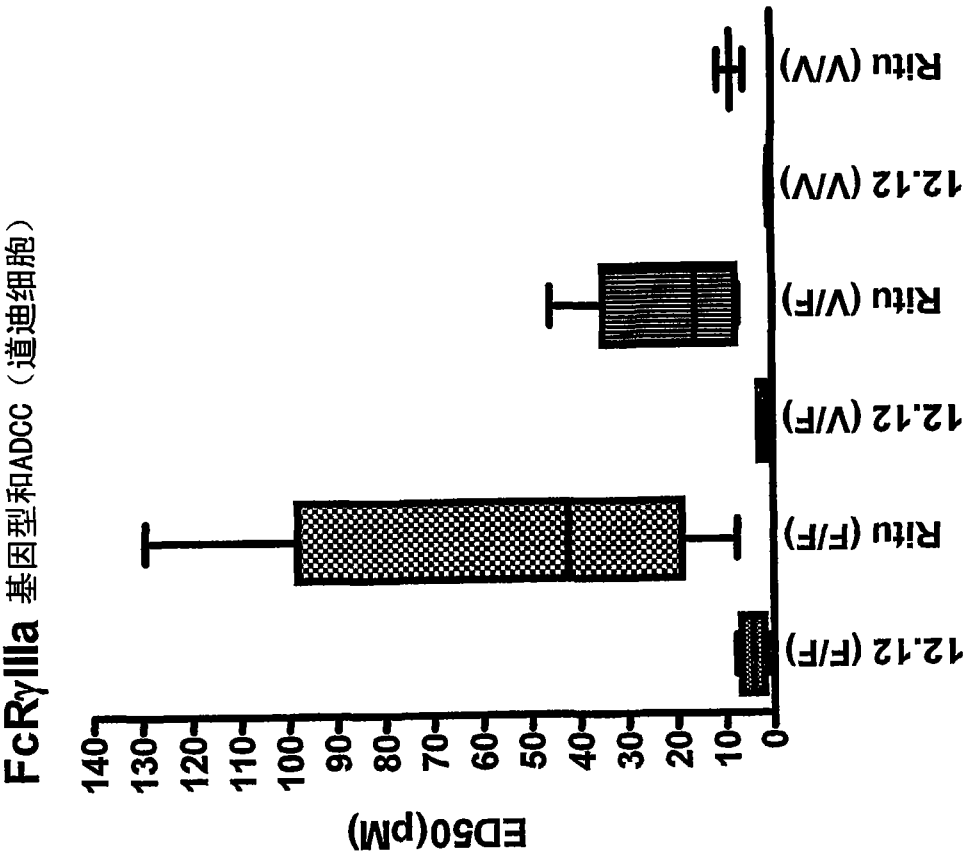


图 13
NK细胞基因型

比较CHIR-12.12与利妥昔单抗介导不同FcR γ IIIa基因型多位供者人NK细胞杀伤CLL患者癌细胞(n=9)的ADCC

CLL 患者 #	最大裂解%			EC 50(pM)			NK 供者的 基因型
	CHIR-12.12	利妥昔单抗	CHIR-12.12与 利妥昔单抗的差异	CHIR-12.12	利妥昔单抗	利妥昔单抗 与CHIR-12.12 相比的倍数	
4	46.35	20.15	26.2	5.12	127.64	25	FF
21	32.9	32.8	0.1	14.86	272.68	18	FF
22	46.65	31.08	15.57	3.24	62.08	19	FF
27	79.87	56.04	23.83	0.99	71.54	72	VF
32	56.92	49.97	6.95	3.14	16.58	5	VF
30	37.6	21.33	16.27	8.87	170.34	19	VV
31	63.4	27.27	36.13	3.23	64.59	20	VV
33(1)	27.71	12.33	15.38	49.53	473.28	10	FF
33(2)	48.57	28.63	19.94	37.85	141.03	4	VV
39	44.18	21.13	23.05	5.63	72.42	13	VF
Mean	48.42	30.07	18.34	13.25	147.22	20.53	
SD	15.27	13.57	10.09	16.73	135.60	19.43	

图 14