

抗 CD40 抗体及其用途

本发明涉及特异性结合 CD40 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, 以及药物、组合产品或试剂盒。此外, 本发明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。

背景技术

T 细胞的完全激活需要两个信号: 抗原呈递细胞(APC)对肿瘤抗原进行摄取、加工, 形成 MHC-抗原复合物, 呈递给 T 细胞并与 T 细胞表面的 TCR 结合, 这是 T 细胞活化的第一信号; 第二或共刺激信号则是通过 CD28 与 B7-1(CD80)/B7-2 (CD86), 以及共刺激因子 CD40、OX40、GITR 等与其配体相互作用来传递 (Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 2009. 27: p. 591-619)。在缺乏共刺激信号时, T 细胞可能发生无应答性(无反应力)或抗原刺激后的细胞程序性死亡(细胞凋亡)。

CD40 是 TNF 受体(TNFR)超家族的成员, 主要表达在 B 细胞、树突状细胞(DC 细胞)、单核细胞和巨噬细胞等多种抗原呈递细胞上 (Grewal, I.S. and R.A. Flavell, CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: p. 111-35)。CD40 在细胞表面形成三聚体, 相应配体 CD40L(即 CD154)主要表达于激活的 T 细胞表面。CD40 和 CD40L 的相互作用是 T 细胞活化的共刺激信号。根据特定的细胞类型, CD40 参与作用导致特定的基因表达模式。T 细胞上 CD40L 与 CD40 的结合可以激活多种通路, 包括 NF- κ B(核因子 κ B), MAPK(裂原活化蛋白激酶)和 STAT3(信号转导子和转录激活子 3)等 (Rothe, M., et al., TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*, 1995. 269(5229): p. 1424-7)。

CD40 不仅由正常的免疫细胞表达, 同时也由许多恶性细胞表达。具体而言, CD40 在以下疾病中过表达: B 系 NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、多毛细胞白血病(HCL)、霍奇金病、多发性骨髓瘤以及膀胱癌、肾癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、肺癌、鼻咽癌和恶性黑色素瘤等 (Hassan, S.B., et al., Anti-CD40-mediated cancer immunotherapy: an update of recent and ongoing clinical trials. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2014. 36(2): p. 96-104)。

CD40 激动剂抗体可以通过多种机制对抗肿瘤细胞: 第一, CD40 激动剂抗体通过激活免疫系统, 介导更强的抗肿瘤效应。具体而言, CD40 激动剂抗体可以激活 DC 细胞增加其抗原递呈能力, 这表现在共刺激分子, 如 B7 家族(CD80, CD86)的表达增加, 以及促进细胞因子分泌, 如白细胞介素 12, 这将导致显著的 T 细胞应答 (Fong, L. and E.G. Engleman, Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol*, 2000. 18: p. 245-73); CD40 激动剂抗体可以促进静息 B 细胞的增殖、免疫球蛋白类别转变、抗体分泌, 并且对生发中心的发展和记忆性 B 细胞的存活都有影响, 所有这一切都是体液免疫应答必不可少的 (Beatty, G.L., Y. Li, and K.B. Long, Cancer immunotherapy: activating innate and adaptive immunity through CD40 agonists. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2017. 17(2): p. 175-186)。第二, CD40 激动剂抗体与肿瘤细胞表面表达的 CD40 结合后, 介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)作用, 由杀伤细胞直接清除高表达 CD40 的肿瘤细胞 (Vonderheide, R.H. and M.J. Glennie, Agonistic CD40 antibodies and cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(5): p. 1035-43)。第三, CD40 激动剂抗体与肿瘤细胞表面表达的 CD40 结合后, 直接抑制肿瘤的生长并促进其凋亡, 例如 CD40/CD40L 信号通路可阻断

肿瘤细胞的细胞周期,使细胞停止于 G2-M 期,CD40 / CD40L 的相互反应还可促进肿瘤细胞表面 Fas 表达上升,通过 Fas/FasL 信号通路抑制高表达 CD40 肿瘤细胞生长并促进其凋亡 (Eliopoulos, A.G., et al., CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily. Mol Cell Biol, 2000. 20(15): p. 5503-15)。

CD40 的激动剂抗体按照其激动方式不同可分两类,第一类 CD40 激动活性不依赖 Fc 受体的交联(如 CP-870893 和 CDX-1140),尽管前者显示出令人鼓舞的抗癌疗效,但是存在剂量限制性毒性,会导致全身免疫功能的紊乱、静脉血栓性栓塞症和细胞因子释放综合征(Cytokine Release Syndrome, CRS)的发生;另一类需要 Fc 受体交联才具有 CD40 激动活性。肿瘤组织及周围引流淋巴结有更多肿瘤相关炎性细胞的存在, FcγR2b 受体在肿瘤细胞周围有更多聚集。因此,这样的“交联抗体”激动剂就具有了更高的组织选择性,在肿瘤微环境中抗体才能产生明显的激动作用,而在身体正常组织部位,作用能力会保持在低水平,这样就能提高治疗的安全窗。

因此,尽管在本领域中已存在一些 CD40 抗体,例如辉瑞制药的 CP870893,但是仍然需要一些新的具有与现有抗体相当或更佳性质的 CD40 抗体,特别是依赖于 Fc 受体交联的 CD40 抗体,尤其是具有更佳抗癌性质且安全性更高的抗体。

发明内容

本发明因此提供了一种新的结合 CD40 (特别是人 CD40 或恒河猴 CD40) 的抗体, 及其抗原结合片段。

在一些实施方案中, 本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH), 其中所述 VH 包含

(i) 如 SEQ ID NO:13、58、60、62 或 14 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 或

(ii) 相对于(i)的序列, 在所述三个 CDR 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, 或

(iii) 相对于 (i) 的序列, 在 HCDR3 上包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变 (优选地氨基酸置换, 优选地保守置换)。

在一些实施方案中, 本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区 (VL), 其中所述 VL 包含:

(i) 如 SEQ ID NO:15、64、66 或 16 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 (CDR) LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

(ii) 相对于(i)的序列, 在所述三个 CDR 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, 或

(iii) 相对于 (i) 的序列, 在 LCDR3 上包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变 (优选地氨基酸置换, 优选地保守置换)。

在一些实施方案中, 本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL, 其中

(a) 所述 VH 包含

(i) 如 SEQ ID NO: 13、58、60、62 或 14 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 或

(ii) 相对于(i)的序列, 在所述三个 CDR 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;

(iii) 相对于(i)的序列, 在 HCDR3 上包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选地氨基酸置换, 优选地保守置换); 和/或

(b)所述 VL 包含:

(i) 如 SEQ ID NO: 15、64、66 或 16 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 (CDR) LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

(ii) 相对于(i)的序列, 在所述三个 CDR 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; 或

(iii) 相对于(i)的序列, 在 LCDR3 上包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选地氨基酸置换, 优选地保守置换)。

在一些实施方案中, 本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL, 其中

(a) 所述 VH 包含

(i) 如 SEQ ID NO: 13、58、60 或 62 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域(CDR)HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 或

(ii) 相对于(i)的序列, 在所述三个 CDR 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;

(iii) 相对于(i)的序列, 在 HCDR3 上包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选地氨基酸置换, 优选地保守置换); 和/或

(b)所述 VL 包含:

(i) 如 SEQ ID NO: 15、64 或 66 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域(CDR)LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

(ii) 相对于(i)的序列, 在所述三个 CDR 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; 或

(iii) 相对于(i)的序列, 在 LCDR3 上包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选地氨基酸置换, 优选地保守置换)。

在一些实施方案中, 本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL, 其中

(a) 所述 VH 包含

(i) 如 SEQ ID NO: 14 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 或

(ii)相对于(i)的序列,在所述三个 CDR 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;

(iii) 相对于(i)的序列,在 HCDR3 上包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选地氨基酸置换,优选地保守置换);和/或

(b)所述 VL 包含:

(i) 如 SEQ ID NO: 16 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域(CDR)LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;或

(ii) 相对于(i)的序列,在所述三个 CDR 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;或

(iii) 相对于(i)的序列,在 LCDR3 上包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选地氨基酸置换,优选地保守置换)。

在优选的实施方案中,VH 包含选自 SEQ ID NO: 13、58、60、62 或 14 所示的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

在优选的实施方案中,VL 包含选自 SEQ ID NO: 15、64、66 或 16 所示的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

在优选的实施方案中,本发明抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含

如 SEQ ID NO: 13、58、60、62 或 14 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR,以及如 SEQ ID NO: 15、64、66 或 16 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR。

在优选的实施方案中,本发明抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含

如 SEQ ID NO: 13、58、60 或 62 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR,以及如 SEQ ID NO: 15、64 或 66 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR。

在优选的实施方案中,本发明抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含

如 SEQ ID NO: 14 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR,以及如 SEQ ID NO: 16 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR。

在优选的实施方案中,本发明抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含:

- (i) 如 SEQ ID NO: 13 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,以及如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;
- (ii) 如 SEQ ID NO: 58 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,以及如 SEQ ID NO: 64 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;
- (iii) 如 SEQ ID NO: 60 或 62 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,以及如 SEQ ID NO: 66 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

- (iv) 如 SEQ ID NO: 14 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 16 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;
- (v) (i) - (iv) 中任一项的 CDR 组合, 其中相比 HCDR3 和/或 LCDR3, 在所述序列上包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变 (优选地氨基酸置换, 优选地保守置换)。

在一些实施方案中, 本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和/或轻链可变区 (VL), 其中

(i) 所述 VH 包含互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 或 2 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 2 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; HCDR2 包含 SEQ ID NO:3 或 4 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成, 或者 HCDR2 包含与选自 SEQ ID NO:3 或 4 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; HCDR3 包含 SEQ ID NO:5、51、52、55 或 6 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: 5、51、52、55 或 6 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;

和/或

(ii) 其中所述 VL 包含互补决定区域 (CDR) LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO:7 或 8 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 8 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; LCDR2 包含 SEQ ID NO:9 或 10 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:9 或 10 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; LCDR3 包含选自 SEQ ID NO:11、53、54、56 或 12 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:11、53、54、56 或 12 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。

在优选的实施方案中, 本发明提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中

(a) 所述 VH 包含

(i) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:5; 或者

(ii) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:51; 或者

(iii) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:52; 或者

(iv) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:6; 或者

(v) (i)-(iv) 中任一项的 HCDR 组合, 其中在所述三个 CDR 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); 或者

(vi) (i)-(iv)中任一项的 HCDR 组合, 其中在所述 HCDR3 包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换);

和/或

(b) 所述 VL 包含

(i) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11;或者

(ii) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:53; 或者

(iii) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:54; 或者

(iv) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12;或者

(v) (i)-(iv)中任一项的 LCDR 组合, 其中在所述三个 CDR 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); 或者

(vi) (i)-(iv)中任一项的 LCDR 组合, 其中在所述 HCDR3 包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)。

在优选的实施方案中, 本发明提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中

(a) 所述 VH 包含

(i)包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:5; 或者

(ii) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:51; 或者

(iii) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:52; 或者

(iv) (i)-(iii)中任一项的 HCDR 组合, 其中在所述三个 CDR 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); 或者

(v) (i)-(iii)中任一项的 HCDR 组合, 其中在所述 HCDR3 包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换);

和/或

(b) 所述 VL 包含

(i) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11;或者

(ii) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:53; 或者

(iii) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:54; 或者

(iv) (i)-(iii)中任一项的 LCDR 组合, 其中在所述三个 CDR 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); 或者

(v) (i)-(iii)中任一项的 LCDR 组合, 其中在所述 LCDR3 包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)。

在优选的实施方案中, 本发明提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中

(a) 所述 VH 包含

(i)包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:6; 或者

(ii) (i)的 HCDR 组合, 其中在所述三个 CDR 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); 或者

(iii) (i)中的 HCDR 组合, 其中在所述 HCDR3 包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换);

和/或

(b) 所述 VL 包含

(i) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12;或者

(ii) (i)中 LCDR 组合, 其中在所述三个 CDR 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); 或者

(iii) (i)中的 LCDR 组合, 其中在所述 LCDR3 包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)。

在优选的实施方案中, 本发明提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 其包含

(i)包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:5, 以及包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11; 或者

(ii) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:51, 以及包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:53; 或者

(iii) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:52, 以及/或者包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:54; 或者

(iv) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:6, 以及包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12;

(v) (i)-(iv) 中任一项的 HCDR 和 LCDR 组合, 其中在所述三个 HCDR 区上和/或在所述三个 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); 或者

(vi) (i)-(iv) 中任一项的 HCDR 和 LCDR 组合, 其中在所述 HCDR3 和/或 LCDR3 中包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)。

在优选的实施方案中, 本发明提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中

(a) 所述 VH 包含

(i) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:55; 或

(ii) (i) 中的 HCDR 的组合, 其中在所述三个 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);

和/或

(b) 所述 VL 包含

(iii) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:56; 或

(iv) (i) 中的 LCDR 的组合, 其中在所述三个 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)。

在一些实施方案中, SEQ ID NO:55 所示的氨基酸序列如下:

A-R-E-R-V-G-A-X1-P-T-Y-Y-Y-X2-X3-DV, 其中 X1、X2 或 X3 可以为任何氨基酸, 优选地, 其中 X1 可以为 T、N、W、K、A 或 Y, 更优选的 T 或 N; 其中 X2 优选的为 W 或 Y; 其中 X3 可以为 W、Y、M、F、T, 更优选地为 M、W 或 Y。

在一些实施方案中, SEQ ID NO:56 所示的氨基酸序列如下:

M-X1-X2-L-X3-X4-P-Y-T, 其中 X1、X2、X3 和 X4 可以为任何氨基酸, 优选地, 其中 X1 可以为 Q、N 或 P, 更优选地为 Q 或 N; X2 可以为 G、Q、F、S、Y 或 M; 更优选的为 G 或 Q; X3 可以为 E、N、T、S 或 K; 更优选地为 E 或 N; X4 可以为 T、Q、V、L、P 或 E; 更优选地为 T、Q 或 V。

在优选的实施方案中, 本发明提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中所述 VH 包含互补决定区域 (CDR) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 并且所述 VL 包含 (CDR) LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中所述抗体或其抗原结合片段所包含的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的组合如下表 (表 A) 所示:

表 A: 本发明抗体或其抗原结合片段中 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2

和 LCDR3 的示例性组合

组合	HCDR1, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	HCDR2, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	HCDR3, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	LCDR1, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	LCDR2, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	LCDR3, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成
(1)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:11
(2)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:53
(3)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:54
(4)	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:56
(5)	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:12

在一些实施方案中, 本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL, 其中,

(a) 重链可变区 VH

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:13、58、60、62 或 14 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其组成; 或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 13、58、60、62 或 14 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 13、58、60、62 或 14 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, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中, 优选地, 所述氨基酸改变发生在 FR 区中;

和/或

(b) 轻链可变区 VL

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:15、64、66 或 16 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其组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 15、64、66 或 16 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 15、64、66 或 16 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, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中, 优选地, 所述

氨基酸改变发生在 FR 区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段的重链可变区 VH

(i)包含与选自 SEQ ID NO:13、58、60 或 62 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其组成;或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 13、58、60 或 62 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii)包含与选自 SEQ ID NO: 13、58、60 或 62 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中，优选地，所述氨基酸改变发生在 FR 区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区 VL

(i)包含与选自 SEQ ID NO:15、64 或 66 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其组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 15、64 或 66 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 15、64 或 66 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中，优选地，所述氨基酸改变发生在 FR 区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段的重链可变区 VH

(i)包含与选自 SEQ ID NO:14 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其组成;或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii)包含与选自 SEQ ID NO: 14 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中，优选地，所述氨基酸改变发生在 FR 区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段的轻链可变区 VL

(i)包含与选自 SEQ ID NO:16 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其组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 16 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中，优选地，所述氨基酸改变发生在 FR 区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL，其中，

- (i) 重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列或由其组成, 和轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列或由其组成;
- (ii) 重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列或由其组成, 和轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO: 64 的氨基酸序列或由其组成;
- (iii) 重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列或由其组成, 和轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列或由其组成;
- (iv) 重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列或由其组成, 和轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列或由其组成;
- (v) 重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列或由其组成, 和轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中, 本发明的抗体的重链可变区的氨基酸序列与上文所述的 (i) - (v) 中重链可变区的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性, 或者其氨基酸序列相比上文所述的 (i) - (v) 中重链可变区的氨基酸序列, 包含 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, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中, 优选地, 所述氨基酸改变发生在 FR 区中。

在一些实施方案中, 本发明的抗体的轻链可变区的氨基酸序列与上文所述的 (i) - (v) 中轻链可变区的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性, 或者其氨基酸序列相比上文所述的 (i) - (v) 中轻链可变区的氨基酸序列, 包含 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, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中, 优选地, 所述氨基酸改变发生在 FR 区中。

在优选的实施方案中, 本发明提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL), 其中所述抗体或其抗原结合片段所包含的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 的组合如下表 (表 B) 所示:

表 B: 本发明抗体或其抗原结合片段中重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 的示例性组合

组合	VH, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	VL, 其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成
(1)	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:15
(2)	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:64
(3)	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:66
(4)	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:66
(5)	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:16

在一些实施方案中, 本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含重链和/或轻链, 其中

(a) 重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:17、18、19、67、69、70 或 20 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其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 17、18、19、67、69、70 或 20 的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 17、18、19、67、69、70 或 20 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在重链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在重链可变区中，最优选地，所述氨基酸改变发生在重链恒定区中；

和/或

(b) 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:21、68、71 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其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:21、68、71 或 22 的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:21、68、71 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链可变区中，最优选的，所述重链氨基酸改变发生在轻链恒定区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含的重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:17、18、19、67、69 或 70 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其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 17、18、19、67、69 或 70 的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 17、18、19、67、69 或 70 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在重链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在重链可变区中，最优选的，所述重链氨基酸改变发生在重链恒定区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含的轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:21、68 或 71 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其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:21、68 或 71 的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO:21、68 或 71 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链可变区中，最优选的，所述重链氨基酸改变发生在轻

链恒定区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含的重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:20 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其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 20 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在重链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在重链可变区中，最优选的，所述重链氨基酸改变发生在重链恒定区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含的轻链

(i) 包含与选自 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其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: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，优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链可变区中，最优选的，所述重链氨基酸改变发生在轻链恒定区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段包含重链和/或轻链，其中，

(i) 重链包含 SEQ ID NO: 17、18、19、67、69 或 70 的氨基酸序列或由其组成，和轻链包含 SEQ ID NO:21、68 或 71 的氨基酸序列或由其组成，

(ii) 重链包含 SEQ ID NO: 17、18 或 19 的氨基酸序列或由其组成，和轻链包含 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列或由其组成；

(iii) 重链包含 SEQ ID NO: 67 的氨基酸序列或由其组成，和轻链包含 SEQ ID NO: 68 的氨基酸序列或由其组成；

(iv) 重链包含 SEQ ID NO: 69 或 70 的氨基酸序列或由其组成，和轻链包含 SEQ ID NO: 71 的氨基酸序列或由其组成；

(v) 重链包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列或由其组成，和轻链包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明抗体的重链的氨基酸序列与上述 (i) - (v) 中的重链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，或其氨基酸序列与上述 (i) -(v) 中的重链氨基酸序列相比，包含 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在重链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在重链可变区中，最优选的，所述氨基酸改变发生在重链的恒定区中。

