

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/63

[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/00 G01N 33/53

A61K 38/00 C07K 5/00

C07K 14/00 C07K 16/00

C07H 21/04

[21] 申请号 00811357.2

[43] 公开日 2002 年 9 月 11 日

[11] 公开号 CN 1369015A

[22] 申请日 2000.6.8 [21] 申请号 00811357.2

[30] 优先权

[32] 1999.6.8 [33] US [31] 09/328296

[86] 国际申请 PCT/US00/15749 2000.6.8

[87] 国际公布 WO00/75348 英 2000.12.14

[85] 进入国家阶段日期 2002.2.5

[71] 申请人 西雅图基因公司

地址 美国华盛顿州

[72] 发明人 C·B·西加尔 A·F·瓦尔

J·A·弗兰西斯科

小 H·P·菲尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥

权利要求书 9 页 说明书 60 页 附图页数 10 页

[54] 发明名称 重组抗 - CD40 抗体及其应用

[57] 摘要

本发明涉及预防和治疗癌症、炎症性疾病和免疫系统疾病或缺陷的方法和组合物。本发明的方法包括给予增强 CD40 与 CD40 配体结合的 CD40 结合蛋白。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种包含 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、
SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 的分子，所述分子(a)免疫特异性地
5 结合 CD40，和(b)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)
分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在一级氨基酸序列中包含一个或
多个取代或插入。

2. 一种包含 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、
SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 的分子，所述分子(a)免疫特异性地
10 结合 CD40，和(b)不是由杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为
PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6，且不是由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切
割 S2C6 产生。

3. 权利要求 1 或 2 的分子，所述分子含有 SEQ ID NO: 2 的氨基
酸序列，或者含有 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列，或者既含有 SEQ ID
15 NO: 2 的氨基酸序列，也含有 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列。

4. 权利要求 1 或 2 的分子，它是一种抗体。

5. 权利要求 1 或 2 的分子，它是一种融合蛋白，含有为非抗体的
第二种分子的氨基酸序列。

6. 权利要求 5 的分子，它含有融合至 SEQ ID NO: 7 或融合至
20 SEQ ID NO: 2 的 bryodin (BD1)的氨基酸序列。

7. 权利要求 1 或 2 的分子，它是一种抗体，包含由杂交瘤(保藏
于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 的可变
区和人恒定区。

8. 权利要求 1-4 中任一项的分子，该分子是纯化的。

25 9. 一种纯化的蛋白，它含有的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 或
SEQ ID NO: 7 具有至少 95%的同一性，所述蛋白(a)免疫特异性地结
合 CD40；和(b)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分
泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在初级氨基酸序列中包含一个或多

个取代或插入。

10. 一种纯化的蛋白，所述蛋白(a)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，(b)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(c)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入。

11. 一种纯化的蛋白，所述蛋白(a)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，(b)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(c)不是由杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6，且不是由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生。

12. 一种分离的核酸，它含有 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15。

13. 一种分离的核酸，它含有编码含 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 的蛋白的核苷酸序列。

14. 权利要求 13 的分离的核酸，它含有编码蛋白的核苷酸序列，所述蛋白包含(a)由杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 的重链可变区，和(b)人恒定区。

15. 一种分离的核酸，它含有编码蛋白的核苷酸序列，所述蛋白包含的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 7 具有至少 95% 的同一性。

16. 一种包含编码蛋白的核苷酸序列的分离的核酸，所述蛋白与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，并且所述蛋白增加 CD40 配体与 CD40 的结合至少 45%。

17. 一种包含编码融合蛋白的核苷酸序列的分离的核酸，所述融

合蛋白包含融合至 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 2 的 bryodin 1 (BD1) 的氨基酸序列。

18. 一种分离的核酸，它在高严格条件下与由编码 DNA 序列组成的 DNA 的反向互补物杂交，所述编码 DNA 序列对由选自 SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列组成的蛋白进行编码，所述分离的核酸编码免疫特异性结合 CD40 的蛋白。

19. 一种重组细胞，它含有的重组核酸载体包含编码蛋白的核苷酸序列，所述蛋白与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，并且所述蛋白增加 CD40 配体与 CD40 的结合至少 45%。

20. 一种重组细胞，它含有的重组核酸载体包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15。

21. 一种生产蛋白的方法，该方法包括：

15 (a)培养包含编码蛋白的重组核苷酸序列的细胞，所述蛋白与保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110 的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，并且所述蛋白增加 CD40 配体与 CD40 的结合至少 45%，以使所述蛋白由所述细胞表达；
和

20 (b)回收所表达的蛋白。

22. 一种生产蛋白的方法，该方法包括：

(a)培养包含编码蛋白的重组核苷酸序列的细胞，所述蛋白包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10，以使由所述核苷酸序列编码的蛋白由所述细胞表达；
25 和

(b)回收所表达的蛋白。

23. 一种药用组合物，它包括

- 5 (a) 包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 的一种分子，其量可有效治疗或预防癌症，所述分子(i)免疫特异性结合 CD40，(ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入；和
- (b) 一种药学上可接受的载体。
24. 一种药用组合物，它包括
- 10 (a) 一种治疗或预防癌症有效量的纯化蛋白，所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，(ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，
- 15 在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入；和
- (b) 一种药学上可接受的载体。
25. 一种药用组合物，它包括
- (a) 一种治疗或预防癌症有效量的纯化蛋白，所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，(ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(iii)不是由杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6，且不是由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生；和
- 20 (b) 一种药学上可接受的载体。
- 25 26. 一种药用组合物，它包括
- (a) 包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 的一种分子，其量可有效激活或增强免疫应答，所述分

- 子(i)免疫特异性结合 CD40, (ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%, 和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比, 在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入; 和
- 5 (b)一种药学上可接受的载体。
27. 一种药用组合物, 它包括
- (a)一种纯化蛋白, 其量可有效激活或增强免疫应答, 所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40, (ii)使 CD40 配体
- 10 与 CD40 的结合增加至少 45%, 和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比, 在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入; 和
- (b)一种药学上可接受的载体。
- 15 28. 一种药用组合物, 它包括
- (a)一种纯化蛋白, 其量可有效激活或增强免疫应答, 所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40, (ii)使 CD40 配体
- 20 与 CD40 的结合增加至少 45%, 和(iii)不是由杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6, 且不是由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生; 和
- (b)一种药学上可接受的载体。
29. 权利要求 23-28 中任一项的药用组合物, 它还含有 CD40 配
- 25 体。
30. 一种在患者中治疗或预防癌症的方法, 该方法包括:
- 给予所述患者一定量的包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO:

- 9 或 SEQ ID NO: 10 的一种分子, 其量可有效治疗或预防癌症, 所述分子(i)免疫特异性结合 CD40, (ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%, 和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比, 在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入。
- 5
31. 一种在患者中治疗或预防癌症的方法, 该方法包括:
- 给予所述患者一定量的一种纯化蛋白, 其量可有效治疗或预防癌症, 所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40, (ii)使
- 10 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%, 和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比, 在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入。
32. 一种在患者中治疗或预防癌症的方法, 该方法包括:
- 15 给予所述患者一定量的一种纯化蛋白, 其量可有效治疗或预防癌症, 所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40, (ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%, 和(iii)不是由杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6, 且不是由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生。
- 20
33. 一种激活或增强患者的免疫应答的方法, 该方法包括:
- 给予所述患者一定量的包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 的一种分子, 其量使得所述患者的免疫
- 25 应答被激活或增强, 所述分子(i)免疫特异性结合 CD40, (ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%, 和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比, 在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或

插入。

34. 一种在患者中激活或增强免疫应答的方法，该方法包括：

给予所述患者一定量的一种纯化蛋白，其量使得所述患者的免疫应答被激活或增强，所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，(ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入。

35. 一种在患者中激活或增强免疫应答的方法，该方法包括：

给予所述患者一定量的一种纯化蛋白，其量使得所述患者的免疫应答被激活或增强，所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，(ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(iii)不是由杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6，且不是由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生。

36. 一种在患者中治疗或预防免疫疾病的方法，该方法包括：

给予所述患者一定量的包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 的一种分子，其量可有效治疗或预防免疫疾病，所述分子(i)免疫特异性结合 CD40，(ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入。

37. 一种在患者中治疗或预防免疫疾病的方法，该方法包括：

给予所述患者一定量的一种纯化蛋白，其量可有效治疗或预

5 防免疫疾病，所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，(ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入。

38. 一种在患者中治疗或预防免疫疾病的方法，该方法包括：
10 给予所述患者一定量的一种纯化蛋白，其量可有效治疗或预防免疫疾病，所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，(ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(iii)不是由杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6，且不是由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生。

39. 权利要求 30-38 中任一项的方法，该方法还包括给予所述患
15 者 CD40 配体。

40. 权利要求 30-38 中任一项的方法，其中所述患者是人。

41. 权利要求 4 的抗体，它不是同种型 IgG1。

42. 一种人类以外的转基因动物、转基因植物或包含一种或多种编码蛋白的转基因的分离细胞，所述蛋白与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，并且
20 所述蛋白使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%。

43. 一种药用组合物，它包含(a)免疫特异性结合 CD40 的一种分子，所述分子增加 CD40 配体与 CD40 的结合；(b)CD40 配体；和(c)一种药学上可接受的载体，它们的量可有效治疗或预防癌症或免疫疾
25 病，或可有效激活或增强免疫应答。

44. 一种在患者中治疗或预防癌症或免疫疾病的方法，该方法包括给予所述患者(a)免疫特异性结合 CD40 的一种分子，所述分子增加 CD40 配体与 CD40 的结合；和(b)CD40 配体，它们的量对所述治疗或

预防有效。

45. 权利要求 44 的方法，其中所述方法是用于治疗癌症。

46. 权利要求 30-32 和 45 中任一项的方法，其中所述癌症为实体瘤。

5 47. 权利要求 36-38 中任一项的方法，其中所述免疫疾病为类风湿性关节炎。

说明书

重组抗-CD40 抗体及其应用

5

1. 发明领域

本发明涉及治疗包括癌症、炎症性疾病和免疫系统疾病或紊乱在内的疾病的方法和组合物，包括给予增强 CD40 配体与 CD40 结合的 CD40 结合蛋白。CD40 结合蛋白包括重组/变异形式的单克隆抗体 S2C6 及其衍生物。

10

2. 发明背景

15

20

CD40 是一种在各种细胞类型上表达的细胞表面磷酸化糖蛋白，所述细胞类型包括 B 细胞、B 细胞恶性肿瘤、小结树突细胞、上皮基细胞和癌。CD40 结合 CD40 配体(“CD40L”)。在炎症和癌症过程中，CD40L 于活化 T 细胞上表达(Younes 等，1998, Br. J. Haematol. 100: 135-141; 参见 Grewal 和 Flavell, 1998, Annu. Rev. Immunol. 16: 111-135 的论述)。CD40 与 CD40L 的相互作用导致 B 细胞激活和正常 B 细胞的增殖；然而在 B 细胞衍生的肿瘤系中 CD40 介导的信号转导可以导致激活-诱导的细胞死亡。活化信号的强度是激活-诱导的肿瘤细胞死亡的关键(Grafton 等，1997, Cell. Immunol. 182: 45-56)。因此，用于增强 CD40 和 CD40L 之间的受体-配体相互作用以及活化信号强度的组合物和方法对于治疗疾病应当具有巨大的价值。

2.1 CD40 和 CD40 配体

25

CD40 是 TNF 受体超家族的一员。该家族包括 TNFrII、CD40、CD30、LMP-1、LTBr、ATAR、OX-40 和 4-1BB 受体。CD40 组成型表达于 B-淋巴细胞、巨噬细胞和树突细胞上，并由在成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞上活化的细胞因子诱导(Van Kooten 和 Banchereau, 1997, Curr. Opin. Immunol., 9: 330-337)。还已经表明，

CD40 高度表达于许多人类癌症，包括肺癌、膀胱癌、胃癌、乳癌和卵巢癌(Stamenkovic 等，1989，EMBO J. 8: 1403-1410)。

CD40 配体是一种在活化 T 细胞上表达的膜蛋白。受体结合 CD40L 导致 CD40 多聚化，产生活化信号(对于抗原提呈(presenting)细胞如树突细胞、单核细胞和 B 细胞)和生长与分化信号(对于细胞因子活化的成纤维细胞和上皮细胞)。CD40 信号由多聚化受体经一系列 TNF 受体相关因子(“TRAF”)的募集而转导(Kehry, 1996, J. Immunol. 156: 2345-2348)。TRAF 的各种亚型与 TNF 家族成员(包括 CD40)的相互作用各有不同，以使向种类繁多的下游途径提供刺激物。TRAF1 和 TRAF2 参与编程性细胞死亡的调节(Speiser 等，1997，J. Exp. Med. 185: 1777-1783; Yeh 等，1997，Immunity, 7: 715-725)。TRAF 2、5 和 6 参与增殖和活化过程，包括 NF- κ B 和 c-Jun N 末端激酶活化。在正常 B 细胞中，CD40 的结合为受体复合物募集 TRAF2 和 TRAF3，并诱导其它 TRAF 的下调(Kuhune 等，1997，J. Exp. Med. 186: 337-342)。CD40 结合的作用还取决于膜密度(De Paoli 等，1997，Cytometry 30: 33-38)。重要的是，与在正常原始 B 细胞观察到的增殖反应不同，在肿瘤 B 细胞上的 CD40 结合可以导致生长抑制和活化-诱导的细胞死亡(Funakoshi 等，1994，Blood 83: 2787-2794)。因此，在不同细胞类型中的 CD40 的活化、转化、残余 TRAF 和共刺激物可以诱导由活化和增殖至生长抑制和编程性细胞死亡的反应。

2.2 抗 CD40 抗体

除至少一个类型外，至今描述的抗 CD40 单克隆抗体(“mAb”)有三个基本类型：(1)以至少 90%封闭 CD40/CD40L 的相互作用并具有抗瘤特性的抗 CD40 单克隆抗体(Armitage 等，美国专利第 5,674,492 号; Fanslow 等，1995，Leukocyte Typing V, Schlossman 等编辑，1: 555-556); (2)通过 CD40 对抗信号转导的抗 CD40 单克隆抗体(deBoer 等，美国专利第 5,677,165 号); 和(3)通过 CD40 传递刺激信号但不增

加 CD40 和 CD40L 之间的相互作用的抗 CD40 单克隆抗体, 例如 G28-5 (Ledbetter 等, 美国专利第 5,182,368 号; PCT 说明书 WO 96/18413)。

已表明, 一种单克隆抗体 CD40.4 (5C3)(PharMingen, San Diego, California)使 CD40 和 CD40L 之间的相互作用增加约 30-40% (Schlossman 等编辑, 1995, Leukocyte Typing V: 白细胞分化抗原 1: 547-556)。

Armitage 等(美国专利第 5,674,492 号)介绍了使用 CD40 结合蛋白(包括单克隆抗体 HuCD40-M2)的方法, 它们能够结合 CD40 并抑制 CD40 与 CD40L 的结合, 以预防或治疗特征为肿瘤细胞表达 CD40 的疾病。

DeBoer 等(美国专利第 5,677,165 号)描述了抗 CD40 单克隆抗体, 它没有明显的拮抗活性, 结合 B 细胞表面上的 CD40 并阻断 B 细胞活化。美国专利第 5,677,165 号的基本特征在于当抗 CD40 单克隆抗体结合正常人 B 细胞表面上的人 CD40 时, 正常人 B 细胞的生长或分化受到抑制。

Ledbetter 等(美国专利第 5,182,368 号)描述了一种配体 G28-5, 它结合 B 细胞表面抗原 Bp50(现称为 CD40)并刺激活化的 B 细胞阻碍细胞周期, 使得 B 细胞增殖扩大。然而, G28-5 在 CD40L 存在下没有增强 B 细胞的活化, 也没有加强 CD40/CD40L 的相互作用。

S2C6 是一种制备用于抵抗人膀胱癌的抗 CD40 单克隆抗体(Paulie 等, 1984, Cancer Immunol. Immunother. 17: 165-179)。S2C6 结合在各种细胞类型上表达的 CD40 受体, 包括 B-淋巴细胞、内皮细胞和上皮细胞。已经证明 S2C6 对尿路上皮癌和 B 细胞衍生的恶性淋巴细胞具有特异性。还已经证明 S2C6 与前列腺癌细胞系 HS 具有反应性, 以及与黑素瘤具有弱反应性(Paulie 等, 1984, Cancer Immunol. Immunother. 17: 165-179)。已有研究证实 S2C6 作为 B 细胞恶性肿瘤诊断标记的用途(Paulie 等, 1984, Cancer Immunol. Immunother. 17: 165-179; Paulie 等, 1985, Eur. J. Cancer. Clin. Oncol. 21: 701-710)。

除了检测 B 细胞恶性肿瘤以外，还已经显示 S2C6 向 B 淋巴细胞传递强生长促进信号(Paulie 等，1989, J. Immunol. 142: 590-595)。

S2C6 能以剂量依赖方式刺激原代 B 细胞增殖，由此证明 S2C6 对人外周 B 细胞具有激动活性(Paulie 等，1989, J. Immunol. 142: 590-595)。

尽管竞争性研究已经显示 G28-5 和 S2C6 结合相同或最接近的表位，但经测定所述抗体的功能不同，这主要是依据所述的单克隆抗体之一所达到的对先前受刺激的扁桃体 B 细胞的刺激程度(Clark 和 Ledbetter, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494-4498; Ledbetter 等，美国专利第 5,182,368 号)。在具体的测试条件下，实现扁桃体 B 细胞活化需要的 S2C6 比 G28-5 多 100 倍(Ledbetter 等，美国专利第 5,182,368 号)。

