抗 CD40L 抗体及其在人自身免疫疾病治疗的应用

本发明涉及特异性结合 CD40L 的新型抗体和抗体片段以及含有所述抗体或抗体片段的组合物。本发明还涉及编码所述抗体或其抗体片段的核酸及包含其的宿主细胞，以及相关用途。此外，本发明涉及这些抗体和抗体片段的治疗和诊断用途。

发明背景

CD40 配体 （CD40L）也被称为 CD154、gp39、TNF 相关活化蛋白（TRAP）、5c8 抗原或 T-BAM，是一种全长为 39 kDa 的二型跨膜蛋白。CD40L 属于肿瘤坏死因子（TNF）超家族成员，以同源三聚体的形式存在于细胞膜上。其主要表达在活化的 T 细胞上，同时也存在于其他类型的免疫细胞和非免疫细胞上，例如上皮细胞、单核细胞、树突状细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、内皮细胞及血小板。CD40L/CD40 信号通路介导了多种免疫反应和炎症反应过程，对正常的免疫应答起着重要作用。已有的研究表明，CD40L/CD40 信号通路不仅介导了多种淋巴细胞之间的信号传导，同时也参与了非免疫细胞之间的相互作用。因此，CD40L/CD40 信号通路在多种慢性炎症疾病，例如自身免疫性疾病、神经退行性疾病、移植物抗宿主病、肿瘤以及动脉粥样硬化等过程中起着重要的致病作用。

目前，已有多个靶向 CD40/CD40L 的抗体或蛋白药物在临床上显示出积极的疗效。早期针对 CD40L 的抗体 Ruplizumab(CN101072587B)在系统性红斑狼疮和狼疮肾炎等疾病中已显示出具有良好的治疗效果，但由于同时出现了血栓等严重的安全性事件而开发停止（Nat. Med. 6 (2) (2000) 114）。后续的研究表明，血栓事件主要是由于游离的 CD40L 与抗体形成免疫复合体，随后通过和 C1q 以及 FcgR 的相互作用，尤其是血小板上表达的 FcgRIIa 的互作，诱发血小板的激活与凝集，导致血栓事件的发生。因此，完全去除 Fc 区域效应功能对于 anti-CD40L 抗体的安全性至关重要。

在后续进入临床实验的靶向 CD40L 的抗体均对 Fc 区域进行了改造，主要的技术路线分为两种：一是通过突变减弱 Fc 区域的效应功能；二是完全去除 Fc 区域，同时利用其他技术手段延长分子的半衰期。但二者都存在一定的问题。其中在第一种技术路线中，以 frexalimab（AU2016294417B2）为例，二者分别采用了 C220S/C226S/C229S/P238S 和 E269R/K322A 突变减弱 Fc 区域的效应功能，但随后的研究表明，这些突变均不能完全去除 Fc 的效应功能，因此都存在一定的安全风险。第二种技术路线以 Dapirolizumab pegol（US8293237B2）和 Dazodalibep（CN101679521B）为例，其中 Dapirolizumab pegol 只保留了 anti-CD40L 的单价 Fab，通过与 PEG 交联的方式来延长其半衰期。但这种单价的分子形式减弱了分子的生物学活性，同时 PEG 交联也增加了分子 CMC 的难度。Dazodalibep 采用的是非传统抗体形式的 Tn3 骨架蛋白作为靶向抑制 CD40L 的分子，并通过融合白蛋白来延长分子的半衰期。但临床显示，这种形式的分子具有很高的免疫原性，因此也存在一定的安全性风险。

因此具有更好的安全性与保留抗体药物的药代动力学特点，且同时具有更强的生物学活性的靶向 CD40/CD40L 的药物，尤其抗体药物是期望的。

发明概述

本发明中提供了一种靶向 CD40L 的抗体或其片段（例如抗原结合片段）。具体地，本发明通过小鼠杂交瘤技术，筛选得到全新的且具有高亲和力的靶向 CD40L 的抗体。此外，本发明还提供了突变技术以及其利用该技术产生的突变体，以在保留传统 IgG 分子形式的同时，完全去除了 Fc 区域所介导的效应功能（ADCC, ADCP, CDC），同时降低了安全性风险。具体地，本发明通过不同的 Fc 突变技术（突变位点为 L234A/L235A/ΔP329），提供了靶向 CD40L 的抗体。

本发明实施方案中的抗体显示出更好的安全性。具体地，该抗体采用了 IgG 的分子形式，通过 Fc 突变技术，该分子完全去除了 Fc 区域与所有 FcγRs 的结合能力，并保留了和 FcRn 的亲和力。因此，该抗体及其片段在降低分子的免疫原性及安全性风险的同时，保留了抗体分子具有的良好的药代动力学特点。

另一方面，本发明实施方案中的抗体还显示出更强的生物学活性。具体地，通过筛选得到的靶向 CD40L 的高亲和力抗体及其片段可以更有效地阻断 CD40L/CD40 信号通路和/或其所介导的生物学功能。因此，该抗体及其片段显示了出更优的生物学活性。

在一些实施方案中，本发明涉及一种抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，所述抗体包含：

（i） 如 SEQ ID NO:4 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:10 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

（ii） 如 SEQ ID NO:16 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:21 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

例如，其中所述 HCDR1 根据 Kabat 和 Chothia 组合确定，所述 HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 根据 Kabat 确定。

在一些实施方案中，本发明涉及一种抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含第一重链互补决定区（HCDR1）、第二重链互补决定区（HCDR2）、第三重链互补决定区（HCDR3）以及第一轻链互补决定区（LCDR1）、第二轻链互补决定区（LCDR2）和第三轻链互补决定区（LCDR3），其中：

（i） 所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或分别由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成；或

（ii） 所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别包含 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或分别由 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区（VH），其中所述重链可变区包含与选自 SEQ ID NO:4 或 16 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成或包含选自 SEQ ID NO:4 或 16 所示的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含轻链可变区（VL），其中所述轻链可变区包含与选自 SEQ ID NO:10 或 21 所示的氨基酸序列具有

至少 90%同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成或包含选自 SEQ ID NO:10 或 21 所示的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中

（i） 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

（ii） 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中

(i) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含 Fc 区。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其中所述 Fc 区来自人的 IgGFc，例如，来自人 IgG1 的 Fc,来自人 IgG2 的 Fc,来自人 IgG3 的 Fc 或来自人 IgG4 的 Fc。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其中所述 Fc 区包含降低或消除效应子功能的突变，和/或消除与 FcγR 结合且保留与 FcRn 结合亲和力的突变。在一些实施方案中，所述突变为 L234A/L235A 和 P329 缺失突变。在一些实施方案中，所述 Fc 区

(i)包含氨基酸序列 SEQ ID NO:23 或 24 或由其组成;

(ii)包含与氨基酸序列 SEQ ID NO:23 具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性的氨基酸序列；或者

(iii)包含与氨基酸序列 SEQ ID NO:24 具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性的氨基酸序列，且包含 L234A/L235A 和 P329 缺失突变。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链恒定区，所述重链恒定区来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区，优选地，所述重链恒定区

(i) 包含选自 SEQ ID NO:5 或 26 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含与 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；或者

(iii)包含与 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且具有 L234A/L235A 和 P329 缺失突变。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含轻链恒定区，所述轻链恒定区为 lambda 或 Kappa 轻链恒定区，优选地，所述轻链恒定区

(i)包含与 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或

(ii)包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链，其中所述重链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:6 或 17 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或

(ii)包含选自 SEQ ID NO:6 或 17 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含轻链，其中所述轻链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:12 或 22 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或

(ii)包含选自 SEQ ID NO:12 或 22 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中

(i) 所述重链包含与 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且所述轻链包含与 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 所述重链包含与 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且所述轻链包含与 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明涉及抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中

（i） 所述重链包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或由其组成的，所述轻链包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列或由其组成;

（ii） 所述重链包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列或由其组成的，所述轻链包含 SEQ ID

NO:22 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，所述抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中，所述抗体是人源化的抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中，抗原结合片段是选自以下的抗体片段：Fv，Fab，Fab'，Fab'-SH，$F(ab')_2$、dAb(domain antibody)、线性抗体、单链抗体(例如 scFv)；单结构域抗体(sdAb)例如 VHH、双价抗体或其片段、或骆驼科抗体或双体抗体(diabody)。

在一些实施方案中，所述抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段具有一种或多种以下性质：

a) 以高亲和力结合 CD40L（例如人 CD40L）；

b) 抑制 CD40 与 CD40L 的结合

c) 抑制 CD40/CD40L 信号通路；

d) 抑制 B 细胞激活或增殖；

e) 抑制 B 细胞的增殖；

f) 抑制 B 细胞成熟分化，例如抑制 B 细胞分化为浆细胞；

g) 抑制树突细胞的 IL-12 的分泌；

h) 不引起血小板的激活；

i) 治疗或预防免疫疾病，例如多发性硬化症(MS)；和/或

j) 抑制免疫反应，优选体液免疫反应，例如抑制抗体的产生

k) 改善药代动力学，优选具有等于或大于大约 200 小时的体内半衰期，更优选地等于或大于大约 210、220、230、240、250、260、270、280 或 290 小时的体内半衰期。

在一些实施方案中，本发明涉及一种分离的核酸，其编码本发明的抗 CD40 的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，本发明涉及一种包含所述核酸的载体，优选地所述载体是表达载体。

在一些实施方案中，本发明涉及一种包含本发明的核酸或本发明的载体的宿主细胞，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，更优选的选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 CHO-K 细胞或 HEK293 细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。

在一些实施方案中，本发明涉及一种制备抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括

l) 在适于表达编码本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段的核酸的条件下培养本发明的宿主细胞，

m) 任选地分离所述抗体或其抗原结合片段，

n) 任选地所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，任选地，所述抗体被纯化，例如被 ProteinA 纯化。

在一些实施方案中，本发明涉及一种免疫缀合物，其包含本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段和其它物质，例如治疗剂，例如会产生生物学效应的活性剂，包括但不

限于细胞因子、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫抑制剂）。

在一些实施方案中，本发明涉及一种药物组合物，其包含本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段或本发明的免疫缀合物，以及任选地药用辅料。

在一些实施方案中，本发明涉及一种其包含本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段或本发明的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂，例如会产生生物学效应的活性剂，包括但不限于细胞因子、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫抑制剂）。

在一些实施方案中，本发明涉及一种预防或治疗个体中涉及 CD40L/CD40 介导的途径的不适当激活相关疾病或病症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本发明的抗 CD40L 的抗体或其抗原结合片段、或免疫缀合物、或药物组合物、或药物组合产品。

在一些实施方案中，所述受试者中，相比健康个体，具有 CD40L/CD40 介导的信号通路的异常激活和/或过多抗自身抗体的产生与沉积；和/或所述受试者的细胞（例如活化的 T 细胞或其他类型的免疫细胞或非免疫细胞，例如上皮细胞、单核细胞、树突状细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、内皮细胞及血小板）上具有增加的 CD40L 或 CD40 的表达，例如相比健康个体的相应细胞。

在一些实施方案中，所述疾病或病症选自自身免疫性疾病、狼疮肾炎、免疫性血小板减少性紫癜(ITP)、移植排斥、克罗恩氏病、炎性肠病(IBD)、结肠炎、哮喘/变态反应、动脉粥样硬化、重症肌无力、多发性硬化、银屑病、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、冠心病、1 型糖尿病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和对重组药物产品例如血友病因子 VII 的免疫应答。

附图说明:

图 1 显示，本发明抗体在分子水平上抑制 CD40 与 CD40L 的结合。

图 2 显示，本发明抗体在细胞水平上抑制过表达 CD40 的 Jurkat 细胞下游信号激活。

图 3 显示，本发明抗体对 B 细胞激活标志物 CD86 表达的抑制。

图 4 显示，本发明抗体对体外分离的 B 细胞增殖的影响。

图 5 显示，本发明抗体对 B 细胞分化为浆细胞的影响。

图 6 显示，本发明抗体对 moDC 细胞分泌 IL-12 的影响。

图 7-9 显示，本发明抗体在体外实验中不会引起血小板的激活。

图 10-12 显示，本发明抗体在实验性自身免疫脑脊髓炎（EAE）小鼠模型中的数据。

图 13 显示，本发明抗体抑制抗血蓝蛋白抗体在小鼠体内的产生。

图 14 显示，本发明抗体在小鼠体内的药代动力学。

发明详述

I. 定义

在下文详细描述本发明前，应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。要理解，本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案，并且不意欲是限制性的。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5%的下限和比指定数字数值大 5%的上限的范围内的数字数值。

如本文所用，术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项或全部。

如本文所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组合的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

术语“CD40L”指在活化的 T 细胞上表达的配体。本领域还已知其的其他名称例如 CD154、CD40 配体(CD40L)、CD40 反受体(CD40CR)、gp39、T-BAM、T-细胞活化分子、TRAF、TNF-相关的活化蛋白(TRAP)和肿瘤坏死因子配体超家族成员 5(TNFSF5)。这些术语在整个申请中可互换使用。在一些实施方中，CD40L 的氨基酸序列如 Uniport P29965 中所示。在一些实施方案中，CD40L 包含如 SEQ ID NO: 27 所示的序列。

术语“全抗体”或“全长抗体”在本文中可互换使用，是指具有天然免疫球蛋白分子结构的抗体分子。在常规四链 IgG 抗体的情况下，全长抗体包含由二硫键相互连接的两条重链(H)和两条轻链(L)。在仅具有重链而缺乏轻链的重链抗体情况下，全长抗体包含由二硫键相互连接的两条重链(H)。对于常规四链 IgG 抗体，全长抗体重链通常由重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成，其中重链恒定区至少包含 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3。全长抗体轻链由轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成，其中轻链恒定区由结构域 CL 组成。每个重链可变区 VH 和每个轻链可变区都由三个 CDR 和 4 个 FR 组成，从氨基端到羧基端以如下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。术语“抗体片段”包括完整抗体的一部分。在优选的实施方案中，抗体片段为抗原结合片段。

术语抗体的“抗原结合片段”是与全长抗体不同的分子，其包含全长抗体的一部分，但其能结合全长抗体的抗原或与全长抗体(即与抗原结合片段所来源的全长抗体)竞争结合抗原。可以通过重组 DNA 技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于 Fv，Fab，Fab’，Fab’-SH，$F(ab')_2$、dAb(domain antibody)、线性抗体、单链抗体(例如 scFv)；单结构域抗体（sdAb）例如 VHH、双价抗体或其片段、或骆驼科抗体或双体抗体(diabody)。例如，通过木瓜蛋白酶消化全长抗体能够获得 Fab 片段。此外，通过胃蛋白酶在铰链区的二硫键下面消化完全抗体产生 F(ab')2，其为 Fab’的二聚体，是二价的抗体片段。F(ab')2 可以在中性条件下通过破坏铰链区中的二硫键而被还原，由此将 F(ab')2 二聚体转化为 Fab'单体。Fv 片段由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成。Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 可以由独立的基因编码，但是也可以使用重组方法，使用合成性连接肽连接这两个结构域以使其作为单条蛋白链产生，并且在所述单条蛋白链中 VL 区和 VH 区配对以形成单链 Fv (scFv)。

