



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119119271 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 13

(21) 申请号 202411218466.9

(22) 申请日 2006.03.23

(30) 优先权数据

PA200500429 2005.03.23 DK

US60/667579 2005.04.01 US

US60/696163 2005.07.01 US

US60/728561 2005.10.20 US

(62) 分案原申请数据

200680017915.7 2006.03.23

(71) 申请人 根马布股份公司

地址 丹麦瓦尔比

(72) 发明人 M. 德韦尔斯 Y. 格劳斯

J. 奥普林斯 P.P. 帕伦

J. 范德温克尔 M. 范武格特

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 任晓华 彭昶

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

权利要求书1页 说明书131页

序列表(电子公布) 附图27页

(54) 发明名称

用于治疗多发性骨髓瘤的CD38抗体

(57) 摘要

描述了与人CD38结合的分离的人单克隆抗体及基于相关抗体的组合物和分子。也描述了包含人抗体的药物组合物和使用人抗体的治疗和诊断方法。

1. 由以下 (i) — (iv) 编码的、与人CD38结合的抗体
 - (i) 在其可变区含有分别如SEQ ID No:1和SEQ ID No:6所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;
 - (ii) 在其可变区含有分别如SEQ ID No:11和SEQ ID No:16所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;
 - (iii) 在其可变区含有分别如SEQ ID No:21和SEQ ID No:26所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;或
 - (iv) 在其可变区含有使如上述 (i)、(ii) 或 (iii) 所示的序列经保守的序列修饰所得的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸。
2. 与人CD38结合的抗体, 包含具有如SEQ ID No:2所示氨基酸序列的V_L区。
3. 与人CD38结合的抗体, 其包含具有如SEQ ID No:7所示氨基酸序列的V_H区。
4. 与人CD38结合的抗体, 其包含具有如SEQ ID No:30所示序列的V_H CDR3。
5. 与人CD38结合的抗体, 其包含具有如SEQ ID No:22所示氨基酸序列的V_L区。
6. 与人CD38结合的抗体, 其包含具有如SEQ ID No:27所示氨基酸序列的V_H区。
7. 分离的人单克隆抗体, 其包含
 - (i) 来源于人Hv1263/3M28 (V_HI) 胚系序列的重链可变区氨基酸序列和来源于人L15 (V_KI) 胚系序列的轻链可变区氨基酸序列, 其中人抗体与人CD38结合; 或
 - (ii) 来源于人V_H3-DP-47/V3-23 (V_HIII) 胚系序列的重链可变区氨基酸序列和来源于人L6 (V_KI) 胚系序列的轻链可变区氨基酸序列, 其中人抗体与人CD38结合。
8. 药物组合物, 其含如权利要求1到7任何一项中所述的肽及药学上可接受的载体。
9. 一种治疗患者因表达CD38的细胞参与的疾病或症状的方法, 该方法包括对所需要治疗的患者给药如权利要求1到7任何一项中所述的肽。
10. 在含如权利要求1到7任何一项中所述的肽的样品中检测CD38抗原或表达CD38的细胞存在的试剂盒。

用于治疗多发性骨髓瘤的CD38抗体

[0001] 本申请是申请日为2006年03月23日,申请号为202011391749.5,发明名称为“用于治疗多发性骨髓瘤的CD38抗体”的发明专利申请的分案申请。所述申请号为202011391749.5的中国发明专利申请是申请号为201710164800.0的发明专利申请的分案申请。所述申请号为201710164800.0的中国发明专利申请是申请号为200680017915.7的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及与CD38结合的抗体,该抗体具有特定的特征,此外还可用于治疗多发性骨髓瘤。

背景技术

[0003] 多发性骨髓瘤是一种B细胞恶性肿瘤,其特征是在骨髓中潜在积累具有低增生系数和延长的生活期的分泌型浆细胞。该疾病最终攻击骨骼和骨髓,在整个骨骼系统中造成多发性肿瘤和恶化。

[0004] 约1%的癌症及约略高于10%的血液性恶性疾病都属于多发性骨髓瘤(MM)。在老年人群中MM的发生率增加,平均诊断年龄约为61岁。

[0005] 目前可用的多发性骨髓瘤的治疗包括化疗、干细胞移植、**Thalomid®** (沙利度胺)、**Velcade®** (硼替佐米)、**Aredia®** (帕米磷酸)和**Zometa®** (唑来膦酸)。目前的治疗方案,包括联合使用诸如长春新碱、BCNU、美法仑、环磷酰胺、羟基红霉素和强的松或地塞米松之类的化疗药剂,其完全缓解率仅约为5%,平均存活时间约为从诊断时间起36-48个月。最近关于使用高剂量化疗,然后进行自体骨髓或外周血单核细胞移植的进展提高了完全缓解率和缓解时间。但整个存活时间仅略有延长,而且没有治愈的迹象。最终,所有MM患者甚至在单独用干扰素- α (IFN- α) 或联合使用类固醇进行维持性治疗的情况下都会复发。

[0006] 可用的MM化疗方法的效率受限于低的细胞增殖率和多重耐药的发生。对90%以上的MM患者而言,该病是化疗耐药的。因此,替代的治疗方法是寻找采用针对浆细胞上的表面抗原的免疫治疗法。

[0007] CD38是表达在这种恶性浆细胞上的抗原的例子,而且在多种恶性血液性疾病中表达,包括但不限于多发性骨髓瘤、B细胞慢性淋巴细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病、Waldenstrom氏大球蛋白血症、原发性系统性淀粉样变病、套细胞淋巴瘤、前淋巴细胞/粒细胞白血病、急性粒细胞白血病、慢性粒细胞白血病、滤泡淋巴瘤、NK细胞白血病和浆细胞白血病。已在不同来源的包括前列腺的腺上皮细胞在内的上皮/内皮细胞、胰腺的胰岛细胞、包括腮腺在内的腺体的胆管上皮细胞、支气管上皮细胞、睾丸和卵巢中的细胞及结直肠癌中的癌上皮细胞中描述了CD38的表达。CD38表达参与的疾病包括但不限于肺的支气管上皮癌、乳腺癌(来源于乳腺的导管或小叶的上皮表面的恶性增生)、来源于b细胞的胰腺肿瘤(胰岛瘤)、来源于肠道上皮的肿瘤(例如腺癌和鳞状细胞癌)。在CNS中,成神经细胞瘤表达CD38。其它疾病包括前列腺中的癌、睾丸和卵巢癌中的精原细胞瘤。

[0008] 通常,CD38在实体组织中由造血细胞表达。对于造血细胞而言,大多数髓质胸腺细胞是CD38⁺,休眠的和循环的T和B细胞是CD38⁻,被激活的细胞是CD38⁺的。CD38也在约80%休眠NK细胞和单核细胞中,及在淋巴结生发中心淋巴母细胞、浆B细胞和某些滤泡内细胞中表达。CD38也可由枝状细胞表达。大部分正常的骨髓细胞,特别是前体细胞可表达CD38。另外,50-80%脐带血细胞是CD38⁺,并可在人血液中存活2到3年。除了淋巴前体细胞外,CD38也在红细胞和血小板上表达。

[0009] 对于实体组织而言,CD38可通过上皮内细胞和固有层淋巴细胞在内脏中、通过Purkinje细胞和神经原纤维缠结在脑中、通过上皮细胞在前列腺中、通过 β 细胞在胰中、通过破骨细胞在骨中、通过视网膜细胞在眼中及肌纤维膜在平滑和横纹肌中表达。

[0010] 关于CD38的功能包括黏附和信号传导事件中的受体介导及胞外酶活性。作为胞外酶,CD38以NAD⁺为底物,形成环化ADP-核糖(cADPR)和ADPR,及烟碱和烟酸腺嘌呤二核苷酸(NAADP)。已表明cADPR可作为Ca²⁺从内质网迁移的二级信使。除了通过Ca²⁺的信号传导外,CD38信号传导也通过抗原与T和B细胞上的受体复合物或其它类型的诸如MHC分子受体的复合物的相互作用而进行,并以这种方式参与几种细胞应答,而且可启动IgG1的转换和分泌。

[0011] 抗CD38抗体已有文献报道,例如Lande R,et al.,Cell Immunol.220(1),30-8(2002)、Ausiello CM,et al.,Tissue Antigens.56(6),539-47(2000),和Cotner T,et al.,Int J Immunopharmacol.3(3),255-68(1981)。CD38具有多种功能,可以或不被与CD38结合的分子激活。例如,鼠抗CD38抗体IB4对CD38具有拮抗特性。已表明IB4在Jurkat细胞中可诱导T细胞激活(Zubiaur M,et al.,J Immunol.159(1),193-205(1997)、to induce significant proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), to induce release of significant IL-6 levels and to induce release of detectable IFN- γ levels(Lande,Zubiaur Morra,Ansiello,同上)。

发明内容

[0012] 本发明提供一种与以下编码的人CD38结合的抗体:

[0013] (i) 在其变异区含有分别如SEQ ID No:1和SEQ ID No:6所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;

[0014] (ii) 在其变异区含有分别如SEQ ID No:11和SEQ ID No:16所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;

[0015] (iii) 在其变异区含有分别如SEQ ID No:21和SEQ ID No:26所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;或

[0016] (iv) 在其变异区含有列于(i)、(ii)或(iii)中的保守序列变化的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸。

[0017] 本发明提供含有具有如SEQ ID No:10中的序列的V_H CDR3的与人CD38结合的抗体。

[0018] 本发明提供含有具有如SEQ ID No:5中的序列的V_L CDR3的序列和具有如SEQ ID No:10中的序列的V_H CDR3的与人CD38结合的抗体。

[0019] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它含有人轻链和人重链可变区,其中所述的轻

链可变区包含具有如SEQ ID No:3中的序列的V_L CDR1、具有如SEQ ID No:4中的序列的V_L CDR2和具有如SEQ ID No:5中的序列的V_L CDR3,重链可变区包含具有如SEQ ID No:8中的序列的V_H CDR1、具有如SEQ ID No:9中的序列的V_H CDR2和具有如SEQ ID No:10中的序列的V_H CDR3。

[0020] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含具有如SEQ ID No:2中的氨基酸序列的V_L区。

[0021] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含与如SEQ ID No:2中的序列至少约90%,例如至少约95%的氨基酸序列同一性的V_L区。

[0022] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含具有如SEQ ID No:7中的氨基酸序列的V_H区。

[0023] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含含有跨越SEQ ID No:7的V_H CDR1-V_H CDR3区的氨基酸序列的V_H区。

[0024] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含与如SEQ ID No:7中的序列或与如SEQ ID No:7中跨越V_H CDR1-V_H CDR3的区域至少约90%,例如至少约95%的氨基酸序列同一性的V_H区。

[0025] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含与如SEQ ID No:7中的序列或与如SEQ ID No:7中跨越V_H CDR1-V_H CDR3的区域相比较具有1-5个,例如1-3个氨基酸替代、缺失或增加的V_H区。

[0026] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含如上定义的V_L区和如上定义的V_H区。

[0027] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含具有如SEQ ID No:20中的序列的V_H CDR3。

[0028] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含具有如SEQ ID No:15中的序列的V_L CDR3和具有如SEQ ID No:20中的序列的V_H CDR3。

[0029] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含人轻链和人重链可变区,其中所述的轻链可变区包含具有如SEQ ID No:13中的序列的V_L CDR1、具有如SEQ ID No:14中的序列的V_L CDR2和具有如SEQ ID No:15中的序列的V_L CDR3,重链可变区包含具有如SEQ ID No:18中的序列的V_H CDR1、具有如SEQ ID No:19中的序列的V_H CDR2和具有如SEQ ID No:20中的序列的V_H CDR3。

[0030] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含具有如SEQ ID No:12中的氨基酸序列的V_L区。

[0031] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含与如SEQ ID No:12中的序列至少约90%,例如至少约95%的氨基酸序列同一性的V_L区。

[0032] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含具有如SEQ ID No:17中的氨基酸序列的V_H区。

[0033] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含含有跨越SEQ ID No:17的V_H CDR1-V_H CDR3区的氨基酸序列的V_H区。

[0034] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含与如SEQ ID No:17中的序列或与如SEQ ID No:17中跨越V_H CDR1-V_H CDR3的区域至少约90%,例如至少约95%的氨基酸序列同一性的V_H区。

[0035] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含与如SEQ ID No:17中的序列或与如SEQ ID No:17中跨越 V_H CDR1- V_H CDR3的区域相比较具有1-5个,例如1-3个氨基酸替代、缺失或增加的 V_H 区。

[0036] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含如上定义的 V_L 区和如上定义的 V_H 区。

[0037] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含具有如SEQ ID No:30中的序列的 V_H CDR3。

[0038] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含具有如SEQ ID No:25中的序列的 V_L CDR3和具有如SEQ ID No:30中的序列的 V_H CDR3。

[0039] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含人轻链和人重链可变区,其中所述的轻链可变区包含具有如SEQ ID No:23中的序列的 V_L CDR1、具有如SEQ ID No:24中的序列的 V_L CDR2和具有如SEQ ID No:25中的序列的 V_L CDR3,重链可变区包含具有如SEQ ID No:28中的序列的 V_H CDR1、具有如SEQ ID No:29中的序列的 V_H CDR2和具有如SEQ ID No:30中的序列的 V_H CDR3。

[0040] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含具有如SEQ ID No:22中的氨基酸序列的 V_L 区。

[0041] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含与如SEQ ID No:22中的序列至少约90%,例如至少约95%的氨基酸序列同一性的 V_L 区。

[0042] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含具有如SEQ ID No:27中的氨基酸序列的 V_H 区。

[0043] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含含有跨越SEQ ID No:27的 V_H CDR1- V_H CDR3区的氨基酸序列的 V_H 区。

[0044] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含与如SEQ ID No:27中的序列或与如SEQ ID No:27中跨越 V_H CDR1- V_H CDR3的区域至少约90%,例如至少约95%的氨基酸序列同一性的 V_H 区。

[0045] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含与如SEQ ID No:27中的序列或与如SEQ ID No:27中跨越 V_H CDR1- V_H CDR3的区域相比较具有1-5个,例如1-3个氨基酸替代、缺失或增加的 V_H 区。

[0046] 本发明提供与人CD38结合的抗体,它包含如上定义的 V_L 区和如上定义的 V_H 区。

[0047] 本发明提供与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的肽,它与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 的结合程度不同于与其与人CD38 (SEQ ID No:31) 的结合程度。

[0048] 本发明提供如上定义的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的50%,例如不到10%,不到5%或不到1%。

[0049] 本发明提供与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的肽,它与其中272位谷氨酰胺残基被精氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:33) 的结合程度不同于与其与人CD38 (SEQ ID No:31) 的结合程度。

[0050] 本发明提供如上定义的肽,其中肽与其中272位谷氨酰胺残基被精氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:33) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的

EC₅₀的50%，例如不到10%，不到5%或不到1%。

[0051] 本发明提供如上定义的肽，其中所述肽肽与其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:32) 结合，结合程度与其和人CD38 (SEQ ID No:31) 结合相同。

[0052] 本发明提供如上定义的肽，其中肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的EC₅₀相当于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的EC₅₀的75% - 125%。

[0053] 本发明提供与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的肽，其中肽具有以下结合特性：(i) 与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合，结合程度与其和人CD38 (SEQ ID No:31) 结合相同，(ii) 与其中272位谷氨酰胺残基被精氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:33) 结合，结合程度与其和人CD38 (SEQ ID No:31) 结合相同，及 (iii) 肽与其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:32) 结合，结合程度与其和人CD38 (SEQ ID No:31) 结合相同。

[0054] 本发明提供与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的肽，其中肽具有以下结合特性：(i) 与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 的结合程度不同于与其与人CD38 (SEQ ID No:31) 的结合程度，(ii) 与其中272位谷氨酰胺残基被精氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:33) 的结合程度不同于与其与人CD38 (SEQ ID No:31) 的结合程度，(iii) 肽与其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:32) 结合，结合程度与其和人CD38 (SEQ ID No:31) 结合相同。

[0055] 本发明提供如上定义的肽，其中EC₅₀通过如说明书的实施例17中所述的ELISA进行测定。

[0056] 本发明提供与如上技术方案(i)所述的抗体竞争性结合CD38的肽。在一个技术方案中，竞争作用通过说明书的实施例8或9中所述的ELISA测定，其中竞争作用定义为通过吸收测定至少90%的信号，或通过说明书的实施例7中所述的交叉阻滞测定法测定，其中竞争作用定义为通过荧光测定至少90%的信号。

[0057] 本发明提供与CD38抗原决定簇特异结合的肽，其抗原决定簇也与如上定义的抗体特异结合。

[0058] 本发明提供与人CD38 (SEQ ID No:31) 的SKRNIQFSCKNIYR区和EKVQTLEAWVIHGG区特异结合的肽。

[0059] 本发明提供与如上定义的抗体在结合人CD38方面具有基本上相同的特异结合性质的肽。

[0060] 本发明提供与人CD38结合的肽，该抗体具有以下一个或多个特性：

[0061] (i) 作为CD38的拮抗剂；

[0062] (ii) 通过说明书的实施例18中所述的方法进行测定时，不诱导外周血单核细胞的显著增殖；

[0063] (iii) 通过说明书的实施例19中所述的方法进行测定时，不诱导人单核细胞或外周血单核细胞显著释放IL-6；

[0064] (iv) 通过说明书的实施例20中所述的方法进行测定时，不诱导人T细胞或外周血单核细胞释放可检测的IFN- γ ；

[0065] (v) 被CD38表达细胞内在化;例如通过说明书的实施例12中所述的方法在37℃维持5到15分钟可被CHO-CD38内在化;

[0066] (vi) 诱导ADCC;例如在Daudi-luc细胞中 EC_{50} 值低于15ng/ml;例如低于10ng/ml,例如在MM细胞中 EC_{50} 值低于75ng/ml,低于50ng/ml、30ng/ml或10ng/ml,通过说明书的实施例5中所述的方法进行测定;

[0067] (vii) 在补体存在下诱导CDC;例如在daudi-luc或CD38-CHO细胞中 EC_{50} 值低于5 μ g/ml,例如低于1 μ g/ml,通过说明书的实施例6中所述的方法进行测定;

[0068] (viii) 抑制cGDPR的合成;

[0069] (ix) 抑制cADPR的合成;

[0070] (x) 与人CD38的结合亲和性(K_D) 低于 10^{-8} M,例如范围是 10^{-8} M到 10^{-11} M, 7×10^{-9} M到 10^{-10} M,通过说明书的实施例20中所述的表面等离子共振进行测定。

[0071] 本发明提供如上定义的肽,该肽在90分钟,浓度为3 μ g/ml时,可抑制至少25%,例如至少30%的cGDPR的合成,通过如说明书的实施例24中所述的光度法进行测定。

[0072] 本发明提供如上定义的肽,该肽在90分钟,浓度为3 μ g/ml时,可抑制至少25%,例如至少30%的cADPR的合成,如Munshi et al., J.Biol.Chem.275,21566-21571(2000)中所述的HPLC法进行测定。

[0073] 在一个技术方案中,如上定义的肽是人单克隆抗体。

[0074] 本发明提供如上定义的抗体,其特征在于它是全长的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM抗体,例如IgG1抗体,优选地为IgG1, κ 抗体,或IgM抗体,优选地为IgM, κ 抗体。

[0075] 本发明提供分离的人单克隆抗体,含有

[0076] (i) 来源于人Hv1263/3M28(V_H I) 胚系序列(germline sequence)的重链可变区氨基酸序列和来源于人L15(V_K I) 胚系序列的轻链可变区氨基酸序列,其中人抗体与人CD38结合;或

[0077] (ii) 来源于人 V_H 3-DP-47/V3-23(V_H III) 胚系序列的重链可变区氨基酸序列和来源于人L6(V_K I) 胚系序列的轻链可变区氨基酸序列,其中人抗体与人CD38结合。

[0078] 本发明提供如上定义的肽,其中肽在真核细胞中是糖基化的。

[0079] 在一个技术方案中,如本发明所述的抗体是抗体片段或单链抗体。

[0080] 本发明提供如上定义的肽,进一步包括螯合剂连接区,以连接放射性同位素。

[0081] 本发明提供如上定义的肽,是充分分离的形式。

[0082] 本发明提供编码如上定义的肽的分离的核酸。

[0083] 本发明提供含编码如上定义的肽的核酸序列的表达载体。

[0084] 本发明提供表达载体,包含

[0085] (i) SEQ ID No:1中的 V_L 核苷酸序列;

[0086] (ii) SEQ ID No:6中的 V_H 核苷酸序列;

[0087] (iii) SEQ ID No:1中的 V_L 核苷酸序列和SEQ ID No:6中的 V_H 核苷酸序列;

[0088] (iv) SEQ ID No:11中的 V_L 核苷酸序列;

[0089] (v) SEQ ID No:16中的 V_H 核苷酸序列;

[0090] (vi) SEQ ID No:11中的 V_L 核苷酸序列和SEQ ID No:16中的 V_H 核苷酸序列;

[0091] (vii) SEQ ID No:21中的 V_L 核苷酸序列;

[0092] (viii) SEQ ID No:26中的V_H核苷酸序列;或

[0093] (ix) SEQ ID No:21中的V_L核苷酸序列和SEQ ID No:26中的V_H核苷酸序列。

[0094] 本发明提供如上定义的表达载体,进一步包括编码人抗体的轻链、重链或轻链和重链的恒定区的核苷酸序列。

[0095] 本发明提供如上定义的表达载体,其中编码人抗体的轻链、重链或轻链和重链的恒定区的核苷酸序列编码IgG1抗体。

[0096] 本发明提供产生由人轻链和人重链核酸编码的人单克隆抗CD38抗体的杂交瘤,包括

[0097] (i) 在其可变区含有分别如SEQ ID No:1和SEQ ID No:6所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;

[0098] (ii) 在其可变区含有分别如SEQ ID No:11和SEQ ID No:16所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;

[0099] (iii) 在其可变区含有分别如SEQ ID No:21和SEQ ID No:26所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;或

[0100] (iv) 在其可变区含有列于(i)、(ii)或(iii)的保守序列变化的人轻链和人重链核酸。

[0101] 本发明提供可产生具有含以下序列的人重链和轻链可变区的人单克隆抗CD38抗体的杂交瘤:

[0102] (i) 如SEQ ID No:2中的人轻链可变氨基酸序列和如SEQ ID No:7中的人重链可变氨基酸序列;

[0103] (ii) 如SEQ ID No:12中的人轻链可变氨基酸序列和如SEQ ID No:17中的人重链可变氨基酸序列;

[0104] (iii) 如SEQ ID No:22中的人轻链可变氨基酸序列和如SEQ ID No:27中的人重链可变氨基酸序列;或

[0105] (iv) 列于(i)、(ii)或(iii)的保守序列变化的人轻链和人重链可变氨基酸序列。

[0106] 本发明提供可产生由含以下序列的人轻链和人重链核酸编码的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤:

[0107] (i) 在其可变区含有分别如SEQ ID No:1和SEQ ID No:6所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;

[0108] (ii) 在其可变区含有分别如SEQ ID No:11和SEQ ID No:16所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;

[0109] (iii) 在其可变区含有分别如SEQ ID No:21和SEQ ID No:26所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸;或

[0110] (iv) 在其可变区含有列于(i)、(ii)或(iii)的保守序列变化的人轻链和人重链核酸。

[0111] 本发明提供可产生具有含以下序列的人重链和轻链可变区的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤:

[0112] (i) 如SEQ ID No:2中的人轻链可变氨基酸序列和如SEQ ID No:7中的人重链可变氨基酸序列;

[0113] (ii) 如SEQ ID No:12中的人轻链可变氨基酸序列和如SEQ IDNo:17中的人重链可变氨基酸序列;

[0114] (iii) 如SEQ ID No:22中的人轻链可变氨基酸序列和如SEQ IDNo:27中的人重链可变氨基酸序列;或

[0115] (iv) 列于(i)、(ii)或(iii)的保守序列变化的人轻链和人重链可变氨基酸序列。

[0116] 本发明提供可产生如上定义的肽的真核或原核宿主细胞。

[0117] 本发明提供含如上定义的表达载体的真核或原核宿主细胞。

[0118] 本发明提供含有编码人重链和人轻链的核酸的转基因非人动物或植物,其中动物或植物产生可检测量的如上定义的肽。

[0119] 本发明提供含有与细胞毒药剂、放射性同位素或药物连接的如上定义的肽的免疫连接物。

[0120] 本发明提供含如上定义的肽的免疫连接物,其中肽是单价的与细胞毒素药剂、放射性同位素或药物连接的IgM抗体。

[0121] 本发明提供含如上定义的肽并与人效应细胞有结合特异性的双特异性或多特异性分子。

[0122] 本发明提供含如上定义的肽并与CD3、CD4、CD138、IL-15R、膜结合或受体结合的TNF- α 、人Fc受体、或膜结合或受体结合的IL-15有结合特异性的双特异性或多特异性分子。

[0123] 本发明提供含如上定义的肽或如上定义的免疫连接物及药学上可接受的载体的药物组合物。

[0124] 本发明提供如上定义的含有一种或多种其它的治疗性药剂的药物组合物。

[0125] 本发明提供一种抑制表达CD38的细胞的生长和/或增殖的方法,包括给药如上定义的肽、如上定义的免疫连接物、如上定义的药物组合物,或如上定义的表达载体,从而抑制细胞的生长和/或增殖。

[0126] 本发明提供一种治疗患者由表达CD38的细胞参与的疾病或症状的方法,该方法包括对所需要治疗的患者给药如上定义的肽、如上定义的免疫连接物、如上定义的药物组合物,或如上定义的表达载体。

[0127] 本发明提供一种抑制患者由表达CD38的细胞参与的疾病或症状的方法,该方法包括对所需要治疗的患者给药如上定义的肽、如上定义的免疫连接物、如上定义的药物组合物,或如上定义的表达载体。

[0128] 在一个技术方案中,疾病或症状是风湿性关节炎。

[0129] 在一个技术方案中,疾病或症状是多发性骨髓瘤。

[0130] 在一个技术方案中,方法包括对患者给药一种或多种其它治疗性药剂。

[0131] 在一个技术方案中,一种或多种其它治疗性药剂选自化疗药剂、抗炎症药剂、或免疫抑制和/或免疫调节药剂。

[0132] 在一个技术方案中,一种或多种其它治疗性药剂选自施铂锭、吉非替尼(gefitinib)、西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐单抗、埃罗替尼(erlotinib)、硼替佐米(bortezomib)、沙利度胺、帕米膦酸盐(pamidronate)、唑来膦酸、氯膦酸盐、利塞膦酸盐(risendronate)、伊班膦酸盐、依替膦酸盐、阿仑膦酸盐、替鲁膦酸盐、三氧化二砷、来那度胺(lenalidomide)、非格司亭、聚乙二醇化非格司亭(pegfilgrastim)、沙格司亭、N-辛二酰

苯胺异羟肟酸和SCIO-469。

[0133] 本发明提供一种在样品中检测CD38抗原或表达CD38的细胞存在的体外方法,包括:a)将样品与如上定义的肽在肽与CD38可形成复合物的条件下进行接触;及b)检测复合物的形成。

[0134] 本发明提供在含如上定义的肽的样品中检测CD38抗原或表达CD38的细胞存在的试剂盒。

[0135] 本发明提供在患者中检测CD38抗原或表达CD38的细胞的体内方法,包括:

[0136] a) 在肽与CD38可形成复合物的条件下给药如权利要求1到55任何一项中所述的肽;及

[0137] b) 检测形成的复合物。

[0138] 本发明提供与如上定义的抗体结合的抗独特型抗体。

[0139] 在一个技术方案中,抗独特型抗体用于检测样品中如上定义的抗体水平。

[0140] 在一个技术方案中,抗独特型抗体用于检测样品中抗CD38的人单克隆抗体水平。

附图说明

[0141] 图1A所示的是通过流式细胞仪测定的-003、-005和同型体对照抗体HuMab-KLH与CD38转染的CHO (CHO-CD38) 细胞的结合。实验设置在实施例4中描述。

[0142] 图1B所示的是通过流式细胞仪测定的-024和HuMab-KLH与CD38转染的CHO (CHO-CD38) 细胞的结合。实验设置在实施例4中描述。

[0143] 图2A所示的是通过流式细胞仪测定的-003、-005和同型体对照抗体HuMab-KLH与Daudi细胞的结合。实验设置在实施例4中描述。

[0144] 图2B所示的是通过流式细胞仪测定的-024和HuMab-KLH与Daudi细胞的结合。实验设置在实施例4中描述。

[0145] 图3所示的是-003、-005、-024和HuMab-KLH与多发性骨髓瘤细胞的结合。实验设置在实施例4中描述。

[0146] 图4A所示的是与利妥昔单抗和HuMab-KLH相比较,-003和-005通过ADCC诱导Daudi细胞裂解的能力。实验设置在实施例5中描述。

[0147] 图4B所示的是与HuMab-KLH相比较,-024通过ADCC诱导Daudi细胞裂解的能力。实验设置在实施例5中描述。

[0148] 图5A所示的是与HuMab-KLH相比较,-003、-005和-024通过ADCC诱导新鲜的多发性骨髓瘤细胞裂解的能力。实验设置在实施例5中描述。

[0149] 图5B所示的是与HuMab-KLH相比较,-003、-005和-024通过ADCC诱导新鲜的浆细胞白血病肿瘤细胞裂解的能力。实验设置在实施例5中描述。

[0150] 图6所示的是与HuMab-KLH相比较,-003和-005通过ADCC诱导JK6L (一种多发性骨髓瘤细胞系) 裂解的能力。实验设置在实施例5中描述。

[0151] 图7所示的是与HuMab-KLH相比较,-003和-005通过ADCC诱导AMO-1 (一种多发性骨髓瘤细胞系) 裂解的能力。实验设置在实施例5中描述。

[0152] 图8所示的是与HuMab-KLH相比较,通过-003和-005诱导的对Daudi-luc细胞的CDC介导的裂解。实验设置在实施例6中描述。

[0153] 图9A所示的是与HuMab-KLH相比较,通过-003和-005诱导的对CHO-CD38细胞的CDC介导的裂解。实验设置在实施例6中描述。

[0154] 图9B所示的是与HuMab-KLH相比较,通过-024诱导的对CHO-CD38细胞的CDC介导的裂解。实验设置在实施例6中描述。

[0155] 图10A所示的是在存在-003、-005和HuMab-KLH时,3%耐受性肿瘤细胞的CDC介导的裂解。实验设置在实施例6中描述。

[0156] 图10B所示的是在存在-003、-005和HuMab-KLH时,9%耐受性肿瘤细胞的CDC介导的裂解。实验设置在实施例6中描述。

[0157] 图10C所示的是在存在-003、-005和HuMab-KLH时,30-40%耐受性肿瘤细胞的CDC介导的裂解。实验设置在实施例6中描述。

[0158] 图10D所示的是在存在-003、-005和HuMab-KLH时,70%耐受性肿瘤细胞的CDC介导的裂解。实验设置在实施例6中描述。

[0159] 图10E所示的是在存在-024和HuMab-KLH时,多发性骨髓瘤细胞的CDC介导的裂解。实验设置在实施例6中描述。

[0160] 图11所示的是-003和-005不交叉抑制对CD38的结合。实验设置在实施例7中描述。

[0161] 图12A所示的是含-003的巨噬细胞、淋巴细胞和浆B细胞的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0162] 图12B所示的是含-003的支气管上皮细胞的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0163] 图12C所示的是含-003的肌细胞的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0164] 图12D所示的是含-003的猕猴淋巴组织的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0165] 图13A所示的是含-005的巨噬细胞、淋巴细胞和浆B细胞的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0166] 图13B所示的是含-005的支气管上皮细胞的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0167] 图13C所示的是含-005的肌细胞的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0168] 图13D所示的是含-005的猕猴淋巴组织的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0169] 图14A所示的是含CD31的肝内皮细胞的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0170] 图14B所示的是含vWF的肝内皮细胞的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0171] 图14C所示的是含抗KLH的肝内皮细胞的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0172] 图14D所示的是含-003的肝内皮细胞的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0173] 图14E所示的是含-005的肝内皮细胞的免疫组化染色。实验设置在实施例10中描述。

[0174] 图15A所示的是通过流式细胞仪测定的,与HuMab-KLH相比较,-003和-005对猕猴淋巴细胞的交叉反应性。实验设置在实施例11中描述。

[0175] 图15B所示的是通过流式细胞仪测定的,与HuMab-KLH相比较,-003和-005对猕猴单核细胞的交叉反应性。实验设置在实施例11中描述。

[0176] 图15C所示的是通过流式细胞仪测定的,与HuMab-KLH相比较,-003和-005对恒河猴PBMCs的交叉反应性。实验设置在实施例11中描述。

[0177] 图16A所示的是通过EtBr淬灭测定的-003的内在化。实验设置在实施例12中描述。

[0178] 图16B所示的是通过EtBr淬灭测定的-005的内在化。实验设置在实施例12中描述。

[0179] 图17A所示的是通过体内SCID荧光成像测定的,与抗CD20单克隆抗体(利妥昔单抗)和HuMab-KLH相比较,-003和-005在预防性设置中对肿瘤细胞生长的抑制作用。实验设置在实施例13中描述。

[0180] 图17B所示的是通过体内SCID荧光成像测定的,与抗CD20单克隆抗体(利妥昔单抗)和HuMab-KLH相比较,-003和-005在治疗性设置I中对肿瘤细胞生长的抑制作用。实验设置在实施例13中描述。

[0181] 图17C所示的是通过体内SCID荧光成像测定的,与抗CD20单克隆抗体(利妥昔单抗)和HuMab-KLH相比较,-003和-005在治疗性设置II中对肿瘤细胞生长的抑制作用。实验设置在实施例13中描述。

[0182] 图17D所示的是通过体内SCID荧光成像测定的,与HuMab-KLH相比较,-003和-024在治疗性设置III中对肿瘤细胞生长的抑制作用。实验设置在实施例13中描述。

[0183] 图18所示的是与抗CD20单克隆抗体(利妥昔单抗)和HuMab-KLH相比较,-003和-024在未交联或交联时对凋亡的诱导作用。实验设置在实施例14中描述。

[0184] 图19所示的是在用抗KLH(HuMab-KLH)或-005治疗14天后,在移植的RA-SCID鼠的异种移植植物中CD38阳性细胞的组织学分值。方法在实施例15中描述。

[0185] 图20所示的是在用抗KLH或-005治疗14天后,在移植的RA-SCID鼠的异种移植植物中CD38阳性细胞的组织学分值。方法在实施例15中描述。

[0186] 图21所示的是移植前(A)、或用抗KLH(B)或-005(C)治疗后异种移植植物的B细胞CD38染色。方法在实施例15中描述。

[0187] 图22所示的是移植前(A)、或用抗KLH(B)或-005(C)治疗后异种移植植物的B细胞CD138染色。方法在实施例15中描述。

[0188] 图23所示的是通过ELISA测定的-003和-005与野生型和突变型人CD38的结合。

[0189] 23A:-003和-005与T237A突变型人CD38的结合。

[0190] 23B:-003和-005与Q272R突变型人CD38的结合。

[0191] 23C:-003和-005与S274F突变型人CD38的结合。方法在实施例17中描述。

[0192] 图24所示的是与HuMab-KLH相比较,-003和-005对人PBMCs的增殖(A)、IL-6产生(B)和IFN- γ 产生(C)的作用。方法分别在实施例18、19和20中描述。

[0193] 图25所示的是在存在各种浓度的-003(B)、-005(C)、-024(D)或抗KLH(A)时,cGMP核糖的酶产量。方法在实施例23中描述。

[0194] 图26所示的是在CHO-CD38细胞(26A)的CDC、Daudi细胞的CDC(26B)、和Daudi细胞的ADCC(26C)中,-003、-005和Morphosys抗体TH-3079的比较。

- [0195] 本发明中的序列表示在附加的序列表中。
- [0196] SEQ ID No:1是抗体-003V_L区的核苷酸序列。
- [0197] SEQ ID No:2是抗体-003V_L区的氨基酸序列。
- [0198] SEQ ID No:3是抗体-003V_L CDR1的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:2的24-34位氨基酸。
- [0199] SEQ ID No:4是抗体-003V_L CDR2的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:2的50-56位氨基酸。
- [0200] SEQ ID No:5是抗体-003V_L CDR3的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:2的89-97位氨基酸。
- [0201] SEQ ID No:6是抗体-003V_H区的核苷酸序列。
- [0202] SEQ ID No:7是抗体-003V_H区的氨基酸序列。
- [0203] SEQ ID No:8是抗体-003V_H CDR1的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:7的31-35位氨基酸。
- [0204] SEQ ID No:9是抗体-003V_H CDR2的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:7的50-66位氨基酸。
- [0205] SEQ ID No:10是抗体-003V_H CDR3的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:7的99-109位氨基酸。
- [0206] SEQ ID No:11是抗体-005V_L区的核苷酸序列。
- [0207] SEQ ID No:12是抗体-005V_L区的氨基酸序列。
- [0208] SEQ ID No:13是抗体-005V_L CDR1的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:12的24-34位氨基酸。
- [0209] SEQ ID No:14是抗体-005V_L CDR2的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:12的50-56位氨基酸。
- [0210] SEQ ID No:15是抗体-005V_L CDR3的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:12的89-97位氨基酸。
- [0211] SEQ ID No:16是抗体-005V_H区的核苷酸序列。
- [0212] SEQ ID No:17是抗体-005V_H区的氨基酸序列。
- [0213] SEQ ID No:18是抗体-005V_H CDR1的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:17的31-35位氨基酸。
- [0214] SEQ ID No:19是抗体-005V_H CDR2的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:17的50-66位氨基酸。
- [0215] SEQ ID No:20是抗体-005V_H CDR3的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:17的99-111位氨基酸。
- [0216] SEQ ID No:21是抗体-024V_L区的核苷酸序列。
- [0217] SEQ ID No:22是抗体-024V_L区的氨基酸序列。
- [0218] SEQ ID No:23是抗体-024V_L CDR1的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:22的24-34位氨基酸。
- [0219] SEQ ID No:24是抗体-024V_L CDR2的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:22的50-66位氨基酸。

- [0220] SEQ ID No:25是抗体-024V_L CDR3的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:22的89-97位氨基酸。
- [0221] SEQ ID No:26是抗体-024V_H区的核苷酸序列。
- [0222] SEQ ID No:27是抗体-024V_H区的氨基酸序列。
- [0223] SEQ ID No:28是抗体-024V_H CDR1的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:27的31-35位氨基酸。
- [0224] SEQ ID No:29是抗体-024V_H CDR2的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:27的50-66位氨基酸。
- [0225] SEQ ID No:30是抗体-024V_H CDR3的氨基酸序列,包括SEQ IDNo:27的99-111位氨基酸。
- [0226] SEQ ID No:31是人CD38的序列。
- [0227] SEQ ID No:32是突变型人CD38序列,其中237位的苏氨酸被丙氨酸替代。
- [0228] SEQ ID No:33是突变型人CD38序列,其中272位的谷氨酸被精氨酸替代。
- [0229] SEQ ID No:34是突变型人CD38序列,其中274位的丝氨酸被苯丙氨酸替代。

具体实施方案

[0230] 本发明提供结合CD38的肽(“CD38BPs”),它可用于治疗、诊断和预防各种由表达CD38的细胞参与的疾病,例如多发性骨髓瘤。

[0231] 在一个技术方案中,本发明的CD38BP是抗体-003。-003是人单克隆IgG1抗体,具有包括SEQ ID No:2的序列的V_L区和包括SEQ IDNo:7的序列的V_H区。

[0232] 在一个技术方案中,本发明的CD38BP是抗体-005。-005是人单克隆IgG1抗体,具有包括SEQ ID No:12的序列的V_L区和包括SEQ ID No:17的序列的V_H区。

[0233] 在一个技术方案中,本发明的CD38BP是抗体-024。-024是人单克隆IgG1抗体,具有包括SEQ ID No:22的序列的V_L区和包括SEQ ID No:27的序列的V_H区。

[0234] 抗体主要通过位于6个重链和轻链互补决定区(CDRs)的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此,在各个抗体间,CDRs中的氨基酸序列比CDRs之外的序列变异更多。由于CDR序列负责大部分抗体-抗原相互作用,因此可通过将来自特定天然存在的抗体CDR序列移植到来自具有不同特性的不同抗体的同框序列中而构建的表达载体来表达可模拟特定天然存在的抗体的性质的重组抗体(参见例如Riechmann,L.et al.,Nature 332,323-327(1998)、Jones,P.et al.,Nature 321,522-525(1986)and Queen,C.et al.,PNAS USA 86,10029-10033(1989))。

[0235] 由于在本领域中已知抗体重链CDR3结构域在抗体与抗原的结合特异性/亲和性方面起非常重要的作用(Ditzel HJ,et al.,J Immunol.157(2),739-49(1996)、Barbas SM et al.,J.Am.Chem.Soc.116,2161-2162(1994),和Barbas SM et al.,Proc Natl Acad Sci USA 92(7),2529-33(1995)),因此本发明的CD38BPs可包括-003或-005或-024的重链CDR3s。本发明的CD38BPs也包括-003或-005或-024的轻链CDR3s。本发明的CD38BPs进一步分别包括-003或-005或-024的重链CDR2s。本发明的CD38BPs进一步分别包括-003或-005或-024的重链CDR1s。

[0236] 本发明提供CD38BPs,它可与-003竞争结合CD38。

- [0237] 本发明提供CD38BP_s,它可与-005竞争结合CD38。
- [0238] 本发明提供CD38BP_s,它可与-024竞争结合CD38。
- [0239] 在一个技术方案中,竞争作用通过如实施例部分描述的ELISA测定。
- [0240] 在一个技术方案中,竞争作用通过如实施例部分描述的FACS测定。
- [0241] 本发明提供与CD38抗原决定簇结合的CD38BP,该抗原决定簇也与-003或-005或-024特异结合。
- [0242] 本发明提供与-003或-005或-024具有基本相同的结合人CD38的特异结合特性的CD38BP。
- [0243] 本发明提供含主要由SEQ ID No:3组成的V_L CDR1的CD38BP。
- [0244] 本发明提供含主要由SEQ ID No:4组成的V_L CDR2的CD38BP。
- [0245] 本发明提供含主要由SEQ ID No:5组成的V_L CDR3的CD38BP。
- [0246] 本发明提供含主要由SEQ ID No:5组成的V_L CDR3和主要由SEQ ID No:3组成的V_L CDR1的CD38BP。
- [0247] 本发明提供含主要由SEQ ID No:5组成的V_L CDR3和主要由SEQ ID No:4组成的V_L CDR2的CD38BP。
- [0248] 本发明提供含主要由SEQ ID No:5组成的V_L CDR3和主要由SEQ ID No:4组成的V_L CDR2和主要由SEQ ID No:3组成的V_L CDR1的CD38BP。
- [0249] 本发明提供含主要由SEQ ID No:8组成的V_H CDR1的CD38BP。
- [0250] 本发明提供含主要由SEQ ID No:9组成的V_H CDR2的CD38BP。
- [0251] 本发明提供含主要由SEQ ID No:10组成的V_H CDR3的CD38BP。
- [0252] 本发明提供含主要由SEQ ID No:10组成的V_H CDR3和主要由SEQ ID No:8组成的V_H CDR1的CD38BP。
- [0253] 本发明提供含主要由SEQ ID No:10组成的V_H CDR3和主要由SEQ ID No:9组成的V_H CDR2的CD38BP。
- [0254] 本发明提供含主要由SEQ ID No:10组成的V_H CDR3和主要由SEQ ID No:9组成的V_H CDR2和主要由SEQ ID No:8组成的V_H CDR1的CD38BP。
- [0255] 本发明提供含主要由SEQ ID No:13组成的V_L CDR1的CD38BP。
- [0256] 本发明提供含主要由SEQ ID No:14组成的V_L CDR2的CD38BP。
- [0257] 本发明提供含主要由SEQ ID No:15组成的V_L CDR3的CD38BP。
- [0258] 本发明提供含主要由SEQ ID No:15组成的V_L CDR3和主要由SEQ ID No:13组成的V_L CDR1的CD38BP。
- [0259] 本发明提供含主要由SEQ ID No:15组成的V_L CDR3和主要由SEQ ID No:14组成的V_L CDR2的CD38BP。
- [0260] 本发明提供含主要由SEQ ID No:15组成的V_L CDR3和主要由SEQ ID No:14组成的V_L CDR2和主要由SEQ ID No:13组成的V_L CDR1的CD38BP。
- [0261] 本发明提供含主要由SEQ ID No:18组成的V_H CDR1的CD38BP。
- [0262] 本发明提供含主要由SEQ ID No:19组成的V_H CDR2的CD38BP。
- [0263] 本发明提供含主要由SEQ ID No:20组成的V_H CDR3的CD38BP。
- [0264] 本发明提供含主要由SEQ ID No:20组成的V_H CDR3和主要由SEQ ID No:18组成的

V_H CDR1的CD38BP。

[0265] 本发明提供含主要由SEQ ID No:20组成的 V_H CDR3和主要由SEQ ID No:19组成的 V_H CDR2的CD38BP。

[0266] 本发明提供含主要由SEQ ID No:20组成的 V_H CDR3和主要由SEQ ID No:19组成的 V_H CDR2和主要由SEQ ID No:18组成的 V_H CDR1的CD38BP。

[0267] 本发明提供含主要由SEQ ID No:23组成的 V_L CDR1的CD38BP。

[0268] 本发明提供含主要由SEQ ID No:24组成的 V_L CDR2的CD38BP。

[0269] 本发明提供含主要由SEQ ID No:25组成的 V_L CDR3的CD38BP。

[0270] 本发明提供含主要由SEQ ID No:25组成的 V_L CDR3和主要由SEQ ID No:23组成的 V_L CDR1的CD38BP。

[0271] 本发明提供含主要由SEQ ID No:25组成的 V_L CDR3和主要由SEQ ID No:24组成的 V_L CDR2的CD38BP。

[0272] 本发明提供含主要由SEQ ID No:25组成的 V_L CDR3和主要由SEQ ID No:24组成的 V_L CDR2和主要由SEQ ID No:23组成的 V_L CDR1的CD38BP。

[0273] 本发明提供含主要由SEQ ID No:28组成的 V_H CDR1的CD38BP。

[0274] 本发明提供含主要由SEQ ID No:29组成的 V_H CDR2的CD38BP。

[0275] 本发明提供含主要由SEQ ID No:30组成的 V_H CDR3的CD38BP。

[0276] 本发明提供含主要由SEQ ID No:30组成的 V_H CDR3和主要由SEQ ID No:28组成的 V_H CDR1的CD38BP。

[0277] 本发明提供含主要由SEQ ID No:30组成的 V_H CDR3和主要由SEQ ID No:29组成的 V_H CDR2的CD38BP。

[0278] 本发明提供含主要由SEQ ID No:30组成的 V_H CDR3和主要由SEQ ID No:29组成的 V_H CDR2和主要由SEQ ID No:28组成的 V_H CDR1的CD38BP。

[0279] 本发明提供CD38BP,包含

[0280] (a) 含有3个 V_L CDRs的第一个 V_L 区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:3、SEQ ID No:4和SEQ ID No:5组成;及

[0281] (b) 含有3个 V_H CDRs的第一个 V_H 区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:8、SEQ ID No:9和SEQ ID No:10组成。

[0282] 本发明提供CD38BP,包含

[0283] (a) 含有3个 V_L CDRs的第一个 V_L 区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:13、SEQ ID No:14和SEQ ID No:15组成;及

[0284] (b) 含有3个 V_H CDRs的第一个 V_H 区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:18、SEQ ID No:19和SEQ ID No:20组成。

[0285] 本发明提供CD38BP,包含

[0286] (a) 含有3个 V_L CDRs的第一个 V_L 区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:23、SEQ ID No:24和SEQ ID No:25组成;及

[0287] (b) 含有3个 V_H CDRs的第一个 V_H 区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:28、SEQ ID No:29和SEQ ID No:30组成。

[0288] 在一个技术方案中, V_L 区和 V_H 区位于肽的同一条链上。

- [0289] 在另一个技术方案中, V_L 区和 V_H 区由柔性的连接物分开。
- [0290] 在一个技术方案中, V_L 区和 V_H 区位于肽的单独的链上。
- [0291] 在另一个技术方案中, V_L 区和 V_H 区位于作为免疫球蛋白折叠蛋白的肽的不同链上。
- [0292] 在一个技术方案中, 第一个 V_L 区和第一个 V_H 区是定向的, 从而使 V_L 区的3个CDRs和 V_H 区的3个CDRs协同作用来选择性地和/或特异性地与人CD38上的抗原决定簇结合。
- [0293] 在另一个技术方案中, 肽包括第二个与第一个 V_L 区相同的 V_L 区和第二个与第一个 V_H 区相同的 V_H 区, 其中第二个 V_L 区和第二个 V_H 区一起用于选择性地和/或特异性地结合人CD38的抗原决定簇。
- [0294] 本发明提供含有作为-003或-005或-024的 V_L 区的功能变异体的 V_L 区的CD38BP。
- [0295] 在一个技术方案中, CD38BP的 V_L 区主要由与分别如SEQ ID No:2或SEQ ID No:12或SEQ ID No:22中所述序列的氨基酸同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。在一个技术方案中, CD38BP分别具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%的-003或-005或-024的抗原决定簇结合特性。
- [0296] 本发明提供含有作为-003或-005或-024的 V_H 区的功能变异体的 V_H 区的CD38BP。
- [0297] 在一个技术方案中, CD38BP的 V_H 区主要由与分别如SEQ ID No:7或SEQ ID No:17或SEQ ID No:27中所述序列的氨基酸同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。在一个技术方案中, CD38BP分别具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%的-003或-005或-024的抗原决定簇结合特性。
- [0298] 本发明提供含至少一个作为-003或-005或-024的CDR的功能变异体的CDR的CD38BP。
- [0299] 在一个技术方案中, 至少一个肽的CDRs主要由与分别如SEQ ID No:3、SEQ ID No:4、SEQ ID No:5、SEQ ID No:8、SEQ ID No:9或SEQ ID No:10所述, 或如SEQ ID No:13、SEQ ID No:14、SEQ ID No:15、SEQ ID No:18、SEQ ID No:19, 或如SEQ ID No:20所述或如SEQ ID No:23、SEQ ID No:24、SEQ ID No:25、SEQ ID No:28、SEQ ID No:29或SEQ ID No:30中所述序列的氨基酸序列同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。在一个技术方案中, CD38BP分别具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%的-003或-005或-024的抗原决定簇结合特性。
- [0300] 在一个技术方案中, CD38BP分别具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%的-003或-005或-024的亲合性、强度或特异性。
- [0301] 在一个技术方案中, CD38BP与-003或-005或-024竞争结合CD38。
- [0302] 在另一个技术方案中, 竞争作用通过如实施例部分所述的ELISA进行测定。在另一个技术方案中, 竞争作用通过如实施例部分所述的FACS进行测定。
- [0303] 在一个技术方案中, CD38BP与CD38抗原决定簇特异结合, 其抗原决定簇也与-003或-005或-024特异结合。
- [0304] 在一个技术方案中, CD38BP与人CD38结合的亲和性大于-003或-005或-024。
- [0305] 在一个技术方案中, CD38BP实质具有与-003或-005或-024相同的特异结合CD38的

特性。

[0306] 在一个技术方案中,CD38BP实质没有其它CD38结合肽。

[0307] 在一个技术方案中,本发明的CD38BP是抗体。在另一个技术方案中,CD38BP是人抗体。在另一个技术方案中,CD38BP是人源化抗体。在另一个技术方案中,CD38BP是嵌合抗体。

[0308] 在一个技术方案中,本发明的抗体是单克隆抗体。

[0309] 在一个技术方案中,本发明的抗体是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、或IgM抗体。在另一个技术方案中,抗体是IgG1抗体。在另一个技术方案中,抗体是IgG1 κ 抗体。在另一个技术方案中,抗体是IgM抗体。在另一个技术方案中,抗体是IgM1 κ 抗体。

[0310] 在一个技术方案中,本发明的抗体是抗体片段或单链抗体。

[0311] 在一个技术方案中,CD38BP在真核细胞中是糖基化的。

[0312] 在一个技术方案中,CD38BP进一步含有用于连接放射性同位素的螯合剂连接物。

[0313] 在一个技术方案中,CD38BP实质是分离的形式。

[0314] 本发明提供分离的编码本发明的CD38BP的核酸。

[0315] 本发明提供含编码本发明的CD38BP的核酸序列的表达载体。

[0316] 在一个技术方案中,表达载体含序列号为SEQ ID No:1的V_L核苷酸序列,序列号为SEQ ID No:6的V_H核苷酸序列,或序列号为SEQ ID No:1的V_L核苷酸序列和序列号为SEQ ID No:6的V_H核苷酸序列。

[0317] 在一个技术方案中,表达载体含序列号为SEQ ID No:11的V_L核苷酸序列,序列号为SEQ ID No:16的V_H核苷酸序列,或序列号为SEQ ID No:11的V_L核苷酸序列和序列号为SEQ ID No:16的V_H核苷酸序列。