本领域需要一种治疗方法，以增加治疗或预防癌症、激活或加强免疫系统或治疗或预防免疫缺陷或疾病的功效，而本发明提供这种需要。

本文引用或有关联的任一参考文献不应被视为允许该参考文献作为本发明的先有技术。

3. 发明概述

申请人获得的出乎意料的发现是一类新的抗 CD40 抗体，即除了传递刺激信号以外，还增强 CD40 和 CD40L 之间的相互作用、增强 CD40L 介导的刺激和具有体内抗癌活性。本发明人对 S2C6 单克隆抗体可变区的克隆和测序以及其中 CDR 区和构架区的鉴定，促进了这些抗体和其相关分子的产生和应用。

本发明涉及的分子包含 S2C6 单克隆抗体的可变区或一个或多个具有新序列(SEQ ID NO: 3、4、8、9 或 10)的其互补性决定区(CDR)，所述分子(a)免疫特异性地结合 CD40 和(b)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在初

级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入，或不是由杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 且不是由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生。在一个具体的实施方案中，所述分子不是天然单克隆抗体 S2C6，且不含有所述单克隆抗体 S2C6 的天然重链或轻链。在另一个具体的实施方案中，所述分子是一种抗体。在另一个实施方案中，所述抗体不是同种型 IgG1。在另一个具体的实施方案中，所述分子含有轻链可变区(SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列)或重链可变区(SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列)。

本发明还涉及包含融合至第二种蛋白的氨基酸序列的单克隆抗体 S2C6 的片段的嵌合/融合蛋白，以及涉及其中单克隆抗体 S2C6 的片段共价结合(例如通过使用交联剂)至另一种化学结构的分子。在一个具体的实施方案中，提供一种免疫特异性地结合 CD40 的分子，该分子含有单克隆抗体 S2C6 的重链和/或轻链可变区，它们融合至含有 bryodin 1(BD1)的氨基酸序列的第二种蛋白。

本发明还涉及其含有的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 具有至少 95%的同一性的蛋白，所述蛋白(a)免疫特异性地结合 CD40 和(b)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入。在一个具体的实施方案中，所述蛋白不是天然单克隆抗体 S2C6，且不含有所述单克隆抗体 S2C6 的天然重链或轻链。

本发明还涉及纯化蛋白，所述蛋白(a)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，(b)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(c)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入，或不是由杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体

S2C6, 且不是由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生。在一个具体的实施方案中, 所述蛋白不是天然单克隆抗体 S2C6, 且不含有所述单克隆抗体 S2C6 的天然重链或轻链。

5 本发明还涉及编码所述分子和蛋白的核酸或与包括编码核苷酸序列的所述蛋白的 DNA 杂交的核酸; 包含所述分子和蛋白的重组细胞; 以及生产所述蛋白的方法。

在一个实施方案中, 所述分离的核酸包含编码蛋白的核苷酸序列, 其中所述蛋白含有(a)由杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 的重链可变区, 和(b)人恒定区。

10 在一个实施方案中, 所述分离的核酸包含编码蛋白的核苷酸序列, 其中所述蛋白含有(a)由杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 的轻链可变区, 和(b)人恒定区。

15 本发明还涉及包含重组核酸载体的重组细胞, 该载体含有编码蛋白的核苷酸序列, 所述蛋白与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40, 并使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%。本发明还提供生产所述蛋白的方法, 包括培养所述细胞, 使得所述蛋白由所述细胞表达, 并回收所表达的蛋白。

20 本发明还涉及含有重组核酸载体的重组细胞, 所述载体包含 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15, 以及涉及生产蛋白的方法, 包括培养所述细胞, 使得由所述核苷酸序列编码的蛋白由所述细胞表达, 并回收所表达的蛋白。

25 还提供优选为纯化形式的包含本发明分子和抗体的药用组合物。在具体的实施方案中, 本发明涉及含有一种分子和一种药学上可接受的载体的药用组合物, 所述分子含有 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10, 该分子(i)免疫特异性地结合 CD40, (ii)增加 CD40

配体与 CD40 的结合, 和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比, 在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入。在一个具体的实施方案中, 所述分子不是天然单克隆抗体 S2C6, 且不含有所述单克隆抗体 S2C6 的天然重链或轻链。

本发明还涉及包含一种纯化蛋白和一种药学上可接受的载体的药用组合物, 所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40, (ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%, 和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比, 在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入, 或不是由杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6, 且不是由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生。在一个具体的实施方案中, 所述蛋白不是天然单克隆抗体 S2C6, 且不含有所述单克隆抗体 S2C6 的天然重链或轻链。

在具体的实施方案中, 本发明的药用组合物包含本发明的分子或抗体, 其量可有效治疗或预防癌症, 或可有效激活或增强免疫应答, 或活化或增强患者的免疫应答。

在具体的实施方案中, 本发明的药用组合物还包含 CD40 配体。在一个具体的实施方案中, 所述药用组合物包含(a)一种分子, 它免疫特异性地结合 CD40, 增加 CD40 配体与 CD40 的结合; (b)CD40 配体; 和(c)一种药学上可接受的载体, 它们的量可有效治疗或预防癌症或免疫疾病, 或可有效激活或增强免疫应答。在此实施方案中, 例如, 所述分子可以是天然单克隆抗体 S2C6 或天然单克隆抗体 5C3 或如本文所述的 S2C6 衍生物。

本发明还涉及在患者中治疗或预防癌症的方法, 在患者中激活或增强免疫应答的方法或在患者中治疗或预防免疫缺陷或疾病的方法, 包括给予所述患者治疗有效量的本发明的分子或抗体, 例如一

5 定量的包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10 的分子，所述分子(i)免疫特异性地结合 CD40，(ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，并且与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入。在一个具体的实施方案中，所述分子不是天然单克隆抗体 S2C6，且不含有所述单克隆抗体 S2C6 的天然重链或轻链。

10 本发明还涉及在患者中治疗或预防癌症的方法，在患者中激活或增强免疫应答的方法或在患者中治疗或预防免疫缺陷或疾病的方法，包括给予所述患者一种纯化的蛋白，所述蛋白(i)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，(ii)使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%，和(iii)与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的天然单克隆抗体 S2C6 相比，在初级氨基酸序列中包含一个或多个取代或插入，
15 或不是由杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6，且不是由木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生。在一个具体的实施方案中，所述蛋白不是天然单克隆抗体 S2C6，且不含有所述单克隆抗体 S2C6 的天然重链或轻链。

20 在具体的实施方案中，本发明的方法还包括给予所述患者 CD40 配体。

本发明还涉及在患者中治疗或预防癌症或免疫疾病的方法，包括给予所述患者其量可有效用于所述治疗或预防的下述物质：(a)一种分子，它免疫特异性地结合 CD40，该分子增强 CD40 配体与 CD40
25 的结合；和(b) CD40 配体，其中所述分子可以是天然单克隆抗体 S2C6 或天然单克隆抗体 5C3 或如本文所述的任一种 S2C6 衍生物。

在一个优选的实施方案中，所述患者为人。

本发明还涉及人类以外的转基因动物、转基因植物或含有一种

或多种编码蛋白的转基因的分离细胞，所述蛋白与杂交瘤(保藏于 ATCC，指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 竞争结合 CD40，并且所述蛋白使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%。

5

4. 附图简述

图 1. S2C6 的轻链可变区结构。显示了所述轻链可变区(“V_L”)的核苷酸序列(SEQ ID NO: 1)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)。

图 2 S2C6 的重链可变区结构。显示了所述重链可变区(“V_H”)的核苷酸序列(SEQ ID NO: 6)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 7)。

10

图 3A-3B. S2C6 的可变区结构。(A)显示了 S2C6 V_L的氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)。(B)显示了 S2C6 V_H的氨基酸序列(SEQ ID NO: 7)。下划线标示互补性决定区(“CDR”)。显示了邻接 CDR 的四个构架区的序列。V_L CDR 1-3 的氨基酸序列分别对应于 SEQ ID NOS: 3-5。V_H CDR 1-3 的氨基酸序列分别对应于 SEQ ID NOS: 8-10。

15

图 4. S2C6 单克隆抗体增强 CD40-Ig 与表达 CD40L 的 Jurkat T 细胞的结合。在增加浓度的抗-CD40 单克隆抗体(“mAb”)存在下，CD40-Ig (CD40 和人免疫球蛋白的可溶性融合蛋白)结合表面 CD40L。单克隆抗体与 CD40-Ig 预温育 1 小时，接着与表达 CD40L 的靶细胞温育 1 小时。使用异硫氰酸荧光素(“FITC”)标记的抗人 Ig 利用流式细胞仪检测结合靶细胞的 CD40-Ig。然后根据对数平均荧光强度(“MFI”)测定 CD40/CD40L 结合的程度。显示了减去每组背景值的 MFI。

20

图 5. S2C6 单克隆抗体增强可溶性 CD40L 与 B 细胞表面 CD40 的结合。在增加浓度的抗-CD40 单克隆抗体: S2C6、G28-5 或 M3 或者无关对照单克隆抗体，EXA-1H8 存在下，温育 Ramos B 细胞、人 B 细胞淋巴瘤。将所述单克隆抗体与表达 CD40 的靶细胞预温育 1 小时。接着通过流式细胞仪直接检测 FITC 标记的 CD40L 与 B 细胞的结合。然后根据对数平均荧光强度测定 CD40/CD40L 结合的程度。

25

显示了减去每组背景值的 MFI。

图 6. 在 CD40L⁺刺激细胞和抗-CD40 单克隆抗体存在下, S2C6 增强原代人外周 B 细胞的增殖反应。将外周 B 细胞(1×10^5 /孔)与增加数目的非增殖性 CD40L⁺ Jurkat T 刺激细胞和 30 ng/ml 的抗-CD40 单克隆抗体: S2C6、G28-5 或 M3 或对照单克隆抗体 EXA2-1H8 混合在一起。通过在加入刺激物后 72 小时掺入 ³H-TdR 检测 B 细胞增殖。

图 7. 在 CD40L 存在或不存在时, 对比原代人外周 B 细胞对抗-CD40 单克隆抗体的增殖反应。将外周 B 细胞与 4:1 混合比率的非增殖性 CD40L⁺刺激细胞和增加浓度的抗-CD40 单克隆抗体: S2C6、G28-5 或对照抗体, EXA2-1H8 混合在一起。通过在加入刺激物后 72 小时掺入 ³H-TdR 检测 B 细胞增殖。

图 8A-8C. 单克隆抗体 S2C6 的体内抗瘤活性。评价 S2C6 抗(A) Ramos 人 B 细胞非 Hodgkin 淋巴瘤, (B) HS Sultan 多发性骨髓瘤, 或(C) IM-9 多发性骨髓瘤的抗瘤活性。用或不用抗-脱唾液酸-GM1 预处理 SCID 小鼠(5 只/组), 以抑制天然杀伤细胞(“NK”)活性, 并在注射 1×10^6 - 2×10^6 肿瘤细胞后的第 1 天或第 5 天用单克隆抗体处理所述小鼠。实线表示随时间的存活小鼠数目。

图 9. BD1-S2C6 sFv 在 ELISA 中特异性结合固定化 CD40-Ig。BD1-S2C6 sFv(由融合至单克隆抗体 S2C6 可变区的 bryodin 1(BD1)组成的单链抗-CD40 免疫毒素)在大肠杆菌中作为包含体表达, 使其变性和重折叠。然后使用 Blue Sepharose 分离重折叠的蛋白, 接着经固定化 CD40-Ig 亲和性层析。然后测试纯化蛋白在 ELISA 中结合固定化 CD40-Ig 的情况。用 0.5 μ g/ml 的 CD40-Ig 包被微量滴定板, 接着在 25 μ g/ml S2C6 单克隆抗体(▲)、25 μ g/ml 对照抗体 BR96 (●)或无过量抗体(■)存在下, 加入纯化 BD1-S2C6 sFv 的稀释液。通过加入 BD1 特异性兔抗血清, 接着加入缀合山羊抗兔 Ig 的辣根过氧化物酶, 检测 BD1-S2C6 sFv 与固定化受体的结合。加入过量 S2C6 单克隆抗

体完全抑制 BD1-S2C6 sFv 与 CD40-Ig 的结合, 但加入对照单克隆抗体不能完全抑制此种结合。

5. 发明详述

5 本发明涉及 S2C6 基因的核苷酸序列及其编码蛋白。本发明还涉及所述 S2C6 蛋白和核酸的片段以及其它衍生物和类似物。在各种具体的实施方案中, 本发明的分子(例如抗体)包含全部或部分的 S2C6 单克隆抗体(轻链和/或重链, 或轻链 CDR 1 (SEQ ID NO: 3), 和/或轻链 CDR 2 (SEQ ID NO: 4), 和/或重链 CDR 1 (SEQ ID NO: 8)、
10 重链 CDR 2 (SEQ ID NO: 9)和/或重链 CDR 3 (SEQ ID NO: 10), 或轻链 CDR 3 (SEQ ID NO: 5)与任何其它 CDR 和/或四条重链构架区和四条轻链构架区中的一个或多个的组合), 前提是所述分子不是天然单克隆抗体 S2C6(保藏于 ATCC, 获得的保藏号微 PTA-110)或其重链或轻链。所述分子与 S2C6 在序列和/或翻译后修饰(糖基化、酰胺化、肽键合或交联至非 S2C6 序列等)方面可以不同。在各种具体
15 实施方案中, 本发明的分子免疫特异性地结合 CD40 (或在多聚化时免疫特异性地结合 CD40)、与天然 S2C6 竞争结合 CD40, 和/或使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%、50%、60%或 65%。编码所述分子(例如 S2C6 片段或其衍生物)的核酸以及编码天然单克隆抗体 S2C6
20 的核酸也属于本发明的范围。提供例如通过重组方法来生产前述蛋白。

 本发明还涉及 S2C6 蛋白及其衍生物, 包括但不限于具有功能活性的融合/嵌合蛋白, 即其能够显示一种或多种已知与全长 S2C6 单克隆抗体相关的功能活性。这样的功能活性包括但不限于结合 CD40
25 的能力、刺激信号至 CD40 信号转导途径的传递(例如便于引起 B 细胞增殖)、CD40L 与 CD40 相互作用的加强; 抑制肿瘤生长的能力; 以及诱导免疫应答的能力。

 另外提供抗 CD40 的抗体, 包括 S2C6、其衍生物和类似物, 包

括但不限于人源化抗体、单链抗体、双特异性抗体和结合化疗剂或生物反应调节剂的抗体。

本发明还涉及治疗或预防癌症、炎症疾病和免疫系统疾病的方法，包括单独或与 CD40L 联合给予本发明组合物。

5 通过下文 6-9 部分阐明的实施例说明本发明，所述实施例特别公开了 S2C6 基因的克隆和鉴定特征；CD40/CD40L 的相互作用的增强；肿瘤生长的抑制；以及单链抗-CD40 免疫毒素与 CD40-Ig 的结合。

10 为了使公开内容更清晰明瞭而不是起限制作用，本发明的详述被分成以下的小单元。

5.1 分离 S2C6 基因

本发明涉及 S2C6 核酸的核苷酸序列。在具体的实施方案中，S2C6 核酸包括 SEQ ID NO: 1 和 6 的 cDNA 序列，或编码 S2C6 蛋白的核酸(例如具有 SEQ ID NO: 2 和 7 的序列的蛋白)。本发明提供的纯化核酸由 S2C6 基因序列的至少 8 个核苷酸(即可杂交部分)组成；在其它实施方案中，所述核酸由 S2C6 序列的至少 25 个(连续)核苷酸、50 个核苷酸、100 或 200 个核苷酸或全长 S2C6 可变区编码序列组成。在相同的或其它实施方案中，所述核酸的长度小于 50、75、100 或 200 或 5000 个核苷酸长度。核酸可以是单链或双链。本发明还涉及与前述序列或其反向互补物杂交或互补的核酸，具体而言，这种编码结合于 CD40 的蛋白的核酸与 S2C6 竞争结合 CD40，和/或使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%、50%、60%或 65%。在具体方面，提供包含与至少 10、25、50、100 或 200 个核苷酸或 S2C6 可变区基因的完整编码区互补的序列的核酸。

25 另外提供编码 S2C6 蛋白的衍生物和类似物的核酸。显而易见，本文使用的“编码 S2C6 蛋白的片段或部分的核酸”应被解释为是指仅编码所提及的 S2C6 蛋白的片段或部分的核酸，而不是编码为连续

序列的 S2C6 蛋白的其它邻接部分的核酸。

5.2 克隆步骤

5 以下为克隆 S2C6 基因的具体实施方案。在一个具体的实施方案中，由产生单克隆抗体 S2C6 的杂交瘤分离总 RNA，并使用基于本文公开序列的引物，用聚合酶链式反应扩增所需的可变区序列。参见作为说明性实施例的下文 6 单元。至于另一个实施例，由产生单克隆抗体 S2C6 的杂交瘤分离 mRNA，制备 cDNA 并将其连接至表达载体(例如噬菌体衍生物)，使得其能够由宿主细胞表达，从而将其
10 导入所述宿主细胞中。然后可以用各种筛选测定法选择表达产物。在一个实施方案中，选择是基于与代表一部分 S2C6 基因或其 RNA 或其片段的标记探针的杂交(Benton 和 Davis, 1977, Science 196: 180; Grunstein 和 Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3961)。这些具有与探针大致同源性的 DNA 片段将与探针杂交。还可能通过
15 限制酶消化来鉴定合适的片段，并按照已知的限制图谱(如果可以获得的话)比较其与预期片段的片段大小。可以根据所述基因的特性进行进一步的选择。