“Fab 片段”或“Fab”在本文中可互换使用，用于指，由两条多肽链组成的、包含免疫球蛋

白重链可变结构域 VH、重链恒定结构域 CH1、轻链可变结构域 VL 和轻链恒定结构域 CL 的免疫球蛋白片段，其中，一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VH 和选自 CH1 和 CL 的一个恒定区，另一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VL 和选自 CL 和 CH1 的另一恒定区，其中所述 VH 结构域和 VL 结构域配对形成抗原结合位点。在本文中，包含重链恒定区 CH1 的 Fab 多肽链也称作“Fab 重链”；相应地，包含轻链恒定区 CL 的 Fab 多肽链也称作“Fab 轻链”。

“双体抗体”是通过基因融合构建的二价小型抗体，例如其是由两个多肽链组成的二聚体。双体抗体的每一多肽链的 VL 和 VH 域通过接头结合，从而编码在同一多肽链中的 VL 和 VH 形成具有不同的单链可变区片段的二聚体。双体抗体一般具有两个抗原结合位点。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环（“超变环”）和/或含有抗原接触残基（“抗原接触点”）的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派方案的任一种或其组合确定，所述指派方案包括例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人. (1989) Nature 342: 877-883，Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))，基于抗体序列可 变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath)，Contact (University College London)，国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr/上)，以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类 (affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。

除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式或其组合确定的 CDR 序列。CDR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区中的残基位置（包括重链可变区残基和轻链可变区残基）时，是指根据 Kabat 编号系统（Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）的编号位置。

在一些实施方案中，本发明中抗体的重链可变区的 CDR 是按照 Kabat 或 Chothia，或 Kabat 和 Chothia 组合确定的。在一些实施方案中，本发明中抗体的轻链可变区的 CDR 是按照 Kabat 确定的。

在一些实施方案，本发明中抗体重链可变区的 CDR1 是根据 Kabat 和 Chothia 组合的方案（后文称为 “Kabat 和 Chothia 组合”，在 Kabat 编号系统下对应于 H26-H32）确定的，重链可变区的 CDR2、CDR3、轻链可变区的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 是根据 Kabat 方案确定的。

CDR	Kabat 方案	Kabat 和 Chothia 组合
LCDR1（Kabat 和 Chothia 编号系统）	L24-L34	
LCDR2（Kabat 和 Chothia 编号系统）	L50-L56	
LCDR3（Kabat 和 Chothia 编号系统）	L89-L97	

HCDR1（Kabat 编号系统）	H31-H35	H26-H32
HCDR2（Kabat 和 Chothia 编号系统）	H50-H65	
HCDR3（Kabat 和 Chothia 编号系统）	H95-H102	

与参照抗体“结合相同或重叠表位的抗体”是指这样的抗体，其在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合，反言之，参照抗体在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。

与参照抗体“竞争结合其抗原的抗体”是指这样的抗体，其在竞争测定中阻断 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合。反言之，参照抗体在竞争测定中阻断 50％、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗体是否与另一种竞争，这些测定例如：固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定。

“抑制（例如竞争性抑制）参照抗体与其抗原的结合的抗体”是指这样的抗体，其抑制 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的所述参照抗体与其抗原的结合。反言之，参照抗体抑制 50％、60%、70%、80%、90%或 95%以上的该抗体与其抗原的结合。抗体与其抗原的结合可以亲和力（例如平衡解离常数）衡量。测定亲和力的方法是本领域已知的。

“与参照抗体显示相同或相似的结合亲和力和/或特异性的抗体”是指这样的抗体，其能够具有参照抗体的至少 50%、60%、70%、80%、90%或 95%以上的结合亲和力和/或特异性。这可以通过本领域已知的任何测定结合亲和力和/或特异性的方法进行测定。

术语“嵌合抗体”是这样的抗体分子，其中(a)将恒定区或其部分改变、替换或交换，从而抗原结合位点与不同的或改变的类别、效应子功能和/或物种的恒定区或赋予嵌合抗体新性能的完全不同的分子(例如，酶、毒素、激素、生长因子、药物)等连接；或(b)将可变区或其部分用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。例如，小鼠抗体可以通过将其恒定区更换为来自人免疫球蛋白的恒定区进行修饰。由于更换为人类恒定区，该嵌合抗体可以保留其在识别抗原方面的特异性，同时如与原始小鼠抗体相比，具有在人类中降低的免疫原性。

“人源化抗体”是一种保留非人类抗体(例如小鼠单克隆抗体)的抗原特异性反应性，同时作为治疗药对人施用时免疫原性较低的抗体。这可以例如通过保留非人类抗原结合位点并将抗体的剩余部分替换成它们的人类相应部分(例如，将恒定区以及可变区中不参与结合的部分替换为人类抗体的相应部分)来实现。

术语“Fc 结构域”或“Fc 区”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的 C 端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然的免疫球蛋白“Fc 结构域”包含两个或三个恒定结构域，即 CH2 结构域、CH3 结构域和可选的 CH4 结构域。例如，在天然抗体中，免疫球蛋白 Fc 结构域包含源自 IgG、IgA 和 IgD 类抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域(CH2 结构域和 CH3 结构域)；或者包含源自 IgM 和 IgE 类抗体的两条重链的第二、第三和第四恒定结构域(CH2 结构域、CH3 结构域和 CH4 结构域)。除非本文中另外说明，否则 Fc 区或重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如 Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interes，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991，NIH Publication 91-3242 中所述的 EU 编号体系（也称作 EU 索引）进行编号。然而，Fc 区的 C 端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。两个 Fc 区可以实现二聚化以构成二聚 Fc，两个不同的 Fc 异二聚化形成异二聚 Fc。在本文中，术语“Fc 区”、“Fc 部分”和“二聚 Fc”

不包括免疫球蛋白的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 以及重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL，但在一些情况下可以包括在重链恒定区 N 端的铰链区或部分铰链区，例如，IgG1 铰链区或部分 IgG1 铰链区，例如根据 EU 编号，D221 到 P230 的序列。在一个实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区从 Asp221 或从 Cys226 或从 Asp231 延伸至重链的羧基端。

在一个实施方案中，人 IgG1 Fc 区多肽（包含铰链区）包含以下氨基酸序列：

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:23 下划线为铰链区)。

术语“效应器功能”指抗体的 Fc 或恒定区结合免疫系统的蛋白质和/或细胞的功能性能力。

术语“氨基酸取代”或“氨基酸置换”在本文中可以互换使用，是指将预先确定的亲本氨基酸序列中的至少一个氨基酸残基替换为不同的“取代”氨基酸残基。该取代残基或多个残基可以是“天然存在的氨基酸残基”(即由遗传密码编码)并且选自：丙氨酸(Ala)；精氨酸(Arg)；天冬酰胺(Asn)；天冬氨酸(Asp)；半胱氨酸(Cys)；谷氨酰胺(Gln)；谷氨酸(Glu)；甘氨酸(Gly)；组氨酸(His)；异亮氨酸(Ile)：亮氨酸(Leu)；赖氨酸(Lys)；甲硫氨酸(Met)；苯丙氨酸(Phe)；脯氨酸(Pro)；丝氨酸(Ser)；苏氨酸(Thr)；色氨酸(Trp)；酪氨酸(Tyr)；和缬氨酸(Val)。本文的氨基酸取代定义中还涵盖用一种或多种非天然存在的氨基酸残基置换。“非天然存在的氨基酸残基”指除上文所列的那些天然存在的氨基酸残基之外，能够共价结合多肽链中相邻氨基酸残基的残基。非天然存在的氨基酸残基的例子包括正亮氨酸、鸟氨酸、正缬氨酸、高丝氨酸、Aib 和其他氨基酸残基类似物。

在一些实施方案中，氨基酸取代用(原始氨基酸,氨基酸位置,突变氨基酸)来表示。例如，当取代位点位于 C 区时，“L234A”是指，位于 EU 位置 234 的亮氨酸（L）被丙氨酸（A）取代。当述及突变组合时，组合的突变之间用斜杠连接。“L234A/L235A”表示同时包含突变 L234A 和 L235A。

在一些实施方案中，氨基酸缺失用△+氨基酸+突变位点来表示，例如△P329 表示 329 位脯氨酸（Proline）的缺失。氨基酸缺失还可以用 “氨基酸+突变位点+缺失” 来表示，例如第 329 位脯氨酸缺失也可以写成 “P329 缺失”。

如本文所述的“保守改变”包括对多肽序列的置换、缺失或添加，但不实质性改变多肽序列的期望功能活性。在一些实施方案中，保守改变为保守置换。保守置换是指一个氨基酸经相同类别内的另一氨基酸置换，例如一个酸性氨基酸经另一酸性氨基酸置换，一个碱性氨基酸经另一碱性氨基酸置换，或一个中性氨基酸经另一中性氨基酸置换。例如，保守置换常常导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守置换表是本领域熟知的。以下列出了 8 组含有互为保守替换的氨基酸：1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)；5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；和 8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。在一些实施方案中，术语“保守改变”在应用于抗体分子氨基酸序列时用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的本发明抗体分子的目的抗原结合特征的氨基酸修饰。例如保守改变变体相对于亲本抗体保持对目的抗原至少 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%或更高，例如 100-110%或更高的结合亲和力。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语

包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。

“免疫缀合物”是与一个或多个其它物质(包括但不限于标记)缀合的抗体。

本文所述的术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗与 CD40L/CD40 介导的途径的不适当激活相关疾病中有效的任何活性剂，例如，会产生生物学效应的物质活性剂。其中，会产生生物学效应的物质活性剂包括但不限于细胞因子、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫抑制剂）。

术语“小分子药物”是指低分子量的能够调节生物过程的有机化合物。“小分子”被定义为分子量小于 10kD、通常小于 2kD 和优选小于 1kD 的分子。小分子包括但不限于无机分子、有机分子、含无机组分的有机分子、含放射性原子的分子、合成分子、肽模拟物和抗体模拟物。作为治疗剂，小分子可以比大分子更能透过细胞、对降解更不易感和更不易于引发免疫应答。

本文使用的术语“免疫调节剂”指抑制或调节免疫应答的天然或合成活性剂或者药物。免疫应答可以是体液应答或细胞应答。免疫调节剂包含免疫抑制剂。

本文使用的“免疫抑制剂”、“免疫抑制药物”或“免疫抑制物”是在免疫抑制治疗中用于抑制或阻止免疫系统活性的治疗剂。

术语“有效量”指本发明的抗体或片段或缀合物或组合物或组合的这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。

“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体或抗体片段或其缀合物或组合物或组合的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤体积)至少约 20%、更优选地至少约 40%、甚至更优选地至少约 50%、60%或 70%。在一些实施方案中如本文所使用的术语“治疗有效量”意图限定在治疗方案中治疗状况(例如自身免疫、过敏、发炎、GVHD 或移植)或降低或消除免疫应答，特别是对抗原(如自身抗原，过敏原，发炎诱导剂，移植的细胞、组织或器官)或对抗药物(如生物的，例如治疗抗体，Ig 融合蛋白、激素、生长因子或其他治疗蛋白或多肽)的T细胞或B细胞抗体应答必需的治疗的量。

“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量将小于治疗有效量。在一些实施方案中，如本文所使用的术语“预防有效量”是意图限定治疗方案中预防状况或疾病的进展和症状(例如自身免疫，过敏，发炎，GVHD 或抗移植、药物或排斥反应)必需的治疗的量。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换地使用且是指其中引入外源核酸的细胞，包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，其包括初级转化的细胞和来源于其的后代，而不考虑传代的数目。后代在核酸内容上可能与亲本细胞不完全相同，而是可以包含突变。本文中包括在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

本文所使用的术语“标记”是指被直接或间接缀合或融合至试剂（诸如多核苷酸探针或抗体）并且促进其所缀合或融合的试剂的检测的化合物或组合物。标记本身可以是可检测的(例如，放射性同位素标记或荧光标记)或在酶促标记的情况下可以催化可检测的底物化合物或组

合物的化学改变。术语旨在涵盖通过将可检测物质偶联(即，物理连接)至探针或抗体来直接标记探针或抗体以及通过与直接标记的另一种试剂反应来间接标记探针或抗体。

“个体”“对象”或“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于，家养动物(例如，牛，羊，猫，狗和马)，灵长类动物(例如，人和非人灵长类动物如猴)，兔，以及啮齿类动物(例如，小鼠和大鼠)。在一些实施方案中，个体或受试者是人。

“受试者/患者/个体样品”指从患者或受试者得到的细胞或流体的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织，像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品；血液或任何血液组分；体液，诸如脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液；来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。组织样品可能包含在自然界中天然不与组织混杂的化合物，诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。

“分离的”抗体是这样的抗体，其已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中，将抗体纯化至超过 95％或 99％纯度，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE，等电聚焦(IEF)，毛细管电泳)或层析(例如，离子交换或反相 HPLC)确定的。

“分离的编码抗 CD40L 抗体或其片段的核酸”是指一个或多个核酸分子，其编码抗体重链或轻链(或其片段，例如重链可变区或轻链可变区)，包括在单一载体或分开的载体中的这样的核酸分子，以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的这样的核酸分子。

氨基酸序列的“同一性百分数(%)”是指将候选序列与本说明书中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后，并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分时，候选序列中与本说明书中所示的具体氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分数。在一些实施方案中，本发明考虑本发明抗体分子的变体，所述变体相对于在本文中具体公开的抗体分子及其序列而言具有相当程度的同一性，例如同一性为至少 80%,85%,90%,95%, 97%, 98%或 99%或更高。所述变体可以包含保守性改变。

术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。

术语“药物组合物”指这样的组合物，其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

术语“药物组合”是指非固定组合产品或固定组合产品，包括但不限于药盒、药物组合物。术语“非固定组合”意指活性成分（例如，(i)抗 CD40L 抗体或其片段、以及(ii)其他治疗剂）以分开的实体被同时、无特定时间限制或以相同或不同的时间间隔、依次地施用于患者，其中这类施用在患者体内提供预防或治疗有效水平的两种或更多种活性剂。在一些实施方案中，药物组合中使用的抗 CD40L 抗体或其片段和其他治疗剂以不超过它们单独使用时的水平施用。术语“固定组合”意指两种或更多种活性剂以单个实体的形式被同时施用于患者。优选对两种或更多种活性剂的剂量和/或时间间隔进行选择，从而使各部分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。各成分可以各自呈单独的制剂形式，其制剂形式可以相同也可以不同。

术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂或治疗方式（例如放射疗法或手术）以治疗本文所述疾病。这种施用包括以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂，例如以具有固定比例的活性成分的单一胶囊。或者，这种施用包括对于各个活性成分在多种或在分开的容器(例如片剂、胶囊、粉末和液体)中的共同施用。粉末和/或液体可以在施用前重构或稀释至所需剂量。此外，这种施用还包括以大致相同的时间或在不同的时间以顺序的方式使用每种类