[0318] 在一个技术方案中,表达载体含序列号为SEQ ID No:21的V_L核苷酸序列,序列号为SEQ ID No:26的V_H核苷酸序列,或序列号为SEQ ID No:21的V_L核苷酸序列和序列号为SEQ ID No:26的V_H核苷酸序列。

[0319] 在另一个技术方案中,表达载体进一步含编码人抗体的轻链、重链或轻链和重链恒定区的核苷酸序列。

[0320] 在另一个技术方案中,编码人抗体的轻链、重链或轻链和重链恒定区的核苷酸序列编码IgG1抗体。

[0321] 本发明提供可产生由人轻链和人重链核酸编码的人单克隆抗CD38抗体的杂交瘤,这些序列包括如SEQ ID No:1中的可变轻链区的核苷酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:6中的可变重链区的核苷酸序列或其保守序列改变。在一个技术方案中,人轻链核酸含有如SEQ ID No:1所示的核苷酸序列,人重链核酸含有如SEQ ID No:6所示的核苷酸序列。

[0322] 本发明提供可产生具有人轻链和重链可变区的人单克隆抗CD38抗体的杂交瘤,它包括如SEQ ID No:2或其保守序列改变中的人轻链可变氨基酸序列,及如SEQ ID No:7或其保守序列改变中的人重链可变氨基酸序列。在一个技术方案中,人轻链可变区含有如SEQ ID No:2中的氨基酸序列,人重链可变区含有如SEQ ID No:7中的氨基酸序列。

[0323] 本发明提供可产生由如SEQ ID No:1中的人轻链可变区的核酸或其保守序列改变及如SEQ ID No:6中的人重链核酸或其保守序列改变编码的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤。在一个技术方案中,人单克隆抗CD38抗体由如SEQ ID No:1中的人轻链可变区核酸和如SEQ ID No:6中的人重链核酸编码。

[0324] 本发明提供可产生具有人轻链和重链可变区的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤,这些可变区包括如SEQ ID No:2中的人轻链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:7中的人重链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变。在一个技术方案中,人轻链含有如SEQ ID No:2中的人轻链可变区氨基酸序列,人重链含有如SEQ ID No:7中的人重链可变区氨基酸序列。

[0325] 本发明提供可产生由人轻链和人重链核酸编码的人单克隆抗CD38抗体的杂交瘤,这些序列包括如SEQ ID No:11中的可变轻链区的核苷酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:16中的可变重链区的核苷酸序列或其保守序列改变。在一个技术方案中,人轻链核酸含有如SEQ ID No:11所示的核苷酸序列,人重链核酸含有如SEQ ID No:16所示的核苷酸序列。

[0326] 本发明提供可产生具有人重链和轻链可变区的人单克隆抗CD38抗体的杂交瘤,这些可变区包括如SEQ ID No:12中的人轻链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:17中的人重链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变。在一个技术方案中,人轻链含有如SEQ ID No:12中的人轻链可变区氨基酸序列,人重链含有如SEQ ID No:17中的人重链可变区氨基酸序列。

[0327] 本发明提供可产生由如SEQ ID No:11中的人轻链可变区的核酸或其保守序列改变及如SEQ ID No:16中的人重链核酸或其保守序列改变编码的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤。在一个技术方案中,人单克隆抗CD38抗体由如SEQ ID No:11中的人轻链可变区核酸和如SEQ ID No:16中的人重链核酸编码。

[0328] 本发明提供可产生具有人轻链和重链可变区的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤,这些可变区包括如SEQ ID No:12中的人轻链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:17中的人重链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变。在一个技术方案中,人轻链含有如SEQ ID No:12中的人轻链可变区氨基酸序列,人重链含有如SEQ ID No:17中的人重链可变区氨基酸序列。

[0329] 本发明提供可产生由人轻链和人重链核酸编码的人单克隆抗CD38抗体的杂交瘤,这些序列包括如SEQ ID No:21中的可变轻链区的核苷酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:26中的可变重链区的核苷酸序列或其保守序列改变。在一个技术方案中,人轻链核酸含有如SEQ ID No:21所示的核苷酸序列,人重链核酸含有如SEQ ID No:26所示的核苷酸序列。

[0330] 本发明提供可产生具有人重链和轻链可变区的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤,这些可变区包括如SEQ ID No:22中的人轻链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:27中的人重链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变。在一个技术方案中,人轻链可变区含有如SEQ ID No:22中的人轻链可变区氨基酸序列,人重链可变区含有如SEQ ID No:27中的人重链可变区氨基酸序列。

[0331] 本发明提供可产生由如SEQ ID No:21中的人轻链可变区的核酸或其保守序列改变及如SEQ ID No:26中的人重链核酸或其保守序列改变编码的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤。在一个技术方案中,人单克隆抗CD38抗体由如SEQ ID No:21中的人轻链可变区核酸和如SEQ ID No:26中的人重链核酸编码。

[0332] 本发明提供可产生具有人轻链和重链可变区的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤,这

些可变区包括如SEQ ID No:22中的人轻链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:27中的人重链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变。在一个技术方案中,人轻链含有如SEQ ID No:22中的人轻链可变区氨基酸序列,人重链含有如SEQ ID No:27中的人重链可变区氨基酸序列。

[0333] 本发明提供可产生本发明的CD38BP的真核或原核宿主细胞。

[0334] 本发明提供含有本发明的表达载体的真核或原核宿主细胞。

[0335] 本发明提供含有编码人重链和人轻链的核酸的转基因动物或植物,其中动物或植物产生可检测量的本发明的CD38BP。

[0336] 本发明提供与腺病毒药剂、放射性同位素或药物连接的本发明的CD38BP的免疫连接物。在一个技术方案中,肽是与腺病毒药剂、放射性同位素或药物连接的单价的IgM抗体。

[0337] 本发明提供含有本发明的CD38BP,并对人效应细胞具有结合特异性的双特异或多种特异的分子。在一个技术方案中,对人效应细胞的结合特异性是指对CD3、CD4、CD138、IL-15R、膜结合或受体结合的TNF- α 、人Fc受体或膜结合或受体结合的IL-15的结合特异性。

[0338] 本发明提供与本发明的CD38BP结合的抗独特型抗体。本发明提供本发明的抗独特型抗体在检测样品中抗CD38的人单克隆抗体水平方面的用途。

[0339] 以下是本发明选择的技术方案的列表。

[0340] 技术方案1:与人CD38结合的抗体,由可变区分别含有如SEQ IDNo:1和SEQ ID No:6所示的核苷酸序列、或是其保守序列改变的人轻链和人重链核酸编码。

[0341] 技术方案2:与人CD38结合的抗体,由可变区分别含有如SEQ IDNo:1和SEQ ID No:6所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸编码。

[0342] 技术方案3:与人CD38结合的抗体,由可变区分别含有如SEQ IDNo:11和SEQ ID No:16所示的核苷酸序列、或是其保守序列改变的人轻链和人重链核酸编码。

[0343] 技术方案4:与人CD38结合的抗体,由可变区分别含有如SEQ IDNo:11和SEQ ID No:26所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸编码。

[0344] 技术方案5:与人CD38结合的抗体,由可变区分别含有如SEQ IDNo:21和SEQ ID No:26所示的核苷酸序列、或是其保守序列改变的人轻链和人重链核酸编码。

[0345] 技术方案6:与人CD38结合的抗体,由可变区分别含有如SEQ IDNo:21和SEQ ID No:26所示的核苷酸序列的人轻链和人重链核酸编码。

[0346] 技术方案7:与如技术方案2所述的抗体竞争结合CD38的肽。

[0347] 技术方案8:如技术方案7所述的肽,其中竞争作用是由说明书的实施例8或9中所述的ELISA测定的。

[0348] 技术方案9:如技术方案7所述的肽,其中竞争作用是由说明书的实施例7中所述的交叉抑制方法测定的。

[0349] 技术方案10:与CD38抗原决定簇特异结合的肽,该抗原决定簇也可被如技术方案2所述的抗体特异结合。

[0350] 技术方案11:与技术方案2所述的抗体实质具有相同的特异结合人CD38的结合特性的肽。

[0351] 技术方案12:含有主要由SEQ ID No:3组成的V_L CDR1的肽。

[0352] 技术方案13:含有主要由SEQ ID No:4组成的V_L CDR2的肽。

- [0353] 技术方案14:含有主要由SEQ ID No:5组成的V_L CDR3的肽。
- [0354] 技术方案15:如技术方案14所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:3组成的V_L CDR1。
- [0355] 技术方案16:如技术方案14所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:4组成的V_L CDR2。
- [0356] 技术方案17:如技术方案16所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:3组成的V_L CDR1。
- [0357] 技术方案18:含有主要由SEQ ID No:8组成的V_H CDR1的肽。
- [0358] 技术方案19:含有主要由SEQ ID No:9组成的V_H CDR2的肽。
- [0359] 技术方案20:含有主要由SEQ ID No:10组成的V_H CDR3的肽。
- [0360] 技术方案21:如技术方案20所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:8组成的V_H CDR1。
- [0361] 技术方案22:如技术方案20所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:9组成的V_H CDR2。
- [0362] 技术方案23:如技术方案22所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:8组成的V_H CDR1。
- [0363] 技术方案24:肽,含有
- [0364] (a) 含有3个V_L CDRs的第一个V_L区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:3、SEQ ID No:4和SEQ ID No:5组成;及
- [0365] (b) 含有3个V_H CDRs的第一个V_H区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:8、SEQ ID No:9和SEQ ID No:10组成。
- [0366] 技术方案25:如技术方案24所述的肽,其中V_L区和V_H区位于肽的同一条链上。
- [0367] 技术方案26:如技术方案25所述的肽,其中V_L区和V_H区由柔性的连接物分隔开。
- [0368] 技术方案27:如技术方案24所述的肽,其中V_L区和V_H区位于肽的不同的链上。
- [0369] 技术方案28:如技术方案27所述的肽,其中V_L区和V_H区位于作为免疫球蛋白折叠蛋白的肽的不同链上。
- [0370] 技术方案29:如技术方案24到28任何一项中所述的肽,其中第一个V_L区和第一个V_H区是定向的,从而使V_L区的3个CDRs和V_H区的3个CDRs协同作用来选择性地和/或特异性地与人CD38上的抗原决定簇结合。
- [0371] 技术方案30:如技术方案29所述的肽,其中肽含有第二个与第一个V_L区相同的V_L区和第二个与第一个V_H区相同的V_H区,其中第二个V_L区和第二个V_H区协同作用来选择性地和/或特异性地与人CD38上的抗原决定簇结合。
- [0372] 技术方案31:含有作为技术方案2的抗体V_L区功能变异体的V_L区的肽。
- [0373] 技术方案32:如技术方案31所述的肽,其中肽的V_L区主要由与如SEQ ID No:2中所述序列的氨基酸同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。
- [0374] 技术方案33:含有作为技术方案2的抗体V_H区功能变异体的V_H区的肽。
- [0375] 技术方案34:如技术方案33所述的肽,其中肽的V_H区主要由与如SEQ ID No:7中所述序列的氨基酸同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至

少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。

[0376] 技术方案35:至少含有一个作为技术方案2中抗体CDR的功能变异体的CDR的肽。

[0377] 技术方案36:如技术方案35所述的肽,其中至少一个肽的CDRs主要由与如SEQ ID No:3、SEQ ID No:4、SEQ ID No:5、SEQ ID No:8、SEQ ID No:9或SEQ ID No:10中所述序列的氨基酸同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。

[0378] 技术方案37:如技术方案31到36任何一项中所述的肽,其中肽具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%技术方案2中抗体的抗原决定簇结合特性。

[0379] 技术方案38:如技术方案31到36任何一项中所述的肽,其中肽具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%技术方案2中抗体的亲和性、强度或特异性。

[0380] 技术方案39:如技术方案12到38任何一项中所述的肽,该肽与人CD38特异地结合。

[0381] 技术方案40:如技术方案12到39任何一项中所述的肽,该肽与如技术方案2所述的抗体竞争结合CD38。

[0382] 技术方案41:如技术方案40所述的肽,其中竞争作用是通过说明书的实施例8或9中所述的ELISA测定的。

[0383] 技术方案42:如技术方案7所述的肽,其中竞争作用是通过说明书的实施例7中所述的交叉抑制方法测定的。

[0384] 技术方案43:如技术方案39所述的肽,该肽与CD38抗原决定簇特异结合,该抗原决定簇也与如技术方案2所述的抗体特异结合。

[0385] 技术方案44:如技术方案39到43任何一项中所述的肽,其中肽与人CD38的结合亲和力大于如技术方案2所述的抗体。

[0386] 技术方案45:如技术方案39到43任何一项中所述的肽,其中肽实质具有与如技术方案2所述的抗体相同的特异的CD38结合特性。

[0387] 技术方案46:如技术方案39到45任何一项中所述的肽,其中CD38结合肽实质不含有其它CD38结合肽。

[0388] 技术方案47:与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的肽,它与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 的结合程度不同于与其与人CD38 (SEQ ID No:31) 的结合程度。

[0389] 技术方案48:如技术方案47所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的50%。

[0390] 技术方案49:如技术方案48所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的10%。

[0391] 技术方案50:如技术方案49所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的5%。

[0392] 技术方案51:如技术方案50所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的1%。

[0393] 技术方案52:与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的肽,它与其中272位谷氨酰胺残基被精氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:33) 的结合程度不同于与其与人CD38 (SEQ ID No:31) 的结合程度。

[0394] 技术方案53:如技术方案52所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的50%。

[0395] 技术方案54:如技术方案53所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的10%。

[0396] 技术方案55:技术方案47到51任何一项中的肽与其中272位谷氨酰胺残基被精氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:33) 的结合程度不同于与其与人CD38 (SEQ ID No:31) 的结合程度。

[0397] 技术方案56:如技术方案55所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的50%。

[0398] 技术方案57:如技术方案56所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的10%。

[0399] 技术方案58:如技术方案47到57任何一项中所述的肽,其中所述肽与其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:32) 结合,结合程度与其和人CD38 (SEQ ID No:31) 结合相同。

[0400] 技术方案59:如技术方案58所述的肽,其中肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的75%。

[0401] 技术方案60:如技术方案59所述的肽,其中肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的85%。

[0402] 技术方案61:如技术方案60所述的肽,其中肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的90%。

[0403] 技术方案62:如技术方案61所述的肽,其中肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的95%。

[0404] 技术方案63:与如技术方案4所述的抗体竞争结合CD38的肽。

[0405] 技术方案64:如技术方案63所述的肽,其中竞争作用是通过说明书的实施例8或9中所述的ELISA测定的。

[0406] 技术方案65:如技术方案63所述的肽,其中竞争作用是通过说明书的实施例7中所述的交叉抑制方法测定的。

[0407] 技术方案66:与CD38抗原决定簇特异结合的肽,该抗原决定簇也与如技术方案4所述的抗体特异结合。

[0408] 技术方案67:实质具有与如技术方案4所述的抗体相同的结合人CD38的特异结合特性的肽。

[0409] 技术方案68:含有主要由SEQ ID No:13组成的V_L CDR1的肽。

[0410] 技术方案69:含有主要由SEQ ID No:14组成的V_L CDR2的肽。

[0411] 技术方案70:含有主要由SEQ ID No:15组成的V_L CDR3的肽。

[0412] 技术方案71:如技术方案70所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:13组成的V_L CDR1。

[0413] 技术方案72:如技术方案70所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:14组成的V_L CDR2。

[0414] 技术方案73:如技术方案72所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:13组成的V_L CDR1。

[0415] 技术方案74:含有主要由SEQ ID No:18组成的V_H CDR1的肽。

[0416] 技术方案75:含有主要由SEQ ID No:19组成的V_H CDR2的肽。

[0417] 技术方案76:含有主要由SEQ ID No:20组成的V_H CDR3的肽。

[0418] 技术方案77:如技术方案76所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:18组成的V_H CDR1。

[0419] 技术方案78:如技术方案76所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:19组成的V_H CDR2。

[0420] 技术方案79:如技术方案78所述的肽,该肽也含有主要由SEQ IDNo:18组成的V_H CDR1。

[0421] 技术方案80:肽,含有

[0422] (a) 含有3个V_L CDRs的第一个V_L区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:13、SEQ ID No:14和SEQ ID No:15组成;及

[0423] (b) 含有3个V_H CDRs的第一个V_H区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:18、SEQ ID No:19和SEQ ID No:20组成。

[0424] 技术方案81:如技术方案80所述的肽,其中V_L区和V_H区位于肽的同一条链上。

[0425] 技术方案82:如技术方案81所述的肽,其中V_L区和V_H区由柔性的连接物分隔开。

[0426] 技术方案83:如技术方案80所述的肽,其中V_L区和V_H区位于肽的不同的链上。

[0427] 技术方案84:如技术方案83所述的肽,其中V_L区和V_H区位于作为免疫球蛋白折叠蛋白的肽的不同链上。

[0428] 技术方案85:如技术方案80到84任何一项中所述的肽,其中第一个V_L区和第一个V_H区是定向的,从而使V_L区的3个CDRs和V_H区的3个CDRs协同作用来选择性地和/或特异性地与人CD38上的抗原决定簇结合。

[0429] 技术方案86:如技术方案85所述的肽,其中肽含有第二个与第一个V_L区相同的V_L区和第二个与第一个V_H区相同的V_H区,其中第二个V_L区和第二个V_H区协同作用来选择性地和/

或特异性地与人CD38上的抗原决定簇结合。

[0430] 技术方案87:含有作为技术方案4的抗体V_L区功能变异体的V_L区的肽。

[0431] 技术方案88:如技术方案87所述的肽,其中肽的V_L区主要由与如SEQ ID No:12中所述序列的氨基酸同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。

[0432] 技术方案89:含有作为技术方案4的抗体V_H区功能变异体的V_H区的肽。

[0433] 技术方案90:如技术方案89所述的肽,其中肽的V_H区主要由与如SEQ ID No:17中所述序列的氨基酸同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。

[0434] 技术方案91:至少含有一个作为技术方案4的抗体CDR的功能变异体的CDR的肽。

[0435] 技术方案92:如技术方案91所述的肽,其中至少一个肽的CDRs主要由与如SEQ ID No:13、SEQ ID No:14、SEQ ID No:15、SEQ ID No:18、SEQ ID No:19或SEQ ID No:20中所述序列的氨基酸同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。

[0436] 技术方案93:如技术方案87到92任何一项中所述的肽,其中肽具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%技术方案4中抗体的抗原决定簇结合特性。

[0437] 技术方案94:如技术方案87到92任何一项中所述的肽,其中肽具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%技术方案4中抗体的亲和性、强度或特异性。

[0438] 技术方案95:如技术方案68到94任何一项中所述的肽,该肽与人CD38特异地结合。

[0439] 技术方案96:如技术方案68到95任何一项中所述的肽,该肽与如技术方案4所述的抗体竞争结合CD38。

[0440] 技术方案97:如技术方案96所述的肽,其中竞争作用是通过说明书的实施例8或9中所述的ELISA测定的。

[0441] 技术方案98:如技术方案96所述的肽,其中竞争作用是通过说明书的实施例7中所述的交叉抑制方法测定的。

[0442] 技术方案99:如技术方案95所述的肽,该肽与CD38抗原决定簇特异结合,该抗原决定簇也与如技术方案4所述的抗体特异结合。

[0443] 技术方案100:如技术方案95到99任何一项中所述的肽,其中肽与人CD38的结合亲和力大于如技术方案4所述的抗体。

[0444] 技术方案101:如技术方案95到99任何一项中所述的肽,其中肽实质具有与如技术方案4所述的抗体相同的特异的CD38结合特性。

[0445] 技术方案102:如技术方案95到101任何一项中所述的肽,其中CD38结合肽实质不含有其它CD38结合肽。

[0446] 技术方案103:如技术方案63到102任何一项中所述的肽,它与人CD38(SEQ ID No:31)结合,但不与突变的其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的人CD38(SEQ ID No:34)如与其和人CD38(SEQ ID No:31)相同的结合程度进行结合。

[0447] 技术方案104:如技术方案103所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸

酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的50%。

[0448] 技术方案105:如技术方案104所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的10%。

[0449] 技术方案106:如技术方案105所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的5%。

[0450] 技术方案107:如技术方案106所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的1%。

[0451] 技术方案108:与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的肽,它与其中272位谷氨酰胺残基被精氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:33) 的结合程度不同于与其与人CD38 (SEQ ID No:31) 的结合程度。

[0452] 技术方案109:如技术方案108所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的50%。

[0453] 技术方案110:如技术方案109所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的10%。

[0454] 技术方案111:技术方案103到107任何一项中的肽与其中272位谷氨酰胺残基被精氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:33) 的结合程度与其和人CD38 (SEQ ID No:31) 结合程度不同。

[0455] 技术方案112:如技术方案111所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的50%。

[0456] 技术方案113:如技术方案112所述的肽,其中肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的10%。

[0457] 技术方案114:如技术方案103到113任何一项中所述的肽,其中所述肽肽与其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:32) 结合,结合程度与其和人CD38 (SEQ ID No:31) 结合相同。

[0458] 技术方案115:如技术方案114所述的肽,其中肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的75%。

[0459] 技术方案116:如技术方案115所述的肽,其中肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的85%。

[0460] 技术方案117:如技术方案116所述的肽,其中肽与突变的其中237位苏氨酸残基被

丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的90%。

[0461] 技术方案118:如技术方案117所述的肽,其中肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的95%。

[0462] 技术方案119:与如技术方案6所述的抗体竞争结合CD38的肽。

[0463] 技术方案120:如技术方案119所述的肽,其中竞争作用是通过说明书的实施例8或9中所述的ELISA测定的。

[0464] 技术方案121:如技术方案119所述的肽,其中竞争作用是通过说明书的实施例7中所述的交叉抑制方法测定的。

[0465] 技术方案122:与CD38抗原决定簇特异结合的肽,该抗原决定簇也与如技术方案6所述的抗体特异结合。

[0466] 技术方案123:实质具有与如技术方案6所述的抗体相同的结合人CD38的特异结合特性的肽。

[0467] 技术方案124:含有主要由SEQ ID No:23组成的 V_L CDR1的肽。

[0468] 技术方案125:含有主要由SEQ ID No:24组成的 V_L CDR2的肽。

[0469] 技术方案126:含有主要由SEQ ID No:25组成的 V_L CDR3的肽。

[0470] 技术方案127:如技术方案126所述的肽,该肽也含有主要由SEQ ID No:23组成的 V_L CDR1。

[0471] 技术方案128:如技术方案126所述的肽,该肽也含有主要由SEQ ID No:24组成的 V_L CDR2。

[0472] 技术方案129:如技术方案128所述的肽,该肽也含有主要由SEQ ID No:23组成的 V_L CDR1。

[0473] 技术方案130:含有主要由SEQ ID No:28组成的 V_H CDR1的肽。

[0474] 技术方案131:含有主要由SEQ ID No:29组成的 V_H CDR2的肽。

[0475] 技术方案132:含有主要由SEQ ID No:30组成的 V_H CDR3的肽。

[0476] 技术方案133:如技术方案132所述的肽,该肽也含有主要由SEQ ID No:28组成的 V_H CDR1。

[0477] 技术方案134:如技术方案132所述的肽,该肽也含有主要由SEQ ID No:29组成的 V_H CDR2。

[0478] 技术方案135:如技术方案134所述的肽,该肽也含有主要由SEQ ID No:28组成的 V_H CDR1。

[0479] 技术方案136:肽,含有

[0480] (a) 含有3个 V_L CDRs的第一个 V_L 区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:23、SEQ ID No:24和SEQ ID No:25组成;及

[0481] (b) 含有3个 V_H CDRs的第一个 V_H 区,它们彼此间各自主要由SEQ ID No:28、SEQ ID No:29和SEQ ID No:30组成。

[0482] 技术方案137:如技术方案136所述的肽,其中 V_L 区和 V_H 区位于肽的同一条链上。

[0483] 技术方案138:如技术方案137所述的肽,其中 V_L 区和 V_H 区由柔性的连接物分隔开。

- [0484] 技术方案139:如技术方案136所述的肽,其中V_L区和V_H区位于肽的不同的链上。
- [0485] 技术方案140:如技术方案139所述的肽,其中V_L区和V_H区位于作为免疫球蛋白折叠蛋白的肽的不同链上。
- [0486] 技术方案141:如技术方案136到140任何一项中所述的肽,其中第一个V_L区和第一个V_H区是定向的,从而使V_L区的3个CDRs和V_H区的3个CDRs协同作用来选择性地和/或特异性地与人CD38上的抗原决定簇结合。
- [0487] 技术方案142:如技术方案141所述的肽,其中肽含有第二个与第一个V_L区相同的V_L区和第二个与第一个V_H区相同的V_H区,其中第二个V_L区和第二个V_H区协同作用来选择性地和/或特异性地与人CD38上的抗原决定簇结合。
- [0488] 技术方案143:含有作为技术方案6的抗体V_L区功能变异体的V_L区的肽。
- [0489] 技术方案144:如技术方案143所述的肽,其中肽的V_L区主要由与如SEQ ID No:22中所述序列的氨基酸同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。
- [0490] 技术方案145:含有作为技术方案6的抗体V_H区功能变异体的V_H区的肽。
- [0491] 技术方案146:如技术方案145所述的肽,其中肽的V_H区主要由与如SEQ ID No:27中所述序列的氨基酸同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。
- [0492] 技术方案147:至少含有一个作为技术方案6的抗体CDR的功能变异体的CDR的肽。
- [0493] 技术方案148:如技术方案147所述的肽,其中至少一个肽的CDRs主要由与如SEQ ID No:23、SEQ ID No:24、SEQ ID No:25、SEQ ID No:28、SEQ ID No:29或SEQ ID No:30中所述序列的氨基酸同一性至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的序列组成。
- [0494] 技术方案149:如技术方案143到148任何一项中所述的肽,其中肽具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%技术方案6中抗体的抗原决定簇结合特性。
- [0495] 技术方案150:如技术方案143到148任何一项中所述的肽,其中肽具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%技术方案6中抗体的亲和性、强度或特异性。
- [0496] 技术方案151:如技术方案124到150任何一项中所述的肽,该肽与人CD38特异地结合。
- [0497] 技术方案152:如技术方案124到151任何一项中所述的肽,该肽与如技术方案6所述的抗体竞争结合CD38。
- [0498] 技术方案153:如技术方案152所述的肽,其中竞争作用是通过说明书的实施例8或9中所述的ELISA测定的。
- [0499] 技术方案154:如技术方案152所述的肽,其中竞争作用是通过说明书的实施例7中所述的交叉抑制方法测定的。
- [0500] 技术方案155:如技术方案151所述的肽,该肽与CD38抗原决定簇特异结合,该抗原决定簇也与如技术方案6所述的抗体特异结合。
- [0501] 技术方案156:如技术方案151到155任何一项中所述的肽,其中肽与人CD38的结合

亲和力大于如技术方案6所述的抗体。

[0502] 技术方案157:如技术方案151到155任何一项中所述的肽,其中肽实质具有与如技术方案6所述的抗体相同的特异的CD38结合特性。

[0503] 技术方案158:如技术方案151到157任何一项中所述的肽,其中CD38结合肽实质不含有其它CD38结合肽。

[0504] 技术方案159:如技术方案1到158任何一项中所述的肽,其中肽不是CD38的拮抗物。

[0505] 技术方案160:如技术方案1到159任何一项中所述的肽,其中肽不诱导外周血单核细胞的显著增殖。

[0506] 技术方案161:如技术方案1到160任何一项中所述的肽,其中肽不诱导人单核细胞或外周血单核细胞显著释放IL-6。

[0507] 技术方案162:如技术方案1到161任何一项中所述的肽,其中肽不诱导人T细胞或外周血单核细胞释放可检测的IFN- γ 。

[0508] 技术方案163:如技术方案1到162任何一项中所述的肽,其中肽是抗体。

[0509] 技术方案164:如技术方案1到6或163任何一项中所述的抗体,其中抗体是人抗体。

[0510] 技术方案165:如技术方案1到6或163任何一项中所述的抗体,其中抗体是人源化抗体。

[0511] 技术方案166:如技术方案1到6或163任何一项中所述的抗体,其中抗体是嵌合抗体。

[0512] 技术方案167:如技术方案1到6或163任何一项中所述的抗体,其中抗体是单克隆抗体。

[0513] 技术方案168:如技术方案1到6或163任何一项中所述的抗体,其特征是它是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM抗体。

[0514] 技术方案169:如技术方案168所述的抗体,其特征是它是IgG1抗体。

[0515] 技术方案170:如技术方案169所述的抗体,其特征是它是IgG1, κ 抗体。

[0516] 技术方案171:如技术方案168所述的抗体,其特征是它是IgM抗体。

[0517] 技术方案172:如技术方案171所述的抗体,其中抗体是IgM1 κ 抗体。

[0518] 技术方案173:如技术方案2到172任何一项中所述的肽,其中肽在真核细胞中是糖基化的。

[0519] 技术方案174:如技术方案1到6或163任何一项中所述的抗体,它是抗体片段或单链抗体。

[0520] 技术方案175:如技术方案1到174任何一项中所述的肽或抗体,进一步含有用于连接放射性同位素的螯合连接物。

[0521] 技术方案176:如技术方案1到175任何一项中所述的肽,它实质是分离的形式。

[0522] 技术方案177:编码如技术方案1到175任何一项中所述的肽的分离的核酸。

[0523] 技术方案178:含有编码如技术方案1到175任何一项中所述的肽的核酸的表达载体。

[0524] 技术方案179:含有SEQ ID No:1中的V_L核苷酸序列、SEQ IDNo:6中的V_H核苷酸序列或SEQ ID No:1中的V_L核苷酸序列和SEQ ID No:6中的V_H核苷酸序列的表达载体。

[0525] 技术方案180:含有SEQ ID No:11中的V_L核苷酸序列、SEQ IDNo:16中的V_H核苷酸序列或SEQ ID No:11中的V_L核苷酸序列和SEQ ID No:16中的V_H核苷酸序列的表达载体。

[0526] 技术方案181:如技术方案179或技术方案180所述的表达载体,进一步包括编码人抗体的轻链、重链或轻链和重链的恒定区的核苷酸序列。

[0527] 技术方案182:如技术方案181所述的表达载体,其中编码人抗体的轻链、重链或轻链和重链的恒定区的核苷酸序列编码IgG1抗体。

[0528] 技术方案183:可产生由人轻链和人重链核酸编码的人单克隆抗CD38抗体的杂交瘤,这些序列包括如SEQ ID No:1中的可变轻链区的核苷酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:6中的可变重链区的核苷酸序列或其保守序列改变。

[0529] 技术方案184:如技术方案183所述的杂交瘤,其中人轻链核酸含有如SEQ ID No:1所示的核苷酸序列,人重链核酸含有如SEQ IDNo:6所示的核苷酸序列。

[0530] 技术方案185:可产生由人轻链和人重链核酸编码的人单克隆抗CD38抗体的杂交瘤,这些序列包括如SEQ ID No:2中的可变轻链区的核苷酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:7中的可变重链区的核苷酸序列或其保守序列改变。

[0531] 技术方案186:如技术方案185所述的杂交瘤,其中人轻链核酸含有如SEQ ID No:2所示的核苷酸序列,人重链核酸含有如SEQ IDNo:7所示的核苷酸序列。

[0532] 技术方案187:可产生由如SEQ ID No:1中的人轻链可变区的核酸或其保守序列改变及如SEQ ID No:6中的人重链核酸或其保守序列改变编码的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤。

[0533] 技术方案188:如技术方案187所述的转染瘤,其中人单克隆抗CD38抗体由如SEQ ID No:1中的人轻链可变区核酸和如SEQ ID No:6中的人重链核酸编码。

[0534] 技术方案189:可产生具有人轻链和重链可变区的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤,这些可变区包括如SEQ ID No:2中的人轻链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:7中的人重链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变。

[0535] 技术方案190:如技术方案189所述的转染瘤,人轻链含有如SEQ ID No:2中的人轻链可变区氨基酸序列,人重链含有如SEQ ID No:7中的人重链可变区氨基酸序列。

[0536] 技术方案191:可产生由人轻链和人重链核酸编码的人单克隆抗CD38抗体的杂交瘤,这些序列包括如SEQ ID No:11中的可变轻链区的核苷酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:16中的可变重链区的核苷酸序列或其保守序列改变。

[0537] 技术方案192:如技术方案191所述的杂交瘤,其中人轻链核酸含有如SEQ ID No:11所示的核苷酸序列,人重链核酸含有如SEQ IDNo:16所示的核苷酸序列。

[0538] 技术方案193:可产生具有人重链和轻链可变区的人单克隆抗CD38抗体的杂交瘤,这些可变区包括如SEQ ID No:12中的人轻链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:17中的人重链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变。

[0539] 技术方案194:如技术方案193所述的杂交瘤,其中人轻链可变区含有如SEQ ID No:12中的氨基酸序列,人重链可变区含有如SEQ ID No:17中的氨基酸序列。

[0540] 技术方案195:可产生由如SEQ ID No:11中的人轻链可变区的核酸或其保守序列改变及如SEQ ID No:16中的人重链核酸或其保守序列改变编码的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤。

[0541] 技术方案196:如技术方案195所述的杂交瘤,其中人单克隆抗CD38抗体由如SEQ ID No:11中的人轻链可变区核酸和如SEQ IDNo:16中的人重链核酸编码。

[0542] 技术方案197:可产生具有人轻链和重链可变区的人单克隆抗CD38抗体的转染瘤,这些可变区包括如SEQ ID No:12中的人轻链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变,及如SEQ ID No:17中的人重链可变区的氨基酸序列或其保守序列改变。

[0543] 技术方案198:如技术方案197所述的杂交瘤,其中人轻链含有如SEQ ID No:12中的人轻链可变区氨基酸序列,人重链含有如SEQ ID No:17中的人重链可变区氨基酸序列。

[0544] 技术方案199:可产生如技术方案1到175任何一项中所述的肽的真核或原核宿主细胞。

[0545] 技术方案200:含有如技术方案178所述的表达载体的真核或原核宿主细胞。

[0546] 技术方案201:含有编码人重链和人轻链的核酸的转基因非人动物或植物,其中动物或植物产生可检测量的如技术方案1到175任何一项中所述的肽。

[0547] 技术方案202:含有与细胞毒药剂、放射性同位素或药物连接的如技术方案1到174任何一项中所述的肽的免疫连接物。

[0548] 技术方案203:含有与细胞毒药剂、放射性同位素或药物连接的如技术方案1到55或技术方案171到174任何一项中所述的肽的免疫连接物,其中肽是单价的与细胞毒素药剂、放射性同位素或药物连接的IgM抗体。

[0549] 技术方案204:含如技术方案1到175任何一项中所述的肽并与人效应细胞有结合特异性的双特异性或多特异性分子。

[0550] 技术方案205:含如技术方案1到175任何一项中所述的肽并与CD3、CD4、CD138、IL-15R、膜结合或受体结合的TNF- α 、人Fc受体、或膜结合或受体结合的IL-15有结合特异性的双特异性或多特异性分子。

[0551] 技术方案206:含如技术方案1到176任何一项中所述的肽或如技术方案202或205所述的免疫连接物及药学上可接受的载体的药物组合物。

[0552] 技术方案207:如技术方案206所述的药物组合物含有一种或多种其它的治疗性药剂。

[0553] 技术方案208:一种抑制表达CD38的细胞的生长和/或增殖的方法,包括给药如技术方案1到176任何一项中所述的肽、如技术方案202或205所述的免疫连接物、如技术方案206或207所述的药物组合物,或如技术方案178到182任何一项中所述的表达载体,从而抑制细胞的生长和/或增殖。

[0554] 技术方案209:一种治疗患者由表达CD38的细胞参与的疾病或症状的方法,该方法包括对所需要治疗的患者给药如技术方案1到176任何一项中所述的肽、如技术方案202或205所述的免疫连接物、如技术方案206或207所述的药物组合物,或如技术方案178到182任何一项中所述的表达载体。

[0555] 技术方案210:一种抑制患者由表达CD38的细胞参与的疾病或症状的方法,该方法包括对所需要治疗的患者给药如技术方案1到176任何一项中所述的肽、如技术方案202或205所述的免疫连接物、如技术方案206或207所述的药物组合物,或如技术方案178到182任何一项中所述的表达载体。

[0556] 技术方案211:如技术方案209或210所述的方法,其中疾病或症状是风湿性关节

炎。

[0557] 技术方案212:如技术方案209或210所述的方法,其中疾病或症状是多发性骨髓瘤。

[0558] 技术方案213:如技术方案209到212任何一项中所述的方法,其中方法包括对患者给药一种或多种其它治疗性药剂。

[0559] 技术方案214:如技术方案213所述的方法,其中一种或多种其它治疗性药剂选自化疗药剂、抗炎症药剂、或免疫抑制和/或免疫调节药剂。

[0560] 技术方案215:如技术方案213所述的方法,其中一种或多种其它治疗性药剂选自施铂锭、吉非替尼、西妥昔单抗、利妥昔单抗、贝伐单抗、埃罗替尼、硼替佐米、沙利度胺、帕米膦酸盐、唑来膦酸、氯膦酸盐、利塞膦酸盐、伊班膦酸盐、依替膦酸盐、阿仑膦酸盐、替鲁膦酸盐、三氧化二砷、来那度胺、非格司亭、聚乙二醇化非格司亭、沙格司亭、辛二酰苯胺异羟肟酸和SCI0-469。

[0561] 技术方案216:一种在样品中检测CD38抗原或表达CD38的细胞存在的体外方法,包括:a)将样品与如技术方案1到176任何一项中所述的肽在肽与CD38可形成复合物的条件下进行接触;及b)检测复合物的形成。

[0562] 技术方案217:如技术方案216所述的体外方法,其中所述肽是抗体。

[0563] 技术方案218:在含如技术方案1到176任何一项中所述的肽的样品中检测CD38抗原或表达CD38的细胞存在的试剂盒。

[0564] 技术方案219:检测患者CD38抗原或表达CD38的细胞存在的体内方法,包括:a)在肽与CD38可形成复合物的条件下给药如技术方案1到176任何一项中所述的肽;及b)检测形成的复合物。

[0565] 技术方案220:如技术方案219所述的体内方法,其中所述肽是抗体。

[0566] 技术方案221:与如技术方案2、4或163到174任何一项中所述的肽结合的抗独特型抗体。

[0567] 技术方案222:如技术方案221所述的抗独特型抗体在检测样品中如技术方案2、4或163到174任何一项中所述的肽的水平方面的用途。

[0568] 技术方案223:如技术方案221所述的抗独特型抗体在检测样品中抗CD38的人单克隆抗体水平方面的用途。

[0569] 术语“CD38”和“CD38抗原”此处可交换使用,而且包括任何由细胞天然表达的或在使用CD38基因转染的细胞中表达的人CD38的变异体、同种型和种同源物。CD38的异名在本领域中包括ADP核糖基环化酶1、cADPr水解酶1、Cd38-rs1、环化ADP-核糖水解酶1、1-19、NIM-R5抗原。

[0570] 此处所述的术语肽是指CD38结合肽和非CD38肽,包括任何合适的肽,除非文中特别说明,可与术语多肽和蛋白通用;只要读者认为每种含各种氨基酸多聚体的分子具有显著差异,从而可形成本发明的单个技术方案即可(例如,含有多个多肽链的肽,例如抗体与单链抗体、肽免疫黏附剂或单链免疫肽显著不同)。因此,此处的术语肽可被理解为任何合适大小和组成(包括蛋白分子中的氨基酸数目和相互作用的链的数目)的任何合适的肽。

[0571] 另外,除非文中特别说明,此处所述的发明方法和组分中的肽可包括非天然存在和/或非L氨基酸残基。除非文中特别说明,术语肽进一步(如个别技术方案中的术语多肽

和/或蛋白)也包括衍生的肽分子。简言之,在本发明的文中,衍生物是在肽中的一个或多个氨基酸残基被化学修饰(例如烷基化、酰基化、酯化或胺化成),或与一个或多个非氨基酸有机和/或无机原子或分子取代物(例如,聚乙烯二醇(PEG)基团、亲脂取代物(选择性地可与肽的氨基酸序列通过间隔区残基或基团,例如 β -丙氨酸、 γ -氨基丁酸(GABA)、UD-谷氨酸、琥珀酸等)、荧光、生物素、放射性核等)连接的肽,也可以或选择性地含有非必需、非天然存在和/或非L氨基酸残基,除非文中特别说明(但应再次意识到,这种衍生物其本身及其包括的分子可视为本发明的独立特征,将这类分子包括在肽的概念内是为了更方便地描述本发明,而不是表示在裸肽与这类衍生物之间存在任何等价关系)。这种氨基酸残基的非限定例子包括,例如2-氨基脂肪酸、3-氨基脂肪酸、 β -丙氨酸、 β -氨基丙酸、2-氨基丁酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、2-氨基庚酸、2-氨基异丁酸、3-氨基异丁酸、2-氨基环己酸、2,4-二氨基丁酸、锁链素、2,2'-二氨基环己酸、2,3-二氨基丙酸、N-乙烷基甘氨酸、N-乙烷基天冬氨酸、羟基赖氨酸、异羟基赖氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸、异锁链赖氨酸、同分异构异亮氨酸、N-甲基甘氨酸、6-N-甲基赖氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸和施德丁卤化的氨基酸。

[0572] 抗原结合肽是指任何与部分给定抗原在细胞和/或生理条件下特异结合的肽,从而可在充分时间内诱导、促进、增强和/或调控与给抗原相关的生理功能;可通过此处所述的和/或本领域已知的ELISA、Western印迹或其它类似合适的蛋白结合技术和/或在相关时间内进行检测(例如至少约15分钟、至少约30分钟、至少约45分钟、至少约1小时、至少约2小时、至少约4小时、至少约6小时、至少约12小时、约1-24小时、约1-36小时、约1-48小时、约1-72小时、约1周或更长时间)。

[0573] CD38结合肽,或CD38BP,是与抗原CD38特异结合的抗原结合肽。在一个技术方案中,CD38BP与CD38的结合是通过使用实施例4所述的方法测定的。

[0574] 术语免疫球蛋白是指一类结构相关的糖蛋白,由两对多肽链组成,一对为轻的(L)低分子量链,一对是重(H)链,所有四条链通过二硫键内部连接。免疫球蛋白的结构已被详细描述。参见,例如Fundamental Immunology,第七章(Paul,W.,ed.,2nd ed.Raven Press,N.Y.(1989))。简言之,每个重链典型地包括重链可变区(此处缩写为 V_H)和重链恒定区。重链恒定区典型地包括三个结构域, C_H1 、 C_H2 和 C_H3 。每个轻链典型地包括轻链可变区(此处缩写为 V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区典型地包括一个结构域 C_L 。 V_H 和 V_L 区可进一步细分为高变区(或结构确定的环的序列和/或形式可高度变化的高变区),也称为互补决定区(CDRs),其中散布着更保守的称为框架区(FRs)的区域。

[0575] 每个 V_H 和 V_L 典型地包括3个CDRs和4个FRs,从氨基末端到羧基末端以如下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(也参见Chothia and Lesk J.Mol.Biol.196,901-917(1987))。典型地,该区氨基酸残基的数目通过Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991)中所述的方法测定(诸如按Kabat中或根据此处Kabat进行编号的可变结构域残基这样的短语,是指用于重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统)。使用该编号系统,肽的实际线性氨基酸序列可含有更少的或额外的氨基酸,相当于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可包括在 V_H CDR2的残基52后有单个氨基酸的插入(根据Kabat的残基52a)和在重链FR残基82后有插入的残基(例如根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。对给定的抗体,残基的Kabat编号可通过将抗体序列的同源

区与“标准的”Kabat编号序列比对后而确定。

[0576] 本发明文中的抗体(Ab)是指免疫球蛋白分子,免疫球蛋白分子的一部分或其衍生物,具有在典型地生理条件下可与抗原在足够的时间内,例如至少约30分钟,至少约45分钟,至少约1小时,至少约2小时,至少约4小时,至少约8小时,至少约12小时,至少约24小时或以上,至少约48小时或以上,至少约3、4、5、6、7或更多天等,或任何其它相关功能性确定的时期(例如足够诱导、促进、增强和/或调节与抗体结合抗原相关的生理应答)内与抗原特异结合的能力。

[0577] 免疫球蛋白分子的重链和轻链可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体(Abs)的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和典型的补体系统的第一成分(C1q)的结合。

[0578] 抗CD38抗体可以为双特异性抗体、双功能抗体或相似分子(参见,例如PNAS USA 90(14),6444-8(1993)描述的双功能抗体)。实际上,本发明提供的双特异性抗体,双功能抗体等可与除CD38部分外的任何其它合适的靶结合。

[0579] 如上所述,除非文中特别说明或明确矛盾,此处术语抗体包括具有特异结合抗原能力的抗体部分。已表明抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来完成。结合片段的例子包括在术语“抗体”中,包括(i)Fab片段,含有 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域的单价片段;(ii) $F(ab)_2$ 和 $F(ab')_2$ 片段,含2个Fab在铰链区通过二硫键连接的片段的双价片段;(iii)主要由 V_H 和 C_H1 结构域组成的Fd片段;(iv)主要由抗体的单个臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的Fv片段;(v)dAb片段(Ward et al.,Nature 341,544-546(1989)),它主要由 V_H 结构域组成;(vi)独立的互补决定区(CDR)1,及(vii)两个或单个独立的CDRs的组合,可选择性地通过合成的连接物连接。另外,虽然Fv片段、 V_L 和 V_H 的两个结构域是由不同的基因编码的,但他们可通过重组方法,用可使其 V_L 和 V_H 区形成单价分子而作为单个蛋白链的合成的连接物连接(已知作为单链抗体或单链Fv(scFv),参见例如,Bird et al.,Science 242,423-426(1988)and Huston et al.,PNAS USA 85,5879-5883(1988))。这种单链抗体在术语抗体的范围内,除非文中特别说明或明确提示。其它类型的单链抗体,例如双功能抗体包括在术语抗体的范围内。虽然这种片段通常包括在抗体的含义中,但它们所有每个都是本发明的独特特征,表现不同的生物学特性和用途。这些和其它有用的抗体片段在本文进一步讨论。

[0580] 也应理解术语抗体也通常包括多克隆抗体、单克隆抗体(mAbs),抗体类似的多肽,例如通过任何已知技术,例如酶切割、肽合成和重组技术制备的嵌合抗体和人源化抗体,抗体的抗独特型(抗Id)抗体和具有与抗原特异结合的能力的抗体片段(抗原结合片段)。产生的抗体具有任何同种型。

[0581] 抗CD38抗体是如上所述的抗体,它可与抗原CD38特异结合。

[0582] 术语“抗原决定簇”是指可与抗体特异结合的蛋白决定区。抗原决定簇通常由分子的有化学活性的表面基团,例如氨基酸或糖侧链组成,通常具有特定的3个二维结构特征,及特定的电荷特征。可区分构象和非构象抗原决定簇,因为在存在变性溶剂时,前者的结合消失,而后者的结合不消失。抗原决定簇可含有直接参与结合的氨基酸残基(也称为抗原决定簇的免疫优势组分)和其它氨基酸残基,它们不直接参与结合,例如通过特异的抗原结合肽而被有效封闭的氨基酸残基(即,氨基酸残基在特异的抗原结合肽的覆盖区)。

[0583] 术语“双特异性分子”包括任何试剂,例如蛋白、肽和蛋白或肽的复合物,它具有两

个不同的结合特异性。例如,该分子可与(a)细胞表面的抗原和(b)效应细胞编码的Fc受体结合或相互作用。术语“多特异性分子”包括任何试剂,例如蛋白、肽和蛋白或肽的复合物,它具有多于两个不同的结合特异性。例如,该分子可与(a)细胞表面的抗原,(b)效应细胞编码的Fc受体和(c)至少一种其它组分结合或相互作用。因此,本发明包括,但不限于,针对CD38和其它细胞表面抗原或靶,例如效应细胞的Fc受体的双特异性、三特异性、四特异性和其它多特异性分子。

[0584] 术语“双特异性抗体”包括任何双特异性分子的抗CD38抗体。术语“双特异性抗体”也包括双功能抗体。双功能抗体是二价的双特异性抗体,其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达,但通过同一链上的两个结构域间的较短的不能使其配对的连接物进行连接,从而使结构域与另一条链的互补结构域配对,从而得到两个抗原结合位点(参见,例如Holliger, P. et al., PNAS USA 90, 6444-6448(1993)、Poljak, R.J. et al., Structure 2, 1121-1123 (1994))。

[0585] 此处所用术语“效应细胞”是指参与免疫应答的效应阶段的免疫细胞,与免疫应答的认知和激活阶段相对应。示例的免疫细胞包括骨髓或淋巴来源的细胞,例如,淋巴细胞(例如B细胞和T细胞,包括溶细胞的T细胞(CTLs)),杀伤细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜曙红细胞、嗜中性粒细胞、分叶核白细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱细胞。某些效应细胞表达特异的Fc受体,并具有特定的免疫功能。在某些技术方案中,效应细胞可诱导抗体依赖的细胞毒素作用(ADCC),例如嗜中性粒细胞可诱导ADCC。例如,表达FcR的单核细胞、巨噬细胞参与特定的靶细胞杀伤,并向免疫系统的其它组分呈递抗原,或与呈递抗原的细胞结合。在某些技术方案中,效应细胞可吞噬靶抗原、靶细胞或微生物。效应细胞上特定的FcR的表达可通过体液因子,例如细胞因子来调控。例如,已发现Fc γ RI的表达可被干扰素 γ (IFN- γ)和/或G-CSF上调。这种增强的表达可提高含Fc γ RI的细胞针对靶的细胞毒活性。效应细胞可吞噬或裂解靶抗原或靶细胞。

[0586] 此处所用术语“人抗体”包括具有来源于人胚系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体也包括不被人胚系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点突变或体内细胞突变引入的突变)。但此处所用术语“人抗体”不包括其来源于其它哺乳动物种,例如鼠的CDR序列移植到人的阅读框序列中的抗体。此处所用抗体是“来源于”特定的胚系序列,如果抗体是从使用人免疫球蛋白序列的系统,例如通过免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因鼠,或通过筛选人免疫球蛋白基因库而获得的,则筛选的人抗体的氨基酸序列与由胚系 V_H 或 V_L 可变区基因片段编码的氨基酸序列的同一性至少为90%,例如至少为95%,例如至少为96%,例如至少为97%,例如至少为98%,或例如至少为99%。典型地,来源于特定的人胚系 V_H 或 V_L 可变区基因片段序列的人抗体与由胚系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相比较,具有不超过10个氨基酸的差异,例如不超过5,例如不超过4、3、2或1个氨基酸差异。

[0587] 嵌合抗体是含有一个或多个来源于一个抗体的区域和一个或多个来源于一个或多个来自另一个物种的其它抗体的区域的抗体。单价嵌合抗体是将嵌合的H链通过二硫键与嵌合的L链连接而形成的二聚体(HL))。二价嵌合抗体是两个HL二聚体通过至少一个二硫键连接而形成的四聚体(H_2L_2)。也可产生多价嵌合抗体,例如,通过使CH区寡聚化(例如来源于IgM H链或 μ 链)。典型地,嵌合抗体是指其重链和/或轻链部分与来源于特定物种的抗体

的对应序列同一或同源的或属于特定的抗体类型或亚类,而链的其余部分与另一物种的抗体的对应序列同一或同源或属于另一种抗体类型或亚类的抗体及这种抗体的片段,只要它们具有所需的生物活性即可(参见,例如US 4,816,567和Morrison et al.,PNAS USA 81., 6851-6855(1984))。嵌合抗体通过本领域已知的重组过程产生(参见,例如Cabilly et al.,PNAS USA 81,3273-3277(1984)、Morrison et al.,PNAS USA 8JL6851-6855(1984)、Boulianne et al.,Nature 312,643-646(1984)、EP125023,Neuberger et al.,Nature 314,268-270(1985)、EP171496,EP173494,W086/01533,EP184187,Sahagan et al.,J.Immunol.137.1066-1074(1986)、W087/02671,Liu et al.,PNAS USA 84,3439-3443(1987)、Sun et al.,PNAS USA 84,214-218(1987)、Better et al.,Science 240,1041-1043(1988)and Harlow et al.,Antibodies:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,(1988))。

[0588] 人源化抗体是来源于非人物种的抗体,其中将阅读框和重链及轻链恒定区的特定氨基酸突变,从而可避免或消除在人中的免疫应答。非人(例如鼠)抗体的人源化形式是含有来源于非人免疫球蛋白最小序列的嵌合抗体。对大部分而言,人源化抗体是其受体的高变区残基被具有所需抗原结合特性,例如特异性和亲和性的非人物种(供体抗体),例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替代的人免疫球蛋白(受体抗体)。在某些情况下,人免疫球蛋白的Fv阅读框区域(FR)残基被相应的非人残基替代。另外,人源化抗体可含有受体抗体或供体抗体中没有的残基。这些修饰可进一步优化抗体的功能。通常,人源化抗体实质含有至少一个,典型地两个可变结构域,其中所有或实质所有高变区的环对应非人免疫球蛋白,或所有或实质所有FR区域是人免疫球蛋白的序列。人源化抗体选择性地也含有至少一部分免疫球蛋白的恒定区(Fc),典型地是人免疫球蛋白的恒定区。详细内容参见Jones et al.,Nature 321,522-525(1986)、Riechmann et al.,Nature 332,323-329(1988)and Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2,593-596(1992)。