或者，通过基于所需基因表达产物的物理、化学或免疫学特性的测定，可以检测所需基因的存在。例如，可以选择并表达 cDNA
20 克隆或杂种选择合适 mRNA 的 DNA 克隆，以产生具有例如类似或等同于已知的 S2C6 蛋白的电泳迁移、等电聚焦特性、蛋白水解的消化图谱或功能活性的蛋白。例如，可在 ELISA(酶联免疫吸附测定)-型方法中检测结合 CD40 的能力。

还可以通过使用核酸杂交的 mRNA 选择，接着通过体外翻译，
25 鉴定 S2C6 基因。在此方法中，使用片段通过杂交分离互补性 mRNA。分离 mRNA 的分离产物的体外翻译产物的功能测定(例如结合 CD40 等)鉴定所述 mRNA，因此所述互补性 DNA 片段包含所需的序列。

在另一个实施方案中，可以由本文公开的序列化学合成 S2C6

cDNA。可以使用技术人员已知的其它分离 S2C6 基因的方法。

然后可以将所鉴定和分离的 S2C6 基因/cDNA 插入到合适的克隆载体中。可以使用本领域已知的大量载体-宿主系统。可行的载体包括但不限于质粒或修饰病毒，但所述载体系统必须与使用的宿主细胞相适配。这样的载体包括但不限于噬菌体(如 λ 衍生物)或质粒，诸如 PBR322 或 pUC 质粒衍生物或 Bluescript 载体(Stratagene)。例如，可以通过将所述 DNA 片段连接至具有互补粘性末端的克隆载体，实现对克隆载体的插入。然而，如果用于所述 DNA 片段的互补限制位点在所述克隆载体中不存在，则可以经酶修饰所述 DNA 分子的末端。或者，通过将核苷酸序列(接头)连接至 DNA 末端上，可以产生任何需要的位点；这些连接接头可以含有编码限制性内切核酸酶识别序列的特异性化学合成的寡核苷酸。在一个替代的方法中，可以通过同聚物加尾或使用含合适序列的引物的 PCR, 修饰切割的载体和 S2C6 基因。可以通过转化、转染、感染、电穿孔等将重组分子引入到宿主细胞中，以便产生许多拷贝的基因序列。

在一个替代的方法中，可在以“鸟枪”法将所需基因插入到合适的克隆载体后对其进行鉴定和分离。在插入所述克隆载体之前，可以通过例如大小分级进行所需的基因的富集。

在具体的实施方案中，用加入分离的 S2C6 基因、cDNA 或合成的 DNA 序列的重组 DNA 分子转化宿主细胞能够产生多拷贝的所述基因。因此，通过培养转化体、由转化体分离重组 DNA 分子并在需要时由分离的重组 DNA 中回收所插入的基因，可以获得大量的所述基因。

本发明提供的 S2C6 基因包括编码与天然 S2C6 可变区发现的基本相同的氨基酸序列的那些核苷酸序列、编码具有功能相同的氨基酸的氨基酸序列的那些核苷酸序列，以及编码其它 S2C6 衍生物或类似物(如下文对 S2C6 衍生物或类似物的描述)的那些核苷酸序列。

5.3 表达 S2C6 基因

编码 S2C6 蛋白或其功能活性类似物或片段或其它衍生物(参见 5.6 单元)的核苷酸序列, 可以被插入到合适的表达载体中, 即含有插入蛋白编码序列的转录和翻译必需的元件的载体。转录和翻译必需的信号还可以由天然 S2C6 基因和/或其侧翼区提供。可以使用各种宿主-载体系统表达所述蛋白编码序列。这些系统包括但不限于用病毒(例如痘苗病毒、腺病毒等)感染的哺乳动物细胞系统; 用病毒(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统; 微生物, 诸如含酵母载体的酵母或用噬菌体、DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 转化的细菌; 转基因植物或人类以外的转基因动物。载体的表达元件在其长度和特异性上有所变化。根据使用的宿主-载体系统, 可以使用大量合适转录和翻译元件中的任一个。

可以使用先前所述的任一种将 DNA 片段插入到载体中的方法, 构建含有嵌合基因(由合适的转录/翻译控制信号组成)和蛋白编码序列的表达载体。这些方法可包括体外重组体 DNA 和合成技术以及体内重组体(基因重组)。编码 S2C6 蛋白或肽片段的核酸序列的表达可以由第二种核酸序列调节, 以便 S2C6 蛋白或肽在用重组体 DNA 分子转化的宿主中表达。例如, 可以通过本领域已知的任何启动子/增强子元件控制 S2C6 蛋白的表达。可用于控制 S2C6 基因表达的非天然 S2C6 基因启动子包括但不限于, SV40 早期启动子区(Benoist 和 Chambon, 1981, Nature 290: 304-310)、包含在 Rous 肉瘤病毒的 3' 长末端复制的启动子(Yamamoto 等, 1980, Cell 22: 787-797)、疱疹胸苷激酶启动子(Wagner 等, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445)、金属硫蛋白基因的调节序列(Brinster 等, 1982, Nature 296: 39-42); 原核细胞表达载体如 β -内酰胺酶启动子(Villa-Kamaroff 等, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3727-3731)或 *lac* 启动子(DeBoer 等, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21-25); 也参见“得自重组细菌的有用蛋白”, 载于 Scientific American, 1980, 242:

74-94; 含有胭脂碱合成酶启动子区的植物表达载体(Herrera-Estrella等, Nature 303: 209-213)或花椰菜花叶病毒 35S RNA 启动子(Gardner等, 1981, Nucl. Acids. Res. 9: 2871), 以及光合成酶核酮糖二磷酸羧化酶启动子(Herrera-Estrella 等, 1984, Nature 310: 115-120); 得
5 自酵母或其它真菌的启动子元件如 Gal 4 启动子、ADC(醇脱氢酶)启动子、PGK(磷酸甘油激酶)启动子、碱性磷酸酶启动子, 和以下的显示出组织特异性并已应用于转基因动物的动物转录控制区: 在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶 I 基因控制区(Swift 等, 1984, Cell
10 38: 639-646; Ornitz 等, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7: 425-515)、在胰腺β细胞中有活性的基因控制区(Hanahan, 1985, Nature 315: 115-122)、在淋巴细胞中有活性的免疫球蛋白基因控制区(Grosschedl 等, 1984, Cell 38: 647-658; Adames 等, 1985, Nature 318: 533-538; Alexander等, 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1436-1444)、在睾丸、乳房、淋巴和肥大
15 细胞中有活性的小鼠乳腺癌病毒控制区(Leder 等, 1986, Cell 45: 485-495)、在肝脏中有活性的白蛋白基因控制区(Pinkert 等, 1987, Genes and Devel. 1: 268-276)、在肝脏中有活性的甲胎蛋白基因控制区(Krumlauf 等, 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639-1648; Hammer 等, 1987, Science 235: 53-58)、在肝脏中有活性的α 1-抗胰蛋白酶基因
20 控制区(Kelsey 等, 1987, Genes and Devel. 1: 161-171)、在骨髓细胞中有活性的β-球蛋白基因控制区(Mogam 等, 1985, Nature 315: 338-340; Kollias 等, 1986, Cell 46: 89-94)、在大脑的少突胶质细胞中有活性的髓鞘碱性蛋白基因控制区(Readhead 等, 1987, Cell 48: 703-712)、在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链-2 基因控制区(Sani, 1985, Nature 314: 283-286)和在下丘脑中有活性的促性腺释放激素
25 基因控制区(Mason 等, 1986, Science 234: 1372-1378)。

在一个具体的实施方案中, 使用的载体包含有效连接至 S2C6 基因核酸的启动子、一个或多个复制起点以及任选含有一个或多个选

择性标记(例如抗生素抗性基因)。

可通过三种基本方法鉴定包含 S2C6 基因插入片段的表达载体：

(a)核酸杂交；(b)“标记”基因功能的存在或不存在；和(c)插入序列的表达。在第一种方法中，可通过使用含与插入的 S2C6 基因同源的序列的探针进行核酸杂交，检测插入到表达载体中的 S2C6 基因的存在。在第二种方法中，可根据所述载体中插入的 S2C6 基因产生的某些“标记”基因功能(例如胸苷激酶活性、抗生素抗性、转化表型、在杆状病毒中形成包含体等)的存在或不存在，鉴定并选择重组载体/宿主系统。例如，如果在所述载体的标记基因序列中插入 S2C6 基因，则可通过标记基因功能的缺失鉴定含有 S2C6 插入片段的重组体。在第三种方法中，可通过测定由所述重组体表达的 S2C6 产物，鉴定重组表达载体。这样的测定可基于例如 S2C6 蛋白在体外测定系统中的物理和功能特性，例如增强 CD40L 与 CD40 的结合、刺激正常 B 细胞增殖、抑制肿瘤生长。

一旦鉴定和分离出具体的重组 DNA 分子，则可用几种本领域已知的方法进行增殖。一旦确定合适的宿主系统和培养条件，则可以大量增殖和制备重组表达载体。如前所述，可使用的表达载体包括但不限于以下的载体或其衍生物：人或动物病毒如痘苗病毒或腺病毒、昆虫病毒如杆状病毒、酵母载体、噬菌体载体(例如 λ 噬菌体)以及质粒和粘粒 DNA 载体，在此仅举几个例子。

此外，可以选择调节插入序列的表达或以需要的特异性方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。在某些诱导物存在下可提升某些启动子的表达；因此，可以控制 S2C6 基因工程蛋白的表达。而且，不同的宿主细胞具有用于翻译和翻译后加工和修饰的特征性和特异性机制(例如蛋白糖基化、磷酸化)。可以选择合适的细胞系或宿主系统，以确保对表达的前述蛋白的所需修饰和加工。例如，在细菌系统中的表达可用于产生非糖基化核心蛋白产物。在酵母中的表达可产生糖基化产物。在哺乳动物细胞中的表达可用于确保异源蛋白的

“天然”糖基化。而且，不同载体/宿主系统可不同程度地影响加工反应。

在具体的实施方案中，表达的 S2C6 相关蛋白为抗体或其片段或衍生物。重组抗体可含有重组轻链可变区、重组重链可变区或二者均包含在内。在一个具体的实施方案中，轻链和重链或其衍生物均由细胞重组表达(参见例如 Boss 等于 1989 年 3 月 28 日登记的美国专利第 4,816,397 号)。可使用各种宿主-载体系统表达蛋白编码序列。这些系统包括但不限于用病毒(例如痘苗病毒、腺病毒等)感染的哺乳动物细胞系统；用病毒(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统；微生物，诸如含酵母载体的酵母或用噬菌体、DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 转化的细菌；转基因植物或人类以外的转基因动物。

5.4 鉴定和纯化基因产物

在具体的方面，本发明提供 S2C6 蛋白及其片段和衍生物的氨基酸序列，以及编码它们的核酸序列，所述氨基酸序列含有互补决定区(CDR)或具有其它的功能活性。本文使用的“功能活性”的 S2C6 物质是指显示出一种或多种与全长(天然) S2C6 蛋白相关的功能活性的物质，所述功能活性例如为结合 CD40，刺激正常 B 细胞增殖，抑制肿瘤生长，使 CD40 配体与 CD40 的结合增加至少 45%。

在具体的实施方案中，本发明提供 S2C6 蛋白片段以及其编码核酸，其中所述片段由至少 6、10、20、50、75 或 100 个氨基酸组成。

一旦鉴定出表达 S2C6 基因序列的重组体，则可以分析基因产物。这可通过基于所述产物的物理或功能特性的测定来实现，所述测定包括放射性标记所述产物然后经凝胶电泳分析、免疫测定、正常 B 细胞增殖的刺激、CD40 结合测定、CD40 配体与 CD40 结合的促进、肿瘤生长的抑制等。

一旦鉴定出 S2C6 蛋白，则可通过标准方法对其进行分离和纯化，所述标准方法包括层析(例如离子交换层析、亲和性层析和分子

筛(sizing)柱层析)、离心、不同溶解性或任何其它用于蛋白纯化的标准技术。可用任一合适的测定评价功能特性(参见 5.7 单元)。

或者, 可通过本领域已知的基于本文公开的序列的标准化学方法合成 S2C6 蛋白或其衍生物(例如参阅 Hunkapiller 等, 1984, Nature 310: 105-111)。

在本发明的一个具体实施方案中, 这类 S2C6 蛋白, 无论是通过重组 DNA 技术产生还是通过化学合成方法产生, 或是通过天然蛋白纯化产生, 都包括(但不限于)包含为初级氨基酸序列的基本如图 3A-3B (SEQ ID NO: 2 和 7)所示的氨基酸序列的全部或部分的蛋白, 以及其片段和其他衍生物和其类似物(包括其同源蛋白)。

5.5 S2C6 基因和蛋白的结构

可通过本领域已知的各种方法分析本发明的 S2C6 基因和蛋白的结构。以下描述这些方法的某些实例。

5.5.1 遗传分析

可分析对应于 S2C6 基因的克隆 DNA 或 cDNA 的方法包括但不限于 DNA 杂交(Southern hybridization)(Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98: 503-517)、RNA 杂交(Northern hybridization)(参见例如 Freeman 等, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 4094-4098)、限制性内切核酸酶作图(Maniatis, 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: New York)以及 DNA 序列分析。因此, 本发明提供识别 S2C6 基因的核酸探针。例如, 在聚合酶链反应(PCR; 美国专利第 4,683,202、4,683,195 和 4,889,818 号; Gyllenstein 等, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 7652-7656; Ochman 等, 1988, Genetics 120: 621-623; Loh 等, 1989, Science 243: 217-220)后用 S2C6 基因特异性探针进行 DNA 杂交, 可检测来自细胞(例如杂交瘤)的 DNA 或 cDNA 中的 S2C6 基因。也可

生物的方法。

这样的抗体包括但不限于单克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体、双特异性抗体、Fab 片段、F(ab')₂ 片段、由 Fab 表达文库产生的片段、抗独特型(抗 Id)抗体以及以上任一抗体的表位结合片段。在一个实施方案中，S2C6 衍生物在与 S2C6 初级氨基酸序列相关的初级氨基酸序列中包含一个或多个缺失、添加和/或取代。在另一个实施方案中，S2C6 衍生物不是用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生的。在再另一个实施方案中，S2C6 衍生物在与 S2C6 初级氨基酸序列相关的初级氨基酸序列中包含一个或多个缺失、添加和/或取代，且不是用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割 S2C6 产生的。在本单元和下文的 5.7 单元提供选择合适的缺失、添加和/或取代的引导。

为制备另外的抗 CD40 的单克隆抗体，可使用在培养基中由传代细胞系生产抗体分子的任何技术。这些技术包括但不限于 Kohler 和 Milstein 的杂交瘤技术(1975, Nature 256, 495-497; 以及美国专利第 4,376,110 号)、人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor 等, 1983, Immunology Today 4, 72; Cole 等, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-2030)以及生产人单克隆抗体的 EBV-杂交瘤技术(Cole 等, 1985, 单克隆抗体和癌症治疗, Alan R. Liss, Inc., 第 77-96 页)。这样的抗体或本领域可获得的其它抗 CD40 抗体例如可用作克隆的基础，并因此在 S2C6 重链重组表达时提供互补轻链(两条链可在同一细胞中重组表达，或在分开表达和纯化后体外组合); 或者，可使用来自任何特异性抗体的轻链。可将编码 S2C6 重链或编码含 S2C6 重链可变区的分子的核酸(例如质粒)转染入表达抗体轻链或含抗体轻链的分子的细胞中，用于表达多聚体蛋白; 所述抗体轻链可以是重组体或非重组体，并可以具有或不具有抗-CD40 特异性。或者，可任选在互补轻链或轻链可变区不存在的情况下，表达和使用 S2C6 重链或含其可变区或其 CDR 的分子。在各种实施方案中，本发明提供具有 CD40 结合亲和性的 S2C6 重链或一种分子(其含有一个或多个拷贝的重链 CDR 8、

9 和/或 10 或由其组成)或一种蛋白(肽或多肽), 所述蛋白的序列含有一个或多个拷贝的 CDR 8、9 和/或 10 或由其组成。在一个具体的实施方案中, 这种蛋白可以通过例如 C 末端酰胺化或 N 末端乙酰化对 N 或 C 末端进行修饰。

5 另外, 可使用通过将合适抗原特异性的小鼠抗体分子基因与合适生物活性的人抗体分子基因剪接在一起开发的用于产生“嵌合抗体”的技术(Morrison 等, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6851-6855; Neuberger 等, 1984, Nature 312, 604-608; Takeda 等, 1985, Nature 314, 452-454)。嵌合抗体是一种其中不同的部分得自不同的动物物种的分子, 例如具有鼠类单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的分子。(参阅例如美国专利第 4,816,567 号; 以及 Boss 等, 美国专利第 5,816,397 号)。在一个具体的实施方案中, 所述嵌合抗体包含由杂交瘤(保藏于 ATCC, 指定的保藏号为 PTA-110)分泌的单克隆抗体 S2C6 的可变区和人恒定区。在具体的实施方案中, 所述嵌合抗体的可变区含有示于图 3A 的 S2C6 V_L (SEQ ID NO: 2)和/或示于图 3B 的 S2C6 V_H (SEQ ID NO: 7)。

10 另外, 已开发了产生人源化抗体的技术。(参阅例如 Queen, 美国专利第 5,585,089 号和 Winter, 美国专利第 5,225,539 号)。免疫球蛋白轻链或重链可变区由被三个高变区间隔的“构架”区组成, 称为互补性决定区(CDR)。已精确定义了构架区和 CDR 的范围(参阅“目的免疫球蛋白的序列”, Kabat, E.等, 美国公共医疗卫生与人类健康部(1983))。简而言之, 人源化抗体是得自具有一个或多个人类以外物种的 CDR 和人免疫球蛋白分子的构架区的人类以外物种的抗体分子。