型的治疗剂。在任一情况下，治疗方案将提供药物组合在治疗本文所述的病症或病状中的有益作用。

用于本文时，“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转疾病的症状、并发症、或生化指征的发作、缓解症状或阻止或抑制疾病、病状或病症的进一步发展。

用于本文时，“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。

本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入。上文以及整个本申请中所论述的任何或所有特征可以在本发明的各种实施方案中组合。此外，本文中所述的材料、方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从后附的权利要求书中显而易见。

II 抗体

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段以高亲和力结合 CD40L（例如人 CD40L）。在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段与人 CD40L 的结合亲和力高于已知的 CD40L 抗体，例如 INX-021 抗体(WO2017011544A1)。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段与细胞表面的 CD40L 结合。在一些实施方案中，CD40L 在细胞表面表达或过表达。在一些实施方案中，细胞为表达或过表达 CD40L 的 CHO 细胞。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段具有以下一种或多种性质：

a) 以高亲和力结合 CD40L（例如人 CD40L）；

b) 抑制 CD40 与 CD40L 的结合

c) 抑制 CD40/CD40L 信号通路；

d) 抑制 B 细胞激活；

e) 抑制 B 细胞的增殖；

f) 抑制 B 细胞成熟分化，例如抑制 B 细胞分化为浆细胞；

g) 抑制树突状细胞的 IL-12 的分泌；

h) 不引起血小板的激活（例如在体外或体内）；

i) 治疗或预防免疫疾病，例如多发性硬化症(MS)；

j) 抑制免疫反应，优选体液免疫反应，例如抑制抗体的产生；和/或

k) 改善药代动力学，优选具有等于或大于大约 200 小时的体内半衰期，更优选地等于或大于大约 210、220、230、240、250、260、270、280 或 290 小时的体内半衰期。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自轻链可变区

的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR）和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR）。

在一些方面中，本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）。在一些方面中，本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区（VH）。在一些方面中，本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区（VH）。在一些实施方案中，所述重链可变区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（CDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中，所述轻链可变区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（CDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段还包含抗体重链恒定区 HC。在一些实施方案中，本发明抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段还包含抗体轻链恒定区 LC。在一些实施方案中，本发明抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区 HC 和轻链恒定区 LC。

在一些实施方案中，本发明重链可变区：

（i） 包含与选自 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:16 中任一项的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

（ii） 包含选自 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:16 中任一项的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

（iii） 包含与选自 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:16 中任一项的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明的轻链可变区

（i） 包含与选自 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:21 中任一项的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

（ii） 包含选自 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:21 中任一项的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

（iii） 包含与选自 SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:21 中任一项的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明的 3 个来自重链可变区的互补决定区 (HCDR) ，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自

（i）如 SEQ ID NO: 4 或 16 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和

HCDR3;

(ii) 相对于 (i)中任一项的序列，在所述三个 HCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的序列，

例如其中所述 HCDR 可以根据任何确定 CDR 的方案来确定，例如分别根据 Kabat、AbM、Chothia、Contact 或 IMGT 方案或其组合确定；

例如，所述 HCDR1 根据 Kabat 和 Chothia 组合方案确定，所述 HCDR2 和 HCDR3 根据 Kabat 方案确定。

在一些实施方案中，本发明的 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (LCDR) ，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 选自

(i) 如 SEQ ID NO: 10 或 21 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，或

(ii) 相对于 (i)中任一项的序列，在所述三个 LCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的序列，

例如其中所述 LCDR 可以根据任何确定 CDR 的方案来确定，例如分别根据 Kabat、AbM、Chothia、Contact 或 IMGT 方案或其组合确定；

例如，，所述 LCDR1-3 根据 Kabat 方案确定。

在一些实施方案中，HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 或 13 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR1 包含与 SEQ ID NO:1 或 13 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 或 14 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR2 包含与 SEQ ID NO: 2 或 14 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 或 15 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 HCDR3 包含与 SEQ ID NO: 3 或 15 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，LCDR1 包含 SEQ ID NO: 7 或 18 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR1 包含与 SEQ ID NO: 7 或 18 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，LCDR2 包含 SEQ ID NO: 8 或 19 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR2 包含与 SEQ ID NO: 8 或 19 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，LCDR3 包含 SEQ ID NO: 9 或 20 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，或者 LCDR3 包含与 SEQ ID NO: 9 或 20 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变 (优选氨基酸置换，优选保守置换) 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，本发明的抗体重链恒定区为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区，优选的 IgG1 的重链恒定区。在一些实施方案中，本发明的抗体轻链恒定区为 lambda 或 Kappa 轻链恒定区，优选的 Kappa 轻链恒定区。

在一些实施方案中，本发明的抗体的重链恒定区包含突变的 Fc 区。

因此，本发明还涉及一种突变的 Fc 区。

在一些实施方案中，Fc 区为来自人的 IgG Fc，例如，来自人 IgG1 的 Fc，来自人 IgG2 的 Fc，来自人 IgG3 的 Fc 或来自人 IgG4 的 Fc。在一个实施方案中，Fc 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:23 或 24 或与其具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。

在一个实施方案中，在 Fc 区的效应子功能（例如 Fc 区的补体激活功能）的特性上修饰 Fc 区。在一个实施方案中，所述效应子功能相对于野生同种型 Fc 区已经被降低或消除。在一个实施方案中，通过选自以下的方法来降低或消除效应子功能：使用天然具有降低或消除的效应子功能的 Fc 同种型、和 Fc 区修饰。

在一个优选的实施方案中，Fc 区具有减少的由 Fc 区介导的效应子功能，例如减少的或消除的 ADCC 或 ADCP 或 CDC 效应子功能，例如包含实现上述功能的突变。

Fc 区可以包含改变对一种或多种 Fc 受体的结合亲和力的修饰。在一个实施方案中，所述 Fc 受体是 Fcγ 受体，特别地是人 Fcγ 受体。在一些实施方案中，所述 Fc 区包含降低与 Fcγ 受体结合的突变。例如，在一些实施方案中，用于本发明的 Fc 区具有降低与 Fcγ 受体结合的 L234A/L235A 突变。在再一优选的实施方案中，Fc 片段可以具有导致增加的血清半衰期的突变，例如改善 Fc 片段与 FcRn 结合的突变。

在一个优选的实施方案中，本发明的 Fc 区具有减少的与 FcγR 结合的能力（优选地完全消除了与所有 FcγR 结合的能力），同时仍保留与 FcRn 的亲和力。因此，用于本发明的 Fc 区具有 L234A/L235A 和 P329 缺失突变。

因此，在一个优选的实施方案中，本发明的 Fc 区包含 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%的同一性的氨基酸序列且具有 L234A/L235A 和 P329 缺失突变。

在一些优选的实施方案中，本发明的抗体重链恒定区

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:5 或 26 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii)包含选自 SEQ ID NO: 5 或 26 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii)包含与选自 SEQ ID NO:5 或 26 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些优选的实施方案中，本发明的抗体重链恒定区包含与 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且具有 L234A/L235A 和 P329 缺失突变。在一些优选的实施方案中，本发明的抗体重链恒定区包含选自 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗体轻链恒定区

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中，本发明的抗CD40L抗体包含第一重链互补决定区(HCDR1)、第二重链互补决定区（HCDR2）、第三重链互补决定区（HCDR3）以及第一轻链互补决定区（LCDR1）、第二轻链互补决定区（LCDR2）和第三轻链互补决定区（LCDR3），其中：

（i） 所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或分别由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成；或

（ii） 所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别包含 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或分别由 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的 VH 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，以及所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或分别由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列组成，所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别包含 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或分别由 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的 VH 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，以及所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 分别包含 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO14、SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或分别由 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO14、SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列组成，所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别包含 SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或分别由 SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段：

（i） 包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的 VH，和/或包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的 VL；

（ii） 包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的 VH，和/或包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的 VL。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区，其中

(i) 重链可变区包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列或由其组成，且轻链可变区包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(ii) 重链可变区包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列或由其组成，且轻链可变区包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明的抗CD40L抗体或其抗原结合片段还包含抗体重链。在一些实施方案中，本发明抗CD40L抗体或其抗原结合片段还包含抗体轻链。在一些实施方案中，本发明抗CD40L抗体或其抗原结合片段还包含重链和轻链。在一些实施方案中，本发明的抗体重链包含重链可变区和重链恒定区，或由重链可变区和重链恒定区组成。在一些实施方案中，本发明的抗体轻链包含轻链可变区和轻链恒定区，或由轻链可变区和轻链恒定区组成。在一些实施方案中，本发明的抗体包含两条重链和两条轻链，或由两条重链和两条轻链组成。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链，其中所述重链

(i) 包含与选自SEQ ID NO: 6或17的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自SEQ ID NO:6或17的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自SEQ ID NO: 6或17的氨基酸序列相比具有1个或多个(优选不超过20个或10个，更优选不超过5、4、3、2、1个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含轻链，其中所述轻链

(i) 包含与选自SEQ ID NO: 12或22的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自SEQ ID NO: 12或22的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自SEQ ID NO: 12或22的氨基酸序列相比具有1个或多个(优选不超过20个或10个，更优选不超过5、4、3、2、1个)的氨基酸改变(优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，其中

(i) 所述重链包含与SEQ ID NO: 6的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和/或所述轻链包含与SEQ ID NO: 12的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 所述重链包含与SEQ ID NO: 17的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；和/或所述轻链包含与SEQ ID NO: 22的氨基酸序列具有至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链，其中

（i） 所述重链包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或由其组成的，所述轻链包含SEQ ID

NO:12 的氨基酸序列或由其组成；或者

（ii） 所述重链包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列或由其组成的，所述轻链包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列或由其组成。

在本发明的一个实施方案中，本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。优选的，本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换，优选地保守置换。

在优选的实施方案中，本发明所述的氨基酸改变发生在 CDR 外的区域（例如在 FR 中）。更优选地，本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。

在某些实施方案中，本文中所提供的抗体经改变以增加或降低抗体经糖基化的程度。对抗体的糖基化位点的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以便产生或移除一或多个糖基化位点而方便地实现。当抗体包含 Fc 区时，可以改变附着于其的糖类。在一些应用中，除去不想要的糖基化位点的修饰可以是有用的，例如除去岩藻糖基序以提高抗体依赖性细胞毒性(ADCC)功能。在其它应用中，可以进行半乳糖苷化修饰以修饰补体依赖性细胞毒性(CDC)。

在某些实施方案中，可能需要产生经半胱氨酸工程改造的抗体，例如“硫代 MAb”，其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基置换。

在某些实施方案中，本文中所提供的抗体可进一步经修饰为含有本领域中已知且轻易获得的其他非蛋白质部分。适合抗体衍生作用的部分包括，但不限于，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括，但不限于，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二烷、聚-1,3,6-三烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段具有以下一个或多个特性：

(i)显示与本发明抗体对 CD40L 相同或相似的结合亲和力和/或特异性；

(ii)抑制 (例如，竞争性抑制) 本发明抗体与 CD40L 的结合；

(iii)与本发明抗体结合相同或重叠的表位；

(iv)与本发明抗体竞争结合 CD40L；

(v)具有本发明抗体的一个或多个生物学特性。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40L 抗体是 IgG1 形式的抗体或 IgG2 形式的抗体或 IgG3 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体，优选的，为 IgG1 形式的抗体。

在一些实施方案中，抗 CD40L 抗体是单克隆抗体。

在一些实施方案中，抗 CD40L 抗体是人源化的。

在一些实施方案中，抗 CD40L 抗体是嵌合抗体。

在一个实施方案中，本发明的抗 CD40L 抗体还涵盖其抗体片段（例如抗原结合片段），优选地选自以下的抗体片段：Fv，Fab，Fab’，Fab’-SH，$F(ab')_2$、dAb(domain antibody)、线性抗体、单链抗体(例如 scFv)；单结构域抗体（sdAb）例如 VHH、双价抗体或其片段、或骆驼科抗体或双体抗体(diabody)。

在一些实施方案中，本发明的抗CD40L抗体还涵盖特异性结合CD40L的多特异性抗体，例如双特异性抗体。

在一些实施方案中，本发明的抗CD40L抗体是全长抗体。

III. 本发明的核酸以及包含其的宿主细胞

在一方面，本发明提供编码本发明的抗体或其抗原结合片段的任一条链或任何单体或结构域的核酸。可以采用本领域熟知的方法，产生编码各条链的多核苷酸序列。例如，当从适宜的表达载体表达时，由所述核酸编码的多肽能够显示人CD40L抗原结合能力。例如，在一些实施方案中，所述编码重链和/或轻链的可变区的核酸在读框中与编码重链和/或轻链的恒定区的核酸可操作连接，从而当从适宜的表达载体表达时，产生编码所述抗体重链和/或的核酸。

在一方面，本发明提供了编码本文所述任何抗CD40L抗体或其片段的核酸。所述核酸可以包含编码抗体的轻链可变区和/或重链可变区的氨基酸序列的核酸，或包含编码抗体的轻链和/或重链的氨基酸序列的核酸。

例如，本发明的核酸包含编码选自SEQ ID NO: 4-6、10、12、16、17、21和22中任一项所示氨基酸序列的核酸，或编码与选自SEQ ID NO: 4-6、10、12、16、17、21和22中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列的核酸。如本领域技术人员明了的，因为密码子简并性，每一个抗体或多肽氨基酸序列可以由多种核酸序列编码。在一些实施方案中，本发明的核酸包含选自SEQ ID NO:28-31中任一项所示的核酸，或包含与选自SEQ ID NO:28-31中任一项所示的核酸具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的核酸。

编码本发明分子的核酸序列可以采用本领域熟知的方法，例如通过从头固相DNA合成，或通过PCR扩增而产生。

为了便于生产和纯化，可以在抗体的重链和/或轻链的 N 端融合分泌性信号肽，和/或利于纯化的标签肽。

本发明也提供包含本发明核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在优选的实施方案中，本发明的表达载体是pcDNA载体，例如pcDNA3.1表达载体。

在一个实施方案中，提供包含所述载体的宿主细胞。本发明也提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。适用于复制并支持本发明抗体表达的宿主细胞是本领域中公知的。可以用特定的表达载体转染或转导这类细胞，并且可以生长大量的含载体细胞以用于接种大规模发酵罐，从而获得充足量的抗体用于临床应用。用于克隆或表达编码抗体的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，抗体可在细菌中产生，特别当不需要糖基化和Fc效应子功能时。在表达后，抗体可以从可溶级分中的细菌细胞糊状物分离，并且可以进一步纯化。

在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如CHO细胞(例如CHO-K1、CHO-S、CHO-K或ExpiCHO细胞)或293细胞（例如293F或HEK293细胞））或适用于制备抗体或其片段的其它细胞。在一个实施方案中，