[0589] 此处所用“单克隆抗体”或“单克隆抗体组分”是指单分子组分的抗体分子的制备。单克隆抗体组分具有单一的特定抗原决定簇的结合特异性和亲和性。因此,术语“人单克隆抗体”是指具有来源于人胚系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区,并具有单一的结合特异性的抗体。人单克隆抗体可通过杂交瘤产生,包括从具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因或转染色体非人动物,例如转基因鼠获得B细胞与永生化细胞融合。单克隆抗体可缩写为mAb。

[0590] 此处所用术语“重组人抗体”包括所有通过重组方法制备、表达、产生或分离的人抗体,例如(a)从含有人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如鼠)中分离的抗体或制备的杂交瘤(在本文其它部分描述), (b)从转化的以表达抗体的宿主细胞,例如转染瘤分离的抗体, (c)从重组的、组合人抗体库分离的抗体,及(d)通过任何其它涉及将人免疫球蛋白基因序列与其它DNA序列拼接的方法制备、表达、产生或分离的抗体。这种重组的人抗体具有来源于人胚系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。但在某些技术方案中,这种重组人抗体可进行体外突变(或当对人Ig序列使用动物转基因时,为体内体细胞突变),因此,重组抗体的V_H和V_L区的氨基酸序列,当它们来源于人胚系V_H和V_L序列并与之相关时,可以是体内人抗体胚系库天然不存在的序列。

[0591] 此处所用“异源抗体”定义为涉及转基因非人生物产生的抗体。该术语是指与在不

由非人动物所组成的生物中,通常是在来源于除了转基因非人动物外的某个物种中所发现的抗体具有相对应的氨基酸序列的抗体。

[0592] 此处所用“分离的抗体”是指实质不含有其它具有不同的抗原特异性的抗体(例如,与CD38特异结合的分离抗体实质不含有与除CD38外的抗原特异结合的抗体)的抗体。但与人CD38的抗原决定簇、同种型或变异体特异结合的分离抗体可与其它相关的抗原,例如来源于其它物种(例如CD38物种同源体)具有交叉反应性。另外,分离抗体实质不含有其它细胞物质和/或化学制品。在本发明的一个技术方案中,具有不同特异性的“分离的”单克隆抗体的组合可含有明确的成分。

[0593] 此处所用“特异结合”是指诸如抗体这样的抗原结合肽,结合到预定的抗原上。典型地,当通过表面等离子共振 (SPR) 技术在BIAcore3000仪器上,以重组CD38为配体,抗体为分析物进行测定时,诸如抗体这样的抗原结合肽的结合亲和性相当于 K_D 为 $10^{-7}M$ 或更少,例如约 $10^{-8}M$ 或更少,例如约 $10^{-9}M$ 或更少,约 $10^{-10}M$ 或更少,约 $10^{-11}M$ 或更少。抗原结合肽可与预定抗原以相当的 K_D ,比其与除预定蛋白或密切相关的抗原之外的非特异抗原(例如BSA、酪蛋白)的结合亲和性低至少10倍,例如至少低100倍,例如至少低1000倍,例如至少低10,000倍,例如至少低1000,000倍的亲和力结合。具有更低的亲和力的量依赖于抗原结合肽的 K_D ,因此当抗原结合肽的 K_D 很低时(即抗原结合肽是高度特异的),则与抗原亲和力的量比与非特异抗原亲和力至少低10,000倍。此处所用短语“识别抗原的抗原结合肽”和“抗原特异的抗原结合肽”可与术语“与抗原特异结合的抗原结合肽”互换使用。同样,此处所用短语“识别抗原的抗体”和“抗原特异的抗体”可与术语“与抗原特异结合的抗体”互换使用。

[0594] 此处所用术语“ k_d ”(sec⁻¹)是指特定的抗体抗原相互作用的解离平衡速率常数。所述值也指 k_{off} 值。

[0595] 此处所用术语“ k_a ”(M⁻¹×sec⁻¹)是指特定的抗体抗原相互作用的结合平衡速率常数。

[0596] 此处所用术语“ k_D ”(M)是指特定的抗体抗原相互作用的解离平衡常数。

[0597] 此处所用术语“ K_A ”(M⁻¹)是指特定的抗体抗原相互作用的结合平衡常数,通过 k_a 除以 k_d 而得到。

[0598] 此处所用“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类型(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、或IgM)。

[0599] 此处所用“同种型转换”是指抗体的类型或同种型从一种免疫球蛋白类型转变为一种其它的免疫球蛋白类型的现象。

[0600] 此处所用“非转换的同种型”是指在无同种型转换发生时产生的重链的同种型类型;编码非转换同种型的CH基因典型地是紧接功能性重组VDJ基因下游的第一个CH基因。同种型转换分为典型的或非典型的同种型转换。典型的同种型转换通过至少转基因的一个转换序列区参与的重组事件发生。非典型的同种型转换可发生在例如人 $\sigma\mu$ 和人 $\Sigma\mu$ (δ -相关的缺失)间的同源重组。选择性的非典型转换机制,例如转基因内和/或染色体内重组可发生,并实现同种型转换。

[0601] 此处所用术语“转换序列”是指那些负责转换重组的DNA序列。“转换供体”序列典型地是 μ 转换区,是在转换重组过程中被删除的恒定区的5'(即上游)。“转换受体”区是被删除的恒定区和替代的恒定区(例如 γ 、 ϵ 等)之间。由于在发生重组的地方没有特定的位点,

因此典型地,最终的基因序列不能从构建体来预测。

[0602] 此处所用“糖基化模式”定义为与蛋白,更具体地与免疫球蛋白(抗体)蛋白共价连接的碳水化合物单元的模式。异源抗体的糖基化模式的特征在于与由非人转基因动物物种产生的抗体上天然存在的糖基化模式实质上是相似的,本领域普通人员会意识到异源抗体的糖基化模式与所述非人转基因动物物种的糖基化模式比与转基因的CH基因来源的物种具有更大的相似性。

[0603] 此处所用术语“天然存在的”用于某受试体时是指该受试体是在自然界发现的。例如,可从自然界来源分离的,没有在实验室人工改变的生物(包括病毒)中存在的多肽或多聚核酸序列是天然存在的。

[0604] 此处所用术语“重排的”是指重链或轻链免疫球蛋白座位的构象,其中在分别编码完整的V_H或V_L结构域的构象中,V片段位于紧邻D-J或J片段。重组的免疫球蛋白(抗体)基因座位可通过与胚系DNA比较来鉴定;重组的座位具有至少一个七聚物/九聚物同源元件。

[0605] 此处所用术语“未重排的”或“胚系构象”参照V片段而言,是指其中V片段不重组以与D或J片段紧邻的构象。

[0606] 此处所用术语“核酸分子”是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链的或双链的,但优选地是双链DNA。核酸可存在于全细胞、细胞裂解物中或是部分纯化或基本纯化的形式。

[0607] 当通过标准技术,包括碱/SDS处理、CsCl成带、柱色谱、琼脂糖凝胶电泳和其它本领域公知的技术从其它细胞成分或诸如其它细胞核酸或蛋白等其它污染物中将核酸纯化出来时,在核酸是“分离的”或“基本纯化的”。参见F.Ausubel et al.,ed.Current Protocols in Molecular Biology,Greenlee Publishing and Wiley InterScience New York(1987)。

[0608] 当将其与另一个核酸序列进行功能相连时,则核酸是“可操作连接的”。例如,启动子或增强子当影响序列的转录时则是与编码序列可操作连接的。对于调控序列的转录而言,可操作连接是指被连接的DNA序列在连接两个蛋白编码区是连续的,而且使阅读框也是连续的。对开关序列而言,可操作连接表示可影响开关重组的序列。

[0609] 此处所用术语“抑制生长”(例如当指细胞时)是指当与CD38BP,例如抗CD38抗体接触时,和未与CD38BP,例如抗CD38抗体接触时相比较,细胞生长的任何可测定的降低,例如抑制细胞培养物生长的至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。

[0610] 此处所用术语“抑制结合”和“阻断结合”(例如当指抑制/阻断CD38结合物与CD38结合时)可互换使用,均包括部分和完全抑制/阻断。CD38结合物与CD38的结合的抑制/阻断可降低或改变CD38结合物与CD38结合未被抑制或阻断时发生的细胞信号传导的正常水平或类型。抑制和阻断也指当与诸如抗CD38抗体这样的CD38BP接触时,与未与诸如抗CD38抗体这样的CD38BP接触的配体相比较,CD38结合物与CD38的结合亲和性任何可测定的降低,例如抑制CD38结合物与CD38的结合至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。

[0611] “靶细胞”是指可被本发明的组分(包括例如,诸如人单克隆抗CD38抗体和/或针对CD38的双特异性或多特异性分子这样的CD38BP)作为靶标的受试者(例如人或动物)中的任

何非期望的细胞。在某些技术方案中,靶细胞是表达或过表达CD38的细胞。表达CD38的细胞典型地包括诸如骨髓胸腺细胞、激活的T和B细胞、80%其余的NK细胞和单核细胞、淋巴结生发中心成淋巴细胞、浆B细胞和某些滤泡内细胞、枝状细胞、正常骨髓细胞、特定的前体细胞、50-80%脐带血细胞、红血球以及血小板这样的造血细胞。CD38也可被诸如内脏中的上皮内细胞和固有层淋巴细胞这样的非造血细胞、被脑中的Purkinje细胞和神经原纤维缠结、被前列腺的上皮细胞、胰脏中的 β 细胞、骨中的破骨细胞、眼中的视网膜细胞和平滑肌和横纹肌中的肌膜所表达。在恶性细胞中,CD38在各种恶性血液疾病,包括但不限于多发性骨髓瘤、原发和继发浆细胞白血病、B细胞慢性淋巴细胞白血病、B细胞急性淋巴细胞白血病、Waldenstrom巨球蛋白血症、原发性系统性淀粉样变病、套细胞淋巴瘤、前淋巴细胞/髓细胞白血病、急性骨髓白血病、慢性骨髓白血病、滤泡淋巴瘤和NK细胞白血病中也有表达。

[0612] 此处所用术语“载体”是指可运输与其连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,它是指环状双链DNA环,其中可连接额外的DNA片段。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA片段可连接到病毒基因组中。某些载体可在其所导入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离的哺乳动物载体)。其它载体(例如非游离哺乳动物载体)可在导入到宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,然后与宿主基因组一起复制。此外,某些载体可指导与其可操作连接的基因的表达。这类载体在此处被称为“重组表达载体”(或简言之,“表达载体”)。一般来说,应用于重组DNA技术中的表达载体通常是质粒形式。在本说明书中,由于质粒是载体的最普遍的使用形式,因此“质粒”和“载体”可互换使用。但本发明包括其它形式的表达载体,例如病毒载体(比如复制缺陷的逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒,它们可发挥同样的功能)。

[0613] 此处所用术语“重组宿主细胞”(或简言之“宿主细胞”)是指导入重组表达载体的细胞。可理解为该术语不仅是指特定的受试细胞,而且也指这种细胞的后代。由于在后代中因突变或环境影响可能发生某些改变,因此事实上,这种后代可能与母细胞不是相同的,但仍包括在此处所用术语“宿主细胞”的范围内。重组宿主细胞包括例如诸如CHO细胞这样的转染瘤,NS/O细胞和淋巴细胞。

[0614] 术语“调控序列”包括可控制抗体链基因转录或翻译的启动子、增强子和其它表达控制元件(例如多聚腺苷酸信号)。这种调控序列可描述在例如Goeddel, Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)中。本领域技术人员可设计表达载体,包括根据选择被转化的宿主细胞、所需蛋白的表达水平等因素来选择调控序列。用于哺乳动物宿主细胞表达的调控序列的例子包括可在哺乳动物中指导高水平蛋白表达的病毒元件,例如来源于 γ 细胞巨化病毒(CMV)、猿病毒40(SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。选择性地,可使用非病毒调控序列,例如泛素启动子 β -球蛋白启动子。

[0615] 此处所用术语“受试体”包括任何人和非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类、羊、狗、牛、鸡、两栖类、爬行类等。

[0616] 术语“转染”的各种形式包括广泛的各种通常用于将外源DNA导入原核或真核细胞的技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-右旋糖苷转染、脂质体转染等。

[0617] 此处所用术语“转染瘤”包括表达抗体的重组真核宿主细胞,例如CHO细胞、NS/O细胞、HEK293细胞、植物细胞或真菌,包括酵母细胞。

[0618] 术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,譬如非人灵长类、羊、狗、牛、鸡、两栖类、爬行类等。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,譬如非人灵长类、羊、狗、牛、鸡、两栖类、爬行类等。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,譬如非人灵长类、羊、狗、牛、鸡、两栖类、爬行类等。

[0619] 术语“转基因非人动物”是指具有含一个或多个重链和/或轻链转基因或转染色体的基因组(整合或不整合在动物的天然基因组DNA中),并可完全表达人抗体的非人动物。例如,转基因鼠可具有人轻链转基因或人重链转染色体,从而当鼠用CD38抗原和/或表达CD38的细胞免疫时可产生人可CD38抗体。人重链转基因可整合在鼠染色体DNA中,这种情况下的转基因鼠是,例如诸如HCo7或HCo12鼠这样的HuMAb鼠,或人重链转基因可维持在染色体外,这种情况下的转染色体KM鼠在W002/43478中有所描述。这种转基因和转染色体鼠(此处统称为“转基因鼠”)可通过V-D-J重组和同型体转换产生多种针对给定抗原的人单克隆抗体的同型体(例如IgG、IgA、IgM、IgD和/或IgE)。转基因非人动物也可通过导入编码特定抗体的基因、例如通过将基因与在动物乳汁中表达的基因有效连接的方式来用于产生针对特定抗原的抗体

[0620] 此处所用术语特异性是指诸如抗CD38抗体这样的CD38结合肽识别CD38抗原决定簇、但对CD38的其它部分(包括可被诸如抗CD38抗体这样的其它CD38BPs结合的其它的抗原决定簇)仅具有很小或不可检测的反应性的能力。特异性可通过此处所述的竞争检测法进行相关检测。特异性更具体地可通过任何此处所述抗原决定簇鉴定/描述技术或其在领域中已知的等效技术来测定。

[0621] 不过特异针对特定抗原决定簇的抗体可与某些存在CD38的生物样品中的其它分子发生交叉反应。更典型地,诸如抗CD38抗体这样的CD38BP,可与来自其它物种的CD38同源物交叉反应。在其中一种或全部两种情况下,典型地,这种交叉反应抗体是针对与人CD38相关的结构和/或环境因子进行选择的。

[0622] 此处所用术语选择性是指诸如抗CD38抗体这样的CD38BP对特定的区域、靶、或者肽的优先结合;典型地,相对于一个或多个其它生物分子、结构、细胞、组织等,是CD38上的区域或抗原决定簇。在一个技术方案中,本发明中的诸如抗CD38抗体这样的CD38BP是针对直肠癌细胞环境中的CD38部分进行选择的(即,抗CD38抗体选择性地结合到CD38部分,超过与直肠癌细胞其它组分的结合)。

[0623] 本发明的CD38BPs典型地以一种至少是充分分离的形式来使用并提供的。充分分离的分子是在组分中为主要种类的分子,在上述的组分中含该分子与其所属的一类分子(即,它在组分中至少占约50%的分子类型,典型地在组分中至少占约70%、至少约80%、至少占约85%、至少约90%、至少约95%、或更多的分子种类,例如肽(譬如,对所有存在的肽种类中,组分对CD38BP具有至少约98%、98%或99%的同质性))。

[0624] 分离的分子是指不与诸如产生CD38BP的细胞或动物中所含有的非CD38结合生物分子(或可干扰本发明的CD38BP结合和/或活性的CD38结合分子)这样的任何外源及非必需的生理因子在显著性上(例如大于约1%、大于约2%、大于约3%、或大于约5%)相关联的分子。分离的分子也可指任何经过人工干预(无论自动、手工还是二者皆有)的纯化阶段所获得的分子。在本发明提供的多种组分中,例如在含有一个或多个药学上可接受的载体的组

分中(例如在含有大量药学上可接受的载体、稳定剂和/或防腐剂的组分的情况下),CD38BP可根据组分中所有分子种类的数目而以相对较小的量存在。在某些情况下,诸如BSA这样的附加的肽,也可与先前纯化的CD38BP包括在这样的组分中。不过,如果这种组分的附加组成对于有意使用CD38BP是可以接受的,那么这种组分仍可描述为包含分离的CD38BP。

[0625] 典型地,本发明的CD38BP实质上不具有诸如具有不同抗原特异性的CD38BP这样的其它CD38BP。但本发明也提供了含有多种具有不同特异性和特征的CD38BP的组分(例如,本发明提供了具有不同特异性和/或选择性特征的CD38BP“鸡尾酒”)。

[0626] “治疗”是指给药有效剂量的本发明的具有治疗活性的化合物,以达到减轻、减弱或根除(治愈)症状或疾病状态的目的。

[0627] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:2的序列所组成的 V_L 的CD38BP。

[0628] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:6的序列所组成的 V_H 的CD38BP。

[0629] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:2的序列所组成的 V_L 和实质上由SEQ ID No:6的序列所组成的 V_H 的CD38BP。

[0630] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:3的序列所组成的 V_L CDR1的CD38BP。

[0631] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:4的序列所组成的 V_L CDR2的CD38BP。

[0632] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:5的序列所组成的 V_L CDR3的CD38BP。

[0633] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:8的序列所组成的 V_H CDR1的CD38BP。

[0634] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:9的序列所组成的 V_H CDR2的CD38BP。

[0635] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:10的序列所组成的 V_H CDR3的CD38BP。

[0636] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上分别由SEQ ID No:3、SEQ ID No:4和SEQ ID No:5的序列所组成的 V_L CDRs(V_L CDR1、CDR2和CDR3)的CD38BP。

[0637] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上分别由SEQ ID No:8、SEQ ID No:9和SEQ ID No:10的序列所组成的 V_H CDRs(V_H CDR1、CDR2和CDR3)的CD38BP。

[0638] 在一个技术方案中,本发明提供了CD38BP,它包含

[0639] (a) 三种 V_L CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:3、SEQ ID No:4和SEQ ID No:5所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近 V_L CDRs的间隔区),以及

[0640] (b) 三种 V_H CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:8、SEQ ID No:9和SEQ ID No:10所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近 V_H CDRs的间隔区)。

[0641] 在一个进一步的技术方案中,本发明提供了在CD38BP的 V_L 区和 V_H 区之间含有柔性连接物的CD38BP。在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了一种CD38BP,其中 V_L 和 V_H 区位于免疫球蛋白折叠蛋白的不同链上,并以 V_L CDR1、CDR2、CDR3及 V_H CDR1、CDR2和CDR3这样

的顺序定向连接,从而可与CD38上的抗原决定簇选择性和/或特异性结合。在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了含有两组可变结构域(在相联的不同链上联结的V_L和V_H结构域组)的CD38BP,从而使CD38BP含有两个相同的抗原决定簇结合位点。

[0642] 预期在本段中所述的任何这种CD38BPs,至少在部分上,与具有含SEQ ID No:2序列的V_L区和含SEQ ID No:7序列的V_H区的抗体,具有相似的抗原决定簇特异性、选择性和其它特征,因此,可用于治疗多发性骨髓瘤。

[0643] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:12的序列所组成的V_L的CD38BP。

[0644] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:17的序列所组成的V_H的CD38BP。

[0645] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:12的序列所组成的V_L和实质上由SEQ ID No:17的序列所组成的V_H的CD38BP。

[0646] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:13的序列所组成的V_L CDR1的CD38BP。

[0647] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:14的序列所组成的V_L CDR2的CD38BP。

[0648] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:15的序列所组成的V_L CDR3的CD38BP。

[0649] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:18的序列所组成的V_H CDR1的CD38BP。

[0650] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:19的序列所组成的V_H CDR2的CD38BP。

[0651] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:20的序列所组成的V_H CDR3的CD38BP。

[0652] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上分别由SEQ ID No:13、SEQ ID No:14和SEQ ID No:15的序列所组成的V_L CDRs(V_L CDR1、CDR2和CDR3)的CD38BP。

[0653] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上分别由SEQ ID No:18、SEQ ID No:19和SEQ ID No:20的序列所组成的V_H CDRs(V_H CDR1、CDR2和CDR3)的CD38BP。

[0654] 在一个技术方案中,本发明提供了CD38BP,它包含

[0655] (a) 三种V_L CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:13、SEQ ID No:14和SEQ ID No:15所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近V_L CDRs的间隔区),以及

[0656] (b) 三种V_H CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:18、SEQ ID No:19和SEQ ID No:20所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近V_H CDRs的间隔区)。

[0657] 在一个进一步的技术方案中,本发明提供了在CD38BP的V_L区和V_H区之间含有柔性连接物的CD38BP。在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了一种CD38BP,其中V_L和V_H区位于免疫球蛋白折叠蛋白的不同链上,并以V_L CDR1、CDR2、CDR3及V_H CDR1、CDR2和CDR3这样的顺序定向连接,从而可与CD38上的抗原决定簇选择性和/或特异性结合。在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了含有两组可变结构域(在相联的不同链上联结的V_L和V_H结构域

组)的CD38BP,从而使CD38BP含有两个相同的抗原决定簇结合位点。

[0658] 预期在本段中所述的任何这种CD38BPs,至少在部分上,与具有含SEQ ID No:12序列的V_L区和含SEQ ID No:17序列的V_H区的抗体,具有相似的抗原决定簇特异性、选择性和其它特征,因此,可用于治疗多发性骨髓瘤。

[0659] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:22的序列所组成的V_L的CD38BP。

[0660] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:27的序列所组成的V_H的CD38BP。

[0661] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:22的序列所组成的V_L和实质上由SEQ ID No:27的序列所组成的V_H的CD38BP。

[0662] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:23的序列所组成的V_L CDR1的CD38BP。

[0663] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:24的序列所组成的V_L CDR2的CD38BP。

[0664] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:25的序列所组成的V_L CDR3的CD38BP。

[0665] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:28的序列所组成的V_H CDR1的CD38BP。

[0666] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:29的序列所组成的V_H CDR2的CD38BP。

[0667] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由SEQ ID No:30的序列所组成的V_H CDR3的CD38BP。

[0668] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上分别由SEQ ID No:23、SEQ ID No:24和SEQ ID No:25的序列所组成的V_L CDRs (V_L CDR1、CDR2和CDR3)的CD38BP。

[0669] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上分别由SEQ ID No:28、SEQ ID No:29和SEQ ID No:30的序列所组成的V_H CDRs (V_H CDR1、CDR2和CDR3)的CD38BP。

[0670] 在一个技术方案中,本发明提供了CD38BP,它包含

[0671] (a) 三种V_L CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:23、SEQ ID No:24和SEQ ID No:25所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近V_L CDRs的间隔区),以及

[0672] (b) 三种V_H CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:28、SEQ ID No:29和SEQ ID No:30所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近V_H CDRs的间隔区)。

[0673] 在一个进一步的技术方案中,本发明提供了在CD38BP的V_L区和V_H区之间含有柔性连接物的CD38BP。在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了一种CD38BP,其中V_L和V_H区位于免疫球蛋白折叠蛋白的不同链上,并以V_L CDR1、CDR2、CDR3及V_H CDR1、CDR2和CDR3这样的顺序定向连接,从而可与CD38上的抗原决定簇选择性和/或特异性结合。在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了含有两组可变结构域(在相联的不同链上联结的V_L和V_H结构域组)的CD38BP,从而使CD38BP含有两个相同的抗原决定簇结合位点。

[0674] 预期在本段中所述的任何这种CD38BPs,至少在部分上,与具有含SEQ ID No:22序

列的V_L区和含SEQ ID No:27序列的V_H区的抗体,具有相似的抗原决定簇特异性、选择性和其它特征,因此,可用于治疗多发性骨髓瘤。

[0675] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由如SEQ ID No:3或SEQ ID No:13或SEQ ID No:23所述的序列组成的V_L CDR1的CD38BP,其中N末端残基和/或1、2或3个C末端氨基酸残基是缺失的。

[0676] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由如SEQ ID No:4或SEQ ID No:14或SEQ ID No:24所述的序列组成的V_L CDR2的CD38BP,其中N末端残基和/或1、2或3个C末端残基是缺失的。

[0677] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由如SEQ ID No:5或SEQ ID No:15或SEQ ID No:25所述的序列组成的V_L CDR3的CD38BP,其中N末端残基和/或1、2、3或4个C末端残基是缺失的。

[0678] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由如SEQ ID No:8或SEQ ID No:18或SEQ ID No:28所述的序列组成的V_H CDR1的CD38BP,其中1、2、3或4个N末端残基和/或1、2、3或4个C末端残基是缺失的。

[0679] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由如SEQ ID No:9或SEQ ID No:19或SEQ ID No:29所述的序列组成的V_H CDR2的CD38BP,其中1、2、3、4或5个N末端氨基酸和/或1、2、3、4、5或6个C末端氨基酸是缺失的。

[0680] 在一个技术方案中,本发明提供了含有实质上由如SEQ ID No:10或SEQ ID No:20或SEQ ID No:30所述的序列组成的V_H CDR3的CD38BP,其中N末端1、2或3个氨基酸残基和/或C末端1、2、3或4个氨基酸残基是缺失的。

[0681] 本发明也提供其中这些“剪切的”CDR序列彼此间和/或其它此处所述CDR序列组合在一起的CD38BPs。

[0682] 在一个技术方案中,本发明提供CD38BP,包含

[0683] (a) 三种V_L CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:3、SEQ ID No:4和SEQ ID No:5所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近V_L CDRs的间隔区),以及

[0684] (b) 三种V_H CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:8、SEQ ID No:9和SEQ ID No:10所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近V_H CDRs的间隔区)。

[0685] 在一个进一步的技术方案中,本发明提供了在CD38BP的V_L区和V_H区之间含有柔性连接物的CD38BP。在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了一种CD38BP,其中V_L和V_H区位于免疫球蛋白折叠蛋白的不同链上,并以V_L CDR1、CDR2、CDR3及V_H CDR1、CDR2和CDR3这样的顺序定向连接,从而可与CD38上的抗原决定簇选择性和/或特异性结合。在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了含有两组可变结构域(在相联的不同链上联结的V_L和V_H结构域组)的CD38BP,从而使CD38BP含有两个相同的抗原决定簇结合位点。预期在本段中所述的任何这种CD38BPs,至少在部分上,与具有含SEQ ID No:2序列的V_L区和含SEQ ID No:7序列的V_H区的抗体,具有相似的抗原决定簇特异性、选择性和其它特征。

[0686] 在一个技术方案中,本发明提供CD38BP,包含

[0687] (a) 三种V_L CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:13、SEQ ID No:14和SEQ ID No:15所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近V_L CDRs的间隔区),以及

[0688] (b) 三种 V_H CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:18、SEQ ID No:19和SEQ ID No:20所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近 V_H CDRs的间隔区)。

[0689] 在一个进一步的技术方案中,本发明提供了在CD38BP的 V_L 区和 V_H 区之间含有柔性连接物的CD38BP。

[0690] 在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了一种CD38BP,其中 V_L 和 V_H 区位于免疫球蛋白折叠蛋白的不同链上,并以 V_L CDR1、CDR2、CDR3及 V_H CDR1、CDR2和CDR3这样的顺序定向连接,从而可与CD38上的抗原决定簇选择性和/或特异性结合。在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了含有两组可变结构域(在相联的不同链上联结的 V_L 和 V_H 结构域组)的CD38BP,从而使CD38BP含有两个相同的抗原决定簇结合位点。预期在本段中所述的任何一种CD38BP,至少在部分上,与具有含SEQ ID No:12序列的 V_L 区和含SEQ ID No:17序列的 V_H 区的抗体,具有相似的抗原决定簇特异性、选择性和其它特征。

[0691] 在一个技术方案中,本发明提供CD38BP,包含

[0692] (a) 三种 V_L CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:23、SEQ ID No:24和SEQ ID No:25所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近 V_L CDRs的间隔区),以及

[0693] (b) 三种 V_H CDRs,它们实质上分别由SEQ ID No:28、SEQ ID No:29和SEQ ID No:30所组成,并在CD38BP中彼此紧邻(例如,在野生型抗CD38抗体中靠近 V_H CDRs的间隔区)。

[0694] 在一个进一步的技术方案中,本发明提供了在CD38BP的 V_L 区和 V_H 区之间含有柔性连接物的CD38BP。

[0695] 在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了一种CD38BP,其中 V_L 和 V_H 区位于免疫球蛋白折叠蛋白的不同链上,并以 V_L CDR1、CDR2、CDR3及 V_H CDR1、CDR2和CDR3这样的顺序定向连接,从而可与CD38上的抗原决定簇选择性和/或特异性结合。在另一个进一步的技术方案中,本发明提供了含有两组可变结构域(在相联的不同链上联结的 V_L 和 V_H 结构域组)的CD38BP,从而使CD38BP含有两个相同的抗原决定簇结合位点。预期在本段中所述的任何一种CD38BP,至少在部分上,与具有含SEQ ID No:22序列的 V_L 区和含SEQ ID No:27序列的 V_H 区的抗体,具有相似的抗原决定簇特异性、选择性和其它特征。

[0696] 本发明也提供含实施例中抗体的 V_L 区、 V_H 区或一个或多个CDRs的功能变异体的CD38BP。CD38BP所用的 V_L 、 V_H 或CDR的功能变异体仍允许CD38BP至少保持母抗体中亲和性/强度和/或特异性/选择性的实质部分(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更高),在某些情况下,这种CD38BP可以具有比母抗体更高的亲和性、选择性和/或特异性。

[0697] 在一个技术方案中,本发明提供含有可变的 V_L 的CD38BP,该 V_L 实质上由与如SEQ ID No:2或SEQ ID No:12或SEQ ID No:22所述的序列具有约50%,譬如至少60%、例如至少约70%、譬如至少约75%、例如至少约80%、譬如至少约85%、例如至少约90%、譬如至少95%约氨基酸序列同一性的序列所组成,其中CD38BP至少具有抗体抗原决定簇结合特征的实质部分(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多),该抗体分别具有SEQ ID No:2或SEQ ID No:12或SEQ ID No:22的可变 V_L 序列,譬如分别具有SEQ ID No:2的 V_L 序列和SEQ ID No:7的 V_H 序列的抗体,及分别具有SEQ ID No:12的 V_L 序列和SEQ ID No:17的 V_H 序列的抗体,和分别具有SEQ ID No:22的 V_L 序列和SEQ ID No:27的 V_H 序列的抗体。

[0698] 在一个技术方案中,本发明提供含有可变的 V_L CDR1的CD38BP,该 V_L CDR1实质上由

与如SEQ ID No:3或SEQ ID No:13或SEQ ID No:23所述的序列具有约50%,譬如至少60%、例如至少约70%、譬如至少约75%、例如至少约80%、譬如至少约85%、例如至少约90%、譬如至少约95%氨基酸序列同一性的序列所组成,其中CD38BP至少具有抗体抗原决定簇结合特征的实质部分(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多),该抗体分别具有SEQ ID No:3或SEQ ID No:13或SEQ ID No:23的可变V_L CDR1序列,譬如分别具有SEQ ID No:2或SEQ ID No:12或SEQ ID No:22的抗体,譬如分别具有SEQ ID No:2的V_L序列和SEQ ID No:7的V_H序列的抗体,及分别具有SEQ ID No:12的V_L序列和SEQ ID No:17的V_H序列的抗体,和分别具有SEQ ID No:22的V_L序列和SEQ ID No:27的V_H序列的抗体。

[0699] 在一个技术方案中,本发明提供含有可变的V_L CDR2的CD38BP,该V_L CDR2实质上由与如SEQ ID No:4或SEQ ID No:14或SEQ ID No:24所述的序列具有约50%,譬如至少60%、例如至少约70%、譬如至少约75%、例如至少约80%、譬如至少约85%、例如至少约90%、譬如至少约95%氨基酸序列同一性的序列所组成,其中CD38BP至少具有抗体抗原决定簇结合特征的实质部分(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多),该抗体分别具有SEQ ID No:4或SEQ ID No:14或SEQ ID No:24的可变V_L CDR2序列,譬如分别具有SEQ ID No:2或SEQ ID No:12或SEQ ID No:22的抗体,譬如分别具有SEQ ID No:2的V_L序列和SEQ ID No:7的V_H序列的抗体,及分别具有SEQ ID No:12的V_L序列和SEQ ID No:17的V_H序列的抗体,和分别具有SEQ ID No:22的V_L序列和SEQ ID No:27的V_H序列的抗体。

[0700] 在一个技术方案中,本发明提供含有可变的V_L CDR3的CD38BP,该V_L CDR3实质上由与如SEQ ID No:5或SEQ ID No:15或SEQ ID No:25所述的序列具有约50%,譬如至少60%、例如至少约70%、譬如至少约75%、例如至少约80%、譬如至少约85%、例如至少约90%、譬如至少约95%氨基酸序列同一性的序列所组成,其中CD38BP至少具有抗体抗原决定簇结合特征的实质部分(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多),该抗体分别具有SEQ ID No:5或SEQ ID No:15或SEQ ID No:25的可变V_L CDR3序列,譬如分别具有SEQ ID No:2或SEQ ID No:12或SEQ ID No:22的抗体,譬如分别具有SEQ ID No:2的V_L序列和SEQ ID No:7的V_H序列的抗体,及分别具有SEQ ID No:12的V_L序列和SEQ ID No:17的V_H序列的抗体,和分别具有SEQ ID No:22的V_L序列和SEQ ID No:27的V_H序列的抗体。

[0701] 在一个技术方案中,本发明提供含有可变的V_H的CD38BP,该V_H实质上由与如SEQ ID No:7或SEQ ID No:17或SEQ ID No:27所述的序列具有约50%,譬如至少60%、例如至少约70%、譬如至少约75%、例如至少约80%、譬如至少约85%、例如至少约90%、譬如至少约95%氨基酸序列同一性的序列所组成,其中CD38BP至少具有抗体抗原决定簇结合特征的实质部分(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多),该抗体分别具有SEQ ID No:7或SEQ ID No:17或SEQ ID No:27的可变V_L CDR3序列,譬如分别具有SEQ ID No:7的V_H序列和SEQ ID No:2的V_L序列的抗体,及分别具有SEQ ID No:17的V_H序列和SEQ ID No:12的V_L序列的抗体,和分别具有SEQ ID No:27的V_H序列和SEQ ID No:22的V_L序列的抗体。

[0702] 在一个技术方案中,本发明提供含有可变的V_H CDR1的CD38BP,该V_H CDR1实质上由与如SEQ ID No:8或SEQ ID No:18或SEQ ID No:28所述的序列具有约50%,譬如至少60%、例如至少约70%、譬如至少约75%、例如至少约80%、譬如至少约85%、例如至少约90%、譬如至少约95%氨基酸序列同一性的序列所组成,其中CD38BP至少具有抗体抗原决定簇结合特征的实质部分(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多),该抗体分别具有SEQ

ID No:8或SEQ ID No:18或SEQ ID No:28的可变 V_H CDR1序列,譬如分别具有SEQ ID No:7或SEQ ID No:17或SEQ ID No:27的抗体,譬如分别具有SEQ ID No:7的 V_H 序列和SEQ ID No:2的 V_L 序列的抗体,及分别具有SEQ ID No:17的 V_H 序列和SEQ ID No:12的 V_L 序列的抗体,和分别具有SEQ ID No:27的 V_H 序列和SEQ ID No:22的 V_L 序列的抗体。

[0703] 在一个技术方案中,本发明提供含有可变的 V_H CDR2的CD38BP,该 V_H CDR2实质上由与如SEQ ID No:9或SEQ ID No:19或SEQ ID No:29所述的序列具有约50%,譬如至少60%、例如至少约70%、譬如至少约75%、例如至少约80%、譬如至少约85%、例如至少约90%、譬如至少约95%氨基酸序列同一性的序列所组成,其中CD38BP至少具有抗体抗原决定簇结合特征的实质部分(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多),该抗体分别具有SEQ ID No:9或SEQ ID No:19或SEQ ID No:29的可变 V_H CDR2序列,譬如分别具有SEQ ID No:7或SEQ ID No:17或SEQ ID No:27的抗体,譬如分别具有SEQ ID No:7的 V_H 序列和SEQ ID No:2的 V_L 序列的抗体,及分别具有SEQ ID No:17的 V_H 序列和SEQ ID No:12的 V_L 序列的抗体,和分别具有SEQ ID No:27的 V_H 序列和SEQ ID No:22的 V_L 序列的抗体。

[0704] 在一个技术方案中,本发明提供含有可变的 V_H CDR3的CD38BP,该 V_H CDR3实质上由与如SEQ ID No:10或SEQ ID No:20或SEQ ID No:30所述的序列具有约50%,譬如至少60%、例如至少约70%、譬如至少约75%、例如至少约80%、譬如至少约85%、例如至少约90%、譬如至少约95%氨基酸序列同一性的序列所组成,其中CD38BP至少具有抗体抗原决定簇结合特征的实质部分(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多),该抗体分别具有SEQ ID No:10或SEQ ID No:20或SEQ ID No:30的可变 V_H CDR3序列,譬如分别具有SEQ ID No:7或SEQ ID No:17或SEQ ID No:27的抗体,譬如分别具有SEQ ID No:7的 V_H 序列和SEQ ID No:2的 V_L 序列的抗体,及分别具有SEQ ID No:17的 V_H 序列和SEQ ID No:12的 V_L 序列的抗体,和分别具有SEQ ID No:27的 V_H 序列和SEQ ID No:22的 V_L 序列的抗体。

[0705] 两个序列间的百分比同一性是序列中相同位点的数目的函数(即, $\% \text{同源性} = \# \text{一致位点} / \text{总} \# \text{位点} \times 100$),为了对两个序列进行最适比对,需要考虑空位数和每个空位的长度。可使用数学算法来实现两个序列间的序列比较和百分比同一性的测定,如下非限制性实施例所述。

[0706] 两个核苷酸序列间的百分比同一性可使用GCG软件包(可从<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序,通过NWSgapdna.CMP矩阵和40、50、70或80的空位权重及1、2、3、4、5或6的长度权重来测定。两个核苷酸或氨基酸序列间的百分比同一性也可使用E.Meyers and W.Miller,Comput.Appl.Biosci 4,11-17(1988))中的算法来测定,它已整合到ALIGN程序(2.0版),所用的是PAM120权重残基表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。另外,两个氨基酸序列间的百分比同一性可使用Needleman and Wunsch,J.Mol.Biol.48,444-453(1970))算法来测定,它已整合到GCG软件包(可从<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序中,使用的是Blossum 62矩阵和PAM250矩阵,空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0707] 本发明的核酸和蛋白序列可进一步用作“查询序列”,以对公共数据库进行搜索,例如鉴定相关序列。这种搜索可使用Altschul et al.,J.Mol.Biol.215,403-10(1990) NBLAST和XBLAST程序(2.0版)来执行。可使用NBLAST程序,分数=100,字长=12来执行BLAST核苷酸搜索,以获得与本发明中核酸分子同源的核苷酸序列。可使用XBLAST程序,分

数=50,字长=3来执行BLAST蛋白搜索,以获得与本发明中蛋白分子同源的氨基酸序列。为了获得空位比对以进行比较,可使用如Altschul et al.,Nucleic Acids Res.25(17),3389-3402(1997)所述的Gapped BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可使用各自程序(例如XBLAST和NBLAST)的缺省参数。参见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0708] CDR变异体的序列可通过大部分保守替代而与母抗体序列的CDR序列有所不同;例如,变异体中至少约35%、约50%或更多、约60%或更多、约70%或更多、约75%或更多、约80%或更多、约85%或更多、约90%或更多、约95%或更多(譬如约65-99%)的替代是保守氨基酸残基的替换。在本发明的语境中,保守替代定义为如下3个表的一个或多个中所表示的氨基酸种类中的替代:

[0709] 保守替代的氨基酸残基种类

[0710]	酸性残基	Asp和Glu
	碱性残基	Lys,Arg,和His
	亲水不带电荷残基	Ser,Thr,Asn,和Gln
	脂肪族不带电荷残基	Gly,Ala,Val,Leu,和Ile
	非极性不带电荷残基	Cys,Met,和Pro
	芳香族残基	Phe,Tyr,和Trp

[0711] 可选择的保守氨基酸残基替代的种类

[0712]	1	Ala (A)	Ser (S)	Thr (T)
	2	Asp (D)	Glu (E)	
	3	Asp (N)	Gln (Q)	
	4	Arg (R)	Lys (K)	
	5	Ile (I)	Leu (L)	Met (M)
	6	Phe (F)	Tyr (Y)	Trp (W)

[0713] 可选择的氨基酸残基的物理和功能分类

[0714]	含羟基基团的残基	S和T
	脂肪族残基	I,L,V,和M
	连接环烯烃基的残基	F,H,W,和Y
	疏水残基	A,C,F,G,H,I,L,M,R,T,V,W,和Y
	带负电荷残基	D和E
	极性残基	C,D,E,H,K,N,Q,R,S,和T
	正电残基	H,K,和R
	小残基	A,C,D,G,N,P,S,T,和V
	非常小的残基	A,G,和S
	涉及转角形成的残基	A,C,D,E,G,H,K,N,Q,R,S,P,和T
	柔性残基	Q,T,K,S,G,P,D,E,和R

[0715] 更保守的替代组包括:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸-苯丙氨酸-酪氨酸-赖氨酸-精氨酸-丙氨酸-缬氨酸和天冬氨酸-谷氨酸。其它组氨基酸也可通过如Creighton(1984) Proteins:Structure and Molecular Properties(2d Ed.1993),W.H.Freeman and

Company所述的原理来表示。

[0716] 在本发明的一个技术方案中,与实施例中药体的CDR相比较,在变异的CDR中,根据亲水/疏水性质和残基分子量/大小的保守性实质上也是保留的(例如,序列的分子量种类、亲水得分或二者保留了至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或更多(例如65-99%))。例如,保守残基的替代也可选择性地基于根据保守基团分子量的强或弱进行的替代,这在本领域是已知的。

[0717] 选择性地,也可通过相似性得分,例如通过使用BLAST程序(例如,可通过NCBI获得BLAST 2.2.8)所确定的那样来测定相似残基的保持能力。典型地,合适的变异体与母肽具有至少约45%,譬如至少约55%、至少约65%、至少约75%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或更高(例如约70-99%)的相似性。

[0718] 可通过选择与上述已定义的组中具有更低保守性的替代来产生功能上的实质改变。例如,可产生在改变的区域更显著地影响肽的结构非保守性替代,例如, α -螺旋或 β -折叠;在靶位点上分子的电荷或疏水性或侧链的位阻。通常期望在多肽的性质上产生最大改变的替代是那些,1) 亲水残基,例如丝氨酸或苏氨酸替换为(或被替换)疏水残基,例如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨酸;2) 半胱氨酸或脯氨酸替换为(或被替换)任何其它残基;3) 具有正电侧链的残基,例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸替换为(或被替换)负电残基,例如谷氨酸或天冬氨酸;或4) 具有空间位阻侧链的残基,例如苯丙氨酸替换为(或被替换)没有侧链的残基,例如甘氨酸。因此,这些及其它非保守替代可引入到其中功能/结构需要显著改变的肽变异体中,而且这种消除了结构/功能的保守性的改变是所期望的。

[0719] 产生替代变异体的简便途径是利用本领域中已知方法使用噬菌体而进行的亲和力成熟技术。为了鉴定候选的高变区域位点以进行修饰,可进行丙氨酸扫描突变方法,以鉴定对抗原结合具有显著贡献的高变区域。选择性或附加地,分析抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗原-抗体间的接触位点是有益的。这些接触的残基和临近的残基可能是替代的合适候选者。

[0720] 当通过高变区插入以生成变异抗体时,应该考虑已知抗体中所研究的高变区长度的典型范围。例如,对于轻链可变结构域的第一个高变区而言,可在保持实质相似性及所预期的合适大小的情况下,向母抗体V_L CDR1中引入插入,根据Kabat等,同上,典型地V_L CDR1具有总共约9-20(例如,约10-17)个残基。同样,典型地V_L CDR2具有总共长度约5-10个残基;典型地V_L CDR3有约7-20个残基长;典型地V_H CDR1有约10-15个残基长;典型地V_H CDR2有约15-20个残基长;典型地V_H CDR3有约6-30个残基长(例如,3-25残基)。使用Kabat中所述的比对和计数方法,典型地,在V_H CDR3中生成位于V_H区域中的插入,而且典型地,该插入靠近结构域的C末端,譬如,在母V_H CDR3的约残基97-102处(例如毗邻,或C末端邻接到,母V_H CDR3序列的100号残基)。可随机制备在其高变区有插入氨基酸残基的抗体变异体,特别地,其中母抗体针对靶抗原的起始结合亲和力可使随机产生的抗体变异体易于被筛选。例如,噬菌体展示提供了一种筛选这种随机变异体的方法。

[0721] 在设计、构建和/或评估CDR变异体时,应注意到可改变CDR区域,使其与抗原决定簇更好结合。典型地,可通过提供互补表面,可能包括可伸出到抗原蛋白表面的指状结构或其它固定抗原决定簇的抗体决定簇结构来操作抗体CDRs。如果抗原决定簇没有紧密固定,抗体将不会发挥最大亲和力。但对于抗原决定簇而言,在抗体决定簇结构中,通常是几个关

键残基来主要负责这种结合。因此,CDR序列在针对相同肽的抗体间,可在长度和组成上有显著差异。技术人员知道诸如酪氨酸残基(例如,位于 V_H CDR3序列中)这样的通常对于这种抗原决定簇结合具有显著贡献的特定残基典型地保留在CDR变异体中。

[0722] 与抗原和母抗体间的氨基酸接触相比较,通过引入一个或多个增加抗原中存在的一个或多个氨基酸残基与抗体中存在的一个或多个氨基酸残基间的接触或在能量方面有利的相互作用的氨基酸残基(通过替代或插入),则CDR区域的变异体也可增加抗原与抗体变异体间的氨基酸接触。目的氨基酸相互作用可从疏水键相互作用、范德华相互作用和离子相互作用中选择。

[0723] 本领域技术人员要注意在设计和筛选含本发明抗体的CDR变异体的CD38BP时的其它原则。

[0724] 对于作为实施例中的抗体的CDRs变异体的CDR变异体而言,特别是对抗CD38抗体或其片段中的变异CDR而言,典型地,应保留支持和/或定向CDR结构性环结构所需的残基;典型地,也不改变位于CDR结构性环约10埃(但选择性地只包括该区域具有约5平方埃或更大的水溶剂接触表面的残基)的残基或仅通过保守氨基酸残基替代进行改变;和/或典型地,氨基酸序列仅具有有限数量的插入和/或缺失(即便要),从而使CDR结构性类似环的结构可在变异体中保留(相关技术和相关原理的描述参见,例如Schiweck et al., J Mol Biol. 268(5), 934-51(1997)、Morea, Biophys Chem. 68(1-3), 9-16(1997)、Shirai et al., FEBS Lett. 399(1-2), 1-8(1996)、Shirai et al., FEBS Lett. 455(1-2), 188-97(1999)、Reckzo et al., Protein Eng. 8(4), 389-95(1995) and Eigenbrot et al., J Mol Biol. 229(4), 969-95(1993))。也参见WO 03/048185、WO 03/070747和WO 03/027246。

[0725] 其它技术也可用于产生变异的抗体,包括定向进化和其它变异体产生技术,例如在US20040009498, Marks et al., Methods Mol Biol. 248, 327-43(2004)、Azriei-Rosenfeld et al., J Mol Biol. 335(1), 177-92(2004)、Park et al., Biochem Biophys Res Commun. 275(2), 553-7(2000)、Kang et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 88(24), 11120-3(1991)、Zahnd et al., J Biol Chem. 279(18), 18870-7(2004)、Xu et al., Chem Biol. 9(8), 933-42(2002)、Border et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 97(20), 10701-5(2000)、Cramer et al., Nat Med. 2(1), 100-2(1996)中所述,更普遍地,例如在WO 03/048185中所述。

[0726] 产生的抗体变异体可用于任何合适的筛选技术,而且可筛选在一个或多个相关检测中具有合适的和所需的高级特征的抗体,用于进一步研究。

[0727] 如上所述的含CDR序列的CD38BPs在保留至少实质部分(至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多)具有如SEQ ID No:2中的 V_L 序列和如SEQ ID No:7中的 V_H 序列的抗体,和/或具有如SEQ ID No:12中的 V_L 序列和如SEQ ID No:17中的 V_H 序列的抗体,和/或具有如SEQ ID No:22中的 V_L 序列和如SEQ ID No:27中的 V_H 序列的抗体的亲和性/强度和/或特异性/选择性的情况下,可含有任何合适数目和组合的这种 V_L 和 V_H CDRs,但可选择性地,在诸如人患者中的免疫原性、对抗原决定簇的亲和性、增加的半衰期等这样的其它特性上会有所差别。在某些情况下,这种CD38BP可比母抗体具有更高的亲和性、选择性和/或特异性。在一个技术方案中,在本发明的CD38BP中可存在少于1个完整系列的 V_L CDRs和/或 V_H CDRs。在一个技术方案中,存在所有的 V_L CDRs和 V_H CDRs。

[0728] 与-003和-005及-024相比较,在本发明的变异CD38BPs中可改变或保留的抗体的其它功能性质的实施例有:

[0729] (1) 与CD38结合的高亲和性;

[0730] (2) 从CD38的低解离速率;

[0731] (3) 抑制或阻断CD38与CD38靶的结合;

[0732] (4) 清除表达CD38的T细胞或B细胞;

[0733] (5) 诱导高水平的CD55/59阴性或CD55/59阳性细胞的CDC;

[0734] (6) 与CD38结合后转位到脂质筏中;

[0735] (7) T细胞耐受性;

[0736] (8) 抑制表达CD38的T或B细胞的增殖;

[0737] (9) CD38内在化;

[0738] (10) 抑制或诱导CD38的酶活性;

[0739] (11) 抑制或诱导CD38诱导的信号转导;

[0740] (12) 诱导或抑制细胞因子的产生;

[0741] (13) 诱导或阻断T细胞或B细胞的分化;

[0742] (14) 诱导或从凋亡中恢复;

[0743] (15) 减轻或增加NK细胞的裂解诱导性;

[0744] (16) 诱导或抑制胰腺中 β 细胞中胰岛素的产生;

[0745] (17) 延长具有表达CD38的肿瘤细胞的患者的存活;和/或

[0746] (18) 当与适量的效应细胞混合时诱导CD38靶的ADCC。本发明也提供CD38BPs,其特征在于它们可与具有SEQ ID No:2的 V_L 序列和如SEQ ID No:7中的 V_H 序列的抗体(譬如抗体-003),或具有如SEQ ID No:12中的 V_L 序列和如SEQ ID No:17中的 V_H 序列的抗体(譬如抗体-005),或具有如SEQ ID No:22中的 V_L 序列和如SEQ ID No:27中的 V_H 序列的抗体(譬如抗体-024)竞争(竞争性抑制)或交叉竞争(即,相对部分抑制抗原决定簇的结合)结合CD38。

[0747] 例如,这种CD38BP可以是来源于抗体的Fab片段,该抗体可结合到与具有如SEQ ID No:2中的 V_L 序列和如SEQ ID No:7中的 V_H 序列的抗体,和/或具有如SEQ ID No:12中的 V_L 序列和如SEQ ID No:17中的 V_H 序列的抗体,和/或具有如SEQ ID No:22中的 V_L 序列和如SEQ ID No:27中的 V_H 序列的抗体相结合的抗原决定簇相同或重叠的抗原决定簇上。这种Fab片段由于其与mAb分子相比较具有较小的尺寸,因此不能显著性地与上述抗体竞争结合到CD38时,虽然其所来源的抗体可以做到这一点。然而,这种CD38BP在靠近CD38区域的类似定位中也有作用(例如,在免疫连接物的CD38BP中的细胞毒素、放射性核苷等的定位)。所以,这种CD38BPs可用于本发明的方法中,因此也提供在本发明中。

[0748] 可通过任何合适的技术来测定两个或多个CD38BPs竞争结合到CD38或CD38的一部分。在一个技术方案中,例如,竞争作用如实施例7、8和9中所述进行测定。

[0749] 本发明语境中的竞争作用是指特定分子与特定结合伴侣之间的结合倾向性在存在另一种可结合到结合伴侣的分子时有任何可检测的显著降低。典型地,竞争是指CD38BP与以下物质的结合在存在另一种CD38BP时,使用足量的两种或多种竞争性CD38BPs和CD38BPs分子通过例如ELISA分析或FACS分析(如实施例部分所述)进行测定,至少约有10%的降低,譬如至少约15%、或至少约20%的降低

[0750] (a) CD38形式(例如,“加工过的”、“成熟的”、“未加工的”、“没加工的”或“不成熟的”CD38);

[0751] (b) 游离CD38形式(例如,通过体内加工产生的CD38片段);