25 本发明包括含重链或轻链可变区的抗体或其衍生物, 所述可变区包含(a)一组三个互补性决定区(CDR), 其中所述 CDR 组来自单克隆抗体 S2C6, 和(b)一组四个构架区, 其中所述构架区组与单克隆抗体 S2C6 中的构架区组不同, 并且其中所述抗体或其衍生物免疫特异

性地结合 CD40。所述构架区组最好是得自人单克隆抗体，例如不结合 CD40 的人单克隆抗体。

5 在一个具体的实施方案中，本发明包括含轻链可变区的抗体或其衍生物，所述可变区包含(a)一组三个互补性决定区(CDR)，其中所述 CDR 组包含 SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4，和(b)一组四个构架区，其中所述构架区组与单克隆抗体 S2C6 中的轻链构架区组不同，并且其中所述抗体或其衍生物免疫特异性地结合 CD40。

10 在一个具体的实施方案中，本发明包括含重链可变区的抗体或其衍生物，所述可变区包含(a)一组三个互补性决定区(CDR)，其中所述 CDR 组包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或 SEQ ID NO: 10，和(b)一组四个构架区，其中所述构架区组与单克隆抗体 S2C6 的重链中的构架区组不同，并且其中所述抗体或其衍生物免疫特异性结合 CD40。

15 或者，可采用所描述的用于产生单链抗体的技术(美国专利第 4,946,778 号; Bird, 1988, Science 242, 423-426; Huston 等, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883; 和 Ward 等, 1989, Nature 334, 544-546)，使用 S2C6 序列产生单链抗体。通过经氨基酸桥连接 Fv 区的重链和轻链片段形成单链抗体，产生单链多肽。在一个具体的实施方案中，所述单链抗体包含示于图 3A 和图 3B 的氨基酸序列(分别为 SEQ ID NOS: 2 和 7)。

20 在一个具体的实施方案中，含有 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 6 的全部或部分的抗 CD40 抗体、多肽、肽或其它衍生物或其类似物是一种双特异性抗体(一般参见例如 Fanger 和 Drakeman, 1995, *Drug News and Perspectives* 8: 133-137)。对这样的双特异性抗体进行基因工程改造，以便识别(1)表位和(2)众多“触发”分子中的一种，例如骨髓细胞上的 Fc 受体和 T 细胞上的 CD3 和 CD2，它们已被鉴定为能够使细胞毒性 T 细胞破坏特定靶。可通过化学接合、杂交瘤或技术人员已知的重组分子生物学技术制备这种双功能抗体。在一个具

体的实施方案中，所述双功能抗体包含的分子含有 S2C6 重链或轻链可变区或其 CDR 序列，所述分子具有抗体重链或轻链的结构，但不同于天然 S2C6 重链或轻链(例如在构架区或人恒定区中具有氨基酸取代)。

5 可通过已知技术产生保留识别 CD40 能力的抗体片段。例如，这样的片段包括但不限于：可通过胃蛋白酶消化抗体分子产生的 F(ab')₂ 片段以及可通过还原 F(ab')₂ 片段的二硫键产生的 F(ab')片段。或者，可构建 Fab 表达文库(Huse 等，1989，Science 246: 1275-1281)，以允许快速且容易地鉴定具有所需的特异性的单克隆 Fab 片段。

10

5.7 S2C6 蛋白、衍生物和类似物

除了在以上 5.6 单元描述的那些抗体分子/变体以外，本发明还涉及 S2C6 蛋白、衍生物(包括但不限于片段)、类似物和 S2C6 蛋白分子。还提供编码 S2C6 蛋白衍生物和 S2C6 蛋白类似物的核酸。
15 在一个实施方案中，S2C6 蛋白由上文 5.1 单元描述的核酸所编码。在具体的方面，所述蛋白、衍生物或类似物由 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 6 的序列所编码。

与 S2C6 蛋白相关的衍生物和类似物的生产和应用属于本发明的范围。在一个具体的实施方案中，所述衍生物和类似物具有功能活
20 性，即能够表现出一种或多种与全长 S2C6 蛋白相关的功能活性。作为一个实施例，可在免疫测定或治疗性抑制肿瘤生长等中应用这样的具有所需结合特异性的衍生物或类似物。一个具体的实施方案涉及结合 CD40 并增强 CD40L 与 CD40 结合的 S2C6 蛋白片段。可通过本领域已知的各种免疫测定检测 S2C6 蛋白的衍生物或类似物的所
25 需活性，所述免疫测定包括但不限于使用以下技术的竞争性测定系统和非竞争性测定系统：诸如放射免疫测定、酶联免疫吸附测定(ELISA)、“夹心”免疫测定、蛋白质印迹、免疫荧光测定、A 蛋白测定、免疫电泳测定等。

另外，可使用本领域已知的测定检测或测定体内或体外抑制细胞增殖(例如抑制肿瘤生长)的能力或刺激细胞增殖(例如 B 细胞增殖)的能力。

具体而言，可通过提供功能等同分子的取代、添加(例如插入)或缺失改变 S2C6 序列，制备 S2C6 衍生物。由于核苷酸编码序列的简并性，所以编码与 S2C6 基因大致相同的氨基酸序列的其它 DNA 序列可用于本发明的实践。这些 DNA 序列包括但不限于包含 S2C6 基因的全部或部分的核苷酸序列，它们是通过编码序列中功能等同氨基酸残基的不同密码子的取代，由此产生沉默变化而得到改变。同样地，本发明的 S2C6 衍生物包括但不限于包含为初级氨基酸序列的 S2C6 蛋白的全部或部分氨基酸序列的那些物质，包括其中功能等同氨基酸残基取代所述序列的残基导致沉默变化的改变序列。例如，所述序列中的一个或多个氨基酸残基可被另一个起功能等价作用的相似极性氨基酸取代，产生沉默改变。所述序列中的氨基酸取代可选自所述氨基酸所属类型的其它成员。例如，非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。这类取代通常被理解为保守取代。

在本发明的一个具体实施方案中，提供由 S2C6 蛋白片段组成或包含 S2C6 蛋白片段的蛋白，其中所述 S2C6 蛋白片段由 S2C6 蛋白的至少 10 个(连续的)氨基酸组成。在其它实施方案中，所述片段由 S2C6 蛋白的至少 20 个或至少 50 个氨基酸组成。在具体的实施方案中，这种片段不长于 50、75、100 或 200 个氨基酸。S2C6 蛋白的衍生物或类似物包括但不限于那些含有与 S2C6 蛋白或其片段大致同源(例如在各种实施方案中，在没有插入或缺失的相同大小的氨基酸序列上的同一性至少为 60%或 70%或 80%或 90%或 95%，或与通过本

领域已知的计算机同源性程序进行序列对比的对比序列相比较，同一性至少为 60%或 70%或 80%或 90%或 95%)的区的分子，或者其编码核酸能够在高、中或低严格条件下与编码 S2C6 基因序列杂交的分子。

5 具体而言，用于测定同源性的计算机程序实例包括但不限于 TBLASTN、BLASTP、FASTA、TEASTA 和 CLUSTALW (Pearson 和 Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (8): 2444-8; Altschul 等, 1990, J. Mol. Biol. 215 (3): 403-10; Thompson 等, 1994, Nucleic Acids. Res. 22 (22): 4673-80; Higgins 等, 1996, Methods Enzymol 266: 10 383-402; Altschul 等, 1990, J. Mol. Biol. 215 (3): 403-10)。这些计算机程序中的每一种程序的默认参数均为熟知的，并可加以利用。

 具体而言，基本局部序列对比检索工具 (BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul 等, 1990, J. of Molec. Biol. 215: 403-410, “BLAST 算法; Altschul 等, 1997, Nuc. Acids. Res. 25: 15 3389-3402)是一种专门用于检索序列相似性的启发性检索算法，该算法可归结于使用 Karlin 和 Altschul 等, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-68; 1993, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90: 5873-77 的统计学方法的显著性。使用五种特定的 BLAST 程序执行以下的任务：1) BLASTP 程序比较氨基酸查询(query)序列与蛋白质序列数据库；2) 20 BLASTN 程序比较核苷酸查询序列与核苷酸序列数据库；3) BLASTX 程序比较核苷酸查询序列(双链)的 6-读框(frame)概念翻译产物与蛋白质序列数据库；4) TBLASTN 程序比较蛋白查询序列与在全部 6 个读框中翻译的核苷酸序列数据库(双链)；5) TBLASTX 程序比较核苷酸查询序列的 6-读框翻译产物与核苷酸序列数据库的 6-读框翻译产物。

25 Smith-Waterman (数据库：欧洲生物信息研究所 www.ebi.ac.uk/bic_sw/) (Smith-Waterman, 1981, J. of Molec. Biol., 147: 195-197)是一种用于序列对比的数学上严密的算法。

 FASTA (参见 Pearson 等, 1988, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 85:

2444-2448)是一种近似于 Smith-Waterman 算法的启发性算法。关于 BLAST、Smith-Waterman 和 FASTA 算法的步骤和优势的一般性论述, 参见 Nicholas 等, 1998, “序列数据库检索指南和序列记分方法”(www.psc.edu)及其中引用的参考文献。

5 本发明的 S2C6 衍生物和类似物可通过本领域已知的各种方法产生。可在基因或蛋白水平上进行导致其产生的操作。例如, 可通过本领域已知的众多策略中的任一种, 修饰克隆的 S2C6 基因序列 (Sambrook 等, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二
10 York)。可用限制性内切核酸酶在合适的位点切割所述序列, 接着如果需要的话进一步进行酶修饰、分离并体外连接。在产生编码 S2C6 蛋白衍生物或类似物的修饰基因时, 应小心确保所述修饰基因保留在与天然蛋白相同的翻译读框中, 而不致于在编码所需的 S2C6 蛋白活性的基因区中被翻译终止信号间断。

15 另外, S2C6 核酸序列可在体外或体内突变, 以产生和/或破坏翻译序列、起始序列和/或终止序列, 或在编码区产生变异和/或形成新的限制性内切核酸酶位点或破坏预先存在的限制性内切核酸酶位点, 以易于进一步的体外修饰。可以使用任一种本领域已知的诱变技术, 包括但不限于化学诱变、体外定点诱变(Hutchinson 等, 1978,
20 J. Biol. Chem. 253: 6551)、使用含有诱变的引物的 PCR 等。

还可以在蛋白水平上操作 S2C6 蛋白序列。包括在本发明范围内的 S2C6 蛋白片段或其它衍生物或类似物在翻译过程中或在翻译后被分别修饰, 例如通过糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、利用已知的保护基/封闭基团衍生化、蛋白酶剪切、连接至抗体分子或其它细
25 胞配体等。可通过已知技术进行众多化学修饰中的任一种, 包括但不限于利用溴化氰、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶、V8 蛋白酶、 NaBH_4 进行特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、氧化、还原、在衣霉素存在下的代谢合成等。

另外，可化学合成 S2C6 蛋白的类似物和衍生物。例如，可使用肽合成仪合成对应于一部分、含有所需的结构域或在体外介导所需的活性的 S2C6 蛋白的肽。而且，如果需要的话，可将非典型氨基酸或化学氨基酸类似物以取代或添加引入到 S2C6 序列中。非典型氨基酸包括但不限于一般氨基酸的 D-异构体、 α -氨基异丁酸、4-氨基丁酸、Abu、2-氨基丁酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6-氨基己酸、Aib、2-氨基异丁酸、3-氨基丙酸、鸟氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、羟脯氨酸、肌氨酸、瓜氨酸、半胱氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、苯甘氨酸、环己基丙氨酸、 β -丙氨酸、氟代氨基酸、designer 氨基酸(诸如 β -甲基氨基酸、C α -甲基氨基酸、N α -甲基氨基酸)和一般的氨基酸类似物。而且，所述氨基酸可以是 D(右旋)氨基酸或 L(左旋)氨基酸。

在其它的具体实施方案中，S2C6 蛋白、片段、类似物或衍生物可作为融合或嵌合蛋白产物(包含通过肽键连接不同蛋白的异源蛋白序列的所述蛋白、片段、类似物或衍生物)表达。所述异源蛋白序列可含有生物反应调节剂，包括但不限于 α 干扰素、 γ 干扰素、白介素-2、白介素-4、白介素-6 和肿瘤坏死因子或其功能活性部分。或者，所述异源蛋白序列可包含酶(如 β -内酰胺酶或羧酸酯酶)或毒素(如 bryodin 1、假单胞菌外毒素 A 或 gelonin)或其功能活性部分。或者，S2C6 蛋白可与化疗剂化学连接，所述化疗剂包括但不限于烷化剂(例如氮芥、亚硝基脲、三氮烯); 抗代谢物(例如叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似剂); 天然产物(例如抗生素、酶、生物反应调节物); 其它物质(例如取代的脲、铂配位复合物); 以及激素和拮抗剂(例如雌激素、雄激素、抗雄激素、促性腺素释放激素类似物); 或其功能活性部分(参见例如 Goodman 和 Gilman, 治疗的药理基础, 第九版, McGraw-Hill, 第 1225-1287 页, 1996)。可通过本领域已知的方法, 将编码所需的氨基酸序列的合适核酸序列在正确的编码框内互相连接, 并通过本领域通常已知的方法表达所述嵌合产物, 从而制备这样的嵌合产物。或者, 可通过蛋白合成技术(例如使用肽合成仪)制备这样的嵌合产

物。在不同的实施方案中，异源蛋白序列可通过非肽键(例如使用本领域众所周知的化学交联剂)与 S2C6 相关序列共价结合。

在一个具体的实施方案中，S2C6 蛋白衍生物是一种含有 S2C6 蛋白或其片段(优选由 S2C6 蛋白的至少一个结构域或基序组成，或由 S2C6 蛋白的至少 10、50 或 100 个氨基酸组成)的嵌合或融合蛋白，其中所述 S2C6 蛋白或其片段在其氨基末端或羧基末端通过肽键连接至不同蛋白的氨基酸序列。在一个具体的实施方案中，所述不同蛋白是毒素、酶或生物反应调节剂。

在具体的实施方案中，所述不同蛋白的氨基酸序列为所述不同蛋白的至少 6、10、20 或 30 个连续的氨基酸或所述不同蛋白的功能活性部分，在一个实施方案中，通过重组表达编码所述蛋白(包含在读框内连接至不同蛋白的编码序列的 S2C6 编码序列)的核酸产生这样的嵌合蛋白。可通过本领域已知的方法，将编码所需的氨基酸序列的合适核酸序列在正确的编码框内互相连接，并通过本领域通常已知的方法表达所述嵌合产物，从而制备这样的嵌合产物。或者，可通过蛋白合成技术(例如使用肽合成仪)制备这样的嵌合产物。可构建含有融合至任何异源蛋白编码序列的 S2C6 基因部分的嵌合基因。一个具体的实施方案涉及的嵌合蛋白含有的 S2C6 蛋白片段至少为 6 或 15 或 50 个氨基酸，或具有 S2C6 蛋白的一种或多种功能活性(例如包含一个或多个 CDR 的拷贝)。

在一个具体的实施方案中，S2C6 蛋白或其衍生物化学连接至化疗药物(包括但不限于阿霉素、紫杉醇或 docetaxel)。这种 S2C6-药物结合体可将所述药物传递至表达 CD40 的细胞。S2C6 蛋白或衍生物可连接一种或多种药物分子。连接包括但不限于胍、肽或糖连接。

在另一个具体的实施方案中，所述衍生物是一种含有与 S2C6 蛋白同源的区的分子。作为实施例，在各种实施方案中，当第一个蛋白区的氨基酸序列(没有任何插入或缺失)与第二个蛋白区(其含有的氨基酸数目与所述第一个区中含有的氨基酸数目相等)的任何序列相

比至少 30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或 95%相同，或当第一个蛋白区的氨基酸序列与第二个区的已通过本领域已知的计算机同源程序进行比较的对比序列相比至少 30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或 95%相同时，则可认为所述第一个蛋白区与所述第二个蛋白区同源。

5.8 杂交条件

在一个具体的实施方案中，提供在低严格条件下与 S2C6 核酸(例如具有 SEQ ID NOS: 1 或 6 所提供的序列)或其反向互补物或者编码 S2C6 衍生物的核酸或其反向互补物杂交的核酸。作为非限制性实例，以下为使用这类低严格条件的方法(也参见 Shilo 合 Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6789-6792)。于 40℃在含 35%甲酰胺、5X SSC、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EDTA、0.1% PVP、0.1% Ficoll、1% BSA 和 500 µg/ml 变性鲑精 DNA 的溶液中预处理含 DNA 的滤器 6 小时。在具有以下改变的相同溶液中进行杂交：0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100 µg/ml 鲑精 DNA、10%(重量/体积)硫酸葡聚糖，并使用 $5-20 \times 10^6$ cpm ^{32}P 标记的探针。滤器于 40℃在杂交混合物中温育 18-20 小时，然后于 55℃在含 2X SSC、25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA 和 0.1% SDS 的溶液中漂洗 1.5 小时。用新鲜溶液替换漂洗溶液，并于 60℃再温育 1.5 小时。吸干滤器并进行放射自显影曝光。如果必要，于 65-68℃第三次清洗滤器并对胶片重新曝光。可以使用的其它低严格条件是本领域众所周知的(例如采用种间杂交)。

在一个具体的实施方案中，提供在高严格条件下与 S2C6 核酸(例如具有 SEQ ID NOS: 1 或 6 所提供的序列)或其反向互补物或者编码 S2C6 衍生物的核酸或其反向互补物杂交的核酸。作为非限制性实例，以下为使用这类高严格条件的方法。于 65℃在由 6X SSC、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA

和 500 $\mu\text{g/ml}$ 变性鲑精 DNA 组成的缓冲液中预杂交含 DNA 的滤器 8 小时至过夜。于 65 $^{\circ}\text{C}$ 使滤器在含 100 $\mu\text{g/ml}$ 变性鲑精 DNA 和 $5\text{-}20 \times 10^6$ cpm ^{32}P 标记的探针的预杂交混合物中杂交 48 小时。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 在含 2X SSC、0.01% PVP、0.01% Ficoll 和 0.01% BSA 的溶液中漂洗滤器 1 小时。接着于 50 $^{\circ}\text{C}$ 在 0.1X SSC 中漂洗 45 分钟，然后放射自显影。可以使用的其它高严格条件是本领领域众所周知的。

在一个具体的实施方案中，提供在中等严格条件下与 S2C6 核酸(例如具有 SEQ ID NOS: 1 或 6 所提供的序列)或其反向互补物或者编码 S2C6 衍生物的核酸或其反向互补物杂交的核酸。对合适的中等严格条件的选择是本领域众所周知的(参见例如 Sambrook 等, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: New York; 还参见 Ausubel 等编辑, 载于: 实验室技术手册分子生物学系列现时方案, 1987-1997 Current Protocols,[©] 1994-1997 John Wiley and Sons, Inc.)。

5.9 治疗应用

本发明通过给予治疗性化合物(本文称为“治疗剂”)提供对各种疾病或紊乱的治疗和预防。这样的治疗剂包括但不限于: S2C6 抗体及其衍生物(例如上文所述); 以及编码这种 S2C6 抗体及其衍生物的核酸(例如上文所述)。本文使用的“治疗”实际上应包括任何对所述疾病或紊乱有临床需要或有益的作用, 包括但不限于缓解一种或多种症状、抑制、减缓或终止恶化等。

在本发明的具体实施方案中, 所述治疗剂或单独给予或与 CD40L 一起给予, 以治疗或预防恶性肿瘤(包括但不限于癌和血癌)、炎性疾病以及免疫系统疾病。所述治疗剂和 CD40L 可以(但不是必须)包含在同一制剂中, 即所述治疗剂和 CD40 可分别给予, 但也可同时给予或同一治疗过程中给予。在一个具体的实施方案中, 所述恶性细胞表达 CD40。或者, 所述恶性细胞不必表达 CD40, 因为与恶性肿

瘤相连的脉管系统的内皮细胞应表达 CD40，因此本发明的治疗剂甚至对不表达 CD40 的肿瘤也能提供治疗功效。在一个优选的实施方案中，所述治疗剂使 CD40L 与 CD40 的结合增强至少 45%、50%、60 或 65%。

5 在具体的实施方案中，所述治疗剂用于增强免疫受抑制的个体(如罹患获得性免疫缺陷综合征、恶性肿瘤的人或婴儿或老年人)的免疫应答。

10 在本发明的其它实施方案中，所述治疗剂可进行化学修饰，以便杀死其结合的细胞。这样的细胞包括但不限于多发性骨髓瘤细胞、淋巴瘤细胞或癌细胞。因为所有的 B 细胞都表达 CD40，所以该方法可对免疫应答产生抑制。例如，为了越移植患者的组织相容性屏障，可使用连接 S2C6 序列的细胞毒性药物(例如融合蛋白)，以在体内引起免疫抑制；或者可使用这些修饰的配体控制自身免疫性疾病。

15 在其它的实施方案中，所述治疗剂可用于促进非 B 细胞的携带 CD40 的细胞(例如肺癌细胞)的增殖和/或分化，作为直接治疗恶性肿瘤的工具或作为化疗辅助剂。

可使用本发明的治疗剂治疗或预防的恶性肿瘤包括但不限于表 1 中的那些恶性肿瘤：

表 1

恶性肿瘤和相关疾病

白血病

急性白血病

急性淋巴细胞白血病

急性骨髓细胞白血病

急性成髓细胞白血病

急性前髓细胞白血病

急性骨髓单核细胞白血病

急性单核细胞白血病

急性红白血病

慢性白血病

慢性骨髓细胞(粒细胞)白血病

慢性淋巴细胞白血病

脾大性红细胞增多

淋巴瘤

何杰金氏病

非何杰金氏病

多发性骨髓瘤

Waldenström 氏巨球蛋白血症

重链疾病

实体瘤

肉瘤和癌症

纤维肉瘤

粘液肉瘤

脂肪肉瘤

软骨肉瘤

骨源性肉瘤

骨肉瘤

脊索瘤

血管肉瘤

内皮肉瘤

淋巴管肉瘤

淋巴管内皮肉瘤

滑膜瘤

间皮瘤

Ewing 氏瘤

平滑肌肉瘤

横纹肌肉瘤
结肠癌
结肠直肠癌
胰腺癌
乳癌
卵巢癌
前列腺癌
鳞状细胞癌
基细胞癌
腺癌
汗腺癌
皮脂腺癌
乳头状癌
乳头状腺癌
囊腺癌
髓样癌
支气管原性癌
肾细胞癌
肝细胞瘤
胆管癌
绒膜癌
精原细胞瘤
胚胎癌
Wilms 氏肿瘤
颈癌
子宫癌
睾丸癌
肺癌

小细胞肺癌
非小细胞肺癌
膀胱癌
上皮细胞癌
神经胶质瘤
星细胞瘤
成神经管细胞瘤
颅咽管瘤
室管膜细胞瘤
松果体瘤
成血管细胞瘤
听神经瘤
寡枝神经胶质细胞瘤
脑膜瘤(menangioma)
黑素瘤
成神经细胞瘤
眼癌
鼻咽癌
食道癌

可使用本发明的治疗剂治疗或预防的炎性疾病和免疫系统缺陷或疾病包括但不限于在表 2 中的那些病症:

表 2

炎性疾病和免疫系统疾病

系统性红斑狼疮(SLE)
硬皮病(例如 CRST 综合征)
炎症性肌炎

Sjögren 氏综合征(SS)

混合性结缔组织疾病(例如 MCTD、Sharp 综合征)

类风湿性关节炎

多发性硬化

炎性肠道疾病(例如溃疡性结肠炎、节段性结肠炎)

急性呼吸窘迫综合征

肺炎

骨质疏松症

迟发型过敏症

哮喘

夏科氏肝硬变(PBC)

自发性血小板减少性紫癜(ITP)

5.9.1 有效剂量

5 可通过标准药理学方法测定所述治疗剂在细胞培养物或实验性动物中的毒性和治疗功效，例如测定 LD_{50} (使 50% 的群体致死的剂量) 和 ED_{50} (在 50% 的群体中治疗有效的剂量)。毒性和疗效之间的剂量比率为治疗指数，它可以表示为 LD_{50}/ED_{50} 比率。优选具有大治疗指数的治疗剂。尽管可以使用具有毒性副作用的治疗剂，但应小心设计将所述化合物靶向受累组织部位的传递系统，以使对未感染细胞的潜在伤害最小，并因此减少副作用。

10 在配制人类使用的剂量范围时，可使用由细胞培养测定和动物研究所获得的数据。典型剂量包括但不限于 1 ng/kg 至 100 mg/kg。所述治疗剂的剂量优选位于包括几乎无毒或无毒的 ED_{50} 的循环浓度范围内。所述剂量可根据使用的剂型和利用的给药途径而在此范围内有所变化。对于一种治疗剂，最好先由细胞培养测定评价治疗有效剂量。

15 可配制一种剂量，以在动物模型中达到循环血浆浓度范围，包括在细胞培养中测定的 IC_{50} (即达到对综合征最大抑制一半时的测

试化合物浓度)。可使用这种信息,以更精确地测定在人类中有用的剂量。例如可通过高效液相色谱检测在血浆中的水平。

5.9.2 配制

5 可以常规方式,使用一种或多种生理学上可接受的载体或赋形剂,配制按照本发明使用的药用组合物。

 因此,可配制所述治疗剂及其生理学上可接受的盐和溶剂化物,以通过吸入或吹入(或通过嘴或通过鼻)给药或口服、口腔含化、胃肠外或直肠给药。

10 对于口服给药,所述药用组合物可采用例如通过常规方法利用药学上可接受的赋形剂制备的片剂或胶囊剂剂型,其中所述赋形剂有例如粘合剂(例如预凝胶化的玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石粉或二氧化硅);崩解剂(例如马铃薯淀粉或羟基乙

15 酸淀粉钠);或润湿剂(例如十二烷基硫酸钠)。片剂可通过本领域广为人知的方法进行包衣。口服的液体制剂可采用的剂型例如为溶液剂、糖浆剂或悬浮剂,或者它们可作为在使用前用水或其它合适溶媒稀释的干燥产品存在。这样的液体制剂可通过常规方法,用药学上可接受的添加剂制备,其中所述添加剂例如为悬浮剂(例如山梨醇

20 糖浆、纤维素衍生物或氢化可食用脂肪);乳化剂(例如卵磷脂或阿拉伯胶);非水溶性载体(例如杏仁油、油酯、乙醇或分馏植物油);以及防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯或羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。所述制剂在合适时还可以含有缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。

 可适当地配制口服给药制剂,以获得控释的活性化合物。

25 对于口腔含化给药,所述组合物可采用以常规方式配制的片剂或锭剂剂型。

 对于吸入给药,按照本发明使用的所述治疗剂通常以由加压填充器或喷雾器使用合适的抛射剂提供的气溶胶喷雾剂形式传递,所

述抛射剂例如为二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体。在加压气溶胶的情况下，可通过提供一种计量的量传递的阀确定剂量单位。用于吸入剂或吹入剂的胶囊和药筒(例如明胶)，可配制成含有所述化合物的粉末混合物和一种合适的粉末基，诸如乳糖或淀粉。

所述治疗剂可配制为通过注射胃肠外给予，例如通过大剂量注射或连续输注。注射制剂可以是有或没有添加的防腐剂的单位剂型(例如在安瓿或多剂量容器中)。所述组合物可采用诸如在油性或水性溶媒中的悬浮液、溶液或乳液的形式，并可以含有配制剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者，所述活性成分可以为在使用前用合适溶媒(例如灭菌无热源水)配制的粉末形式。

所述治疗剂还可以被配制为直肠组合物，诸如栓剂或保留灌肠剂，例如含常规栓剂基质(如可可酯或其它甘油酯)的组合物。

除了先前描述的制剂以外，所述治疗剂还可以被配制为包埋长效(depot)制剂。这种长效制剂可通过植入(例如皮下或肌肉)或肌肉注射给药。因此，例如所述治疗剂可用合适的聚合物或疏水性物质(例如在可接受的油中的乳液)或离子交换树脂配制，或配制为微溶衍生物，例如微溶盐。

如果需要的话，所述组合物可存在于包装或分散装置中，所述装置可含有一种或多种含所述活性成分的单位剂型。所述包装例如可包括金属或塑料薄片，诸如泡罩包装。所述包装或分散装置可附带有优选给予人的给药说明。

在具体的实施方案中，本发明提供包含治疗有效量的治疗剂与CD40配体的药用组合物。

在以下的实施例中进一步描述本发明，但这些实施例决不是限制本发明的范围。

6. 实施例：克隆 S2C6 可变区

6.1 材料与方法

使用基本如 Gilliland 等, 1996, Tissue Antigens 47: 1-20 所述的方法, 克隆 S2C6 轻链和重链可变区。由 S2C6 杂交瘤分离总 RNA。使用逆转录酶和退火 JC 接点(junction)下游大约 100 个碱基对的反义引物, 制备小鼠 κ 轻链和重链可变区的互补 DNA(cDNA)第一链。使用末端转移酶将聚鸟苷酸尾(poly-G tail)加入到所述 cDNA 链中, 然后使用聚合酶链反应(PCR)合成双链 DNA。设计对所述聚鸟苷酸尾或轻链或重链 cDNA 内部约 50 个碱基的序列特异性的 PCR 引物, 使之能包括独特限制酶切位点。扩增后, 将用 *EcoRI* 和 *HindIII* 消化的 PCR 产物克隆入已用相同限制酶消化的 pUC19 中。连接这些反应物, 转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 并通过限制酶切分析筛选获得的克隆。通过在 Li-Cor 荧光测序仪上进行 DNA 测序, 对限制酶消化分析为阳性的克隆测序。在图 1 中显示了轻链可变区(V_L)的核苷酸序列(SEQ ID NO: 1)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)。在图 2 中显示了重链可变区(V_H)的核苷酸序列(SEQ ID NO: 6)和氨基酸序列(SEQ ID NO: 7)。图 3A-3B 图解显示了 S2C6 V_L 和 S2C6 V_H 的氨基酸序列(分别为图 3A 和 3B)。CDR 标出下划线。 V_L CDR 1-3 的氨基酸序列分别对应于 SEQ ID NOS: 3-5。 V_H CDR 1-3 的氨基酸序列分别对应于 SEQ ID NOS: 8-10。

然后比较获得的 DNA 序列与相同同种型的其它鼠抗体的轻链和重链可变区, 并测定分离自 S2C6 的基因的读框和对应的氨基酸序列。为证实所述氨基酸序列, 对 S2C6 单克隆抗体的轻链和重链可变区进行 N-末端氨基酸分析。

1999 年 4 月 21 日提交 S2C6 V_L 、S2C6 V_H 以及 V_L 和 V_H 二者 CDR 的氨基酸序列, 使用 NR 数据库(全部非冗余 GenBank CDS 翻译物 + PDB + SwissProt + PIR + PRF)和 Kabat 数据库(Kabat 的有关免疫球蛋白序列数据库)进行 BLASTP 检索。在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 使用登录号可获取使用 NR 数据库发现的

序列。在 http://immuno.bme.nwu.edu/database_.html 和 SEQHUNT II 使用登录号可获取使用 Kabat 数据库发现的序列。这些检索结果如下所示:

5 **使用 NR 数据库进行 BLASTP 检索**

S2C6 VL (SEQ ID NO: 2): 用 S2C6 VL 作为查询序列对 NR 数据库进行 BLASTP 检索, 在 100% 同一性时未得到命中序列, 而在 94% (106/112) 同一性时获得 6 个命中序列。这 6 个序列示于以下:

10 pir | PT0359 IgG κ 链 V 区(R4A.12) – 小鼠(片段)
 gi | 196660 (M59949) 免疫球蛋白 κ 链 VJ 区[鼠类肌肉]
 gi | 196954 (M12183) κ 链 V 区[鼠类肌肉] > gi | 2247[鼠类肌肉]
 pir | B34904 Ig κ 链前体 V 区(12-40 和 5-14) ...
 emb | CAA80076 | (Z22102) 免疫球蛋白可变区[鼠类肌肉]
 dbj | BAA22172 | (AB006833) 抗假尿苷单克隆抗体 ...

15 **VL CDR1 (SEQ ID NO: 3):** 用 VL CDR1 作为查询序列进行 BLASTP 检索, 在 100% 同一性时未得到命中序列, 而在 93% (15/16) 同一性时获得无数命中序列。其中前 5 个序列示于以下:

20 dbj | BAA03480 | (D14627) 免疫球蛋白 γ -3 κ 链[鼠类肌肉]
 dbj | BAA22172 | (AB006833) 抗假尿苷单克隆抗体 ...
 gi | 4101647 (AF005352) 免疫球蛋白 V 区轻链[鼠类肌肉]
 gi | 3377681 (AF078800) 单链抗 HIV-1 Rev 可变区片段
 gi | 1870366 (U55625) 抗 DNA 免疫球蛋白轻链 IgM [鼠类肌肉]

25 **VL CDR2 (SEQ ID NO: 4):** 用 VL CDR2 作为查询序列对 NR 数据库进行 BLASTP 检索, 未得到命中序列。

VL CDR3 (SEQ ID NO: 5): 用 VL CDR3 作为查询序列对 NR

数据库进行 BLASTP 检索，未得到命中序列。

S2C6 VH (SEQ ID NO: 7): 用 S2C6 VH 作为查询序列对 NR 数据库进行 BLASTP 检索，在 100%同一性时未得到命中序列，而在最多可至 88%同一性时获得无数命中序列，其中的前 5 个序列示于以下：

gi | 3561044 (AF083186) 抗 HIV-1 p24 抗体 D2 重链 [鼠类肌肉]
pdb | 1A6T | B 链 B, Mab1-Ia 单克隆抗体的 Fab 片段
gi | 2895955 (AF045895) IgG1 重链 mAB1-IA [鼠类肌肉]
emb | CAA80023 | (Z22049) 免疫球蛋白可变区 [鼠类肌肉]
gi | 194510 (M91695) 免疫球蛋白 γ -1 链 [鼠类肌肉]

VH CDR1 (SEQ ID NO: 8): 用 VH CDR1 作为查询序列对 NR 数据库进行 BLASTP 检索，未得到命中序列。

VH CDR2 (SEQ ID NO: 9): 用 VH CDR2 作为查询序列对 NR 数据库进行 BLASTP 检索，在 100%同一性时未得到命中序列，在 94% (16/17) 同一性时获得 1 个命中序列，而在低于 94% 的同一性时得到无数个命中序列。94% 同一性时获得的 1 个命中序列如下所示：

gi | 3561044 (AF083186) 抗 HIV-1 p24 抗体 D2 重链 [鼠类肌肉]

VH CDR3 (SEQ ID NO: 10): 用 VH CDR3 作为查询序列对 NR 数据库进行 BLASTP 检索，未得到命中序列。

使用 KABAT 数据库进行 BLASTP 检索

S2C6 VL (SEQ ID NO: 2): 用 S2C6 VL 作为查询序列对 Kabat 数据库进行 BLASTP 检索，在 100%同一率时未得到命中序列，而在 89-91% 同一率时获得无数个命中序列。前 5 个序列示于以下：

KADBID 005591, 小鼠 IG κ 轻链可变区 (5-14...),

KADBID 005594, 小鼠 IG κ轻链可变区(10VA...),
KADBID 005593, 小鼠 IG κ轻链可变区(12-4...),
KADBID 005603, 小鼠 IG κ轻链可变区(17s...),
KADBID 005588, 小鼠 IG κ轻链可变区(TEPC...).