宿主细胞是原核的，例如是细菌，例如大肠杆菌。

例如，真核微生物诸如丝状真菌或酵母是关于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。例如，糖基化途径已经进行“人源化”的真菌和酵母菌株导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如，可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7); 人胚肾系(HEK293、293F 或 293T 细胞) 等。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，包括 CHO-K1、CHO-K、DHFR-CHO 细胞、CHO-S 细胞、ExpiCHO 等 ； 以及骨髓瘤细胞系如 Y0，NS0 和 Sp2/0。本领域已知适合产生抗体的哺乳动物宿主细胞系。

V. 本发明的抗体分子的生产和纯化

在一个实施方案中，本发明提供制备本发明抗体分子或其片段（优选的抗原结合片段）的方法，其中所述方法包括在适于表达编码本发明抗体分子或其片段(优选的抗原结合片段）的核酸的条件下培养所述宿主细胞，以及任选地分离所述抗体或其片段(例如抗原结合片段)。在某个实施方案中，所述方法还包括从宿主细胞回收本发明抗体分子或其片段（例如抗原结合片段）。

可以将编码本发明抗体的多肽链的多核苷酸插入一个或多个载体中以便进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体。一旦已经制备了用于表达的包含本发明的一种或多种核酸分子的表达载体，则可以将表达载体转染或引入适宜的宿主细胞中。多种技术可以用来实现这个目的，例如，原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒的转导、病毒转染、基因枪、基于脂质体的转染或其他常规技。

如本文所述制备的抗体分子可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于净电荷、疏水性、亲水性等因素，并且这些对本领域技术人员是显而易见的。可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的抗体分子的纯度，所述熟知分析方法包括尺寸排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。

VI. 测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的抗 CD40L 抗体鉴定，筛选，或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

本发明还提供了用于鉴定具有生物学活性的抗 CD40L 抗体的测定法。生物学活性可以包括例如结合 CD40L (例如结合人 CD40L)，对 CD40/CD40L 信号通路的抑制、对 CD40 与 CD40L 的结合的阻断、对 B 细胞激活的抑制、对 B 细胞增殖的抑制、对 B 细胞分化的抑制、对树突细胞分泌细胞因子的抑制、对受试者体内产生抗体功能的抑制，以及对免疫系统疾病的治疗作用等。还提供在体内和/或在体外具有此类生物学活性的抗体。

对于上述生物学活性的测定，可以具体参见实施例中给出的示例性的测定方法。

可以理解的是，能够使用本发明的免疫缀合物替换或补充抗 CD40L 抗体来进行任何上述测定法。

可以理解的是，能够使用抗 CD40L 抗体和别的活性剂的组合来进行任何上述测定法。

VII. 免疫缀合物

在一些实施方案中，本发明提供了免疫缀合物，其包含本文中提供的任何抗 CD40L 抗体和其它物质，例如治疗剂或标记。在一些实施方案中，治疗剂可以是适合与 CD40L 抗体形成免疫缀合物的治疗剂，例如，会产生生物学效应的活性剂或活性成分。其中，会产生生物学效应的活性剂包括但不限于细胞因子、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫抑制剂）。

在一些实施方案中，所述免疫缀合物是抗体药物偶联物（ADC）。

VIII. 药物组合物和药物制剂

在一些实施方案中，本发明提供包含本文所述的任何抗 CD40L 抗体或其片段（优选地其抗原结合片段）或其免疫缀合物的组合物，优选地组合物为药物组合物。在一个实施方案中，所述组合物还包含药用辅料。在一个实施方案中，组合物，例如，药物组合物，包含本发明的抗 CD40L 抗体或其片段或其免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂的组合。

本发明还涵盖包含抗 CD40L 抗体或其免疫缀合物的组合物(包括药物组合物或药物制剂)，或包含编码抗 CD40L 抗体的多核苷酸的组合物(包括药物组合物或药物制剂)。在某些实施方案中，组合物包含一种或多种结合 CD40L 的抗体或其片段，或一种或多种编码一种或多种抗 CD40L 的抗体或其片段的多核苷酸。这些组合物还可以包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。

如本文所用，“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。

对于药用辅料的使用及其用途，亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”,第八版, R.C.Rowe,P.J.Seskey 和 S.C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。

本发明的组合物可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型，如液态溶液剂(例如，可注射用溶液剂和可输注溶液剂)、散剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。

可以通过将具有所需纯度的本发明的抗体与一种或多种任选的药用辅料混合来制备包含本文所述的抗体的药物制剂，优选地以冻干制剂或水溶液的形式。

本发明的药物组合物或制剂还可以包含超过一种活性成分，所述活性成分是被治疗的特定适应证所需的，优选具有不会不利地彼此影响的互补活性的那些活性成分。例如，理想的是还提供其它治疗剂，例如在预防或治疗与 CD40L/CD40 介导的途径的不适当激活相关疾病中会产生生物学效应的活性剂，包括但不限于细胞因子、小分子药物、免疫调节剂（例如免疫抑制剂）或其他抗体等。所述活性成分以对于目的用途有效的量合适地组合存在。可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质，所述基质呈成形物品，例如薄膜或微囊形式。

IX. 药物组合和药盒

在一些实施方案中，本发明还提供了药物组合或药物组合产品，其包含本发明的抗CD40L抗体或其片段（优选的抗原结合片段），或其免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂（细胞因子、小分子药物、免疫调节剂（例如免疫抑制剂或抗炎剂）或其他抗体等）。

本发明的另一个目的是提供一种成套药盒，其包含本发明的药物组合，优选地所述药盒为药物剂量单元形式。由此可以依据给药方案或药物施用间隔提供剂量单元。

在一个实施方案中，本发明的成套药盒在同一包装内包含:

- 含有包含抗CD40L抗体或其片段的药物组合物的第一容器;

- 含有包含其它治疗剂的药物组合物的第二容器。

在一些实施方案中，所述其它治疗剂是例如在预防或治疗与CD40L/CD40介导的途径的不适当激活相关疾病中会产生生物学效应的活性剂，包括但不限于细胞因子、小分子药物、免疫调节剂（例如免疫抑制剂）或其他抗体等。

X. 用途和方法

在一些实施方案中，本发明的抗体作为单药或联合用药预防或治疗个体中涉及CD40L/CD40介导的信号通路的异常激活相关疾病或病症的方法。

在一些实施方案中，所述疾病或病症为免疫系统异常的疾病或病症。在一些实施方案中，患有所述疾病或病症的患者中，相比健康个体，具有CD40L/CD40所介导的免疫系统过度活跃。在一些实施方案中，相比健康个体，所述疾病或病症的患者中，相比健康个体，具有CD40L/CD40介导的信号通路的异常激活。在一些实施方案中，相比健康个体，所述疾病或病症的患者中，相比健康个体，产生或沉积过多的抗自身抗体。在一些实施方案中，相比健康个体，所述疾病或病症的患者中，具有CD40L/CD40介导的信号通路的异常激活以及过多抗自身抗体的产生与沉积。

在一些实施方案中，所述疾病或病症的患者中的细胞（例如活化的T细胞或其他类型的免疫细胞或非免疫细胞，例如上皮细胞、单核细胞、树突状细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、内皮细胞及血小板）上具有增加的CD40L或CD40的表达，例如相比健康个体的相应细胞。

在一些实施方案中，所述疾病或病症包括但不限于自身免疫性疾病、狼疮肾炎、免疫性血小板减少性紫癜(ITP)、移植排斥、克罗恩氏病、炎性肠病(IBD)、结肠炎、哮喘/变态反应、动脉粥样硬化、重症肌无力、多发性硬化、银屑病、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、冠心病、1型糖尿病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和对重组药物产品例如血友病因子VII的免疫应答。

在一些实施方案中，本发明的抗体或抗体片段或免疫缀合物或组合物或产品会延迟病症和/或与病症相关的症状的发作。

在一些实施方案中，本发明提供本发明的抗CD40L抗体或其片段或包含其的免疫缀合物或组合物在生产或制备药物中的用途，所述药物用于本文所述的用途，例如用于预防或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中，本文所述的预防或治疗方法还包括向所述受试者或个体组合施用本

文公开的抗体分子或药物组合物或免疫缀合物，以及一种或多种其它疗法，例如治疗方式和/或其它治疗剂。在一些实施方案中，抗 CD40L 抗体或其片段(以及包含其的免疫缀合物、组合物、药物组合物、制剂等)还能与一种或多种其它疗法例如治疗方式和/或其它治疗剂组合施用，用于本文所述的用途，例如用于预防和/或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中，所述治疗剂选自细胞因子、小分子药物、免疫调节剂（例如免疫抑制剂或抗炎剂）或其他抗体等。

在一些实施方案中，本文中描述的抗体可以与其他抗体组合，用于分别施用，例如，分别作为单独的抗体分别施用，或连接时 (例如作为双特异性或多特异性抗体分子) 施用。

本发明的组合疗法涵盖组合施用 (例如两种或更多种治疗剂包含在同一配制剂或分开的配制剂中)，和分开施用，在该情况中，可以在施用别的治疗剂和/或药剂之前，同时，和/或之后发生本发明的抗体或其片段的施用。在一些实施方案中，所述别的治疗剂是例如在预防或治疗与 CD40L/CD40 介导的途径的不适当激活相关疾病中会产生生物学效应的活性剂，包括但不限于细胞因子、小分子药物、免疫调节剂（例如免疫抑制剂）或其他抗体等。

本发明的抗体或其片段(以及包含其的免疫缀合物、组合物、药物组合物、制剂、组合产品等)可以通过任何合适的方法给药，包括肠胃外给药，并且，如果局部治疗需要，病灶内给药。肠胃外注射或输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下注射或输注。

XI. 用于诊断和检测的方法和组合物

在一个方面，本发明还涉及对本发明抗体或其抗原结合片段的用于诊断和检测的方法和包含其的用于诊断和检测的组合物。

在某些实施方案中，本文中提供的任何抗 CD40L 抗体或其片段（优选的抗原结合片段）可以用于检测 CD40L 在生物样品中的存在。

术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测，示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术(例如，FACS)、抗体分子复合的磁珠、ELISA 测定法、PCR-技术(例如，RT-PCR)。在某些实施方案中，生物样品是血、血清或生物来源的其他液体样品。在某些实施方案中，生物样品包含细胞或组织。

在一个实施方案中，提供用于诊断或检测方法的抗 CD40L 抗体或其片段。

在另一个方面中，提供检测 CD40L 在生物样品中的存在的方法。在某些实施方案中，所述方法包含检测 CD40L 蛋白在生物样品中的存在。在某些实施方案中，CD40L 是人 CD40L。在某些实施方案中，所述方法包括将生物样品与如本文所述的抗 CD40L 抗体或其片段在允许抗 CD40L 抗体或其片段与 CD40L 结合的条件下接触，并检测在抗 CD40L 抗体或其片段和 CD40L 之间是否形成复合物。复合物的形成表示存在 CD40L。该方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中，抗 CD40L 抗体或其片段被用于选择适合利用抗 CD40L 抗体或其片段的治疗的受试者，例如其中 CD40L 是用于选择所述受试者的生物标记物。

在一些实施方案中，提供标记的抗 CD40L 抗体或其片段。标记包括但不限于，被直接检测的标记或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记)，以及被间接检测的部分，如酶或配体，例如，通过酶促反应或分子相互作用。

在本文中提供的一些实施方案中，样品是在用抗 CD40L 抗体或其片段治疗之前获得的。

在一些实施方案中，样品是在用其他疗法之前获得的。在一些实施方案中，样品是在用其他疗法治疗过程中，或者用其他疗法治疗后获得的。

在一些实施方案中，在治疗之前，例如，在起始治疗之前或在治疗间隔后的某次治疗之前检测 CD40L。

在一些实施方案中，提供了一种治疗本发明疾病的方法，所述方法包括：对受试者(例如，样品)(例如，受试者样品)检验 CD40L 的存在，因而确定 CD40L 值，将 CD40L 值与对照值比较，并且如果 CD40L 值大于对照值，则向受试者施用治疗有效量的任选与一种或多种其他疗法组合的抗 CD40L 抗体或其片段(例如，本文所述的抗 CD40L 抗体或其片段)，因而治疗所述疾病。

本发明的这些以及其它方面和实施方案在附图(附图简述紧随其后)和以下的发明详述中得到描述并且示例于以下实施例中。上文以及整个本申请中所论述的任何或所有特征可以在本发明的各种实施方案中组合。以下实施例进一步说明本发明，然而，应理解实施例以说明而非限定的方式来描述，并且本领域技术人员可以进行多种修改。

实施例

实施例 1：抗 CD40L 抗体的筛选以及人源化

采用杂交瘤技术，以人 CD40L（Human CD40 Ligand / TNFSF5 Protein, His,Flag Tag, active trimer (MALS verified) ，Acro）融合蛋白免疫小鼠，牺牲小鼠取脾脏并消化为单细胞悬液，将脾细胞与具有增殖能力的骨髓瘤细胞杂交，在选择培养基的作用下，得到能够表达阳性抗体的杂交瘤细胞。再通过体外 ELISA 和流式细胞术筛选，得到能阻断 CD40-CD40L 相互作用的鼠源抗体。

电融合皿准备

用 70%乙醇彻底浸泡电融合皿，并于超净台中吹干备用。

分离脾细胞：颈脱位将小鼠处死，用 75%酒精消毒体表 5 min，随即放入超净台内小鼠解剖板上，左侧卧位，用 7 号针头固定四肢。无菌打开腹腔取出脾脏，用 1640（含 10%胎牛血清，1%Glutamax）培养基洗涤，并仔细去掉周围附着的结缔组织。随后将脾脏转移到另一个盛有基础培养基的平皿中。以弯头针头压住脾脏，用小针头在脾脏上插孔，并用镊子挤压，使脾细胞充分释放，制成脾细胞悬液。细胞悬液经 70 μM 细胞筛网过滤后用 30 ml1640（含 10%胎牛血清，1%Glutamax）培养基洗一遍，1200 rpm 离心 6 min。

裂解红细胞

去除上清，用 10 ml RBC 裂解缓冲液(GIBCO)重悬细胞。然后再加入 20 ml RBC 裂解缓冲液。悬液静置 5 min 后 1100 rpm 离心 6 min。去上清后用 10 ml 基础培养基重悬细胞，然后再加入 30 ml 基础培养基，1100 rpm 离心 6 min。去除上清后，细胞重悬于 20 ml 1640（含 10%胎牛血清，1%Glutamax）培养基中并计数。

电融合

用 20 ml 1640（含 10%胎牛血清，1%Glutamax）培养基重悬小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞（ATCC）并计数。将 SP2/0 和裂解红细胞后的脾细胞以 1:2~1:1 的比例混合，1000 rpm 离心

6 min。去除上清后将混合的细胞重悬于 10 ml 融合缓冲液(BTXpress)中。再加入 15 ml 融合缓冲液，1000 rpm 离心 5 min，去除上清。重复上述步骤一遍后，加入适量体积的融合缓冲液重悬细胞，调整混合细胞密度至 1×10^7 个细胞/ml。每个电融合皿中加入 2 ml 上述细胞悬液进行电融。