[0752] (c) 由诸如CD31这样的与CD38相关的另一种肽和CD38组成的异源二肽;

[0753] (d) CD38和诸如cAMP、NAD⁺和/或cADPR这样的一种或多种底物组成的复合物;

[0754] (e) CD38与诸如CD31这样的可溶性配体组成的二聚体化的,相关联的和/或加工过的二聚体;或

[0755] (f) CD38的一部分。对于多于一种的CD38和/或CD38一部分,例如,CD38特定区域的抗体结合性质在其片段中仍有保留,竞争也存在于CD38BPs间,在这种情况下,位于多个检测片段上的完全呈递的线性抗原决定簇或构象抗原决定簇,与在CD38中一样,呈递在足够大的CD38片段上。

[0756] 典型地,检测竞争性涉及使用第一个量的第一分子;第二个量的第二分子和第三个量的第三分子(或通过结合研究测定的标准,它与以第一和第二分子作为实际同期数据的替代数据的新结合数据相比较更为合理)来评估相对抑制的结合,其中第一、第二和第三个量都是足够的,可以比较,从而给出所讨论的分子与其它存在的分子关于选择性和/特异性方面的信息。第一、第二和第三个量可根据CD38BP的性质和所讨论的潜在靶标有所不同。例如,对于ELISA检验而言,与实施例部分所述类似,需要约5-50 μ g(例如,约10-50 μ g、约20-50 μ g、约5-20 μ g、约10-20 μ g等)CD38BP和/或CD38靶标检验是否存在竞争。条件也应该适于结合。典型地,生理或接近生理条件(例如,温度约20-40 $^{\circ}$ C,pH约7-8等)适于CD38BP:CD38结合。

[0757] 通常,竞争是以通过ELISA和/或FACS分析测定,相对抑制显著高于约5%为特征。需要设定较高的相对抑制的门槛作为特定语境中关于竞争的适当水平的标准/测定值(例如,当竞争分析是用于选择或筛选通过阻断另一种与CD38结合的肽或分子(例如诸如CD31这样的,也称为CD31抗原的CD38天然结合伴侣、EndoCAM、GPIIA1、PECAM-1、血小板/内皮细胞黏附分子或天然存在的抗CD38抗体)的结合功能所设计的新抗体时)。因此,例如,可以设定竞争的标准,其中在认为抗体具有充分竞争性之前,可检测至少约10%的相对抑制,可检测至少约15%的相对抑制,或者可检测至少约20%的相对抑制。在其中属于竞争性抗体的抗原决定簇紧邻抗原的情况下,竞争可为高于40%的CD38结合的相对抑制(例如,至少约45%的抑制、譬如约50%的抑制、例如至少约55%的抑制、譬如约60%的抑制、例如至少约65%的抑制、譬如约70%的抑制、例如至少约75%的抑制、譬如约80%的抑制、例如至少约85%的抑制、譬如约90%的抑制、例如至少约95%的抑制或更高水平的相对抑制)。

[0758] 竞争可被认为是某分子和两种潜在结合伴侣之间交叉反应性的另一面。在某些技术方案中,本发明的CD38BP特异地结合到CD38的一个或多个残基或者区域上,但也不与其它肽、肽区域或分子发生交叉反应,例如,本发明提供一种不与诸如BST-1(骨髓基质细胞抗原-1)和也称为CD157的Mo5这样的与CD38同源的蛋白发生交叉反应的抗CD38抗体;或者不与诸如参与多发性骨髓瘤的组织这样的正常组织中CD38发生交叉反应的抗CD38抗体。典型地,没有交叉反应性是指当使用足够量的分子在合适的检测条件下通过ELISA和/或FACS分析进行评估时,在分子间的相对竞争抑制性低于5%。

[0759] 在一个技术方案中,本发明提供可与诸如抗体-003这样的具有如SEQ ID No:2中

的V_L序列和如SEQ ID No:7中的V_H序列的抗体竞争结合CD38或其部分的CD38BP。

[0760] 在一个技术方案中,本发明提供可与诸如抗体-005这样的具有如SEQ ID No:12中的V_L序列和如SEQ ID No:17中的V_H序列的抗体竞争结合CD38或其部分的CD38BP。

[0761] 在一个技术方案中,本发明提供可与诸如抗体-024这样的具有如SEQ ID No:22中的V_L序列和如SEQ ID No:27中的V_H序列的抗体竞争结合CD38或其部分的CD38BP。

[0762] 如本文其它地方所述,除非特别说明或与内容明显矛盾,涉及CD38BP与CD38的结合是指在任何合适情况下的结合,例如在存在CD38结构的构象环境中;或在线性抗原决定簇环境中。显然,在这种环境的有限子集中的结合是本发明的提供的任何CD38BP的一个重要特性。

[0763] 可在例如Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc, and Wiley InterScience N.Y., (1992, 1993), and Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983)) 中找到其它通过竞争抑制来测定CD38BP特异性的方法。

[0764] 人CD38含有多个不同的抗原决定簇,它们包括(1)包括在人CD38单个肽链中的肽抗原决定簇;(2)由特定链上一个或多个非连续氨基酸和/或在空间上连续,但在不同肽链上(典型地,其中链的各自氨基酸序列在人CD38多肽序列中是不连续的)的氨基酸组成的构象抗原决定簇;(3)由诸如碳水化合物基团这样的全部或部分共价连接到人CD38的分子结构所组成的翻译后抗原决定簇;或(4) (1) - (3)的组合。

[0765] 本发明中的抗原决定簇包括任何可特异结合到免疫球蛋白上的肽或肽衍生的决定簇。抗原决定簇可在任何位置(对CD38线性序列而言)、方向(对折叠的CD38或其片段而言)包含任何合适数目的氨基酸、氨基酸组合物(因此,至少部分带电)。

[0766] 因此,例如,抗原决定簇可在CD38一级序列的一个或多个连续或不连续位置上含有约3-10个氨基酸,典型地为3-8个氨基酸(例如,抗原决定簇可实质上由分布在CD38中1、2、3、4或5个非连续位置上的2、3、4、5、6、7或8个氨基酸残基组成)。选择性地,例如,可认为抗原决定簇被CD38上约5-40个连续的氨基酸残基的区域所限定(例如,约7-30氨基酸残基、约5-20氨基酸残基或约3-15氨基酸残基)(单独或与相邻的CD38结构域的一部分组合)。在某些抗原决定簇中,可能是只有一个氨基酸残基或仅有几个氨基酸残基对CDR或CDR(s)识别是重要的(因此,对CD38BP:CD38抗原亲和性和强度是最重要的)。所以,可基于一个或多个这种关键残基来描述抗原决定簇,同时意识到其它残基也对抗原决定簇具有较小的贡献。在通过氨基酸区域来定义抗原决定簇的情况中,在区域中的一个或多个氨基酸对于抗体结合仅有很小的贡献,甚至没有贡献,因此这种残基可用合适的不同残基来替代,并不会导致抗原决定簇对至少某些特异针对它的CD38BPs出现“丢失”。

[0767] 在一个技术方案中,本发明提供诸如抗CD38抗体这样的CD38BP,它可特异结合到CD38抗原决定簇上,该抗原决定簇也可以被具有如SEQ ID No:2中的V_L序列和如SEQ ID No:7中的V_H序列的抗体(譬如抗体-003)、或具有如SEQ ID No:12中的V_L序列和如SEQ ID No:17中的V_H序列的抗体(譬如抗体-005)、或具有如SEQ ID No:22中的V_L序列和如SEQ ID No:27中的V_H序列的抗体(譬如抗体-024)特异结合。具有一个或多个不同于具有如SEQ ID No:2中的V_L序列和如SEQ ID No:7中的V_H序列的抗体的CDRs、或具有如SEQ ID No:12中的V_L

序列和如SEQ ID No:17中的V_H序列的抗体的CDRs、或具有如SEQ ID No:22中的V_L序列和如SEQ ID No:27中的V_H序列的抗体的CDRs的CD38BPs可特异针对分别与作为具有如SEQ ID No:2中的V_L序列和如SEQ ID No:7中的V_H序列的抗体、或具有如SEQ ID No:12中的V_L序列和如SEQ ID No:17中的V_H序列的抗体、或具有如SEQ ID No:22中的V_L序列和如SEQ ID No:27中的V_H序列的抗体相同的抗原决定簇。在某些情况下,所述CD38BP可识别或比分别具有如SEQ ID No:2中的V_L序列和如SEQ ID No:7中的V_H序列的抗体、或具有如SEQ ID No:12中的V_L序列和如SEQ ID No:17中的V_H序列的抗体、或具有如SEQ ID No:22中的V_L序列和如SEQ ID No:27中的V_H序列的抗体更特异/选择性地针对抗原决定簇的特定结构或区域。

[0768] 结合了具有如SEQ ID No:2中的V_L序列和如SEQ ID No:7中的V_H序列的抗体(譬如抗体-003)、或具有如SEQ ID No:12中的V_L序列和如SEQ ID No:17中的V_H序列的抗体(譬如抗体-005)、或具有如SEQ ID No:22中的V_L序列和如SEQ ID No:27中的V_H序列的抗体(譬如抗体-024)的CD38抗原决定簇可通过标准图谱和描述技术来鉴定,可通过合适的技术来鉴定进一步的细节,技术人员可使用这种技术的多种例子。通常这些技术也可用于鉴定和/或描述针对CD38BPs的抗原决定簇。对这种图谱/描述方法的实施例而言,针对抗CD38抗体的抗原决定簇可通过抗原决定簇的“足迹”对CD38蛋白中暴露的氨基/羧基进行化学修饰的方法来测定。这种足迹技术的一个具体实施例是使用HXMS(通过质谱检测的氢-氘交换),其中发生了受体和配体蛋白氨基质子的氢/氘交换、结合和回复交换,其中参与蛋白结合的骨架氨基基团在回复交换中受到保护,因此仍为含氘的。在该处通过肽裂解、快速混合高效液相色谱分离和/或电喷雾电离质谱来鉴定相关区域。参见例如Ehring H, *Analytical Biochemistry*, 267 (2) 252-259 (1999) and/or Engen, J.R. and Smith, D.L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A。另一个合适的抗原决定簇鉴定技术的实施例是核磁共振抗原决定簇图谱(NMR),其中典型地,对游离抗原和与诸如抗体这样的抗原结合肽复合在一起的抗原的二维NMR图谱中的信号位置进行比较。典型地,抗原选择性地用同位素¹⁵N标记,这样在NMR图谱上仅有与抗原相关的信号是可见的,而结合了肽的抗原没有信号。典型地,与游离抗原的图谱相比较,来源于氨基酸并参与抗原结合肽相互作用的抗原信号在复合物的图谱有位移,参与结合的氨基酸可被鉴定出来。参见例如Ernst Schering Res Found Workshop. (44), 149-67 (2004)、Huang et al., *Journal of Molecular Biology* 281 (1), 61-67 (1998) and Saito and Patterson, *Methods*. 9 (3), 516-24 (1996)。

[0769] 也可用质谱方法进行抗原决定簇绘图/描述。参见,例如Downward, J *Mass Spectrom.* 35 (4), 493-503 (2000) and Kiselar and Downard, *Anal Chem.* 71. (9), 1792-801 (1999)。

[0770] 蛋白酶消化技术也可用于抗原决定簇绘图和鉴定。可通过蛋白酶消化测定抗原决定簇相关的区域/序列,例如,通过胰蛋白酶以与CD38约1:50的比例,在37°C, pH7-8, 过夜(0/N)消化,然后通过质谱(MS)分析进行肽鉴定。然后可通过比较进行胰蛋白酶消化的样品和CD38BP温育后,再进行例如胰蛋白酶消化的样品,可鉴定出在胰蛋白酶切割中被CD38BP保护的肽(从而表明结合伴侣的足迹)。其它的胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶等酶也可或选择性地用作同样的抗原决定簇描述方法。在这些检测中,与具有如SEQ ID No:2中的V_L序列和如SEQ ID No:7中的V_H序列的抗体(譬如抗体-003)、或具有如SEQ ID No:12中的V_L序列和如

SEQ ID No:17中的V_H序列的抗体(譬如抗体-005)、或具有如SEQ ID No:22中的V_L序列和如SEQ ID No:27中的V_H序列的抗体(譬如抗体-024)具有显著相同的结果的CD38BP可被认为是与分别具有如SEQ ID No:2中的V_L序列和如SEQ ID No:7中的V_H序列的抗体(譬如抗体-003)、或具有如SEQ ID No:12中的V_L序列和如SEQ ID No:17中的V_H序列的抗体(譬如抗体-005)、或具有如SEQ ID No:22中的V_L序列和如SEQ ID No:27中的V_H序列的抗体(譬如抗体-024)结合相同抗原决定簇的抗体。例如,参见Manca, Ann 1st Super Sanita.27(1),15-9(1991)讨论的类似技术。通过其中一个抗体是生物素化的两个抗体与CD38竞争结合而获得的抗原决定簇图谱是鉴定相关抗原决定簇区域的另一种方法。

[0771] 通过基于PEPSCAN的酶联免疫方法来检测抗体与线状或环状CD38肽的结合是另一种鉴定相关抗原决定簇区域的方法,例如,参见Slootstra-JW et al. Mol-Divers.1,87-96(1996)。定点突变是鉴定相关抗原决定簇区域的另一种方法,参见,例如Polyak and Deans, Blood 99,3956-3962(2002)。

[0772] 各种噬菌体展示技术也可用于鉴定抗原决定簇。参见,例如Wang and Yu, Curr Drug Targets.5(1),1-15(2004)、Burton, Immunotechnology.1(2),87-94(1995Aug), Cortese et al., Immunotechnology.1(2),87-94(1995)和Irving et al., Curr Opin Chem Biol.5(3),314-24(2001)。一致的抗原决定簇也可通过修改的噬菌体展示相关的技术进行鉴定(参见<http://www.cs.montana.edu/~mumey/papers/jcb03.pdf>)。

[0773] 其它可能进行抗原决定簇绘图的方法包括晶体技术、X-射线衍射技术(譬如由Poljak和其它人在1970s-1980s开发的X-射线衍射/序列研究技)、和多中心肽合成的应用。诸如序列分析和三维结构分析等基于计算机的方法也可用于鉴定抗原决定簇。例如,可通过CD38的结构和进入的单个单克隆抗体Fab片段的结构的分子建模来测定抗原决定簇。这些和其它绘图方法在Epitope Mapping A Practical Approach(Westwood and Hay Eds.) 2001 Oxford University Press中进行了讨论。

[0774] 在一个技术方案中,本发明提供实质具有一个或多个选自具有如SEQ ID No:2中的V_L序列和如SEQ ID No:7中的V_H序列的抗体(譬如抗体-003)、或具有如SEQ ID No:12中的V_L序列和如SEQ ID No:17中的V_H序列的抗体(譬如抗体-005)、或具有如SEQ ID No:22中的V_L序列和如SEQ ID No:27中的V_H序列的抗体(譬如抗体-024)的mAbs的相同的特异CD38结合特征的CD38BP。

[0775] 绘图研究已表明,几种增强针对人CD38的单克隆抗体是与CD38的C末端区域的抗原决定簇(220-296)结合的(Hoshino et al. and Ferrero et al.)。在人和猕猴CD38序列间在该区域有3个氨基酸差异:在人中的T237、Q272和S274对应于猕猴中的A238、R273和F275。-005不与猕猴组织结合(如实施例10和11所示)。人和猴CD38序列存在有限数目的氨基酸差异,例如蛋白的羧基末端部分,例如以下人和猕猴CD38序列间的3个氨基酸差异,在人CD38s中的T237、Q272和S274对应于猕猴的猴CD38中的A238、R273和F275(比较SEQ ID No.21和SEQ ID No.22)。-005与突变的其中SEQ ID No:31的272位谷氨酰胺残基被精氨酸残基替代(Q272R)人CD38蛋白、或突变的其中SEQ ID No:31的274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代(S274F)(如实施例17所示)人CD38蛋白的结合程度与其和野生型人CD38的结合程度不同。特别地,与-005的结合可被S274F位置的氨基酸替代所消除。

[0776] 因此,本发明提供与人CD38(SEQ ID No:31)结合的肽,它与其中272位谷氨酰胺残

基被精氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:33) 的结合程度不同于与其与人CD38 (SEQ ID No:31) 的结合程度。

[0777] 本发明也提供与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的肽,它与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ IDNo:34) 的结合程度不同于与其与人CD38 (SEQ ID No:31) 的结合程度。

[0778] 术语“相同程度”应理解为,肽与突变人CD38的结合显著低于肽与野生型人CD38的结合。肽与CD38分子(野生型和突变型)的结合可通过各种本领域技术人员熟知的方法来测定与突变型的结合是否“显著低于”与野生型的结合。本领域技术人员可使用各种测定肽与另一种肽的结合的不同技术,例如ELISA、放射性免疫检测、BIAcore或流式细胞仪。

[0779] 一个测定结合的方法是通过测定肽与突变蛋白的结合的 EC_{50} ,然后比较所获得的数值。另一种测定结合的方法是通过检测在饱和浓度结合的数量(例如,结合信号的平台),或通过诸如BIAcore来测定动力学速率常数 k_{on} 和 k_{off} 。

[0780] 在一个技术方案中,所述肽与CD38蛋白(突变型或野生型)的结合通过如实施例17所述的ELISA来测定。

[0781] 在一个技术方案中,肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的50%。在一个技术方案中,肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的10%。在一个技术方案中,肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的5%。在一个技术方案中,肽与其中274位丝氨酸残基被苯丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:34) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的1%。

[0782] 在一个技术方案中,肽与其中272位谷氨酰胺残基被精氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:33) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的50%。在一个技术方案中,肽与其中272位谷氨酰胺残基被精氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:33) 结合的 EC_{50} 不到该肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的10%。

[0783] 在一个技术方案中,肽与其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的、突变的人CD38 (SEQ ID No:32) 结合,结合程度与其和人CD38 (SEQ ID No:31) 结合相同。在一个技术方案中,肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ IDNo:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的75%。在一个技术方案中,肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的85%。在一个技术方案中,肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的90%。在一个技术方案中,肽与突变的其中237位苏氨酸残基被丙氨酸残基替代的人CD38结合 (SEQ ID No:32) 的 EC_{50} 大于肽与人CD38 (SEQ ID No:31) 结合的 EC_{50} 的95%。

[0784] 为了在CD38中鉴定更特异的可能的抗原决定簇区域,可使用各种预测的分析方法。在第一个分析方法中,可分析CD38的(1)高度疏水区域(使用Kyte-Doolittle方法);(2)通过原外凸区指数方法测定抗原性;(3)通过Parker方法测定抗原性;(4)通过Hopp/Woods

方法测定抗原性;及(5)通过Goldman,Engleman,and Steitz方法测定亲水性。可根据具有一个或多个这些特性来选择长10-40个氨基酸的序列。该方法的原则是通用的同一性是:许多理想的B细胞抗原决定簇是长8-10个氨基酸的亲水的、表面定向的及柔性序列。

[0785] 本发明提供针对以这种方式鉴定的CD38的CD38区域的CD38BPs。另外,这些序列的末端可与预测的通过此处所述其它分析获得的抗原决定簇的区域,从而提供其它的特定的可能含抗原决定簇的区域。可进行其它类似的比较,从而提供其它的可能的抗原决定簇区域,其中与这些抗原决定簇区域结合的CD38BPs可认为是本发明的另一个特征。

[0786] 在一个技术方案中,本发明的CD38BP是抗体。本发明提供的CD38结合免疫球蛋白分子的非限定的例子包括(a)含以下组成的有完全功能的免疫球蛋白分子:(i)两个含具有人B细胞表面抗原特异性的可变区和人恒定区的相同的嵌合重链,及(ii)两个相同的全(即,非嵌合)人轻链;(b)含以下组成的有完全功能的免疫球蛋白分子(i)两个含如所述的可变区和人恒定区的嵌合重链,及(ii)两个相同的全(即,非嵌合)非人轻链;(c)单价抗体,即,含以下组成的有完全功能的免疫球蛋白分子(i)两个含如所述的可变区和人恒定区的嵌合重链,就(ii)两个不同的轻链,其中只有一个具有与重链可变区相同的特异性。得到的抗体分子仅与其一个末端结合,而不能进行二价结合。如示例,本发明提供的免疫球蛋白相关的肽可包括以下组成:(a)整个免疫球蛋白分子;(b)scFv;(c)单克隆抗体;(d)人抗体;(e)嵌合抗体;(f)人源化抗体;(g)Fab片段;(h)Fab₁片段;(i)F(ab')₂片段;(j)Fv分子;及(k)二硫键连接的Fv分子。

[0787] 在一个技术方案中,本发明的CD38BP是多克隆抗体。在一个技术方案中,本发明的CD38BP是单克隆抗体。在另一个技术方案中,本发明的CD38BP是人单克隆抗体。在另一个技术方案中,本发明的CD38BP是人源化抗体。在另一个技术方案中,本发明的CD38BP是嵌合抗体。在另一个技术方案中,本发明的CD38BP是完全来源于不同于人的哺乳动物物种的单克隆抗体。在另一个技术方案中,本发明的CD38BP是完全的鼠单克隆抗体。

[0788] 单克隆抗体是指含具有相同结构和特异性的同源抗体群的组分。典型地,单克隆抗体是从实质同源的抗体,即含除了存在微量可能的天然发生的突变外,相同的群组成的单个抗体,获得的抗体。单克隆抗体是高度特异的,每个单克隆抗体典型地针对单个抗原决定簇,相反,多克隆抗体制品典型地包括针对不同抗原决定簇的不同抗体。抗体是单克隆的并不表示需要通过任何特定的方法来产生抗体。例如,本发明的单克隆抗体可通过Kohler et al.,Nature 256,495(1975)描述的杂交方法来产生,或可通过重组DNA方法来产生。单克隆抗体也可使用,例如Clackson et al.,Nature 352,624-628(1991)和Marks et al.,J.Mol.Biol.222.581-597(1991)所述的技术,从噬菌体抗体文库中分离。

[0789] 单克隆抗体可从任何合适的来源获得。因此,例如,单克隆抗体可从用目的抗原,例如,以在表面表达抗原的细胞形式,或者编码目的抗原的核酸形式,所免疫的鼠脾B细胞所制备的杂交瘤中获得。单克隆抗体也可从来源于免疫的人或诸如鼠、狗、灵长类等非人哺乳动物中的抗体表达细胞的杂交瘤中获得。

[0790] 选择性地,可在其它表达系统,包括原核细胞,譬如诸如大肠杆菌这样的微生物、藻类和昆虫细胞中表达克隆的抗体基因,用于产生单链Fv抗体。另外,抗体可在诸如羊和兔奶或鸡蛋这样的转基因非人动物,或在转基因植物中进行生产。残基,例如Verma,R.,et al.,J.Immunol.Meth.216,165-181(1998);Pollock,et al.,J.Immunol.Meth.231,147-

157(1999);and Fischer,R.,et al.,Biol.Chem.380,825-839(1999)。

[0791] 在一个技术方案中,可使用携带部分人免疫系统,而不是鼠系统的转基因或转染色体小鼠来产生直接针对CD38的人单克隆抗体。这种转基因和转染色体小鼠分别包括此处所指的HuMAb鼠和KM鼠,此处统称为“转基因鼠”。在这种鼠中产生的人单克隆抗体简称为HuMab。

[0792] HuMAb小鼠含编码未重排人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白具有微座位与内源 μ 个 κ 链基因座位失活的目的突变(Lonberg,N.et al.,Nature 368,856-859(1994))。因此,小鼠在免疫应答时表现出鼠IgM或 κ 的降低表达,所导入的人重链和轻链转基因经过类别转换和体细胞突变生成高亲和性的人IgG, κ 单克隆抗体(Lonberg,N.et al.(1994)、supra;reviewed in Lonberg,N.Handbook of Experimental Pharmacology 113,49-101(1994),Lonberg,N.and Huszar,D.,Intern.Rev.Immunol.Vol.1365-93(1995) and Harding,F.and Lonberg,N.Ann.N.Y.Acad.Sci 764536-546(1995))。在Taylor,L.et al.,Nucleic Acids Research 20,6287-6295(1992)、Chen,J.et al.,International Immunology 5,647-656(1993)、Tuailon et al.,J.Immunol.152,2912-2920(1994)、Taylor,L.et al.,International Immunology 6,579-591(1994)、Fishwild,D.et al.,Nature Biotechnology 14,845-851(1996)中详细描述了HuMAb小鼠的制备。也参见,US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,789,650、US 5,877,397、US 5,661,016、US 5,814,318、US 5,874,299、US 5,770,429、US 5,545,807、WO 98/24884、WO 94/25585、WO 93/1227、WO 92/22645、WO 92/03918和WO 01/09187。

[0793] HCo7小鼠在其内源轻链(κ)基因中具有JKD破坏(如Chen et al.,EMBO J.12,821-830(1993)所述),在其内源重链基因中有CMD破坏(如WO 01/14424中实施例1所述)。KCo5人 κ 轻链转基因如Fishwild et al.,Nature Biotechnology 14,845-851(1996))所述,HCo7人重链转基因(如US 5,770,429所述)。

[0794] HCo12小鼠在其内源轻链(κ)基因中具有JKD破坏(如Chen et al.,EMBO J.12,821-830(1993)所述),在其内源重链基因中有CMD破坏(如WO 01/14424中实施例1所述)。KCo5人 κ 轻链转基因如Fishwild et al.,Nature Biotechnology 14,845-851(1996))所述,HCo12人重链转基因(如WO 01/14424中实施例2所述)。在KM小鼠株中,已按照Chen et al.,EMBO J.12,811-820(1993)所述对小鼠内源 κ 轻链基因进行纯合破坏,并按WO 01/09187的实施例1中所述对内源小鼠重链基因进行纯合破坏。该小鼠株携带人 κ 轻链转基因KCo5,如Fishwild et al.,Nature Biotechnology 14,845-851(1996)所述。该小鼠株也携带由染色体14片段hCF(SC20)组成的人重链转染色体,如WO 02/43478所述。

[0795] KM小鼠含人重链转染色体和人 κ 轻链转基因。在KM鼠中,内源鼠重链和轻链基因也被破坏,这样对鼠免疫可产生人免疫球蛋白,而不是鼠免疫球蛋白。在WO 02/43478中详细描述了KM小鼠的构建及在产生人免疫球蛋白方面的用途。

[0796] 根据众所周知的技术,来自这些转基因小鼠的脾细胞可用于产生能分泌人单克隆抗体的杂交瘤。这些转基因哺乳动物、含编码可操作的核酸序列用于表达CD38BP的哺乳动物、用一个或单个编码CD38核酸序列稳定转染的哺乳动物等是本发明的另外的特征。

[0797] 本发明的人单克隆或多克隆抗体,或本发明来源于其它物种的抗体也可通过另一种非人动物或植物后代经转基因方式产生,该非人哺乳动物或植物是用目的免疫球蛋白重

链和轻链序列进行转基因的,并能以可回收的形式产生抗体。与哺乳动物中转基因产生相关,抗体可以羊、牛或其它哺乳动物的乳汁的可回收形式来生产。参见,例如,US 5,827,690、US 5,756,687、US 5,750,172和US 5,741,957。

[0798] 此外,本发明的人抗体或本发明来源于其它物种的抗体可使用本领域周知的工艺,通过展示类技术来生产,包括但不限于,噬菌体展示、逆转录病毒展示、核糖体展示及其它技术,所获得的分子可用于诸如亲和力成熟这样的另外的成熟,这类技术在本领域是周知的(参见,例如Hoogenboom et al.,*J.Mol.Biol.*227.381(1991)(噬菌体展示),Vaughan et al.,*Nature Biotech* 14.309(1996)(噬菌体展示),Hanes and Plutchau,*PNAS USA* 94,4937-4942(1997)(核糖体展示),Parmley and Smith,*Gene* 73,305-318(1988)(噬菌体展示),Scott *TIBS*17,241-245(1992)、Cwirla et al.,*PNAS USA* 87,6378-6382(1990)、Russet et al.,*Nucl.Acids Research* 21,1081-1085(1993)、Hoogenboom et al.,*Immunol.Reviews* 130,43-68(1992)、Chiswell and McCafferty *TIBTECH* 10,80-84(1992)、and US 5,733,743)。如果展示技术用于产生非人抗体,则这类抗体可被人源化,例如本文其它部分所述。

[0799] 通过将人抗体的恒定结构域与非人物种的可变结构域相融合的方式可产生本发明的人源化单克隆抗体。如何制备人源化单克隆抗体的实施例可在例如US 6,054,297、US 5,886,152和US 5,877,293中找到。人源化抗体被设计为与人免疫球蛋白比动物来源的单克隆抗体具有更高的同源性。来自“输入”(动物的)可变结构域的非人氨基酸残基典型地被转染到人“骨架”中。实质上,人源化可按照Winter及其同事(Jones et al.,*Nature* 321,522-525(1986)、Riechmann et al.,*Nature* 332,323-327(1988)、Verhoeyen et al.,*Science* 239,1534-1536(1988))的方法,通过将鼠补体决定区(“CDRs”)或CDR序列替换为人抗体的相应序列的方式来进行。因此,在这种“人源化”抗体中,人可变结构域的CDR部分已被非人物种的相应部分替代。这样,人源化抗体是典型的人抗体,其中某些CDR残基和某些可能的框架残基被啮齿类抗体的相似部位所替代。用于制备人源化抗体的人重链和轻链可变结构域的选择对降低抗原性至关重要。根据所谓的“最适”方法,筛选针对已知的人可变结构域序列完整文库的啮齿类抗体可变结构域的序列。然后,与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架(FR)(Sims et al.,*J.Immunol.*,151,2296(1993)、Chothia et al.,*J.Mol.Biol.*196,901(1987))。另一种方法使用了来源于特定轻链或重链亚组中所有人抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可用于几个不同的人源化抗体(Carter et al.,*PNAS USA* 89,4285(1992)、Presta et al.,*J.Immunol.*151,2623(1993))。

[0800] 典型地,人源化抗体保持对抗原高亲和性及其它有利的生物学特性也很重要。为了达到这个目的,可使用母序列和人源化序列的三维模型通过分析母序列及多种与之有关的人源化产物的过程来制备人源化抗体。通常三维免疫球蛋白模型是可获得,本领域技术人员对此比较了解。已有可示例并展现所选的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序。考察这些展示的结构可分析特定残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即,对能影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力进行分析。尽管CDR残基直接并基本上影响抗原结合,但通过这种方式,可从受体选择并组合FR残基,并输入序列,这样可使所需的诸如增加对靶抗原亲和性这样的抗体特征最大化。

[0801] 可使用任何合适的技术对鼠抗体或来自其它物种的抗体使其人源化或灵长类化,

多种合适的技术已是本领域周知的(参见,例如Winter and Harris Immunol Today 14, 43-46(1993)and Wright et al., Crit.Reviews in Immunol.125-168(1992))。目的抗体可通过重组DNA技术进行加工,以用相应的人序列来替代 C_H1 、 C_H2 、 C_H3 、铰链结构域和/或框架结构域(参见WO 92/02190和US 5,530,101、US 5,585,089、US 5,693,761、US 5,693,792、US 5,714,350和US 5,777,085)。

[0802] 也可按照Winter及其同事的方法(Jones et al., Nature 321,522-525(1986)、Riechmann et al., Nature 332,323-327(1988)、Verhoeyen et al., Science 239,1534-1536(1988)),通过将啮齿类CDRs和CDR序列替换为相应的人抗体序列的方式来对抗体进行人源化。因此,这种“人源化”抗体在某种意义上是嵌合抗体(US 4,816,567),其中实质上少于完整的人可变区结构域已被非人物种的相应序列所替代。实际上,典型地,人源化抗体是人抗体,其中某些CDR残基及某些可能的FR残基被来自啮齿类抗体中同源位点的残基所替代。

[0803] 此外,用于构建嵌合免疫球蛋白基因的Ig cDNA的用途在本领域是已知的(参见,例如Liu et al., PNAS USA 84,3439(1987)and J.Immunol.139,3521(1987))。从杂交瘤或其它产生抗体的细胞中分离mRNA,用于产生cDNA:目的cDNA可通过使用特异引物的聚合酶链反应来扩增(US 4,683,195和US 4,683,202)。选择性地,制备并筛选文库,以分离目的序列。然后将编码可变区的DNA序列与人恒定区序列融合。人恒定区(及可变区)序列可在Kabat et al., (1991)中找到,最近的相关数据可在<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/GeneralInfo.html>获得。典型地,通过诸如补体结合或抗体依赖的细胞毒素作用活性这样的所需的效应物功能来指导同型体的选择。示例的同型体有IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。可使用人轻链恒定区 κ 或 λ 的其中之一。然后可通过常规方法来表达嵌合的人源化抗体。

[0804] 就多聚体而言,本发明的CD38BPs可以是任何合适的形式。抗CD38抗体及抗体片段如果不是更高的多聚体形式,例如与IgM抗体相联的抗体,则至少是异源三聚体。在其它技术方案中,CD38BP可以二聚体或单体形式存在。例如,本发明的单体CD38BPs可被任何合适的技术所修饰,以形成多聚体肽组分。

[0805] 如果需要,本发明的抗CD38抗体的种类可通过已知方法进行转换。例如,最初为IgM的本发明的抗体可经类别转换为本发明的IgG抗体。此外,类别转换技术可用于将一种IgG亚类转换为另一种,例如,从IgG1转换为IgG2。因此,本发明中抗体的效应物功能可通过同型体转换改变为,例如,用于多种治疗用途的IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM抗体。

[0806] 在一个技术方案中,本发明的抗体是IgG1抗体,例如IgG1, κ 或IgG1, λ 同型体。在另一个技术方案中,本发明的抗体是IgG3抗体,例如IgG3, κ 或IgG3, λ 同型体。在另一个技术方案中,本发明的抗体是IgG4抗体,例如IgG4, κ 或IgG4, λ 同型体。在另一个技术方案中,本发明的抗体是IgA1或IgA2抗体。在另一个技术方案中,本发明的抗体是IgM抗体。

[0807] 可从诸如scFv噬菌体展示文库这样的重组组合抗体文库中获得抗CD38抗体,它是用来源于人淋巴细胞的mRNA制备的人 V_L 和 V_H cDNAs制成的。制备和筛选这类文库的方法在本领域是已知的。已有多种商品化的试剂盒用于生成噬菌体展示文库。还有其它的用于生成并筛选抗体展示文库的方法和试剂(参见,例如US 5,223,409、WO 92/18619、WO 91/

17271、WO 92/20791、WO 92/15679、WO 93/01288、WO 92/01047、WO 92/09690, Fuchs et al., Bio/Technology 9, 1370-1372 (1991), Hay et al., Hum. Antibod. Hybridomas 3, 81-85 (1992), Huse et al., Science 246, 1275-1281 (1989), McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990), Griffiths et al., EMBO J 12, 725-734 (1993), Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992), Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991), Gram et al., PNAS USA 89, 3576-3580 (1992), Garrad et al., Bio/Technology 9, 1373-1377 (1991), Hoogenboom et al., Nuc Acid Res 19, 4133-4137 (1991) 和 Barbas et al., PNAS USA 88, 7978-7982 (1991)。可使用任何适当的方法来筛选合适的 V_L 和 V_H 核酸序列。例如, 可通过WO 93/06213中所述的抗原决定簇印迹方法来筛选 V_L 和 V_H 核酸。可使用诸如在例如WO 92/01047, McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990) 和 Griffiths et al., EMBO J 12, 725-734 (1993) 所述的已知合适的方法来制备和筛选诸如scFv文库这样的抗体文库(以含人CD38的肽作为抗原)。这种抗体文库和CD38BPs的其它组合(文库、基因库等)是本发明的特征, 它可用于医疗用途, 以提供更全面的免疫应答; 在免疫原性的肽、小分子、其它抗CD38抗体(例如, 通过竞争检测)等的筛选方法中; 和/或在诊断方法及组分(例如, 通过标准技术可制备含可与其它抗体连接的这种抗体的点阵的免疫检测芯片)中作为工具。当选择初始的人 V_L 和 V_H 片段后, 可进行“混合及匹配”实验, 其中筛选与含CD38肽结合的初始选择的 V_L 和 V_H 片段的不同配对, 以选取所需的 V_L/V_H 配对组合。例如, 肽的反应性可通过ELISA或其它合适的抗原决定簇分析方法来确定(参见, 例如Scott, J.K. and Smith, G.P. Science 249, 386-390 (1990), Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990), Felici et al., J. Mol. Biol. 222, 301-310 (1991) and Kuwabara et al., Nature Biotechnology 15, 74-78 (1997), 以上文献对这些技术和原理进行讨论)。可通过抗体对抗原的亲亲和性和/或其从抗原解离的动力学(解离速率)来选择抗体(参见, 例如Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889-896 (1992))。

[0808] 为了进一步改善抗CD38抗体的质量和/或多样性, V_L/V_H 对的 V_L 及 V_H 片段可在例如 V_H 和/或 V_L 的CDR3区域中, 以与天然免疫应答中负责抗体亲和力成熟的体内体细胞突变过程相似的过程进行随机突变。该体外亲和力成熟可通过用分别与 V_H CDR3或 V_L CDR3互补的PCR引物扩增 V_H 和 V_L 区域来实现, 其中典型地引物在特定位点上“引入”四种核苷酸碱基随机混合物, 这样获得的PCR产物编码在 V_H 和/或 V_L CDR3区域中引入随机突变的 V_H 和 V_L 片段。可再次筛选与含CD38的肽结合的随机突变的 V_H 和 V_L 片段。

[0809] 筛选后, 可从展示包装体(例如, 从噬菌体基因组中)中回收编码所选抗体的核酸, 并通过标准重组DNA技术亚克隆到合适的载体中。如果需要, 这种编码抗体的核酸可进行进一步操作, 以生成其它抗体形式和CD38BPs。为了表达通过筛选组合文库分离的重组抗体, 典型地, 将含编码抗体序列的核酸克隆到重组表达载体中, 并在适于表达核酸并产生抗体的条件下, 转到合适的宿主细胞(哺乳动物细胞、酵母细胞等)内。

[0810] 诸如人单链Fv(scFv)及Fab抗体片段这样的高亲和抗体肽也可使用将目标抗原固定在诸如微滴定板或珠这样的固体表面上的淘选技术从这类文库中来分离(参见, 例如Barbas and Burton, Trends. Biotechnol. 14, 230-234 (1996) and Aujame et al., Hum. Antibodies 8, 155-68 (1997))。大型天然文库的噬菌体展示也使得不需免疫而直接分离人抗体成为可能(参见例如, de Haard et al., J. Biol. Chem. 274 (26), 18218-18230

(1999))。

[0811] 在一个技术方案中,本发明提供变异的CD38抗体。“变异的”抗CD38抗体是与母抗体(典型地,通过免疫反应来产生)在CDRs或其它V_H和/或V_L序列中有一个或多个氨基酸改变,及替代、缺失、插入或添加末端序列的抗体(即使这种改变没有改善母抗体抗原决定簇结合特性,但只要保留母抗体抗原决定簇结合特性最小实质量即可)。

[0812] 在单个变异抗体中的框架区、恒定结构域和/或可变区(或其任何一个或多个CDRs)的每个中可产生抗体变异体的变异形式。选择性地,可仅在抗体框架区、可变区(或其单个CDR)、或恒定结构域中的某一个产生变异。诸如由Cunningham and Wells, Science 244, 1081-1085 (1989)所述的这样的丙氨酸扫描突变技术可用于在生成的含变异V_L、V_H或替代CDR序列的CD38BPs中鉴定用于替代或缺失的合适的残基,不过也可使用其它合适的突变技术。也可使用诸如Reidhaar-Olson and Sauer, Science 241, 53-57 (1988) or Bowie and Sauer, PNAS USA 86, 2152-2156 (1989)所述的已知突变和筛选方法来产生并检测单个氨基酸替代。

[0813] 因此,例如,在抗体变异体中,可将一个或单个氨基酸残基引入或插入到,或紧邻母抗体一个或多个高变区,譬如在一个或多个CDRs中。抗CD38抗体变异体可含有任意数目的插入的氨基酸残基,只要仍保留母抗体中抗原决定簇结合特征的最少实质量即可。举例来说,本发明的抗CD38抗体变异体可含有约1-30个插入的氨基酸残基,例如约1-10个、譬如例如约2-10个、例如2-5个或譬如约1-5个插入的氨基酸残基。同样,举例来说,本发明的抗CD38抗体变异体可含有约1-30个缺失的氨基酸残基,例如约1-10个、譬如例如约2-10个、例如2-5个或譬如约1-5个缺失的氨基酸残基。同样,举例来说,本发明的抗CD38抗体变异体可含有约1-30个替代的氨基酸残基,例如约1-10个、譬如例如约2-10个、例如2-5个或譬如约1-5个替代的氨基酸残基。同样,举例来说,本发明的抗CD38抗体变异体可含有约1-30个末端序列氨基酸残基增加,例如约1-10个、譬如例如约2-10个、例如2-5个或譬如约1-5个末端序列氨基酸残基增加。本发明的抗体变异体也包含2个或多个这种插入、缺失、替代及末端序列氨基酸残基增加的组合,只要这些变异体具有母抗体相对于一个或多个CD38抗原决定簇的亲性和、特异性和/或选择性的最小实质部分即可。

[0814] 在本文其它地方描述了在选择抗体变异体方面的考虑(例如,氨基酸残基功能特性的保守性、基于亲水特性的氨基酸残基的保守性,和/或基于分子量/大小的氨基酸残基的保守性)。典型地,诸如保守替代变异这样的氨基酸序列改变预计不会对母序列结构特性造成实质改变(例如,替代的氨基酸不应该破坏作为母序列功能特性的二级结构)。在例如Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)), Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)) and Thornton et al., Nature 354, 105 (1991)中描述已知的多肽二级和三级结构的例子。其它关于设计和构建肽变异体的原则在例如Collinet et al., J Biol Chem 275 (23), 17428-33 (2000)中有所讨论。

[0815] 抗体的氨基酸序列变异体可通过向抗体编码核酸中引入合适的核苷酸改变(例如通过定点突变)或通过化学肽合成方式来获得。这种变异体包括,例如,在此处示例的抗体氨基酸序列中残基的缺失和/或插入和/或替代和/或末端序列增加。可产生缺失、插入和替

代的任何组合,以获得所需的变异体,只要变异体具有母抗体抗原决定簇结合特性的最小实质部分即可。相对于母抗体的氨基酸序列的改变也可通过譬如改变糖基化位点的数目或位置来改变变异抗体相对于母抗体的翻译后加工过程。

[0816] 本发明的变异抗体可包含诸如在CDRs这样的高变区的改变。含有这类CDR变异体的CD38BPs的实施例在本文其它部分有所描述,并且如上所述,这类CD38BPs可以是抗体。

[0817] 本发明的变异抗体可包含位于高变区之外的框架(FR)改变,例如在Fc区域,该改变可与诸如改变抗体功能或药物动力学特性这样的有利特性相关。例如,框架区或恒定结构域中的替代或其它修饰(插入、缺失、末端序列增加或其任何组合)与变异抗体相对于母抗体半衰期的增加相关,或可用于改变变异抗体相对于母抗体的免疫原性,以提供与另一个分子共价或非共价结合的位点,或改变补体结合这样的特性,例如导致C1q结合与CDC或Fc γ R结合与抗体依赖的细胞毒素作用(ADCC)的降低或增加。例如,可在重链恒定区的234、235、236、237、297、318、320和322位中一个或多个氨基酸残基处进行替代,从而可导致与未修饰的抗体相比较,在保持与抗原结合的同时在效应物功能上发生改变,参见US 5,624,821和US 5,648,260。进一步文献有W0 00/42072,它揭示了具有改变的Fc区的抗体增加了ADCC,W0 94/29351,揭示了在C_H2结构域N末端区域具有突变的抗体改变了抗体与FcRI结合的能力,从而降低了抗体与C1q结合的能力,这随后降低了抗体结合补体的能力。此外,Shields et al.,J.Biol.Chem.276,6591-6604(2001)描述了组合变异体,它可改善Fc γ RIII与例如T256A/S298A、S298A/E333A和S298A/E333A/K334A的结合。

[0818] 抗体的体外半衰期也可通过改变Ig恒定结构域或Ig类似的恒定结构域的拯救受体抗原决定簇来改善,从而使该分子不含有完整的C_H2结构域或完整的Ig Fc区域,参见US 6,121,022和US 6,194,551。可进一步通过在Fc区域引入突变,例如252位苏氨酸替代为亮氨酸、254位苏氨酸替代为丝氨酸、256位苏氨酸替代为苯丙氨酸来增加体外半衰期,参见US 6,277,375。

[0819] 在一个技术方案中,本发明提供变异的抗CD38抗体,其中抗体中潜在的T细胞抗原决定簇通过常规设计被降低或删除。这样,例如,在一个技术方案中,本发明提供“去免疫化的”抗CD38抗体,其中潜在的T细胞抗原决定簇被删除。去免疫化的抗CD38抗体的设计和构建可通过任何合适的已知技术来实现(参见,例如W09852976中关于制备去免疫化抗体的方法),当将这种如本发明所述的CD38BPs(例如,抗CD38变异抗体)给药时,希望可消除或实质降低在人中的免疫原性。

[0820] 其它框架突变包括可降低对蛋白酶水解的敏感性、降低对氧化的敏感性,和/或在相关变异抗体中赋予或改变其它生理化学或功能特性的序列改变。框架的氨基酸序列改变也可导致变异抗体中相对于母抗体糖基化模式发生改变。改变是指删除一个或多个母抗体中发现的碳水化合物部分,和/或增加一个或多个母抗体中不存在的糖基化位点。抗体的糖基化典型地是N连接或O连接的。N连接是指碳水化合物部分与天冬氨酸残基的侧链连接。三肽序列天冬氨酸-X-丝氨酸和天冬氨酸-X-苏氨酸是常见的碳水化合物部分与天冬氨酸侧链酶连接的识别序列,其中X是除脯氨酸外的任何氨基酸。因此,多肽中的这两种三肽序列的存在是潜在的糖基化位点。O连接糖基化是指诸如N乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖等糖与羟基氨基酸的连接,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。可通过改变氨基酸序列,使其含一个或多个上述三肽序列(对N连接糖基化位点而言)来

增加抗体的糖基化位点。也可通过对原始抗体序列进行一个或多个丝氨酸或苏氨酸的增加、或替代而进行改变(对O连接糖基化而言)。

[0821] 抗体也可在不加通常与Fc 297位Asn连接的碳水化合物连接的海藻糖单位的转基因瘤中表达,以增强Fc对Fc γ RIII的亲合性,从而导致在存在NK细胞时抗体的ADCC增强,参见Shield et al., J. Biol. Chem. 277.26733 (2002)。其它基于海藻糖化来改变糖基化的方法如Kyowa的WO 00/61739中所述。另外,可改变糖基化以改变CDC。进一步的参考文献有WO 99/54342和Umana et al., Nat. Biotechnol. 17, 176 (1999), 描述了构建的CHO细胞系表达GntIII, 导致具有改变的糖型和改善的ADCC活性的单克隆抗体的表达。

[0822] 其它可能的制备新型抗CD38抗体的合适技术包括CDR步移突变、抗体链替换、“简约突变”(Balint and Larrick, Gene 137, 109-118 (1993)), 和其它亲和力成熟技术(参见, 例如Wu et al., PNAS USA 95, 6037-42 (1998))。抗体库克隆技术也可用于产生变异抗体(参见, 例如WO 96/33279)。

[0823] 有多种已知可产生CDR变异体的技术, 任何合适的技术或其组合可用于本发明文中来产生实施例中的抗体CDRs的CDR变异体。这种技术的实施例包括删除非必需残基, 如Studnicka et al., Protein Engineering 7, 805-814 (1994) 所述(也参见Soderlind et al., Immunotechnology. 4(3-4), 279-85 (1999), CDR步移突变和其它人工亲和力成熟技术(参见, 例如Yang et al., Journal of Molecular Biology 254(3).392-403 (1995)), CDR替换技术, 其中CDRs典型地从不同组的选择性地含合成的寡核苷酸的基因模板中扩增, 并扩增 V_L 、 V_H 的恒定区和/或CDRs, 然后将各种片段混合(以单链或双链形式), 并通过聚合酶链反应(PCR)组装, 从而产生一组携带引入到母框架中的替换的CDR的基因产物编码的抗体片段, 该基因产物是用可与插入限制性位点之外的位点退火的外侧引物扩增的, 从而保证产生全长的产物, 将其插入到选自的载体中, 用于表达含变异CDR的蛋白。可通过变异体/模拟结构和母序列的结构的叠印, 例如, 通过比较NMR溶液结构来测定合适的结构。合理设计CDR序列变异体的有用方法如例如WO 91/09967和WO 93/16184中所述。这些方法的其它实施例在本文其它部分提供。

[0824] 本发明也提供具有与CD38结合能力的本发明的抗体(包括变异抗体)的片段(CD38结合片段)。因此, CD38BPs包括含小于天然抗体整个四聚体结构的类似抗体的分子。抗体片段可以是任何含有全长抗体一部分的肽, 通常为抗原结合或其可变区部分(这包括例如含本发明抗体的CDRs的人源化抗体片段、其变异体, 或其它可使抗原片段与本发明的抗体竞争结合CD38的其它CDRs)。在一个技术方案中, 抗体片段是指主要由或仅由抗体分子的一部分组成的肽。在一个技术方案中, 本发明提供至少含包括本发明的一个或多个 V_H CDRs的重链可变结构域, 选择性地也含具有本发明的一个或多个 V_L CDRs的轻链可变结构域的一部分的抗体片段, 其中重链可变结构域及选择性地轻链可变结构域选择性地与其它部分, 例如免疫球蛋白恒定结构域融合。恒定结构域序列可加到重链和/或轻链序列中, 形成具有部分长度重链和/或轻链的种类。可使用任何抗体同型体恒定区或其部分, 包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE的恒定区来实现该目的。

[0825] CD38结合抗体片段的例子包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和Fv片段。本发明的抗体片段也包括含CDR等的肽。在一个技术方案中, 本发明提供含具有任何此处所述的重链CDRs的第一多肽链和具有任何此处所述的轻链CDRs的第二多肽链, 其中两个多肽链通过一个或多个链

内二硫键共价连接。在一个技术方案中,本发明提供具有这种特征的两链抗体片段,其中抗体片段选自Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv和/或F(ab')₂片段。可通过常规方法使抗体片段化,可使用上述针对整个抗体的相同方法来筛选片段。例如,可通过胃蛋白酶处理抗体来产生F(ab')₂片段。得到的F(ab')₂片段可通过处理除去二硫键,从而产生Fab1片段。可通过木瓜蛋白酶处理IgG抗体获得Fab片段;可通过胃蛋白酶消化IgG抗体获得Fab'片段。将Fab1通过如下所述巯基或二硫键连接可产生Fab1片段。Fab1片段是通过切割F(ab')₂的铰链区的二硫键而获得的抗体片段。可通过用还原剂,例如二硫苏糖醇处理F(ab')₂片段而获得Fab'片段。抗体片段肽也可通过在重组细胞中表达编码这种肽的核酸来产生(参见,例如Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995))。例如,编码F(ab')₂片段的一部分的嵌和基因可包括编码C_H1结构域和H链铰链区的DNA序列,然后通过翻译终止密码子来产生这种截短的抗体片段分子。

[0826] CD38BPs也包括单价抗体和单链抗体。单链抗体是其中重链和轻链Fv区连接的肽。在一个技术方案中,本发明提供单链Fv(scFv),其中本发明的抗CD38抗体的Fv中的重链和轻链通过柔性的肽连接物(典型地约10、12、15或更多氨基酸残基)连接在单个肽链上。产生这种抗体的方法如例如US 4,946,778, Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Bird et al., Science 242, 423-426 (1988), Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) 及 McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990) 所述。如果只使用单个V_H和V_L,则单链抗体可以是单价的,如果使用2个V_H和V_L,则是二价的,如果使用多于两个V_H和V_L,则是多价的。

[0827] 在本发明的一个技术方案中,CD38BP可来源于或与另一个功能分子,例如另一个肽或蛋白(例如Fab'片段)连接,从而产生与多个结合位点或靶抗原决定簇结合的双特异或多特异分子。例如,本发明的抗体可功能上与一个或多个其它结合分子,例如另一个抗体、肽或结合类似物连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价连接或其它方式)。在一个技术方案中,CD38BP是本发明的抗体。

[0828] 因此,本发明包括含至少一个对CD38的第一结合特异性和针对第二个靶抗原决定簇的第二结合特异性的双特异和多特异分子。在本发明的一个技术方案中,第二个靶抗原决定簇是Fc受体,例如人FcγRI(CD64)或人Fcα受体(CD89),或T细胞受体,例如CD3。在一个技术方案中,本发明提供可与表达FcγR、FcαR或FcεR的效应细胞(例如,单核细胞、巨噬细胞或分叶核细胞(PMNs))结合,并作用于表达CD38的细胞的双特异和多特异分子。这些双特异和多特异分子使表达CD38的细胞定位到效应细胞,并启动诸如表达CD38细胞的吞噬作用、抗体依赖的细胞毒素作用(ADCC)、细胞因子释放、或过氧化物阴离子的产生这样的Fc受体介导的效应细胞活性。