5

VL CDR1 (SEQ ID NO: 3): 用 VL CDR1 作为查询序列对 Kabat 数据库进行 BLASTP 检索, 在 100%同一率时未得到命中序列, 而在 93% (15/16)同一率时获得无数命中序列。前 5 个序列示于以下:

10 KADBID 005720, 小鼠 IG κ轻链可变区(BW24...),
KADBID 005614, 小鼠 IG κ轻链可变区(PME7...),
KADBID 005624, 小鼠 IG κ轻链可变区(C5-7...),
KADBID 005621, 小鼠 IG κ轻链可变区(40-6...),
KADBID 005640, 小鼠 IG κ轻链可变区(40-9...).

15 **VL CDR2** (SEQ ID NO: 4): 用 VL CDR2 作为查询序列对 Kabat 数据库进行 BLASTP 检索, 未得到命中序列。

VL CDR3 (SEQ ID NO: 5): 用 VL CDR3 作为查询序列对 Kabat 数据库进行 BLASTP 检索, 在与所述查询序列的同一性为 100%时得到 1 个命中序列:

KADBID 005681, 小鼠 IG κ轻链可变区(NC10...).

25 **S2C6 VH** (SEQ ID NO: 7): 用 S2C6 VH 作为查询序列对 Kabat 数据库进行 BLASTP 检索, 在与所述查询序列的同一性为 100%时未得到命中序列, 而在与所述查询序列的同一性为 79-85%时获得无数命中序列。前 5 个命中序列示于以下:

KADBID 001498, 小鼠 IG 重链可变区(HDEX24),
KADBID 001494, 小鼠 IG 重链可变区(HDEX5),

KADBID 001529, 小鼠 IG 重链可变区(163.72'CL),
KADBID 001500, 小鼠 IG 重链可变区(HDEX 37),
KADBID 001597, 小鼠 IG 重链可变区(BB128'CL)。

5 **VH CDR1** (SEQ ID NO: 8): 用 VH CDR1 作为查询序列对 Kabat 数据库进行 BLASTP 检索, 未得到命中序列。

10 **VH CDR2** (SEQ ID NO: 9): 用 VH CDR 作为查询序列对 Kabat 数据库进行 BLASTP 检索, 在与所述查询序列的同一率为 100% 时未得到命中序列, 而在与所述查询序列的同一率为 87-88% 时获得 10 个命中序列。前 5 个命中序列如下所示:

 KADBID 001535, 小鼠 IG 重链可变区(H10''CL),
 KADBID 001534, 小鼠 IG 重链可变区(H81'CL),
 KADBID 001533, 小鼠 IG 重链可变区(H50'CL),
15 KADBID 019741, 小鼠 IG 重链可变区(克隆 F'CL),
 KADBID 001529, 小鼠 IG 重链可变区(163.72'CL)。

VH CDR3 (SEQ ID NO: 10): 用 VH CDR3 作为查询序列对 Kabat 数据库进行 BLASTP 检索, 未得到命中序列。

20

7. 实施例: S2C6 的生物活性

7.1 材料与方法

7.1.1 抗-CD40 抗体的制备

25 于 37°C 在含 10% 胎牛血清(FBS)、100 单位/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素的完全 IMDM(Gibco-BRL, Grand Island, NY)中培养 S2C6 杂交瘤。通过离心收获培养物, 并通过使用 0.2 μ m 滤膜过滤收集上清液。随后将所述上清液上 GammaBind™ Sepharose 柱(Pierce), 用磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤, 并用 0.1 M 甘氨酸 pH 2.5 洗脱。在洗脱后立

即用 1 M Tris pH 8.0 中和抗体，透析到 PBS 中，并除菌过滤。通过大小排阻层析分析单克隆抗体制品。在本文所述的研究中只使用单体蛋白超过 99% 的样品。

7.1.2 人肿瘤异种移植模型

得到 90 只 6-8 周龄的雌性 C.B.-17 SCID 小鼠(Taconic Labs, Germantown, NY)，并隔离检疫 2 周。对照组小鼠静脉内(i.v.)注射人 B 细胞肿瘤系：Ramos(非何杰金氏淋巴瘤)细胞、HS Sultan(多发性骨髓瘤)细胞或 IM-9(多发性骨髓瘤)细胞(1×10^6 - 2×10^6 细胞)。余下的小鼠被分为两组；一半在注射肿瘤细胞前 1 天静脉注射 200 μ l 1:10 稀释的抗-脱唾液酸-GM1 (Wako Chemicals, Richmond, VA)，以去除宿主天然杀伤细胞(Murphy 等, 1992, Eur. J. Immunol. 22: 241)。两组小鼠静脉注射 Ramos 细胞、HS Sultan 细胞或 IM-9 细胞(1×10^6 - 2×10^6 细胞)。然后由肿瘤移植后第 1 天或第 5 天开始，按照以下的时间表对测试组小鼠腹腔内(i.p.)注射 1 mg/kg 的如 7.1.2 单元中所述制备的 S2C6 IgG，并监测测试组小鼠的部分瘫痪或其它疾病体征。

异种移植模型时间表

组别	肿瘤细胞系	抗 体 (1 mg/kg, i.p.)	抗-脱唾液酸-GM1	用 mAb 处理天数
1 对照	Ramos	-	-	-
2	Ramos	S2C6	-	1, 5, 9, 13, 17
3	Ramos	S2C6	-	5, 9, 13, 17, 21
4	Ramos	S2C6	+	1, 5, 9, 13, 17
5	Ramos	S2C6	+	5, 9, 13, 17, 21
6 对照	HS Sultan	-	-	-
7	HS Sultan	S2C6	-	1, 5, 9, 13, 17
8	HS Sultan	S2C6	-	5, 9, 13, 17, 21
9	HS Sultan	S2C6	+	1, 5, 9, 13, 17
10	HS Sultan	S2C6	+	5, 9, 13, 17, 21

11 对照	IM-9	-	-	-
12	IM-9	S2C6	-	1, 5, 9, 13, 17
13	IM-9	S2C6	-	5, 9, 13, 17, 21
14	IM-9	S2C6	+	1, 5, 9, 13, 17
15	IM-9	S2C6	+	5, 9, 13, 17, 21

7.1.3 外周血 B 细胞分离

使用抗 CD19 和 CD20 二者的固定化抗体，通过正选择分离外周血 B 细胞。经流式细胞仪测定，最终分离的细胞群含有的 B 细胞超过 85%。为了储存，将所述细胞在含 10% 二甲基亚砷的胎牛血清(FBS)中稀释至 4×10^7 细胞/ml，并储存在液氮冷冻装置中。

7.1.4 B 细胞增殖测定

解冻人外周血 B 细胞，并在 5 ng/ml 重组人 IL-4 (Biosource)和各种稀释度的抗-CD40 单克隆抗体：S2C6、G28-5(Bristol-Myers Squibb)或 M3 (Genzyme #80-3702-04)存在的情况下，在 IMDM 培养基 + 10% FBS 中以 1×10^5 细胞/孔在 96 孔组织培养板中温育。作为对照，细胞与 IL-4 和不相关对照单克隆抗体 EXA2-1H8 (抗假单胞菌外毒素)温育。该板于 37℃ 温育 3 天，然后以 0.5 mCi ^3H -胸苷/孔脉冲 16 小时。使用 Filtermate 196 Harvester™ (Packard Instruments)将细胞收获在 96 孔玻璃纤维过滤器上，并与闪烁液混合。使用 Topcount LSC™ (Packard Instruments)通过液闪记数检测 ^3H -胸苷掺入到新生 DNA 中的程度。

将选择用来组成型表达高水平 CD40L 的 Jurkat 细胞系 (“Jurkat/CD40L”)用作 CD40L 刺激细胞(Malik 等, 1996, J. Immunol. 156: 3952-60)。为消除刺激细胞增殖，将它们用丝裂霉素(50 mg/ml)的 PBS 溶液于 37℃ 处理 20 分钟，接着在 PBS 中洗涤 3 次，然后与 B 细胞混合。将 B 细胞(1×10^5 细胞/孔)与 Jurkat/CD40L 细胞混合，如上所述进行测定。首先将 B 细胞和 IL-4 与刺激细胞(2.5×10^4 细胞/

孔)混合,接着立即加入抗 CD40 单克隆抗体。用固定浓度的刺激细胞滴定单克隆抗体,或者用固定浓度的单克隆抗体滴定刺激细胞。

7.1.5 CD40/CD40L 结合测定

5 在这些测定中使用 Jurkat/CD40L 细胞系作为靶细胞系。将细胞浓度调节为 $2 \times 10^7/\text{ml}$, 每个样品 50 μl 。在 RPMI 1640 培养基(Gibco) + 10% FBS 中进行结合。为测定受体饱和度,将 Jurkat/CD40L 细胞与增加浓度的 CD40-Ig (CD40 和人免疫球蛋白的可溶性融合蛋白)温育(Noelle 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6550-6554), 洗
10 涤并与缀合抗人免疫球蛋白的异硫氰酸荧光素(“FITC-抗-人 Ig”)温育。使用 FacScan™流式细胞仪(Becton Dickinson)评价产生的结合。将重组可溶性 CD40-Ig (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)在冰上与增加浓度的 S2C6 单克隆抗体预温育 1 小时。抗-CD40 单克隆抗体 G28-5、M3 和抗假单胞菌外毒素(一种同种型对照品)被用于比较。可溶性重组人 CD40 配体
15 (CD154- $\mu\text{CD}8$)作为与鼠 CD8 的融合蛋白产生并用 FITC 标记,该配体得自 Research Diagnostics, Inc.(Flanders, NJ)。以 4 倍终浓度稀释可溶性 CD40-Ig 和抗-CD40 单克隆抗体,在冰上预温育 1 小时,然后在冰上与 Jurkat 细胞混合 1 小时。洗涤细胞,并用 FITC-山羊抗人 F(ab')_2 (Jackson Labs, Fc 特异性#109-096-098)标记。通过流式细胞仪测定 CD40 结合的程度。
20

7.2 结果

7.2.1 体外研究: S2C6 单克隆抗体促进 CD40/CD40L 的相互作用

25 为评价抗 CD40 单克隆抗体对可溶性 CD40 与在激活 T 细胞表面表达的 CD40L 的结合的影响,将增加浓度的各种 CD40 单克隆抗体与 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 可溶性 CD40-Ig 预温育,接着与 Jurkat/CD40L 细胞的复合体(complex)温育。首先通过流式细胞仪用 FITC 标记的抗 CD40L

核实在选择的 CD40L⁺ Jurkat T 细胞上的 CD40L 表达(未列出数据)。然后使用 FITC-山羊抗人 Ig 对 Jurkat/CD40L 细胞进行流式细胞计量,测定结合在这些靶细胞上的 CD40L 的 CD40,以检测结合的 CD40-Ig。用 CD40-Ig 滴定显示受体饱和度约为 25 $\mu\text{g/ml}$ CD40-Ig。使用饱和浓度的可溶性 CD40, S2C6 与 CD40 以 0.25-2: 1(质量: 质量)的比率混合,导致 CD40 与 CD40L 的结合剂量依赖性增加(在约 6 $\mu\text{g/ml}$ 、13 $\mu\text{g/ml}$ 、25 $\mu\text{g/ml}$ 和 50 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度分别为约 50%、100%、146%和 220%)(图 4)。采用抑制性抗体 M3 的相似滴定以剂量依赖方式阻断 CD40/CD40L 结合。相对于对照 EXA2-1H8 Ig, G28-5 单克隆抗体在高至 25 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度显示对 CD40/CD40L 结合没有影响,在测试的最高浓度(50 $\mu\text{g/ml}$)仅具有轻微刺激性。

这些数据清楚表明, S2C6 单克隆抗体促进 CD40/CD40L 相互作用。此外, S2C6 在增加 CD40/CD40L 相互作用的能力方面与 G28-5 和 M3 不同。

在交互测定中,评价抗 CD40 单克隆抗体对可溶性 CD40L 与在 B 细胞表面表达的膜结合 CD40 的结合的影响。用可溶性 CD40L 滴定显示, Ramos B 细胞表面 CD40 饱和度约为 10 $\mu\text{g/ml}$ 。将增加浓度的各种抗 CD40 单克隆抗体与表达 CD40 的 B 细胞预温育,接着将所述细胞与 FITC 标记的可溶性 CD40L 温育。然后通过对 Ramos 细胞进行流式细胞计量,测定与靶 B 细胞上的 CD40 结合的标记 CD40L。使用饱和浓度的可溶性 CD40L,将浓度范围为 0.04-2 $\mu\text{g/ml}$ 的 S2C6 单克隆抗体与表达 CD40 的细胞混合,导致 CD40L 结合最大增加约 51%-68%(图 5)。

在以上可溶性 CD40 的结果中,单克隆抗体 G28-5 对 CD40/CD40L 的相互作用几乎没有影响,与其相反, G28-5 在所有的测试浓度均显示抑制可溶性配体与 CD40 的结合。采用抑制性单克隆抗体 M3 的相似滴定也以剂量依赖方式阻断 CD40L/CD40 结合。

这些数据表明, S2C6 在增加 CD40L/CD40 相互作用的能力方面

令人惊奇地与 G28-5 和 M3 不同。而且,在这些条件下,单克隆抗体 G28-5 和单克隆抗体 M3 在低至 40 ng/ml 的浓度抑制可溶性 CD40L 与 CD40 的相互作用。

5 7.2.2 体外研究: 单克隆抗体 S2C6 增加 B 细胞对 CD40/CD40L 的响应

10 在存在抗 CD40 单克隆抗体(S2C6、G28-5 或 M3)的情况下,检测原代外周 B 细胞对表达 CD40L 的细胞的生长应答。首先,在存在或不存在固定水平(30 ng/ml)的各种单克隆抗体的情况下,将 B 细胞与增加数目的非增殖性 Jurkat/CD40L 细胞混合。然后通过刺激后 72 小时加入 ^3H -胸苷,检测 B 细胞对处理的活化反应。存在单克隆抗体 M3 时滴定 T 细胞导致 B 细胞增殖,与对照 Ig 观察到的相似(图 6)。

15 尽管在没有配体时单克隆抗体 G28-5 使某些 B 细胞活化(图 7),但在存在 G28-5 时 CD40L⁺ T 细胞滴定仅略微地增加 B 细胞增殖,超过单独用 G28-5 观察到的水平 1.3 倍。相反,在 S2C6 存在下 B 细胞增殖随着 T 细胞刺激细胞数目的增加以剂量依赖方式增加,当 B 细胞对 T 细胞刺激物的比率为 4: 1 时, B 细胞增殖增加至仅用单克隆抗体刺激时的 3 倍以上。

20 这些数据证明,与 M3 和 G28-5 不同, S2C6 令人惊奇地可与 CD40L 协同作用,通过 CD40 促进 B 细胞增殖。

在该类型的第二个测定中,或者用抗 CD40 单克隆抗体滴定 B 细胞,或者将 B 细胞与非增殖性 CD40L⁺ T 刺激细胞以固定比率 4: 1(B: T)混合,并用抗 CD40 单克隆抗体滴定 B 细胞(图 7)。

25 这些结果证明,在这些条件下,和单独的 G28-5 相比, 10 $\mu\text{g/ml}$ 的单克隆抗体 G28-5 和配体使原始人外周血 B 细胞的活化增加 2 倍。S2C6 明显更具有活性,与单独的 S2C6 相比,在配体存在下 10 $\mu\text{g/ml}$ (最高测试水平)的 S2C6 以剂量依赖方式使 B 细胞增殖增加至 16.2 倍,

达到令人吃惊的程度。

总而言之，这些数据表明，S2C6 与 CD40 混合增加 CD40L 结合。尽管 S2C6 自身以类似于 G28-5 的方式刺激 B 细胞增殖，但 S2C6 在其增加 CD40L 结合的能力以及随后的 CD40L 介导的活化信号强度方面与 G28-5 不同。

8. 实施例：单克隆抗体 S2C6 抑制肿瘤生长

为评价天然单克隆抗体 S2C6 的抗肿瘤活性，将雌性 C.B.-17 SCID 小鼠分为两组(20 只小鼠/组)。每组的一半小鼠用抗-脱唾液酸-GM1 处理，以钝化宿主天然杀伤细胞活性(Murphy 等, 1992, Eur. J. Immunol. 22: 241)。第二天，用 Ramos、HS Sultan 或 IM-9 细胞(1×10^6 细胞)静脉内注射小鼠。然后用 1 mg/kg 的如前文第 7 单元的材料和方法中所述的单克隆抗体 S2C6 IgG 腹膜内注射小鼠，并监测部分瘫痪或其它疾病发作体征。

用单克隆抗体 S2C6 治疗患有 Ramos 人 B 细胞淋巴瘤(图 8A)、HS Sultan 多发性骨髓瘤(图 8B)或 IM-9 多发性骨髓瘤(图 8C)的动物，明显减小了肿瘤块以及所后的与肿瘤相关的发病率和死亡率。在平行研究中，存在抗-脱唾液酸-GM1 时疗效得到维持，提示在单克隆抗体 S2C6 存在时存活率增加不是缘于非特异性 NK 细胞的活性。IM-9 细胞系是一种类似于多发性骨髓瘤的侵袭性肿瘤模型，该细胞系分泌作为疾病替代标志的人 Ig。

用单克隆抗体 S2C6 治疗患 IM-9 疾病的小鼠明显增加动物的存活。这些研究清楚显示，S2C6 对小鼠中移入的人肿瘤具有有效的抗肿瘤活性。

9. 实施例：单链抗-CD40 免疫毒素融合蛋白结合 CD40-Ig

在大肠杆菌中以包含体表达 BD1-S2C6 sFv(单链抗-CD40 免疫毒素，一种由 bryodin 1(BD1)的氨基酸序列(Francisco 等, 1997, J. Biol.