在一些实施方案中，本发明抗体的轻链的氨基酸序列与上述 (i) - (v) 中的重链的氨基

酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性，或其氨基酸序列与上述 (i) -(v)中的轻链氨基酸序列相比，包含 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链可变区中，最优选的，所述氨基酸改变发生在轻链的恒定区中。

在优选的实施方案中，本发明提供抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中所述抗体或其抗原结合片段所包含的重链和轻链的组合如下表（表 C）所示：

表 C：本发明抗体或其抗原结合片段中重链和轻链的示例性组合

组合	重链，其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成	轻链，其包含下述 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列或由其组成
(1)	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:21
(2)	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:21
(3)	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:21
(4)	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:68
(5)	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:71
(6)	SEQ ID NO:70	SEQ ID NO:71
(4)	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:22

在一些实施方案中，本发明抗 CD40 抗体或其片段的重链和/或轻链还包含信号肽序列，例如所述信号肽序列包含 SEQ ID NO:43 所示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。

在一些实施方案中，改变发生在抗体的重链和/或轻链的 CDR 区（尤其是 CDR3 区）中。在一些实施方案中，在 CDR 区，例如 CDR3 区中可以存在 1、2 或 3 个改变。

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）。在某些实施方案中，改变发生在抗体的 FR 区，例如抗体重链和/或轻链可变区的 FR 区，例如 FR1、FR2、FR2 或 F4 区。在一些实施方案中，改变发生在 FR2 区。在一些实施方案中，FR 区可以存在 1、2 或 3 个改变。

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，例如在重链和/或轻链的恒定区中。

在一些实施方案中，置换为保守性置换。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。示例性的置换如下表 D 所示：

表 D

原始残基	示例性置换	优选的保守氨基酸置换
Ala (A)	Val、Leu、Ile	Val
Arg (R)	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn (N)	Gln、His、Asp、Lys、Arg	Gln
Asp (D)	Glu、Asn	Glu
Cys (C)	Ser、Ala	Ser
Gln (Q)	Asn、Glu	Asn
Glu (E)	Asp、Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile (I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe、正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe	Ile
Lys (K)	Arg、Gln、Asn	Arg
Met (M)	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe (F)	Trp、Leu、Val、Ile、Ala、Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val、Ser	Ser
Trp (W)	Tyr、Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val (V)	Ile、Leu、Met、Phe、Ala、正亮氨酸	Leu

在某些实施方案中，置换发生在抗体的 CDR 区。通常，获得的变体相对于亲本抗体在某些生物学特性方面(例如，增加的亲和力)具有修饰(例如，改善)和/或将具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟抗体。在一些实施方案中，置换发生在抗体的重链和/或轻链的 CDR3 区中。在一些实施方案中，在 CDR3 区中可以存在 1、2 或 3 个置换。

在某些实施方案中，置换发生在抗体的 FR 区，例如抗体重链和/或轻链可变区的 FR 区，例如 FR1、FR2、FR2 或 F4 区。在一些实施方案中，置换发生在 FR2 区。在一些实施方案中，FR 区可以存在 1、2 或 3 个置换。

在某些实施方案中，本发明提供包含本文公开的可变区序列或具有本文公开的 CDR 的可变区序列，以及具有经修饰的 Fc 区的恒定结构域的抗体，所述经修饰的 Fc 区相比于其对其他 Fc 受体（即活化受体）的亲和力，具有对 Fc γ RIIb 增强的亲和力。预期具有增强的 Fc γ RIIb 特异性的此类激动性抗 CD40 抗体在癌症治疗和慢性感染中展示出优秀的效力(Li 和 Ravetch (2011) *Science* 333:1030; White 等人(2011) *J. Immunol.*187:1754)。旨在不受理论束缚，

此类 Fc γ RIIB 特异性激动性抗 CD40 抗体可以通过增加促进细胞毒性 CD8⁺ T 细胞的增殖和活化的树突细胞的成熟、导致抗肿瘤应答增强来展示出增强的辅助作用。旨在不受理论束缚，由于本发明的交联导致的 FcR 介导的激动剂 CD40 抗体的信号增强可以是治疗效力的主要促进因素。通过抗体的 Fc 部分的经 FcR 接合的 CD40 激动剂抗体的交联可以增加信号强度并由此增强细胞活化。

能够产生对 Fc γ RIIB 增强的亲和力的 Fc 序列中的突变是本领域已知的，例如描述于 Yu 等人 (2013) *J. Am. Chem. Soc.* 135:9723 和 WO 2014/184545，Chu 等人 (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926，和 Mimoto 等人 (2013) *Protein Engineering Design & Selection* 26:589。关于 Fc 区中突变的位置（编号）的命名法根据 EU 索引，如在 Kabat 等人 (1981) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.)，其便于比较具有不同可变结构域长度的抗体中相同位置处的 Fc 序列。

示例性的 Fc 序列中的突变包括例如 E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, S267E 和/或 L328F。在一个优选的实施方案中，本发明的抗体包含增强 Fc γ RIIB 特异性的突变的人 IgG1 恒定结构域，所述突变包括 E233D, G237D, H268D, P271G 和 A330R，或者 S267E 和 L328F。示例性的包含增强 Fc γ RIIB 特异性的突变的人 IgG1 恒定结构域的抗体重链的序列参见例如 SEQ ID NO:18 或 19。

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，例如除去岩藻糖模块以提高抗体依赖性细胞性细胞毒性 (ADCC) 功能(参见 Shield 等(2002) *JBC* 277:26733)。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。可以如，例如美国专利号 7,521,541 中所述地生成半胱氨酸改造的抗体。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段显示与本发明抗体对 CD40 相同或相似的结合亲和力和/或特异性；和/或抑制(例如，竞争性抑制) 本发明抗体与 CD40 的结合和/或与本发明抗体结合相同或重叠的表位；和/或与本发明抗体竞争结合 CD40；和/或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 CD40 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。

在一些实施方案中，抗 CD40 抗体是单克隆抗体。

在一些实施方案中，抗 CD40 抗体是人源化的。用于使抗体人源化的不同方法是技术人员已知的，如由 Almagro&Fransson 综述的，其内容通过提述完整并入本文(Almagro JC 和 Fransson J(2008)Frontiers in Bioscience 13:1619-1633)。

在一些实施方案中，抗 CD40 抗体是人抗体。可使用本领域中已知的各种技术来制备人抗体。人抗体一般描述于 van Dijk 和 van de Winkel, Curr.Opin.Pharmacol 5 : 368-74(2001) 以及 Lonberg, Curr.Opin.Immunol 20 : 450-459(2008)。

在一些实施方案中，抗 CD40 抗体是嵌合抗体。

在一个实施方案中，本发明的抗 CD40 抗体还涵盖其抗体片段，优选地选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)或(Fab')₂、单结构域抗体、diabody(dAb)或线性抗体。

在某些实施方案中，抗 CD40 抗体分子处于双特异性或多特异性抗体分子形式。在一个实施方案中，双特异性抗体分子具有针对 CD40 的第一结合特异性和针对 PD-1 或 PD-L1 或 PD-L2 或 OX40 或 4-1BB 或 GITR 等的第二结合特异性。在一个实施方案中，双特异性抗体分子与 CD40 和 TNF 或 IL-17 结合。多特异性抗体分子可以具有任何针对前述分子的结合特异性的组合。

在一些实施方案中，本发明的抗体具有一个或多个如下的特性：

(1) 选择性结合 CD40，其结合能力高于与其他 TNFR 家族蛋白的结合，或其不与其他 TNFR 家族的蛋白相结合；在一些实施方案中，该结合利用 ELISA 检测。

(2) 阻断 CD40 与 CD40 配体 (CD40L) 的结合。

(3) 以交联形式或组成型形式，优选地以交联形式激活表达 CD40 的细胞，例如激活 NFkappa-B 信号通路；在一些实施方案中，用流式细胞术进行检测；在一些实施方案中，使用的报告细胞为表达 NF-κB-GFP 和 hCD40 的细胞；

(4) 与 CD40，例如人 CD40 结合，其平衡解离常数小于或等于大约 5×10^{-7} M、 4.5×10^{-7} M、 4.4×10^{-7} M、 4.3×10^{-7} M、 4.2×10^{-7} M、 4.1×10^{-7} M、 4×10^{-7} M、 3.9×10^{-7} M、 3.8×10^{-7} M、 3.7×10^{-7} M、 3.6×10^{-7} M、 3.5×10^{-7} M、或 3.4×10^{-7} M；在一些实施方案中，所述测量为表面等离子共振技术。

(5) 特异性地与表达 CD40 (例如人 CD40 或恒河猴 CD40) 的细胞上的 CD40 结合；；在一些实施方案中，与 CD40 (例如人 CD40 和/或恒河猴 CD40) 结合的 EC50 小于或等于大约 50nM、40nM、30nM、20nM、15nM、14nM、13nM、12nM、10nM、9nM、8nM。在一些实施方案中，结合采用流式细胞术检测；在一些实施方案中，表达 CD40 的细胞是 293 细胞，例如 293FT 细胞。

(6) 诱导肿瘤细胞凋亡。在一些实施方案中，EC50 小于或等于大约 4nM、3.5nM、3nM、2.9nM、2.8nM、2.7nM、或 2.6nM；在一些实施方案中，使用流式细胞术进行测量。在一些实施方案中，肿瘤细胞是 Raji 细胞或 Ramos 细胞。

(7) 具有激动剂活性，例如显著激活 (例如人) B 细胞或 T 细胞或树突细胞。

(8) 促进 (例如人) B 细胞或 T 细胞的增殖。

(9) 增强免疫应答。

(10) 抑制肿瘤生长, 优选地同时维持个体体重。

在一些实施方案中, CD40 抗体在交联的情况下具有上述一个或多个特性。

在一些实施方案中, 本发明还涵盖与其他物质缀合的抗体(“免疫缀合物”)。

在一些实施方案中, 其它物质例如治疗剂或标记, 如细胞毒性剂或免疫抑制剂或化疗剂。细胞毒性剂包括任何对细胞有害的药剂。适合于形成免疫缀合物的细胞毒性剂(例如化疗剂)或其他物质的例子是本领域中已知的, 参见例如 WO2017/004006 或 WO2017/059243 等。

在一些实施方案中, 标记例如标记序列, 例如肽。在优选的实施方案中, 标记氨基酸序列是六组氨酸肽, 如 pQE 载体(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)等中提供的标签, 它们中的许多是可商业获得的。如 Gentz 等人, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 中所述, 例如, 六组氨酸提供融合蛋白的便利纯化。用于纯化的其他肽标签包括但不限于血凝素(“HA”)标签, 其对应于源自流感血凝素蛋白的表位(Wilson 等人, 1984, Cell 37:767)和“flag”标签。

在其他实施方案中, 所示标记可以是诊断剂或可检测剂。所获得的抗体缀合物可以作为临床检验方法的部分(如确定特定疗法的效力), 用于监测或预测疾病或病症的发作、形成、进展和/或严重性。可检测剂或诊断剂包括但不限于多种酶, 例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶; 辅基, 例如链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素; 荧光物质, 如但不限于伞形酮、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, 如但不限于鲁米诺; 生物发光物质, 如但不限于萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白; 放射性物质, 如但不限于碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 和 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 和 ^{111}In)、铪(^{99}Tc)、钽(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 和 ^{117}Tm ; 和用于各种正电子发射成像术中的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

在一些实施方案中, 所述治疗性剂包括化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂。

另外, 本发明的抗体分子可以缀合至治疗性部分(治疗剂)如放射性金属离子, 如 α -发射体如 ^{213}Bi 或可用于使放射金属离子(包括但不限于 ^{131}In 、 ^{131}Lu 、 ^{131}Y 、 ^{131}Ho 、 ^{131}Sm)缀合至多肽的大环螯合剂。在某些实施方案中, 大环螯合剂是 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA), 其可通过接头分子附着到抗体上。这类接头分子是本领域公知的并且在 Denardo 等人, 1998, Clin Cancer Res. 4(10):2483-90 中描述, 所述文献每篇通过引用的方式完整并入。

用于治疗性部分与抗体缀合的技术是熟知的, 参见, 例如 Arnon 等人, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, 引自 Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld 等人(编著), 第 243-256 页(Alan R. Liss, Inc. 1985)。

在一些实施方案中, 本发明提供了编码本文所述任何抗体或其片段或其任一条链的核酸。在一个实施方案中, 提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中, 载体是表达载体, 例如 pFuse 载体。在一个实施方案中, 提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。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 细胞或 293 细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。在另一个实施方案中，宿主细胞是原核的。

例如，本发明的核酸包含：

编码选自 SEQ ID NO:13-22 中任一项所示氨基酸序列的核酸，或编码与选自 SEQ ID NO:13-22 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；或者

选自 SEQ ID NO:39-42 所示的核酸，或与选自 SEQ ID NO:39-42 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。

本发明还涵盖与下述核酸在严格性条件下杂交的核酸或与下述核酸具有一个或多个置换(例如保守性置换)、缺失或插入的核酸：包含编码选自 SEQ ID NO:1-9 中任一项所示氨基酸序列的核酸序列的核酸；或包含编码与选自 SEQ ID NO:13-22 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序列的核酸；或包含选自 SEQ ID NO:39-42 所示的核酸序列的核酸，或包含与选自 SEQ ID NO:39-42 所示的核酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的核酸序列的核酸。

在一个实施方案中，提供包含所述核酸的一个或多个载体。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)。例如 pFUSE 载体。一旦已经制备了用于表达的表达载体或 DNA 序列，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、基于脂质的转染或其他常规技术。在原生质体融合的情况下，将细胞在培养基中培育并且筛选适宜的活性。用于培养所产生的转染细胞和用于回收产生的抗体分子的方法和条件是本领域技术人员已知的并且可以基于本说明书和现有技术已知的方法，根据使用的特定表达载体和哺乳动物宿主细胞变动或优化。另外，可以通过引入允许选择已转染的宿主细胞的一个或多个标记物，选出已经稳定将 DNA 掺入至其染色体中的细胞。标记物可以例如向营养缺陷型宿主提供原养型、杀生物抗性(例如，抗生素)或重金属(如铜)抗性等。可选择标记基因可以与待表达的 DNA 序列直接连接或通过共转化引入相同的细胞中。也可能需要额外元件以便最佳合成 mRNA。这些元件可以包括剪接信号，以及转录启动子、增强子和终止信号。

在一个实施方案中，提供了包含一种或多种本发明多核苷酸的宿主细胞。在一些实施方案中，提供了包含本发明表达载体的宿主细胞。在一些实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物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(优选地抗原结合片段)。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(优选地抗原结合片段)。

在一个实施方案中，提供了制备本发明抗体分子的方法，其中所述方法包括，在适合抗体表达的条件下，培养包含编码所述抗体(例如任意一条多肽链和/或多条多肽链)的核酸

或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞,如上文所提供的,和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

为了重组产生本发明抗体分子,分离编码抗体(例如上文所描述的抗体,例如任意一条多肽链和/或多条多肽链)的核酸,并将其插入一个或多个载体,用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序(例如通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针进行)。

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大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。

在一些实施方案中,本发明还提供了对本发明的抗体分子进行鉴定、筛选或表征其物理/化学性质和/或生物学活性的方法。

一方面,对本发明的抗体测试其抗原结合活性,例如通过已知的方法诸如 ELISA, Western 印迹,等来进行。可使用本领域已知方法来测定对 CD40 的结合,本文中公开了示例性方法。在一些实施方案中,使用表面等离子共振测定法(例如亲和测量)或 ELISA 测定法。

本发明还提供了用于鉴定具有生物学活性的抗 CD40 抗体的测定法。生物学活性可以包括例如结合 CD40(例如结合人和/或恒河猴 CD40),提高 CD40 介导的信号转导(例如提高 NF-kappa-B 信号通路),通过直接诱导肿瘤细胞凋亡消减表达 CD40 的细胞(例如 Raji 或 Ramos 细胞),激活树突细胞或 B 细胞或 T 细胞(例如通过提高 T 细胞的细胞因子生成)、促进 T 细胞(例如 CD8+T 细胞,例如激活的 CD8+T 细胞)或 B 细胞增殖或抑制肿瘤生长。

在某些实施方案中,对本发明的抗体测试此类生物学活性。

可以使用本领域已知的方法来测定 T 细胞((例如 CD8+T 细胞))或树突细胞或 B 细胞的激活。例如,通过细胞活化标志物 CD8(T 细胞)或 CD86(树突细胞或 B 细胞)的水平(例如表达)。还可以使用本领域公知的方法来测定 CD40 信号传导(例如 NF-kB 信号通路),从而测定 T 细胞的激活。在一个实施方案中,生成表达人 CD40 和报告基因(包含融合至报告基因(例如 β 荧光素酶, GFP)的 NF-kappa B 启动子)的转基因细胞。对细胞添加抗 CD40 抗体导致 NF-kappa B 转录升高,这使用针对报告基因的测定法(例如荧光素酶报告基因测定法)来检测。

可以使用本领域已知的方法来测定抗体的 ADCC 效应。例如通过检测其对肿瘤细胞凋亡的诱导(例如通过细胞凋亡标志分子,例如 CD95)、对肿瘤细胞生长的抑制或对体内肿瘤生长的抑制。

可以使用本领域已知的方法来测定 T 细胞(例如 CD8+T 细胞,例如活化的 CD8+T 细胞)或 B 细胞的增殖。例如通过发光法,例如 CellTiter-Glo 发光法,来测定 B 细胞的增殖。还例如,通过 OVA 特异性的 OT-I 细胞法,检测 CD8+T 细胞的增殖。

供任何上述体外测定法使用的细胞包括天然表达 CD40 或经改造而表达 CD40 细胞系。此类细胞包括天然表达 CD40L 的 T 细胞((例如 CD8+T 细胞,例如活化的 CD8+T 细胞)),天然表达 CD40 的 B 细胞或树突细胞。此类细胞还包括表达 CD40 和并非正常情况下表达 CD40 的编码 CD40 DNA 转染的细胞系。

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 CD40 抗体来进行任何上述测定法。

可以理解的是，能够使用抗 CD40 抗体和别的活性剂来进行任何上述测定法。

在一些实施方案中，本发明提供了包含本发明抗体的药物组合物和组合产品。

在一些实施方案中，本发明提供包含本文所述的任何抗体分子或其片段（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。

本发明还包括包含本发明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）和/或包含编码本发明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本发明抗体或其片段或一种或多种编码一种或多种本发明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。适用于本发明的药用载体可以是无菌液体，如水和油，包括那些石油、动物、植物或合成来源的，如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用药物组合物时，水是优选的载体。还可以将盐水溶液和水性右旋糖以及甘油溶液用作液体载体，特别是用于可注射溶液。

合适的赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石、氯化钠、干燥的脱脂乳、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。对于赋形剂的使用及其用途，亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，第五版，R.C.Rowe, P.J.Seskey 和 S.C.Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。

若期望的话，所述组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂。

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）、分散体剂或混悬剂、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。常见的优选组合物处于可注射用溶液剂或可输注溶液剂形式。优选的施用模式是肠胃外（例如，静脉内、皮下、腹腔（i.p.）、肌肉内）注射。在一个优选实施方案中，通过静脉内输注或注射施用抗体分子。在另一个优选实施方案中，通过肌肉内、腹腔或皮下注射施用抗体分子。

本发明的特异性结合人 CD40 的激动性抗体可冻干以便于储存，使用之前可在合适的载体中复原。此项技术已被证实对常规的蛋白制剂有效，并且可采用熟知的冻干和复原技术。