电融合后铺板

细胞于电融合皿中室温静置 5 min。将细胞转移入离心管中，用筛选培养基 1640（含 10%胎牛血清，1%Glutamax，1%HAT medium）培养基稀释细胞至 $1\sim2\times10^4$ 个细胞/ml。96 孔板中每孔加入 100 μl 细胞悬液。融合后第 7 天更换筛选培养基。培养第 10 天（或更久，根据细胞生长状态）后使用 ELISA 和流式细胞术筛选出表达特异性抗 CD40L 抗体的杂交瘤细胞。

阳性杂交瘤细胞亚克隆

准备一块 96 孔板，第 2 至第 8 排每孔加入 200 μl 如上所述的 1640（含 10%胎牛血清，1%Glutamax）培养基。将上述融合筛选出的阳性孔的细胞，按约 1×10^5 个/ml 的密度，分别取 300ul 加入到第一排的每个孔中。用排抢，将第 1 排细胞悬液取 100 μl 加入第 2 排，充分混匀后取 100 μl 加入下一排。重复上述步骤，直至最后一列体积变为 300 μl；静置 96 孔板 15 min，显微镜下观察计数。取 100 个细胞对应的体积加入 20 ml 如上所述的 1640（含 10%胎牛血清，1%Glutamax）培养基中，并混匀铺板，每孔 200 μl。一周后显微镜下观察，判断并标记出单克隆孔，待测挑出阳性孔。

体外筛选

使用 ELISA 和流式细胞术筛选出表达特异性抗 CD40L 抗体的杂交瘤细胞。

杂交瘤测序

RNA 抽提：取新鲜培养的细胞约 5×10^6 个，300 g 离心 5 min，去除上清，沉淀中加入 500 μl LY 缓冲液(Biomiga)（在使用前每 1 ml 加入 20 μl β 巯基乙醇），混匀至澄清。加入到 DNA 去除管中，13000 rpm 离心 2 min，收集流穿液。按 1/2 的比例向流穿液中加入 100%乙醇，上下颠倒 5 次混匀至澄清。将澄清的溶液加入到 RNA 收集管中，13000 rpm 离心 1 min 去除液体，加入 500 μl RB(Recovery Buffer，回收缓冲液)(Takara)，13000 rpm 离心 30 s，再加入 500 μl RNA 洗涤缓冲液(Biomiga)（用之前加入适量乙醇），离心 30 s，重复一遍上述过程后，离心彻底挥发去除乙醇后，向收集柱（来自 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit）中加入 30 μl DEPC 水，12000 g 离心 2 min，收集洗脱液。测定 RNA 浓度。

利用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit（Takara）反转录获得 cDNA，65℃温育 5 min 后，迅速置冰上冷却。将反应体系 I 加入到反转录体系中，总量为 20 μl，缓慢混匀后按下列条件进行反转录翻译：42℃ 60 min 95℃ 5 min，然后放冰上冷却，获得 cDNA。将 cDNA 连接 T 载体，采用 Mighty TA-cloning Kit 试剂盒（Takara）：PCR 分别扩增重链和轻链可变区。

转化细胞

-80℃取出 TOP10 感受态（天根生化科技（北京）有限公司），冰上融化，取上述获得的连接产物 5 μl 加入到融化的 TOP10 感受态中，混匀后冰上孵育 30 min。42℃热激 90 s 后迅速冰上冷却 2 min，向 EP 管中补加 900 μl LB 培养基（生工生物工程（上海）股份有限公司），37℃，220 rpm 摇床培养 1 h。3000 g 离心 2 min，吸除 800 μl 上清，用剩余的培养基将菌体重悬并涂布在氨苄青霉素抗性的平板上。于 37℃培养过夜，挑克隆测序。

构建嵌合抗体

利用分子生物学技术，获得上述杂交瘤细胞产生的抗 CD40L 抗体的序列，将测序得到候选抗 CD40L 抗体的 VH 及 VL 区序列与 hIgG1(突变位点为 L234A/L235A/ΔP329，SEQ ID NO:5) 序列组合，构建人鼠嵌合抗体。

嵌合抗体筛选

采用 ELISA 和 Luciferase 体外实验筛选，得到同时具有结合 CD40L 和阻断 CD40-CD40L 相互作用的抗 CD40L 抗体。

嵌合抗体的人源化

将得到的嵌合抗体进行人源化。通过以下步骤进行人源化:

①确定 CDR 环结构;

②在人种系序列数据库为重链和轻链的每个 V / J 区域找到最接近的同源序列;

③筛选与重链轻链最匹配的人种系以及最低量的回复突变;

④将嵌合抗体的 CDR 区构建至人的骨架区上;

⑤使用序列和结构特征，确定骨架区中起到维持 CDR 功能的氨基酸位置;

⑥在确定为重要的序列位置进行回复突变（返回到输入氨基酸类型);

⑦优化风险位点的氨基酸。

最终得到结合人 CD40L 的人源化抗体 Hz33B9C5 和 Hz47E2，本发明示例的两个人源化抗体(Hz33B9C5 和 Hz47E2)的 CDR、轻链可变区和重链可变区，轻链和重链的氨基酸序列，以及对应的核苷酸序列在序列表中全部列出。

实施例 2: ForteBio 测定本发明抗体与抗原的结合动力学

采用生物膜薄层干涉测定技术（ForteBio ）测定本发明抗体结合人 CD40L 的平衡解离常数（KD)。

根据样品数量准备对应的 AMQ(Pall, 1506091)或 AHQ(Pall，1502051)(用于阳性对照检测)传感器浸泡于 SD buffer(PBS 1×，BSA0.1％，Tween-20 0.05％)中。

取 100μl 的 SD 缓冲液、抗体(Hz33B9C5 和 Hz47E2，100nM)、抗原(人 CD40L，购自 Acrobiosystems，100nM) 各以 200μl 的上样体积分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板(Greiner，675076)中。根据样品位置布板，选择传感器位置。仪器设置参数如下: 运行步骤: Baseline、Loading ~ 1nm、Baseline、Association 和 Dissociation; 各个步骤运行时间取决于样品结合和解离速度，转速为 400rpm，温度为 30℃。使用 ForteBio 分析软件分析 KD 值。

在以上测定法所述实验中，Hz33B9C5 和 Hz47E2 的亲和力如表 X 所示:

表 1. ForteBio 检测抗原抗体结合的亲和力常数（平衡解离常数）

抗体	K_D(M)

Hz33B9C5	2.97E-10
Hz47E2	3.15E-10

实施例 3：本发明抗体在分子水平上抑制 CD40 与 CD40L 的结合

在本申请中，本发明的发明人通过小鼠杂交瘤技术筛选到了与 CD40L 有更高亲和力的抗体，并进行人源化改造最终得到了 2 个人源化抗体 Hz33B9C5 和 Hz47E2，具体序列参见序列表。

在 ExpiCHO 细胞中的表达和纯化如下：

将 Hz33B9C5 和 Hz47E2 的序列分别克隆进 pcDNA3.1 载体备用。取 ExpiCHO 细胞，检测细胞密度达到 8.0~10 x10^6 viable cells/mL，活力应该在 95-99%之间，将细胞密度调整至 6.0x10^6 viable cells/mL。取适量大小容器，按 8%转染细胞体积加入转染缓冲试剂 Fectamine（来源：Gibco），按 0.8μg/mL 转染细胞加入对应量的质粒，含 DNA 质粒的转染缓冲液通过 0.22 μm 滤膜过滤除菌至另一个新的干净容器中。按 3.2 μL/mL 比例向过滤后的混合物中加入转染试剂 FectPro（来源：Polyplus），静置 10min。将转染试剂与质粒 DNA 形成的复合物快速加到细胞中，边加边轻轻晃动摇瓶。36.5℃ 摇床培养，8% CO_2。培养 18-22h 后，按 6 μL/mL cell 加入 Enhancer（来源：Gibco），300 μL/mL cell 加入 Feed（来源：Gibco）。第 7 天取细胞收上清。通过亲和层析的方式进行蛋白纯化，得到最终抗体分子。将纯化后的抗体溶液使用 15ml 超滤离心管，4000rpm/min 离心 10 分钟，使用 PBS 将蛋白稀释后继续离心，4000rpm/min 离心 10 分钟，重复该操作几次，以更换缓冲液。将更换缓冲液后的抗体合并，测抗体浓度。进一步利用液相色谱-质谱联用技术（LC-MS）和体积排阻色谱（SEC）对单克隆抗体的成分进行定性，利用紫外-可见光分光光度计（UV spectrophotometer）进行定量。

在本实施例中测试其在分子水平对 CD40L 的阻断作用。使用 INX-021 作为对照（参见 WO2017011544A1 中 Figure1A 和 Figure 1B 的序列）。抗原（human CD40 Ligand）来源：商业化抗原：Acro Human CD40 Ligand / TNFSF5 Protein, His,Flag Tag (active trimer) (MALS verified)。

设备：Thermo Fisher MULTISKAN-FC

试剂及原材料：

名称	厂家	货号
PBS(1X)	Gibco	10010-023
BSA	生工生物工程	A500023-0100
Tween	生工生物工程	A600560-0500
TMB 单组份显色液	Solarbio	PR1200
ELISA 终止液	Solarbio	C1058
Human CD40 Ligand / TNFSF5 Protein, His,Flag Tag, active	Acro	CDL-H52Db

trimer (MALS verified)		
Biotinylated Human CD40 / TNFRSF5 Protein, Fc, Avitag™ (MALS verified)	Acro	TN5-H82F9
HRP Streptavidin	Biolegend	405210
ExpiFectamine CHO Enhancer	Gibco	100033019
ExpiCHO Feed	Gibco	A29101-01
FectPro	Polyplus	101000007
Fectamine	Gibco	A38915

方法的细节如下：

a) 抗原包被：用 1X PBS 稀释 Human CD40 Ligand 至 1ug/ml，100ul/孔加入 96 孔酶标板，封板 4℃ 过夜；

b) 封闭：取孔板弃上清，用 PBST 洗液洗涤 3 次后，加入 1%BSA，300ul/孔，封闭 2h；

c) 配置一抗：待测抗体按 20ug/ml 为起始浓度，用 1%BSA 按 2 倍梯度稀释试剂备用；用 1%BSA 将 Biotinylated Human CD40 稀释至 2ug/ml 备用；

d) 一抗孵育：取孔板弃上清，用 PBST 洗液洗涤 6 次后，先按 50ul/孔加入抗体，再按 50ul/孔加入 Biotinylated Human CD40，孵育 2h；

e) 配置酶标抗体：HRP Streptavidin 用 1%BSA 1:3000 稀释备用；

f) 酶标抗体孵育：取孔板弃上清，用 PBST 洗液洗涤 3 次后，100ul/孔加入稀释好的 HRP Streptavidin，孵育 1h；

g) 显色：取孔板弃上清，用 PBST 洗液洗涤 3 次后，100ul/孔加入 TMB 显色液，显色 5-10min，待显色完全后，50ul/孔加入终止液，置于酶标仪中读取 450nm 下的读数。

结果如图 1 所示，相对于阳性对照 INX-021，本发明的抗体分子 Hz33B9C5 和 Hz47E2 组显示出更低的 CD40 蛋白结合百分比，说明 Hz33B9C5 和 Hz47E2 更好地抑制了 CD40 蛋白与其配体 CD40L 蛋白的结合。总之，相对于阳性对照 INX-021，本发明的抗体分子 Hz33B9C5 和 Hz47E2 具有更优的靶标阻断活性。

实施例 4：本发明抗体在细胞水平上抑制过表达 CD40 的 Jurkat 细胞下游信号激活

通过 Jurkat-NFkB-Luc 报告系统检测 Hz33B9C5 和 Hz47E2——抗 CD40L 抗体对 CD40 下游信号通路激活的抑制活性。在没有抗 CD40L 抗体的情况下，过表达 CD40 的 Jurkat-NFκB-Luc 细胞在 CHO-CD40L 细胞的刺激下会产生荧光素酶并催化底物发光。当抗 CD40L 抗体与 CHO 细胞表面过表达的 CD40L 结合时，抑制了 CD40L 与过表达 CD40 的 Jurkat-NFκB-Luc 的膜蛋白的相互作用，荧光素酶的分泌随之降低。因此，可以通过 Luciferase 报告系统评估 Hz33B9C5

和 Hz47E2 对细胞激活的抑制。

过表达 CD40L 的细胞系 CHO-CD40L 细胞系的构建:

将CD40L蛋白序列(SEQ ID NO:27)克隆到PXC17.4载体,将制备好的载体质粒与Pvul-HF在稀释后的 CutSmart Buffer 中共孵育，进行酶切反应。取 GS-CHO 细胞（来源：Lonza）离心后去除上清，用含 1%SP4 的 CD CHO Medium 轻柔地重悬细胞，将酶切后的质粒加入到细胞中混匀，转入到电转小杯中。将电转仪程序调至 300V，900uF，Resistance infinity，进行电转。电转结束后立即将细胞转入预热过的含 1%SP4 的 CD CHO Medium 中，于摇床中 120rpm 37℃，6%$C0_2$ 培养。培养 1-2 天后，更换含有 MSX 的培养基进行筛选，细胞活率会经历先下降后回升的过程，待活率恢复至 95%以上后，将细胞冻存备用。

过表达 CD40 的细胞系 Jurkat-Luc-CD40 细胞系的构建:

将 CD40 蛋白序列（SEQ ID NO:32）克隆到 pLVX-IRES-EGFP 载体，将制备好的载体质粒与 pSPAX、pMD2.G、PEIpro 以及 Opti-MEM 混合，转染进 293T 细胞进行病毒包装，48h 后收集病毒并浓缩，感染 NFkB Reporter Jurkat 细胞系（来源：吉满生物）。采用流式分选的方式筛选出有荧光信号的细胞，扩大培养后冻存备用。

在构建的过表达 CHO-CD40L 和过表达 Jurkat-Luc-CD40 细胞的共培养体系中，本发明抗体的加入阻断了 CHO 细胞表面 CD40L 和 Jurkat-NFκB-Luc 表面 CD40 的结合，从而抑制了 Jurkat 细胞下游 NFκB 的激活和荧光素酶产生，降低体系的荧光信号。图 2 所示为实验结果。

方法的细节如下:

a) 将细胞培养至对数生长期，用 1640 完全培养基调整细胞数，其中 Jurkat-Luc-CD40 调整至 1*10^5cells/45ul，CHO-CD40L 调整至 5000cells/45ul。

b) 抗体准备：用 1640 完全培养基配置抗体浓度至 200ug/ml，2 倍梯度稀释备用。

c) 加样：先将 CHO-CD40L 取出轻柔地吹打 5-7 次，按 45ul 每孔加至 96 孔板中，接着 10μl/孔加入配置好的抗体稀释液，用排枪吹打 5 次混匀，最后将 Jurkat-Luc-CD40 细胞取出轻柔地吹打 5-7 次,分别加入 45ul 至 96 孔板中,用排枪吹打 5 次混匀。将 96 孔板放置于 37 ℃，5% CO_2 细胞培养箱中继续培养 6 h。

d) 反应 6 小时后,将 96 孔板取出,平衡至室温。体积 1:1 加入 Bio-Glo™ Luciferase Assay System，室温反应 10 min 后读数。