[0829] 本发明的双特异和多特异分子除了抗Fc结合特异性和抗CD38结合特异性之外,还可进一步包括第三种结合特异性。在一个技术方案中,第三种结合特异性是抗增强因子(EF)部分,例如,与表面蛋白结合的分子参与细胞毒素作用,因此,增加对靶细胞的免疫反应。“抗增强因子部分”可以是与给定分子结合的抗体,功能性抗体片段或配体,例如,抗原或受体,因此导致结合决定簇对Fc受体或靶细胞抗原的增强作用。“抗增强因子部分”可结合Fc受体或靶细胞抗原。选择性地,抗增强因子部分可与不同于可结合第一和第二结合特

异性的实体相结合。例如,抗增强因子部分可结合细胞毒素T细胞(例如,通过CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1或针对靶细胞具有更高免疫应答的其它免疫细胞)。

[0830] 在一个技术方案中,本发明的双特异和多特异分子包含至少一个具有结合特异性的其它抗体,这种抗体包括例如Fab、Fab1、F(ab')₂、Fv或scFv。该其它抗体也可以是轻链或重链二聚体,或诸如Fv或Ladner et al在US 4,946,778中所述的单链构建体这样的任何最小片段。抗体还可以是如US2003/0118592和US2003/0133939所述的结合结构域免疫球蛋白融合蛋白。

[0831] 在一个技术方案中,对Fc受体的结合特异性是由人单克隆抗体来提供的,其结合不被人免疫球蛋白G(IgG)所阻断。此处所用术语“IgG受体”是指位于染色体1上的8个 γ 链基因中的任何一个。这些基因共编码12个可分属于3个Fc*受体种类:Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和Fc γ RIII(CD16)转膜或可溶性受体同型体。在一个技术方案中,Fc γ 受体是人高亲和性Fc γ RI。Fanger等在WO 88/00052和US 4,954,617中描述了这些单克隆抗体的产生和特性。这些抗体在不同于受体的Fc γ 结合位点处与Fc γ RI、Fc γ RII或Fc γ RIII的抗原决定簇结合,因此,它们的结合不会被生理水平的IgG完全阻断。本发明中所用的特异性抗Fc γ RI抗体有mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62和mAb 197。在其它技术方案中,抗Fc γ 受体抗体是mAb22(H22)的人源化形式。H22抗体的产生和特性在Graziano,R.F.et al., J. Immunol. 155(10), 4996-5002(1995)和WO 94/10332中有所描述。产生H22抗体的细胞系于1992年11月4日,以HA022CL1的命名保存在美国典型培养物保藏中心,其序列号为CRL 11177。

[0832] 在一个技术方案中,Fc受体的结合特异性是由与人IgA受体,例如Fc α 受体(Fc α 1(CD89))相结合的抗体来提供的,在一个技术方案中,其结合不会被人免疫球蛋白A(IgA)所阻断。术语“IgA受体”是指含有位于染色体19上的一个 α 基因(Fc α RI)的基因产物。已知该基因编码几个55到110kDa选择性拼接的转膜同型体。在单核细胞/巨噬细胞、嗜曙红细胞和嗜中性粒细胞的Fc α RI(CD89)是组成型表达的,但在非效应细胞群中不是这样。Fc α RI对IgA1和IgA2具有中等亲和性,当与诸如G-CSF或GM-CSF这样的细胞因子接触后亲和性会提高(Morton,H.C.et al.,Critical Reviews in Immunology 16,423-440(1996))。鉴定为A3、A59、A62和A77的、可在IgA配体结合结构域之外结合Fc α RI的4种Fc α RI-特异性单克隆抗体已被描述(Monteiro,R.C.et al.,J. Immunol. 148,1764(1992))。

[0833] Fc α RI、Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII,特别是Fc γ RII和Fc γ RIII是本发明中所用的触发受体的实施例,这是因为它们(1)主要在免疫效应细胞,例如单核细胞、PMNs、巨噬细胞和枝状细胞上表达;(2)以高水平表达(例如,每个细胞5,000-100,000);(3)是细胞毒素作用的介导体(例如ADCC、吞噬作用);及(4)介导增强的抗原,包括自身抗原,针对它们的抗原呈递。

[0834] 在一个技术方案中,本发明的CD38BP是多特异性抗CD38抗体或类似抗体的分子,其特定的实施例是包含至少一对特异针对含有至少部分CD38的抗原决定簇的V_H序列和V_L序列链,及另一个至少一对特异针对第二个抗原决定簇的V_H和V_L序列链的双特异性抗体。双特异抗体中的V_H和V_L序列可包含对应于抗CD38 V_H和V_L区、变体V_H和/或V_L序列、或V_H和/或V_L区的合适部分的完整V_H和V_L序列,譬如,CDR序列和足以提供与目的抗原决定簇结合的其它序列的合适组合。

[0835] 示例的双特异性抗体分子包括(i)两种相互连接的抗体,一种特异针对CD38,第二种针对第二个靶标,(ii)具有一条特异针对CD38的链和第二条特异针对第二个分子的链的单个抗体,及(iii)特异针对CD38和第二种分子的单链抗体。典型地,第二个靶/第二种分子是除CD38外的分子。在一个技术方案中,第二种分子是癌抗原/肿瘤相关抗原,譬如癌胚抗原(CEA)、前列腺特异抗原(PSA)、RAGE(肾抗原)、 α -胎蛋白、CAMEL(在黑色瘤上识别CTL的抗原)、CT抗原(譬如MAGE-B5、-B6、-C2、-C3和D;Mage-12;CT10;NY-ES0-1、SSX-2、GAGE、BAGE、MAGE和SAGE)、粘液素抗原(例如MUC1、粘液素CA125等)、神经节苷脂抗原、酪氨酸酶、gp75、C-myc、Marti、MelanA、MUM-1、MUM-2、MUM-3、HLA-B7和Ep-CAM。在一个技术方案中,第二个分子是诸如 $\alpha 5\beta 3$ 整联蛋白这样的癌相关整联蛋白。在一个技术方案中,第二个分子是血管生长因子或其它癌相关生长因子,譬如血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)、表皮生长因子受体(EGFR)、血管生长素及其受体,特别是与癌进展(例如HER1-HER4受体之一)相关的受体。其它此处所述的癌进展相关的蛋白也是合适的第二种分子。在一个技术方案中,第二种分子是在诸如CD138这样的多发性骨髓瘤细胞表面表达的分子。

[0836] 在一个技术方案中,本发明的双特异抗体是双功能抗体。

[0837] 双特异抗体也包括交联的或“异源连接物”抗体。例如,在异源连接物中的抗体可与针对生物素的亲和素和其它分子偶联。例如,已计划使用这种抗体使免疫系统细胞可针对另外的细胞(参见,例如US 4,676,980)。可使用任何便利的交联方法来生成异源连接物抗体。合适的肽交联试剂和技术在本领域是周知的,例如在US 4,676,980中揭示了这类试剂和技术的实施例。

[0838] 因此,尽管此处讨论的是抗体,但应理解,如果合适,抗体的细节和特征可等价用于诸如Fab片段、Fab1片段和scFv肽、类似抗体的肽(含CDR的肽)、双和多特异抗体和其它CD38BPs的抗体片段,只要本发明的CD38BP保留相应完整抗体的抗原结合特性的最小实质部分即可。在某些情况下,抗体片段可具有较低的抗原结合亲和性,但可提供能弥补亲和性上任何这种损失的其它优势特征。

[0839] 本发明的CD38BPs,特别是抗CD38抗体可基于它们能或不能提供补体结合的能力来进行选择。存在多种能进行补体结合和CDC的抗体同型体,包括但不限于以下:鼠IgM、鼠IgG2a、鼠IgG2b、鼠IgG3、人IgM、人IgG1和人IgG3。这些不包括,也不限定的同型体鼠人IgG2和人IgG4。同型体测定和其它改变抗体的补体结合和CDC功能特征的方法是本领域已知的。本发明的CD38BPs也包括免疫黏附素,它是指其中抗CD38抗体的一个或多个CDRs与该分子共价或非共价连接的分子。免疫黏附素可与CDR(s)整合为更大的多肽链的一部分,可将CDR(s)与另一种多肽链共价连接,或可非共价整合到CDR(s)中。CDRs可使免疫黏附素与CD38特异连接。

[0840] 本发明也提供CD38BP融合蛋白。CD38BP融合蛋白可包含任何合适的氨基酸序列或特异和/或选择性地针对至少部分包含在CD38中的至少一个结构域的序列的组合(例如,抗CD38抗体 V_H 结构域、 V_L 结构域或特别是其CDRs),及至少一个非同源的,典型地实质不相同的氨基酸序列(例如,与CD38特异的/选择性的序列的氨基酸同一性低于约40%、低于约35%、低于约30%、低于约25%、低于约20%),它可赋予融合蛋白那些无法单独由CD38特异/选择序列所提供的可检测的生物功能和/或特性(例如,体内半衰期的延长、荧光、更多地作用于

对特定细胞类型等)。这类融合蛋白的功能序列可被柔性连接物分开。二级序列也可来源于细胞毒性或凋亡的肽。二级序列也可提供诊断特性。这类序列的实施例包括那些诸如辣根过氧化物酶这样的易于可视化的酶的序列。

[0841] CD38BP融合蛋白也可通过比较比较抗原决定簇标签来描述。抗原决定簇标签序列是具有足够多残基、可提供抗原决定簇用于针对生成的抗体的氨基酸序列,但在CD38BP中,该序列很短,以至于无法实质上干扰CD38BP的活性(选择性、特异性、亲和性和/或生物活性)(与缺失抗原决定簇标签的母CD38BP相比较而言)。所需的抗原决定簇标签应充分特异,从而可使抗抗原决定簇标签抗体实质上不与其它抗原决定簇发生交叉反应。合适的标签多肽一般具有至少约6个氨基酸残基,通常为8-50个氨基酸残基(例如,约9-30残基)。抗原决定簇标签的实施例包括flu HA标签多肽及其抗体12CA5(Field et al., *Mol. Cell. Biol.* 8, 2159-2165 (1988)); myc标签及其抗体8F9、3C7、6E10、G4、B7和9E10(Evan et al., *Mol. Cell. Biol.* 5 (12), 3610-3616 (1985)), 和单纯疱疹病毒糖蛋白D(gD)标签及其抗体(Paborsky et al., *Protein Engineering* 3(6), 547-553 (1990))。在特定技术方案中,抗原决定簇标签是“拯救受体结合抗原决定簇”。此处所用术语“拯救受体结合抗原决定簇”是指IgG分子中Fc区的抗原决定簇(IgG1、IgG2、IgG3、或IgG4),它负责增加IgG分子在体内的血清半衰期。

[0842] 本发明的CD38BPs也包括CD38BP衍生物。衍生物是肽,其中肽的一个或多个氨基酸残基被化学修饰(例如,被烷基化、酰化、形成酯或形成氨基)或与一个或多个异源替代物(例如,亲脂性替代,PEG基团、与合适的有机基团连接物相连接的肽侧链等)共价连。肽也可与诸如细胞毒素、化疗药物、免疫抑制剂或放射性同位素(即所谓的免疫连接物)这样的治疗基团相连接。通常,此处所述的CD38BPs可被含有任何合适数目的这种修饰氨基酸的物质所修饰,和/或与这种连接替代物相联。在本文中适用性通常是通过至少在实质上保留与非衍生的母CD38BP所具有的CD38选择性和/或特异性的能力来确定的。含有一个或多个修饰氨基酸的优势在于,例如(a)增加多肽血清半衰期,(b)降低多肽抗原性,或(c)增加多肽保藏稳定性。例如,氨基酸可在重组生产过程中,在翻译时或翻译后被修饰(例如,在哺乳动物细胞中表达时,在N-X-S/T元件上的N连接糖基化),或通过合成方式来修饰。修饰氨基酸的非限制性实施例包括糖基化氨基酸、硫酸盐氨基酸、prenylated(例如,法尼基化、geranylgeranylated)氨基酸、乙酰化氨基酸、酰化氨基酸、PEG化氨基酸、生物素化氨基酸、羧基化氨基酸、磷酸化氨基酸等。指导技术人员进行氨基酸修饰的参考文献遍布各种文献中。实验流程可在Walker(1998) *Protein Protocols On Cd-Rom*, Humana Press, Towata, NJ 中找到。修饰氨基酸可选自糖基化氨基酸、PEG化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂基团连接的氨基酸及与有机衍生试剂连接的氨基酸。

[0843] 此外,可通过与多聚体共价连接的方式对抗体进行化学修饰,以例如增加其循环半衰期。作为示例的多聚体和将其连接到肽上的方法在例如US 4,766,106、US 4,179,337、US 4,495,285和US 4,609,546中有所描述。其它示例的多聚体包括聚氧乙烯化多羟基化合物和聚乙二醇(PEG)(例如,分子量在约1,000和约40,000之间,譬如在约2000和约20,000间,例如,约3,000-12,000的PEG)。

[0844] 在一个技术方案中,本发明提供与第二个选自放射性核、酶、酶底物、辅因子、荧光标记、化学发光标记、肽标签或磁性颗粒的分子连接的CD38BP。在一个技术方案中,CD38BP

可与一个或多个抗体片段、核酸(寡核苷酸)、核酸酶、激素、免疫调节物、螯合剂、硼化合物、光敏试剂、染料等连接。这些和其它合适的试剂可直接或间接与本发明的CD38BP偶联。与第二种试剂间接偶联的例子是通过间隔基团偶联。这些间隔可以是不溶的或可溶的(参见,例如Diener et al., Science 231.148(1986)),并可选择间隔从而使药物在靶位点和/或在特定条件下从CD38BP释放。可与CD38BP偶联的治疗试剂的其它实施例包括凝集素和荧光肽。

[0845] 在一个技术方案中,提供了含一个或多个放射性标记的氨基酸的CD38BP衍生物。放射性标记的CD38BP可用于诊断和治疗目的(与放射性分子的偶联是另一个可能的特征)。标记多肽的非限制性例子包括但不限于 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{131}I 和 ^{186}Re 。制备放射性标记的氨基酸和相关的肽衍生物的方法是本领域已知的(参见,例如Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven(1996))及US 4,681,581、US 4,735,210、US 5,101,827、US 5,102,990 (US RE35,500)、US 5,648,471和US 5,697,902。例如,放射性同位素可通过氯胺T方法偶联。

[0846] 在诊断中有用的放射性核是铟放射性同位素,用于治疗的是细胞毒的钷放射性同位素。通常发射质光子的放射性同位素在诊断(放射免疫显像(RIS))方法上是有用的。俄歇电子具有很短的径长(5-10nm),需要使其内在化而产生细胞毒性(参见,例如Adelstein et al., Nucl. Med. Biol. 14, 165-169(1987))。因此,偶联这种放射性同位素的肽可用于诊断方法,但仅有内在化的肽被认为可释放治疗意义上的俄歇电子。 α 颗粒需要与细胞紧邻(在3-4个细胞直径之内),才能作为有效的治疗试剂(Vriesendorp et al., "Radioimmunoglobulin therapy," in High Dose Cancer Therapy Armitage et al., (eds). (Williams&Wilkins, Baltimore, Md. 1992))。俄歇电子和 α 反射器由于其短范围发射,所以均可认为具有高度选择性,典型地不照射邻近正常细胞。

[0847] 射电金属 ^{111}In 和 ^{90}Y 分别是纯的 γ -发射者和纯的 β -发射者。最常用的俄歇电子发射者碘-125的半衰期约为60天,通常通过免疫偶联物在体内释放(由于去卤化)。最常用于临床的 α 发射者砒-211和铋-212具有相对较短的半衰期(分别为7.2h和1.0h),而且在第一次 α 发射后衰减为不被免疫偶联物保留的放射性同位素(Wilbur, Antibiot. Immunoconj. Radiopharm. 4, 5-97(1991))。对于诊断应用而言,可使用标记铟-111或钇-99m的CD38BPs。这两种放射性同位素均在合适的能量范围(100-250keV)内释放 γ 射线用于成像。典型地,低于该范围的能量不足以穿透而到达外部成像设备。更高的能量水平难以校准,因此所提供的诊断图像分辨率较差。 ^{99}Tc 的短半衰期典型地可限制其在具有快速肿瘤吸收的免疫偶联物中的使用。

[0848] 在一个技术方案中,提供了偶联第一和第二放射性同位素的第一和第二CD38BPs。在另一个技术方案中,提供了具有两个放射性同位素的单个CD38BP。用两个单独的放射性同位素,例如一个用于成像,另一个用于治疗的优势是利于门诊患者的治疗。诊断所用的低量放射性不具有辐射危险,而治疗性放射性同位素,例如纯 β 发射者所发射的辐射典型地将大量在靶细胞邻近被吸收。

[0849] 放射性同位素可直接或间接与CD38BP连接。例如,放射性同位素 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{99}Tc 、 ^{186}Re 和 ^{188}Re 可通过氨基酸功能基团与蛋白(包括抗体)共价连接。对放射性碘而言,它通常

通过酪氨酸的苯基连接。有多种方法来完成这种连接:氯胺-T(参见,例如Greenwood et al.,*Biochem J.* 89,114-123 (1963)及Iodogen(Salacinski et al.,*Anal. Biochem.* HZ, 136-146 (1981))。Tc和Re放射性同位素可通过半胱氨酸巯基基团共价连接(参见,例如Griffiths et al.,*Cancer Res.* 51,4594-4602 (1991))。但这些组分相对更适于诊断目的,因为机体通常会破坏这些共价键,从而向循环系统释放放射性同位素。

[0850] CD38BP也可被用于检测的酶,例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶等标记。CD38BP也可用生物素标记,从而可通过亲和素或链亲和素的结合而进行间接检测。CD38BP也可用预测的被第二种报告分子(例如,亮氨酸拉链配对序列、第二种抗体的结合位点、金属结合结构域、抗原决定簇标签等)识别的多肽抗原决定簇标记。其它的酶偶联物候选者的例子包括苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、delta-V-类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 α -磷酸甘油脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、天冬氨酰酶、葡萄糖氧化酶、核糖核酸酶、尿素酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。

[0851] 其它的示例的标记基团通常包括但不限于自旋标记分子和其它具有诊断价值的标记基团。

[0852] 在一个技术方案中,本发明提供交联的CD38BP衍生物。例如,这种CD38BP衍生物可提供两个或多个(相同类型或不同类型的,例如,可产生双特异性抗体)、其中至少一个特异/选择性针对CD38的抗体交联而产生。合适的交联物包括那些通过合适的间隔区(例如,m-马来酰亚胺苯甲酸-N-羧基琥珀酰亚胺酯)而具有两个不同的反应基团的异源双功能或同源双功能(例如,二琥珀酰亚胺基底物)物质。这种连接物可从Pierce Chemical Company, Rockford, III获得。

[0853] CD38BPs也可与任何合适的化学基团,例如聚乙二醇(PEG)、甲基或乙烷基团或碳水化合物基团偶联。这些和其它合适的偶联基团可用于改善CD38BP的生物学特性,例如,增加血清半衰期、溶解性和/或组织结合能力。

[0854] CD38BP衍生物可将放射性同位素、蛋白或其它试剂/基团/化合物化学偶联到(a) CD38BP的N末端侧链或C末端侧链或其亚基(例如,抗CD38抗体H链、L链、或抗其CD38特异性/选择性片段)的合适取代基或侧链,或(b) CD38BP的糖链(参见,例如Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan(1994))。在合适情况下,也可通过在内部残基或糖偶联来产生衍生物。

[0855] CD38BPs也可用检测试剂,例如包括荧光素、荧光素硫氰酸盐、若丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰氯化物、镧系元素磷等在内的荧光化合物来衍生。合适的荧光标记的其它实施例包括¹²⁵Eu标记、异硫氰酸盐标记、藻红蛋白标记、藻蓝蛋白标记、异藻蓝蛋白标记、邻苯二甲醛标记、荧光胺标记等。化学发光标记的实施例包括鲁米诺标记、异鲁米诺标记、芳香丫啶酯标记、咪唑标记、丫啶盐标记、草酸酯标记、荧光素标记、荧光素酶标记、发光蛋白质标记等。

[0856] 在一个技术方案中,CD38BP衍生物含有偶联的核酸或核酸相关的分子。在本发明的一个方面,偶联的核酸是细胞毒核糖核酸酶。在一个技术方案中,偶联的核酸是反义核酸(例如诊断反义分子的S100A10,它也可可是本发明的组合组分或联合给药方法中的单独成分-参见,例如Zhang et al.,*J Biol Chem.* 279(3),2053-62(2004))。在一个技术方案中,偶联的核酸是抑制性RNA分子(例如siRNA分子)。在一个技术方案中,偶联的核酸是免疫激

活核酸(例如,免疫激活的含CpG元件的DNA分子)。在一个技术方案中,偶联的核酸是编码肿瘤抑制基因、抗癌疫苗、抗癌细胞因子或凋亡试剂表达的表达盒。这种衍生物也可含有编码一种或多种诸如植物和细菌毒素这样的细胞毒性蛋白表达的核酸偶联物。

[0857] 在一个技术方案中,CD38BP与功能性核酸分子偶联。功能性核酸分子包括反义分子、干扰核酸分子(例如,siRNA分子)、核酸适体、核酶、三螺旋分子及外源性指导序列。功能性核酸分子可作为靶分子特异活性的效应物、抑制物、调节物及刺激物,或功能性核酸分子可具有独立于任何其它分子的从头合成活性。用于设计及使用反义核酸分子的方法和技术的代表性例子可在以下非限制性美国专利列表中找到:US 5,135,917、US 5,294,533、US 5,627,158、US 5,641,754、US 5,691,317、US 5,780,607、US 5,786,138、US 5,849,903、US 5,856,103、US 5,919,772、US 5,955,590、US 5,990,088、US 5,994,320、US 5,998,602、US 6,005,095、US 6,007,995、US 6,013,522、US 6,017,898、US 6,018,042、US 6,025,198、US 6,033,910、US 6,040,296、US 6,046,004、US 6,046,319和US 6,057,437。

[0858] 在一个技术方案中,CD38BP与核酸适体偶联。核酸适体是,例如以特定方式,与靶分子相互作用的分子。典型地,核酸适体是长度为15-50个碱基的小核酸,可折叠成诸如茎-环或G-四聚体这样的确定的二级和三级结构。核酸适体可与诸如ATP(US 5,631,146)和茶碱(US 5,580,737)这样的小分子及诸如逆转录酶(US 5,786,462)和凝血酶(US 5,543,293)这样的大分子结合。如何生成和使用与多种不同的靶分子结合的核酸适体的代表性实施例可在以下非限制性美国专利列表中找到:US 5,476,766、US 5,503,978、US 5,631,146、US 5,731,424、US 5,780,228、US 5,792,613、US 5,795,721、US 5,846,713、US 5,858,660、US 5,861,254、US 5,864,026、US 5,869,641、US 5,958,691、US 6,001,988、US 6,011,020、US 6,013,443、US 6,020,130、US 6,028,186、US 6,030,776和US 6,051,698。

[0859] 在一个技术方案中,本发明提供与核酶偶联的CD38BP。核酶是能催化分子内或分子间化学反应的核酸分子。因此,核酶是具有催化功能的核酸。有多种不同类型的,催化核酸酶或核酸聚合酶类型反应的核酶,这些反应基于天然系统中发现的核酶,譬如(a)锤头型核酶(例如,描述在US 5,334,711、US 5,436,330、US 5,616,466、US 5,633,133、US 5,646,020、US 5,652,094、US 5,712,384、US 5,770,715、US 5,856,463、US 5,861,288、US 5,891,683、US 5,891,684、US 5,985,621、US 5,989,908、US 5,998,193、US 5,998,203、WO 9858058、WO 9858057和WO 9718312中)。(b)发卡型核酶(例如,描述在US 5,631,115、US 5,646,031、US 5,683,902、US 5,712,384、US 5,856,188、US 5,866,701、US 5,869,339和US 6,022,962中),及(c)四膜虫型核酶(例如,描述在US 5,595,873和US 5,652,107中)。还有很多不是在天然系统中发现的核酶,但它们可被构建,以从头催化特定反应(这类实施例在例如US 5,580,967、US 5,688,670、US 5,807,718和US 5,910,408中描述)。典型地,核酶剪切RNA或DNA底物,更通常是剪切RNA底物。典型地,核酶通过识别并结合到靶底物上及随后的切割来剪切核酸底物。该识别过程主要是基于典型的或非典型的碱基配对相互作用。因为靶底物的识别基于靶底物的序列,所以该特性使得核酶成为核酸靶特异性剪切的非常优秀的候选者。如何生成并使用核酶以催化多种不同的反应的代表性实施例可在以下非限制性美国专利列表中找到:US 5,646,042、US 5,693,535、US 5,731,295、US 5,811,300、US 5,837,855、US 5,869,253、US 5,877,021、US 5,877,022、US 5,972,699、US 5,972,704、US 5,989,906和US 6,017,756。

[0860] 在一个技术方案中,本发明提供与三螺旋形式功能性核酸偶联的CD38BP。这种核酸分子可与双链或单链核酸相互作用。当三螺旋分子与靶区域相互作用时,形成了被称为三螺旋的结构,其中3条DNA链形成了基于Watson-Crick和Hoogsteen碱基配对的复合物。三螺旋分子可以高亲和性和特异性与靶区域结合。如何生成并使用与多种不同的靶分子相结合的三螺旋形式分子的代表性实施例可在以下非限制性美国专利列表中找到:US 5,176,996、US 5,645,985、US 5,650,316、US 5,683,874、US 5,693,773、US 5,834,185、US 5,869,246、US 5,874,566和US 5,962,426。

[0861] 在一个技术方案中,CD38BP与外源性指导序列偶联。外源性指导序列(EGSs)是与形成可被切割靶分子的Rnase P所识别的复合物的靶核酸分子相结合的分子。EGSs可被设计为特异性针对所选择的RNA分子。RNase P在细胞中帮助转运RNA(tRNA)的加工。通过使用可使靶RNA:EGS复合物模拟为天然tRNA底物的EGS,可募集细菌RNase P来实质切割任何RNA序列(参见,例如WO 92/03566和Forster and Altman,Science 238,407-409(1990)的讨论)。如何生成并使用EGS分子以促进多种不同靶分子剪切的代表性实施例可在以下非限制性美国专利列表提供:US 5,168,053、US 5,624,824、US 5,683,873、US 5,728,521、US 5,869,248和US 5,877,162。

[0862] 在一个技术方案中,CD38BP可与诸如siRNA或其它RNAi分子(例如,约20-25个核苷酸的抑制性双链(ds)RNA分子)这样的干扰核酸分子偶联,它可针对并干扰诸如参与CD38介导的疾病或症状这样的基因表达产物的靶基因表达产物的作用。在例如Nishikura,Cell.107(4).415-8(2001)、Fjose et al.,Biotechnol Annu Rev.7,31-57(2001)、Hanon,Nature 418,244-51(2002)、Brantl,Biochim Biophys Acta.1575(1-3),15-25(2002)、Tuschl,Chembiochem.2(4),239-45(2001)、Caplen,Expert Opin Biol Ther.3(4),575-86(2003)、Lu et al.,Curr Opin MoI Ther.5(3),225-34(2003)、Shuey et al.,Drug Discov Today.7(20),1040-6(2002)、Shi,Trends Genet.19(1),9-12(2003)、Kovar et al.,Semin Cancer Biol.13(4),275-81(2003)、Lavrey et al.,Curr Opin Drug Discov Devel.6(4),561-9(2003)、Clewey,Commun Dis Public Health.6(2),162-3(2003)、Duxbury et al.,J Surg Res.117(2),339-44(2004)、Caplen et al.,Ann N Y Acad Sci.1002,56-62(2003)、WO 01/75164、US 6,506,559、US20040086884、US20040077574、US20040063654、US 20040033602、US20030167490、US20030157030、US20030114409、US20030108923、US20040014113和US20020132788中提供了产生和使用干扰核酸分子的方法。

[0863] 在一个技术方案中,CD38BP可与肿瘤靶向结构域肽或分子偶联。在一个技术方案中,CD38BP与肿瘤靶向因子VII序列偶联。

[0864] 用于将CD38BP与偶联分子相偶联的本领域中任何已知的方法,譬如如上所述的方法,均可使用,包括在Hunter et al.,Nature.144,945(1962)、David et al.,Biochemistry 13,1014(1974)、Pain et al.,J.Immunol.Meth.40,219(1981)和Nygren,J.Histochem.and Cytochem.30,407(1982)中所述的方法。可以任何合适的方式来实现连接/偶联。例如,共价连接可采用二硫键的形式(如果需要且合适的情况下),可将CD38BP构建为含有额外的半胱氨酸密码子,但需要它不干扰分子的CD38结合活性。具有修饰的CD38BP中半胱氨酸巯基基团反应性的毒素分子可与CD38BP肽形成免疫连接物。选择性地,

可使用固相多肽技术直接向CD38BP中引入巯基基团。例如,Hiskey,Peptides3,137(1981)描述了向肽中引入巯基的方法。在Maasen et al.,Eur.J.Biochem.134,32(1983)中描述了向蛋白中引入巯基的方法。当存在正确的巯基基团时,可纯化细胞毒素和CD38BP,二者的巯基被还原;细胞毒素和配体相混合(例如,以约1:5到1:20的比例);在室温下可完成二硫键的形成(通常约20到30分钟)。然后,可通过磷酸缓冲盐透析或诸如葡聚糖这样的树脂进行层析来除去混合物中未反应的配体及毒素分子。

[0865] 可通过细胞毒性组分上的反应基团或通过使用交联试剂将多种类型的细胞毒性组分加入到蛋白中。常用的可在体内与胺形成稳定共价键的反应基团是异硫氰酸盐(Means et al.,Chemical modifications of proteins(Holden-Day,San Francisco 1971) pp.105-110)。该基团优选地与赖氨酸的 ϵ -氨基反应。顺丁烯二酰亚胺通常用作反应基团以在体内与半胱氨酸上的巯基基团形成稳定的共价键(Ji.,Methods Enzymol 91.,580-609(1983))。典型地,单克隆抗体不能与射电金属离子形成共价键,但它们间接通过使用与抗体共价连接的螯合剂来吸附在抗体上。螯合剂可通过氨基酸残基的氨基基团(Meares et al.,Anal.Biochem..142,68-78(1984))及巯基基团(Koyama,Chem.Abstr.120,217262t(1994)),也可通过碳水化合物基团(Rodwell et al.,PNAS USA 83,2632-2636(1986)、Quadri et al.,Nucl.Med.Biol.20,559-570(1993))连接。由于这些螯合剂含有两种类型的功能基团,一种结合金属离子,另一种参与抗体的螯合,因此它们通常称为双功能螯合剂(Sundberg et al.,Nature 250,587-588(1974))。

[0866] 具有反应性的功能基团的交联试剂可分为同源双功能或异源双功能的。同源双功能交联试剂的实施例包括与巯基基团(Chen et al.,J Biol Chem 266,18237-18243(1991))反应的双顺丁烯二酰亚胺(BMH),及与氨基基团(Browning et al.,J.Immunol.143,1859-1867(1989))反应的乙烯基乙二醇(succinimidylsuccinate)(EGS)。异源双功能交联物的实施例包括马来酰亚胺苯甲酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)(Myers et al.,J.Immunol.Meth.111,129-142(1989))。这些方法比较简单,是常用的。

[0867] 治疗性或诊断性试剂也可以,或选择性地通过形成二硫键连接在还原性抗体组分的铰链区。作为选择,这种肽可使用诸如3-(2-吡啶二巯基)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SPDP)这样的异源双功能交联物连接到抗体组分上。Yu et al.,Int.J.Cancer 56,244(1994)。这类偶联方法的通用技术在本领域是已知的。参见例如,Wong,Chemistry Of Protein Conjugation And Cross-Linking(CRC Press1991)、Upeslakis et al.,“Modification of Antibodies by Chemical Methods,”In Monoclonal Antibodies: Principles And Applications,Birch et al.,(eds.) (Wiley-Liss,Inc.1995)、Price,“Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies,”in Monoclonal Antibodies:Production,Engineering And Clinical Application,Ritter et al.,(eds.) (Cambridge University Press 1995)。

[0868] 在某些技术方案中,标记或其它偶联的取代基团通过各种长度的间隔臂与CD38BP的氨基酸序列连接,以减小可能的立体位阻。

[0869] 未标记的CD38BP(s)可与和CD38BP(s)反应的其它标记的抗体(第二抗体),例如,针对与抗CD38 mAbs连接的人免疫球蛋白恒定区的抗体联合使用。选择性地,可直接标记CD38BP。多种标记可用于直接或间接标记CD38BPs,例如标记放射性核、氟石、酶、酶底物、酶

辅因子、酶抑制剂、配体 (特别是半抗原) 等。

[0870] 氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基末端融合长度为1个残基到含100或更多残基的多肽, 及内部序列插入单个或多个氨基酸残基。末端插入的实施例包括具有N末端甲二磺酰残基的抗体或融合抗原决定簇标签的抗体。其它抗体分子的插入变异体包括抗体的N或C末端融合酶或多肽或PEG, 从而增加抗体的血清半衰期。这种抗CD38抗体融合蛋白和类似的含CD38BP序列的融合蛋白是本发明的另一个特征。

[0871] 在一个技术方案中, 本发明提供含与治疗性基团, 例如细胞毒素、化疗药物、免疫抑制剂或放射性同位素偶联的诸如人抗CD38抗体这样的本发明的CD38BP的分子。这种偶联物此处称为“免疫连接物”, 它含有一个或多个称为“免疫毒素”的细胞毒素。

[0872] 细胞毒素或细胞毒素试剂包括任何对细胞有害 (例如杀死) 的试剂。对于描述这类本领域周知的药物及其作用机制, 参见Goodman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990。其它与制备抗体免疫毒素相关的技术在例如Vitetta, Immunol. Today 14, 252 (1993) 和US 5, 194, 594中提供。

[0873] 合适的形成本发明的免疫连接物的治疗性试剂包括泰素、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根素、丝裂霉素、足叶乙甙、鬼臼噻吩甙、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、阿霉素、正定霉素、二氢炭疽菌素二酮、米托蒽醌、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、心得安、嘌呤霉素、抗代谢物 (譬如氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、胞嘧啶阿拉伯糖苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、氮烯咪胺、羟基脲、天门冬酰胺酶、吉西他滨、克拉曲滨)、烷基化试剂 (譬如二氯甲基二乙胺、thioepa、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、亚硝脲氮芥 (BSNU)、洛莫司汀 (CCNU)、环磷酰胺、甲磺酸丁二醇二酯、二溴磷、链脲霉素、氮烯咪胺 (DTIC)、甲基苄肼、丝裂霉素C、施铂锭及其它诸如卡铂这样的铂衍生物)、抗生素 (譬如更生霉素 (以前称为放线菌素)、博来霉素、正定霉素 (以前称为道诺霉素)、阿霉素、去甲氧基柔红霉素、光神霉素、加里刹霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素、安曲霉素 (AMC))、白喉毒素及相关分子 (譬如白喉A链及其活性片段以及杂合分子)、蓖麻毒素 (譬如蓖麻蛋白A或去糖基化蓖麻蛋白A链毒素)、霍乱毒素、志贺样毒素 (SLT-I、SLT-II、SLT-IIIV)、LT毒素、C3毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆Bowman-Birk型蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、alorin、肥皂草素、莫迪素、甘丙素、相思豆毒素A链、莫迪素A链、 α -帚曲菌素、油桐蛋白、康乃馨蛋白、美洲商陆蛋白 (PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、sapaonaria officinalis抑制剂、多花白树素、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、及依诺霉素毒素。可如本文其它地方所述的与本发明的CD38BP联合给药的治疗性试剂也可用作偶联本发明的CD38BP的治疗性基团的候选者。例如, 药物基团可以是具有所需生物学活性的蛋白或多肽。这种蛋白可包括, 例如有酶活性的毒素或其活性片段, 例如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素或白喉毒素; 蛋白, 例如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ; 或生物应答调节物, 诸如例如淋巴因子、白介素-1 (IL-1)、白介素-2 (IL-2)、白介素-6 (IL-6)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 或其它从线粒体分离的生长因子和凋亡诱导蛋白。在一个技术方案中, 细胞毒素试剂是加里刹霉素、 ^{90}Y 、 ^{125}I 和 ^{131}I 。与本发明的CD38BP偶联的治疗性细胞毒素的其它例子包括加里刹霉素和duocarmycins。如上所述, 不必将药物基团限制为传统的化学治疗试剂。例如, 药物基团可以是具有所需生物活

性的蛋白或者多肽。这类蛋白可包括,例如,诸如磷酸酯酶类酶,譬如磷酸酯酶C这样的在细胞表面有活性的试剂。

[0874] 典型地,毒素的裂解部分可与本发明的抗体或抗体片段的Fab片段连接。其它合适的偶联分子包括核糖核酸酶(Rnase)、DNase I、葡萄球菌外毒素A、美洲商陆抗病毒蛋白、白喉毒素和假单胞菌外毒素。参见,例如Pastan et al.,Cell 47,641(1986)和Goldenberg,Calif.A Cancer Journal for Clinicians 44,43(1994)。其它的适于本发明的毒素是本领域技术人员已知的(参见例如US 6,077,499)。

[0875] 诸如抗体这样的CD38BPs的偶联物,和这些细胞毒素基团可通过各种双功能蛋白偶联试剂来制备。这种试剂的例子包括SPDP、IT、诸如己二亚胺酸二甲酯HCl这样的亚氨基双功能衍生物、诸如二琥珀酰氨基底物这样的活性酯、诸如戊二醛这样的醛、诸如二(p-叠氮苯酰)己烷这样的双叠氮化合物、诸如二(p-重氮苯酰)乙二胺这样的双重氮衍生物、诸如亚苄基2,6-二异氰酸酯这样的二异氰酸酯、诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯这样的双活性氟化合物、以及抗有丝分裂试剂(例如,长春新碱、长春碱、紫杉萜、太平洋紫杉醇和长春瑞滨)。

[0876] 将这种治疗性基团与诸如抗体这样的CD38BPs偶联的技术是已知的,参见,例如Arnon et al.,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld et al.,(eds.)、pp.243-56(Alan R.Liss,Inc.1985)、Hellstrom et al.,“Antibodies For Drug Delivery”,in Controlled Drug Delivery(2nd Ed.),Robinson et al.,(eds.)、pp.623-53(Marcel Dekker,Inc.1987)、Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,in Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications,Pinchera et al.,(eds.)、pp.475-506(1985)、“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”,in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin et al.,(eds.)、pp.303-16(Academic Press 1985)和Thorpe et al.,“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”,Immunol.Rev.62,119-58(1982)。

[0877] 在一个技术方案中,本发明提供与混合毒素偶联的CD38BP。混合的毒素分子是来源于两个不同(典型地多肽)毒素的分子。通常,肽毒素含有一个或多个负责进行真核细胞结合的结构域,至少一个有酶活性的结构域,及至少一个转位结构域。结合和转位结构域分别是细胞识别和毒素进入所需的。已知具有转位结构域的天然蛋白包括白喉毒素、假单胞菌外毒素A和可能的其它肽毒素。白喉毒素和假单胞菌外毒素A的转位结构域已被描述(参见,例如Hoch et al.,PNAS USA 82,1692(1985)、Colombatti et al.,J.Biol.Chem.26J.,3030(1986)和Deleers et al.,FEBS Lett.160,82(1983)),这种结构域在其它分子中的存在和定位可通过例如Hwang et al.,Cell 48,129(1987)和Gray et al.,PNAS USA 8J.2645(1984)进行的方法进行测定。对这些技术而言,有用的混合毒素杂交物可通过例如将有酶活性的大肠杆菌志贺样毒素的A亚基(Calderwood et al.,PNAS USA 84,4364(1987))与白喉毒素的转位结构域(氨基酸残基从202到460)与针对特定细胞类型的分子融合而形成,如US 5,906,820所述。三部分的杂和体的定位部分可使分子特异地结合到靶细

胞上,白喉毒素转位部分可将志贺样毒素有酶活性的A亚基插入到靶细胞中。志贺样毒素有酶活性的部分与白喉毒素一样作用于细胞的蛋白合成机器,抑制蛋白合成,从而杀死靶细胞。

[0878] 如本发明所述的免疫连接物也可包含放射性同位素,例如碘-131、钷-90或钷-111,从而产生细胞毒性的放射性药物,用于治疗CD38相关的疾病,例如多发性骨髓瘤。

[0879] 在一个技术方案中,诸如人抗体这样的本发明的CD38BPs与连接物-螯合剂,例如tiuxetan结合,从而使抗体与放射性同位素偶联。

[0880] 其它有用的偶联物替代物包括抗肿瘤类维生素A。紫杉烷偶联物(参见,例如Jaime et al.,*Anticancer Res.*21. (2A),1119-28(2001)、施铂锭偶联物、亚油酸偶联物、加里刹霉素偶联物(参见,例如Damle et al.,*Curr Opin Pharmacol.*3(4),386-90(2003)、阿霉素偶联物、格尔德霉素偶联物等也可用于促进癌症的治疗(通常参见Trail et al.,*Cancer Immunol Immunother.*52(5),328-37(2003))。

[0881] 在一个技术方案中,本发明提供针对本发明的抗CD38抗体的第二和抗独特型抗体。第二抗体是指特异,典型地针对抗CD38抗体的抗体。抗独特型(Id)抗体是识别通常与抗体的抗原结合位点相关的独特决定簇的抗体。可通过免疫具有制备抗Id的mAb的,与抗CD38mAb来源相同物种和基因型的动物来制备。典型地,免疫的动物可识别和对免疫抗体的独特型决定簇产生应答,从而产生针对这些独特型决定簇的抗体(抗Id抗体)。这种抗体描述在例如US 4,699,880中。这种抗体是本发明的另一个特征。

[0882] 抗Id抗体也可作为“免疫原”在另一种动物中诱导免疫应答,从而产生所谓的抗抗Id抗体。抗抗Id可与原始的诱导抗Id的mAb具有相同的抗原决定簇。因此,通过使用针对mAb的独特型决定簇的抗体可鉴定其它具有相同特异性的克隆表达抗体。抗Id抗体可用任何合适的技术,例如本文其它地方描述的关于本发明的抗CD38抗体和其它CD38BPs的方法进行改变(从而产生抗Id抗体变异体)和/或衍生。例如,抗Id mAbs可与诸如钥孔血蓝蛋白(KLH)这样的载体偶联,并用于免疫BALB/c小鼠。来自这些小鼠的血清典型地含有具有与原始/母CD38抗体即使不同但相似的结合特性的抗抗Id抗体。

[0883] 在一个技术方案中,本发明提供编码CD38BP的核酸。CD38BP编码核酸可具有任何合适的特征,并含有任何合适的特征或其组合。因此,例如,CD38BP编码核酸可以是DNA、RNA或其杂和体形式,可包括非天然碱基、修饰的骨架(例如,提高核酸稳定性的硫代磷酸化骨架)或包括二者。核酸可含有促进其在靶宿主细胞中所需表达、复制和/或选择的特征。这种特征的例子包括复制组分的起始点、筛选基因组分、启动子组分、增强子元件组分、多腺苷化序列组分、终止组分等。

[0884] 在一个技术方案中,本发明提供含CD38BP编码核酸的载体。载体是指促进CD38BP编码核酸表达、CD38BP肽产生、靶细胞转染/转化、CD38BP编码核酸复制、促进核酸稳定性、促进核酸和/或转化/转染细胞的检测,或其它赋予CD38BP编码核酸有用的生物学功能的递送工具。本发明文中的载体可以是任何合适的载体,包括染色体、非染色体和合成的核酸载体(含合适的表达调控元件的核酸序列)。这种载体的例子包括SV40衍生物、细菌质粒、噬菌体DNA、棒状病毒、酵母质粒、来源于质粒和噬菌体DNA组合的载体和病毒核酸(RNA或DNA)载体。在一个技术方案中,CD38BP编码核酸由裸露的DNA或RNA载体组成,包括例如,线性表达元件(如例如Sykes and Johnston,*Nat Biotech* 17,355-59(1997)所述),紧密的核酸载体

(如例如US 6,077,835和/或WO 00/70087所述),质粒载体,例如pBR322、pUC 19/18或pUC 118/119,“小”的核酸载体(如例如Schakowski et al.,*Mol Ther* 3,793-800(2001)所述),或作为沉淀的核酸载体构建体,譬如CaPO₄沉淀的构建体(如例如WO 00/46147、Benvenisty and Reshef,*PNAS USA* 83,9551-55(1986)、Wigler et al.,*Cell* 14,725(1978)、及Coraro and Pearson,*Somatic Cell Genetics* 7,603(1981)所述)。这类核酸载体及用途在本领域是周知的(参见例如US 5,589,466和US 5,973,972)。

[0885] 在一个技术方案中,载体适于在细菌细胞中表达CD38BP。这种载体的实施例包括,例如,指导易于纯化的融合蛋白高水平表达的载体(例如,诸如BlueScript(Stratagene)、pIN载体(Van Heeke&Schuster,*J Biol Chem* 264,5503-5509(1989)、pET载体(Novagen, Madison WI)等这样的多功能大肠杆菌的克隆及表达载体)。

[0886] 表达载体也可以或选择性地是适于在酵母系统中进行表达的载体。可使用任何适于在酵母系统中进行表达的载体。例如可用于在酿酒酵母中的合适载体包括,例如,含诸如 α 因子、乙醇氧化酶及PGH这样的组成型或诱导型启动子的载体(综述可参见:F.Ausubel et al.,ed.*Current Protocols in Molecular Biology*,Greene Publishing and Wiley InterScience New York(1987)、及Grant et al.,*Methods in Enzymol* 153.516-544(1987))。

[0887] 核酸和/或载体也可以含有编码分泌/定位序列的核酸序列,这些序列可使诸如新生多肽链这样的多肽定位到所需的细胞内区域、膜或细胞器,或者这些序列可指导多肽分泌到周质空间或细胞培养基中。这类序列在本领域是已知的,包括分泌引导序列或信号肽、细胞器定位序列(例如,核定位序列、ER滞留信号、线粒体穿梭序列、叶绿体穿梭序列)、膜定位/锚定序列(例如,转移终止序列、GPI锚定序列)等。

[0888] CD38BP编码核酸可含有或与任何合适的启动子、增强子及其它促进表达的元件连接。这类元件的实施例包括强表达启动子(例如,人CMV IE启动子/增强子以及RSV、SV40、SL3-3、MMTV和HIV LTR)、有效的多聚(A)终止序列、大肠杆菌中质粒产物的复制起点、用作选择标记的抗生素抗性基因、和/或方便的克隆位点(例如,多连接物)。核酸也可含有与诸如CMV IE这样的组成型启动子相对的诱导型启动子(技术人员指导这类术语是特定条件下基因表达程度的实际描述)。

[0889] 在一个技术方案中,核酸可通过病毒载体定位和/或递送到宿主细胞或者宿主动物中。任何合适的病毒载体可用于该目的,有几个是本领域已知的。病毒载体可单独或者与一个或多个病毒蛋白一起,含有任意数目的病毒多核苷酸,这些病毒蛋白可促进本发明的核酸在所需宿主细胞中的递送、复制和/或表达。病毒载体可以是含有全部或部分病毒基因组的多核苷酸、病毒蛋白/核酸偶联物、病毒类似颗粒(VLP)、与US 5,849,586和WO 97/04748中所述载体类似的载体、或含有病毒核酸及本发明中核酸的完整的病毒颗粒。病毒颗粒类病毒载体可含有野生型病毒颗粒或修饰的病毒颗粒。病毒载体是需要存在另一种载体或野生型病毒来进行复制和/或表达的载体(即,它是辅助依赖病毒),譬如腺病毒载体扩增子。典型地,这类病毒载体实质上由野生型病毒颗粒,或者其蛋白和/或核酸被修饰以增加转基因能力或促进核酸转染和/或表达的病毒颗粒组成的(这类载体的实施例包括疱疹病毒/AAV扩增子)。典型地,病毒载体类似于、和/或来源于通常感染人类的病毒。在这方面,合适的病毒载体包括,例如,腺病毒载体颗粒(包括任何腺病毒或者来源于腺病毒的病

毒)、腺相关病毒载体颗粒(AAV载体颗粒)或其它细小病毒及细小病毒载体颗粒、乳头状瘤病毒载体颗粒、黄质病毒载体、 α 病毒载体、疱疹病毒载体、痘病毒载体、包括慢病毒载体在内的逆转录病毒载体。这类病毒及病毒载体的实施例参见例如Fields et al., eds., Virology Raven Press, Ltd., New York (3rd ed., 1996 and 4th ed., 2001)、Encyclopedia of Virology, R.G. Webster et al., eds., Academic Press (2nd ed., 1999)、Fundamental Virology, Fields et al., eds., Lippincott-Raven (3rd ed., 1995)、Levine, "Viruses," Scientific American Library No. 37 (1992)、Medical Virology, D.O. White et al., eds., Acad. Press (2nd ed. 1994)、及Introduction to Modern Virology, Dimock, N.J. et al., eds., Blackwell Scientific Publications, Ltd. (1994)。

[0890] 可使用本发明中多核苷酸及此处所述方法的病毒载体包括腺病毒和腺相关载体, 例如Carter, Curr Opin Biotech 3, 533-539 (1992) 和Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol 158, 97-129 (1992)。在例如Carter, Contrib. Microbiol. 4, 85-86 (2000)、Smith-Arica, Curr. Cardiol. Rep. 3 (1), 41-49 (2001)、Taj, J. Biomed. Sci. 7 (4), 279-91 (2000)、Vigna et al., J. Gene Med. 2 (5), 308-16 (2000)、Klimatcheva et al., Front. Biosci. 4, D481-96 (1999)、Lever et al., Biochem. Soc. Trans. 27 (6), 841-47 (1999)、Snyder, J Gene Med. 1 (3), 166-75 (1999)、Gerich et al., Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. 5 (2), 118-23 (1998)、和During, Adv. Drug Deliv. Review 27 (1), 83-94 (1997) 以及US 4,797,368、US 5,139,941、US 5,173,414、US 5,614,404、US 5,658,785、US 5,858,775和US 5,994,136中描述了AAV载体的其它类型与方面。可通过在例如US 4,797,368和Laughlin et al., Gene 23, 65-73 (1983)中确定的方法来构建和/或纯化腺相关病毒载体。

[0891] 另一种类型的使用本发明中多核苷酸和方法的病毒载体是乳头状瘤病毒载体。合适的乳头状瘤病毒载体在本领域是已知的, 并在例如中Hewson, MoI Med Today 5 (1), 8 (1999)、Stephens, Biochem J. 248 (1), 1-11 (1987) 和US 5,719,054有所描述。在例如WO 99/21979中提供了乳头状瘤病毒载体的实施例。 α 病毒载体在其它地方可以是基因递送载体 α 病毒载体在本领域是已知的, 并在例如Carter, Curr Opin Biotech 3, 533-539 (1992)、Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol. 158, 97-129 (1992)、Schlesinger, Expert Opin Biol Ther. 1 (2), 177-91 (2001)、Polo et al., Dev Biol (Basel). 104, 181-5 (2000)、Wahlfors et al., Gene Ther. 7 (6), 472-80 (2000)、Colombage et al., Virology. 250 (1), 151-63 (1998) 以及WO 01/81609、WO 00/39318、WO 01/81553、WO 95/07994和WO 92/10578中有所描述。

[0892] 另一组病毒载体是疱疹病毒载体。在例如Lachmann et al., Curr Opin MoI Ther 1 (5), 622-32 (1999)、Fraefel et al., Adv Virus Res. 55, 425-51 (2000)、Huard et al., Neuromuscul Z (5), 299-313 (1997)、Glorioso et al., Annu Rev Microbiol. 49, 675-710 (1995)、Latchman, MoI Biotechnol. 2 (2), 179-95 (1994)、和Frenkel et al., Gene Ther. i (Suppl 1), S40-6 (1994) 以及US 6,261,552和US 5,599,691中描述了疱疹病毒载体的实施例。

[0893] 包括慢病毒载体在内的逆转录病毒载体在特定环境中也是有利的基因递送工具。在本领域已知有多种逆转录病毒载体。在Miller, Curr Top Microbiol Immunol 158.1-24 (1992)、Salmons and Gunzburg, Human Gene Therapy 4, 129-141 (1993)、Miller et al.,

Methods in Enzymology 217,581-599(1994)、Weber et al.,Curr Opin Mol Ther.3(5),439-53(2001)、Hu et al.,Pharmacol Rev.52(4),493-511(2000)、Kim et al.,Adv Virus Res.55,545-63(2000)、Pallu et al.,Rev Med Virol.10(3),185-202(2000)和Takeuchi et al.,Adv Exp Med Biol.465,23-35(2000)以及US 6,326,195、US 5,888,502、US 5,580,766和US 5,672,510中描述了逆转录病毒载体的实施例。