本发明的药物组合物或制剂还可以包含其他治疗剂，所述治疗剂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治疗剂。例如，化疗剂、细胞毒性剂、疫苗、其它抗体、抗感染活性剂、小分子药物或免疫调节剂等。

在一些实施方案中，本发明还提供了组合产品，其包含本发明的抗体或其抗原结合片段，或其免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂（例如化疗剂、其他抗体、细胞毒性剂、疫苗、抗感染活性剂、小分子药物或免疫调节剂等）。

在一些方案中，所述组合产品中的两种或多种成分可以依次、分开或同时联合施用给受试者。

在一些实施方案中，本发明还提供了包含本发明的抗体、药物组合物、免疫缀合物或组合产品的试剂盒，以及任选的指导施用的包装插页。

在一些实施方案中，本发明还提供了包含本发明的抗体、药物组合物、免疫缀合物、组合产品的药物制品，任选地，所述药物制品还包括指导施用的包装插页。

在一些实施方案中，所述其他治疗剂包括例如以下中的一种或多种：抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 TIGIT 抗体、抗 OX40（也称为 CD134、TNFRSF4、ACT35 和/或 TXGP1L）抗体、抗 LAG-3 抗体、抗 CD73 抗体、抗 CD137 抗体、抗 CD27 抗体、抗 CSF-1R 抗体、TLR 激动剂、或 IDO 或 TGF β 的小分子拮抗剂。可以与本发明的抗体组合的治疗剂的例子还参见 WO2017/059243 或 WO2017/004006。

在一些实施方案中，本发明还提供了增强受试者中的免疫应答（例如抗原特异性 T 细胞应答）的方法，其包括向受试者施用有效量的本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，使得所述个体中的免疫应答得到增强。在一些实施方案中，个体具有肿瘤。在另一实施方案中，主体具有病毒感染，例如慢性病毒感染。

在一些实施方案中，本发明提供了利用本发明的抗体在受试者中激活 T 细胞（例如 CD8+T 细胞）和/或树突细胞和/或 B 细胞的方法，其包括向受试者施用有效量的本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。本发明还提供了利用本发明的方法促进 T 细胞（例如激活的 CD8+T 细胞）或 B 细胞增殖的方法，其包括向受试者施用有效量的本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段。因此，在一些实施方案中，考虑到本文所述的抗 CD40 抗体增强 T 细胞应答例如抗原特异性 T 细胞应答的共刺激的能力，本文提供使用本文所述的抗体刺激、增强或上调抗原特异性 T 细胞应答例如抗肿瘤 T 细胞应答的体外和体内方法。CD4+ 和 CD8+ T 细胞应答可以使用抗 CD40 抗体增强。T 细胞可以是 T_{eff} 细胞，例如 CD4+ T_{eff} 细胞、CD8+ T_{eff} 细胞、T 辅助(T_H)细胞和 T 毒性(T_C)细胞。

在一些实施方案中，本发明提供了使用本发明的抗体分子用来治疗或预防需要在受试者中调节（例如增强）免疫应答的疾病，例如肿瘤或感染，例如慢性感染。因此，本发明还提供抑制受试者中的肿瘤生长的方法，其包括向主体施用本发明的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段，使得肿瘤生长得到抑制。

在一些实施方案中，所述疾病是 CD40 相关疾病，例如所述疾病是 CD40 表达或活性降低的疾病（例如与健康对照相比），或者所述疾病是 CD40 基因和/或蛋白质水平降低的疾病（例如与健康对照相比）；或所述疾病受益于激活 CD40 活性，例如激活 CD40 信号通路，和/或激活 T 细胞或 B 细胞或树突细胞。在一些实施方案中，本发明涉及在个体中激活抗原活性或激活抗原介导的信号通路的方法，该方法包括向对象施用有效量的本文公开的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，激活 CD40 活性或激活 CD40 介导的信号通路是指激活 CD40 信号通路。

在一些实施方案中，本发明的所述抗体或其抗原结合片段能够引起抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)，进而杀伤肿瘤细胞。因此，本发明还涉及治疗肿瘤的方法，其包括向个体中施用有效量的本发明的抗体或其抗原结合片段。

在另一方面中，本发明涉及预防或治疗受试者的肿瘤（例如癌症）的方法，所述方法包

括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗体分子或药物组合物或免疫缀合物或组合产品或试剂盒。在一些实施方案中,所述肿瘤是癌症。肿瘤可以是实体瘤或液体瘤,例如恶性血液肿瘤。在某些实施方案中,肿瘤是免疫原性肿瘤。在某些实施方案中,肿瘤是非免疫原性的。在某些实施方案中,肿瘤是 PD-L1 阳性的。在某些实施方案中,肿瘤是 PD-L1 阴性的。

在一些实施方案中,用抗体分子治疗和/或预防的肿瘤包括但不限于实体瘤、血液学瘤(例如,白血病、淋巴瘤、骨髓瘤,例如,多发性骨髓瘤)及转移性病灶。在一个实施方案中,癌是实体瘤。实体瘤的例子包括恶性肿瘤,例如,多个器官系统的肉瘤和癌,如侵袭肺、乳房、卵巢、淋巴样、胃肠道的(例如,结肠)、肛门、生殖器和生殖泌尿道(例如,肾、膀胱上皮、膀胱细胞、前列腺)、咽、CNS(例如,脑、神经的或神经胶质细胞)、头和颈、皮肤(例如,黑素瘤)、鼻咽(例如,分化或未分化的转移性或局部复发性鼻咽癌)和胰的那些癌、以及腺癌,包括恶性肿瘤,如结肠癌、直肠癌、肾细胞癌、肝癌、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。

在一些实施方案中,癌症选自结直肠癌(例如, CRC)、黑素瘤,例如,晚期黑素瘤(例如, II-IV 期黑素瘤)或 HLA-A2 阳性-黑素瘤;胰腺癌,例如,晚期胰腺癌;乳腺癌,例如,转移性乳腺癌或三阴性乳腺癌;头颈癌(例如, HNSCC);食管癌;肾细胞癌(RCC),例如,肾透明细胞癌(ccRCC)或转移性肾细胞癌(MRCC);肺癌(例如, NSCLC);宫颈癌;膀胱癌;或血液学恶性病,例如,白血病(例如,淋巴细胞白血病)或淋巴瘤(例如,霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)或 CLL,例如,复发性或顽固性慢性淋巴细胞白血病)。

在一些实施方案中,癌症的例子进一步包括但不限于 B 细胞增殖性病症,其进一步包括但不限于淋巴瘤(例如 B 细胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL))和淋巴细胞性白血病。

在一些实施方案中,所述肿瘤是需要激活 T 细胞或 B 细胞或树突细胞的肿瘤,例如癌症,例如具有 T 细胞功能障碍的肿瘤或癌症。在一些实施方案中,所述肿瘤是 OX40 的表达或活性被降低的肿瘤。在一些实施方案中,所述肿瘤是受益于 OX40 信号通路激活的肿瘤,例如癌症。

在一些实施方案中,本文所述的癌症是淋巴瘤、结肠癌、结直肠癌、直肠癌、肺癌(例如非小细胞肺癌)、肝癌、胃癌及其转移性癌症。

在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段不适用于治疗具有 CD40 表达的血液癌症,其可能被用 CD40 激动剂治疗而恶化。某些癌症可能已知表达 CD40 并且因此经历此类恶化,因此可以在类别上被排除。在具体的实施方案中,测试特异性肿瘤样品的 CD40 表达并且基于测试结果从用本发明的 CD40 抗体的疗法中排除。

本文公开的方法和组合物可用于治疗与前述癌症相关的转移性病灶。

本发明的特异性结合人 CD40 的抗体或其抗原结合片段也可预防性地施用,以降低罹患癌症的风险、延迟癌症进展中事件的发作和/或在癌症缓解后降低复发的风险。这对于肿瘤难以定位而由于其它生物因素已知患有肿瘤的患者可能尤其有用。

在另一方面中,本发明涉及预防或治疗受试者的感染性疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗体分子或药物组合物或免疫缀合物或组合产品或试剂盒。在一个实施方案中,感染性疾病是慢性感染。在一些实施方案中,所述感染是病毒感染。

在一些实施方案中,所述感染是急性的或慢性的。在一些实施方案中,所述慢性感染是

持续性的感染、潜伏的感染或缓慢感染。在一些实施方案中，所述慢性感染是由选自细菌、病毒、真菌和原生动物的病原体导致的。

在一些实施方案中，病毒的一些实例包括 HIV、肝炎（甲肝、乙肝和丙肝）、疱疹病毒（例如 VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II 和 CMV、EB 病毒）、腺病毒、流感病毒、黄病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、牛痘病毒、HTLV 病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC 病毒和虫媒脑炎病毒；细菌的一些实例包括衣原体、立克次体、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎球菌、脑膜炎球菌和淋球菌、克雷伯氏菌、变形杆菌、沙雷菌、假单胞菌、军团菌、白喉、沙门氏菌、芽孢杆菌、霍乱、破伤风、肉毒中毒、炭疽、鼠疫、钩端螺旋体病和莱姆病病菌；真菌的一些实例包括假丝酵母（白色念珠菌、克柔假丝酵母、光滑假丝酵母、热带假丝酵母等）、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、曲霉（烟曲霉、黑曲霉等）、属毛霉目（毛霉属、犁头霉属、根霉属）、申克氏胞丝菌(*Sporothrix schenckii*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)和荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)；寄生虫的一些实例包括痢疾变形虫(*Entamoeba histolytica*)、结肠小袋纤毛虫(*Balantidium coli*)、福氏耐格里变形虫(*Naegleria fowleri*)、棘阿米巴属种(*Acanthamoeba* sp.)、蓝氏贾第虫(*Giardia lamblia*)、隐孢子虫属种(*Cryptosporidium* sp.)、卡氏肺孢子虫(*Pneumocystis carinii*)、间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)、微小巴贝虫(*Babesia microti*)、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)、杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、巴西日圆线虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)。

在一些实施方案中，用抗体分子治疗和/或预防的感染性疾病包括目前不存在有效疫苗的病原体或常规疫苗对其未及完全有效的病原体。这些包括但不限于 HIV、(甲型、乙型和丙型)肝炎、流感、疱疹、贾第鞭毛虫(*Giardia*)、疟疾、利什曼原虫(*Leishmania*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

可以用本发明公开的方法和组合物治疗的疾病还参见 WO2017/059243 或 WO2017/004006。

在一些实施方案中，本发明的抗体或药物组合物或免疫缀合物或组合产品或试剂盒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，用于本文所述的预防和/或治疗。

在一些实施方案中，治疗方式包括外科手术(例如肿瘤切除术)；放射疗法(例如，外粒子束疗法，它涉及其中设计照射区域的三维适形放射疗法)、局部照射(例如，指向预选靶或器官的照射)或聚焦照射等。聚焦照射可以选自立体定位放射手术、分割立体定位放射手术和强度调节型放射疗法。聚焦照射可以具有选自粒子束(质子)、钴-60(光子)和直线加速器(X射线)的辐射源。放射疗法可以通过几种方法之一或方法组合施用，所述方法包括而限于外粒子束疗法、内部放射疗法，植入物照射、立体定位放射手术、全身放射疗法、放疗法和永久或短暂间质近距放射疗法。

在一些实施方案中，治疗剂选自化疗剂、细胞毒性剂、疫苗、其它抗体、抗感染活性剂或免疫调节剂(例如共刺激分子的激活剂或免疫检查点分子的抑制剂)。

示例性的其它抗体包括但不限于免疫检查点抑制剂(例如，抗 CTLA-4、抗 TIM-3、抗 CEACAM)；刺激免疫细胞的抗体(例如，激动性 GITR 抗体或 CD137 抗体)；抗癌抗体(例如，利妥昔单抗(Rituxan®或 MabThera®)、曲妥珠单抗(Herceptin®)、托西莫单抗(Bexxar®)、替伊

莫单抗(Zevalin®)、阿来组单抗(Campath®)、依帕珠单抗(Lymphocide®)、贝伐珠单抗(Avastin®)、厄洛替尼(Tarceva®)西妥昔单抗(Erbitux®),等等。例如,其他抗体可以是抗 PD-L1 抗体、抗 LAG-3 抗体、抗 PD-1 抗体或抗 CLA-4 抗体。

示例性的疫苗包括但不限于癌症疫苗。疫苗可以是基于 DNA 的疫苗、基于 RNA 的疫苗或基于病毒转导的疫苗。癌症疫苗可以是预防性的或治疗性的,诸如癌细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)、细胞和转染有编码免疫刺激细胞因子的基因的细胞(He 等人(2004) *J. Immunol.* 173:4919-28)。可以使用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑素瘤抗原的肽,诸如 gp100 的肽、MAGE 抗原、Trp-2、MART1 和/或酪氨酸酶、或经转染以表达细胞因子 GM-CSF 的肿瘤细胞。在一些实施方案中,癌症疫苗是肽癌症疫苗,其在一些实施方案中是个性化肽疫苗。在一些实施方案中,该肽癌症疫苗是多价长肽、多重肽、肽混合物、杂合肽,或经肽脉冲的树突细胞疫苗(参见例如 Yamada 等人, *Cancer Sci*, 104:14-21, 2013)。在本发明的任何方法的一些实施方案中,本发明的抗体或其片段的施用与肿瘤抗原的施用组合。抗原可以例如是肿瘤抗原、病毒抗原、细菌性抗原或来自病原体的抗原。在一些实施方案中,肿瘤抗原包含蛋白质。在一些实施方案中,肿瘤抗原包含核酸。在一些实施方案中,肿瘤抗原肿瘤细胞。

示例性的抗感染活性剂包括但不限于,抗病毒剂、抗真菌剂、抗原生动物剂、抗细菌剂,例如核苷类似物齐多夫定(AST)、更昔洛韦、膦甲酸或 cidovir 等。

免疫调节剂包括免疫检查点分子抑制剂和共刺激性分子激活剂。

在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是 CTLA-4、TIM-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CEACAM(例如,CEACAM-1 和/或 CEACAM-5)和/或 TGFR 的抑制剂。对分子的抑制可以在 DNA、RNA 或蛋白质水平进行。在一些实施方案中,抑制性核酸(例如,dsRNA、siRNA 或 shRNA)可以用来抑制免疫检查点分子的表达。在其他实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是与免疫检查点分子结合的多肽,例如,可溶性配体或抗体或抗体片段。

在一些实施方案中,免疫调节剂是共刺激分子的激活剂或激动剂。在一个实施方案中,共刺激分子的激动剂选自以下分子的激动剂(例如,激动性抗体或其抗原结合片段、或可溶性融合物): OX40、CD2、CD27、CD28、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKP80、CD160、B7-H3 或 CD83 配体。

在一些实施方案中,本发明的抗体或其片段可以与包含过继转移表达嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞(例如细胞毒性 T 细胞或 CTL)的治疗联合施用。

在一些实施方案中,本发明的抗体或其片段可以与抗肿瘤剂或溶瘤病毒联合施用。

在所有上述方法中,CD40 激动作用可以与其他形式的免疫疗法诸如细胞因子治疗(例如干扰素、GM-CSF、G-CSF、IL-2)或双特异性抗体疗法组合,其提供增强的肿瘤抗原呈递。参见例如 Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123。

在一些实施方案中,本发明的抗体或其片段可以与增强宿主免疫功能的常规方法组合,所述常规方法包括但不限于:(i)APC 增强,诸如(a)向肿瘤注射编码异源 MHC 同种异体抗原的 DNA,或(b)用增加免疫抗原识别可能性的基因(例如免疫刺激细胞因子、GM-CSF、共刺激分子 B7.1、B7.2)转染活化的肿瘤细胞,(iii)过继性细胞免疫疗法,或用活化的肿瘤特异

性 T 细胞治疗。过继性细胞免疫疗法包括分离肿瘤浸润的宿主 T 淋巴细胞, 诸如通过 IL-2 或肿瘤或两者刺激体外扩增该群体; 此外, 功能障碍的分离的 T 细胞也可通过体外应用本发明的抗体来活化, 如此活化的 T 细胞可然后重新施用给宿主。

上文所述的各种组合疗法可以进一步组合以用于治疗。

更多的本发明抗体与其他治疗方式或治疗剂的组合的例子可以参见 WO2017/059243 或 WO2017/004006 等。

此类组合疗法涵盖组合施用(其中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, 可以在施用别的疗法, 例如治疗方式和/或治疗剂之前, 同时, 和/或之后发生本发明的抗体的施用。抗体分子和/或其他疗法, 例如治疗剂或治疗方式可以在活动性疾病期间或在缓解或活动度更小的疾病期间施用。抗体分子可以在其他治疗前、与其他治疗同时、治疗后或在疾病缓解期间施用。

可以理解的是, 能够使用本发明的免疫缀合物或组合物或组合产品或试剂盒替换或补充本发明的抗体来进行任何治疗。

本发明的抗体(以及包含其的药物组合物或免疫缀合物, 以及任何另外的治疗剂)的施用模式可为任何合适的途径, 诸如胃肠外施用, 例如真皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内或皮下、粘膜(口腔、鼻内、阴道内、直肠)或如本领域所熟知的技术人员了解的其它方式。特异性结合 CD40 的激动性抗体可使用已知的方法瘤内施用到淋巴结引流部位以局部递送到肿瘤中。本发明的特异性结合人 CD40 的激动性抗体可通过任何合适的途径, 例如经肠胃外通过静脉(i.v.)输注或弹丸式注射、肌内或皮下或腹膜内注射施用于患者。

本文中涵盖各种用药时程, 包括, 但不限于, 单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

为了预防或治疗疾病, 本发明的抗体的合适剂量(当单独或与一种或多种其他的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、所述抗体是以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答, 和主治医师的判断力。所述抗体以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。通常, 临床医师施用组合物直到达到获得预期效果的剂量。本发明的抗体因此可以单一剂量施用, 或者在一定时间内以两次或更多次剂量(其可包含相同或不同量的所需分子)施用, 或者通过植入装置或导管连续输注施用。适当的剂量可通过使用适当的剂量反应数据确定。在某些实施方案中, 可在延长的时间期限内向患者施用抗体。在某些实施方案中, 抗体是每周、每两周、每月、每两个月、每三个月、每四个月、每五个月或每六个月给药。

在某些实施方案中, 本文中提供的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段可以用于检测 CD40 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。在一些实施方案中, 生物样品来自本文所述疾病(例如肿瘤或感染)的相关病灶

在一些实施方案中, CD40 是人 CD40 或食蟹猴 CD40。在一些实施方案中, 所述方法包括将生物样品与如本文所述的抗 CD40 抗体或其抗原结合片段在允许抗 CD40 抗体与 CD40 结合的条件下接触, 并检测在抗 CD40 抗体和 CD40 之间是否形成复合物。复合物的形成表示存在 CD40。该方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中, 抗 CD40 抗体被用于选择

适合利用抗 CD40 抗体的治疗的受试者，例如其中 CD40 是用于选择所述受试者的生物标记物。

在一个实施方案中，可以使用本发明抗体诊断本文所述疾病，例如评价(例如，监测)对象中本文所述疾病的治疗或进展、其诊断和/或分期。在某些实施方案中，提供标记的抗 CD40 抗体。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。示例性标记包括但不限于，放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 和 ^{131}I ，荧光团如稀土螯合物或荧光素及其衍生物，罗丹明及其衍生物，丹酰(dansyl)，伞形酮(umbelliferone)，荧光素酶(luciferase)，例如，萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利号 4,737,456)，荧光素，2,3-二氢酞嗪二酮，辣根过氧化物酶(HR)，碱性磷酸酶， β -半乳糖苷酶，葡萄糖淀粉酶，溶解酶，糖类氧化酶，例如，葡萄糖氧化酶，半乳糖氧化酶，和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，杂环氧化酶如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，以及利用过氧化氢氧化染料前体的酶如 HR，乳过氧化物酶，或微过氧化物酶(microperoxidase)，生物素/亲和素，自旋标记，噬菌体标记，稳定的自由基，等等。