设备：荧光定量酶标仪 SPARK

试剂及原材料:

名称	厂家	货号
RPMI medium 1640 (1x)	Gibco	22400-089
FBS	Hyclone	SH30406.05
Bio-Glo™ Luciferase Assay System	Promega	G7940
PXC17.4 载体	金唯智	NA

Pvul-HF	NEB	R3150SVIAL
CutSmart Buffer	NEB	B6004SVIAL
CD CHO Medium	Gibco	10743-029
MSX	SIGMA	M5379-500MG
pLVX-IRES-EGFP 载体	金唯智	NA
pSPAX	金唯智	80-735332355
pMD2.G	金唯智	80-735332355
PEIpro	Polyplus	115-100
Opti-MEM	Gibco	11058021

结果如图 2 所示，相对于阳性对照 INX-021，本发明的抗体分子 Hz33B9C5 和 Hz47E2 更强地抑制了过表达 CD40 细胞的下游的 NFkB 信号激活，这说明本发明的抗体分子能够显著抑制由 CD40L 介导的 CD40 下游信号激活。

实施例 5：本发明抗体对 B 细胞激活标志物 CD86 表达的抑制

通过流式细胞术（FACs）检测抗 CD40L 抗体 Hz33B9C5 和 Hz47E2 在外周血单核淋巴细胞（PBMC）的体外培养体系中，对 B 细胞激活的抑制。当 B 细胞接收到刺激信号后，其表面的激活标志物 CD86 的表达会快速升高，但在抗 CD40L 抗体的存在下， B 细胞的激活会被抑制。故通过检测 B 细胞表面 CD86 表达的比例，可以反映抗体的抑制效果。图 3 所示为实验结果。

方法的细节如下：

a) 取 PBMC，于 37℃ 水浴锅迅速化开，加入 9ml 完全培养基中，300g 离心 5min，弃上清，重悬于完全培养基(RPMI 中加入 10%胎牛血清)中，按 5*10^cells 每孔加入 96 孔板中（U 型）；

b) 取 CHO-CD40L 细胞，按 5*10^3cells 每孔加入上述孔板，用排枪吹打均匀；

c) 将不同浓度的待测抗体稀释后加入上述孔板，并用排枪吹打均匀，培养 18h；

d) 染色，流式（PC5.5 CD19，PE CD86，LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit）上机检测。

设备：Beckman Cytoflex

试剂及原材料：

名称	厂家	货号
Human PBMCs	赛笠生物	XFB-HP100B
RPMI	HYCLONE	SH30809.01
胎牛血清	HYCLONE	SH30084.03

PC5.5 CD19	Beckman Coulter	A66328
PE CD86	Biolegend	325406
LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit	Invitrogen	L34975

如图 3 所示，本发明的抗体分子 Hz33B9C5 和 Hz47E2 可以剂量依赖性的抑制 B 细胞中 CD86 的表达，说明其显著抑制了 B 细胞早期激活，且抑制效果与阳性对照 INX-021 类似。

实施例 6：本发明抗体对体外分离的 B 细胞增殖的影响

B 细胞在类别转换以及分化为浆细胞的过程中会大量增殖，通过分离外周血单核淋巴细胞中的 B 细胞，给予一定的条件下体外培养，在第一信号第二信号以及细胞因子共存的体系中，B 细胞会快速增殖。Hz33B9C5 或 Hz47E2 的加入会阻断作为第二信号的 CD40L 与 B 细胞表面的 CD40 相互作用，从而抑制 B 细胞的增殖。图 4 所示为实验结果。

方法的细节如下：

a) 取 PBMC 复苏，于 37℃ 水浴锅迅速化开，加入 9ml 完全培养基中，300g 离心 5min，弃上清，重悬于 MACs buffer 中。

b) 按照 B cell isolation kit II protocol 从 PBMC 中分离 B 细胞，计数后用 10 mL 含 0.5 μg/mL Anti-IgM（AffiniPure F(ab')$_2$ Fragment Goat Anti-Human IgM）的完全培养基在 4℃ 下孵育 2h。

c) 取处理好的细胞洗涤，计数，将 B 细胞以 5e+5/ ml 稀释于含 1 μg/mL Anti-IgM，160 ng/mL Recombinant Human IL-21 Protein，2 μg/mL CD40L 的培养基中。

d) 将各个抗体以首孔 20 μg/ml 用 PBS2 倍梯度稀释，12 个梯度，抗体 100 μL+ 100 μL B 细胞加入 96 孔白底板。

e) 培养至第四天按上述步骤 d)中的培养液同样的抗体浓度配置新鲜培养液，半量更换培养液。

f) 第七天，将孔板离心后每孔小心吸弃 60ul 上清，加入 100 μl CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay，吹打 3-5 下，室温静止 10min，置于酶标仪下读值。

设备：荧光定量酶标仪 SPARK

试剂及原材料：

名称	厂家	货号
RPMI	HYCLONE	SH30809.01
澳洲胎牛血清（FBS)	HYCLONE	SH30084.03
Penicillin-Streptomycin	GIBCO	15070-063
β-巯基乙醇	SIGMA	07604-100ML

HEPES (1 M)	GIBCO	15630080
AffiniPure $F(ab')_2$ Fragment Goat Anti-Human IgM, Fc5μ fragment specific	Jackson	109-006-129
Recombinant Human IL-21 Protein	R&D	8879-IL-050
CD40L	Acro	CDL-H52Db
Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega	G7573
B cell isolation kit II	Miltenyi Biotec	130-091-151

结果如图 4 所示，通过 Cell Titer-Glo®试剂盒检测细胞数，发现 Hz33B9C5 和 Hz47E2 在体外的 B 细胞培养体系中，能剂量依赖地抑制 CD40L 信号所诱导的 B 细胞增殖，且抑制效果与阳性对照 INX-021 相当。

实施例 7: 本发明抗体对 B 细胞分化为浆细胞的影响

B 细胞在适当的条件下分化为最终产生抗体的浆细胞，浆细胞分泌的抗体是适应性免疫中体液免疫的主要作用方式。从 PBMC 中分离出来的 B 细胞，在 3T3-CD40L 细胞、Anti-IgM（AffiniPure $F(ab')_2$ Fragment Goat Anti-Human IgM, Fc5μ fragment specific）和 IL-21 的刺激下会分化为浆细胞，同时加入抗 CD40L 抗体 Hz33B9C5 或 Hz47E2 抑制 3T3-CD40L 与 B 细胞相互作用从而减少 B 细胞向浆细胞。图 5 所示为实验结果。

过表达 CD40L 的 3T3-CD40L 细胞系的构建:

a) 慢病毒(Lenti)包装

1）铺板 1 个 T175 瓶的 293T 细胞;

2）当胞密度达大于 80%时进行转染；转染前将 T175 瓶中的培养基弃去，加入 20ml 基础 DMEM 培养基 (无血清无抗生素)，重新放入 37℃，5% CO_2 培养箱中;

3）制备转染混合物，其中质粒:pSPAX2:pMD2.G:PEIpro 的比例为 2:2:1:15，转染混合物总体积是 10%培养总体积;

4)将配制好的转染混合物轻柔滴入培养瓶中;轻轻晃动培养瓶使其均匀分布,放入 37℃，5%CO_2 培养箱中培养;

5)转染 6 h 后将培养瓶中的培养基吸弃,加入 20ml 新鲜的含 4%FBS 的 DMEM 培养基，于 37℃，5% CO_2 培养箱中;

b) 收集病毒与感染 3T3 细胞(来源：中科院上海生科院细胞库)

1）感染前 1 天准备 3T3 细胞，将细胞铺入 6 孔板中；其中 4 孔为实验组，2 孔为阴性对照组;

2）感染当天，将 a)中获得的细胞收集病毒上清离心（500g，10min），去除死细胞;

3）将离心后的病毒上清加入到 3T3 细胞中，实验组孔加入 2ml 病毒上清；阴性对照组孔加入 2ml 培养基；细胞转入培养箱;

4）病毒感染 1 天后换液，换成完全培养基（10% FBS，含有抗生素）;

c) 细胞分选

1）待细胞稳定扩增后将细胞离心收集，使用流式抗体对细胞表面的 CD40L 染色;

2）使用流式分选仪器进行分选，筛选出有荧光信号的细胞;

3）扩大培养分选后的细胞；获得 3T3-CD40L，冻存备用。

方法的细节如下:

a) 将 3T3-CD40L 细胞用 10ug/ml mitomycin C 37 ℃ 处理 30min，以 6250/孔种于 96 孔板。

b) 次日配置 B 细胞基础培养基：50 ml RPMI1640+0.192μl 2-mercaptoethanol + 100 μl HEPES，以下各试剂均用此培养基配置。

c) 使用 B cell isolation kit II，分离 PBMC 中 B cell，用 10 mL 含 0.5 μg/mL anti-IgM 的 B 细胞基础培养基 4 度处理 2h，洗涤，计数，将 B 细胞以 1e+6/ ml 稀释于含 160 ng/mL IL21 的 B 细胞基础培养基中。

d) 将各个抗体以首孔 40 μg/ml 配置，然后 2 倍梯度稀释，12 个梯度，将铺有 3T3-CD40L 细胞的 96 孔板中培养基吸弃，每孔加入抗体 100 μL+ 100 μL B 细胞,注意缓慢加入，切勿吹打。

e) 培养至 D4 半量更换 B 细胞基础培养基。

f) 将分化第 7 天细胞进行 IgD（BB515 Mouse Anti-Human IgD ，1:100）、CD38 (Brilliant Violet 785™ anti-human CD38 Antibody ，1.5:100) 、CD19 (CD19-PE-CF594，1:100) 和 DCM (DCM APC-Cy7，1:1000) 染色，流式分析。

设备：BD Symphony

试剂及原材料:

名称	厂家	货号
RPMI1640	HYCLONE	SH30809.01B
IL21 (100 μg/ml)	R&D	8879-IL-050
AffiniPure F(ab')$_2$ Fragment Goat Anti-Human IgM, Fc5μ fragment specific (1.3 mg/ml)	jakson	109-006-129
B cell isolation kit II, human	Miltenyi Biotec	130-091-151
FBS	HYCLONE	SH30406.05
DMEM	HYCLONE	SH30022.01
2-mercaptoethanol	Thermofisher/Gibco	21985023
Brilliant Violet 785™ anti-human CD38 Antibody	Biolegend	303530

CD19-PE-CF594	BD Biosciences	562294
BB515 Mouse Anti-Human IgD	BD Pharmingen	565243
DCM APC-Cy7	invitrogen	L34963
pSPAX2:pMD2.G:	金唯智	NA
PEIpro	Polyplus	115-100
HEPES	GIBCO	15630080

如图 5 所示，与阳性对照 INX-021 和 MEDI4920（CN103874501B 中的 SEQ ID NO:145 所示）类似，本发明的抗体分子 Hz33B9C5 和 Hz47E2，浓度依赖地抑制了浆细胞的分化比例。可见，通过抑制 3T3-CD40L 与 B 细胞相互作用，本发明的抗体能够降低 B 细胞向浆细胞的分化。

实施例 8：本发明抗体对 moDC 细胞分泌 IL-12 的影响

虽然 CD40 主要表达在 B 细胞上，但同样作为抗原呈递细胞的 DC 细胞表达的 CD40 与 CD40L 在许多情况下也会参与到免疫系统反应中发挥作用，DC 细胞分泌的 IL-12 作用于 T 细胞和 NK 细胞上的受体会引起 T 细胞的分化和 NK 细胞 IFN-γ 和 TNF-α 的分泌，促进炎症反应。该实验从外周血单核细胞分离出单核细胞，在 IL-4 和 GM-CSF 的诱导下分化为 moDC 细胞，在 CD40L 蛋白和本发明抗体存在的情况下共培养。通过 ELISA 的方法检测 DC 细胞分泌的 IL-12 浓度。图 6 所示为实验结果。

方法的细节如下：

a) 复苏 PBMC 细胞（50 M/支），用 Pan monocyte isolation kit 阴选出 monocyte;

b) 用 X-VIVO 培养基重悬细胞接中于 6 孔板中，并向细胞中加入 100 ng/ml GM-CSF 和 10ng/ml IL-4 诱导 7 天，其中 Day2 和 Day4 补充 1ml 加入了 100 ng/ml GM-CSF 和 10ng/ml IL-4 的培养基;

c) 收集 b)中获得的诱导的 imDC 细胞，用 X-VIVO 培养基重悬细胞，调整细胞密度为 2.5*10^5/ml。

d) 向 96 孔平底板中加入 c)中获得的 DC 细胞悬液，100 μl/孔。

e) 使用 10% FBS 的 RPMI1640 培养基配置 4ug/ml CD40L，50 μl/孔，体系终浓度 1ug/ml。

f) 使用 X-VIVO 培养基稀释待测抗体至 20ug/ml，取 50 μl 稀释的抗体加入到细胞中，混匀后 37 度孵育培养。

g) 培养 4 天后，收集细胞培养上清，用商业化 ELISA 检测试剂盒(Human IL-12/IL-23 p40 ELISA kit)检测 IL-12 p40 的含量。

设备：Thermo Fisher MULTISKAN-FC

试剂和原材料：

名称	厂家	货号

Pan monocyte isolation kit	美天旎	130-096-537
X-VIVO	LONZA	04-418Q
GM-CSF	R&D	215-GM/CF
IL-4	R&D	204-IL
Human IL-12/IL-23 p40 ELISA kit	联科生物	EK1183-96

如图 6 所示，相对于阳性对照 INX-021，本发明的抗体分子 Hz33B9C5 和 Hz47E2 更强地抑制了 DC 细胞分泌 IL-12，说明本发明抗体能更加显著地抑制 IL-12，从而抑制 IL-12 介导的系列炎症反应。

实施例 9：本发明抗体在体外实验中不会引起血小板的激活

对于本发明抗体是否会引起血小板的激活，基于血小板激活的标志分子表达和全血血小板聚集分析系统检测聚集这两种检测方法进行检测。使用阳性对照药物和阴性对照药物处理血小板，随后用流式细胞技术检测血小板上激活性标志分子 CD62P 和 PAC1 的表达并进行定量分析，同时利用全血血小板聚集分析系统进行实时监控和定量分析。图 7-图 9 所示为实验结果。