[0894] 腺病毒载体也是基因转移合适的病毒载体。腺病毒载体是本领域已知的,描述在例如Graham et al.,Mol Biotechnol 33(3),207-220(1995)、Stephenson,Clin Diagn Virol 10(2-3),187-94(1998)、Jacobs,Clin Sci(Lond).85(2),117-22(1993)、US 5,922,576、US 5,965,358和US 6,168,941和W098/22588、W098/56937、W099/15686、W099/54441和W000/32754中。用于本发明的腺病毒载体、疱疹病毒载体和Sindbis病毒载体描述在例如Jolly Cancer Gene Therapy 1,51-64(1994)、Latchman Molec Biotechnol 2,179-195(1994)和Johanning et al.,Nucl Acids Res 23,1495-1501(1995)中。

[0895] 其它合适的病毒载体包括痘病毒载体。这种载体的实施例描述在例如Berencsi et al.,J Infect Dis 183(8),1171-9(2001)、Rosenwirth et al.,Vaccine 19(13-14),1661-70(2001)、Kittlesen et al.,J Immunol 164(8),4204-11(2000)、Brown et al.,Gene Ther 7(19),1680-9(2000)、Kanesa-thasan et al.,Vaccine 19(4-5),483-91(2000)、Sten,Drua 60(2),249-71(2000)中。疫苗病毒载体可以是痘病毒载体。这种载体及其用途的实施例在例如Venugopal et al.,Res Vet Sci 57(2),188-193(1994)、Moss Dev Biol Stand 82,55-63(1994)、Weisz et al.,Mol Cell Biol 14,137-159(1994)、Mahr and Payne,Immunobiology 184(2-3),126-146(1992)、Hruby,Clin Microbiol Rev 3(2),153-170(1990)和W092/07944、W098/13500和W089/08716中提供。

[0896] 本发明的其它特征包括例如酵母、细菌和哺乳动物(例如,永生化哺乳动物细胞)这样的含核酸、载体或其组合的重组细胞。例如,在一个技术方案中,本发明提供含稳定整合在细胞基因组中,含表达本发明的CD38BP的编码序列的核酸的细胞。在一个技术方案中,本发明提供含例如质粒、粘粒、噬菌体粒或线性表达元件这样的包含编码表达CD38BP的序列的非整合核酸。

[0897] 本发明也提供含任何上述针对本发明的CD38BPs的抗原决定簇部分,例如针对-003和-005及-024的CD38抗原决定簇部分的免疫肽。这种免疫原可在含有活性免疫治疗的方法中用于引发直接的免疫应答。本发明进一步提供含这种CD38免疫原和融合部分序列的融合蛋白,该融合序列可提高融合蛋白半衰期(例如,包括免疫球蛋白结构域序列);利于融合蛋白检测和/或纯化(通过含例如荧光肽序列、报告酶序列、抗原决定簇标签、六组氨酸序列等);促进融合蛋白定位(例如,通过含有特异针对靶细胞上受体的配体或配体一部分);促进不同免疫应答的诱导(例如,对癌抗原或其免疫原片段应答)是细胞毒试剂;或完成任何其组合(例如,热休克融合蛋白伴侣可增加产生的针对融合蛋白非相似的异源抗原部分的免疫应答,而且也增加融合蛋白的体内半衰期)。融合蛋白也含有一个或多个切割位点,特别是在结构域间。

[0898] 这种肽的变异体和这种免疫原肽或免疫原肽变异体的衍生物是本发明的另一个特征(例如,这种CD38免疫原肽衍生物可通过化学偶联、基因融合、非共价相互作用等与其它例如抗体、递送、放射性同位素、细胞毒试剂或控制细胞生长的试剂这样的分子实体连接

而修饰)。例如,含CD38抗原决定簇序列的肽模拟表位也可作为疫苗候选者。这种肽也可用于抗CD38抗体的纯化。除了此处所述的B细胞抗原决定簇序列外,这种肽也被构建或选择或选择性地含有一个或多个抗CD38 T细胞抗原决定簇。这种抗原决定簇可通过本领域已知的任何合适技术进行鉴定(例如通过使用T细胞抗原决定簇预测软件)。

[0899] 在一个技术方案中,本发明提供编码这种免疫原肽的核酸。这种核酸可被合适的载体,例如复制缺陷靶载体(例如,靶核酸载体或复制缺陷的靶腺病毒载体)被递送到宿主中。本发明也提供一种或多种这样的免疫原肽和/或免疫原肽编码核酸的组分。

[0900] 本发明的CD38BPs包括“内在化”CD38BPs,例如内在化抗体。术语“内在化CD38BP”和“内在化抗体”是指能实质抑制或消除CD38相关肽的生物学活性的CD38BP或抗体。典型地,内在化CD38BP,例如内在化抗CD38抗体可直接或间接抑制CD38的功能,例如酶活性、信号转导、诱导细胞因子表达、诱导增殖或分化或诱导裂解,在程度上比由于给药约等量的-003或-005或-024而使这种细胞的抑制更大。

[0901] 本发明的CD38BP可对至少部分含在CD38中的一个或多个抗原决定簇具有任何合适的亲和性和/或强度。亲和性是指CD38BP与这种抗原决定簇结合的强度。典型地,亲和性通过解离常数 K_d 来测定, K_d 定义为 $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$,其中 $[Ab-Ag]$ 是抗体-抗原复合物(或CD38BP-抗原复合物)的摩尔浓度, $[Ab]$ 是未结合的抗体(或CD38BP)的摩尔浓度, $[Ag]$ 是未结合的抗原的摩尔浓度。亲和性常数 K_a 定义为 $1/K_d$ 。通过竞争作用测定特异性和亲和性的合适方法可在例如,Harlow et al.,*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988)、Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc, and Wiley InterScience N.Y., (1992, 1993) 和Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983) 中发现。

[0902] CD38BP,特别是本发明的抗CD38抗体可具有至少部分含在CD38中的至少一个抗原决定簇的亲和性的范围为 10^4 到约 $10^{10} M^{-1}$ 。典型地,此处术语免疫反应是指CD38BP与CD38抗原决定簇以解离常数 K_d 低于约 $10^{-4} M$ 的结合。

[0903] CD38BP可具有至少与-003和-005和-024相同的针对CD38的亲和性,在某些技术方案中,具有至少与-003和-005和-024相同的亲和性。亲和性可通过任何其它地方所述的本领域中的方法或其已知的等同方法来测定。一个用于测定亲和性的方法的实施例在Scatchard analysis of Munson&Pollard, *Anal. Biochem.* 107, 220 (1980) 中提供。结合亲和性也可通过平衡方法测定(例如,酶联免疫吸收检测方法(ELISA)或放射免疫检测(RIA)或动力学分析(例如BIACORE™分析)。

[0904] 典型地,诸如抗CD38抗体这样的本发明的CD38BPs的解离常数小于约100nM、小于约50nM、小于约10nM、小于约5nM或更少、小于约1nM或更少、小于约0.5nM或更少、小于约0.1nM或更少、小于约0.01nM或更少、或甚至小于约0.001nM或更少。

[0905] 诸如抗CD38抗体这样的本发明的CD38BPs可具有与-003和-005和-024相同的功能特征,例如可通过抗体依赖的细胞毒素作用(ADCC)和补体介导的细胞毒素作用(CDC)检测方法进行测定(参见,例如US 5500362)。

[0906] 在一个技术方案中,如本发明所述的肽不作为CD38的竞争剂,而作为CD38的拮抗剂。CD38的竞争剂是可激活CD38一个或多个功能的分子。这种功能包括黏附中的受体介导和信号事件和(外部)酶活性。另外,作为外部酶,CD38以 NAD^+ 底物,形成环化ADP-核糖

(cADPR) 和ADPR,而且也生成尼克酰胺和尼克酰胺-腺苷二核苷磷酸 (NAADP)。已表明cADPR 作为 Ca^{2+} 从内质网移动的第二信使。除了通过 Ca^{2+} 的信号传导,CD38信号传导可通过与T和B 细胞上的抗原-受体复合物或其它类型的受体复合物,例如MHC分子的交流而发生,并以这种方式参与到几种细胞应答中,而且也转换并分泌IgG1。

[0907] 在一个技术方案中,如本发明所述的肽不诱导PBMCs的显著增殖。在一个技术方案中,如本发明所述的肽不诱导IL-6水平的显著释放。在一个技术方案中,如本发明所述的肽不诱导可检测的IFN- γ 水平的释放。这种检测可如Ausiello et al., *Tissue antigens* 56, 538-547 (2000) 所述进行测定。

[0908] 本发明的抗CD38抗体和本发明的其它CD38BPs可通过重组表达在任何合适类型的细胞或动物中产生。

[0909] 重组CD38BPs,例如重组抗体,例如重组人抗体,包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的CD38BPs,例如抗体,例如人抗体,例如用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的CD38BPs,例如人抗体。

[0910] 重组抗体,例如重组人抗体也包括从重组的组合的人抗体文库中分离的抗体、从动物,例如转基因动物分离的抗体,或通过任何其它包括将人免疫球蛋白编码核酸序列与其它人免疫球蛋白编码核酸和人免疫球蛋白编码基因外源的核酸序列拼接的方式制备、表达、产生或分离的抗体。典型地,重组人抗体具有来源于人胚系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。但在特定技术方案中,这种重组人抗体进行体外突变(或使用动物转基因的人Ig序列时进行体内体细胞突变),从而使重组抗体的 V_L 和 V_H 区的氨基酸序列是来源于人胚系 V_H 和 V_L 序列并与其相关,可以是在体内人抗体胚系库中非天然存在的序列。本发明提供了这两种类型的人抗体。

[0911] 重组蛋白产生的合适方法是本领域已知的,参见例如(Sambrook and Russell (eds.), *Molecular cloning*, third edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA)。

[0912] 同样,抗体产生的合适方法是本领域已知的,包括那些描述在例如Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)、Harlow and Lane: *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999))、US 4,376,110和Ausubel et al., eds., *Current Protocols In Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc, and Wiley InterScience N.Y., (1987, 1992) 中的方法。单克隆抗体可通过首次描述在Kohler et al., *Nature* 256, 495 (1975) 中的杂交瘤方法,或通过其它已知的随后开发的方法(参见例如, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)) 制备。用于产生本发明的抗CD38抗体的产生的杂交瘤也在本发明中提供。这种杂交瘤可通过化学融合、电融合或任何其它合适的技术与任何合适类型的骨髓瘤、异骨髓瘤、淋巴母细胞、浆细胞或其等同的细胞和任何合适类型的抗体表达细胞融合。转化的永生B细胞也可用于有效产生本发明的抗体,因此也在本发明中提供。这种细胞可提供标准技术,例如用Epstein Barr病毒或转化基因的转化来制备(参见,例如"Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity," Zurawaki, V.R. et al., in *Monoclonal Antibodies*, ed. by Kennett

R.H. et al., Plenum Press, N.Y. 1980, pp19-33.)。因此,稳定的连续的和/或永生化抗CD38抗体表达细胞和细胞系是本发明的一个特征。含CD38BP编码或CD38BP片段编码核酸的真核和原核细胞(例如,酵母细胞、连续和/或永生化哺乳动物细胞系(例如,淋巴抗体产生细胞衍生的细胞系)、植物细胞、昆虫细胞和诸如大肠杆菌这样的细菌细胞等)在本发明中提供。表达本发明的抗CD38抗体转基因动物,例如非人灵长类、啮齿类(例如大鼠、豚鼠和田鼠-包括其修饰株,例如联合免疫缺陷鼠(SCID和其它免疫兼容的动物株)、狗等也在本发明中提供。

[0913] 含编码CD38BP的外源核酸的重组细胞可通过任何合适的技术(例如,用裸露DNA质粒载体、病毒载体、侵入性细菌细胞载体或其它全细胞载体等转染/转化,包括通过磷酸钙沉淀的转染、受体介导的定位和转染、生物弹射击递送、电穿孔、葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转化、原生质体融合、直接微注射等方法将CD38BP编码序列(或序列)递送到细胞中)制备。转化/转染细胞的方法是本领域已知的(参见,例如Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2d Edition, 1989 and 3rd Edition, 2001) 和 F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987)。这种重组细胞是本发明的一个特征。

[0914] 作为宿主用于重组蛋白蛋白的细胞系是本领域周知的,包括多种可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得的永生化细胞系。这些细胞系中包括、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、NS0、SP2细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝癌细胞(例如Hep G2)、A549细胞及多种其它细胞系。其它可用的细胞系是诸如Sf9细胞这样的昆虫细胞系。当编码诸如CD38BP(包括抗CD38抗体)这样的蛋白的核酸(或含核酸的载体)导入到哺乳动物宿主细胞中时,诸如CD38BP这样的蛋白可通过将宿主细胞培养足以及在宿主细胞中表达诸如CD38BP这样的蛋白或将诸如CD38BP这样的蛋白分泌到宿主细胞生长的培养基中的时间而产生。可用标准蛋白纯化方法从培养基中回收CD38BP。当没有分泌信号而直接表达时,也可从宿主细胞裂解物中回收CD38BP。

[0915] CD38BP,例如抗CD38抗体,也可在细菌细胞和真核单细胞微生物,例如酵母中产生。产生诸如抗CD38抗体这样的CD38BP的细菌细胞典型地缺少正常的糖基化,因此细菌细胞产生的抗CD38抗体或多或少会在哺乳动物细胞和/或动物中产生的抗CD38抗体相关的ADCC功能和其它免疫应答方面(例如,NK细胞的募集)有缺陷。酵母细胞产生的CD38BP,例如抗CD38抗体通常具有与哺乳动物细胞中产生的抗体类型不同的糖基化模式。但在酵母中产生具有有效糖基化的抗体的方法目前已由公司,例如Glycofi, Inc. (Lebanon, NH, USA) 开发出来。也参见Wildt S et al., Nat Rev Microbiol. 3(2), 119-28 (2005)。

[0916] 当编码CD38BP基因(包括抗CD38抗体基因)的重组表达载体导入到哺乳动物宿主细胞中时,可通过将宿主细胞培养足以及在宿主细胞中表达CD38BP或将抗体分泌到宿主细胞生长的培养基中的时间而产生CD38BP。抗体和其它CD38BP从细胞培养物、细胞裂解物和动物(例如,从产生抗CD38抗体的转基因动物的腹水液中)中的纯化可通过使用任何本领域已知的合适技术,例如免疫亲和柱纯化;硫酸盐沉淀;色谱聚焦;制备型SDS-PAGE等来完成。

[0917] 本发明的人单克隆抗体也可通过各种其它技术,包括传统的单克隆抗体方法,例如Kohler and Milstein, Nature 256, 495 (1975) 中所述的标准体细胞杂交技术来产生。其

它产生单克隆抗体的技术也可使用,例如使用人抗体基因文库的噬菌体展示技术。在一个技术方案中,通过使用杂交瘤产生的本发明的抗CD38抗体在鼠系统中产生。在鼠中产生杂交瘤是非常成熟的流程。免疫流程和分离用于融合的免疫的脾细胞的技术是本领域已知的。融合部分(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。

[0918] 为了产生全长的针对CD38的人单克隆抗体,含人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体鼠(例如HCo12、HCo7或KM鼠)可用CD38抗原和/或表达CD38的细胞的富集产物来免疫,例如,如Lonberg et al., (1994)、同上, Fishwild et al., (1996)、同上,及WO 98/24884所述。选择性地,可用编码人CD38的DNA免疫鼠。在第一次融合时鼠可以为6-16周龄。例如,CD38抗原的富集产物(5-50 μ g)可用于腹膜内免疫HuMAb鼠。在免疫过程中使用纯化的或富集的CD38抗原产物未产生抗体时,也可以用表达CD38的细胞,例如细胞系来免疫鼠,以促进免疫应答。

[0919] 使用各种抗原的积累经验表明,当用含在完全弗氏佐剂中的CD38表达细胞进行腹膜内(i.p.)或皮下(s.c.)初始免疫,然后每隔1周用含在PBS中的CD38表达细胞进行i.p.免疫(共10次以上),可以在HuMAb转基因鼠中产生最大的应答。可在免疫流程中用眶后采血获得的血浆样品来监测免疫应答。可通过FACS分析筛选血浆,具有足够滴度的抗CD38人免疫球蛋白的鼠可用于融合。鼠可在处死并除去脾的3天前用CD38表达细胞进行静脉内注射,如实施例4所述。

[0920] 为了产生可生产针对人CD38的人单克隆抗体的杂交瘤,从免疫鼠中分离脾细胞和淋巴结细胞,并与合适的永生化细胞系,例如鼠骨髓瘤细胞系融合。然后筛选可产生抗原特异的抗体的杂交瘤。例如,将来自免疫鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与SP2/0非分泌鼠骨髓瘤细胞(ATCC, CRL 1581)用50%PEG(w/v)融合。在平底微孔板中放置细胞,每孔约 1×10^5 ,然后在除通用试剂外,含10%胎克隆血清、5-10%Origen杂交瘤克隆因子(IGEN)1 $\times$ HAT(Sigma)的选择培养基中培养2周。约2周后,可在用HT替换HAT的培养基中培养细胞。然后通过针对含 κ -轻链的抗体的ELISA和通过使用具有CD38特异性的CD38表达细胞的FACS分析来筛选各个孔。当大量的杂交瘤生长时,在10-14天后观察培养基。可重新放置分泌抗体的杂交瘤,再次筛选,如果对人IgG仍为阳性,则可将抗CD38单克隆抗体通过有限稀释至少亚克隆2次。然后在体外培养稳定的亚克隆,以在组织培养基中产生用于鉴定的抗体。

[0921] 本发明的人抗体也可在宿主细胞转染瘤中联合使用例如本领域已知的重组DNA技术和基因转染方法来产生,参见例如Morrison, S., Science 229, 1202 (1985)。

[0922] 例如,为了表达抗体或其抗体片段,可通过标准分子生物学技术(例如PCR、定点突变)获得编码部分或全长轻链和重链的DNAs,并将其插入到表达载体中,从而使基因与转录和翻译控制序列可操作连接。在本文中,术语“可操作连接”是指抗体基因与载体连接,从而使载体中的转录和翻译控制序列行使调控抗体基因的转录和翻译的功能。表达载体和表达控制序列选择为与所用的表达宿主细胞兼容的序列。可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入到不同载体中,或更典型地,两个基因插入到相同的表达载体中。可通过标准方法(例如,抗体基因片段和载体的互补限制性位点的连接,或如果不存在限制性位点,则进行平末端连接)将抗体基因插入到表达载体中。此处所述的抗体轻链和重链可变区可通过将任何抗体同种型的全长抗体基因插入到已有编码所需同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,从而使V_H片段与载体中的CH片段可操作连接,V_L片段与载体中的C_L片段可操作连接

而获得。另外,或选择性地,重组表达载体可编码利于抗体链从宿主细胞中分泌的信号肽。可将抗体链基因克隆到载体中,从而使信号肽同框连接到抗体链基因的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白的信号肽或异源信号肽(例如,来自非免疫球蛋白的蛋白信号肽)。

[0923] 除了抗体链基因,本发明的重组表达载体可携带调控抗体链基因在宿主细胞中表达的调控序列。

[0924] 除了抗体链基因和调控序列外,本发明的重组表达载体可携带其它序列,例如调控载体在宿主细胞中复制的序列(例如复制起点)和选择标记基因。选择标记基因利于在引入载体的宿主细胞中进行筛选(参见例如US 4,399,216、US 4,634,665和US 5,179,017)。例如,典型地,选择标记基因可在引入载体的宿主细胞中赋予对药物,例如G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。选择标记基因的例子包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于在dhfr宿主细胞中用甲氨蝶呤筛选/扩增)和neo基因(用于G418筛选)。

[0925] 为了表达轻链和重链,将编码重链和轻链的表达载体通过标准技术转染到宿主细胞中。宿主细胞可以是原核或真核宿主细胞,例如哺乳动物。例如,可在原核宿主细胞中表达抗原结合片段,在真核宿主细胞中表达全长抗体。

[0926] 在一个技术方案中,抗体在真核细胞,例如哺乳动物宿主细胞中表达。在哺乳动物宿主细胞中表达本发明的重组抗体的实施例包括CHO细胞(包括dhfr-CHO细胞,在Urlaub and Chasin,PNAS USA 77,4216-4220(1980)描述,以DHFR为筛选标记,例如在R.J.Kaufman and P.A.Sharp,Mol.Biol.159,601-621(1982)中描述)、NS/O骨髓瘤细胞、COS细胞、HEK293细胞和SP2.0细胞。特别是使用NS/O骨髓瘤细胞,表达系统的另一个实施例是GS(谷氨酰胺合成酶)基因表达系统,在W087/04462、W089/01036和EP338841中描述。

[0927] 可在其它表达系统,包括原核细胞,例如微生物,例如产生scFv抗体的大肠杆菌、藻类和昆虫细胞中表达CD38BP。另外,可在转基因非人动物,例如羊和兔奶或鸡蛋,或转基因植物中表达CD38BPs。参见例如Verma,R.et al.,J.Immunol.Meth.216,165-181(1998)、Pollock et al.,J.Immunol.Meth.23J.,147-157(1999)和Fischer,R.et al.,Biol.Chem.380,825-839(1999)。

[0928] 本发明的双特异性和多特异性CD38BPs可通过化学技术、“Polydome”技术(参见US 4,474,893)或重组DNA技术制备(参见例如D.M.Kranz et al.,PNAS USA 78,5807(1981))。

[0929] 本发明的双特异性抗体可通过各种已知的方法,包括杂交瘤融合或Fab'片段连接(参见,例如Songsivilai&Lachmann,Clin.Exp.Immunol.79,315-321(1990)和Kostelny et al.,J.Immunol.M8,1547-1553(1992))来产生。传统地,双特异性抗体的重组产生是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两个重链具有不同的特异性(参见例如,Milstein and Cuello,Nature 305,537(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分选,这些杂交瘤(四源杂交瘤)可产生约10中不同抗体分子的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。类似流程在W0 93/08829和Traunecker et al.,EMBO J.10,3655(1991)中描述。

[0930] 根据不同的方法,将具有所需结合特异性的抗体可变结构域(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定结构域序列通过重组或合成方法融合在一起。可变结构域序列典型地与含至少部分铰链、C_H2和C_H3区的免疫球蛋白重链恒定结构域融合。而且典型地,在融合肽中至少也存在一个含轻链结合所需位点的第一重链恒定区(C_H1)。在这种方法的具体实

施例中,产生的双特异性抗体含有在一个臂具有第一结合特异性的免疫球蛋白重链的杂交体,另一个臂为免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)的杂交体。这种非对称结构可利于从不需要的免疫球蛋白链组合中分离所需的双特异性化合物(这种方法描述在W0 94/04690中)。对产生双特异性抗体的进一步细节,参见例如Suresh et al.,*Methods in Enzymology* 121,210(1986)。

[0931] 在另一种方法中,一对抗体分子的交界处通过构建以使从重组细胞培养物中回收的异源二聚体,从而形成双特异性抗体分子群的比例最大化。典型地,这种交界处含至少一部分抗体恒定区的C_H3结构域。通常在这种方法中,将第一抗体分子交界处的一个和多个具有较小的侧链的氨基酸残基用具有较大侧链的氨基酸残基(例如酪氨酸或色氨酸)替代。通过用较小残基(例如丙氨酸或苏氨酸)替代较大氨基酸侧链残基,则在第二抗体分子交界处产生与大侧链氨基酸残基具有相同或相似大小的补偿性“洞穴”。这可增加异源二聚体而不是其它不需要的诸如同源二聚体这样的终产物的产量。

[0932] 本发明的双特异性和多特异性分子可通过本领域已知的方法偶联具有结合特异性,例如抗FcR和抗CD38结合特异性的构建体而制备。当结合特异性是蛋白或肽时,可使用各种偶联或交联试剂进行共价偶联。交联试剂的实施例包括蛋白A、碳二亚胺、S-乙酰基-巯基乙酸N-羟基丁二酰亚胺酯(SATA)、5,5'双(4-硝基-3-羧基苯)二硫化物(DTNB)、o-亚苯基顺丁烯二酰亚胺(oPDM)、3-(2-吡啶二巯基)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SPDP)和磺基琥珀酰亚胺基4-[马来酰亚胺甲基]-环己烷-1羧酸盐(sulfo-SMCC),参见,例如Karpovsky et al.,*J.Exp.Med.*160,1686(1984)、Liu,M.A.et al.,*PNAS USA* 82,8648(1985)。在另一个实施例中,Brennan et al.,*Science* 229,81(1985)描述了将完整抗体蛋白酶裂解产生F(ab')₂片段的流程。这些片段在存在可稳定邻近二硫,并抑制分子内二硫键形成的巯醇配位试剂亚砷酸钠时被还原。然后将产生的Fab'片段转变为硝基苯甲酸(TNB)衍生物。然后将其中一种Fab'-TNB衍生物通过用半胱胺还原再次转变为Fab'-巯醇,并与等量的其它Fab'-TNB衍生物混合而形成双特异性抗体。Shalaby et al.,*J.Exp.Med.*175,217-225(1992)根据相关技术,描述了完全人源化双特异性抗体F(ab')₂分子的产生。其它方法包括那些Paulus(Behring Ins.Mitt.No.78,118-132(1985))和Glennie et al.,*J.Immunol.*139,2367-2375(1987)描述的方法。偶联试剂的实施例有SATA和sulfo-SMCC,均可从Pierce Chemical Co.(Rockford,IL)获得。

[0933] 当结合特异性是抗体时,它们可通过两个重链铰链区的C末端巯基键偶联。在一个技术方案中,可在偶联前修饰铰链区使其含奇数数目例如1个的巯基残基。

[0934] 选择性地,两种结合特异性可在同一个载体上编码,并在同一个宿主细胞中表达和组装。这种方法在双特异性和多特异性分子是mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')₂或配体×Fab融合蛋白时特别有用。本发明的双特异性和多特异性分子,例如双特异性分子可以是单链分子,例如单链双特异性抗体、含一个单链抗体和结合决定簇的双特异性分子,或含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性和多特异性分子也可以是单链分子或可含有至少两个单链分子。制备双和多特异性分子的方法在例如US 5,260,203、US 5,455,030、US 4,881,175、US 5,132,405、US 5,091,513、US 5,476,786、US 5,013,653、US 5,258,498和US 5,482,858中描述。

[0935] 已描述了各种直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的技术。例

如,可通过亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见,例如Kostelny et al.,J.Immunol.148(5),1547-1553(1992))。来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽可与两个不同抗体的Fab'部分通过基因融合而连接,得到的抗体同源二聚体在铰链区还原,从而形成可重新氧化的单体,以形成抗体异源二聚体。在中Hollinger et al.,PNAS USA 90,6444-6448(1993)描述的“双功能抗体”技术也提供了制备双特异性抗体片段的选择方案。已报道另一种使用单链Fv(sFv)二聚体制备双特异性抗体片段的策略是。参见例如Gruber et al.,J.Immunol.152,5368(1994)。

[0936] 另外,双特异性抗体可形成“双功能抗体”(Holliger et al.,PNAS USA,90,6444-6448(1993))或“Janusins”(Traunecker et al.,EMBO J 10,3655-3659(1991)和Traunecker et al.,Int J Cancer Suppl7,51-52(1992))。定义的双特异性抗体不存在具有单个结合位点的片段形式(例如Fab、Fab'和Fv片段,也由本发明提供)。

[0937] 双特异性和多特异性分子与其靶标的结合可通过酶联免疫吸收测定法(ELISA)、放射性免疫检测(RIA)、FACS分析、生物检测(例如生长抑制)或Western印迹检测法来确定。这些方法每种通常都是通过使用针对目的复合物的标记试剂(例如抗体)检测目的蛋白-抗体复合物的存在。例如,FcR-抗体复合物可用例如识别和特异结合抗体-FcR复合物的酶联抗体或抗体片段来检测。选择性地,可通过任何其它各种免疫检测法来检测复合物。例如,抗体可进行放射性标记,使用放射性免疫检测法(RIA)来检测(参见,例如Weintraub,B.,Principles of Radioimmunoassays,Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques,The Endocrine Society,March,1986)。在这种方法中,使用 γ 计数器或闪烁计数器或通过自显影来检测放射性同位素。

[0938] 如前所述,抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDRs)的氨基酸残基与靶抗原相互作用。本发明提供具有与来源于-003或-005或-024的CDR区相同或其衍生的CDR区的抗体。这种抗体可通过构建包括将来自-003或-005或-024的CDR序列移植到具有不同特性的不同抗体的框架序列中的表达载体而产生。

[0939] 这种框架序列可从含胚系抗体基因序列的公共DNA数据库获得。这些胚系序列由于不完全包括在B细胞成熟时通过V(D)J连接形成的组装可变基因,因此不同于成熟抗体基因序列。胚系基因序列也不同于在可变基因,典型地集中在CDRs中的高亲和力的第二抗体的序列。例如,体细胞突变在框架区1的氨基末端部分和框架区4的羧基末端部分相对较少。因此,不需获得特定抗体完整的DNA序列来重新产生完整的具有与原始抗体相似结合化学的重组抗体(参见WO 99/45962)。部分跨越CDR区的重链和轻链序列用于测定参与重组抗体可变基因中的胚系可变和连接基因片段。然后用胚系序列填充可变区的缺失部分。重链和轻链引导序列在蛋白成熟时被切割,不参与最终抗体的特性。为了增加缺失的序列,将克隆的cDNA序列与合成的寡核苷酸通过连接或PCR扩增进行连接。选择性地,完整的可变区可通过合成为一组短的重叠的寡核苷酸,并通过PCR合并而产生完整的合成的可变区克隆。该过程具有特定的优势,例如可删除或插入特定的限制性位点,或优化特定的密码子。

[0940] 来自杂交瘤的重链和轻链转录子的核苷酸序列可用于设计一组重叠的合成寡核苷酸而产生具有与天然序列相同的氨基酸编码能力的合成的V序列。合成的重链和 κ 链序列可在三个方面不同于天然序列:打断重复核苷酸碱基的排列,以利于寡核苷酸合成和PCR扩增;根据Kozak的原则(Kozak,J.Biol.Chem.266,19867-19870(1991)引入优化的翻译起始

位点;和在翻译起始位点上游构建HindIII位点。

[0941] 对重链和轻链可变区而言,优化的编码和对应的非编码链序列在相应的非编码核苷酸寡核苷酸的中部打断为30-50个核苷酸。因此,对每条链而言,寡核苷酸可组装为重叠的双链形式,跨越150-400个核苷酸。然后以其作为模板,产生150-400个核苷酸的PCR扩增产物。典型地,单个可变区寡核苷酸组将打断为2组,分别扩增产生两个重叠的PCR产物。然后将这些重叠的产物通过PCR扩增连接,形成完整的可变区。在PCR扩增中也需要重链或轻链恒定区(包括 κ 轻链的BbsI位点,或 γ 重链的AgeI位点)的重叠片段,以产生可易于克隆到表达载体构建体中的片段。

[0942] 然后将重新构建的重链和轻链可变区与克隆的启动子、引导序列、翻译起始区、恒定区3'非翻译区、多聚腺苷化和转录终止区、形成表达载体构建体的序列连接。重链和轻链表达构建体也可与单个载体共转染、顺序转染或单独转染到宿主细胞中,然后融合而从宿主细胞中表两条链。

[0943] 相似的流程可用于将新型抗原特异性移植到存在的成熟抗体中。典型地,受体抗体选自来源于相同的可变胚系基因作为CDR供体的抗体,但也可选择其它受体抗体。然后将供体抗体中的一个或多个CDRs通过上述技术进行转移。

[0944] 在本发明的一个技术方案中,-003和005和-024的结构特征用于产生结构相关的至少保留-003和005和-024的一个功能特性,即与CD38结合的抗CD38抗体,例如人抗CD38抗体。更具体地,可将-003和005和-024的一个或多个CDR区与已知的人框架区和CDRs连接,从而产生本发明的其它重组构建的人抗CD38抗体。

[0945] 用于构建人IgG κ 的表达载体的示例质粒如下所述。构建质粒,使PCR扩增的V κ 重链和V κ 轻链cDNA序列用于重新构建完整的重链和轻链微基因。这些质粒可用于表达完整的人IgG1, κ 或IgG4, κ 抗体,类似的质粒可构建以表达其它重链同型体,或表达含 λ 轻链的抗体。

[0946] 本发明的CD38BPs,例如本发明的人抗CD38抗体可通过多种不同方式分离和鉴定,例如,可将筛选的杂交瘤在合适的烧瓶中培养以进行单克隆抗体纯化。然后在用蛋白A-葡聚糖的亲层析(对IgG1同型体抗体而言)(Pharmacia,Piscataway,NJ)或抗人IgG包被的葡聚糖,或对IgG3同型体抗体而言用蛋白G-葡聚糖进行亲和层析之前过滤上清,并进行浓缩。洗脱的IgG可通过凝胶电泳和高效液相色谱来检测以保证纯度。缓冲液可使用PBS,浓度可通过用1.43消光系数来测定OD₂₈₀。等分单克隆抗体并在-80℃保存。

[0947] 为了测定是否筛选的CD38BPs,例如人抗CD38单克隆抗体与特定的抗原决定簇结合,可使用定点或多点突变技术。

[0948] 为了测定纯化抗体的同种型,可进行同种型ELISAs。微孔板的孔可用10 μ g/ml抗人Ig在4℃包被过夜。板用5%BSA(牛血清蛋白)封闭后,与10 μ g/ml单克隆抗体或纯化的同种型对照在室温下反应2个小时。然后将孔与人特异IgG1、IgG2、IgG3或IgG4、IgE、IgA1、IgA2或人IgM的偶联碱性磷酸酶的探针反应。洗涤后,用pNPP底物(1mg/ml)对板显色,并通过405nm处的OD进行分析。

[0949] 可使用流式细胞仪来检测抗CD38抗体在免疫鼠的血清中的存在或CD38BPs(包括抗CD38抗体)与表达CD38的活细胞的结合。简言之,表达CD38的细胞系(在标准生长条件下生长)与各种浓度的溶在含0.1%BSA和0.02%叠氮化钠的PBS中的CD38BP混合,在4℃温育30分钟。洗涤后,将细胞与荧光素标记的抗人IgG抗体在与一抗染色相同的条件下进行反

应。可用流式细胞仪(例如Becton Dickinson FACS仪)通过流式细胞仪对样品进行分析,以日光和侧向光散射特性来对单个活细胞设门。可使用通过荧光显微镜技术的方法(除外或替代)流式细胞仪方法。可如上所述对细胞进行染色,并通过荧光显微镜进行检测。该方法可观察单个细胞,但根据抗原密度可能降低灵敏度。

[0950] CD38BPs,例如CD38人IgGs可进一步通过Western印迹检测对CD38抗原的反应性。简言之,制备表达CD38细胞的细胞提取物,并进行十二烷基磺酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜上,用20%脱脂奶粉封闭,并用待测的CD38BPs进行检测。可用抗人IgG碱性磷酸酶来检测人IgG的结合,用BCIP/NBT底物片(Sigma Chem.Co.,St.Louis,MO)进行显色,但也可用CD38BP其它特异部分来直接检测。

[0951] 除了与CD38特异结合外,可检测CD38BPs(包括人抗CD38抗体)对表达CD38的细胞的各种活性,例如,但不限于胰岛素产生、 Ca^{2+} 释放、细胞因子产生、裂解诱导作用、分化和增殖的抑制作用。

[0952] 在一个技术方案中,本发明提供可表达特异结合CD38的人抗体的转基因和转染色体非人动物,例如转基因或转染色体鼠。在一个特定技术方案中,本发明提供具有含人重链转基因的基因组的转基因或转染色体鼠,当用表达CD38的细胞免疫时,该鼠可产生人抗CD38抗体。在转基因情况下,人重链转基因可整合到鼠染色体DNA中,例如HuMAb鼠,如下详细描述。选择性地,在转染色体鼠(例如KM)情况下,人重链转基因可在染色体外维持,如WO 02/43478所述。这种转基因和转染色体动物可通过V-D-J/V-J重组和同种型转换而产生多种针对CD38的人单克隆抗体的同种型(例如IgG、IgA和/或IgE)。对具有异源抗体库的外源抗原刺激应答的转基因或转染色体非人动物的设计需要转基因动物中所含的异源免疫球蛋白转基因在B细胞发育过程中正确行使功能。这包括,例如异源重链转基因的同种型转换。因此,构建转基因,使其可诱导同种型转换及具有一个或多个以下抗体基因的特征:(1)高水平 and 细胞类型特异的表达,(2)功能性基因重排,(3)激活并对等位基因排除有应答,(4)表达足够的一级库,(5)信号转导,(6)体细胞高突变,及(7)在免疫应答中转基因抗体座位是显性的。

[0953] 并不是所有前述标准都满足。例如,在某些技术方案中,其中转基因动物的内源免疫球蛋白座位是被功能上破坏的,转基因不需激活等位基因排除反应。另外,在某些技术方案中,其中转基因含功能性重组的重链和/或轻链免疫球蛋白基因,因此功能性基因重组的第二个标准是不需要的,至少对转基因已经重组的情况而言。对于分子免疫学背景,参见,Fundamental Immunology,2nd edition(1989)、Paul William E.,ed.Raven Press,N.Y.

[0954] 在特定技术方案中,转基因或转染色体非人动物用于在转基因动物的胚系中产生含重组的、未重组的或同时含有重组和未重组的异源免疫球蛋白重链和轻链转基因的本发明的人单克隆抗体。每种重链转基因含有至少一个 C_H 基因。另外,重链转基因可含有功能性同型体转换序列,可支持在转基因动物的B细胞中编码多个 C_H 基因的异源转基因的同种型转换。这种转换序列是那些在作为转基因 C_H 基因来源的物种中的胚系免疫球蛋白座位中天然存在的序列,或这种转换序列来源于那些在接受转基因构建体的物种(转基因动物)中存在的序列。例如,用于产生转基因鼠的人转基因构建体如果整合了那些与鼠重链座位天然存在的序列相似的转换序列,则可产生高频率的同种型转换事件,可能鼠转换序列优先对鼠转换重组酶系统起作用,而人转换序列不是这样。可通过常规克隆方法分离和克隆转换

序列,或从基于免疫球蛋白转换区序列相关的公布的序列信息设计的重叠的合成寡核苷酸从头合成(Mills et al.,Nucl.Acids Res.15,7305-7316(1991)Sideras et al.,Intl.Immunol.1,631-642(1989))。对每种前述转基因动物而言,在转基因动物的B细胞中发现大部分有功能的重组异源重链和轻链免疫球蛋白转基因(至少10%)。

[0955] 用于产生本发明的转基因非人动物的转基因包括含编码至少一个可变基因片段、一个多样性基因片段、一个连接基因片段和至少一个恒定区基因片段的DNA的重链转基因。免疫球蛋白轻链转基因含有编码至少一个可变基因片段、一个连接基因片段和至少一个恒定区基因片段的DNA。编码轻链和重链基因片段的基因片段对转基因动物是异源的,因为它们来源于或对应于编码来自不组成转基因非人动物的物种的免疫球蛋白重链和轻链基因片段的DNA。在本发明的一个技术方案中,构建转基因,使单个基因片段不重组,即不重排以编码功能性免疫球蛋白轻链或重链。这种未重排的转基因可支持V、D和J基因片段的重组(功能性重组),而且支持当暴露到CD38抗原中,所有或部分D区整合在转基因动物中所得到的重组免疫球蛋白重链中。

[0956] 在选择的技术方案中,转基因含有未重组的“微座位”。这种转基因典型地含有C、D和J片段的实质部分,及V基因片段的亚组。在这种转基因构建体中,各种调控序列,例如启动子、增强子、种类转换区、RNA加工中的拼接供体和拼接受体序列、重组信号等均含有来自异源DNA的相应序列。这种调控序列可整合到来自本发明所用的非人动物相同或相关的物种中的转基因中。例如,人免疫球蛋白基因片段可与转基因中用于转基因鼠的啮齿类免疫球蛋白增强子序列连接。选择性地,合成的调控序列可整合在转基因中,其中这种合成的调控序列不与已知天然存在于哺乳动物基因组中的功能DNA序列同源。合成的调控序列根据同一性原则进行设计,例如,那些特异针对拼接受体位点或启动子/增强子元件的允许序列。例如,与天然存在的胚系Ig座位相比较,微座位含有至少一个内部(即不在部分的末端)缺失非必需DNA部分(例如,干扰序列;内含子或其内含子或部分)的基因组免疫球蛋白座位。

[0957] 转基因和转染色体非人动物例如鼠的实施例具有显著的免疫球蛋白产生的库,理想地,在调整体积后与人的库实质上相似。

[0958] 在调整体积后,人的库理想地通常密度至少约为10%或更高,例如25%到50%或更多。通常,构建引入到鼠基因组中的V、J和D区的不同数目及V(-D-)J基因片段重组的其它多样性和连接区的随机核苷酸增加,可产生至少约1000个不同的免疫球蛋白(理想地为IgG1),例如 10^4 到 10^6 或更多。典型地,免疫球蛋白对预选的抗原的亲合性低于 10^{-8} M,例如低于 10^{-9} M、 10^{-10} M或 10^{-11} M,或甚至更低。如上所述的转基因和转染色体非人动物,例如鼠可用例如表达Cd38的细胞免疫。选择性地,转基因动物可用编码人CD38的DNA免疫。然后动物产生B细胞,并通过转换重组(顺式转换)进行种类转换,并表达与CD38反应的免疫球蛋白。免疫球蛋白是人抗体(也称为“人序列抗体”),其中重链和轻链多肽由包括体细胞突变衍生的序列和V区重组连接序列及胚系编码序列的人转基因序列编码;这些人抗体是指实质上与人 V_L 和 J_L 或 V_H 、 D_H 和 J_H 基因片段编码的多肽序列相同,即使由于体细胞突变和不同的V-J和V-D-J重组连接而存在其它非胚系序列。每个抗体链的可变区典型地与胚系V和J基因片段同源性为80%,对重链而言,人胚系V、D和J基因片段通常与转基因中存在的人胚系序列的同源性至少为85%;通常90或95%或更高。但由于非胚系序列通过体细胞突变和VJ和VDJ连

接而被引入,因此人序列抗体通常具有某些不被在鼠的胚系中的人转基因中的人V、D或J基因片段所编码的某些可变区序列。典型地,这种非胚系序列(或单个核苷酸位置)将成簇存在并邻近CDRs,或在簇中的体细胞突变是已知的区域。

[0959] 本发明也提供来源于此处所述的转基因或转染色体非人动物的B细胞。B细胞可用于产生表达与人CD38以高亲和性(例如,解离平衡常数(K_D)低于 10^{-8} M)结合的人单克隆抗体的杂交瘤。因此,在一个技术方案中,本发明提供产生亲和性(K_D)低于 10^{-8} M,例如低于 10^{-9} M、 10^{-10} M或 10^{-11} M,或甚至更低的人抗体,用放射性标记的单克隆抗体通过斯卡查德分析或通过FACS分析测定最大半衰期结合浓度、或通过表面等离子共振分析在BIAcore仪器上进行测定。本发明提供含由以下组成的抗CD38抗体,其中人序列轻链含有(1)具有实质上与由人 V_L 基因片段和人 J_L 片段编码的多肽序列相同的多肽序列的轻链可变区,及(2)由人 C_L 基因片段编码的轻链恒定区;人序列重链含有(1)具有实质上与由人 V_H 基因片段、D区和人 J_H 片段编码的多肽序列相同的多肽序列的轻链可变区,及(2)由人CH基因片段编码的轻链恒定区。应注意人D基因实质上通过重组和体细胞突变事件而发生改变,从而可能不易于识别原来的人胚系序列。

[0960] 针对CD38的高亲和性人单克隆抗体的开发可通过扩展具有含整合的人免疫球蛋白转基因的基因组的转基因非人动物中的人可变区基因片段的文库的方法来进行,所述方法包括,将含不存在于所述整合的人免疫球蛋白转基因中的V区基因片段的V基因转基因整合到基因组中。通常,V区转基因是含有部分在人基因组中天然存在或通过重组方法拼接在一起的人 V_H 或 V_L (V_K)基因片段阵列的酵母人工染色体(YAC),这些片段包括无序的或省略的V基因片段。通常至少在YAC中含5个或更多功能性V基因片段。在这种变化中,可通过V文库扩展方法制备转基因动物,其中动物表达含有由存在于V区转基因上的V区基因片段编码的可变区序列和人Ig转基因上编码的C区的免疫球蛋白链。通过V文库扩展方法,可产生具有至少5个不同V基因的转基因动物;例如含至少约34个V基因或更多的动物。某些V基因片段可能是没有功能的(例如,假基因等);如果需要,这些片段可通过技术人员已知的重组方法被保留或选择性删除。

[0961] 当构建含具有扩展的V片段文库的功能性YAC的鼠胚系,实质上不存在含J和C基因片段的人Ig转基因时,则可扩增该特性,并扩增到其它遗传背景,包括其中具有扩展的V片段文库的功能性YAC导入到具有不同的人Ig转基因的非人动物胚系的背景。多个具有扩展的V片段文库的功能性YACs可导入到胚系中,使其与人Ig转基因(或多个人Ig转基因)一起起作用。虽然此处是指YAC转基因,但如果这种转基因整合到实质上缺失酵母序列的基因组中时,例如在酵母中需自主复制序列中;则这种序列在酵母复制后不再需要时(即,在导入到鼠ES细胞或鼠原接合子(prozygote)中之前),可选择性地通过基因工程(例如,限制性消化和脉冲凝胶电泳或其它合适的方法)除去。扩增人序列免疫球蛋白表达的方法包括培养具有人Ig转基因,选择性地也具有含扩展的V片段文库的功能性YAC的转基因动物。 V_H 和 V_L 基因片段均可存在于YAC中。转基因动物可在任何实验人员所需的背景中培养,包括含有其它人转基因,包括人Ig转基因和/或编码其它人淋巴细胞蛋白的转基因的背景。本发明也提供由具有扩展的V区文库YAC转基因产生的高亲和性人序列免疫球蛋白。虽然以上描述了本发明的转基因动物的特定技术方案,其它划分在以下3类中的技术方案是期望的:

[0962] I. 含未重组重链和重组轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物;

[0963] II.含未重组重链和未重组轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物;及

[0964] III.含重组重链和未重组轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物。

[0965] 在一个技术方案中,本发明提供含治疗有效量的本发明的CD38BP的药物组合物。药物组合物可由药学上可接受的载体或稀释剂和其它已知的佐剂和赋形剂通过例如在 Remington:The Science and Practice of Pharmacy,19th Edition,Gennaro,Ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA11995中描述的传统技术制备。

[0966] 药学上可接受的载体或稀释剂和任何其它已知的佐剂和赋形剂对本发明所选的化合物和所选的给药方式是合适的。载体和其它药物组合物的成分的合适性是根据对本发明所选的化合物或药物组合物所需的生物学特性在抗原结合上没有显著的负面影响而确定的(例如,小于实质影响(小于10%或更低的相对抑制作用,5%或更低的相对抑制作用等))。

[0967] 本发明的药物组合物也可包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲液、去垢剂(例如非离子去垢剂,例如Tween80)、稳定剂、稳定剂(例如糖或无蛋白的氨基酸)、防腐剂、组织固定剂和/或其它适于包含在药物组合物中的材料。

[0968] 可改变本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平,以获得对特定患者、组成和给药模式而言,可达到所需治疗性应答的有效的活性成分的量,但对患者是无害的。选择的剂量水平依赖于各种药物动力学因素,包括所用的本发明的药物组合物或其酯、盐或胺的特定组成的活性、给药途径、给药时间、所用特定化合物排泄速度、治疗持续时间、与所用特定组分联合使用的其它的药物、化合物和/或材料、年龄、性别、体重、疾病症状、被治疗患者的一般健康情况和药物史及医学领域已知的其它因素。

[0969] 药物组合物可通过任何合适的途径和方式给药。合适的给药本发明的化合物的体内和体外途径在本领域是已知的,本领域技术人员可进行选择。

[0970] 本发明的化合物可通过任何合适的途径,例如口服、鼻服、吸入式、局部(包括口腔、经皮肤和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外途径。

[0971] 在一个技术方案中,本发明的药物组合物通过例如与惰性稀释剂或同化的可食用载体进行口服给药。活性成分可包括在硬的或软的壳明胶胶囊中、压缩为片剂、或直接混合在患者的饮食中。适于口服给药的本发明的药物组合物包括含本领域已知的合适载体的可吸收片剂、口腔片剂、药片、胶囊、甘香洒剂、悬浮液、糖浆、糯米纸等。为了对本发明的化合物进行口服给药,需要将化合物包被在可抑制其失活的化合物中或共同给药。

[0972] 在一个技术方案中,本发明的药物组合物是通过鼻给药的。适于经鼻给药的本发明的药物组合物在本领域是已知的,典型地包括喷剂、鼻滴剂和吸入剂。

[0973] 在一个技术方案中,本发明的药物组合物是局部给药的。适于局部或经皮肤给药的本发明的药物组合物包括含本领域已知的合适载体的粉剂、喷剂、药膏、泥膏、乳剂、洗剂、凝胶、溶液、片剂和吸入剂。

[0974] 在一个技术方案中,本发明的药物组合物是直肠给药的。适于直肠给药的本发明的药物组合物在本领域是已知的,包括凝胶、泥膏、喷雾配方、栓剂。

[0975] 在一个技术方案中,本发明的药物组合物是阴道给药的。适于阴道给药的本发明的药物组合物包括含本领域已知的合适载体的阴道栓剂、止血垫、乳剂、凝胶、泥膏、泡沫或喷雾配方。

[0976] 在一个技术方案中,本发明的药物组合物是肠胃外给药的。

[0977] 此处所用术语“肠胃外给药”和“在肠胃外给药”是指除肠和局部给药外的给药方式,通常是通过注射进行,包括表皮、静脉内、肌肉内、动脉内、玻璃体内、眼窝内、心脏内、皮内、腹膜内、腱内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、头颅内、胸内、硬脑膜外和层间注射和灌液。

[0978] 在一个技术方案中,药物组合物通过静脉内或皮下注射或灌液给药。在一个技术方案中,本发明的化合物以晶体形式通过皮下注射给药,可与Yang et al.,PNAS USA 100 (12),6934-6939(2003)比较。

[0979] 药物组合物可用本领域已知的医疗设备给药。例如,在一个技术方案中,本发明的药物组合物可用无针的皮下组织注射设备,例如在US 5,399,163、US 5,383,851、US 5,312,335、US 5,064,413、US 4,941,880、US 4,790,824或US 4,596,556中描述的设备给药。用于本发明的已知灌液和模式的实施例包括:US 4,487,603描述了灌液用微注射泵以可控速率用于药物分散;US 4,486,194描述了通过皮肤给药药物的治疗性设备;US 4,447,233描述了以精确的灌液速率递送药物的药物灌输泵;US 4,447,224描述了进行持续药物递送的流式可植入灌液设备;US 4,439,196描述了具有多室间隔区的渗透性药物递送系统,及US 4,475,196描述了渗透性药物递送系统。许多其它这样的灌输、递送系统和模式对本领域技术人员是已知的。

[0980] 本发明的药物组合物可制备为用于特定的给药途径,例如口服、鼻服、局部(包括口腔、皮肤和舌下)、直肠、阴道和/或肠胃外给药。药物组合物可方便的以单位剂量形式存在,可通过任何药学领域已知的方法来制备。可与载体材料联合使用以产生单剂量形式的活性成分的量可根据被治疗患者和特定的给药方式而改变。可与载体材料联合使用以产生单剂量形式的活性成分的量通常是可产生治疗性效果的组分的量。通常,以100%表示,该量的范围从约0.01%到约99%的活性成分,例如从约0.1%到约70%,例如从约1%到约30%。不管所选的给药途径,可作为药学上可接受的盐或溶解性水合形式的本发明的化合物和/或本发明的药物组合物通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学上可接受的剂量形式。“药学上可接受的盐”是指可保持母化合物所需生物学活性而没有不需的毒性作用的盐(参见,例如Berge,S.M.et al.,J.Pharm.Sci.66,1-19(1977))。这种盐的实施例包括加酸盐和加碱盐。加酸盐包括那些来源于非毒性无机酸,例如盐酸、硝酸、类似、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸等,以及来自无毒的有机酸,例如脂肪族单和二羧基酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香族酸、脂肪族和芳香族磺酸等的盐。碱加盐包括那些来源于碱土金属,例如钠、钾、镁、钙等,以及来源于无毒的有机胺,例如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、维生素B复合物、二乙醇胺、乙(撑)二胺、普鲁卡因等的盐。

[0981] 药学上可接受的载体包括任何和所有合适的与本发明的化合物兼容的溶剂、分散液、衣料、抗细菌和抗真菌试剂、等压试剂、抗氧化剂和延迟吸收试剂等。

[0982] 用于本发明的药物组合物的合适的水溶性和非水溶性载体的实施例包括水、盐、磷酸缓冲盐、乙醇、葡萄糖、多羟基化合物(例如甘油、丙稀基甘油、聚乙烯甘油等)及其合适的混合物、植物油,例如橄榄油、花生油和芝麻油、羧甲基纤维素胶质溶液、黄芪胶和可注射有机酯,例如乙烷基油酸酯和/或各种缓冲液。其它载体是医学领域已知的。