在本文中提供的任何发明的一些实施方案中，样品是在用抗 CD40 抗体治疗之前获得的。在一些实施方案中，样品是在用本文所述疾病药物治疗之前获得的。在一些实施方案中，样品是福尔马林固定、石蜡包膜(FFPE)的。在一些实施方案中，样品是活检(例如芯活检)，手术标本(例如来自手术切除的标本)，或细针吸出物。

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 CD40。

在一些实施方案中，提供了包含本发明抗体或其抗原结合片段的检测试剂盒，用于诊断本文所述疾病，例如肿瘤或感染。

在一些实施方案中，提供了一种治疗本文所述疾病例如肿瘤或感染的方法，所述方法包括：对受试者(例如，样品)(例如，受试者样品)检验 CD40 的存在，因而确定 CD40 值，将 CD40 值与对照值比较，并且如果 CD40 值小于对照值，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 CD40 抗体(例如，本文所述的抗 CD40 抗体)，因而治疗本文所述疾病，例如肿瘤或感染。

本发明因此还涉及本发明的抗体或其抗原结合片段用于上述方法的用途，以及本发明的抗体或其抗原结合片段在制备用于上述方法的药物或组合物或组合产品或试剂盒中的用途，和/或本发明的抗体或其抗原结合片段在制备用于诊断本文所述疾病的试剂盒中的用途。

适用于本发明的抗体或其抗原结合片段的方法和用途，同样适用于包含本发明抗体或其抗原结合片段的免疫缀合物、组合物、组合产品或试剂盒。

在下面的附图进一步说明本发明。然而，这些附图和本发明的具体实施方案不应被认为限制本发明的范围，并且本领域技术人员容易想到的改变将包括在本发明的精神和所附权利要求要求的保护范围内。

附图说明

图 1 显示了通过流式细胞术测定 293F 细胞产生的 HEL 及 CD40L 对 Jurkat/NF- κ B-GFP +hCD40 报告细胞单克隆的激活, 报告细胞激活后有 GFP 的表达, GFP 阳性率由 FITC 通道检测。

图 2 显示了通过噬菌体 ELISA 测定第二轮(图 2 A)、第三轮(图 2 B)噬菌体展示富集得到的抗体库中 CD40 结合抗体的阳性率, 抗体与 CD40 结合信号大于与 BSA 结合信号的三倍以上定义为阳性抗体。

图 3 显示了通过流式细胞术测定 Jurkat/ NF- κ B-GFP +hCD40 报告细胞单克隆产生的含有阴性对照 N27、阳性 CD40 激动剂抗体的上清对 Jurkat/ NF- κ B-GFP +hCD40 报告细胞的激活。FITC 通道检测的 GFP 荧光强度代表单克隆的激活程度。

图 4 显示了通过分子排阻色谱法测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003 聚体性质。

图 5 A 显示了通过 ELISA 测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003 与 CD40 特异性结合, 与其他 TNFR 家族成员 OX40、4-1BB、GITR 不结合或低结合。图 5 B 显示了通过 ELISA 测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK004 与 CD40 的特异性结合。

图 6 显示了通过 ELISA 测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003 与 CD40L 竞争性结合 CD40。

图 7 A 显示了通过流式细胞术测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003 以交联形式激活 Jurkat/ NF- κ B-GFP +hCD40 报告细胞, 图 7 B 显示了通过流式细胞术测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK004 不依赖于交联, 以组成型形式激活 Jurkat/ NF- κ B-GFP +hCD40 报告细胞。FITC 通道检测 GFP, MFI 定义为 GFP 阳性细胞几何平均数 (Geometrical Mean) 与 GFP 阳性细胞百分比的乘积。

图 8 显示了通过流式细胞术测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003 分布与过表达人 CD40 的 293FT 细胞 (图 8 A)、过表达恒河猴 CD40 的 293FT 细胞 (图 8 B) 的结合。

图 9 显示了通过流式细胞术测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003 诱导 Raji 细胞 (图 9 A) 和 Ramos 细胞 (图 9 B) 的凋亡, 细胞凋亡指标为 CD95 的表达。MFI 定义为 CD95 阳性细胞几何平均数与 CD95 阳性细胞百分比的乘积。

图 10 显示了通过流式细胞术测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003 分别在不加交联剂 (图 10 A) 及加入交联剂 anti-Fc (图 10 B) 时对 PBMC 中树突状细胞的激活。树突状细胞激活指标为 CD86 的表达。MFI 定义为 CD86 阳性细胞几何平均数与 CD86 阳性细胞百分比的乘积。

图 11 显示了通过 CellTiter-Glo 法测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003 对 PBMC 中 B 细胞的增殖作用, 细胞增殖指标为荧光强度 (RLU), RLU 值越大表示细胞越多。

图 12 显示了通过流式细胞术测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003 分别在不加交联剂 (图 12 A) 及加入交联剂 anti-Fc (图 12 B) 时对 PBMC 中 B 细胞的激活。B 细胞激活指标为 CD86 的表达。MFI 定义为 CD86 阳性细胞几何平均数与 CD86 阳性细胞百分比的乘积。

图 13 显示了 SCID 小鼠中接种 Raji 细胞的同时给药在 293F 细胞中产生的本发明抗体 NK003 及阴性对照 HEL, 个体小鼠肿瘤生长曲线 (图 13 A) 及小鼠存活率统计 (图 13 B)。

图 14 显示了 MC38 荷瘤 CD40 人源化小鼠中给药在 293F 细胞中产生的本发明抗体 NK003 及阴性对照 HEL 对免疫系统的激活, OT1 细胞数、OT1 细胞与 CD8 细胞比值 (OT1/CD8⁺ 比值) 及 CD8 细胞与 CD4 细胞比值 (CD8/CD4 比值) 的增加均可说明免疫系统有激活。

图 15 显示了 MC38 荷瘤 CD40 人源化小鼠中给药在 293F 细胞中产生的本发明抗体 NK003、阴性对照 HEL 及阳性对照 CP870893, 个体小鼠肿瘤生长曲线 (图 15 A) 及小鼠体重变化曲线 (图 15 B)。

图 16 显示了通过流式细胞术测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003、FcγRIIB 增强型突变体 NK003-V12、FcγRIIA/FcγRIIB 增强型突变体 NK003-S267E/L328F 及阴性对照 HEL 分别在 293FT-FcγRIIA 细胞 (图 16 A) 和 293FT-FcγRIIB 细胞 (图 16 B) 交联下对 Jurkat/ NF-κB-GFP +hCD40 报告细胞的激活。FITC 通道检测 GFP, MFI 定义为 GFP 阳性细胞几何平均数与 GFP 阳性细胞百分比的乘积。

图 17 显示了 NK003 以 Fab 形式插入 pcomb3 载体的质粒图谱。

图 18 显示了通过噬菌体 ELISA 测定第三轮噬菌体展示得到的抗体库中 CD40 结合抗体的阳性率, 抗体与 CD40 结合信号大于与 BSA 结合信号的三倍以上定义为阳性抗体。

图 19 显示了 NK003 VH (图 19A)、VL (图 19B) 互补决定区 CDR3 亲和力成熟三代测序结果。

图 20 显示了通过流式细胞术测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003-AM-9、NK003-AM-18 以交联形式激活 Jurkat/ NF-κB-GFP +hCD40 报告细胞, FITC 通道检测 GFP, MFI 定义为 GFP 阳性细胞几何平均数 (Geometrical Mean) 与 GFP 阳性细胞百分比的乘积。

图 21 显示了 NK003 VH (图 21A)、VL (图 21B) 骨架区亲和力成熟三代测序结果。

图 22 显示了通过流式细胞术测定 293F 细胞产生的本发明抗体 NK003-AM-18-EP1 以交联形式激活 Jurkat/ NF-κB-GFP +hCD40 报告细胞, FITC 通道检测 GFP, MFI 定义为 GFP 阳性细胞几何平均数 (Geometrical Mean) 与 GFP 阳性细胞百分比的乘积。

定义

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。

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, 但是不排除任何其他要素、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。

如本文所述，术语“CD40”是本领域已知的，例如人 CD40 或恒河猴 CD40。CD40 也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员 5(TNFRSF5)、CD40L 受体或 CD154 受体。人全长 CD40 蛋白质是具有 277 个氨基酸的 I 型膜蛋白，参见例如 NCBI, NM_001250.5。恒河猴 CD40 参见例如 NCBI, NM_001265862.1。

本文所用的术语“抗 CD40 抗体”、“抗 CD40”、“CD40 抗体”或“结合 CD40 的抗体”或“特异性结合 CD40 的抗体”是指这样的抗体，所述抗体能够以足够的亲和力结合(人或恒河猴)CD40 亚基或其片段以致所述抗体可以用作靶向(人或恒河猴)CD40 中的诊断剂和/或治疗剂。在一个实施方案中，抗 CD40 抗体与非(人或恒河猴)CD40 蛋白结合的程度低于所述抗体与(人或恒河猴)CD40 结合的约 10%、约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%或约 90%或以上，如例如通过放射性免疫测定(RIA)或生物光干涉测定法或 MSD 测定法测量的。

特异性地结合人 CD40 的抗体可能对其它相关的抗原具有交叉反应性，例如，对来自其它物种(同源)(诸如恒河猴)的相同抗原具有交叉反应性。虽然单特异性抗体特异性地结合一个抗原或一个表位，而双特异性抗体特异性地结合两个不同的抗原或两个不同的表位。

“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 指派系统的任一种或其组合确定，所述指派系统包括例如：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。

例如，根据不同的 CDR 确定方案，每一个 CDR 的残基如下所述。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat 编号系统)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35

(Chothia 编号系统)				
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
(Kabat 编号系统)				

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，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。

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。

在一个实施方案中，本发明抗体的 CDR 通过 IMGT 规则确定边界，例如利用 IMGT 数据库确定边界。

应该注意，基于不同的指派系统获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派系统下定义的同一抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此，在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体，其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列，但是由于应用了不同的方案（例如不同的指派系统规则或组合）而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

“Fc 区”或“Fc 结构域”或“Fc”指抗体的重链的 C 末端区域，其介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，包括结合位于免疫系统的各种细胞（例如效应细胞）上的 Fc 受体或结合经典补体系统的第一组分（C1q）。因此，Fc 区包含排除第一恒定区免疫球蛋白结构域（例如 CH1 或 CL）的抗体的恒定区。在 IgG、IgA 和 IgD 同种型中，Fc 区包含抗体的两条重链各自中的 CH2 和 CH3 恒定区；IgM 和 IgE Fc 区包含各多肽链中的三个重链恒定结构域(CH 结构域 2-4)。对于 IgG，Fc 区包含免疫球蛋白结构域 C γ 2 和 C γ 3 以及 C γ 1 和 C γ 2 之间的铰链。尽管免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可以改变，但人 IgG 重链 Fc 区通常定义为从位置 C226 或 P230 处的氨基酸残基（或这两个氨基酸之间的氨基酸）至重链的羧基末端的片段，其中编号根据 Kabat 中的 EU 索引。Kabat 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD; 还参见美国专利申请公开号 2008/0248028 的图 3c-3f。人 IgG Fc 区的 CH2 结构域从约氨基酸 231 延伸至约氨基酸 340，而 CH3 结构域位于 Fc 区中 CH2 结构域的 C 末端侧，即，其从 IgG 的约氨基酸 341 延伸至约氨基酸 447（包括 C 末端赖氨酸）。如本文所用，Fc 区可以为天然序列 Fc，包括任何同种异型变体，或变体 Fc（例如非天然存在的 Fc）。Fc 也可以孤立地或在含 Fc 蛋白多肽诸如“包含 Fc 区的结合蛋白”也称为“Fc 融合蛋白”（例如抗体或免疫黏附素）的背景下指这一区域。

如本文所用，术语“表位”指抗原(例如，CD40)中与抗体分子特异性相互作用的部分。蛋白抗原内的表位可以从连续的氨基酸（通常为线性表位）或通过蛋白的三级折叠而并列的不连续氨基酸（通常为构象表位）形成。由连续的氨基酸形成的表位通常（但并非总是如此）对变性溶剂保持暴露，而由三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丧失。表位通常包括独特空间构象中的至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个氨基酸。

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，换言之，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。换言之，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(参见例如 Stahli 等, 1983, *Methods in Enzymology* 9: 242-253)。

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。换言之，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。

“IgG 形式的抗体”是指抗体的重链恒定区所属于的 IgG 形式。所有同一型的抗体的重链恒定区都是相同的，不同型的抗体之间的重链恒定区不同。例如，IgG1 形式的抗体是指其重链恒定区 Ig 结构域为 IgG1 的 Ig 结构域。

“人”抗体(HuMAb)指具有其中框架区和 CDR 区域均来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区的抗体。此外，如果抗体含有恒定区，则恒定区也来源于人种系免疫球蛋白序列。

“人源化”抗体指这样的抗体，所述抗体中一些、大部分或所有非人抗体(例如小鼠抗体)的 CDR 结构域外面的氨基酸被来源于人免疫球蛋白的相应氨基酸所替代。在抗体的人源化形式的一个实施方案中，CDR 结构域外部的一些、大部分或所有氨基酸已被来自人免疫球蛋白的氨基酸所替代，而一个或多个 CDR 区内的一些、大部分或所有氨基酸没有改变。氨基酸的小的添加、缺失、插入、取代或修改是容许的，只要它们没有消除抗体结合特定抗原的能力。“人源化”抗体保留与原始抗体类似的抗原特异性。

如本文所用，“嵌合抗体”指这样的抗体，其中可变区来源于一个物种且恒定区来源于另一物种，诸如其中可变区来源于小鼠抗体且恒定区来源于人抗体的抗体。

如本文所用，“抗体片段”指与完整抗体不同的分子，其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体所结合的抗原。如本文所用，术语“抗原结合片段”如本文所用指保留特异性结合抗原(例如，人 CD40)的能力的抗体的一种或多种片段。抗体片段的例子包括但不限于 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diabody; 线性抗体; 单链抗体(例如 scFv); 单结构域抗体; 双价或双特异性抗体或其片段; 骆驼科抗体; 和由抗体片段形成的双特异性抗体或多特异性抗体。

如本文所用，“多特异性”是指特异性结合至少两个不同抗原或抗原内两个不同表位，例如三个、四个或五个不同的抗原或表位的抗体。

如本文所用,“双特异性”是指特异性结合两个不同抗原或同一抗原内的两个不同表位的抗体。双特异性抗体可对其它相关抗原具有交叉反应性,或者可结合两个或更多个不同抗原之间所共享的表位。

如本文所用,术语“交联”是指在由特异性结合人 CD40 的抗体结合顺式或反式 Fc γ RIIb 所诱导的细胞上 CD40 的更高级多聚化,导致诱导 CD40 的激动活性。可在体外将如本文所述的抗人 F(ab')₂ 用作交联剂对交联进行评估。

如本文所用,术语“交叉反应”指本文所述抗体结合来自不同物种的 CD40 的能力。例如,结合人 CD40 的本文所述的抗体也结合来自另一物种的 CD40 (例如食蟹猴 CD40)。如本文所用,交叉反应性可以通过在结合测定(例如 SPR、ELISA)中用纯化的抗原检测特异性反应性或结合或以其他方式功能性地与生理表达 CD40 的细胞相互作用来测量。用于测定交叉反应性的方法包括如本文所述的标准结合测定,例如通过 BIACORE® 表面等离子共振 (SPR) 分析使用 BIACORE® 2000 SPR 仪器(Biacore AB, Uppsala, Sweden)或流式细胞术技术。

“免疫缀合物”是与一个或多个其它物质(包括但不限于细胞毒性剂或标记)缀合的抗体。

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。间接标记的实例包括使用荧光标记的二级抗体进行的一级抗体的检测和具有生物素的 DNA 探针的末端标记,使得其可以用荧光标记的链霉亲和素蛋白来检测。

“载体”是指能够在生物系统内复制或可在这类系统之间移动的多核苷酸。载体多核苷酸通常含有诸如复制起点、聚腺苷酸化信号或选择标记的元件,其功能是促进这些多核苷酸在生物系统中的复制或保持。此类生物系统的示例可包括细胞、病毒、动物、植物和用能够复制载体的生物组分再造的生物系统。包含载体的多核苷酸可为 DNA 或 RNA 分子或这些分子的杂合分子。“表达载体”是指可用于在生物系统或再造生物系统中以指导由存在于表达载体中的多核苷酸序列所编码的多肽进行翻译的载体。

“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。对于用于评估抗体纯度的方法的综述,参见,例如, Flatman 等, J.Chromatogr.B848: 79-87(2007)。

“分离的”核酸是指这样的核酸分子,其已经与其天然环境的组分分离。分离的核酸包括包含在通常包含该核酸分子的细胞中的核酸分子,但是该核酸分子存在于染色体外或在不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

如下进行序列之间序列同一性的计算。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数,将所述序列出于最佳比较目的比对(例如,可以为了最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。在一个优选实施方案中,为比较目的,所比对的参考序列的长度是至少 30%、优选地至少 40%、更优选地至少 50%、60% 和甚至更优选地至少 70%、80%、90%、100% 的参考序列长度。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残

基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则所述分子在这个位置处是相同的。

可以利用数学算法实现两个序列间的序列比较和同一性百分数的计算。在一个优选实施方案中,使用已经集成至GCG软件包的GAP程序中的Needlema和Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)算法(在<http://www.gcg.com>可获得),使用Blossum 62 矩阵或PAM250 矩阵和空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6,确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。在又一个优选的实施方案中,使用GCG软件包中的GAP程序(在<http://www.gcg.com>可获得),使用NWSgapdna.CMP 矩阵和空位权重40、50、60、70或80和长度权重1、2、3、4、5或6,确定两个核苷酸序列之间的同一性百分数。特别优选的参数集合(和除非另外说明否则应当使用的一个参数集合)是采用空位罚分12、空位延伸罚分4和移码空位罚分5的Blossum 62 评分矩阵。

还可以使用PAM120 加权余数表、空位长度罚分12,空位罚分4),利用已经并入ALIGN程序(2.0版)的E. Meyers和W. Miller算法,((1989) CABIOS, 4:11-17)确定两个氨基酸序列或核苷酸序列之间的同一性百分数。

额外地或备选地,可以进一步使用本文所述的核酸序列和蛋白质序列作为“查询序列”以针对公共数据库执行检索,以例如鉴定其他家族成员序列或相关序列。

如本文所用,术语“在低严格性、中等严格性、高严格性或极高严格性条件下杂交”描述了杂交和洗涤条件。进行杂交反应的指导可以在通过引用方式并入的Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 中找到。参考文献中描述了含水方法和非含水方法并且可以使用任一方法。本文中提及的特异性杂交条件如下: 1)低严格性杂交条件是在约45℃于6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中,随后至少在50℃(对于低严格性条件,可以增加洗涤的温度至55℃)于0.2X SSC, 0.1% SDS中洗涤两次; 2)中等严格性杂交条件是在约45℃于6 X SSC中、随后在60℃在0.2 X SSC、0.1% SDS中洗涤一次或多次; 3)高严格性杂交条件是在约45℃在6 X SSC中、随后在65℃于0.2X SSC、0.1% SDS中洗涤一次或多次; 并且优选地4)极高严格性杂交条件是在65℃于0.5 M磷酸钠、7%SDS中、随后在65℃于0.2X SSC、0.1% SDS中洗涤一次或多次。极高严格性条件(4)是优选的条件和除非另外说明,否则应当使用的一个条件。