方法的细节如下：

a) 人源血小板重悬于 Tyrode's buffer (Sodium Chloride(140 mM), Potassium Chloride(5 mM), HEPES(25 mM), Calcium Chloride Dihydrate(2 mM), Magnesium Chloride Hexahydrate(2 mM), Dextrose / Glucose(10 mM), Water(rest))室温暂存；将血小板悬液以 3000rpm 离心 2min，沉淀的血小板以 PBS 轻轻重悬，以三分类血液分析仪进行血小板计数，一般为 $3*10^{11}$/L。

b) CD40L 抗原和待测抗体抗体按照摩尔比 1:1 混合均匀，使 CD40L 终浓度和抗体药物的终浓度均为 3 μM，室温静置 15min 以激活抗体药物形成免疫复合物。

c) 血小板聚集分析系统分析：聚集仪 Chrono-Log 560Ca 预热至 37℃，将 200μL 血小板与 50μL 抗原-抗体复合物在比色管中轻轻混匀，设置搅拌速度为 1000rpm，加入终浓度 1mM CaCl2，以内含 PBS 的比色管为对照重置基线，记录比色管透光度随时间的变化曲线。

d)流式细胞术分析: 抗原-抗体复合物以上述比例配置 10μL 体系，加入终浓度 1mM 的 CaCl2；将 50μL 血小板与上述 10μL 体系混合，37℃水浴 10min；加入 2.5μL 的 P-selectin 和 PAC-1 流式抗体，室温避光 15min； 300μL PBS 稀释混匀，置于流式管上机。

设备：sysmex 公司三分类血液分析仪（型号：KX-21N）、Chrono-Log 公司全血血小板聚集分析系统（型号：Chrono-Log 560Ca）、BD 公司流式细胞分析仪（型号：FACS Calibur）

试剂和原材料：

名称	厂家	货号

FITC anti-humanCD41/CD61	BioLegend	362804
Hu CD62P PE AK-4	BD Pharmingen	555524
Convulxin	Enzo Life Sciences	ALX-350-100-C050
Rupilzumab	上海百英生物科技有限公司	20210919A062
PBS	Solarbio	P1020-500ml

如图 7-8 所示 FACs 的结果中可知，相对于阳性对照 Convulxin 和 Rupilzumab，本发明的抗体分子 Hz33B9C5 和 Hz47E2 几乎不影响血小板激活标志物 PAC-1 和 CD62P 的表达；同时本发明的抗体与同样进行过 Fc 突变的抗体 INX-021 表现相近。与此同时，图 9 显示，本发明的抗体具有与阴性对照 PBS 基本相同的血小板聚集比例，该比例和 INX-021 是相当的，且显著低于 Convulxin 和 Rupilzumab。这说明本发明抗体与 CD40L 形成的免疫复合物，并未造成血小板的聚集及激活。

实施例 10：本发明抗体在实验性自身免疫脑脊髓炎（EAE）小鼠模型中的数据

多发性硬化症(MS)是一种中枢神经系统慢性炎症性疾病，可导致脑炎和脱髓鞘发生。MS 被认为是一种自身免疫性疾病，由自身反应性 T 细胞引起，症状包括肌肉僵硬和麻痹、视觉障碍和失明、感觉丧失和共济失调，具有反复复发的特征。目前有多种有区别的 MS 动物模型，其中实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)模型由于具有和 MS 相似的炎症和脱髓鞘的病理特征，被广泛应用于多发性硬化症的研究。髓鞘蛋白（本实验使用的是髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 MOG）或这些蛋白的肽免疫诱导产生 EAE 模型。这可能是由于髓磷脂特异性 T 细胞在外周被激活，穿过血脑屏障进入中枢神经系统并被重新激活，引发一系列炎症反应，导致脱髓鞘和轴突细胞凋亡，最终导致神经损伤和失去功能。使用标准化评分系统评估临床症状，可衡量疾病的诱导发生程度。

本实验采用的实验性自身免疫脑脊髓炎(EAE)模型小鼠评分标准如下：

0 分：小鼠健康

1 分：小鼠尾巴无力

2 分：小鼠一只后肢瘫痪

3 分：小鼠两只后肢瘫痪

4 分：小鼠体重减轻 20%及以上

5 分：小鼠死亡或濒临死亡

另外通过测量小鼠体重也可间接表明小鼠的健康状况，以及通过检测小鼠外周血血清中的抗 MOG 抗体的滴度，反映本发明抗体对小鼠产生抗体功能的抑制作用。图 10-图 12 所示为实验结果。

方法的细节如下:

a）试剂配置:

1、灭活结核杆菌母液（H37Ra 母液）(100 mg/ml): 10 ml 完全福氏佐剂+100mg H37Ra 超声溶解;

2、MOG35-55 母液(10 mg/ml): 5 ml 完全福氏佐剂+50mg MOG35-55;

3、百日咳病毒母液（PTX 母液）(100 ug/ml): 50 ug PTX + 500 ul DPBS（分装冻存于-40 度冰箱）;

4、灭活结核杆菌工作液（H37Ra）: 500 ul 完全福氏佐剂+500 ul 灭活结核杆菌母液;

5、MOG35-55 乳化剂: 2 ml MOG35-55 乳化剂=200 ul MOG35-55 母液+ 800 ul DPBS + 1 ml H37Ra 工作液，充分乳化后使用;

6、百日咳病毒工作液（PTX 工作液）: 30 ul PTX 母液+ 1970 ul DPBS（现配现用）

b）模型方法:

1、每组 5 只 8-10 周龄小鼠，均为雌性，分别给药对照（PBS）、hIgG、INX-021、Hz33B9C5 和 Hz47E2，给药剂量均为 10mg/kg;

2、Day0: 背部 2 点各注射 MOG35-55 乳化剂 100 ul，尾静脉注射 PTX 工作液 200 ul，IP 给药抗体或对照;

3、Day3: 尾静脉注射 PTX 工作液，IP 给药抗体或对照;

3、Day7 和 Day10, IP 给药抗体或对照;

4、其中 Day0，3，7，10，12-21 根据 0~5 分体系评价疾病程度以及记录小鼠体重;

5、其中 Day7，Day14，Day21 通过小鼠眼眶取血收集血清，通过 ELISA 检测血清中 Anti-MOG antibody 的滴度。

设备: Thermo Fisher MULTISKAN-FC

试剂和原材料:

名称	厂家	货号
MOG35-55	MedChemExpress	HY-P1240A
PTX	EMD	516560-50UG
人源化 CD40/CD40L 小鼠	南方模式	20170010014874
完全福氏佐剂	SIGMA	F5881-10X10ML
HRP Goat anti-mouse IgG(minimal x-reactivity) Antibody	Biolegend	405306
H37Ra	BD	231141
DPBS	Gibco	70011-044
IgG	信达生物	20210330

如图 10-11 所示，以 10mg/kg 施用本发明的抗体 Hz33B9C5 和 Hz47E2，能够显著降低实验性自身免疫脑脊髓炎（EAE）的临床评分，并且不影响小鼠的体重，这些效果和未经 MOG 诱导的对照组接近，并优于阳性对照 INX-021；这些结果说明，Hz33B9C5 和 Hz47E2 具有改

善实验性自身免疫脑脊髓炎（EAE）以及自身免疫性疾病，如多发性硬化症(MS)的能力。

如图 12 所示，通过 10mg/kg 施用本发明的抗体 Hz33B9C5 和 Hz47E2，在免疫 14 天之后尤其 21 天后，本发明的抗体相比于 INX-021 具有更低的 Anti-MOG antibody 的滴度，这说明本发明的抗体相对于 INX-021 具有更强的体液免疫的抑制作用，优选地具有更强的抑制抗体产生的作用。

实施例 11：本发明抗体抑制抗血蓝蛋白抗体在小鼠体内的产生

由于肽、小蛋白质和部分药物分子为半抗原，通常不具有免疫原性，需要如血蓝蛋白这种载体蛋白的帮助才能以抗体产生的形式刺激免疫系统的反应，故血蓝蛋白（KLH）广泛应用于研究、生物技术和治疗应用。同时，由于血蓝蛋白来源于帽贝类动物（一种腹足动物），其在生长发育上与哺乳动物相差较大，所以在基于哺乳动物的一些免疫学类研究中产生假阳性结果的可能性较低。

在人源化 CD40/CD40L 小鼠体内注射本发明抗体后免疫血蓝蛋白，本发明抗体会抑制 CD40L 与 CD40 相互作用从而抑制 B 细胞成熟分化并分泌抗血蓝蛋白抗体的产生。图 13 所示为实验结果。

方法的细节如下：

a）试剂配置：按每只小鼠 250ug 血蓝蛋白计，对应溶解于 100ulPBS 备用；

b）模型方法：

1、每组小鼠 5 只，鼠龄约 8-10 周，分别给药对照 hIgG、INX-021（3mpk）、Hz33B9C5(0.3mpk、1mpk 和 3mpk)；

2、Day0：将血蓝蛋白母液与明矾佐剂按体积比 1:1 混合，腹腔注射，同时对小鼠 IP 给药抗体药物；

2、 Day7：对小鼠 IP 注射抗体药物；

3、其中 Day7、Day14、Day21 通过小鼠眼眶取血收集血清，用 ELISA 的方法检测血清中 Anti-MOG antibody 的滴度。

设备：Thermo Fisher MULTISKAN-FC

试剂及原材料：

名称	厂家	货号
血蓝蛋白 来源于大锁孔帽贝 （透孔螺）	SIGMA	H7017-20MG
Imject™ 明矾佐剂	Thermo Scientific	77161
人源化 CD40/CD40L 小鼠	百奥赛图	320726210100343216
HRP Goat anti-mouse IgG(minimal x-reactivity) Antibody	Biolegend	405306

如图 13 所示，在人源化 CD40/CD40L 小鼠体内，相对于 INX-021，本发明的抗体 Hz33B9C5 组，小鼠血清中抗 KLH IgG 的浓度更低。这说明本发明的抗体能更强地抑制 CD40L 与 CD40 相互作用，从而抑制 T 细胞依赖途径的 B 细胞成熟分化，最终降低抗血蓝蛋白抗体的产生。并且，在不同的 Hz33B9C5 剂量组，小鼠血清中抗 KLH IgG 的滴度呈现 Dose-response 的趋势，这说明 Hz33B9C5 的在此动物模型中的药效是剂量依赖性的。

实施例 10：本发明抗体在小鼠体内的药代动力学

实验材料

试剂及耗材信息

名称	品牌	货号	批号
96 孔酶标板	USA，Thermo	442404	149868
10×PBS 缓冲液	上海，生工	E607016-0500	F910FA0002
TMB 单组份显色液	北京，索来宝	PR1200	20190404
BSA	上海，生工	A500023-0100	F722BA0005
Tween 20	上海，生工	A600560-0500	FB11BA0001
碳酸盐粉末	USA，Thermo	28382	QH224052
脱脂奶粉	上海，生工	A600669-0250	D4424BA0028
ELISA 终止液	北京，索来宝	C1058	20190620
Human CD40 ligand/TNFSF5 protein	Acrobiosystem	CDL-H52Db	N/A
Goat anti-Human IgG Fc-HRP	BETHYL	A80-104P	A80-104P-91

仪器设备信息

名称	产地及品牌	型号	编号
酶标仪	USA，Thermo	Multiskan FC	AS-A1-008
微孔板恒温振荡器	杭州，奥盛	MB100-4A	AS-A1-015
洗板机	USA，BioTek	405TSUS	AS-A1-076

实验准备

2.1 1×PBS 缓冲液

100 mL 10×PBS 缓冲液，定容至 1 L，混匀。

2.2 包被液

取一包碳酸盐粉末，溶解于 400 mL 超纯水，定容至 500 mL，混匀。

2.3 洗液

取 1mL Tween-20 加入到 1999 mL 1×PBS 缓冲液中，混匀。

2.4 封闭液

称取 5 g 脱脂奶粉，溶解至 100 mL 洗液中，混匀。

2.5 样品稀释液（抗体稀释液）

称取 1g BSA，溶解至 100 mL 洗液中，混匀。

实验过程

3.1.1 预包被：提前一天包被 96 孔酶标板，使用包被液将 CD40L 蛋白稀释至 1 μg/mL。每孔 100 μL，封板膜封板，4℃过夜。

3.1.2 洗板：倒掉 96 孔酶标板中预包被溶液，在吸水纸上拍干，然后每孔加入 300 μL 洗液，振荡混匀 10 秒，拍干洗液后，重复洗涤 3 次。

3.1.3 封闭：排枪加入封闭液，每孔 200 μL，封板膜封板，4℃过夜或室温 2h。

3.1.4 洗板：重复 3.1.2。

3.1.5 加样：将稀释好的标准品（ Hz33B9C5 和 Hz47E2，浓度是 1~512 ng/ml，10 个浓度，2 倍稀释））、质量控制样品（一 Hz33B9C5 和 Hz47E2，5.12~200ng/ml，5 个浓度，2 倍稀释）和待测样本（在一定时间小鼠眼眶取血后获得的血清），每孔 100 μL，室温下孵育 2 小时，注意避光。

3.1.6 洗板：倒掉 96 孔酶标板中溶液，在吸水纸上拍干，然后每孔加入 300μL 洗液，振荡混匀 10 秒，拍干洗液后，重复洗涤 6 次。

3.1.7 加入酶标抗体孵育：加入稀释好的 Goat anti-Human IgG Fc-HRP（25 ng/mL），每孔 100 μL，室温下孵育 1 小时，注意避光。

3.1.8 洗板：重复 3.1.6。

3.1.9 显色：将 TMB 底物加入到 96 孔酶标板中，每孔 100 μL，室温下避光显色 5~10 分钟。

3.1.10 终止：每孔加入 50 μL ELISA 终止液，中速震荡 10 秒，30 分钟内，读取 OD450 nm/620 nm 的值。

结果分析

4.1 浓度测定值保留小数点后 4 位，浓度平均值保留小数点后 2 位，Mean 表示。

4.2 光密度 450nm 和 620nm 的吸光值由酶标仪给出，不可更改，OD 样品 =（A450-A620）样品，吸光值保留至小数点后 4 位，每个样本均是双复孔上样。准确度（用于评价相对于理论值的相对误差，下面简写为%RE）和精密度（用于评价相对标准差，下面简写为%CV）保留到小数点后第 1 位。计算公式如下：

精密度(%CV) = 标准偏差(SD)/测定浓度平均值×100%

准确度(%RE) =（测定浓度平均值-理论浓度）/理论浓度×100%

4.3 实验数据：采用 Thermo 公司的 Skanit 3.1 分析软件进行四参数 Logistic 曲线拟合，得到浓度测定值。浓度平均值、准确度、精密度的计算，都使用的是 Excel 自带的计算功能。

校正曲线方程为：y = d + (a - d)/(1 + (x / c)^b)

结果参见图 14。如下表 2 和图 14 所示，Hz33B9C5 和 Hz47E2 具有较长的体内半衰期，这说明本发明的抗体改善了抗 CD40L 抗体的药代动力学，具有优良的药代动力学。

表 2. 本发明抗 CD40L 抗体的药代动力学

组别	C_{max} (ug/mL)	AUC_{0-t} (ug*h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ug*h/mL)	MRT0-∞(h)	$T_{1/2}$ (h)	CL(ml/h)	Vss (ml/kg)
Hz33B9C5	164	18463	23512	323	231	0.43	142
Hz47E2	214	26304	37260	406	290	0.27	112

序列信息:

抗体 Hz33B9C5		
SEQ ID NO	序列名称	具体序列
1	HCDR1	GFTFSDYYMY
2	HCDR2	TISGGGTYTYSPDSVKG
3	HCDR3	GEPGLAY
4	重链可变区(VH)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMYWIRQAPGKGLEWVSTISGGGT YTYSPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEPGLAYWGQGTLV TVSS
5	重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
6	重链全长(HC)	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMYWIRQAPGKGLEWVSTISGGGT YTYSPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEPGLAYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	LCDR1	KASQSVDYYGDSYMH
8	LCDR2	ASSNLES
9	LCDR3	QQSHEDPWT
10	轻链可变区(VL)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYYGDSYMHWYQQKPGQPPKLLIYASSN LESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSHEDPWTFGGGTKVEIK
11	轻链恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
12	轻链全长（LC）	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYYGDSYMHWYQQKPGQPPKLLIYASSN LESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSHEDPWTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
28	VHDNA	AAGCTTGCCGCCACCATGAAGTGGGTGACTTTTATCAGTCTACTATTCCTGTTCTC CTCCAGCTCTCGGGCTCAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGAGGCCTGGTGAA GCCTGGAGGCTCTCTCCGGCTGTCCTGTGCAGCCTCTGGCTTCACCTTCTCTGACT ACTACATGTACTGGATCAGACAGGCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCAAC AATCAGCGGCGGCGGAACCTACACCTATTCTCCTGATTCCGTCAAGGGCAGATTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGA GAGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGGCGAGCCTGGCCTGGCCTA CTGGGGACAAGGGACCCTCGTGACCGTGTCGTCCGCCTCCACCAAGGGACCTTC TGTGTTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCTGCTCTGG GCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCCGTGACAGTGTCCTGGAACTCTGG CGCCCTGACCAGCGGCGTGCATACCTTTCCCGCTGTGTTGCAGTCCTCTGGCCTGT ACTCTCTGTCTTCCGTGGTCACCGTGCCTTCATCCTCCCTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAA CCCAAATCTTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCTTGCCCTGCTCCCGAGGCCG CTGGCGGCCCTTCCGTCTTTCTGTTCCCACCTAAGCCTAAGGATACACTGATGATC TCTAGAACACCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTCGACGTGTCTCACGAGGATCCAG AGGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAAACCA AACCTAGAGAGGAACAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTTTCTGTCCTGACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACA

		AGGCCCTGGCCCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAGCCCCGGG AACCTCAGGTTTATACACTGCCCCCATCTCGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT GTCTCTGACCTGCCTGGTGAAAGGCTTCTACCCCTCTGACATCGCCGTGGAATGG GAGTCCAATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGCTGGC AGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCATAATCACTA CACCCAGAAGAGCCTGTCACTGTCTCCAGGCAAGTGATGAGAATTC
29	VLDNA	AAGCTTGCCGCCACCATGAAGTGGGTGACTTTTATCAGTCTACTATTTCTGTTCTC CTCCAGCTCTAGAGCCGACATCGTGATGACCCAGAGTCCCGATAGCCTGGCTGTG TCCCTGGGAGAGCGCGCTACCATCAACTGCAAAGCCTCTCAGTCCGTGGATTACT ACGGCGACTCCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAAGCT GCTGATCTACGCCTCTTCCAACCTGGAATCCGGCGTGCCCGACCGGTTTAGCGGC TCCGGCTCTGGTACCGACTTCACCCTCACAATCAGCTCTCTGCAGGCCGAGGACG TGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCTCACGAGGATCCTTGGACCTTCGGCGGCGG AACAAAAGTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCTGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCC CCATCTGATGAACAGCTGAAGAGCGGCACAGCTTCTGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAAT CTGGCAACTCCCAAGAGTCCGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACTC CCTGTCCTCCACCCTGACCCTGTCCAAAGCTGACTACGAGAAGCACAAGGTCTAT GCCTGCGAGGTGACCCATCAGGGCCTGTCTTCTCCTGTGACCAAGTCCTTCAATA GAGGCGAATGTTGATGAGAATTC
抗体 Hz47E2		
SEQIDNO	序列名称	具体序列
13	HCDR1	GFTFSDYAMS
14	HCDR2	EISTVHTYTYYSDAVAG
15	HCDR3	DRVLDY
16	重链可变区（VH）	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISTVHT YTYYSDAVAGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRVLDYWGQGTLVT VSS
5	重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
17	重链全长（HC）	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSEISTVHT YTYYSDAVAGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRVLDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
18	LCDR1	RASESVEYYDTSLMQ
19	LCDR2	AASNLES
20	LCDR3	QQTKKLPWT
21	轻链可变区（VL）	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYDTSLMQWYQQKPGQPPKLLIYAASN LESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTKKLPWTFGQGTKVEIK
11	轻链恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
22	轻链全长（LC）	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYDTSLMQWYQQKPGQPPKLLIYAASN LESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQTKKLPWTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS

		KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
30	VHDNA	AAGCTTGCCGCCACCATGAAGTGGGTGACTTTTATCAGTCTACTATTTCTGTTCTC CTCTTCCTCTAGAGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTCAAG CCTGGAGGCTCTCTGAGACTGTCCTGTGCCGCTTCCGGCTTCACCTTCAGCGACT ACGCCATGTCTTGGGTGCGGCAGGCCCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTCTCTGA GATCAGCACCGTGCACACCTATACCTATTACAGCGACGCCGTGGCCGGCAGATTC ACCATCTCTCGGGACAACGCTAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTCC GGGCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGATCGGGTGCTGGATTACTG GGGCCAAGGCACCCTGGTTACAGTCTCCTCCGCCTCTACCAAGGGACCAAGCGTG TTTCCTCTGGCCCCGAGTTCTAAGTCCACCTCTGGCGGCACCGCTGCCCTGGGCT GCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACTCTGGCGC TCTGACCTCTGGTGTGCATACTTTCCCCGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGACTGTACT CCCTGTCTTCGGTCGTGACAGTGCCCTCTAGCTCTCTGGGCACACAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAACCT AAGTCTTGCGACAAGACACACACCTGTCCTCCTTGCCCTGCTCCTGAGGCTGCTG GCGGCCCTTCCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGATACCCTGATGATCTCC CGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAAGATCCTGAA GTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAAACCAAA CCTCGCGAAGAGCAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTCTCCGTGCTGACCGTGC TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTTTCCAACAAGG CTCTGGCTCCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAAGGCCAGCCTAGAGAGC CTCAGGTGTACACACTGCCTCCTAGCAGAGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGT CTTTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCTTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGA GTCCAATGGCCAACCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCACCTGTGCTGGACTC CGATGGCTCCTTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGATAAGTCCAGATGGCAGC AGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCATAATCACTACAC CCAGAAGTCCCTGTCCCTAAGCCCTGGTAAGTGATGAGAATTC
31	VLDNA	AAGCTTGCCGCCACCATGAAGTGGGTGACTTTTATCAGTCTACTATTTCTGTTCTC CAGCTCTTCTCGGGCCGATATCGTGATGACCCAGTCTCCAGATTCTCTGGCTGTGT CCCTGGGCGAAAGAGCTACCATCAACTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGAATACTA CGACACCAGCCTGATGCAGTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAAGCT GCTGATCTACGCCGCTTCCAACCTGGAATCCGGCGTGCCCGACCGGTTTAGCGGA TCTGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCTCTCCAGGCCGAGGACG TGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGACCAAGAAGCTGCCTTGGACCTTCGGCCAAG GCACCAAAGTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCTGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCC CCCCTCCGATGAACAGCTGAAGTCTGGCACAGCTTCTGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAG TCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTTACTGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACT CCCTGAGCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTCTA TGCCTGCGAGGTGACACACCAGGGACTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTTCAA CAGAGGCGAGTGTTGATGAGAATTC
SEQIDNO	序列名称	具体序列
23	IgG1Fc 区（野生型）	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
24	突变的 IgG1Fc 区（包含 L234A/L235A 和 P329 缺失（△P329））	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
26	野生型重链恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF

		FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
27	CD40L	MIETYNQTSPRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDERNL HEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQKG DQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYA QVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQ PGASVFVNVTDPSQVSHGTGFTSFGLLKL
32	CD40 蛋白质	EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCH QHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIA TGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRL RALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQE TLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

权 利 要 求

1. 一种抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，所述抗体包含:

（i） 如 SEQ ID NO:4 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:10 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

（ii） 如 SEQ ID NO:16 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:21 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

2. 一种抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含第一重链互补决定区（HCDR1）、第二重链互补决定区（HCDR2）、第三重链互补决定区（HCDR3）以及第一轻链互补决定区（LCDR1）、第二轻链互补决定区（LCDR2）和第三轻链互补决定区（LCDR3），其中:

（i） 所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别包含 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或分别由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成；或

（ii） 所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别包含 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或分别由 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列组成。

3. 权利要求 1 或 2 的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区（VH），其中所述重链可变区包含与选自 SEQ ID NO:4 或 16 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成或包含选自 SEQ ID NO:4 或 16 所示的氨基酸序列，或由所述序列组成；或者其包含轻链可变区（VL），其中所述轻链可变区包含与选自 SEQ ID NO:10 或 21 所示的氨基酸序列具有至少 90%同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成或包含选自 SEQ ID NO:10 或 21 所示的氨基酸序列，或由所述序列组成。

4. 抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中

（i） 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

（ii） 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

5. 权利要求 1 或 2 所述的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区和轻链可变区，其中

(i) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且

所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

6. 权利要求 1-5 中任一项所述的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含 Fc 区。

7. 权利要求 6 的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其中所述 Fc 区来自人的 IgGFc，例如，来自人 IgG1 的 Fc,来自人 IgG2 的 Fc,来自人 IgG3 的 Fc 或来自人 IgG4 的 Fc。

8. 权利要求 7 的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其中所述 Fc 区包含降低或消除效应子功能的突变，和/或消除与 FcγR 结合且保留与 FcRn 结合亲和力的突变。

9. 权利要求 8 的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其中所述突变为 L234A/L235A 和 P329 缺失突变。

10. 权利要求 6-9 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其中所述 Fc 区

(i) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:23 或 24 或由其组成;

(ii) 包含与氨基酸序列 SEQ ID NO:23 具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性的氨基酸序列；或者

(iii) 包含与氨基酸序列 SEQ ID NO:24 具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性的氨基酸序列，且包含 L234A/L235A 和 P329 缺失突变。

11. 权利要求 1-10 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链恒定区，所述重链恒定区来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区，优选地，所述重链恒定区

(i) 包含选自 SEQ ID NO:5 或 26 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 包含与 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，且具有 L234A/L235A 和 P329 缺失突变。

12. 权利要求 1-11 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含轻链恒定区，所述轻链恒定区为 lambda 或 Kappa 轻链恒定区，优选地，所述轻链恒定区

(i) 包含与 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或

(ii) 包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

13. 权利要求 1-12 中任一项所述的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链，其中所述重链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:6 或 17 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或

(ii)包含选自 SEQ ID NO:6 或 17 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

其包含轻链，其中所述轻链

(i)包含与选自 SEQ ID NO:12 或 22 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或

(ii)包含选自 SEQ ID NO:12 或 22 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

14. 抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中

(i) 所述重链包含与 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且所述轻链包含与 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 所述重链包含与 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且所述轻链包含与 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

15. 权利要求 1-14 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中

（i） 所述重链包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或由其组成的，所述轻链包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列或由其组成;

（ii） 所述重链包含 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列或由其组成的，所述轻链包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列或由其组成。

16. 权利要求 1-15 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是单克隆抗体。

17. 权利要求 1-16 中任一项的抗 CD40L 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是人源化的抗体或嵌合抗体。

18. 权利要求 1-17 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段是选自以下的抗体片段：Fv，Fab，Fab’，Fab’-SH，$F(ab')_2$、dAb(domain antibody)、线性抗体、单链抗体(例如 scFv)；单结构域抗体（sdAb）例如 VHH、双价抗体或其片段、或骆驼科抗体或双体抗体(diabody)。

19. 权利要求 1-18 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段具有一种或多种以下性质：

a) 以高亲和力结合 CD40L（例如人 CD40L）；

b) 抑制 CD40 与 CD40L 的结合

c) 抑制 CD40/CD40L 信号通路;

d) 抑制 B 细胞激活或增殖;

e) 抑制 B 细胞的增殖;

f) 抑制 B 细胞成熟分化，例如抑制 B 细胞分化为浆细胞;

g) 抑制树突细胞的 IL-12 的分泌;

h) 不引起血小板的激活;

i) 治疗或预防免疫疾病，例如多发性硬化症(MS); 和/或

j) 抑制免疫反应，优选体液免疫反应，例如抑制抗体的产生

k) 改善药代动力学，优选具有等于或大于大约 200 小时的体内半衰期，更优选地等于或大于大约 210、220、230、240、250、260、270、280 或 290 小时的体内半衰期。

20. 分离的核酸，其编码权利要求 1-19 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段。

21. 包含权利要求 20 的核酸的载体，优选地所述载体是表达载体。

22. 包含权利要求 20 的核酸或权利要求 21 的载体的宿主细胞，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，更优选的选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 CHO-K 细胞或 HEK293 细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。

23. 制备结合 CD40L 的抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括

a) 在适于表达编码权利要求 1-19 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段的核酸的条件下培养权利要求 22 的宿主细胞，

b) 任选地分离所述抗体或其抗原结合片段，

c) 任选地所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段，任选地，所述抗体被纯化，例如被 ProteinA 纯化。

24. 免疫缀合物，其包含权利要求 1-19 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段和其它物质，例如治疗剂，例如会产生生物学效应的活性剂，包括但不限于细胞因子、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫抑制剂）。

25. 药物组合物，其包含权利要求 1-19 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段或权利要求 24 的免疫缀合物，以及任选地药用辅料。

26. 药物组合产品，其包含权利要求 1-19 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段或权利要求 24 的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂，例如会产生生物学效应的活性剂，包括但不限于细胞因子、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫抑制剂）。

27. 预防或治疗个体中涉及 CD40L/CD40 介导的途径的不适当激活相关疾病或病症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 1-19 中任一项的抗 CD40L 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 24 的免疫缀合物、或权利要求 25 的药物组合物、或权利要求 26 的药物组合产品。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述受试者中，相比健康个体，具有 CD40L/CD40 介导的信号通路的异常激活和/或过多抗自身抗体的产生与沉积; 和/或所述受试者的细胞（例如活化的 T 细胞或其他类型的免疫细胞或非免疫细胞，例如上皮细胞、单核细胞、树突状细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、内皮细胞及血小板）上具有增加的 CD40L 或 CD40 的表达，例如相比健康个体的相应细胞。

29. 权利要求 27 或 28 的方法，其中所述疾病或病症选自自身免疫性疾病、狼疮肾炎、免疫性血小板减少性紫癜(ITP)、移植排斥、克罗恩氏病、炎性肠病(IBD)、结肠炎、哮喘/变态

反应、动脉粥样硬化、重症肌无力、多发性硬化、银屑病、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、冠心病、1 型糖尿病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)和对重组药物产品例如血友病因子 VII 的免疫应答。