[0983] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散剂和无菌粉剂以制备无菌可注射溶

液或分散剂。对药学上活性底物使用这种介质和试剂在本领域是已知的。除了任何与活性化合物不兼容的传统介质或试剂外,其用途在本发明的药物组合物中是可预期的。例如,通过使用包被材料,例如蛋黄素通过维持分散剂所需的颗粒体积,及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0984] 本发明的药物组合物也含有药学上可接受的抗氧化剂,例如(1)水溶性抗氧化剂,例如维生素C酸、半胱氨酸氢氧化物、硫氢酸钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、维生素E等;及(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0985] 本发明的药物组合物也可在组分中含有等压试剂,例如糖、多元醇,例如甘露醇、山梨醇、甘油或氯化钠。

[0986] 药学上可接受的稀释剂包括盐和水溶性缓冲液。

[0987] 本发明的药物组合物也含有一种或多种适于所选的给药途径的佐剂,例如防腐剂、加湿剂、乳化剂、分散剂、防腐剂或缓冲液,它们可增强药物组合物的货架期或有效性。例如,本发明的化合物可与乳糖、蔗糖、粉剂(例如淀粉)、直链烷酸的纤维素酯、硬脂酸、滑石、硬脂酸镁、氧化镁、磷酸和硫酸的钠、钙盐、阿拉伯树胶、明胶、藻酸钠、聚维酮和/或乙醇。其它佐剂的实施例有QS21、GM-CSF、SRL-172、二盐酸组胺、胸腺卡汀、Tio-TEPA、单磷酸酯A/微细菌组分、明矾、弗氏不完全佐剂、montanide ISA、ribi佐剂系统、TiterMax佐剂、syntex佐剂配方、免疫刺激复合物(ISCOMs)、gerbu佐剂、CpG脱氧寡核苷酸、脂多糖、和聚肌苷酸:聚胞苷酸。

[0988] 抑制微生物的存在可通过灭菌程序和包括各种抗细菌和抗真菌试剂,例如帕拉胶、氯代丁醇、苯酚山梨酸等来保证。另外,可注射药物形式的延时吸收可通过包括延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶产生。含本发明的化合物的本发明的药物组合物也可包括合适的盐。任何合适的盐,例如任何合适形式的碱土金属盐(例如缓冲盐)可用于稳定本发明的化合物。合适的盐典型地包括氯化钠、琥珀酸钠、硫酸钠、氯化钾、氯化镁、硫酸镁和氯化钙。在一个技术方案中,铝盐用于稳定本发明的药物组合物中的本发明的化合物,当这种组分对患者给药时,铝盐也作为佐剂。如本发明所述的药物组合物可以多种合适的形式存在。这种形式包括,例如液体、半固体和固体剂量形式,例如液体溶液(例如,可注射和灌液的溶液)、分散液或悬浮液、乳液、微乳液、凝胶、药膏、颗粒粉剂、片剂、药丸、粉剂、脂质体、聚合物和其它纳米颗粒(参见,例如Baek et al.,Methods Enzymol.362,240-9(2003)、Nigavekar et al.,Pharm Res.21(3),476-83(2004)、微颗粒和栓剂。

[0989] 最佳形式依赖于选择的给药方式、组分的性质和治疗用途。例如,配方包括粉剂、泥膏、药膏、凝胶剂、蜡状物、油剂、脂、含(阳离子或阴离子)载体的脂、DNA偶联物、无水吸附剂、水包油和油包水乳液、聚乙二醇(各种分子大小的聚乙二醇)、半固体凝胶和含聚乙二醇的半固体混合物。根据本发明,任何前述形式在治疗脂是合适,只要药物组合物中的活性成分在配制时不失活,而且配方是生理兼容的并可耐受给药途径即可。也参见例如Powell et al.,“Compendium of excipients for parenteral formulations”PDA J Pharm Sci Technol.52,238-311(1998),此处的引用包括关于药物化学家已知的赋形剂和载体的其它信息。

[0990] 本发明的化合物可用包含化合物免受快速释放,例如以可控释放形式进行释放的载体进行制备,包括植入、皮肤修补和微胶囊递送系统。这种载体可包括明胶、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、生物可降解的生物兼容的多聚物,例如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酐、聚羟基乙酸、胶原、聚原酸酯、和聚乳酸单独或与蜡或其它本领域已知的材料一起使用。制备这种配方的方法通常是本领域技术人员已知的,参见例如,Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson,ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。为了通过特定给药途径给药本发明的组分,需要将化合物与抑制其失活的化合物包被或与其共同给药。例如,本发明的化合物可在合适载体,例如脂质体或稀释剂中给药患者。脂质体包括油包水CGF乳剂及传统的脂质体(Strejan et al.,J.Neuroimmunol.7,27(1984))。

[0991] 根据给药途径,活性化合物可包被在材料中,以保护化合物不被酸和其它可能使化合物失活的天然条件的作用。例如,化合物可在合适载体,例如脂质体中给药患者。脂质体包括油包水包油CGF乳剂及传统的脂质体(Strejan et al.,J.Neuroimmunol.7,27(1984))。

[0992] 在一个技术方案中,可配制本发明的化合物,保证其在体内的正确分布。例如,血脑屏障(BBB)可排除多种高亲水性化合物。为了保证本发明的治疗性化合物通过BBB(如果需要),则它们将配制在例如脂质体中。对制备脂质体的方法,参见例如US 4,522,811、US 5,374,548和US 5,399,331。脂质体可含有一个或多个选择性转运到特异细胞或器官中的基团,从而增强靶药的递送(参见例如,V.V.Ranade J.Clin.Pharmacol.29,685(1989))。示例的定位基团包括叶酸或生物素(参见例如US 5,416,016)、甘露糖醇(Umezawa et al.,Biochem.Biophys.Res.Commun.153,1038(1988))、抗体(P.G.Bloeman et al.,FEBS Lett.357,140(1995)、M.Owais et al.,Antimicrob.Agents Chemother.39,180(1995))、表面蛋白A受体(Briscoe et al.,Am.J.Physiol.1233.134(1995))、不同物种可含有本发明的药物组合物,及发明的分子的组分,p120(Schreier et al.,J.Biol.Chem.269,9090(1994)),也参见K.Keinanen,M.L.Laukkanen,FEBS Lett.346,123(1994)和JJ.Killion,IJ.Fidler,Immunomethods 4,273(1994)。

[0993] 在本发明的一个技术方案中,本发明的化合物配制在脂质体中。在另一个技术方案中,脂质体包括定位基团。在另一个技术方案中,脂质体中的化合物通过快速注射递送到邻近所需部位的位点,例如炎症或感染位点或肿瘤位点。组合物必需是具有易注射性的液体。它必需在制备和储存条件下是稳定的,并可防止微生物,例如细菌和真菌的污染作用。

[0994] 在一个技术方案中,本发明的化合物可配制为抑制或降低其穿过胎盘的运输。这可通过本领域已知的方法进行,例如通过化合物的PEG化或使用F(ab')₂片段。进一步的参考文献是Cunningham-Rundles C et al.,J Immunol Methods.152,177-190(1992)和Landor M.,Ann Allergy Asthma Immunol 74,279-283(1995)。

[0995] 用于肠胃外给药的药学上可接受的载体包括无菌的水溶液或分散剂和无菌的粉剂,用于制备无菌的可注射的溶液或分散剂。对药学上的活性底物使用这种介质和试剂在本领域是已知的。除了任何与活性化合物不兼容的传统介质或试剂外,其用途在本发明的药物组合物中是可预期的。

[0996] 附加的活性化合物也可混合在组分中。

[0997] 典型地,用于注射的药物组合物必须是无菌的,并在制备和储存条件下是稳定的。化合物可配制为溶液、微乳液、脂质体或其它适于高浓度药物的有序结构。载体可以是水溶性或非水溶性溶剂或含例如水、乙醇、多聚物(例如甘油、丙稀基甘油、聚乙烯甘油等)及其合适的混合物、植物油,例如橄榄油和可注射有机酯,例如乙烷基油酸酯的分散剂。例如,通过使用包被材料,例如蛋黄素通过维持分散剂所需的颗粒体积,及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。在许多情况下,在组分中优选地包括等压试剂,例如糖、多元醇,例如甘油、甘露醇、山梨醇或氯化钠。可注射药物形式的延时吸收可通过在组分中包括可延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶产生。无菌注射溶液可通过将活性化合物以所需量混合到所需的具有上述一种或组合成分的合适溶剂中,然后进行微过滤灭菌。通常,通过将活性化合物混合在含基本分散剂和所需的其它成分,例如来自上述成分的无菌载体中而制备。对用无菌粉剂制备无菌注射溶液而言,制备方法的实施例是真空干燥和冻干(冻干法)含活性成分和任何其它所需的,来自前述的无菌过滤溶液的成分。

[0998] 无菌注射溶液可通过将活性化合物以所需量混合到所需的具有上述一种或组合成分的合适溶剂中,然后进行微过滤灭菌。通常,通过将活性化合物混合在含基本分散剂和所需的其它成分,例如来自上述成分的无菌载体中而制备。对用无菌粉剂制备无菌注射溶液而言,制备方法的实施例是真空干燥和冻干(冻干法)含活性成分和任何其它所需的,来自前述的无菌过滤溶液的成分。

[0999] 本发明的药物组合物可含有一种本发明的化合物或本发明的化合物的组合。因此,在一个技术方案中,本发明的药物组合物包括多个(例如两个或多个)具有不同作用机制的本发明的化合物的组合,例如一个化合物主要诱导CDC,另一个化合物主要诱导凋亡。

[1000] 本发明的CD38BPs(包括此处所述的抗CD38抗体、免疫偶联物、双特异性/多特异性分子、组合物和其它衍生物)具有多种体外和体内诊断和治疗用途,可参与由表达CD38的细胞引起的疾病的诊断和治疗。例如,抗体可在例如体外或离体给药所培养的细胞或在例如体内给药受试者,以治疗、抑制和诊断各种疾病。此处所用术语“受试者”是指包括对CD38BP应答的人和动物。例如受试者包括具有通过抑制诸如酶活性、信号转导、诱导细胞因子表达、诱导增殖或分化和/或诱导CD38表达细胞的裂解和/或消除或数目降低这样的CD38功能,可校正或减轻疾病的人患者。例如,可用CD38BPs在体内或体外引发一个或多个下述生物学活性:抑制CD38功能(例如酶活性、信号转导、诱导细胞因子表达、诱导增殖或分化和/或诱导裂解),杀死表达CD38的细胞,在存在人效应细胞时介导表达CD38的细胞的吞噬作用或ADCC,及在存在补体时介导表达CD38的细胞的CDC,或通过凋亡杀死表达CD38的细胞。

[1001] 在存在补体时,也可使用任何含具有补体结合位点,例如结合补体的来源于IgG1、-2或-3或IgM的一部分的本发明的CD38BPs的组分。在一个技术方案中,离体治疗含具有本发明的CD38BP的靶细胞和合适的效应细胞的细胞群可通过加入补体或含补体的血清而进行补充。被本发明的CD38BP包被的靶细胞的吞噬作用或裂解可通过补体蛋白的结合而增强。在一个技术方案中,包被本发明的CD38BPs的靶细胞也可被补体裂解。在一个技术方案中,本发明的CD38BPs不激活补体。

[1002] 本发明的CD38BPs也可与补体一起给药。因此,含血清或补体的CD38BPs也在本发明的范围中。在这些组分中,补体通过例如偶联而紧邻CD38BPs,或适于进行同时给药。选择性地,CD38BPs和补体或血清可单独给药。

[1003] 本发明的CD38BPs也用于针对表达Fc γ R或CD38的细胞,例如用于标记这类细胞。对这种用途而言,CD38BP可与能被检测的分子连接。因此,本发明提供离体或在体外定位表达Fc受体,例如Fc γ R或CD38的细胞的方法。可检测标记可以是例如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。

[1004] 靶特异的效应细胞,例如与本发明的CD38BP连接的效应细胞也可用作治疗性试剂。定位的效应细胞可以是人淋巴细胞,例如巨噬细胞、嗜中性粒细胞或单核细胞。其它细胞包括嗜曙红细胞、自然杀伤细胞和其它含IgG或IgA受体的细胞。如果需要,效应细胞可从被治疗的患者中获得。靶特异的效应细胞可在生理上可接受的溶液中作为悬浮液进行给药。给药的细胞数目可在 10^8 到 10^9 ,但可根据治疗目的而改变。通常使用可在靶细胞,例如表达CD38的肿瘤细胞获得定位,并通过例如吞噬作用或裂解而有效杀死细胞的足够的量。

[1005] 用靶特异的效应细胞的治疗可联合其它清楚靶细胞的技术来进行。例如,使用本发明的CD38BPs和/或针对这些组分的效应细胞的抗肿瘤治疗可与化疗联合使用。另外,联合免疫治疗可用于指导两种不同的细胞毒素效应物群针对肿瘤细胞抑制。例如与抗Fc γ RI或抗CD3连接的CD38BP可与IgG或IgA受体特异结合试剂联合使用。本发明的双特异性和多特异性分子也可用于例如通过在细胞表面加帽和删除受体来调控效应细胞上的Fc α R或Fc γ R水平。抗Fc受体的混合物也可用于该目的。

[1006] 在一个技术方案中,本发明提供在样品中检测CD38抗原存在或测定CD38抗原的量的方法,包括将样品和对照样品与特异结合CD38的CD38BP在可在CD38BP或其部分和CD38间形成复合物的条件下接触。然后检测复合物的形成,其中与对照样品相比较,样品间形成复合物的差异表明在样品中存在CD38抗原。检测免疫检测方法的实施例包括但不限于ELISA、RIA、FACS检测、等离子共振检测、色谱检测、组织免疫组织化学、Western印迹和/或免疫沉淀。

[1007] 在一个技术方案中,本发明的CD38BPs可用于检测CD38的循环水平或在其膜表面含CD38的细胞水平,然后将该水平与特定的疾病症状相关联。选择性地,CD38BPs可用于清除或与表达CD38的细胞相互作用,从而表明这些细胞是疾病的重要介导体。也可通过将样品和对照样品与抗CD38抗体在适于在抗体和CD38形成复合物的条件下接触。检测抗体和CD38形成的任何复合物,并将样品和对照进行比较。本发明的CD38BPs最初可在体外检测治疗和诊断用途相关的结合活性。例如,可用流式细胞仪检测CD38BPs。另外,可检测CD38BPs在引发至少一种效应细胞介导的效应细胞活性方面的活性。例如,可检测本发明的抗CD38抗体引发CDC和/或凋亡的能力。检测CDC、同型黏附、分子成簇或凋亡的流程在本领域是已知的。

[1008] 在一个技术方案中,本发明提供在体内或体外检测并定量CD38表达细胞的量的方法。该方法包括(i) 给药受试者偶联可检测标记的本发明的CD38BP; (ii) 将受试者暴露在检测所述可检测标记中,以鉴定含CD38表达细胞的区域。

[1009] 在一个技术方案中,本发明的免疫偶联物可通过以这种靶化合物作为本发明的免疫偶联物中的治疗性基团,而将化合物(例如治疗性试剂、标记、细胞毒素、免疫抑制剂等)定位到具有结合到表面的CD38的细胞上。

[1010] 在一个技术方案中,本发明也提供离体或在体外定位表达CD38的细胞的方法(例如,用可检测标记,例如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子)。

[1011] 在一个技术方案中,本发明提供通过给药本发明的免疫毒素而杀死具有结合到表面的CD38的细胞。

[1012] 本发明提供在患者中治疗或预防由CD38表达细胞参与的疾病,该方法包括对需要治疗的患者给药治疗有效量的本发明的CD38BP。这种CD38BP用于抑制CD38诱导的与疾病相关的活性或消除或降低CD38表达细胞的数目。

[1013] 这种方法包括对患者给药有效量的本发明的CD38BP组分以治疗或预防疾病。CD38BP组分可单独给药或与其它治疗性药物,例如本文其它地方所述的与CD38BP联合或协同作用的试剂来治疗或预防CD38表达细胞参与的疾病。选择性地,免疫偶联物可用于通过专门针对CD38的细胞毒素或放射性毒素而杀死在其表面表达CD38的细胞。

[1014] 在本发明的一个技术方案中,表达CD38的细胞参与的疾病可以是肿瘤性疾病,例如疾病的特征在于存在表达CD38的肿瘤细胞,例如B细胞淋巴瘤、浆细胞恶性瘤、T/NK细胞淋巴瘤和骨髓恶性瘤。

[1015] 这种肿瘤性疾病的实施例包括B细胞淋巴瘤/白血病,包括前体B细胞成淋巴细胞白血病/淋巴瘤和B细胞非霍奇金淋巴瘤;急性早幼粒细胞白血病急性成淋巴细胞白血病和成熟B细胞肿瘤,例如B细胞慢性淋巴细胞性白血病(CLL)/小淋巴细胞性白血病(SLL)、B细胞急性淋巴细胞性白血病、B细胞前淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞样淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、包括低级、中级和高级FL在内的滤泡性淋巴瘤(FL)、皮肤滤泡中心淋巴瘤、边缘区B细胞淋巴瘤(MALT型、结与脾型)、毛细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、Burkitt淋巴瘤、浆细胞瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞白血病、移植后淋巴增生性疾病、Waldenstrom巨球蛋白血症、浆细胞白血病和间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

[1016] 在一个技术方案中,由表达CD38的细胞参与的疾病是多发性骨髓瘤。

[1017] B细胞非霍奇金淋巴瘤的实施例有淋巴瘤样肉芽肿病、原发性渗出性淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、纵隔大B细胞淋巴瘤、重链疾病(包括 γ 、 μ 和 α 疾病)、由免疫抑制试剂诱导的淋巴瘤,例如环孢霉素诱导的淋巴瘤和甲氨蝶呤诱导的淋巴瘤。

[1018] 在本发明的一个技术方案中,由表达CD38的细胞参与的疾病是霍奇金淋巴瘤。

[1019] 由表达CD38的细胞参与的疾病的实施例可以是来源于T和NK细胞的恶性瘤,包括:成熟T细胞和NK细胞瘤,包括T细胞前淋巴细胞白血病、T细胞大颗粒淋巴细胞白血病、侵袭性NK细胞白血病、成人T细胞白血病/淋巴瘤、结外NK-T细胞淋巴瘤、鼻型、肠病型T细胞淋巴瘤、肝脾性T细胞淋巴瘤、皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤、母细胞性NK细胞淋巴瘤、蕈样霉菌病/Sezary症候群、原发性皮肤CD30阳性T细胞淋巴增生性疾病(原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤C-ALCL、淋巴瘤样丘疹病、交界性病变)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、非特指型外周T细胞淋巴瘤和退行性大细胞淋巴瘤。

[1020] 来源于骨髓细胞的恶性瘤的实施例包括急性骨髓白血病,包括急性早幼粒细胞性白血病、和包括慢性粒细胞白血病在内的慢性髓细胞白血病。

[1021] 在本发明的一个技术方案中,由表达CD38的细胞参与的疾病是由CD38表达B细胞、浆细胞、单核细胞和T细胞参与的免疫性疾病。

[1022] 由CD38表达B细胞、浆细胞、单核细胞和T细胞参与的免疫性疾病的实施例包括诸如牛皮癣、关节银屑病、皮炎、系统性硬皮病及硬化症这样的自身免疫失调、炎症性肠病(IBD)、Crohn病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、肾小球肾炎、湿

疹、哮喘、动脉硬化、白细胞粘附缺陷病、多发性硬化症、Raynaud症候群、Sjogren症候群、青少年糖尿病、Reiter病、Behcet病、免疫复合性肾炎、IgA肾病、IgM多发性神经病、诸如急性特发性血小板减少性紫癜及慢性特发性血小板减少性紫癜这样的免疫介导的血小板减少症状、溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、风湿关节炎(RA)、异位性皮炎、天疱疮、Graves病、桥本甲状腺炎、Wegener肉芽肿、Omenn症候群、慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多症、多发性硬化症、HIV和疱疹病毒相关的疾病。进一步实施例包括严重急性呼吸综合征和脉络视网膜炎(choreoretinitis)。另外,也包括其它疾病和症状,例如那些由诸如伊波病毒(EBV)这样的病毒感染B细胞引起或介导的疾病。

[1023] 在一个技术方案中,由表达CD38的细胞参与的疾病是风湿性关节炎。

[1024] 其中自身抗体和/或过量B和T淋巴细胞活性显著并可根据本发明进行治疗的炎症性、免疫性和/或自免疫性疾病的进一步实施例包括以下部分:

[1025] 血管炎和其它血管疾病,譬如显微镜下多血管炎、Churg-Strauss综合征、及其它ANCA相关性血管炎、结节性多动脉炎、原发性冷球蛋白血症血管炎、皮肤白细胞分裂性血管炎、川崎病、大动脉炎、巨细胞动脉炎、过敏性紫癜肾炎、原发性或独立的脑脉管炎、结节性红斑、血栓闭塞性脉管炎、血栓性血小板减少性紫癜(包括溶血性尿毒综合征)、以及包括皮肤白细胞碎裂性血管炎(例如第二期的B型肝炎、C型肝炎、Waldenstrom巨球蛋白血症、B细胞瘤样变、类风湿性关节炎、Sjogren综合征、或系统性红斑狼疮)在内的继发性血管炎;进一步的实施例有结节性红斑、变应性血管炎、脂膜炎、复发性结节性非化脓性脂膜炎、紫癜hyperglobulinaemia、及Buerger病;皮肤病,譬如接触性皮炎、线状IgA皮肤病、白癜风、坏疽性脓皮病、获得性大疱性表皮松解症、寻常性天疱疮(包括疤痕性类天疱疮和大疱性类天疱疮)、斑秃(包括普秃和全秃)、疱疹样皮炎、多形红斑、与慢性自身免疫性荨麻疹(包括血管神经性水肿和荨麻疹性血管炎);

[1026] 免疫介导血细胞减少症,譬如自身免疫性中性粒细胞减少症和单纯红细胞再生障碍性贫血;

[1027] 结缔组织病,譬如中枢神经系统狼疮、盘状红斑狼疮、CREST综合征、混合性结缔组织病、多肌炎/皮肌炎、包涵体肌炎、继发性淀粉样变性、I型及II型冷沉球蛋白血症、纤维肌痛、磷脂抗体综合征、继发性血友病、复发性多发软骨炎、结节病、僵人综合征和风湿热;进一步的实施例有嗜曙红细胞筋膜炎;

[1028] 关节炎,譬如强直性脊柱炎、幼年性慢性关节炎、成人Still病及SAPHO综合征;进一步的实施例有髌骨关节炎、反应性关节炎、Still病和痛风病;

[1029] 血液病、譬如再生障碍性贫血、原发性溶血性贫血(包括冷凝集素综合征)、对CLL或者系统性红斑狼疮的继发性溶血性贫血;POEMS综合征、恶性贫血及Waldenström's purpura hyperglobulinaemia;进一步的实施例有粒性白血球缺乏症、自身免疫性中性粒细胞减少症、Franklin病、Seligmann病、 γ 重链疾病、对胸腺瘤和淋巴瘤的继发性副癌综合征、及因子VIII抑制物形成;

[1030] 内分泌病、譬如多内分泌症和阿狄森病;进一步的实施例有自身免疫性低血糖症、自身免疫性甲状腺功能低下、胰岛素自身免疫综合征、德奎尔万甲状腺炎、及胰岛素受体抗体介导的胰岛素抵抗;

[1031] 肝-胃肠疾病,譬如乳糜泻、Whipple病、原发性胆汁性硬变、慢性活动性肝炎、及原

发性硬化性胆管炎;进一步的实施例是自身免疫性胃炎;

[1032] 肾病,譬如快速进行性肾小球肾炎、后链球菌肾炎、肺出血-肾炎综合征、膜性肾小球肾炎和冷球蛋白肾炎;进一步的实施例是微小病变疾病;

[1033] 神经障碍、譬如自身免疫性神经病、多数性单神经炎、Lambert-Eaton肌无力综合征、Sydenham舞蹈病、脊髓痨及Guillain-Barre综合征;进一步的实施例有脊髓病/热带痉挛性瘫痪、重症肌无力、急性炎症性脱髓鞘性多发性神经炎及慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经炎;多发性硬化症;

[1034] 心脏及肺部疾病、譬如COPD、纤维性肺泡炎、闭塞性细支气管炎、过敏性肺部霉菌病、囊性纤维变性、Loffler综合征、心肌炎及心包炎;进一步的实施例有过敏性肺炎和继发于肺癌的肿瘤伴随综合征;

[1035] 变态反应性疾病、譬如支气管性气喘和高IgE综合征;进一步的实施例是一时性黑蒙;

[1036] 眼科疾病,譬如先天性脉络膜视网膜炎;

[1037] 感染性疾病,譬如细小病毒B感染(包括hands-and-socks syndrome在内);

[1038] 妇产科疾病,譬如反复流产、反复胎儿损失及宫内发育迟缓;进一步的实施例是继发于妇科肿瘤的肿瘤伴随综合征;

[1039] 男性生殖系统疾病,譬如继发于睾丸肿瘤的肿瘤伴随综合征;

[1040] 以及由于移植引起的疾病,譬如同种异体移植与异种移植排斥及移植抗宿主病。

[1041] 也可预防性给药抗体以降低发生诸如上述肿瘤性疾病这样的癌症的危险性,延迟在这种癌症进程中的发作,和/或在清除这类癌症后降低复发危险性。这在根据其它生物学因素已知存在肿瘤但难于对其定位的患者中是特别有用的。

[1042] 本发明的组分包括“治疗有效量的”或“预防有效量的”CD38BP。“治疗有效量的”是指在需要的时间内可达到所需治疗结果的有效剂量。CD38BP的治疗有效量可根据诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,及CD38BP在个体中引发所需的应答等因素而改变。治疗有效量也是其中抗体或抗体部分的任何有毒或有害作用超过治疗有利作用的量。“预防有效量”是指在需要的时间内可达到所需预防结果(例如降低发展疾病的可能性、降低疾病的强度和扩散性、在疾病即将来临时增加存活的可能性、延迟疾病症状的发作等)的有效剂量。典型地,由于用于患者的预防剂量在疾病早期阶段之前,因此预防性有效量将低于治疗性有效剂量。对肿瘤治疗的“治疗性有效量”也可通过其稳定疾病进展的能力来确定。化合物抑制癌症的能力可在动物模式系统中评估其在人肿瘤中的有效性。选择性地,组分的这一特性可通过技术人员已知的体外检测法检测化合物抑制细胞生长或诱导凋亡的能力来评估。治疗性化合物的治疗有效量可在患者中减小肿瘤体积或减轻症状。本领域技术人员可根据诸如患者的体重、患者病症的严重性和所选择的特定化合物或给药途径来确定该剂量。

[1043] 风湿性关节炎的“治疗有效量”可在患者中产生至少 ACR_{20} 初步疗效判定标准,例如至少 ACR_{50} 初步疗效判定标准,例如至少 ARC_{70} 初步疗效判定标准。 ACR_{20} 初步疗效判定标准定义为:在压痛关节计数(TJC)提高 $\geq 20\%$,并在以下5项评估中提高 $\geq 20\%$:患者疼痛评估(VAS)1、患者整体评估(VAS)、医生整体评估(VAS)、患者自测无力(HAQ)急性阶段反应物

(CRP或ESR)。ACR₅₀和ACR₇₀以相同方式定义为分别 $\geq 50\%$ 和 $\geq 70\%$ 的提高。对于进一步的细节,参见Felson et al., in American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; Arthritis Rheumatism 38, 727-735 (1995)。

[1044] 选择性地,风湿性关节炎的治疗有效量可通过由EULAR定义的DAS (疾病活动度评分),包括DAS28和/或DAS56来测定。

[1045] 调整剂量以提供最适的所需应答(例如,治疗性应答)。例如,可进行单点注射给药,也可随时间进行几次分开的剂量给药,或根据治疗情况的紧急性按比例减小或增加剂量。肠胃外组分可配制成为易于给药的剂量单位和通用剂量形式。此处所用剂量单位形式是指适于被治疗患者的个别的适于作为单一剂量的形式;每个单位含预定量的活性化合物以在与所需药物载体联合时产生所需的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格由和直接依赖于(a)活性化合物的特定性质和需达到的特定治疗效果,及(b)配制方面本身的限制,例如用于治疗的活性化合物在个体中的灵敏度而确定。本发明的CD38BPs的有效剂量和剂量形式根据被治疗疾病或症状而由本领域技术人员来确定。本发明的化合物的治疗有效剂量的示例的非限制性范围是约0.1-100mg/kg、譬如约0.1-50mg/kg、例如约0.1-20mg/kg、譬如约0.1-10mg/kg、例如约0.5、譬如约0.3、约1或约3mg/kg。

[1046] 本领域的医生或兽医可很容易地确定并给药有效剂量的所需药物组合物。例如,医生或兽医开始可使用比达到所需治疗效果所需的剂量低的药物组合物中所用的本发明的CD38BPs,然后逐渐增加剂量以达到所需效果。通常,本发明的组分的合适每日剂量是指化合物的剂量是有效产生治疗性效果的最低剂量。这种有效剂量通常根据上述因素所确定。可进行静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下给药,例如对靶位点最近处给药。如果需要,药物组合物的有效每日剂量可在一天的合适间隔时间内分别进行2、3、4、5、6或更多次亚剂量给药,选择性地,以单位剂量形式进行给药。但对本发明的化合物可进行单独给药,优选地如上述药物组合物一样给药化合物。

[1047] 在一个技术方案中,本发明的CD38BPs可以每周剂量为从10到500mg/m²,譬如从200到400mg/m²通过灌液进行给药。这种给药可重复例如1到8次,譬如3到5次。可在2到24小时,例如从2到12小时的时间内通过连续灌液进行给药。

[1048] 在一个技术方案中,本发明的CD38BPs可在较长的时间内,例如24小时以上,通过缓慢的连续灌液进行给药,以降低毒副作用。

[1049] 在一个技术方案中,本发明的CD38BPs可以每周剂量为从250mg到2000mg,譬如例如300mg、500mg、700mg、1000mg、1500mg或2000mg进行8次以上,例如从4到6次给药。可在一段时间内,例如从2到24小时,譬如从2到12小时通过连续灌液进行给药。如果需要,这种形式可重复1次或多次,例如,在6个月或12个月后重复进行。可在给药后,通过例如提取生物样品,并用针对本发明的CD38BPs的抗原结合区域的抗独特型抗体测定血液中本发明的化合物的量来确定或调整剂量。

[1050] 在一个技术方案中,本发明的CD38BPs可通过维持治疗进行给药,譬如例如,1周1次进行6个月或更长时间。

[1051] 在一个技术方案中,本发明的CD38BPs可通过包括本发明的CD38BP灌液,然后用偶联放射性同位素的本发明的CD38BP灌液进行给药。给药可在例如7到9天后重复进行。

[1052] 作为非限制性实施例,如本发明所述的治疗可以每日本发明的化合物的剂量为0.1-100mg/kg来提供,例如每天0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90或100mg/kg,在初始治疗后,在至少第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40天,或选择性地,至少第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周,或其组合,用单个或分开剂量每隔24、12、8、6、4或2小时或其任何组合给药一次。

[1053] 本发明的药物组合物也以联合治疗的形式给药,例如,与其他被治疗疾病或症状相关的治疗性药剂联合使用。这种给药可以是同时的、单独的或连续的。对同时给药而言,药剂可以合适的1个组分或单独的组分进行给药。因此,本发明提供治疗上述表达CD38的细胞参与的疾病的方法,方法包括与以下所述的一个或多个其他治疗性药剂联合给药本发明的CD38BP。

[1054] 本发明也提供本发明的CD38BP在制备与至少一种针对上述表达CD38的细胞参与的化疗试剂一起给药的药物组合物方面的用途。

[1055] 在一个技术方案中,联合治疗可包括将本发明的组分与至少一种化疗试剂,至少一种抗炎症试剂或至少一种免疫抑制剂和/或免疫调节剂联合给药。

[1056] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗由表达CD38的细胞参与的疾病的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和至少一种化疗试剂。

[1057] 在一个技术方案中,本发明提供治疗多发性骨髓瘤的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和至少一种化疗试剂。

[1058] 在一个技术方案中,本发明提供本发明的CD38BP在制备与至少一种化疗试剂联合给药以治疗多发性骨髓瘤的药物组合物方面的用途。

[1059] 在一个技术方案中,这种化疗试剂选自抗代谢物,譬如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿拉伯树胶酸、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、氨烯咪胺、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨、克拉屈滨和类似试剂。

[1060] 在一个技术方案中,这种化疗试剂选自烷基化试剂,例如二氯甲基二乙胺、thioepa、瘤可宁、美法仑、双氯乙基亚硝脲(BSNU)、氮芥(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、达卡巴嗪(DTIC)、甲基苄肼、丝裂霉素C、施铂锭及其它诸如卡铂这样的铂衍生物和类似试剂。

[1061] 在一个技术方案中,这种化疗试剂选自抗生素,例如更生霉素(以前称为放射菌素)、博来霉素、正定霉素(以前称为道诺霉素)、阿霉素、去甲氧正定霉素、光神霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、光辉霉素、安曲霉素(AMC)和类似试剂。

[1062] 在一个技术方案中,这种化疗试剂选自抗有丝分裂试剂,例如紫杉烷、例如紫杉萜和太平洋紫杉醇,长春花碱、例如长春地辛、长春新碱、长春碱和长春瑞滨。

[1063] 在一个技术方案中,这种化疗试剂选自拓扑异构酶抑制剂,例如托泊替康。

[1064] 在一个技术方案中,这种化疗试剂选自生长因子抑制剂,例如ErbB1(EGFR)(例如吉非替尼(Iressa®)、西妥昔单抗(Erbitux®)、埃罗替尼(Tarceva®)、HuMax-EGFr(2F8,在WO 2002/100348)描述)和类似试剂)的抑制剂,ErbB2(Her2/neu)(例如曲妥单

抗(Herceptin®)和类似试剂)的抑制剂和类似试剂。

[1065] 在一个技术方案中,这种生长因子抑制剂是法呢基转移酶抑制剂,例如SCH-66336和R115777。

[1066] 在一个技术方案中,这种生长因子抑制剂是血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂,例如贝伐单抗(Avastin®)。

[1067] 在一个技术方案中,这种化疗试剂是酪氨酸激酶抑制剂,例如伊马替尼(Glivec, Gleevec STI571)、拉帕替尼泊、PTK787/ZK222584和类似试剂。

[1068] 在一个技术方案中,这种化疗试剂是组氨酸去乙酰化酶抑制剂。这种组氨酸去乙酰化酶抑制剂的实施例包括基于异羟肟酸的杂合极性化合物,譬如SAHA(辛二酰苯胺异羟肟酸)。

[1069] 在一个技术方案中,这种化疗试剂是诸如SCI0-469这样的P38aMAP激酶抑制剂。

[1070] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗由表达CD38的细胞参与的疾病的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和至少一种血管生成、新血管生成和/或其它血管化抑制剂。

[1071] 在一个技术方案中,本发明提供治疗多发性骨髓瘤的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和至少一种血管生成、新血管生成和/或其它血管化抑制剂。

[1072] 在一个技术方案中,本发明提供本发明的CD38BP在制备与至少一种血管生成、新血管生成和/或其它血管化抑制剂联合给药以治疗多发性骨髓瘤的药物组合物方面的用途。

[1073] 这种血管生成抑制剂的实施例是尿激酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂(例如马马司他、新伐司他、BAY 12-9566、AG 3340、BMS-275291和类似试剂)、内皮细胞迁移和增殖抑制剂(例如TNP-470、角鲨胺、2-甲氧雌二醇、考布他汀、内皮他汀、血管他汀、青霉胺、SCH66336(Schering-Plough Corp, Madison, NJ)、R115777(Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ)和类似试剂)、血管生成因子拮抗剂(例如譬如ZD6474、SU6668、抗血管生成试剂的抗体和/或其受体(例如VEGF、bFGF和血管生成素-1)、沙利度胺(Thalomid®)、沙利度胺类似物(譬如CC-5013(来那度胺, RevLimid™)和CC4047(Actimid™)、Sugen 5416、SU5402、抗血管生成因子的核酶(譬如angiozyme)、干扰素 α (譬如干扰素 α 2a)、苏拉明及类似试剂)、VEGF-R激酶抑制剂和其它抗血管生成因子的酪氨酸激酶抑制剂(譬如SU011248)、内皮特异整联蛋白/存活信号传导抑制剂(譬如牡荆碱及类似试剂)、铜拮抗剂/螯合剂(譬如四硫钼酸盐、卡普多普瑞尔和类似试剂)、羧基氨基咪唑(CAI)、ABT-627、CM101、白介素-12(IL-12)、IM862、PNU145156E及抑制血管生成的核苷酸分子(譬如反义-VEGF-cDNA、编码血管生成抑制素的cDNA、编码p53的cDNA和编码缺陷型VEGF受体2的cDNA)和类似试剂。

[1074] 其它这种血管生成、新血管生成和/或其它血管化的抑制剂的实施例是抗血管生成的苷磷脂衍生物和相关分子(例如, heperinase III)、替莫唑胺、NK4、巨噬细胞转移抑制因子(MIF)、环氧合酶-2抑制物、缺氧诱导因子1抑制物、抗血管生成大豆异黄酮、奥替普拉、烟曲霉素及其类似物、生长抑素类似物、戊聚糖多硫酸酯、替可加兰钠、达肝素、肿瘤抑素、凝血酶致敏蛋白、NM-3、考布他汀、血管生成抑制素、阿伐他汀、抗其它相关靶标的抗体(例

如抗 α -v/ β -3整联蛋白和抗激肽抑制素(kininostatin)mAbs和类似试剂。

[1075] 在一个技术方案中,本发明提供本发明的CD38BP在制备与沙利度胺(**Thalomid®**)、沙利度胺类似物(譬如CC-5013(来那度胺、ReVlimid™)和/或CC4047(Actimid™)联合给药方面的用途。

[1076] 在一个技术方案中,本发明提供本发明的CD38BP在制备与沙利度胺联合给药的药物组合物方面的用途。

[1077] 在一个技术方案中,本发明提供本发明的CD38BP在制备与抗CD20抗体,譬如利妥昔单抗(**Rituxan®**, **Mabthera®**)、如WO 2004/035607所述的人单克隆抗CD20抗体,譬如11B8、2F2或7D8联合给药的药物组合物方面的用途。

[1078] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是蛋白酶抑制剂,例如硼替佐米(**Velcade®**)。

[1079] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是皮质类固醇,例如强的松、脱氢皮质甾醇、地塞米松等。

[1080] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是皮质类固醇,例如强的松、脱氢皮质甾醇、地塞米松等。

[1081] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是抗癌免疫原,例如癌抗原/肿瘤相关的抗原(例如内皮细胞黏附分子(EpCAM/TACSTDI)、粘液素1(MUC1)、癌胚抗原(CEA)、肿瘤相关的糖蛋白72(TAG-72)、gp100、Melan-A、MART-1、KDR、RCAS1、MDA7、癌相关病毒疫苗(例如,人乳头瘤病毒疫苗)、肿瘤来源的热休克蛋白和类似试剂。此处所述多种其它合适的癌抗原/肿瘤相关抗原和本领域已知的类似分子也可选择性地用于这种技术方案中。抗癌免疫原性蛋白也包括抗独特型“疫苗”,例如BEC2抗独特型抗体、米妥莫单抗、CeaVac和相关的抗独特型抗体,针对MG7抗体的抗独特型抗体及其它抗癌抗独特型抗体(参见例如,Birebent et al.,Vaccine.21.(15),1601-12(2003)、Li et al.,Chin Med J(Engl).114(9),962-6(2001)、Schmitt et al.,Hybridoma.13(5),389-96(1994)、Maloney et al.,Hybridoma.4(3),191-209(1985)、Raychardhuri et al.,J Immunol.137(5),1743-9(1986)、Pohl et al.,Int J Cancer.50(6),958-67(1992)、Bohlen et al.,Cytokines Mol Ther.2(4),231-8(1996)和Maruyama,J Immunol Methods.264(1-2),121-33(2002))。这种抗独特型Abs可选择性地与作为合成(典型地惰性)分子载体、蛋白(例如钥孔血蓝蛋白(KLH)(参见例如,Ochi et al.,Eur J Immunol.17(11),1645-8(1987))、或细胞(例如红血细胞,参见例如,Wi et al.,J Immunol Methods.122(2),227-34(1989))载体偶联。

[1082] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是二磷酸盐。可能合适的二磷酸盐的实施例是帕米膦酸盐(**Aredia®**)、唑来膦酸(**Zometa®**)、氯膦酸盐(**Bonefos®**)、利塞膦酸盐(**Actonel®**)、伊班膦酸盐(**Boniva®**)、依替膦酸盐(**Didronel®**)、阿仑膦酸盐(**Fosamax®**)、替鲁膦酸盐(**Skelid®**)、伊卡膦酸盐(Yamanouchi Pharmaceutical)和米诺膦酸盐(YM529、Yamanouchi)。

[1083] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是集落刺激因子。合适的集落刺激因子的实施例是粒细胞集落刺激因子(G-CSF),例如非格司亭(**Neupogen®**)和聚乙二醇化非格司亭(**Neulasta®**),和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),例如沙格司亭(**Leukine®**)。

[1084] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是红血球生成试剂。合适的红血球生成试剂的实施例是红细胞生成素(EPO),例如红细胞生成素 α (例如**Procrit®**、**Epogen®**和**Eprex®**)和红细胞生成素 β (例如**NeoRecormon®**)和红细胞生成刺激蛋白(例如**Aranesp®**)。

[1085] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是抗癌细胞因子或其组合。合适的细胞因子和生长因子的实施例包括IFN γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α (例如IFN α 2b)、IFN β 、GM-CSF、CD40L、FltS配体、干细胞因子、安西司亭和TNF α 。合适的趋化因子包括来自人CXC和C-C趋化因子家族的Glu-Leu-Arg(ELR)-阴性趋化因子,例如IP-10、MCP-3、MIG和SDF-1 α 。合适的细胞因子包括细胞因子衍生物、细胞因子变异体、细胞因子片段和细胞因子融合蛋白。

[1086] 此处这些和其它天然肽编码核酸参与的方法或用途可选择性地或另外通过如US 5,968,502、US 6,063,630和US 6,187,305及EP0505500中所述的“基因激活”和同源重组基因上调技术来进行。

[1087] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是例如增强或抑制Fc α 或Fc γ 受体的表达或活性的调控试剂。适于该用途的试剂的实施例包括白介素-1(IL-1)、白介素-2(IL-2)、白介素-6(IL-6)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF),例如非格司亭(**Neupogen®**)和聚乙二醇化非格司亭(**Neulasta®**),及粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),例如沙格司亭(**Leukine®**),干扰素- γ (IFN- γ)和肿瘤坏死因子(TNF)。

[1088] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是细胞循环控制/凋亡调控子(或“调控试剂”)。细胞循环控制/凋亡调控子包括以下分子(i)定位和调控细胞循环控制/凋亡调控子,例如cdc-25(例如NSC 663284),(ii)过度刺激细胞循环的细胞周期蛋白依赖的激酶(例如黄酮类抗肿瘤药flavopiridol(L868275, HMR1275)、7-hydroxystaurosporine(UCN-01, KW-2401)和roscovitine(R-roscovitine, CYC202)),及(iii)端粒酶调控子(例如B1BR1532、SOT-095、GRN163就例如US 6,440,735和US 6,713,055中描述的组分)。干扰凋亡途径的分子的非限制性实施例包括TNF-相关的凋亡诱导配体(TRAIL)/凋亡-2配体(Apo-2L)、诱导NF- κ B阻塞从而抑制IL-6产生的试剂,激活TRAIL受体的抗体、IFNs1反义Bcl-2和As₂O₃(三氧化二砷,**Trisenox®**)。

[1089] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是激素调控试剂,例如用于抗雄激素和抗雌激素治疗的试剂。这种激素调控试剂的实施例有它莫西芬、艾多昔芬、氟维司群、屈洛昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、己烯雌酚、乙炔基雌二醇/乙炔雌二醇、抗雄激素(譬如氟他胺)、孕激素(譬如羟基孕酮己酸盐、甲孕酮/安宫黄体

酮、甲地孕酮醋酸盐/美可治)、肾上腺皮质激素(譬如氢化可的松、强的松)、黄体化激素释放激素(及其类似物和其它LHRH拮抗剂,例如布舍瑞林和戈舍瑞林)、芳香酶抑制剂(例如瑞宁得/瑞宁得、奥美定/cytraden、依西美坦)、激素抑制剂(例如奥曲肽/-善得定)和类似试剂。

[1090] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是抗无反应性化疗剂(例如耐受肿瘤和癌抗原的小分子化合物、蛋白、糖蛋白或抗体)。这种化合物的实施例是可阻断CTLA-4活性的分子,例如MDX-010(Phan et al.,PNAS USA 100, 8372(2003))。

[1091] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是含肿瘤抑制子基因核酸或诸如编码人重组野生型p53/SCH58500的复制缺陷型腺病毒这样的载体等;针对癌基因的反义核酸或去调控基因;或针对突变或去调控基因的siRNA。肿瘤抑制子靶的实施例包括例如BRCA1、RB1、BRCA2、DPC4(Smad4)、MSH2、MLH1和DCC。

[1092] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是抗癌核酸,例如genasense(augmerosen/G3139)、LY900003(ISIS 3521)、ISIS2503、OGX-011(ISIS112989)、LE-AON/Leraf-AON(脂质体胶囊化的c-raf反义寡核苷酸/ISIS-5132)、MG98和其它针对PKC α 、丛生蛋白、IGFBPs、白蛋白激酶A、细胞周期蛋白D1或Bcl-2h的反义核酸。

[1093] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗性试剂是抗癌抑制性RNA分子(参见例如Lin et al.,Curr Cancer Drug Targets.1(3),241-7(2001)、Erratum: Curr Cancer Drug Targets.3(3),237(2003)、Lima et al.,Cancer Gene Ther.11(5),309-16(2004)、Grzmil et al.,Int J Oncol.4(1),97-105(2004)、Collis et al.,Int J Radiat Oncol Biol Phys.57(2Suppl),S144(2003)、Yang et al.,Oncogene.22(36),5694-701(2003)和Zhang et al.,Biochem Biophys Res Commun.303(4),1169-78(2003))。

[1094] 本发明的组分和联合给药也包括给药核酸疫苗,例如编码癌抗原/肿瘤相关抗原的裸露DNA疫苗(参见例如,US 5,589,466、US 5,593,972、US 5,703,057、US 5,879,687、US 6,235,523和US 6,387,888)。在一个技术方案中,联合给药方法和/或联合组分包括自体疫苗组分。在一个技术方案中,联合给药方法和/或联合组分包括全细胞疫苗或细胞因子表达细胞(例如重组IL-2表达成纤维细胞、重组细胞因子表达枝状细胞等)(参见例如,Kowalczyk et al.,Acta Biochim Pol.50(3),613-24(2003)、Reilly et al.,Methods Mol Med.69,233-57(2002)和Tirapu et al.,Curr Gene Ther.2(1),79-89(2002)。这种自体细胞技术用于联合方法的另一个实施例是MyVax®个体化免疫治疗方法(以前称为GTOP-99)(Genitope Corporation-Redwood City,CA,USA)。

[1095] 在一个技术方案中,本发明提供联合组分和联合给药方法,其中CD38BP与病毒、病毒蛋白等联合给药或共同给药。例如,通常仅具有一轮或几轮体内复制并定位于肿瘤细胞的复制缺陷型病毒可用作这种组分和方法的成分。这种病毒试剂包括或与编码免疫刺激剂,例如GM-CSF和/或IL-2的核酸相关。天然溶瘤和重组溶瘤病毒(例如HSV-1病毒、呼肠孤病毒、复制缺陷型和复制敏感型腺病毒等)可用作这种方法和组分的成分。因此,在一个技术方案中,本发明提供联合组分和联合给药方法,其中CD38BP与溶瘤病毒联合给药或共同

给药。这种病毒的实施例包括溶瘤腺病毒和疱疹病毒,它们可以是修饰或不进行修饰的病毒(参见例如,Shah et al.,J Neurooncol.65(3),203-26(2003)、Stiles et al.,Surgery.134(2),357-64(2003)、Sunarmura et al.,Pancreas.28(3),326-9(2004)、Teshigahara et al.,J Surg Oncol.85(1),42-7(2004)、Varghese et al.,Cancer Gene Ther.9(12),967-78(2002)、Wildner et al.,Cancer Res.59(2),410-3(1999)、Yamanaka,Int J Oncol.24(4),919-23(2004)和Zwiebel et al.,Semin Oncol.28(4),336-43(2001)。

[1096] 本发明的联合组分和联合给药方法也包括“全细胞”和“过继”免疫治疗方法。例如,这种方法包括免疫系统细胞(例如肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)、例如CD4+和/或CD8+T细胞(例如具有肿瘤特异抗原和/或基因增强的T细胞)的灌液或再次灌液、抗体表达B细胞和其它抗体产生/呈递细胞、枝状细胞(例如,抗细胞因子病毒重组枝状细胞、用诸如GM-CSF和/或Flt3-L这样的DC扩大试剂培养的枝状细胞、和/或肿瘤相关抗原负载枝状细胞)、抗肿瘤NK细胞、所谓的杂合细胞或其组合。细胞裂解物也用于这种方法和组分中。可用于这方面的临床实验中的细胞型“疫苗”包括CanvaxinTM、APC-8015(Dendreon)、HSPPC-96(Antigenics)和Melacine[®]细胞裂解物。与佐剂,例如明矾混合的从癌细胞脱落的抗原及其混合物(参见例如Bystryn et al.,Clinical Cancer Research Vol.7,1882-1887,July 2001)选择性地也是这种方法和联合组分这的成分。

[1097] 在一个技术方案中,本发明的CD38BP可与内部接种疫苗的方法联合递送到患者中。内部接种疫苗是指在患者中,诱导的肿瘤细胞或癌细胞死亡,例如药物诱导或辐射诱导的肿瘤细胞的细胞死亡,典型地引发针对以下的免疫应答(i)作为整体的肿瘤细胞,或(ii)包括以下的肿瘤细胞部分(a)分泌蛋白、蛋白或其它产物,(b)膜相关蛋白或糖蛋白或其它膜相关或插入膜中的组分,和/或(c)细胞内蛋白或其它细胞内成分。内部接种疫苗诱导的免疫应答可是由体液引起的(即抗体-补体介导)或细胞介导的(例如,识别内部被杀死的肿瘤细胞或其部分的内源细胞毒T淋巴细胞的发育和/或增加)。除了放射性治疗外,可用于诱导所述肿瘤细胞死亡和内部免疫化的药物和试剂的非限制性实施例是传统的化疗试剂、细胞循环抑制剂、抗血管生成药物、单克隆抗体、凋亡诱导试剂和信号转导抑制剂。与本发明的CD38BPs联合使用作为治疗性试剂相关的治疗上述疾病的其它抗癌试剂的实施例是分化诱导试剂、维A酸和维A酸类似物(例如全反式维A酸、13-顺式维A酸及类似试剂)、维生素D类似物(例如西奥骨化醇及类似试剂)、ErbB3、ErbB4、IGF-IR抑制剂、胰岛素受体、PDGFR α 、PDGFR β 、Flk2、Flt4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、TRKA、TRKC、c-met、Ron、Sea、Tie、Tie2、Eph、Ret、Ros、Aik、LTK、PTK7及类似试剂。

[1098] 与本发明的CD38BPs联合使用作为治疗性试剂相关的治疗上述疾病的其它抗癌试剂的实施例有组织蛋白酶B、组织蛋白酶D脱氢酶活性的调控子、谷胱甘肽-S-转移酶(例如谷氨酰半胱氨酸合成酶和乳酸脱氢酶)及类似试剂。

[1099] 与本发明的CD38BPs联合使用作为治疗性试剂相关的治疗上述疾病的其它抗癌试剂的实施例有雌莫司汀和表柔比星。

[1100] 与本发明的CD38BPs联合使用作为治疗性试剂相关的治疗上述疾病的其它抗癌试剂的实施例有HSP90抑制剂类似的17-丙烯基氨基格尔德霉素、针对诸如PSA1 CA125、KSA等肿瘤抗原的抗体、整联蛋白类似的整联蛋白 β 1、VCAM抑制剂及类似试剂。

[1101] 与本发明的CD38BP_s联合使用作为治疗性试剂相关的治疗上述疾病的其它抗癌试剂的实施例有神经钙蛋白抑制剂(例如伐司朴达、PSC 833和其它MDR-1或p-糖蛋白抑制剂),TOR抑制剂(例如西罗莫司、依维莫司和雷帕霉素)。及“淋巴细胞归巢”机制的抑制剂(例如FTY720)及影响细胞信号转导的抑制剂,例如黏附分子抑制剂(例如LFA等)。

[1102] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗由表达CD38的细胞参与的疾病的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和放射性治疗。

[1103] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗多发性骨髓瘤的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和放射性治疗。

[1104] 在一个技术方案中,本发明提供本发明的CD38BP在制备与放射性治疗联合使用以治疗多发性骨髓瘤的药物组合物中的用途。

[1105] 放射性治疗可包括对患者提供的放射性药剂的辐射或相关的给药。辐射的来源对被治疗的患者来说可以外部或内部的(例如,辐射治疗可以外部光束治疗(EBRT)、短程治疗(BT)或针对骨骼的放射性治疗形式)。用于这种方法的放射性元素包括,例如镭、铯-137、铈-192、镅-241、金-198、钴-57、铜-67、镓-67、碘-123、碘-131和铟-111。