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。适用于本发明的合适的宿主细胞包括原核微生物,如大肠杆菌。宿主细胞还可以是真核微生物如丝状真菌或酵母,或各种真核细胞,例如昆虫细胞等。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例子包括SV40转化的猴肾CV1系(COS-7);人胚肾系(HEK 293或293F细胞)、293细胞、幼仓鼠肾细胞(BHK)、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝脏细胞(Hep G2)、中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)、CHOK1SV细胞、CHOK1SV GS-KO细胞、CHOS细胞、NSO细胞、骨髓瘤细胞系如Y0、NS0、P3X63和Sp2/0等。适于产生蛋白质的哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如Yazaki和Wu, Methods in Molecular Biology, 第248卷(B.K.C. Lo编著, Humana Press, Totowa, NJ), 第255-268页(2003)。在一个优选的实

施方案中,所述宿主细胞是CHO细胞,例如CHOS细胞CHOK1SV细胞或CHOK1SV GS-KO,或所述宿主细胞是293细胞,例如HEK293细胞。

术语“激动剂”或“激动性”是指特异性结合人CD40的抗体,在结合CD40时诱导B细胞和/或树突细胞(DC)或T细胞的增殖或激活。B细胞和DC和T细胞的增殖或激活可通过如下方式测定:测定增加的B细胞增殖,或者测定B细胞上任何表面标记物CD23、CD80、CD83、CD86,或DC上CD80、CD83、CD86和HLA-DR的上调。在与不含抗体的对照样本进行比较时,激动剂能够以统计意义上显著的方式诱导B细胞和/或DC和/或T细胞活化。

“抑制肿瘤细胞/肿瘤生长”是指与在不存在治疗剂的情况下相同肿瘤细胞或肿瘤的生长相比,在与治疗剂或治疗剂的组合接触时体外或体内肿瘤细胞生长或肿瘤的可测量的下降。体外或体内肿瘤细胞或肿瘤生长的抑制可为至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。

本文所述的术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗疾病,例如肿瘤(例如癌症)和感染(例如慢性感染)中有效的任何物质,包括化疗剂、细胞毒性剂、疫苗、其它抗体、抗感染活性剂、小分子药物或免疫调节剂。

“化疗剂”包括在治疗免疫系统疾病中有用的化学化合物,包括但不限于烷化剂;抗代谢物;抗微管抑制剂、天然产物;抗生素;酶;杂类试剂;激素和拮抗剂;抗雌激素;抗雄激素;非类固醇抗雄激素、拓扑异构酶抑制剂、受体酪氨酸激酶抑制剂、血管生成抑制剂等等。本发明的示例性的化疗剂例如阿那曲唑(Arimidex®)、比卡鲁胺(Casodex®)、硫酸博来霉素(Blenoxane®)、白消安(Myleran®)、白消安注射剂(Busulfex®)、卡培他滨(Xeloda®)、N4-戊氧羰基-5-脱氧-5-氟胞苷、卡铂(Paraplatin®)、卡莫司汀(BicNU®)、苯丁酸氮芥(Leukeran®)、顺铂(Platinol®)、克拉立滨(Leustatin®)、环磷酰胺(Cytosan®或Neosar®)、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射剂(DepoCyt®)、达卡巴嗪(DTIC-Dome®)、更生霉素(dactinomycin)(放线菌素D、Cosmegen)、盐酸道诺霉素(Cerubidine®)、柠檬酸道诺霉素脂质体注射剂(DaunoXome®)、地塞米松、多西紫杉醇(Taxotere®)、盐酸多柔比星(Adriamycin®、Rubex®)、依托泊苷(Vepesid®)、磷酸氟达拉滨(Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®、Efudex®)、氟他胺(Eulexin®)、tezacitibine、吉西他滨(双氟脱氧胞苷)、羟基脲(Hydrea®)、伊达比星(Idamycin®)、异环磷酰胺(IFEX®)、伊立替康(Camptosar®)、L-天冬酰胺酶(ELSPAR®)、亚叶酸钙、美法仑(Alkeran®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲氧蝶呤(Folex®)、米托蒽醌(米托蒽醌)、米罗他(mylo-targ)、紫杉醇(Taxol®)、phoenix(钇90/MX-DTPA)、喷司他丁、聚苯丙生20联用卡莫司汀植入物(Gliadel®)、柠檬酸他莫昔芬(Nolvadex®)、替尼泊苷(Vumon®)、6-巯鸟嘌呤、塞替派、替拉扎明(Tirazone®)、注射用盐酸拓扑替康(Hycamptin®)、长春碱(Velban®)、长春新碱(Oncovin®)、长春瑞滨(长春瑞滨)、依鲁替尼、吉利德(idelalisib)和贝伦妥单抗-维多汀(brentuximab vedotin),以及任何上述物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。。该定义还包括用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素药物诸如抗雌激素药物,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香化酶抑制4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、keoxifene、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬和抗雄激素,诸如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、醋酸亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及上述任一者的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。示例性的细胞毒性剂包括但不限于:放射性同位素,例如碘(¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I和¹²¹I)、碳(¹⁴C)、硫(³⁵S)、氟(¹⁸F)、铟(¹¹⁵In、¹¹³In、¹¹²In和¹¹¹In)、铊(²⁰¹Tl)、镅(²⁴¹Am)、镓(⁶⁷Ga、⁶⁸Ga)、钯(¹⁰³Pd)、钼(⁹⁹Mo)、氙(¹³³Xe)、氟(¹⁸F)、¹⁵³Sm、¹⁷⁷Lu、¹⁵⁹Gd、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁰La、¹⁷⁵Yb、¹⁶⁶Ho、⁹⁰Y、⁴⁷Sc、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁴²Pr、¹⁰⁵Rh、⁹⁷Ru、⁶⁸Ge、⁵⁷Co、⁶⁵Zn、⁸⁵Sr、³²P、¹⁵³Gd、¹⁶⁹Yb、⁵¹Cr、⁵⁴Mn、

^{75}Se 、 ^{113}Sn 和 ^{117}Sn ；生长抑制剂；烷化剂（包括但不限于氮芥、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯），例如尿嘧啶氮芥、氮芥(Chlormethine)、环磷酰胺 (CYTOXANTM)、异环磷酰胺(fosfamide)、美法仑、苯丁酸氮芥、胍血生、三乙撑蜜胺、三亚乙基硫代磷胺 (Triethylenethiophosphoramine)、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链脲霉素、达卡巴嗪和替莫唑胺；或抗代谢物（包括但不限于叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂）：甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨、喷司他丁(Pentostatine)和吉西他滨。在一些实施方案中，本发明的示例性的细胞毒性剂包括抗微管药物、拓扑异构酶抑制剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、烷基化剂、蒽环类、长春碱类生物碱、嵌入剂、能够干扰信号转导途径的活性剂、促凋亡活性剂、蛋白酶体抑制剂和照射(例如，局部或全身照射(例如， γ 辐射))。

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。有关小分子，例如抗体和细胞因子的肽模拟物，以及小分子毒素的描述参见例如 Casset 等，(2003) Biochem.Biophys.Res.Comm.307: 198-205; Muyldermans(2001)J. Biotechnol.74: 277-302; Li(2000)Nat.Biotechnol.18: 1251-1256; Apostolopoulos 等，(2002)Curr.Med.Chem.9: 411-420; Monfardini 等，(2002)Curr.Pharm.Des.8: 2185-2199; Domingues 等，(1999)Nat.Struct. Biol.6: 652-656; Sato 和 Sone(2003)Biochem.J.371: 603-608; 美国专利号 6,326,482。

术语“抗感染活性剂”包括在施用浓度和给药间隔下特异性抑制或消除微生物生长但对宿主不致命的任何分子，所述微生物诸如病毒、细菌、真菌或原生动物，例如寄生虫。用于本文时，术语抗感染活性剂包括抗生素、抗菌剂、抗病毒剂、抗真菌剂和抗原生动物剂。在一个具体方面中，抗感染活性剂在施用浓度和给药间隔对宿主是无毒的。

抗细菌的抗感染活性剂或抗菌剂可广泛的分类为杀菌的(即，直接杀死)或抑菌的(即，阻止分裂)。抗菌的抗感染活性剂可进一步再分类为窄谱抗菌剂(即，仅影响小类细菌亚型，例如，革兰氏阴性等)或广谱抗菌剂(即，影响广泛种类)。实例包括阿米卡星、庆大霉素、格尔德霉素、除莠霉素、莫匹罗星、呋喃妥因、吡嗪酰胺、奎奴普丁/达福普汀、利福平/异福酰胺 或替硝唑等。

术语“抗病毒剂”包括抑制或消除病毒生长、致病和/或存活 的任何物质。这包括例如阿昔洛韦、西多福韦、齐多夫定、去羟肌苷(ddI, VIDEX)、扎西他滨(ddC, HIVID)、司他夫定(d4T, ZERIT)、拉米夫定(3TC, EPIVIR)、阿巴卡韦(ZIAGEN)、恩曲他滨(EMTRIVA)等。

术语“抗真菌剂”包括抑制或消除真菌生长、致病和/或存活 的任何物质。这包括例如那他霉素、龟裂杀菌素、非律平、制霉菌素、两性霉素 B、坎底辛、绿叶刺蕊草(patchouli)、印度楝树种子油(neem seed oil)、椰子油(Coconut Oil)等。

术语“抗原生动物剂”包括抑制或消除原生动物生物体(例如寄生虫)生长、发病和/ 或存活 的任何物质。抗原生动物剂的实例包括抗疟疾试剂例如，奎宁、奎尼丁等。

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。

术语“免疫检查点分子”意指免疫系统中存在的一类抑制性信号分子，通过调节外周组织中免疫反应的持续性和强度避免组织损伤，并参与维持对于自身抗原的耐受(Pardoll DM., The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264)。研究发现，肿瘤细胞能够逃避体内免疫系统而失控增殖的原因之一是利用了免疫检查点分子的抑制性信号通路，由此抑制了T淋巴细胞活性，使得T淋巴细胞不能有效发挥对肿瘤的杀伤效应(Yao S, Zhu Y 和 Chen L., Advances in targeting cell surface signaling molecules for immune modulation. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(2):130-146)。免疫检查点分子包括但不限于程序性死亡1(PD-1)、PD-L1、PD-L2、细胞毒T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)、LAG-3和TIM-3。

术语“共刺激分子”是指T细胞上的与共刺激配体特异性结合从而介导T细胞的共刺激反应(例如但不限于增殖)的相应结合配偶体。共刺激分子是除抗原受体或其配体之外的有助于有效免疫应答的细胞表面分子。共刺激分子包括但不限于MHC I类分子、TNF受体蛋白、免疫球蛋白样蛋白、细胞因子受体、整联蛋白、信号传导淋巴细胞活化分子(SLAM蛋白)、激活NK细胞受体、OX40、CD40、GITR、4-1BB(即CD137)、CD27和CD28。在一些实施方案中，“共刺激分子”是OX40、GITR、4-1BB(即CD137)、CD27和/或CD28。

术语“细胞因子”是由一种细胞群释放，作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子、单核因子、白介素(IL)，诸如IL-1，IL-1 α ，IL-2，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，IL-7，IL-8，IL-9，IL-11，IL-12，IL-15；肿瘤坏死因子，诸如TNF- α 或TNF- β ；及其它多肽因子，包括LIF和kit配体(KL)和 γ -干扰素。如本文中使用的，术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等效物，包括通过人工合成产生的小分子实体，及其药剂学可接受的衍生物和盐。

术语“抑制剂”或“拮抗剂”包括使所给出分子(例如，免疫检查点分子)的某些参数(例如，活性)降低的物质。例如，这个术语包括使得所给出的分子被抑制至少5%、10%、20%、30%、40%或更多的活性(例如，PD-L1活性)的物质。因此，抑制作用不必是100%。

术语“激活剂”包括使所给出分子(例如，共刺激分子)的某些参数(例如，活性)增加的物质。例如，这个术语包括使得所给出的分子被增加至少5%、10%、20%、30%、40%或更多的活性(例如，OX40活性)的物质。因此，激活作用不必是100%。

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“组合产品”是指一种剂量单位形式的固定组合或非固定组合或用于组合施用的部分的试剂盒，其中两种或更多种治疗剂可以独立地在同一时间或在时间间隔内分开施用，尤其是在这些时间间隔允许组合伴侣展示协作，例如，协同效应时。术语“固定组合”是指本发明抗体和组合伴侣(例如其他治疗剂，例如免疫调节剂，例如免疫抑制剂或抗炎剂)以单一实体或剂量的形式同时施用于患者。术语“非固定组合”意指本发明抗体和组合伴侣(例如其他治疗剂，例如免疫调节剂，例如免疫抑制剂或抗炎剂)作为分开的实体同时、并行或依次施用于患者，没有特定的时间限制，其中这样的施用提供了患者体内两种化合物的治疗有效水平。后者也适用于鸡尾酒疗法，例如施用三种或更多种治疗剂。在一个优选的实施方案中，药物组合是非固定组合。

“免疫原性”指特定物质引发免疫应答的能力。肿瘤是免疫原性的，并且增强肿瘤免疫原性有助于通过免疫应答清除肿瘤细胞。

“免疫应答”指脊椎动物中针对外源物的生物应答，所述应答保护生物体免于这些物质和由其引起的疾病。免疫应答由免疫系统的细胞（例如，T淋巴细胞、B淋巴细胞、天然杀伤（NK）细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突细胞或嗜中性粒细胞）和由这些细胞或肝脏产生的可溶性大分子（包括抗体、细胞因子和补体）的作用介导，其导致从脊椎动物机体选择性靶向、结合、损伤、破坏和/或消除入侵病原体、细胞或感染有病原体的组织、癌性或其他异常细胞、或者（在自身免疫或病理性炎症的情况下）正常人细胞或组织。免疫反应包括例如活化或抑制T细胞，例如，效应T细胞或Th细胞，诸如CD4⁺或CD8⁺T细胞，或者抑制或耗尽Treg细胞。“T效应”（“T_{eff}”）细胞指具有细胞溶解活性的T细胞（例如CD4⁺和CD8⁺T细胞）以及T辅助（Th）细胞（其分泌细胞因子并活化和引导其他免疫细胞），但不包括调节性T细胞（Treg细胞）。

术语“有效量”指本发明的抗体或片段或缀合物或组合物的这样的量或剂量，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。有效量可以由作为本领域技术人员的主治医师通过考虑以下多种因素来容易地确定：诸如哺乳动物的物种；它的大小、年龄和一般健康；涉及的具体疾病；疾病的程度或严重性；个体患者的应答；施用的具体抗体；施用模式；施用制剂的生物利用率特征；选择的给药方案；和任何伴随疗法的使用。

“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。抗体或抗体片段或其缀合物或组合物的治疗有效量可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量和抗体或抗体部分在个体中激发所需反应的能力而变动。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（例如肿胀率等）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%和仍更优选地至少约80%或90%。可以在预示人自身免疫疾病或炎症中的功效的动物模型系统中评价化合物抑制可度量参数（例如，肿胀率）的能力。

“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。

本文所述的“个体”或“受试者”可以互换使用，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，个体或受试者可以是哺乳动物，例如，灵长类，优选地，高级灵长类，例如，人类（例如，患有本文所述疾病或具有患有本文所述疾病的风险的患者）。在一个实施方案中，受试者患有本文所述疾病（例如，如本文所述的肿瘤或感染）或具有患有本文所述疾病的风险。在某些实施方案中，受试者接受或已经接受过其它治疗，例如化疗治疗和/或放射疗法。备选地或组合下，受试者因感染而免疫受损或具有因感染而免疫受损的风险。

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）以治疗如本公开所述的IL-23相关疾病。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、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。

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。在一些实施方式中，具有免疫系统疾病（自身免疫疾病或炎症）家族病史的受试者是预防性方案的候选。通常，在免疫系统疾病（自身免疫疾病或炎症）的背景中，术语“预防”是指在免疫系统疾病（自身免疫疾病或炎症）的病征或症状发生前，特别是在具有免疫系统疾病（自身免疫疾病或炎症）风险的受试者中发生前的药物施用。

“受试者/患者样品”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。

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. 构建报告细胞系 Jurkat/ NF- κ B-GFP +hCD40

NF- κ B-GFP 报告基因慢病毒系统 (QIAGEN, CCS-013G) 的启动子中有多个 NF- κ B 转录因子结合元件,该启动子的激活可以驱动 GFP 的表达。根据试剂盒的说明书,用 NF- κ B-GFP 报告基因慢病毒感染 Jurkat 细胞 (ATCC, TIB-152),并用嘌呤霉素 (InvivoGen, ant-pr-1) 筛选感染慢病毒的 Jurkat 细胞。加入 10 ng/ml TNF α 蛋白 (Sino Biological, 10602-HNAE) 刺激利用嘌呤霉素筛选到的细胞,24h 后流式细胞仪 (BD, FACS Aria III) 分选 GFP 荧光的细胞亚群,获得 Jurkat/ NF- κ B-GFP 细胞。

将人 CD40 CDS (Sino Biological, HG10774-M) 构建至慢病毒核心质粒 pCDH (System Biosciences) 中,使用标准步骤用 PEI (polyscience, 24885-2) 向 293FT 细胞 (Thermo Fisher Scientific, R70007) 中按 1: 1: 1: 1 共转染所获得的慢病毒核心质粒和辅助质粒 pPACKH1-GAG、pPACKH1-REV、pVSVG (均来自 System Biosciences),转染 6h 后换液,37 °C 培养于含 10% 胎牛血清 (Biological Industries, 04-001-1A) 的 DMEM 培养基 (Lifetechnologies, C11995500CP) 中,继续培养 48h 收集含有人 CD40 慢病毒的上清。

本文所用阳性对照 CD40L 序列来自专利 WO 2016/177771 (SEQ ID NO:15),阴性对照 HEL 序列如表 10 所示。CD40L 和 HEL 的 DNA 序列在金唯智公司进行全基因合成。对于 CD40L 和 HEL 纯化,将 DNA 序列插入真核表达载体 pFUSE (InvivoGen, pfuse-hg1fc1) 中,使用标准步骤用 PEI 转染至 293F 细胞 (Thermo Fisher Scientific, R79007); 利用 Freestyle 培养基 (Lifetechnologies, 12338026) 在 37 °C 摇床培养细胞。培养 7 天后收集上清液,并在 AKTA 系统 (GE) 上使用 Superdex™ 200 Increase 预装柱 (GE, 28-9909-44) 纯化。

CD40 信号转导可以激活 NF- κ B 通路,如果 CD40 成功表达于 Jurkat/ NF- κ B-GFP 细胞膜表面,CD40L 刺激将会诱导 GFP 的表达。将如上所述分选获得的构建好的 Jurkat/ NF- κ B-GFP 细胞用上述获得的人 CD40 慢病毒上清感染,16h 后加入 100 nM 上述获得 CD40L 蛋白(作为阳性对照)和 HEL(作为阴性对照)刺激,24h 后流式细胞仪单细胞分选 GFP 荧光最强的细胞至 96 孔板中。