Chem. 272(39): 24165-24169)融合至单克隆抗体 S2C6 可变区组成的融合蛋白), 使其变性和重折叠。

简而言之, 使用 TRIZOL 试剂(Life Technologies), 按照生产商的
5 的建议由 S2C6 杂交瘤细胞分离总 RNA。基本上按照 Gilliland 等所述(Tissue Antigens, 47: 1-20(1996)), 使用与 J-C 接点下游约 100 个碱基的序列互补的引物, 进行轻链可变区和重链可变区的 cDNA 第一链的合成。然后给所述第一链加聚鸟苷酸尾, 并通过使用与聚鸟苷酸尾互补的 poly-C 锚式引物和将约 50 个碱基嵌套入用于第一链合成的引物中的引物的 PCR 进行扩增。设计 PCR 引物以在 PCR 产物的
10 的 5'和 3'末端产生独特限制位点。用 *EcoRI* 和 *HindIII* 消化含有轻链可变区编码序列和重链可变区编码序列的两个 PCR 产物, 并将其连接入已用相同酶消化的 pUC19 中。获得的质粒 pSG5 和 pSG10 包含分别编码 S2C6 VL 和 S2C6 VH 的 DNA。对两种质粒的 DNA 测序, 并验证其与亲代单克隆抗体的氨基酸末端序列匹配。

15 按照 Gilliland 等所述以 VH-VL 取向将 S2C6 的 VH 片段和 VL 片段“缝合”在一起(重叠延伸 PCR), 并连接到克隆载体中。随后通过限制酶消化将 BD1-G28-5 sFv 的 sFv 片段(Francisco 等, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 24165-24169)从 pSE151 中去除, 并在其原位连接 S2C6 sFv。获得的质粒 pSG40 含有在诱导型 T7 启动子控制下的 BD1-S2C6
20 sFv 编码基因。

为了表达 pSG40, 将其转化入感受态大肠杆菌菌株 BL21(DE3)pLysS 细胞中, 并在 T-肉汤培养基中于 37℃培养所述细胞。当培养物达到 $OD_{600}=1.0$ 时, 用 1 mM 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导细胞 3 小时。随后, 通过离心收获细胞, 经超声波裂解,
25 并通过离心分离为不溶性包含体的 BD1-S2C6 sFv 融合蛋白, 如下对其进行变性和重折叠: 在 7M 胍中以 5 mg/ml 溶解包含体, 通过快速稀释(1: 100)到含 0.3 M L-精氨酸和 2 mM DTT 的 PBS 中重折叠, 并对 20 mM 磷酸钠缓冲液(pH 7.4)透析, 以随后纯化。

使用 Blue Sepharose 随后在固定化 CD40-Ig 上亲和层析, 分离重折叠的蛋白。

然后在 ELISA 中测试纯化蛋白对固定化 CD40-Ig 的结合。用 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的 CD40-Ig 包被微量滴定板, 接着在 25 $\mu\text{g/ml}$ S2C6 单克隆抗体(▲)、25 $\mu\text{g/ml}$ 对照抗体 BR96 (●)或无过量抗体(■)存在下, 加入纯化 BD1-S2C6 sFv 在含 1%牛血清白蛋白和 0.05% Tween-20 的 PBS (pH 7.4)中的稀释液。通过加入 BD1 特异性兔抗血清(Seattle Genetics, Inc., Bothell, Washington), 接着加入缀合山羊抗兔 Ig 的辣根过氧化物酶, 检测 BD1-S2C6 sFv 与固定化受体的结合。

加入过量 S2C6 单克隆抗体完全抑制 BD1-S2C6 sFv 与 CD40-Ig 的结合, 但加入对照单克隆抗体不能完全抑制 BD1-S2C6 sFv 与 CD40-Ig 的结合(图 9)。

10. 实施例: 在治疗 CD40 阳性恶性肿瘤时给予重组 S2C6

给患 CD40 阳性恶性肿瘤(例如非何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤和结肠癌或其它癌症)的患者注射重组人源化 S2C6-抗-CD40 单克隆抗体(具有鼠 CDR 和人构架区)或重组嵌合抗体(包含 S2C6 可变区和人抗体恒定区)。体外制备重组抗体。治疗可在病程中的任意时间开始, 可伴随或不伴随化疗。

治疗方案包括每周注射一次在盐水或其它生理上相容的溶液中稀释的所述药物。

重组 S2C6使用的剂量范围为 0.1 mg/m^2 (患者的体表面积)至 1000 mg/m^2 , 优选剂量为 100-500 mg/m^2 。

注射途径为通过或外周静脉连线(access line)或中枢静脉连接线静脉内注射。所述药物作为输注液而不是静脉推注给药。

通过检测 a)在外周血中的总淋巴细胞数目以及 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的数目; b) T 淋巴细胞(辅助 T4 淋巴细胞和溶细胞 T8 淋巴细胞)的体外活性; 和/或 c)使用诸如计算层析 X 射线照相术(CT)扫描、

磁共振成像(MRI)扫描、X 射线成像、骨扫描成像和肿瘤活检采样包括骨髓抽提(BMA)的技术检测肿瘤形态学的变化, 监测重组 S2C6 的治疗功效。

5 根据以上获得的结果, 开发最适宜治疗 CD40 阳性恶性肿瘤的治疗方案, 即对免疫系统能力的影响最小, 并达到肿瘤消退和完全根除肿瘤细胞的最终目标。

11. 微生物保藏

10 根据国际承认的用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约的规定, 1999 年 5 月 25 日将分泌天然单克隆抗体 S2C6 的杂交瘤 S2C6 保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC), 10801 University Boulevard, Manassass, Virginia 20110-2209, 指定的保藏号为 PTA-110。

15 12. 具体的实施方案、参考文献的引用

本文所述的具体实施方案不限制本发明的范围。实际上, 除了本文描述的本发明以外, 根据前述和附图对本发明进行各种修改对本领域技术人员而言是显而易见的。这样的修改应包括在所附权利要求书的范围内。

20 本文引用的各种参考文献, 包括专利申请、专利和科学出版物, 其公开的内容都通过引用整体结合到本文中。

说明书的核苷酸和氨基酸序列

<110>SEATTLE GENETICS, INC.

<120> 重组抗-CD40 抗体及其用途

<130> 9632-009-228

<140>

<141>

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 336

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 1

gat gtt gtg gtg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga	48
Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	

gct caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt gta cac agt	96
Ala Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser	
20 25 30	

aat gga aac acc ttt tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct	144
Asn Gly Asn Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	

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

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 3
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu His
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠

<400> 4
 Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 5

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr

1

5

<210> 6

<211> 342

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(342)

<400> 6

gag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg gtg aag cct ggg gct 48

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

1

5

10

15

tca gtg aag atc tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac 96

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr

20

25

30

tac ata cac tgg gtg aag cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

	35	40	45	
	gga cgt gtt att cct aac aat gga ggc act agt tac aac cag aag ttc			192
	Gly Arg Val Ile Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe			
5	50	55	60	
	aag ggc aag gcc ata tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac			240
	Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
	65	70	75	80
10				
	atg gaa ctc cgc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt			288
	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
		85	90	95
15				
	gca aga gaa ggg atc tac tgg tgg ggc cac ggc acc act ctc aca gtc			336
	Ala Arg Glu Gly Ile Tyr Trp Trp Gly His Gly Thr Thr Leu Thr Val			
	100	105	110	
	tcc tca			342
20	Ser Ser			
	<210> 7			
	<211> 114			
25	<212> PRT			
	<213> 小家鼠			
	<400> 7			
	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala			
30	1	5	10	15
	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr			
	20	25	30	
35				
	Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45	

	Gly	Arg	Val	Ile	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
	50						55					60				
5	Lys	Gly	Lys	Ala	Ile	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70				75						80
	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
10	Ala	Arg	Glu	Gly	Ile	Tyr	Trp	Trp	Gly	His	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val
				100					105					110		
	Ser	Ser														
15																
	<210>	8														
	<211>	6														
	<212>	PRT														
20	<213>	小家鼠														
	<400>	8														
	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Ile	His										
	1				5											
25																
	<210>	9														
	<211>	17														
	<212>	PRT														
30	<213>	小家鼠														
	<400>	9														
	Arg	Val	Ile	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
	1				5				10					15		
35																
	Gly															

	<210> 10	
	<211> 4	
5	<212> PRT	
	<213> 小家鼠	
	<400> 10	
	Glu Gly Ile Tyr	
10	1	
	<210> 11	
	<211> 48	
15	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 11	
	agatctagtc agagccttgt acacagtaat ggaaacacct ttttacat	48
20		
	<210> 12	
	<211> 21	
	<212> DNA	
25	<213> 小家鼠	
	<400> 12	
	acagtttcca accgattttc t	21
30		
	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
35		
	<400> 13	
	actggctact acatacac	18

	<210> 14	
	<211> 51	
5	<212> DNA	
	<213> 小家鼠	
	<400> 14	
10	cgtgttattc ctaacaatgg aggcactagt tacaaccaga agttcaaggg c	51
	<210> 15	
	<211> 12	
	<212> DNA	
15	<213> 小家鼠	
	<400> 15	
20	gaagggatct ac	12

说明书附图

GATGTTGTGGTGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCACTCTTGGAGCTCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCT 75
 CTACAACACCACTGGGTTTGAGGTGAGAGGGACGGACAGTCAGAACCTCGAGTTCGGAGGTAGAGAACCTCTAGA
 D V V V T Q T P L S L P V S L G A Q A S I S C R S
 AGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAACACCTTTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAA 150
 TCAGTCTCGGAACATGTGTCAATTACCTTTGTGGAATAATGTAACCATGGACGTCTTCGGTCCGGTCAGAGTTTT
 S Q S L Y H S K G N T F L H W Y L Q K P G Q S P K
 CTCCTGATCTACACAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT 225
 GAGGACTAGATGTGTCAAAGGTTGGCTAAAAGACCCCAAGGTCCTTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCCTGTCTA
 L L I Y T V S K R F S G V P O R F S G S G S G T O
 TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAACTACACATGTTCCG 300
 AAGTGTGAGTTCTAGTCGTCTCACCTCGGACTCCTAGACCTCAAATAAAGACGAGAGTTTGATGTGTACAAGGC
 F T L K I S R V E A E O L G V Y F C S Q T T H V P
 TGGACGTTCCGTGGAGGCAACCAAGCTGGAAATCCAA 336
 ACCTGCAAGCCACCTCCGTGGTTGGACCTTTAGGTT
 W T F G G G T K L E I Q

图 1

GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATCTCCTGCAAGGCTTCT 75
 CTCCAGGTCGACGTCGTGAGACCTGGACTGGACCACTTCGGACCCCGAAGTCACCTTCTAGAGGACGTTCCGAAGA
 E V Q L Q Q S G P D L V K F G A S V K I S C K -A S
 GGTTACTCATTCACTGGTACTACATACACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCCTTCACTGGATTGGACGT 150
 CCAATGAGTAAGTGACCGATGATGTATGTGACCCACTTCGTCTCGGTACCTTTCTCGGAACTCACCTAACCTGCA
 G Y S F T G Y Y I H V Y K Q S H G K S L E V I G R
 GTTATCTAACAATGGAGGCACTAGTTACAACCAGAAGTTCAGGGCAAGGCCATATTAACTGTAGACAAAGTCA 225
 CAATAAGGATTGTTACCTCCGTGATCAATGTTGCTCTTCAAGTTCCTGTTCCGGTATAATTGACATCTGTTCAGT
 V I P N N G G T S Y N Q K F K G K A I L T V Q K S
 TCCAGCACAGCCTACATGGAACCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGACAAGGG 300
 AGGTCGTGTCGGATGTACCTTGAGGCGTCCGACTGTAGACTCCTGAGACGCCAGATAATGACACGTTCTCTTCCC
 S S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R E G
 ATCTACTGGTGGGGCCACGGCACCCTCTCACAGTCTCCTCA 342
 TAGATGACCAACCCCGTCCCGTGGTGAAGTGTGAGAGGAGT
 I Y W W G H G T T L T V S S