将上述 96 孔板中的细胞在含有 10%胎牛血清(Biological Industries, 04-001-1A)的 RPMI 1640 培养基(Lifetechnologies, C11875500CP)中培养 2 周,待单细胞长起来后分别加入 100 nM 上述获得三聚化 CD40L 蛋白(作为阳性对照)和 HEL(作为阴性对照),挑选 CD40L 强阳性、HEL 阴性的单克隆,作为 Jurkat/ NF- κ B-GFP +hCD40(简称 NF- κ B-GFP +hCD40)细胞,用于后续实验。结果如图 1,CD40L 刺激后 Jurkat/ NF- κ B-GFP +hCD40 单克隆 GFP 阳性率为 94.7%,HEL 刺激无激活。

实施例2. 从噬菌体展示抗体库中筛选 CD40 结合抗体

从天津市血液中心及上海秒通生物公司购买 30 例健康成人外周血,利用 ficoll 分离液(灏洋, LDS1075)离心获取 PBMC,离心条件: 20°C, 2000rpm, 升 5 降 0 模式 30 分钟。使用如上所述获得的 PBMC 构建人天然抗体库,库的构建为常规方法(phage display, Tim Clackson and Henry B. Lowman)。将获得抗体重链和轻链可变区随机组合以单链抗体 scFv 的形式展示于噬菌体衣壳蛋白 pIII 的 N 端,获得噬菌体展示抗体库,库容达到 10^{10} 。

噬菌体筛选为常规技术(Phage Display: A Laboratory Manual, Carlos F Barbas III)。首先,将生物素化 CD40 蛋白(acrobiosystems, TN5-H82F9)与如上所述获得的噬菌体展示抗体库室温孵育 2h。孵育结束后直接加入 150 μ l 链霉亲和素磁珠 Dynabeads M280(Lifetechnologies, 11205D),在室温混匀仪上孵育 30 min。用 0.05% PBS-tween(PBS: Lifetechnologies, 70011044; Tween: Sigma-Aldrich, 9005-64-5)洗去不与抗原结合的噬菌体,最后用 0.2 M 甘氨酸-盐酸(PH2.2)洗脱与抗原结合的噬菌体。应用洗脱的噬菌体感染大肠杆菌 XL1-blue(Agilent, 200236),加入辅助噬菌体 VCSM13(Agilent, 200251)扩增后用于下一轮筛选。共进行三轮筛选。三轮后,富集与 CD40 结合的抗体噬菌体,筛选结果如表 1。

表 1 利用噬菌体展示技术从人天然抗体库中筛选 CD40 结合抗体

		第一轮	第二轮	第三轮
CD40	起始数	5.4×10^{13}	8×10^{12}	9.2×10^{12}
	获得数	8×10^6	3×10^7	2×10^9

为了初步评估筛选到 CD40 结合抗体的阳性率,我们分别挑取第二、三轮 29 个噬菌体单克隆,进行噬菌体 ELISA 分析。噬菌体 ELISA 为常规技术,具体如下:从深孔板中培养的噬菌体单克隆中各挑取第二、三轮 29 个噬菌体单克隆,37°C 300 rpm 摇至 OD = 0.5 ~ 0.8,加入辅助噬菌体 VCSM13 扩增后 30°C 过夜诱导噬菌体,用于抗体表达。在 ELISA 板(Corning, 3690)上包被 1 μ g/ml 的人源 CD40(Acrobiosystems, CD0-H5228),4°C 过夜孵育。向过夜孵育后的 ELISA 板上加入过夜诱导的噬菌体上清,室温孵育 1h,0.05% PBST 洗 8 次。利用 BSA(Solarbio, A8020-100)作为阴性对照。加入 HRP 偶联的抗-M13(GE, 27-9421-01, M13 为噬菌体衣壳蛋白)检测结合的抗体噬菌体。将 CD40 结合信号是 BSA 对照的 3 倍以上定义为阳性克隆。结果如图 2,其中第二轮筛选、第三轮筛选的阳性率分别为 6.9%、27.6%。

实施例3. 共刺激分子 CD40 的激动剂抗体筛选

首先,我们将第三轮噬菌体展示富集到的抗体亚克隆到分泌型慢病毒载体 pCDH 中,同时将 N27 ScFv 克隆到分泌型慢病毒载体 pCDH 中作为阴性对照, N27 ScFv 序列见表 11。向 293FT 细胞中按 1: 1: 1: 1 共转染慢病毒核心质粒和辅助质粒 pPACKH1-GAG、pPACKH1-REV、pVSVG,转染 6h 后换液,37 °C 培养于含 10%胎牛血清(Biological Industries, 04-001-1A)的 DMEM 培养基中,继续培养 48h 收集含有 CD40 结合抗体慢病毒文库的上清;用 50000 pg 所获得的 CD40 结合抗体的慢病毒文库感染 HEK293 细胞,感染 16 h 后,离心去除含有慢病毒的培养基,添加新鲜培养基,利用流式分选技术将感染的 HEK293 细胞分选到 96 孔板中,使每个孔仅含有 1 个感染 HEK293 细胞,培养细胞 3 周,待细胞达到一定数量后取上清。上清加入如上所述获得的 Jurkat/ NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞 3×10^5 个,同时加入 2.5 μ g/ml 山羊抗人 Fc (SouthernBiotech, SBA-2048-01) 的二抗,交联细胞分泌的抗体以增强激动剂抗体的激活强度;培养 24h 后测试细胞上清的活性,阳性抗体的检测结果如图 3;从细胞上清活性为阳性的 HEK293 细胞中提取抗体基因,构建至 pFUSE 载体进行测序,获得阳性抗体 VH 及 VL 序列,获得的两个阳性抗体编号为 NK003 和 NK004,其序列(包括 CDR、VH/VL 和重链、轻链)参见序列列表的表 4 至表 8 中的序列。

实施例4. 全长抗体 IgG 的表达和纯化

抗体的表达与纯化为常规方法,具体如下:

根据抗体序列,合成筛选出的激动剂抗体 NK003、NK004 重链和轻链 DNA (金唯智),将其分别克隆至载体 pFUSE 中,使用标准步骤用 PEI 将分别含有重链和轻链的质粒二者按 1: 1 瞬时共转染至 293F 悬浮细胞,以表达全长抗体。培养 1 周后在 AKTA 系统上使用 Superdex™ 200 Increase 预装柱纯化。

SDS-PAGE 法鉴定纯化抗体,应用分子排阻预装柱 Superdex 200 分析抗体的聚集。结果如图 4,其中 NK003 洗脱峰形对称且洗脱时的保留时间与单个分子量的单克隆抗体保持一致,同时抗体中存在少量聚集体。

实施例5. 人源 CD40 抗体 NK003、NK004 的体外表征

5.1 NK003、NK004 与 CD40 的结合

通过与 TNFR 家族成员 OX40、4-1BB 和 GITR 的直接 ELISA,评价 NK003 的结合选择性。在 ELISA 板上包被含有 1 μ g/ml 人源 OX40 (Acrobiosystems, OX0-H5224)、4-1BB (Acrobiosystems, 41B-H5227)、GITR (Acrobiosystems, GIR-H5228)和 CD40 (Acrobiosystems, CD0-H5228)的 PBS 溶液,4°C 过夜孵育。加入如实施例 4 获得的用 PBS 稀释至不同浓度的 NK003: 0.625 μ g/ml、1.25 μ g/ml、2.5 μ g/ml 和 5 μ g/ml,室温孵育 30 min 后,0.05% PBS-Tween 洗 8 次。加入羊抗人 HRP 偶联的 Fc 抗体 (SouthernBiotech, 2048-05) 检测结合的 NK003。如图 5A 所示,NK003 选择性与人 CD40 结合,与其他测试的 TNFR 家族蛋白低结合或不结合。

为了评价 NK004 与 CD40 的结合,在 ELISA 板上包被 1 μ g/ml 的人源 CD40 (Acrobiosystems, CD0-H5228)的 PB 溶液,4°C 过夜孵育。加入如实施例 4 获得的 PBS 稀释至不同浓度 NK004: 0.002 nM、0.016 nM、0.13 nM、1 nM、8 nM、64 nM 和 500 nM,HEL 为阴性对照抗体,室温孵育 30 min 后,0.05% PBS-Tween 洗 8 次。加入羊抗人 HRP 偶联的 Fc 抗体检测结合的 NK004。如图 5B 所示,NK004 可以与人 CD40 结合。

5.2 NK003 阻断 CD40L 与 CD40 结合

用 ELISA 评价 NK003 对 CD40L 与 CD40 结合的作用。首先，使用蛋白生物素化试剂盒 (GeneCopocia, BI001)，根据说明书生物素化 CD40L。在 ELISA 板上包被 1 $\mu\text{g/ml}$ 的人源 CD40，4°C 过夜孵育。加入如实施例 4 获得的 PBS 稀释至不同浓度 NK003: 0.156 $\mu\text{g/ml}$ 、0.313 $\mu\text{g/ml}$ 、0.625 $\mu\text{g/ml}$ 、1.25 $\mu\text{g/ml}$ 、2.5 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 和 20 $\mu\text{g/ml}$ ，HEL 为对照抗体，室温孵育 1 h 后，加入 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 生物素化的 CD40L，室温孵育 30 min 后，0.05% PBS-Tween 洗 8 次。加入 Streptavidin-HRP 使用酶标仪 (SpectraMax i3x) 读取 OD405 数值，检测结合 CD40L 与 CD40 的结合量。结果如图所示 6，NK003 阻断 CD40 与 CD40L 的结合。

5.3 NK003、NK004 以交联形式激活 NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞系

本实施例中通过流式细胞术检测 NK003、NK004 抗体激活 NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞系的情况，并且测定两种抗体的 EC₅₀，具体步骤如下：

分别取 3×10^5 个/管如实施例 1 中获得 NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞，分别加入如实施例 4 中获得的稀释至不同浓度的 NK003 或 NK004: 0.001 $\mu\text{g/ml}$ 、0.005 $\mu\text{g/ml}$ 、0.01 $\mu\text{g/ml}$ 、0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 和 10 $\mu\text{g/ml}$ ，10 $\mu\text{g/ml}$ ，利用 HEL 抗体做阴性对照；为了交联，各组同时加入 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的二抗，即山羊抗人 Fc。在含有 10% 胎牛血清 (Biological Industries, 04-001-1A) 的 RPMI 1640 培养基 (Lifetechnologies, C11875500CP) 中 37°C 共同培养 24h 后，PBS 洗三次，应用流式细胞仪进行分析。获得的数据使用 GraphPad Prism 6.0 拟合曲线并计算 EC₅₀。结果如图 7，NK003 对 CD40 的激活依赖二抗交联，以交联形式激活 NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞系，EC₅₀ 为 2 nM (图 7A)。NK004 对 CD40 的激活不依赖二抗交联，以组成型模式激活 NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞系，加入二抗时 EC₅₀ 为 4 Nm (图 7B)。

5.4 表面等离子共振对 NK003 动力学和亲和力定量分析

Biacore T200 (GE Healthcare) 用于检测抗体 NK003、NK004 的亲和力。将 NK003、NK004 以 10 $\mu\text{L/min}$ 流过 Protein A 芯片，捕获在芯片上。用 Running buffer (HBS-EP+, GE) 梯度稀释待测抗原人 CD40 重组蛋白 (Acrobiosystems, CD0-H5228)，浓度设置为 2 μM 、1 μM 、500 nM、250 nM、125 nM、62.5 nM、31.25 nM。将上述不同浓度 CD40 按 30 $\mu\text{L/min}$ 流速流过捕获有抗体的芯片，结合 120s，然后芯片以 30 $\mu\text{L/min}$ 的流速流过 Running buffer，240s，抗原逐渐从捕获抗体的芯片上解离。数据处理使用 Biacore T200 仪器配套软件 BIAevaluation software S200 进行，计算结合常数 (K_a)、解离常数 (K_d) 和平衡解离常数 (K_D)。结果如表 2 所示。

表 2 应用表面等离子共振技术平台测量抗体与人 CD40 的亲和力

传感器	抗体	抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
Protein A	NK003	CD40	3.67E+04	1.21E-02	3.31E-07
Protein A	NK004	CD40	8.87E+04	3.90E-02	4.40E-07

5.5 NK003 交叉反应

通过流式细胞术检测表达恒河猴和人的 CD40 的 293FT 细胞与 NK003 的结合，测定 NK003 与恒河猴和人 CD40 的交叉反应。

将恒河猴 CD40 (NCBI, NM_001265862.1) 与人 CD40 (NCBI, NM_001250.5) 的 CDS 区 (金唯智合成) 克隆到 pCDH 载体中, 使用标准步骤用 PEI 瞬时转染到 293FT 细胞中, 转染 6 h 后换液, 37 °C 培养于含 10% 胎牛血清 (Biological Industries, 04-001-1A) 的 DMEM 培养基中, 表达 48 h 后获得分别表达恒河猴 CD40 的细胞和表达人 CD40 的细胞。

分别取 3×10^5 个/管如上所述获得的表达恒河猴和人 CD40 的 293FT 细胞, 加入如实施例 4 所述制备的用 PBS 稀释至不同浓度的 NK003: 0.001 $\mu\text{g/ml}$ 、0.005 $\mu\text{g/ml}$ 、0.01 $\mu\text{g/ml}$ 、0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 和 10 $\mu\text{g/ml}$, HEL 10 $\mu\text{g/ml}$ 作为阴性对照, 将细胞和不同浓度 NK003 4 °C 共同孵育 30 min, PBS 洗三次, 按 1: 100 加入 Alexa Fluor 488 山羊抗人 Fc 荧光二抗 (Lifetechnologies, A11013), 避光 4 °C 孵育 30 min 后采用流式细胞仪进行分析。使用 GraphPad Prism 6.0 拟合曲线并计算 EC50, 结果如图 8 所示, 可见 NK003 与恒河猴 CD40 (图 8B)、人 CD40 (图 8A) 均有交叉反应, 与恒河猴 CD40 结合 EC50 为 8 nM, 与人 CD40 结合 EC50 为 10 nM。

5.6 NK003 诱导肿瘤细胞凋亡

淋巴瘤细胞 Raji 和 Ramos 膜表面有 CD40 的表达, 我们使用 Raji 细胞 (ATCC, CRL-7936) 和 Ramos 细胞 (ATCC, CRL-1596), 检测 NK003 促进肿瘤细胞凋亡的能力。

将 Raji 和 Ramos 细胞以 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于 24 孔板, 在含有 10% 胎牛血清 (Lifetechnologies, 10091148) 的 RPMI 1640 培养基中培养, 细胞接种同时加入如上文实施例 4 中所述制备的 PBS 稀释至不同浓度的 NK003: 0.03 $\mu\text{g/ml}$ 、0.06 $\mu\text{g/ml}$ 、0.09 $\mu\text{g/ml}$ 、0.3 $\mu\text{g/ml}$ 、0.6 $\mu\text{g/ml}$ 、0.9 $\mu\text{g/ml}$ 、3 $\mu\text{g/ml}$ 、6 $\mu\text{g/ml}$ 和 9 $\mu\text{g/ml}$, HEL 9 $\mu\text{g/ml}$ 作为阴性对照, 同时每孔按 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度加入山羊抗人 Fc 做交联剂。共同培养 24 h 后, PBS 洗三次, 1: 100 加入 PE-CD95 (Biolegend, 305611), 避光 4 °C 孵育 30 min。采用流式细胞仪分析细胞凋亡标志分子 CD95 的表达 (以 MFI 表示), 检测细胞凋亡情况。使用 GraphPad Prism 6.0 拟合曲线并计算 EC50。结果如图 9, NK003 促进 Raji 的凋亡, EC50 为 2.6 nM (图 9A); NK003 促进 Ramos 细胞的凋亡, EC50 为 3 nM (图 9B)。

实施例 6. 原代 T 细胞活性实验

6.1 DC 细胞激活

使用人外周血单核细胞 (PBMC) 检测 NK003 激活树突状细胞 (DC) 的能力。DC 细胞的分离为常规方法, 具体如下: PBMC (Hemacare, PB009C-3) 在 37 °C 含有 10% 胎牛血清 (Lifetechnologies, 10091148) 的 RPMI 1640 培养基中培养, 6 小时后收获贴壁的单核细胞; 除去上清, 添加含有 100 ng/mL GM-CSF (R&D Systems, 204-IL) 和 10 ng/mL IL4 (R&D Systems, 215-GM) 的无血清 RPMI 1640 培养基培养, 37 °C; 三天后将其中一半的培养基更换, 将 GM-CSF 和 IL4 补充至 100 ng/mL 和 10 ng/mL; 培养的第六天取悬浮的细胞换至新的培养瓶, 应用同样的含有 100 ng/mL GM-CSF 和 10 ng/mL IL4 的无血清 RPMI 1640 培养基继续培养 24 h, 获得 DC 细胞。

在第七天时, 将上述诱导获得的 DC 细胞以 1×10^5 个/孔的数量接种于 96 孔板, 加入不同浓度的 NK003: 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 、0.05 $\mu\text{g/ml}$ 、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ HEL 做阴性对照; 为了交联, 各组同时加入 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的山羊抗人 Fc。

将上述 DC 细胞和抗体共同孵育 24 h 后, PBS 洗三次, 1: 100 加入 PE-CD11c (DC 细胞标志分子, Biolegend, 117309) 和 APC-CD86 (DC 细胞激活标志分子, Biolegend, 105007), 避光 4 °C 孵育 30 min。应用流式细胞仪检测 DC 细胞激活情况, 以 APC-CD86 的 MFI 表示。

DC 细胞的激活可导致更强的抗肿瘤 T 细胞应答。使用 GraphPad Prism 6.0 拟合曲线并计算 EC50。结果如图 10, NK003 可以显著激活人 DC 细胞, EC50 为 2 nM (图 10A), 加交联剂 (山羊抗人 Fc, anti-Fc) 后 EC50 为 8 nM (图 10B), 且交联形式的 NK003 激活 DC 的强度比未交联明显增强 (MFI 显著更高)。

6.2 B 细胞增殖

使用人外周血单核细胞 (PBMC) 检测 NK003 诱导 B 细胞增殖的能力。使用 CD19 免疫磁珠试剂盒 (Miltenyi Biotec, 130-050-301), 根据试剂盒说明书从人 PBMC (Hemacare, PB009C-3) 中分选 CD19⁺ B 细胞。

将上述分选获得的 B 细胞培养于含有 10% 胎牛血清 (Lifetechnologies, 10091148) 的 RPMI 1640 培养基中, 添加 10 ng/mL IL4。将 B 细胞以 1×10^5 个/孔的数量接种于 96 孔板, 加入不同浓度的 NK003: 0.01 $\mu\text{g/ml}$, 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ HEL 做阴性对照对照。37°C 共同孵育 48 h 后, 使用 CellTiter-Glo 试剂盒 (Promega, G7570) 检测细胞的增殖情况: 根据试剂盒说明书取 70 μl 的细胞加入 100 μl CellTiter-Glo® Reagent, 混匀避光静置 10 min, 使用酶标仪读取荧光强度, 强度越高表示细胞增殖越强。使用 GraphPad Prism 6.0 拟合曲线并计算 EC50。结果如图 11, NK003 可以促进人 B 细胞的增殖, EC50 为 4 nM。

6.3 B 细胞激活

使用人外周血单核细胞 (PBMC) 检测 NK003 激活 B 细胞的能力。

如 6.2 所示, 从人 PBMC 中用 CD19 免疫磁珠试剂盒分选 CD19⁺ B 细胞。将上述分选获得的 B 细胞培养于含有 10% 胎牛血清 (Lifetechnologies, 10091148) 的 RPMI 1640 培养基中。将 B 细胞以 1×10^5 个/孔的数量接种于 96 孔板, 加入不同浓度的 NK003: 0.01 $\mu\text{g/ml}$, 0.05 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ HEL 做阴性对照。为了交联, 还进一步将上述各组加入 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的山羊抗人 Fc。共同孵育 48 h 后, PBS 洗三次, 1: 100 加入 PE-CD86 (B 细胞激活标志分子, Biolegend, 105007), 避光 4°C 孵育 30 min。应用流式细胞仪检测在加入抗体后 (交联和不交联情况下) B 细胞激活情况, 以 APC-CD86 的 MFI 表示。使用 GraphPad Prism 6.0 拟合曲线并计算 EC50。结果如图 12A 和 B 所示, NK003 可以激活人 B 细胞, 不加交联剂 (山羊抗人 Fc, anti-Fc) 时 EC50 为 70 nM (图 12A), 加交联剂后 EC50 为 4 nM (图 12B), 且交联形式的 NK003 激活 B 细胞的强度比未交联明显增强 (CD86 表达显著更高)。

实施例7. 人源 CD40 抗体 NK003 的体内表征

进行不同的体内实验以进一步表征 NK003 人源抗体的作用。

7.1 SCID 小鼠中 NK003 抑制肿瘤的生长

抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC) 是指抗体的 Fab 段结合肿瘤细胞的抗原表位, 其 Fc 段与杀伤细胞 (NK 细胞、巨噬细胞等) 表面的 FcR 结合, 介导杀伤细胞直接杀伤靶细胞。为了评价 NK003 介导的 ADCC 杀伤肿瘤细胞的作用, 我们使用 SCID 小鼠接种表达有 CD40 的肿瘤细胞。

八只五周龄的雄性 SCID 小鼠购于维通利华, 饲养于 SPF 级动物房。饲养一周后随机分为两组, 背部按 2.5×10^6 个/只的数量皮下接种 Raji 细胞, 每组接种四只, 接种当天记为 Day 0。第一组给药 NK003 抗体, 第二组给药 HEL 对照抗体。

Day 1 起, 将 NK003 以 7.5 mg/kg 的剂量腹腔注射, 每 7 天给药一次, 共三次, HEL 为对照抗体, 给药剂量和次数同 NK003。每三天称量小鼠体重并用游标卡尺测量肿瘤的垂直尺寸, 肿瘤的体积 = (长 × 宽 × 宽) / 2, 绘制肿瘤生长曲线。

结果显示, 与对照组相比, NK003 组小鼠未见明显肿瘤 (图 13 A), 且 NK003 组小鼠存活率为 100% (图 13 B)。NK003 可以通过介导 ADCC 作用显著抑制肿瘤的生长, 提高小鼠生存率。

7.2 CD40 人源化小鼠中 NK003 激活免疫系统

在 C57BL/6 遗传背景下, 将人源 CD40 及 Fc 受体 FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIIA 插入小鼠基因组, 在表达人源 CD40 和 Fc 受体蛋白的同时取代小鼠内源 CD40 和 Fc 受体的表达。CD40 人源化小鼠模型为上海交通大学李福彬构建并提供, 饲养于 SPF 级动物房。OT-1 小鼠为上海交通大学李福彬提供, 饲养于 SPF 级动物房。颈椎脱臼处死 OT-1 小鼠并摘取脾脏, 挤压破碎脾脏以收集脾细胞。使用免疫磁珠试剂盒 (R&D Systems, MAGM203), 按照试剂盒说明书分离 CD8⁺T 细胞, 即为 OT-1 CD8⁺T 细胞。

选取八周龄雄性 CD40 人源化小鼠按 2×10^6 个/只的数量尾静脉注射 OT-1 CD8⁺T 细胞, 同时腹腔注射 0.1 mg/kg DEC-OVA (Sigma-Aldrich, SAB4700735) 以及 5 mg/kg NK003 (相同剂量的 HEL 为对照抗体)。接种细胞七天后, 颈椎法处死小鼠分离脾脏。研磨脾脏获得单细胞悬液, 裂解法去除红细胞后, 使用抗-CD4 (ebioscience, RM4-5)、抗-CD8 (Biolegend, 53-6.7)、抗-CD45.1 (Biolegend, A20) 和抗-TCR-Vα2 (Biolegend, B20.1) 染色, 流式细胞仪检测 OVA 特异性 OT-1CD8⁺T 细胞的增殖。CD45.1⁺CD8⁺TCR-Vα2⁺ 亚群即为 OT-1CD8⁺T 细胞 (OT1 细胞)。CD45.1⁺CD8⁺ 亚群为 CD8 细胞, CD45.1⁺CD4⁺ 亚群为 CD4 细胞。结果如图 14, NK003 组 OT-1 CD8⁺T 细胞比例显著升高, 细胞数显著增加, CD8 与 CD4 比值也相应增高。NK003 可以激活 CD40 人源化小鼠免疫系统。

7.3 CD40 人源化小鼠中 NK003 抑制肿瘤的生长

为了评价 NK003 激活免疫系统抑制肿瘤的作用, 我们使用如 7.2 中所述的上海交通大学李福彬构建并提供的 CD40 人源化小鼠进行肿瘤细胞 MC38 (中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心, 3111C0001CCC000523) 的接种。

本文所用阳性对照抗 CD40 抗体 CP870893 序列来自专利 US 7338660 (轻链和重链序列参见其中的 SEQ ID NO: 46 和 SEQ ID NO: 48)。将金唯智合成的 CP870893 轻链和重链转染到 pFUSE 载体中, 按 1: 1 瞬时共转染 293F 悬浮细胞, 表达全长抗体, 表达 1 周后在 AKTA 系统上使用 Superdex™ 200 Increase 预装柱纯化 (具体步骤同实施例 4 所述)。

将八周龄的雄性 CD40 人源化小鼠背部按 2×10^6 个/只的数量皮下接种 MC38 细胞, 当肿瘤长至约 100 mm³ 随机分为三组: HEL 对照组 8 只, NK003 及 CP870893 (阳性对照) 组各五只, 将抗体以 3 mg/kg 的剂量腹腔注射, 每 3 天给药一次, 共两次。每三天称量小鼠体重并用游标卡尺测量肿瘤的垂直尺寸, 肿瘤的体积 = (长 × 宽 × 宽) / 2, 绘制肿瘤生长曲线及小鼠体重曲线。抑瘤率 = (对照组平均体积 - 实验组平均体积) / 对照组平均体积 × 100%。

结果如图 15A, 其中在第 18 天时, NK003 的肿瘤抑制率为 75%, 而 CP870893 的肿瘤抑制率仅为 60%。同时我们对小鼠体重进行检测, 如图 15B 所示, 应用 NK003 抗体的小鼠体重无明显降低。因此, NK003 可以显著抑制肿瘤的生长, 并且对小鼠体重没有显著影响。

实施例 8. NK003-V12、NK003-S267E/L328F Fc 区突变体增加与 FcγRIIB 的结合和 CD40 激

动剂活性

为了增加与 FcγR 的结合和增加 NK003 抗体的激动剂活性，NK003 Fc 区 (IgG1, EU 编号) 的第 233 位残基谷氨酸 (E) 突变为天冬氨酸 (D)，第 237 位残基甘氨酸 (G) 突变为天冬氨酸 (D)，第 268 位残基组氨酸 (H) 突变为天冬氨酸 (D)，第 271 位残基脯氨酸 (P) 突变为甘氨酸 (G)，第 330 位残基丙氨酸 (A) 突变为精氨酸 (R)，产生 NK003-V12 突变体。NK003 Fc 区 (IgG1, EU 编号) 的第 267 位残基丝氨酸 (S) 突变为谷氨酸 (E)，第 328 位残基亮氨酸 (L) 突变为苯丙氨酸 (F)，产生 NK003-S267E/L328F 突变体 (序列见序列列表)。NK003-V12 和 NK003-S267E/L328F 突变体构建以后通过测序确认。

表 3 NK003 Fc 区突变体突变位点概括

突变体	氨基酸置换				
NK003-V12	E233D	G237D	H268D	P271G	A330R
NK003-S267E /L328F	S267E		L328F		

为了评价 NK003-V12 和 NK003-S267E/L328F 突变体的激动剂活性，将金唯智合成的 NK003-V12 和 NK003-S267E/L328F 突变体的轻链和重链转染到 pFUSE 载体中，按 1: 1 瞬时共转染 293F 悬浮细胞，表达全长抗体，表达 1 周后在 AKTA 系统上使用 Superdex™ 200 Increase 预装柱纯化 (具体步骤同实施例 4 所述)。

将金唯智合成的 FcγRIIA (NCBI, NM_001136219.1) 与 FcγRIIB (NCBI, NM_004001.4) CDS 区克隆到 pCDH 载体中，使用标准步骤用 PEI 瞬时转染到 293FT 细胞中，转染 6 h 后换液，37 °C 培养于含 10% 胎牛血清 (Biological Industries, 04-001-1A) 的 DMEM 培养基中，表达 48 h 后获得分别表达 FcγRIIA 的细胞和表达 FcγRIIB 的 293FT 细胞。

分别取如上所述 2×10^5 个/管 293FT-FcγRIIA 或 293FT-FcγRIIB 细胞，每管中分别加入 2×10^5 个/管 NF-κB-GFP+hCD40 报告细胞 (实施例 1 所述)。向每管中加入制备的 PBS 稀释的不同浓度 NK003、NK003-V12 和 NK003-S267E/L328F: 0.01 μg/ml、0.05 μg/ml、0.1 μg/ml、0.5 μg/ml、1 μg/ml、5 μg/ml 和 10 μg/ml，10 μg/ml HEL 做阴性对照；37 °C 共同培养 24h 后，PBS 洗三次，应用流式细胞仪分析，检测 GFP 的 MFI。结果如图 16，NK003-V12、NK003-S267E/L328F 和野生型 NK003 相比，激动剂活性显著增强。

实施例 9. 人源 CD40 抗体 NK003 的亲合力成熟

针对 NK003 VH、VL 的互补决定区和骨架区分别构建突变库，以 Fab 形式 (图 17) 插入 pcomb3 噬菌体载体 (Biovector Inc. 108925)，使用噬菌体亲和力成熟方法完成 NK003 的优化。

9.1 NK003 VH、VL 互补决定区 CDR3 亲和力成熟

9.1.1 NK003 VH、VL 互补决定区 CDR3 突变库的构建

以 CDR3 插入终止密码子的 NK003 轻链 DNA (SEQ ID NO: 72) 为模板，分别使用引物对 VL1/VL2、CL1/CL2 扩增轻链 VL、CL 片段。反应条件: 95°C 2min, 1 cycle; 95°C 30s, 65°C 30s, 72°C 10s, 35 cycle; 72°C 5min, 1 cycle。使用天根回收试剂盒回收 PCR 目的

片段。引物如下：

VL1: 5'-GCGGCCGAGCTCGATGTTGTGATGACTCAG-3'

VL2: 5'-GGTCCCCTGGCCAAA AGT GTA CGG AGT TCA TAG ACC TTG CAT
GCAGTAATAAAG-3' (横线处随意两处突变为MNN, 由金唯智公司高通量合成)

CL1: 5'-TTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATC-3'

CL2: 5'-TATCTAGATTAATTAAATCACTCTCCCCTGTTGAAGCTC-3'

将上述两部分 PCR 产物进行 overlap PCR 扩增获得 NK003 轻链突变库。反应条件: 95°C 2min, 1 cycle; 95°C 30s, 65°C 30s, 72°C 20s, 8 cycle; 加入 VL1/CL2 引物, 95°C 30s, 65°C 30s, 72°C 20s, 27 cycle; 72°C 5min, 1 cycle。用 SacI (NEB, R3156L) 和 PacI (NEB, R0547L) 分别对 NK003 轻链突变库、pcomb3 载体双酶切, 使用天根回收试剂盒回收 PCR 目的片段。突变库基因与载体按摩尔比 3:1 经 T4 连接酶 (NEB, M0202L) 25°C 连接 3h。将连接产物使用电转法转至 XL1-Blue 电转感受态中, 构建库容量为 5×10^5 轻链突变库, 命名为 pcomb3-NK003-LCDR3。

以 CDR3 插入终止密码子的 NK003 重链 DNA (SEQ ID NO: 73) 为模板, 分别使用引物对 VH1/VH2、CH1-1/CH1-2 扩增重链 VH、CH1 片段。反应条件: 95°C 2min, 1 cycle; 95°C 30s, 65°C 30s, 72°C 10s, 35 cycle; 72°C 5min, 1 cycle。引物如下:

VH1: 5'-TGCAGCTGCTCGAGCAGGTACAGCTGGTGCAGTC-3'

VH2: 5'-CTTTGCCCCAGACGTC CAT GTA GTA GTA GGT TCA AGT AGC TCC CAC
TCT TTC TCTCGACAG-3' (横线处随意两处突变为MNN, 由金唯智公司高通量合成)

CH1-1: 5'-GACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTC-3'

CH1-2: 5'-GCCTGGCCACTAGTTTTGTCAACTTTCTTGTCC-3'

将上述两部分 PCR 产物进行 overlap PCR 扩增获得 NK003 重链突变库, 反应条件: 95°C 2min, 1 cycle; 95°C 30s, 65°C 30s, 72°C 20s, 8 cycle; 加入 VH1/CH1-2 引物, 95°C 30s, 65°C 30s, 72°C 20s, 27 cycle; 72°C 5min, 1 cycle。用 SpeI (NEB, R3133L) 和 XhoI (NEB, R0146L) 分别对 NK003 重链突变库、pcomb3-NK003-LCDR3 载体双酶切, 使用天根回收试剂盒回收 PCR 目的片段。突变库基因与载体按摩尔比 3:1 经 T4 连接酶 25°C 连接 3h。将连接产物使用电转法转至 XL1-Blue 电转感受态中, 构建库容量为 2.4×10^7 轻重链双突变库, 命名为 pcomb3-NK003-AM。

9.1.2 噬菌体突变抗体库筛选

使用 pcomb3-NK003-AM 抗体库, 筛选与 CD40 结合的抗体, 具体筛选方法见实施例 2。筛选结果如表 1。

表 12 利用噬菌体展示技术从 pcomb3-NK003-AM 抗体库中筛选 CD40 结合抗体

		第一轮	第二轮	第三轮
CD40	起始数	7.2×10^{11}	8×10^{11}	8×10^{11}
	获得数	1.28×10^8	1.3×10^7	4.9×10^6

抗原浓度	20nM	2nM	0.2nM
------	------	-----	-------

为了初步评估筛选到 CD40 结合抗体的阳性率,我们挑取第三轮 32 个噬菌体单克隆,进行噬菌体 ELISA 分析。噬菌体 ELISA 具体方法见实施例 2。将 CD40 结合信号是 BSA 对照的 3 倍以上定义为阳性克隆。结果如图 18,第三轮筛选阳性率为 96.8%。

将第三轮洗脱的噬菌体感染 XL1-blue 后涂板,刮板混匀后使用天根质粒小提试剂盒提取 NK003-AM 质粒。使用 SacI 和 SpeI 双酶切后回收 1500bp 左右的目的片段,送至金唯智进行三代测序。测序结果如图 19。依据三代测序结果,合成筛选出的抗体 NK003-AM-9、NK003-AM-18 重链和轻链 DNA (金唯智),将其分别克隆至载体 pFUSE 中,纯化表达具体方法见实施例 4。NK003-AM-9、NK003-AM-18 VH/VL 序列参见序列表 6 至表 8。

9.1.3 NK003 CDR3 亲和力成熟活性鉴定

本实施例中通过流式细胞术检测 NK003-AM-9、NK003-AM-18 抗体激活 NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞系的情况,具体步骤如下:

分别取 3×10^5 个/管如实施例 1 中获得 NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞,分别加入不同浓度的 NK003-AM-9、NK003-AM-18 及 NK003: 0.01 μ g/ml、0.05 μ g/ml、0.1 μ g/ml、0.5 μ g/ml 和 1 μ g/ml;为了交联,各组同时加入 2.5 μ g/ml 浓度的二抗,即山羊抗人 Fc (SouthernBiotech, SBA-2048-01)。在含有 10%胎牛血清 (Biological Industries, 04-001-1A) 的 RPMI 1640 培养基 (Lifetechnologies, C11875500CP) 中 37°C 共同培养 24h 后, PBS 洗三次,应用流式细胞仪进行分析。获得的数据使用 GraphPad Prism 6.0 拟合曲线并计算 EC50。结果如图 20, NK003-AM-9、NK003-AM-18 以交联形式激活 NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞系, EC50 分别为 0.25nM、0.3nM,二者活性相似,均比野生型 NK003 提高了近 10 倍。

9.2 NK003 VH、VL 骨架区亲和力成熟

9.2.1 NK003 VH、VL 骨架区突变库的构建

以 NK003 轻链 DNA (SEQ ID NO:74) 为模板,使用随机突变 PCR 试剂盒(Agilent Technologies, 200550)和引物对 VL1/VL2、VL3/VL4 进行巢氏 PCR 扩增轻链 VL 区域,反应条件: 95°C 2min, 1 cycle; 95°C 30s, 65°C 30s, 72°C 30s, 28 cycle; 72°C 10min, 1 cycle。以 NK003 轻链 DNA (SEQ ID NO:11) 为模板,使用引物对 CL1/CL2 扩增轻链 CL 区域,反应条件: 95°C 2min, 1 cycle; 95°C 30s, 65°C 30s, 72°C 30s, 30 cycle; 72°C 5min, 1 cycle。使用天根回收试剂盒回收 PCR 目的片段。引物如下:

VL1: 5'-CTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTG-3'

VL2: 5'-CCAGATTTCAACTGCTCATCAGATGGC-3'

VL3: 5'-CTACCGTGGCCCAGGCGGCCGAGCTC-3'

VL4: 5'-GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTTCG-3'

CL1: 5'-CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC-3'

CL2: 5'-TATCTAGATTAATTAAATCACTCTCCCCTGTTGAAGCTC-3'

将上述 VL、CL PCR 产物进行 overlap PCR 扩增获得 NK003 轻链突变库。反应条件: 95°C 2min, 1 cycle; 95°C 30s, 65°C 30s, 72°C 40s, 8 cycle; 加入 VL3/CL2 引物, 95°C 30s,

65℃ 30s, 72℃ 40s, 27cycle; 72℃ 10min, 1 cycle。用 SacI 和 PacI 分别对 NK003 轻链突变库、pcomb3 载体双酶切, 使用天根回收试剂盒回收 PCR 目的片段。突变库基因与载体按摩尔比 3:1 经 T4 连接酶 25℃ 连接 3h。将连接产物使用电转法转至 XL1-Blue 电转感受态中, 构建库容量为 1×10^5 轻链突变库, 命名为 pcomb3-NK003-VL。

以 NK003 重链 DNA (SEQ ID NO:75) 为模板, 使用引物对 VH1/VH2、VH3/VH4 进行巢氏 PCR 扩增重链 VH 区域, 反应条件 3: 95℃ 2min, 1 cycle; 95℃ 30s, 65℃ 30s, 72℃ 30s, 28cycle; 72℃ 10min, 1 cycle。以 NK003 重链 DNA (SEQ ID NO:12) 为模板, 使用引物对 CH1-1/CH1-2 扩增重链 CH1 区域, 反应条件: 95℃ 2min, 1 cycle; 95℃ 30s, 65℃ 30s, 72℃ 30s, 32cycle; 72℃ 10min, 1 cycle。使用天根回收试剂盒回收 PCR 目的片段。引物如下:

VH1: 5'-GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGC-3'

VH2: 5'-CAGAGGTGCTCTTGGAGGAGGGTGCC-3'

VH3: 5'-GCCATGGCCGAGGTGCAGCTGCTCGAG-3'

VH4: 5'-GAAGACCGATGGGCCCTTGGTGGAGGC-3'

CH1-1: 5'-GCCTCCACCAAGGGCCCCATCGGTCCTC-3'

CH1-2: 5'-GCCTGGCCACTAGTTTTGTCAACTTTCTTGTCC-3'

将上述 VH、CH1 PCR 产物进行 overlap PCR 扩增获得 NK003 重链突变库。反应条件: 95℃ 2min, 1 cycle; 95℃ 30s, 65℃ 30s, 72℃ 40s, 8 cycle; 加入 VH3/CH1-2 引物, 95℃ 30s, 65℃ 30s, 72℃ 40s, 27 cycle; 72℃ 10min, 1 cycle。用 SpeI 和 XhoI 分别对 NK003 重链突变库、pcomb3-NK003-VL 载体双酶切, 使用天根回收试剂盒回收 PCR 目的片段。突变库基因与载体按摩尔比 3:1 经 T4 连接酶 25℃ 连接 3h。将连接产物使用电转法转至 XL1-Blue 电转感受态中, 构建库容量为 2.4×10^7 轻重链双突变库, 命名为 pcomb3-NK003-EP。

9.2.2 噬菌体突变抗体库筛选

使用 pcomb3-NK003-EP 抗体库, 筛选与 CD40 结合的抗体, 具体筛选方法见实施例 2。筛选结果如表 2。

表 13 利用噬菌体展示技术从 pcomb3-NK003-EP 抗体库中筛选 CD40 结合抗体

	第一轮	第二轮	第三轮
	起始数	7×10^{11}	7.6×10^{11}
CD40	获得数	3.7×10^7	4.3×10^6
	抗原浓度	20nM	2nM

将第三轮洗脱的噬菌体感染 XL1-blue 后涂板, 刮板混匀后使用天根质粒小提试剂盒提取 NK003-EP 质粒。使用 SacI 和 SpeI 双酶切后回收 1500bp 左右的目的片段, 送至金唯智进行三代测序。测序结果如图 21。依据三代测序结果, 合成抗体 NK003-AM-18-EP1 重链 DNA (金唯智), 将其克隆至载体 pFUSE 中。使用标准步骤用 PEI 将分别含有 NK003-AM-18 轻链和 NK003-AM-18-EP1 重链的质粒二者按 1: 1 瞬时共转染至 293F 悬浮细胞, 以表达全长 NK003-AM-18-EP1 抗体。纯化表达具体方法见实施例 4。NK003-AM-18-EP1 VH 序列参见序

列表 6。

9.2.3 NK003 骨架区亲和力成熟活性鉴定

本实施例中通过流式细胞术检测NK003-AM-18-EP1 抗体激活 NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞系的情况，具体步骤如下：

分别取 3×10^5 个/管如实施例 1 中获得 NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞，分别加入不同浓度的 NK003-AM-18、NK003-AM-18-EP1 及 NK003：0.0075 nM、0.025 nM、0.075 nM、0.25 nM、0.75 nM、2.5 nM 和 7.5 nM；为了交联，各组同时加入 2.5 μ g/ml 浓度的二抗，即山羊抗人 Fc。在含有 10%胎牛血清(Biological Industries, 04-001-1A)的 RPMI 1640 培养基(Lifetechnologies, C11875500CP)中 37°C 共同培养 24h 后，PBS 洗三次，应用流式细胞仪进行分析。获得的数据使用 GraphPad Prism 6.0 拟合曲线并计算 EC50。结果如图 22，NK003-AM-18-EP1 以交联形式激活 NF- κ B-GFP+hCD40 报告细胞系，EC50 为 0.35nM，与 NK003-AM-18 活性相似。

< PF 200148PCT>

序列:

表 4 本发明示例性抗体重链可变结构域 (VH) (或重链可变区 HCVR) 的 FR 和 CDR 的序列 (CDR 序列以 IMGT 规则定义)

抗体编号	VH FR1	VH CDR1	VH FR2	VH CDR2	VH FR3	VH CDR3	VH FR4
NK003	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKAS(SEQ ID NO:23)	GYTFTGYY(SEQ ID NO:1)	MHWVRQAPGQ GLEWMGW(SE Q ID NO:25)	INPNSGGT(SE Q ID NO:3)	NYAQKFQGRVT MTRDTSISTAYM ELSLRSDDTAV YYC(SEQ ID NO:27)	ARERVGATPTYYYMDV(SEQ ID NO:5)	WGKGTTV TVSS(SEQ ID NO:29)
NK003-AM-9	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:27	ARERVGATPTYYYWDV (SEQ ID NO:51)	SEQ ID NO:29
NK003-AM-18	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:27	ARERVGANPTYYYWDV (SEQ ID NO:52)	SEQ ID NO:29
NK003-AM-18-EP	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	MYWVRQAPGQ GLEWMGW(SEQ ID NO:76)	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:29
共有序列	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:27	ARERVGAXIPTYYYX2X3DV (SEQ ID NO:55)	SEQ ID NO:29
NK004	QVQLVESGGGL VQPGRSLRISC AGS(SEQ ID NO:24)	GFTFGDSA(S EQ ID NO:2)	MHWVRQAPGK GLEWVSG(SEQ ID NO:26)	ISRNSDT(SE Q ID NO:4)	VYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTALY YC(SEQ ID NO:28)	ARRSGDHHAMDV(SEQ ID NO:6)	WGPGTTV TVSS(SEQ ID NO:30)

表 5 本发明示例性抗体轻链可变结构域 (VL) (或轻链可变区 LCVR) 的 FR 和 CDR 的序列 (CDR 序列以 IMGT 规则定义)

抗体编号	VL FR1	VL CDR1	VL FR2	VL CDR2	VL FR3	VL CDR3	VL FR4
NK003	DVVMQTQSPSLP/TPGE SATISCRSS(SEQ ID NO:31)	QSLLYSNGY NY(SEQ ID NO:7)	LDWYLLKPGQSPQ LLIY(SEQ ID NO:33)	LGS(SEQ ID NO:9)	NRASGVPDFRFSG SGSGIDFTLKISR VEAEDVGLYYC(SEQ ID NO:35)	MQGLETPYVT(SEQ ID NO:11)	FGQGTKLE IK(SEQ ID NO:37)
NK003-	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:35	MNGLEVPTYT (SEQ ID NO:11)	SEQ ID NO:37

< PF 200148PCT>

AM-9		NO:7		ID NO:9		NO:53)	NO:37
NK003-AM-18/	SEQ ID NO:31	SEQ NO:7	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:35	MQQLEQPYT (SEQ ID NO:54)	SEQ ID NO:37
NK003-AM-18-E							
P							
共有序列	SEQ ID NO:31	SEQ NO:7	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:35	MX1X2LX3X4PYT (SEQ ID NO:56)	SEQ ID NO:37
NK004	ETTLTQSPATLSLSPGERA TLSCRAS(SEQ ID NO:32)	QSVNTY(SEQ ID NO:8)	LAWYQKPGQAP RLLMY(SEQ ID NO:34)	DSS(SEQ ID NO:10)	SRATGHPDRFSGS GSGTDFTLTISRL EPEDEAVYYC(SEQ ID NO:36)	QQYSTVPLT(SEQ ID NO:12)	FGGGTKLEIK(SEQ ID NO:38)

表 6 本发明示例性抗体重链可变结构域 (VH) (或重链可变区 HCVR) 的 DNA 和氨基酸的序列

抗体编号	VH DNA 序列	VH 氨基酸序列
NK003	SEQ ID NO:39	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFITGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTR DTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCARERV/GATPTYYYYMDVWGKGTITVTVSS(SEQ ID NO:13)
NK003-AM-9	SEQ ID NO:57	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFITGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELSLRSDDTAVYYCARERV/GATPTYYYYMDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO:58)
NK003-AM-18	SEQ ID NO:59	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFITGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELSLRSDDTAVYYCARERV/GANPTYYYYMDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO:60)
NK003-AM-18-EP1	SEQ ID NO:61	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFITGYMHVVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSI STAYMELSLRSDDTAVYYCARERV/GANPTYYYYMDVWGKGTITVTVSS (SEQ ID NO:62)
NK004	SEQ ID NO:40	QVQLVESGGGLVQPGRSLRISCAGSGFTFGDSAMHVVRQAPGKGLEWVSGISRNSDTIVYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARRSGDHHAMDVWGPGTITVTVSS(SEQ ID NO:14)

< PF 200148PCT>

表 7 本发明示例性抗体轻链可变结构域 (VL) (或轻链可变区 LCVR) 的 DNA 和氨基酸的序列

抗体编号	VL DNA 序列	VL 氨基酸序列
NK003	SEQ ID NO:41	DVVMTQSPVLPVTPGESATISCRSSQSLYSNGYNLDWYLLKPGQSPQLLIYLGNSRASGVDPDRFSGSGGTDFTLKISR VEAEDVGLYYCMQGLETPYTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO:15)
NK003-AM-9	SEQ ID NO:63	DVVMTQSPVLPVTPGESATISCRSSQSLYSNGYNLDWYLLKPGQSPQLLIYLGNSRASGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEA EDVGLYYCMNGLEVPTFGQGTKEIK (SEQ ID NO:64)
NK003-AM-18/ NK003-AM-18-EP1	SEQ ID NO:65	DVVMTQSPVLPVTPGESATISCRSSQSLYSNGYNLDWYLLKPGQSPQLLIYLGNSRASGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEA EDVGLYYCMQQLQPYTFGGQTKLEIK (SEQ ID NO:66)
NK004	SEQ ID NO:42	ETTLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNTYLAWYQQKPGQAPRLLMYDSSSRATGIPDRFSGSGGTDFTLISRLEPEDF AVYYCCQYSTVPLTFGGGTKEIK (SEQ ID NO:16)

表 8 本发明示例性抗体的重链和轻链序列

抗体编号	IgG 形式	重链的氨基酸序列	轻链的氨基酸序列
NK003	IgG1	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:21
NK003-V12	IgG1 突变体	SEQ ID NO:18	
NK003-S267E/L328F	IgG1 突变体	SEQ ID NO:19	
NK003-AM-9	IgG1	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:68
NK003-AM-18	IgG1	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:71
NK003-AM-18-EP1	IgG1	SEQ ID NO:70	
NK004	IgG1	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:22

表 9 本发明示例性信号肽 DNA 和氨基酸序列

信号肽 DNA 序列	信号肽氨基酸序列
ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATGCACCTAAGCTTGCACCTTGTCACGA ATTTCG (SEQ ID NO:44)	MYRMQLLSICIALSLALVTNS (SEQ ID NO:43)

< PF 200148PCT>

表 10. 本发明对照抗体 HEL 的氨基酸和 DNA 序列

抗体编号	IgG 形式	重链的氨基酸序列	轻链的氨基酸序列
HEL	IgG1	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46
抗体编号	IgG 形式	重链的 DNA 序列	轻链的 DNA 序列
HEL	IgG1	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48

表 11. 本发明对照抗体 N27 的氨基酸和 DNA 序列

抗体编号	氨基酸序列
N27	SEQ ID NO:49
抗体编号	DNA 序列
N27	SEQ ID NO:50

权利要求

1、结合 CD40 的抗体或其抗原结合片段，其包含

(i) 如 SEQ ID NO: 13、58、60 或 62 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 15、64 或 66 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(ii) 如 SEQ ID NO: 13 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 15 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(iii) 如 SEQ ID NO: 58 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 64 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(iv) 如 SEQ ID NO: 60 或 62 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 66 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(v) 如 SEQ ID NO: 14 所示的重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 16 所示的轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(vi) (i) - (v) 中任一项的 CDR 组合，其中相比 HCDR3 和/或 LCDR3，在所述序列上包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变（优选地氨基酸置换，优选地保守置换）。

2、结合 CD40 的抗体或其抗原结合片段，其包含

(i) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:5；或者

(ii) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:51；或者

(iii) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:52；或者

(iv) (i)-(iii) 中任一项的 HCDR 组合，其中在所述 HCDR3 包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)；

和

(i) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11；或者

(ii) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:53；或者

(iii) 包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:54；或者

(iv) (i)-(iii) 中任一项的 LCDR 组合，其中在所述 LCDR3 包含至少一个且不超过 3、2 或 1

个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)。

3、结合 CD40 的抗体或其抗原结合片段, 其包含

(i) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:5, 以及包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:11; 或者

(ii) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:51, 以及包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:53; 或者

(iii) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:52, 以及包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:54; 或者

(iv) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:6, 以及包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:12;

(v) 包含或由下述序列组成的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3: SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:55, 以及包含或由下述序列组成的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3: SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9 和 SEQ ID NO:56;

(vi) (i)-(iv) 中任一项的 HCDR 和 LCDR 组合, 其中在所述 HCDR3 和/或 LCDR3 中包含至少一个且不超过 3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)。

4、权利要求 1 至 3 中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL, 其中,

(a) 重链可变区 VH

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:13、58、60、62 或 14 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其组成; 或者

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 13、58、60、62 或 14 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 13、58、60、62 或 14 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, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中, 优选地, 所述氨基酸改变发生在 FR 区中;

和/或

(b) 轻链可变区 VL

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:15、64、66 或 16 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其组成;

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 15、64、66 或 16 的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 15、64、66 或 16 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, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中, 优选地, 所述

氨基酸改变发生在 FR 区中。

5、权利要求 4 的抗体或其抗原结合片段，其中

- (i) 重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO: 13、58、60 或 62 的氨基酸序列或由其组成，和轻链可变区 VL 包含选自 SEQ ID NO: 15、64 或 66 的氨基酸序列或由其组成；
- (ii) 重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列或由其组成，和轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列或由其组成；
- (iii) 重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO: 58 的氨基酸序列或由其组成，和轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO: 64 的氨基酸序列或由其组成；
- (iv) 重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO: 60 的氨基酸序列或由其组成，和轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列或由其组成；
- (v) 重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO: 62 的氨基酸序列或由其组成，和轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO: 66 的氨基酸序列或由其组成；
- (vi) 重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO: 14 的氨基酸序列或由其组成，和轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列或由其组成。

6、权利要求 1 至 5 中任一项目的抗体或其抗原结合片段，其包含重链和/或轻链，其中

(a) 重链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 17、18、19、67、69、70 或 20 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其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 17、18、19、67、69、70 或 20 的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 17、18、19、67、69、70 或 20 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在重链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在重链可变区中，最优选地，所述氨基酸改变发生在重链恒定区中；

和/或

(b) 轻链

(i) 包含与选自 SEQ ID NO: 21、68、71 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其组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 21、68、71 或 22 的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 21、68、71 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，优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链可变区中，最优选的，所述重链氨基酸改变发生在轻链恒定区中。

7、权利要求 6 的抗体或其抗原结合片段，其中

- (i) 重链包含 SEQ ID NO: 17、18、19、67、69 或 70 的氨基酸序列或由其组成, 和轻链包含 SEQ ID NO: 21、68 或 71 的氨基酸序列或由其组成;
- (ii) 重链包含 SEQ ID NO: 17、18 或 19 的氨基酸序列或由其组成, 和轻链包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列或由其组成;
- (iii) 重链包含 SEQ ID NO: 67 的氨基酸序列或由其组成, 和轻链包含 SEQ ID NO: 68 的氨基酸序列或由其组成;
- (iv) 重链包含 SEQ ID NO: 69 或 70 的氨基酸序列或由其组成, 和轻链包含 SEQ ID NO: 71 的氨基酸序列或由其组成;
- (v) 重链包含 SEQ ID NO: 20 的氨基酸序列或由其组成, 和轻链包含 SEQ ID NO: 22 的氨基酸序列或由其组成。

8、权利要求 1 至 7 中任一项的结合 CD40 的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体是单克隆抗体。

9、权利要求 1 至 8 中任一项的结合 CD40 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人抗体或嵌合抗体。

10、权利要求 1 至 9 中任一项的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: Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)或(Fab')₂、单结构域抗体、diabody(dAb)或线性抗体。

11、分离的核酸, 其编码权利要求 1 至 10 中任一项的结合 CD40 的抗体的任一或多条链或其抗原结合片段。

12、载体, 其包含权利要求 11 的核酸, 优选地所述载体是表达载体。

13、宿主细胞, 其包含权利要求 11 的核酸或权利要求 12 的载体, 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(例如所述宿主细胞是 CHO 细胞, 例如 CHOS 细胞 CHOK1SV 细胞或 CHOK1SV GS-KO, 或所述宿主细胞是 293 细胞, 例如 HEK293 细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。

14、制备结合 CD40 的抗体或其抗原结合片段的方法, 所述方法包括在适于表达抗体的情况下, 培养包含编码权利要求 1-10 中任一项的抗体或其抗原结合片段的核酸的宿主细胞, 任选地所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述抗体或其抗原结合片段。

15、免疫缀合物, 其包含权利要求 1 至 10 中任一项的结合 CD40 的抗体或其抗原结合片段和其它物质, 例如治疗剂或标记。

16、药物组合物, 其包含权利要求 1 至 10 中任一项的结合 CD40 的抗体或其抗原结合片段或权利要求 13 的免疫缀合物, 以及任选地一种或多种其它治疗剂, 以及任选地药用辅料。

17、组合产品, 其包含权利要求 1 至 10 中任一项的结合 CD40 的抗体或其抗原结合片段

或权利要求 15 的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂。

18、权利要求 15 的免疫缀合物、权利要求 16 的药物组合物或权利要求 17 的组合产品，其中所述治疗剂选自化疗剂、其他抗体、细胞毒性剂、疫苗、抗感染活性剂、小分子药物或免疫调节剂。

19、在受试者中增强免疫应答（例如抗原特异性 T 细胞应答）的方法，其包括向受试者施用有效量的权利要求 1-10 中任一项的抗体或其抗原结合片段、或权利要求 16 或 18 的免疫缀合物、或权利要求 16 或 18 的药物组合物，或权利要求 17 或 18 的组合产品。

20、预防或治疗受试者的需要在受试者中调节（例如增强）免疫应答的疾病或 CD40 相关疾病的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的权利要求 1-10 中任一项的抗体或其抗原结合片段、或权利要求 15 或 18 的免疫缀合物、或权利要求 16 或 18 的药物组合物，或权利要求 17 或 18 的组合产品，优选地，所述疾病为肿瘤，例如淋巴瘤、结肠癌、结直肠癌、直肠癌、肺癌（例如非小细胞肺癌）、肝癌、胃癌及其转移性癌症；或感染，例如慢性感染，或病毒感染。

21、权利要求 20 所述的方法，其还包括向所述受试者联合施用一种或多种疗法，例如治疗方式和/或其它治疗剂，优选地，治疗方式包括手术治疗和/或放射疗法，和/或其它治疗剂选自化疗剂、其他抗体、细胞毒性剂、疫苗、抗感染活性剂、小分子药物或免疫调节剂。

22、检测试剂盒，其包含权利要求 1-10 中任一项的抗体或其抗原结合片段或权利要求 15 的免疫缀合物。