图 2

S2C6 VL

DVVVTQTPLSLPVSLGAQASISCRSSQSLVHSNGNTFLHWYLQKPGQSPKL

CDR1

LIYTVSNRFRSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQTHVPWT

CDR2

CDR3

FGGGTKLEIQ

S2C6 VH

EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYTHWVKQSHGKSLEWIGRY

CDR1

IPNNGGTSYNOKFKGKAILTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAREGIY

CDR2

CDR3

WWGHGTTTLTVSS

图 3A-3B

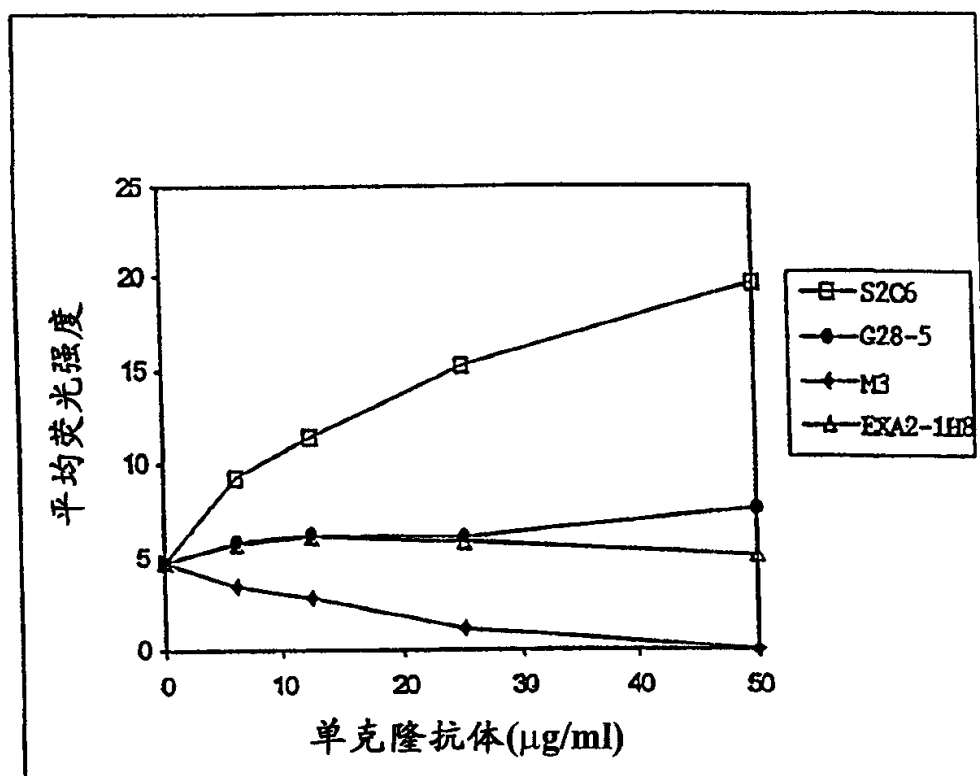


图 4

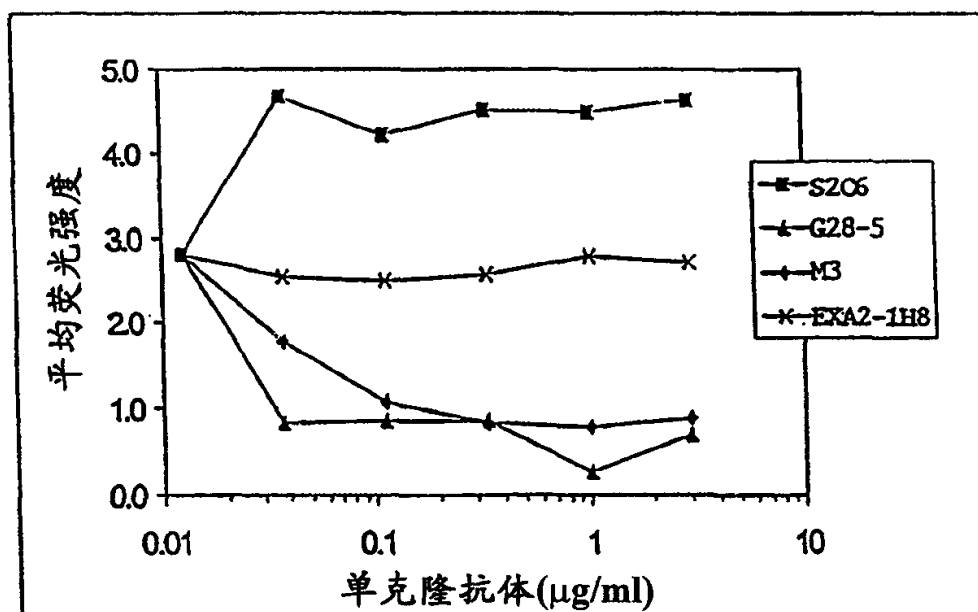


图 5

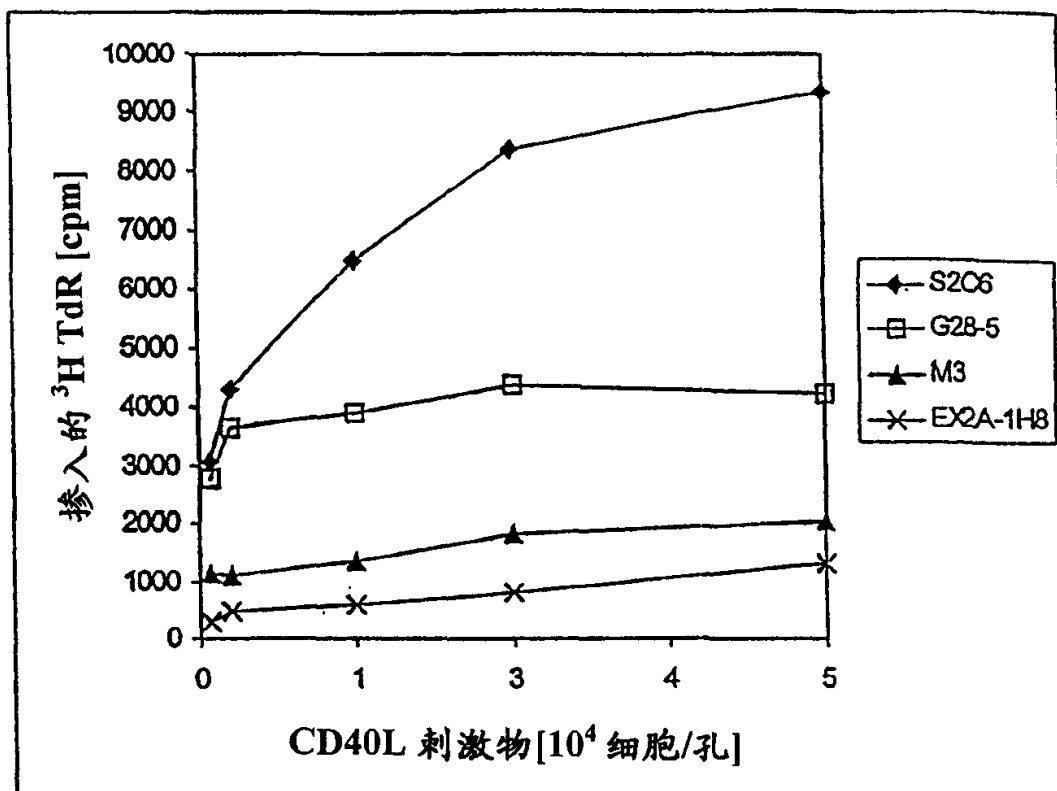


图 6

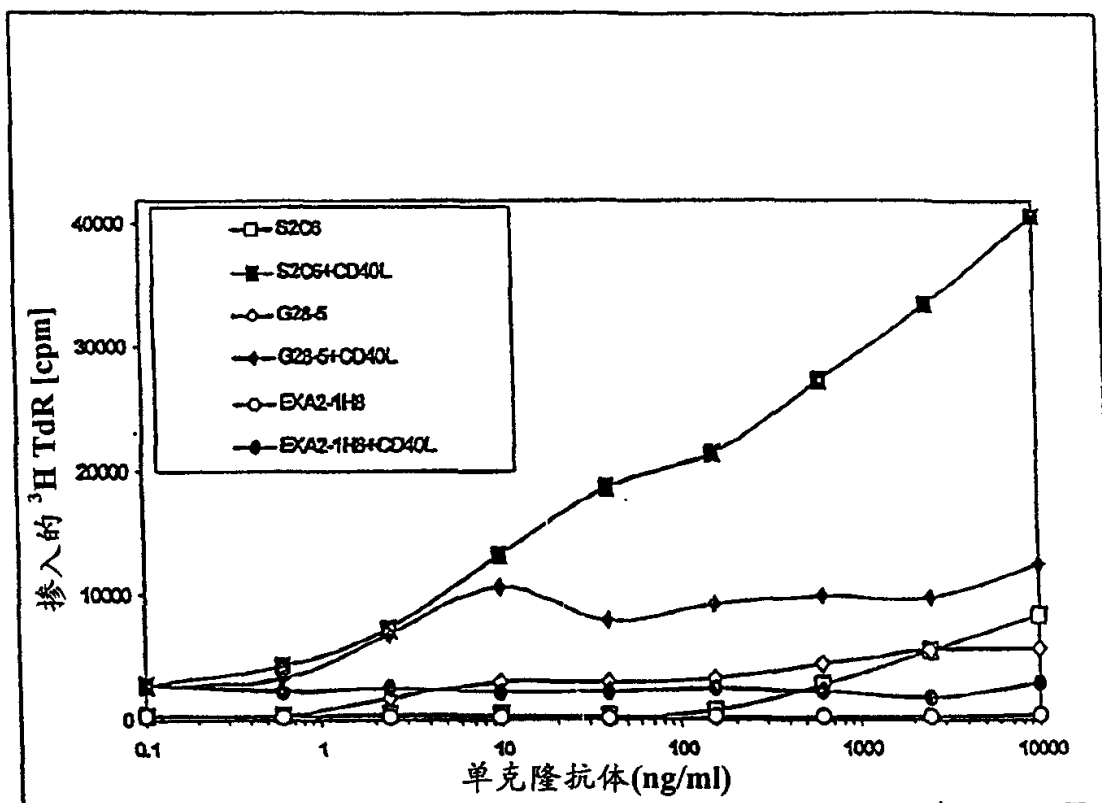
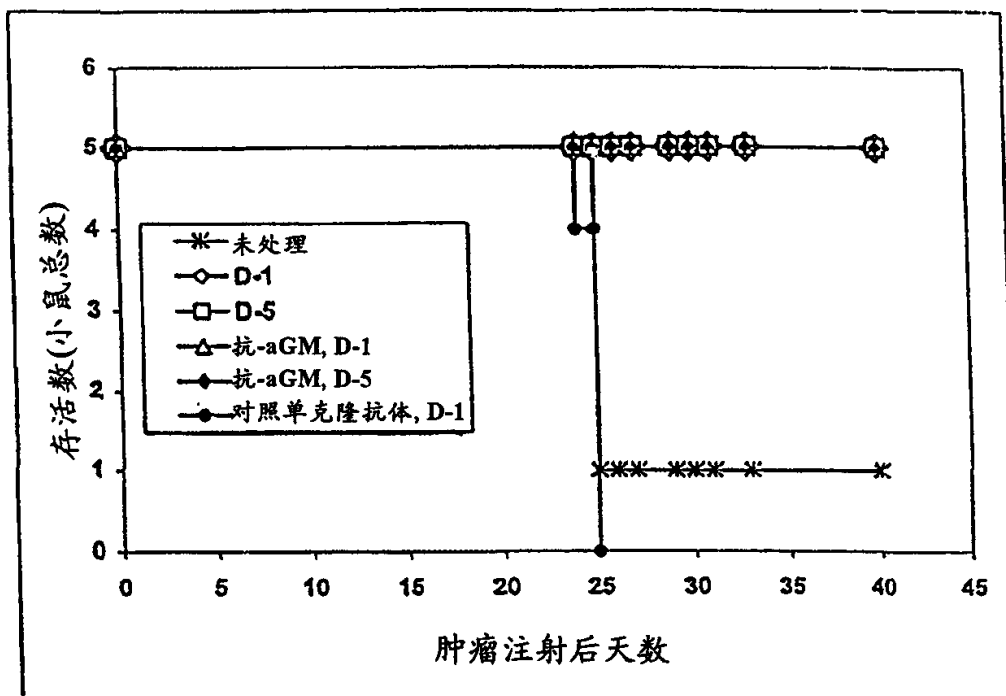


图 7

A.



B.

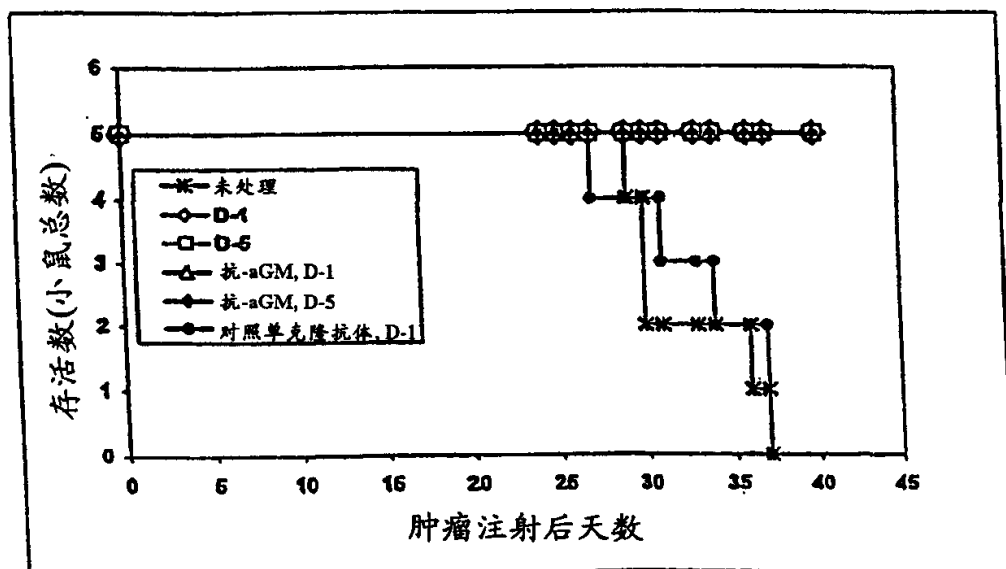


图 8A-8B

C.

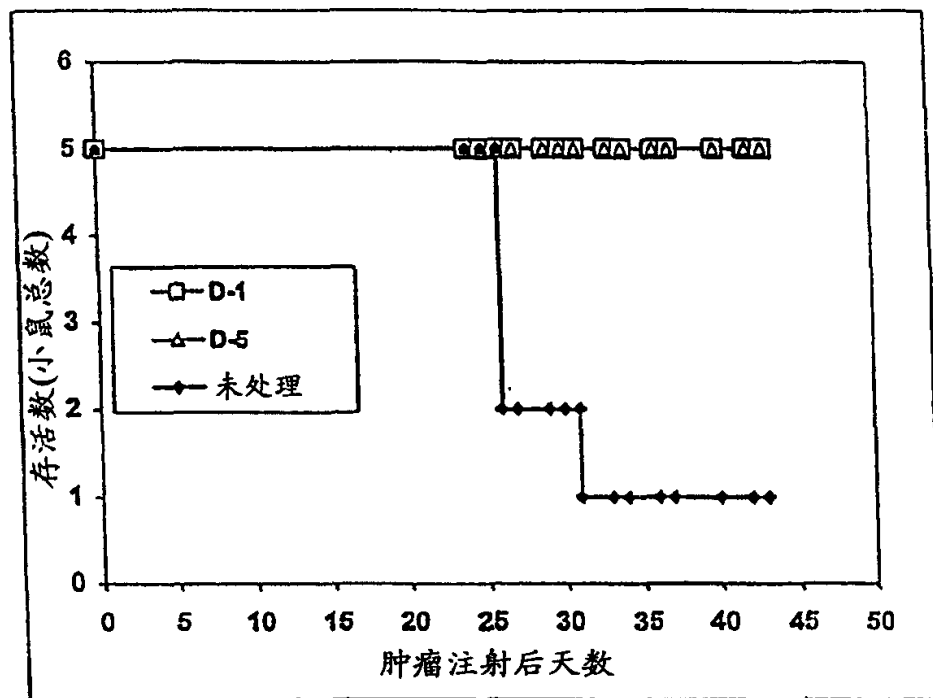


图 8C

BD1-S2C6 sFv ELISA 结合 CD40-Ig

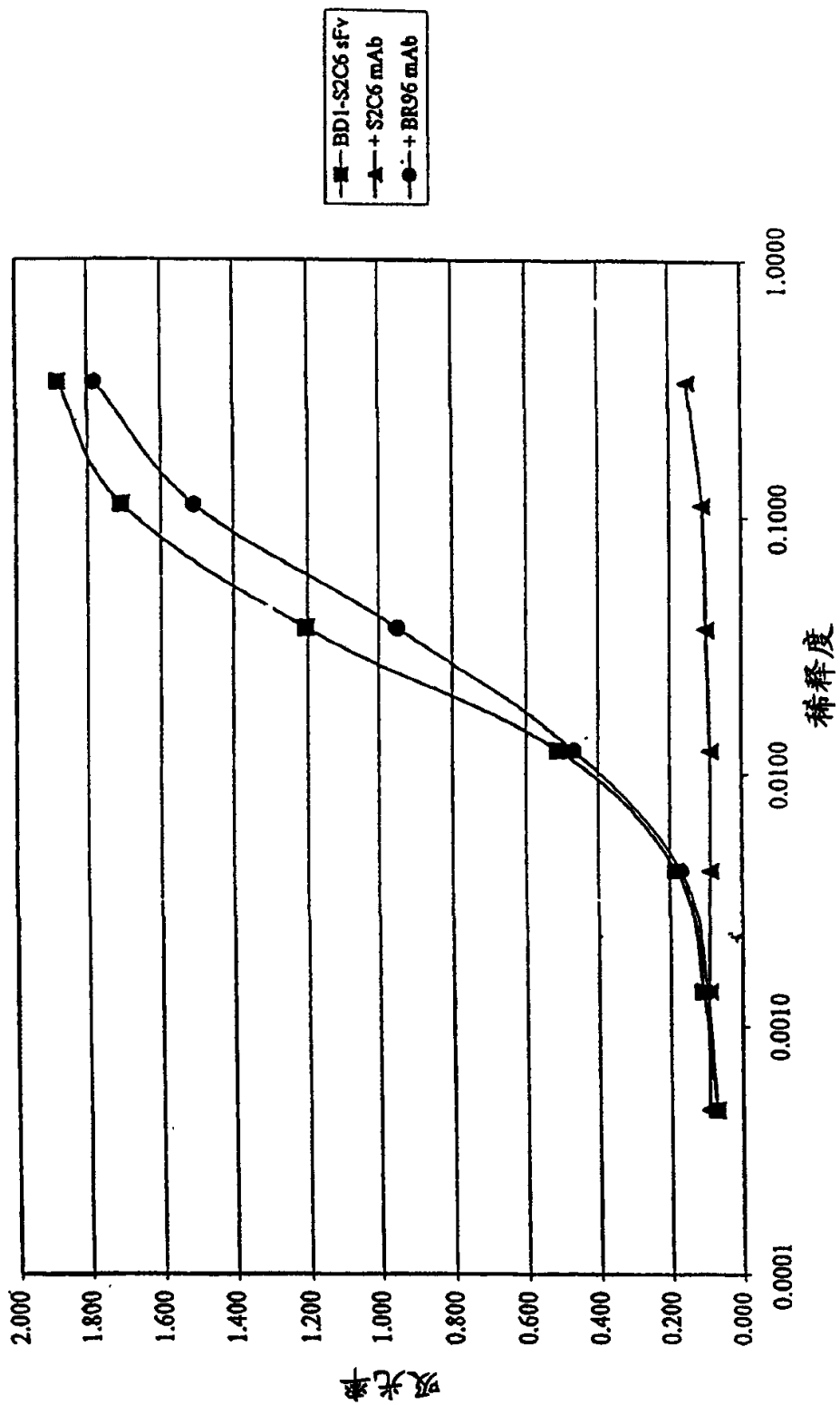


图 9

专利名称(译)	重组抗 - CD40抗体及其应用		
公开(公告)号	CN1369015A	公开(公告)日	2002-09-11
申请号	CN00811357.2	申请日	2000-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	西雅图基因公司		
申请(专利权)人(译)	西雅图基因公司		
当前申请(专利权)人(译)	西雅图基因公司		
[标]发明人	CB西加尔 AF瓦尔 JA弗兰西斯科 小HP菲尔		
发明人	C·B·西加尔 A·F·瓦尔 J·A·弗兰西斯科 小H·P·菲尔		
IPC分类号	C12N15/09 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P7/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/08 C07K5/113 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12N15/63 C12N15/00 G01N33/53 C07K5/00 C07K14/00 C07K16/00 C07H21/04		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/16 A61P7/00 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/08 C07K5/1021 C07K16/2878 C07K2317/622		
代理人(译)	刘玥		
优先权	09/328296 1999-06-08 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及预防和治疗癌症、炎症性疾病和免疫系统疾病或缺陷的方法和组合物。本发明的方法包括给予增强CD40与CD40配体结合的CD40结合蛋白。

```

GATGTTGTGTTGACCCAACTCCAGTCTCCCTGCTGAGTCTTGGAGCTCAAGCCTGCATCTCTTCAGATCT 75
CTACAAACCACTGGGTTTGAGGTGAGAGGGACGGACAGTCAAGACCTCGAGTTCGGAGGTAGAGACCTCTAGA
O V V V T Q T P L S L P V S L G A Q A S I S C R S
AGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTTTTACATTGGTACCTGCAGAGCCAGGCCAGTCTCCAAA 150
TCAGTCTCGGAACATGTGTCAATACCTTTGTGAAAAATGTAACCATGGACGTCTTTCGGTCCGGTCAGAGTTTT
S Q S L V H S K G N T F L N W Y L Q K P G Q S P K
CTCTGATCTACACAGTTCCAACCGATTTTCTGGGTCCAGACAGGTTCAATGGCAGTGGATCAGGGACAGAT 225
GAGGACTAGATGTCTCAAGGTTGGCTAAAAAGCCCAAGGTCTGTCCAAATGCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCT
L L I Y T Y S K R F S G V P O R F S G S G S G T O
TTCACACTCAAGTCAAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGATTTATTTCTGCTCAAACTACACATGTTCCG 300
AAGTCTGAGTCTAGTCTGCTCAAGTCCAGTCTGAGGCTCAAAATAAGACGAGGTTTGTGTGTACAAAGG
F T L K I S R V E A E D L G Y Y F C S Q T T N V P
TGCACCTTGGTGGAGGACCAAGCTGGAAATCCAA 336
ACCTGCAAGCCAGCTCCGTGCTTCAAGCTTTAGGT
W T F G G G T K L E I Q

```