[1106] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗由表达CD38的细胞参与的疾病的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和自体固有的外周干细胞或骨髓移植。

[1107] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗多发性骨髓瘤的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和自体固有的外周干细胞或骨髓移植。

[1108] 在一个技术方案中,本发明提供本发明的CD38BP在制备与自体固有的外周干细胞或骨髓移植联合使用以治疗多发性骨髓瘤的药物组合物中的用途。

[1109] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗由表达CD38的细胞参与的疾病的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和整形外科干涉。

[1110] 在一个技术方案中,本发明提供本发明的CD38BP在制备与自体固有的外周干细胞或骨髓移植联合使用以治疗多发性骨髓瘤的药物组合物中的用途。

[1111] 整形外科干涉可用于治疗由表达CD38的细胞参与的疾病,例如多发性骨髓瘤,以协助控制疼痛或维持功能或活动性。这种干涉包括康复治疗、骨骼夹板以防止骨折、或外科手术(次要或主要)以修复骨折。

[1112] 在一个技术方案中,本发明的CD38BP可与一种或多种促进CD38BP或组合物接近肿瘤内部的递送联合给药。例如,这种方法可与能松弛肿瘤的松弛肽联合递送(参见例如US 6,719,977)。在一个技术方案中,本发明的CD38BP可与细胞穿透肽(CPP)结合。细胞穿透肽和相关的肽(例如构建的细胞穿透抗体)在例如Zhao et al., J Immunol Methods. 254(1-2), 137-45(2001)、Hong et al., Cancer Res. 60(23), 6551-6(2000)、Lindgren et al., Biochem J. 377(Pt 1), 69-76(2004)、Buerger et al., J Cancer Res Clin Oncol. 129(12), 669-75(2003)、Pooga et al., FASEB J. 12(1), 67-77(1998)和Tseng et al., Mol Pharmacol. 62(4), 864-72(2002)中描述。

[1113] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗由表达CD38的细胞参与的疾病的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和至少一种抗炎症试剂。

[1114] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗多发性骨髓瘤的方法,该方法包括

给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和至少一种抗炎症试剂。

[1115] 在一个技术方案中,本发明提供本发明的CD38BP在制备与至少一种抗炎症试剂联合使用以治疗多发性骨髓瘤的药物组合物中的用途。

[1116] 在一个技术方案中,这种抗炎症试剂选自类固醇药物和NSAID(非类固醇抗炎症药物)。

[1117] 在一个技术方案中,这种抗炎症试剂选自用于治疗炎症性疾病的阿司匹林和其它水杨酸、Cox-2抑制物(譬如罗非考昔和塞来考昔)、NSAIDs(譬如布洛芬、酮洛芬、萘普生、枢力达、双氯芬酸、吡罗昔康、酮洛芬、二氟尼柳、萘丁美酮、依托度酸、奥沙普秦和消炎痛)、抗IL6R抗体、抗IL8抗体、抗体IL15抗体、抗IL15R抗体、抗CD4抗体、抗CD11a抗体(例如依法利珠单抗)、抗- α -4/ β -1整联蛋白(V_LA4)抗体(例如那他珠单抗)、CTLA4-Ig、氢化泼尼松、强的松、诸如甲氨蝶呤这样的病症缓解性抗风湿药(DMARDs)、羟化氯喹、柳氮磺胺吡啶、嘧啶合成抑制物(譬如来氟米特)、IL-1受体阻断试剂(譬如阿那白滞素)、TNF- α 阻断试剂(譬如依那西普、英夫利昔单抗和阿达木单抗)及类似试剂。

[1118] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗由表达CD38的细胞参与的疾病的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和至少一种免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[1119] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗多发性骨髓瘤的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和至少一种免疫抑制剂和/或免疫调节剂。

[1120] 在一个技术方案中,本发明提供本发明的CD38BP在制备与至少一种免疫抑制剂和/或免疫调节剂联合使用以治疗多发性骨髓瘤的药物组合物中的用途。

[1121] 在一个技术方案中,这种免疫抑制剂和/或免疫调节剂选自环孢霉素、咪唑硫嘌呤、霉酚酸、麦考酚酸莫酯、譬如强的松这样的脂类固醇、甲氨蝶呤、金盐、柳氮磺胺吡啶、抗疟药、布喹那、来氟米特、咪唑立宾、脱氧精胍菌素、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、雷帕霉素、他克莫司(FK-506)、OKT3、抗胸腺细胞球蛋白、胸腺五肽、胸腺素- α 及类似试剂。

[1122] 在一个技术方案中,这种免疫抑制剂和/或免疫调节剂选自免疫抑制性抗体,例如与IL-2受体的p75结合的抗体,或与例如MHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFN γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6; IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a或CD58结合的抗体,或与其配体结合的抗体。

[1123] 在一个技术方案中,这种免疫抑制剂和/或免疫调节剂选自可溶性IL-15R、IL-10、B7分子(B7-1、B7-2、其变异体及其片段)、ICOS和OX40、T细胞负调控因子抑制剂(例如抗CTLA4抗体)及类似试剂。

[1124] 在一个技术方案中,本发明的CD38BP可与两种或多种免疫抑制剂和/或免疫调节剂联合给药,例如与强的松和环孢霉素;强的松、环孢霉素和咪唑硫嘌呤;或强的松、环孢霉素和麦考酚酸莫酯联合给药。

[1125] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗由表达CD38的细胞参与的疾病的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和抗C3b(i)抗体。

[1126] 在一个技术方案中,本发明提供在患者中治疗多发性骨髓瘤的方法,该方法包括给药所需患者治疗有效剂量的本发明的CD38BP和抗C3b(i)抗体。

[1127] 在一个技术方案中,本发明提供本发明的CD38BP在制备与抗C3b(i)抗体联合使用

以治疗多发性骨髓瘤的药物组合物中的用途。

[1128] 在一个技术方案中,与本发明的CD38BPs联合使用以治疗上述疾病的治疗试剂选自组蛋白去乙酰基转移酶抑制剂(例如苯基丁酸)和/或DNA修复试剂(例如DNA修复酶和相关组分,譬如dimericine)。

[1129] 包括给药治疗有效剂量的本发明的CD38BP以治疗上述疾病的方法也可包括抗癌定向光敏疗法(例如抗癌激光治疗,它选择性地可使用光敏试剂,参见例如,Zhang et al., J Control Release.93(2),141-50(2003))、抗癌声波和冲击波治疗(例如参见,Kambe et al.,Hum Cell.10(1),87-94(1997)),和/或抗癌营养辅助食品治疗(参见例如,Roudebush et al.,Vet Clin North Am Small Anim Pract.34(U249-69,viii(2004)和Rafi, Nutrition.20(1),78-82(2004)。同样,本发明的CD38BP可用作制备治疗上述疾病的药物组合物,与抗癌定向的光力学治疗联合给药(例如,抗癌激光治疗,它选择性地可使用光敏试剂,抗癌声波和冲击波治疗,和/或抗癌营养辅助食品治疗)。

[1130] 如上所述,本发明的药物组合物可联合给药进行治疗,即,作为单独的药物组合物或与一种或多种其它上述治疗性试剂一起配制的本发明的化合物与一种或多种与被治疗疾病或症状相关的试剂联合使用。这种联合治疗需要更低剂量的本发明的化合物和/或共给药试剂,从而避免与各种单一治疗相关的可能毒性或并发症。

[1131] 在一个技术方案中,本发明提供与免疫调节物偶联的CD38BP,譬如免疫调节细胞因子、干细胞生长因子、淋巴毒素(例如TNF,譬如TNF α),或造血因子。这种可用作连接物的分子的实施例包括IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18和IL-21、集落刺激因子(例如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF))、干扰素(例如IFN α 、IFN β 和IFN γ)、命名为“S1因子”的干细胞生长因子、促红细胞生成素和促血小板生成素、其活性片段、其衍生物、其变异体或任何其组合。

[1132] 在一个技术方案中,本发明的CD38BPs可通过检测其膜表面的CD38水平或含CD38的细胞水平,从而在体内或体外诊断其中激活的表达CD38的细胞在发病机理中起重要作用的疾病。例如,可通过将待测样品,选择性地包括对照样品与CD38BP在抗体和CD38间可形成复合物的条件下接触。然后检测复合物的形成(例如使用ELISA)。当对照样品与检测样品一起使用时,在两种样品中检测复合物,两种样品复合物形成的任何统计学上显著的差异即表明在检测样品中存在CD38。

[1133] 更具体地,本发明提供鉴定和诊断入侵细胞和组织及其它本发明的CD38BPs定位的细胞,从而监测治疗进展、治疗后的状态、发展癌症的危险性、癌症进程等。在一个这种诊断检测的实施例中,本发明提供可在组织中诊断入侵细胞水平的方法,包括在CD38BP和潜在的含CD38的组织间形成免疫复合物,然后检测免疫复合物的形成,其中免疫复合物的形成与组织中存在入侵细胞相关。可用标记的分离抗体和标准成像技术在体内进行接触,或可在组织样品上进行体外接触。

[1134] CD38BPs可用于在任何合适的生物样品中提供任何合适的接受检测含CD38的肽和肽片段。本发明提供的传统免疫检测的实施例包括但不限于,用CD38BP进行ELISA、RIA、FACS检测、表面等离子共振检测、色谱检测、组织免疫组织化学、Western印迹和/或免疫沉淀。本发明的抗CD38抗体可用于在人中检测CD38和CD38片段。在这些技术中所用的合适的CD38BP和/或二抗的标记包括但不限于,各种酶、辅基、荧光材料和放射性材料。合适的酶

的实施例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实施例包括链亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光材料的实施例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺、荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;化学发光材料的实施例包括鲁米诺;合适的放射性材料的实施例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 和 ^3H 。

[1135] 也可在生物样品中通过竞争免疫检测法,用标记可检测底物的CD38肽标准品和未标记的CD38BP,例如未标记的抗CD38抗体来检测CD38BPs。在这种检测中,生物样品、标记的CD38肽标准品和CD38BP结合,从而测定与未标记CD38BP结合的标记的CD38标准品的量。生物样品中的CD38肽的量与结合到CD38BP上的标记的CD38标准品的量成反比。

[1136] CD38BPs在体内肿瘤成像中是特别有用的。与CD38相关的体内成像可通过任何合适技术进行。例如在肿瘤中使用Tc-标记或用其它释放 γ 射线的同位素标记抗CD38抗体或次级标记(例如FITC标记)来自肿瘤的CD38BP:CD38复合物,并用 γ 闪烁照相机(例如Elscint Apex 409ECT设备)进行成像,典型地使用低能、高分辨率瞄准仪或低能全目标瞄准仪。然后评估染色组织的放射性计数,作为肿瘤中CD38相关肽的量的指示。通过这种技术获得的图像可用于评估CD38在患者、哺乳动物或组织中的生物分布,例如,以CD38或CD38片段作为存在入侵的癌细胞的生物标志物。这种技术的改变可包括使用磁共振成像(MRI)改善通 γ 照相机的成像技术。类似的免疫成像方法和原理在例如Srivastava(ed.), *Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy* (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Gennaro et al., (eds.), pp.624-652 (Mack Publishing Co., 1990), and Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in *Biotechnology And Pharmacy* 227-49, Pezzuto et al., (eds.) (Chapman&Hall 1993)中描述。这种图像也可用于其它抗癌试剂的定向递送,其实施例如此处所述(例如,凋亡试剂、毒素或CHOP化疗组合)。另外,这种图像也可或选择性地作为外科技术切除肿瘤的依据。另外,这种体内成像技术也可在具有肿瘤的患者中鉴定和定位肿瘤(由于存在其它生物标志物、转移等),但肿瘤不能通过传统分析技术鉴定。所有这些方法均是本发明的特征。

[1137] 本发明提供的体内成像和其它诊断技术在人患者(例如,以前未诊断具有癌症的患者,或在癌症恢复/康复期的患者)中检测微转移是非常有用的。例如,在所有癌细胞中占90%的癌细胞可用CD38抗体偶联组合物染色鉴定。用单克隆抗CD38抗体和其它此处所述的CD38BPs的检测可作为存在侵略性/入侵性癌的暗示,也或选择性地用针对这种微转移的相关单克隆抗CD38抗体、CD38BP或相关组合物治疗来提供可行性的暗示。另外,与癌细胞相关的单克隆抗CD38抗体利于区分这种癌相关组织和来自正常细胞的其它形式CD38相关的细胞。

[1138] 在一个技术方案中,本发明提供体内成像方法,其中本发明的CD38BP,譬如抗CD38抗体与促进检测的无线电不透明试剂偶联,将偶联的抗体给药宿主,譬如通过注入血液中,然后检测宿主中标记抗体的存在和定位。通过这种技术和任何其它此处提供的诊断方法,本发明提供了在人患者或采自人患者的生物样品中筛选疾病相关的细胞存在的方法。对诊断成像而言,可将放射性同位素与CD38BP通过中间功能基团直接或间接结合。有用的中间功能基团包括螯合剂,例如乙二胺四乙酸和二乙烯三胺五乙酸(参见例如US 5,057,313)。在这种放射性同位素偶联的CD38BPs参与的诊断检测中,递送到患者的偶联的肽的剂量典

型地维持在尽可能低的水平,使同位素具有最小半衰期、在机体具有最小滞留时间,同位素数量最小,从而进行检测和精确测定。

[1139] 除了放射性同位素和无线电不透明试剂外,可使用与染料(譬如偶联生物素-链亲和素复合物)、造影剂、荧光化合物或分子及用于磁共振成像(MRI)的增强试剂(例如顺磁性离子)(参见例如美国专利6,331,175,它描述了MRI技术和与MRI增强试剂偶联的抗体的制备)偶联的CD38BP进行诊断方法。这种诊断/检测试剂可选自用于磁共振成像的试剂和荧光化合物。为了加载诸如抗体,偶联放射性金属或顺磁性离子的成分这样的CD38BP,需要使其与具有连接多个可结合离子的螯合剂基团的长尾的试剂反应。这种尾可以是多聚体,譬如多聚赖氨酸、多糖或其它衍生的或具有可与螯合剂基团,譬如例如卟啉、多胺、冠醚、二缩氨基硫脲、聚脲等已知用于该目的的悬挂基团的衍生链。可用标准化学法将螯合剂与CD38BP偶联。螯合剂通常通过可与分子形成具有最小免疫反应性丢失和最小聚集和/或内部交联的基团与CD38BP连接。其它不常用的将螯合剂与抗体偶联的方法和试剂在例如US 4,824,659中描述。潜在有用的金属螯合剂组合物的实施例包括2-苯甲基-DTPA及其一甲基和环己基类似物,使用一般能量范围为60到4,000keV的诊断性同位素,例如 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{18}F 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{99}Tc 、 ^{94}Tc 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 和 ^{76}Br 进行放射性成像。这些和类似的螯合剂在与非放射性金属,譬如镁、铁和钆结合时,可与CD38BP联合用于MRI诊断方法。大环螯合剂,例如NOTA、DOTA和TETA可与各种金属和放射性金属一起使用,特别是分别与镓、钷和铜的放射性核一起使用。可通过剪辑目标金属的环体积而使这种金属-螯合剂复合物非常稳定。其它诸如大环聚醚这样的与核素,例如进行RAIT的 ^{223}Ra 稳定结合的环状螯合剂也适用于诊断方法中。

[1140] 因此,本发明提供诊断型CD38BP偶联物,其中CD38BP与造影剂(例如用于磁共振成像、计算机X线断层摄影术或超声造影剂增强试剂)或放射性核素,例如 γ -、 β -、 α -、俄歇电子或正电子发射同位素偶联。其它有用的偶联CD38BP在其它地方描述,可用于本发明提供的诊断方法和组合物(例如诊断试剂盒)中。

[1141] 在一个技术方案中,本发明提供诊断癌症的试剂盒,包括含诸如抗CD38抗体这样的CD38BP和一种或多种检测CD38BP与CD38肽结合的试剂的试剂盒。例如,试剂可包括荧光标签、酶标签或其它可检测标签。试剂也可包括二抗和三抗及用于酶反应的试剂,其中酶反应可产生可显现的产物。在一个技术方案中,本发明提供诊断试剂盒,在合适的容器中含一种或多种标记或未标记形式的本发明诸如抗CD38抗体这样的CD38BP,间接检测法中的温育试剂,及根据标记的状态,在这种检测中进行检测的底物或衍生的试剂。也包括对照试剂和用途说明书。

[1142] 也提供了诊断型试剂盒,通过诸如偶联/标记的抗CD38抗体这样的CD38BP在组织样品或宿主中检测细胞活性或检测CD38肽的存在。在这种诊断型试剂盒及其它地方所述的用于治疗用途的试剂盒中,典型地可在试剂盒中以冻干形式,单独或与其它针对靶细胞或肽的抗体一起提供CD38BP。典型地,也包括药学上可接受载体(例如惰性稀释剂)和/或其成分,例如Tris、磷酸或碳酸缓冲液、稳定剂、防腐剂、生物杀灭剂、生物杀灭剂、惰性蛋白,例如血清白蛋白等(典型地,装在单独容器中,用于混合)及其它试剂(典型地也在单独的容器中)。在特定试剂盒中,也包括可结合抗CD38抗体或其它CD38BP的第二抗体,它典型地存在单独的容器中。第二抗体典型地以与本发明的抗CD38抗体或其它CD38BP相似的方式与标记

物偶联和配制。用上述方法CD38BP_s可用于区分癌/肿瘤细胞的亚组,并鉴定这种细胞及相关的组织/生长。

[1143] 在一个实施例中,CD38BP或抗CD38抗体可加到硝酸纤维素或其它可固定细胞、细胞颗粒或可溶性蛋白的固相支持物上。然后在用可检测标记的CD38肽或抗体处理后用合适的缓冲液洗涤支持物。然后用缓冲液洗涤固相支持物以除去未结合的肽或抗体。然后可通过已知的方法步骤检测固相支持物上结合的标记物的量。

[1144] 连接的与暴露的底物反应的酶可用于产生可被检测的化学基团,例如,通过分光光度测定、荧光测定或视觉观察的方法检测CD38BP偶联物和/或融合蛋白。可用作可检测标记CD38BP_s和抗CD38抗体的酶包括苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -5-类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、丙糖磷酸异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、尿素酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。也可以用荧光化合物标记CD38BP。当荧光标记的抗体暴露在合适波长的光下时,可通过荧光检测其存在。最常用的荧光标记化合物是荧光素异硫氰酸盐、若丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、异藻蓝蛋白、*o*-邻苯二甲醛和荧光胺。

[1145] 诸如抗CD38抗体的CD38BP_s也可用荧光发射的金属,譬如¹⁵²Eu或其它镧系金属进行可检测标记。例如,这些金属可被抗CD38抗体通过金属螯合基团例如二乙三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)进行连接。

[1146] CD38BP_s和抗CD38抗体也可通过与化学发光化合物偶联而进行可检测标记。然后通过检测在化学反应中升高的荧光的存在来测定化学发光标记的CD38-BP的存在。特别有用的化学发光标记化合物的实施例有发光氨、异氨基苯二酰肼、theromatic吡啶酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯。

[1147] 同样,生物发光化合物可用于标记CD38BP。生物发光是一种在生物系统中发现的化学发光,其中催化蛋白可增加化学发光反应的效率。生物发光蛋白的存在通过检测荧光而测定。用于标记的重要的生物发光化合物有荧光素、荧光素酶和发光蛋白质。例如如果可检测标记是放射性 γ 发射者,则标记肽或抗体、抗体片段或衍生物的检测可通过闪烁计数来完成,如果标记是荧光材料,则通过荧光计数来检测。对酶标记而言,可通过使用酶底物的比色方法进行检测。也可通过将底物的酶反应程度与类似制备的标准品进行视觉比较而进行检测。

[1148] 这些和其它诊断技术可用于筛选任何合适的针对CD38肽或CD38片段的材料。这些被筛选的材料的实施例包括例如血液、血清、淋巴、尿液、炎症流出液、脑脊液、羊水、组织提取物或组织匀浆等。但本发明不限定仅检测这些样品,本领域技术人员可确定使用其它样品的合适条件。

[1149] 可通过从患者中除去组织样品,并对这种样品提供本发明的标记CD38BP_s,譬如抗CD38抗体而进行原位检测。通过对生物样品使用或覆盖标记的CD38BP,譬如标记的抗CD38抗体(或片段),可提供本发明的CD38BP、抗CD38抗体(或片段)。通过使用这种流程,不仅可测定CD38或CD38片段的存在,也可以测定这种肽在被检测的组织中的分布(例如,以评估癌细胞的散布)。通过本发明,技术人员应知道,可改变任何各种组织学方法(例如染色流程)以进行原位检测。

[1150] 本发明进一步提供促进销售和/或使用本发明的CD38BP的方法,包括发布关于对

任何可能的人或实体在预防或治疗任何如其它地方所述的疾病或疾病组合方面化合物的用途信息(例如提供分发、邮寄等的印刷资料,通过广告标记,通过电视节目和广告,通过收音机节目和广告,通过互联网邮寄、通过电子邮件、通过电话销售、通过门对门或人对人销售、通过基金和/或集会、座谈、论坛等、通过使用和/或缩减销售人员的服务和/或医疗/科学联络、通过基金和/或集合科学研究及相关用途的出版物等)(譬如,药物链、规定的管理者、保险公司、HMOs、医院和医院链、其它康复公司、药房管理者、潜在患者、癌症患者、以前的癌症患者、恢复期患者、初级保健医生、护士、药房医生和/或关键的意见领导者)。

[1151] 本发明也提供含本发明的化合物的药物组合物及使用说明书。试剂盒可进一步含有一种或多种其它试剂,例如上述的免疫抑制试剂、化疗试剂和抗炎症试剂或放射性毒素试剂,或一种或多种本发明的其它CD38BPs(例如具有补体活性的CD38BP)。本发明的试剂盒也包括诊断试剂和/或其它治疗试剂。在一个技术方案中,本发明的试剂盒包括用于诊断方法中以诊断患者中表达CD38的细胞参与的疾病状态或存在的本发明的CD38BP和诊断试剂。在一个技术方案中,试剂盒包括以高稳定形式(例如冻干形式)存在的本发明的CD38BP,它可与能和高稳定组合物混合形成可注射组合物的药学上可接受的载体一起存在。

[1152] 此处引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利均通过与每个参考文献单独和特异地通过参考整合在文中的程度进行参考并整合在文中。

[1153] 此处所用的所有标题和副标题仅为了方便,不对本发明以任何方式进行限制。

[1154] 上述元素在其所有可能变化下的任何组合都包括在本发明中,除非进行说明或与本文明确矛盾。

[1155] 术语“a”和“an”和“the”及类似指示物在描述本发明的文中解释为包括单数和复数,除非进行说明或与本文明确矛盾。

[1156] 此处的数值引用范围仅用于作为落在该范围中的每个单独数值的速记方法,除非特别说明,每个单个的数值包括在说明书中,和它是单独引用一样。除非特别说明,所有此处提供的确切数值是相应近似数值的代表(例如,对特定因素或测定法提供所有确切的示例数值可认为也提供了相应的近似测定值,当合适时用“约”修饰)。

[1157] 此处所述所有方法可以合适的顺序进行,除非特别说明或在文中明确矛盾。

[1158] 此处提供的任何和全部实施例或示例语言(例如“譬如”)的用途仅仅是为了更好地阐述本发明,不对本发明的范围进行限制,除非说明。说明书中的语言不表明任何元素对本发明的实施是必需的,除非明确说明。

[1159] 此处的专利文献的引用和整合仅为了方便,不代表任何该专利文献关于有效性、专利权和/或主张。

[1160] 在本发明的任何技术方案的描述中所用术语例如“含有”、“具有”、“包括”或“包含”某成分是指对本发明类似技术方案中“由……组成”、“主要由……组成”或“主要含有”该特定成分提供支持,除非特别说明或在文中明显有矛盾(例如,此处含特定成分的组合也理解为描述由该成分组成的组合物,除非特别说明或在文中有明显矛盾)。在法律允许的最大程度上,本发明包括所有技术方案中再次引用的主体事件的修改和等价物。

[1161] 所有此处引用的专利、正在审理的专利申请和其它文献通过参考整合在文中。

[1162] 通过以下实施例进一步描述本发明,这些实施例不进行进一步限制。

[1163] 实施例

[1164] 实施例1

[1165] 制造荧光素酶转染的 (Daudi-luc) 细胞

[1166] 在添加了10%FCS (Optimum C241, Wisent Inc., St. Bruno, QC, Canada)、2mM L-谷氨酸、100IU/ml青霉素、100mg/ml链霉素、1mM丙酮酸钠 (均来自Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) 的RPMI 1640培养基中培养Daudi细胞 (来源于Burkitt淋巴瘤) 培养物。培养基每周更新两次。在转染前, 剥离细胞, 以 $1-1.5 \times 10^6$ 细胞/ml接种, 以确保生存能力及最优生长。

[1167] 荧光素酶转染

[1168] 将 8.2×10^6 个CD38⁺Daudi细胞置于350 μ l RPMI (添加了10%dFCS, Gibco BRL) 中, 转移到电穿孔小槽 (Biorad, Hemel Hempstead, Herts, UK) 内。然后加入40 μ g来自GTS的gWIZ荧光素酶 (Aidevtron, Fargo, ND, USA) 和10 μ g可提供嘌呤霉素抗性的pPur载体 (BD Biosciences, Alphen a/d Rijn, The Netherlands)。在细胞置于冰上10分钟后, 将细胞进行电穿孔 (250V, 950 μ F; Gene Pulser II, Biorad Laboratories GmbH, München, Germany)。再次将细胞置于冰上, 浸于40ml RPMI (添加了10%FCS) 中。然后将细胞涂布在96孔组织培养皿 (每孔100 μ l) 中。48小时后, 加入嘌呤霉素 (终浓度: 1 μ g/ml; Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, The Netherlands)。然后进一步在24孔组织培养皿中培养嘌呤霉素抗性克隆。

[1169] 测定荧光素酶活性

[1170] 使用荧光素酶检测系统 (#E4030, Promega, Madison, WI, USA) 来确定细胞的荧光素酶活性。在Eppendorf离心机中对 1×10^5 个细胞进行离心 (13.500rpm, 1分钟), 在100 μ l PBS中洗涤沉淀。离心 (13.500rpm, 1分钟) 后, 用20 μ l Reporter Lysis Bu350r (Promega) 通过冻融来裂解沉淀。离心 (13.500rpm, 1分钟) 后, 弃去20 μ l上清液, (在特别的光度计管中, Promega) 加入100 μ l荧光素酶检测试剂。通过光度计 (LB9507, Berthold, Vilvoorde, Belgium) 来测定 (10秒) 荧光。

[1171] 实施例2

[1172] 小鼠的免疫反应及杂交瘤的生成

[1173] -003的免疫方案

[1174] 每两周用20 μ g纯化的HA-CD38免疫HCo12小鼠。第一次免疫在与100 μ l弗氏完全佐剂 (CFA) 相混合的100 μ l PBS中通过腹腔注射来进行。第一次免疫后, 用纯化的HA-CD38在与100 μ l弗氏不完全佐剂 (IFA) 相混合的100 μ l PBS中通过交替使用皮下及腹腔注射来进行连续强化 ($\times 13$)。滴定展示后, 在PBS中用20 μ g HA-CD38通过静脉注射来对小鼠进行强化。

[1175] -005和-024的免疫方案

[1176] 每两周用20 μ g纯化的HA-CD38、交替用NIH-3T3-CD38转染细胞来免疫HCo12小鼠。第一次免疫用 5×10^6 个细胞在与100 μ l弗氏完全佐剂 (CFA) 相混合的100 μ l PBS中通过腹腔注射来进行, 用HA-CD38在与100 μ l IFA相混合的100 μ l PBS中通过皮下注射进行第二次及随后的免疫。在200 μ l PBS中用转染细胞进行接下来的免疫。滴定展示后, 在PBS中用20 μ g HA-CD38通过静脉注射来对小鼠进行强化。

[1177] 可产生针对CD38的人单克隆抗体的杂交瘤的生成

[1178] 从HCo12小鼠中分离小鼠的脾细胞, 根据标准实验方案通过PEG与小鼠骨髓瘤细胞

系进行融合。然后对所获得的杂交瘤进行筛选,通过ELISA筛选产生人抗体的、通过FACS分析使用人CD38转染NS/0细胞来筛选具有CD38特异性的、及通过ELISA来筛选结合重组HA-CD38蛋白的杂交瘤。选出了三种表达人单克隆抗CD-38抗体的杂交瘤细胞系,分别为-003、-005和-024。

[1179] 实施例3

[1180] 用CD38转染NIH细胞

[1181] 用于产生NIH-3T3-CD38细胞的载体(pcIpuroCD38)由M.Glennie教授(Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, UK)惠赠。在DMEM(添加了葡萄糖[4.5g/l]、10%FCS、L-谷氨酸、丙酮酸钠;BioWhittaker)中培养NIH-3T3细胞(DSMZ, ACC 59; 150,000细胞/孔; 0.5ml; 96-孔平底板, Greiner) 24小时。然后,在DMEM中稀释DNA (0.8 μ g) 和脂质转染胺试剂(Invitrogen, Breda, The Netherlands), 并混合(20min, RT)。随后,将混合物(100 μ l)加到每个孔中并温育(ON, 37 $^{\circ}$ C)。

[1182] 筛选CD38表达

[1183] 洗涤NIH-3T3-CD38细胞(在1ml PBS中)并用胰蛋白酶作用(200 μ l, 胰岛素-EDTA, BioWhittaker)。然后,加入1ml DMEM,将混合物用移液管转到FACS管中。离心(1200rpm, 5分钟)后,在FACS缓冲液(FB; PBS, 0.05% BSA, 0.02% NaN_3)中洗涤细胞,并重悬在1ml FB中。离心(1200rpm, 5分钟)后,除去上清,加入小鼠抗人CD38-PE (1/50稀释液, Sanquin, Amsterdam, The Netherlands)。在FB中洗涤细胞两次后,将细胞重悬在FB中,以通过流式细胞仪进行收集。

[1184] 扩增及选择

[1185] 胰岛素处理后,将细胞在DMEM(添加了葡萄糖4.5g/l、2mM L-谷氨酸和嘌呤霉素(2 μ g/ml)BioWhittaker)中转移到T25瓶(Greiner)内。在含嘌呤霉素的培养基上培养2周后通过流式细胞仪检测嘌呤霉素抗性细胞以选择稳定的CD38表达。通过有限稀释来亚克隆所选择的NIH-3T3-CD38细胞。这些细胞扩增后,对全部15个NIH-3T3-CD38克隆的CD38表达进行筛选。将高CD38 NIH-3T3-CD38细胞冻存在液氮中(-80 $^{\circ}$ C)备用。

[1186] 培养NIH-3T3-CD38细胞

[1187] 在DMEM(添加了葡萄糖(4.5g/l)、10%FCS、2mM L-谷氨酸、丙酮酸钠、青霉素、链霉素)中培养细胞。细胞通过使用胰岛素/EDTA每周传代两次,以 1×10^6 细胞/T75瓶的浓度接种。将高CD38NIH-3T3-CD38细胞冻存在液氮中(-80 $^{\circ}$ C)备用。

[1188] 纯化HA-CD38抗原

[1189] 将抗CD38抗体(Serotec, Oxford, UK)与琼脂糖4B(Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)偶联。用至少5个柱体积(CV)的PBS来平衡柱子(对柱管HR5/20进行装柱,底高12cm,柱体积2.4ml;最大流速0.5ml/min)。过滤样品后上样到柱上。用PBS洗柱,直到信号返回基线为止(大约3CV)。用0.1M pH为2的甘氨酸进行洗脱。用1% (v/v) 2M Tris-HCl, pH 9对洗脱组分进行中和。

[1190] 纯化抗CD38抗体

[1191] 从组织培养物上清中纯化人抗CD38抗体。首先,用0.20 μ M单向过滤器过滤上清。然后,将上清上到5ml Protein A柱(rProtein A FF, Amersham Bioscience)上,并用0.1M柠檬酸-NaOH, pH 3洗脱。洗脱液立刻用2M Tris-HCl, pH 9进行中和,并在12.6mM磷酸钠,

140mM NaCl, pH 7.4 (B. Braun, Oss, The Netherlands) 柱透析过夜。透析后, 样品通过0.20μm单向过滤器进行过滤除菌。

[1192] His-CD38批量纯化

[1193] 蛋白存在于His-CD38表达细胞的培养物上清中, 其DNA构建体含有CD38胞外结构域的序列。在构建体中含有额外的多聚His标签序列, 它位于蛋白的N末端。通过该标签可使用固相金属亲和层析来进行纯化。在此过程中, 固定在层析树脂上的螯合剂由于携带了 Co^{2+} 阳离子而带有电荷。特别地, 包括6个组氨酸氨基酸在内的序列可强烈与 Co^{2+} 结合。因此, 带有His标签的CD38蛋白可与强烈结合到这种柱上, 而在培养物上清中的其它蛋白会流过柱子或者被洗掉。然后, 可用含有与 Co^{2+} 竞争结合His的咪唑的缓冲液来洗脱掉所强烈结合的带有His标签的CD38蛋白。当纯化了足够的His-CD38时, 可在脱盐柱上通过缓冲液交换将洗脱液从蛋白中除去。

[1194] 实施例4

[1195] 将-003、-005和-024与转染CD38的CHO (CHO-CD38) 细胞、Daudi-luc细胞及新鲜的多发性骨髓瘤(MM) 肿瘤细胞结合

[1196] 收集并计数后, 将用CD38转染的Daudi-luc细胞、CHO细胞以及对照CHO细胞重悬在PBS中(1×10^6 细胞/ml)。然后, 将细胞置于96孔V型底板中(100μl/孔), 并在PBS-BSA(添加了0.1% BSA及0.02%叠氮化钠的PBS) 中洗涤两次。随后, 向细胞中加入50μl PBS-BSA中的抗体溶液(4℃, 30分钟)。于PBS-BSA中洗涤3次后, 加入50μl (1:400稀释度) PBS-BSA中的兔抗人IgG-FITC(4℃, 于暗处30分钟)。将细胞洗涤3次, 通过流式细胞仪检测CD38抗体与CHO-CD38以及Daudi-luc细胞的特异结合。以HuMab-KLH(一种由Genmab B.V., Utrecht, The Netherlands通过使用本文其它地方所述的免疫流程生成的针对KLH(钥孔血蓝蛋白) 的人单克隆抗体) 作为对照。图1和图2所示的是-003、-005和-024与CHO-CD38细胞及Daudi-luc细胞的结合, 尽管 EC_{50} 有所不同(表1)。没有观察到与对照CHO细胞的结合(数据未显示)。

[1197] 新鲜的MM肿瘤细胞由Dr. Lokhorst (University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands) 惠赠。肿瘤细胞通过Ficoll (Bio Whittaker淋巴细胞分离培养基, cat 17-829E) 梯度离心从多发性骨髓瘤患者的骨髓中分离。收集并计数后, 用25μl FITC标记的CD38特异抗体及25μl CD138重悬MM细胞(100,000细胞/孔)。温育(4℃, 30分钟) 后, 在PBS-BSA中洗涤细胞, 并加入PE标记的羊抗鼠IgG(1:200; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. Soham, UK)。温育(4℃, 30分钟) 并在PBS-BSA中洗涤细胞后, 通过流式细胞仪测定荧光。图3所示的是-003、-005和-024与MM细胞的结合。

[1198] 表1在CHO-CD38细胞、Daudi-luc细胞和新鲜MM肿瘤细胞上结合抗CD38抗体的 EC_{50} 值

	CD38- 特异性 抗体	EC_{50} CHO-CD38 (μg/ml)	EC_{50} Daudi-luc (μg/ml)	EC_{50} MM 细胞 (μg/ml)
[1199]	-003	0.54	0.26	0.56
	-005	0.23	0.09	0.04
	-024	0.08	0.05	0.02

[1200] 实施例5

[1201] 抗体依赖的细胞介导的细胞毒素作用

[1202] 在RPMI⁺⁺ (添加了10%加强型(cosmic)牛血清的RPMI 1640培养基 (HyClone,

Logan, UT, USA)) 中收集 (5×10^6 细胞) Daudi-luc 细胞、新鲜的多发性骨髓瘤肿瘤细胞、新鲜的血浆细胞白血病肿瘤细胞以及 JK6L 和 AMO-1 多发性骨髓瘤细胞, 向其中加入 $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ (铬-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, The Netherlands), 将混合物于 37°C 水浴中温育 1 小时。洗涤细胞后 (于 PBS 中, 1500rpm, 5 分钟, 两次), 将细胞重悬在 RPMI⁺⁺ 中, 通过台盼蓝拒染法来计数。使细胞浓度为 1×10^5 细胞/ml。

[1203] 效应细胞的制备

[1204] 根据厂商说明书通过 Ficoll (Bio Whittaker; 淋巴细胞分离培养基, cat 17-829E) 从 40ml 肝素血中分离新鲜的外周血单核细胞 (健康的志愿者, UMC Utrecht, Utrecht, The Netherlands)。于 RPMI⁺⁺ 中重悬细胞后, 通过台盼蓝拒染法来计数细胞并使其浓度为 1×10^7 细胞/ml。

[1205] 产生 ADCC

[1206] 通过移液管将 $50 \mu\text{l } ^{51}\text{Cr}$ 标记的细胞转到 96 孔板中, 加入 $50 \mu\text{l}$ 抗体, 于 RPMI⁺⁺ 中稀释 (终浓度为 10、1、0.1、0.01 $\mu\text{g/ml}$)。温育细胞 (室温, 15 分钟), 加入 $50 \mu\text{l}$ 效应细胞, 使得效应物于靶的比例为 100:1 (为了确保最大裂解, 加入 $100 \mu\text{l}$ 5% 的 Triton-X100 替代效应细胞; 为了确保自发裂解, 使用 $50 \mu\text{l}$ 靶细胞和 $100 \mu\text{l}$ RPMI⁺⁺)。离心细胞 (500rpm, 5 分钟), 并温育 (37°C , 5% CO_2 , 4 小时)。离心细胞 (1500rpm, 5 分钟) 后, 于 micronic 管中收集 $100 \mu\text{l}$ 上清, 并于 γ 计数器中计数。可按照下面的公式计算百分比特异性裂解:

[1207] (样品的 cpm - 只有靶细胞时的 cpm) / (最大裂解时的 cpm - 只有靶细胞时的 cpm)

[1208] 其中 cpm 为每分钟计数次数。

[1209] 在 Daudi-luc 细胞中 (图 4 和表 2), -003、-005 和 -024 通过 ADCC 诱导裂解, 而且 -003 和 -005 比利妥昔单抗 (抗 CD20 mAb) 略好一些。有趣的是, 当新鲜的多发性骨髓瘤肿瘤细胞 (由 Dr. H. Lokhorst, UMCU, The Netherlands 惠赠) 也用作靶细胞时, ADCC 由 -003、-005 和 -024 诱导 (图 5A 和表 2)。

[1210] 表 2- 在 ADCC 中获得的 CD38 特异性抗体的 EC_{50} 值

	CD38- 特异性抗体	EC_{50} Daudi-luc (ng/ml)	EC_{50} MM 细胞 (ng/ml)
[1211]	-003	9.0	27
	-005	4.5	5.7
	-024	9.7	56

[1212] 人外周血单核细胞 Erlangen 的富集

[1213] 将来自人类志愿者 (Erlangen 大学, Erlangen, Germany) 的人血在 RPMI 1640 中稀释 2 倍, 将血细胞分层置于 Ficoll (淋巴细胞分离培养基 1077g/ml, 710g, 室温, 20 分钟; BioWhittaker, Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Belgium, cat. 17-829E, 批号 014832) 上。从中间相中收集外周血单核细胞 (MNCs), 洗涤并重悬在添加了 10% FCS, 2mM L-谷氨酸, 5U/ml 青霉素, 50 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素 (全部均来自 BioWhittaker) 的 RPMI 1640 培养基中, 向其中加入 25mM HEPES (BioWhittaker)。

[1214] 产生 ADCC II

[1215] 用 $20 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 标记靶 B 细胞 (新鲜的血浆细胞白血病肿瘤细胞, JK6L 和 AMO-1B 细胞系, 由 Dr. T. Valerius, University of Erlangen, Erlangen, Germany 惠赠) 2 小时。在 RPMI-10 中充分洗涤后, 将细胞调为 1×10^5

细胞/ml。向圆底微滴定板 (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) 中加入MNCs (50 μ l)、光敏处理的抗体 (50 μ l) 和RPMI-10 (50 μ l)。通过加入给定终体积为200 μ l的新鲜血浆细胞白血病肿瘤细胞、JK6L或AM0-1细胞 (50 μ l) 来开始进行检验。所用的效应物与靶 (E:T) 的比例为40:1。温育 (3小时; 37 $^{\circ}$ C) 后, 通过离心终止检验, 在闪烁计数器上按每分钟计数次数 (cpm) 来测定三者中所释放的 ^{51} Cr。使用下面的公式计算细胞内细胞毒素作用的百分比:

[1216] % 特异裂解 = (实验中cpm - 基础cpm) / (最大cpm - 基础cpm) $\times$ 100

[1217] 通过向靶细胞中加入高氯酸 (终浓度为3%) 来确定最大的 ^{51} Cr释放, 在没有光敏处理的抗体和效应细胞时测定基础释放。

[1218] 在全部两个多发性骨髓瘤细胞系中 (即, JK6L和AM0-1), 即使CD38表达较低时 (AM0-1细胞系), -003与-005仍可诱导裂解 (图6和图7)。

[1219] -003、-005和-024可诱导血浆细胞白血病初级肿瘤细胞的ADCC (图5B)。

[1220] 实施例6

[1221] 补体依赖的细胞毒素作用

[1222] 收集并计数Daudi-luc细胞后, 细胞的生存能力应 $>90\%$ 。(PBS) 洗涤后, 将细胞以 2×10^6 细胞/ml重悬在RPMI-B (添加了1% BSA的RPMI) 中。随后, 将细胞以 1×10^5 细胞/孔 (50 μ l/孔) 置于96孔圆底板中。然后, 向孔中加入50 μ l抗体 (终浓度在0-100 μ g/ml之间 (RPMI-B中的3倍稀释液))。温育 (室温, 15分钟) 后, 向每个孔中加入11 μ l人血清组合 (18个健康捐赠者的组合) (37 $^{\circ}$ C, 45分钟)。将孔重悬一次, 将其中120 μ l转移到FACS管 (Greiner) 中。然后, 向该悬浮液中加入10 μ l碘化丙啶 (PI; Sigma-Aldrich Chemie B.V.) (10 μ g/ml溶液)。使用流式细胞仪 (FACScaliburTM, Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) 通过测定死亡细胞的百分比 (相对于PI阳性细胞) 来检测裂解。

[1223] 图8和表2所示的是由-005诱导的Daudi-luc细胞的裂解 ($\sim 60\%$ 最大裂解), 而-003的裂解仅在非常高的抗体浓度下才可见。-024在Daudi-luc细胞中不诱导CDC (数据未显示)。在CHO-CD38细胞中, 裂解可由-003、-005和-024诱导 (图9和表3)。在更高浓度下可诱导由-003引发的裂解。在从不同MM患者 (A: 3% 难治性 (refractory) 肿瘤细胞, B: 9% 难治性肿瘤细胞, C: 30-40% 肿瘤细胞, 及D: 70% 肿瘤细胞) 获得的肿瘤细胞中 (全部由Dr. Lokhorst and Dr. Bloem, University Medical Center Utrecht, The Netherlands惠赠), 在存在-005时均观察到CDC介导的裂解, 而在存在-003时并未都观察到 (图10)。-024也诱导MM肿瘤细胞的裂解 (图10E)。

[1224] 表3-在CDC中获得的CD38特异性抗体的EC₅₀值

	CD38- 特异性抗体	EC ₅₀ Daudi-luc (μ g/ml)	EC ₅₀ CD38-CHO (μ g/ml)
[1225]	-003	>90	3.14
	-005	0.33	0.14
	-024	>90	0.24

[1226] 实施例7

[1227] 使用FACS进行交叉阻断研究

[1228] CHO-CD38细胞同过量的未标记的CD38特异性抗体进行温育 (4 $^{\circ}$ C, 15分钟)。将细胞与FITC标记的CD38特异性抗体进行温育 (浓度约为EC₉₀, 4 $^{\circ}$ C, 45分钟)。用PBS-BSA洗涤细胞

两次后,通过流式细胞仪测定荧光。图11所示的是未标记的-003阻断了FITC标记的-003的结合,而FITC标记的-005的结合未被阻断。此外,未标记的-005阻断了FITC标记的-005的结合,而FITC标记的-003的结合未被阻断。由于-003和-005不竞争结合,因此它们结合到不同的抗原决定簇。

[1229] 实施例8

[1230] 使用ELISA进行交叉阻断研究

[1231] 将可溶性人CD38包被在ELISA板的表面。将包被的CD38与过量未标记的CD38特异性抗体温育约15分钟,然后加入生物素连接的CD38特异性抗体(浓度约为 EC_{90} ,室温,1小时)。用PBS/Tween洗涤3次后,加入偶联辣根过氧化物酶(HRP)的链霉抗生物素蛋白,将混合物在室温下温育1小时。通过加入ABST溶液可检测到复合物,使用ELISA读数器在OD405nm处可测定HRP介导的底物转换。

[1232] 实施例9

[1233] 使用夹心法ELISA进行交叉阻断研究

[1234] 将CD38特异性抗体包被在ELISA板的表面。将结合板的抗体与生物素连接的可溶的CD38在液相中存在过量CD38特异性抗体是进行温育。用PBS/Tween洗涤后,用偶联HRP的链霉抗生物素蛋白于室温下1小时来检测所结合的生物素连接的CD38。通过加入ABST溶液(用PBS/Tween洗涤后)可检测到该复合物,使用ELISA读数器在OD405nm处可测定HRP介导的底物转换。

[1235] 实施例10

[1236] 通过免疫组织化学检测对板上人组织的反应性以及猕猴组织的交叉反应性

[1237] 将冰冻人组织(由Dr.H.Niessen,Free University Medical Center,Amsterdam,The Netherlands惠赠)或猴组织(Inveresk Research,Glasgow,Scotland)切片切成6 μ m厚并风干过夜。在丙酮中固定这些低温切片(室温、10分钟)并风干(约5分钟)。随后,用含0.1% H_2O_2 (pH 5.8;Sigma)的1 $\times$ 柠檬酸/磷酸缓冲液温育切片,以阻断内源过氧化物酶。室温下20分钟后,用PBS和0.05% Tween-20(PBST,室温,5分钟;Riedel de-Haen,Germany)洗涤切片两次。然后,将切片与抗生物素蛋白温育(室温,15分钟;DAKO,Glostrup,Denmark),用PBST洗涤两次,与生物素温育(室温,15分钟;DAKO)以阻断内源生物素。用PBST洗涤切片两次后,将切片与RPMI⁺⁺(添加了10%普通人血清(NHS,CLB,Amsterdam,Netherlands)的PBST)和10%普通羊血清(NGS;DAKO)预温育(室温,20分钟)。在吸干预温育的血清后,将切片与在2%PBST⁺⁺中稀释的FITC标记的一抗以所需浓度进行温育(室温,60分钟)。随后,将切片在2%PBST⁺⁺中与兔抗FITC(1:1000;DAKO)温育(室温,30分钟)。用PBST洗涤切片后,将切片在2%PBST⁺⁺中与羊抗兔生物素(1:400;DAKO)温育(室温,30分钟)。然后,在2%PBST⁺⁺中用SABC-HRP(1:100;DAKO)洗涤并温育切片(室温,30分钟)。在PBST中洗涤切片两次后,将其与氨基-乙基-咔唑(AEC)依赖的溶液(50mM醋酸盐缓冲液;pH4.9,0.01% H_2O_2 ;Riedel-de-Haen)温育(室温,10分钟)。最后,在millipore H_2O 中洗涤切片(5分钟),并用苏木精(DAKO)复染。通过使用甘油(37 $^{\circ}$ C),切片可用盖片固定,并通过光学显微镜(Axiovision-2;Zeiss,Thomwood,NY,USA)进行研究。

[1238] 支气管上皮细胞(图12B和图13B),以及横纹肌(肌细胞,图12C和图13C)、巨噬细胞、淋巴细胞和血浆B细胞(图12A和图13A)用-003和-005染色。-024具有类似的横纹肌及支

气管上皮细胞染色,但染色强度更低。无论用-003(图14D)、-005(图14E)还是-024,均未观察到内皮细胞被染色(数据未显示),而用针对内皮细胞标记物CD31的阳性对照抗体(图14A)及vWF(图14B)时可观察到清晰的染色。抗KLH被用作阴性对照抗体(图14C)。是-003(图12D)和-024(数据未显示)而不是-005(图13D)可与猕猴淋巴组织发生交叉反应。

[1239] 实施例11

[1240] 通过流式细胞仪检测对猕猴或恒河猴外周血单核细胞(PBMCs)的交叉反应性

[1241] 通过加入4.5ml振荡缓冲液(1.7mM NH_4Cl , 1mM EDTA)、40ml H_2O 和450 μl 10% KHCO_3 来裂解5ml的猕猴外周血(Inveresk Research)。离心溶血细胞(1200rpm, 10分钟)后在PBS中洗涤3次。通过台盼蓝计数细胞后,将细胞重悬在PBS-BSA中(1×10^6 细胞/ml)。

[1242] 将17.5ml恒河猴外周血(BPRC, Rijswijk, The Netherlands)用RPMI 1640按1:1稀释,分层置于Ficoll(1.077g/ml, BioWhittaker, cat. 17-829E, 批号014832)上。离心(710g, 室温, 20分钟)后,收集中间相并在RPMI中洗涤两次。最后一次洗涤之后,将细胞以 1×10^5 细胞/50 μl 的浓度重悬在RPMI 1640中。

[1243] 将细胞转移到96孔板上(100,000PBMCs/孔),在FACS缓冲液(PBS, 0.05% BSA, 0.02% NaN_3)中洗涤并与一抗温育(4 $^\circ\text{C}$, 30分钟)。在PBS-BSA中洗涤后,加入50 μl FITC标记的兔抗人IgG(DAKO, Glostrup, Denmark)(4 $^\circ\text{C}$, 30分钟)。最后,在FACS管中收集总体积为150 μl 的细胞。使用FACScaliburTM(Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)来测定并分析样品。

[1244] 通过流式细胞仪,可看出-003对猕猴淋巴细胞(图15A)和单核细胞(图15B)具有交叉反应性,但-005没有。在恒河猴中,也是观察到了-003对单核细胞交叉反应性,而-005没有(图15C)。

[1245] 实施例12

[1246] 内在化实验

[1247] 用饱和浓度的FITC标记的CD38特异性抗体对CHO-CD38细胞进行染色(于冰上, 30分钟)。(在添加了10%FCS的RPMI 1640中)洗涤细胞后,将一组细胞加热到37 $^\circ\text{C}$ 以进行内在化,而其它组仍置于冰上。在几个不同的时间间隔(0-120分钟)取出同等份的细胞并转移到用冰冷却的PBS-BSA中以终止内在化。用PBS-BSA洗涤样品两次后,向样品中加入EtBr(在PBS-BSA中稀释,终浓度为2mg/ml)以淬灭膜结合的FITC。通过流式细胞仪来测定荧光。

[1248] 图16A和图16B所示的是37 $^\circ\text{C}$ 时-003和-005被CHO-CD38细胞在5分钟内进行了内在化。

[1249] 实施例13

[1250] 体内SCID-荧光素酶实验

[1251] 在该模型中,肿瘤细胞用萤火虫荧光素酶进行转染。一旦对小鼠给药荧光素(Molecular Probes, Leiden, The Netherlands),便可使用高灵敏度CCD相机通过生物发光成像在体内检测标记的细胞,可与Wetterwald et al., American Journal of Pathology 160(3), 1143-1153(2002)比较。

[1252] 用来自Gene Therapy Systems(San Diego, CA)的gWIZ荧光素酶转染Daudi细胞,并在含有10%FCS、Pen/Strep、丙酮酸钠和1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 嘌呤霉素(Sigma)的RPMI中培养。在光度计中分析细胞的荧光素酶表达(以RLU/ 1×10^5 细胞表达),并通过FACS分析CD38的表达。 2.5×10^6 荧光素酶转染的Daudi细胞/小鼠静脉内注射到SCID小鼠中。用-003、-005、同型体对

照抗体 (HuMab-KLH) 或利妥昔单抗 (抗CD20抗体) 处理小鼠。通过腹膜内注射小鼠。使用了4种处理设置 (参见表4)。在预防性设置中,同时给药抗体 (100 μ g/小鼠) 和细胞。在治疗性设置I中,在给药细胞7天后再给药抗体 (300 μ g/小鼠)。在治疗性设置II中,在给药细胞14天后再给药抗体 (10 μ g/小鼠)。在治疗性设置III中,在给药细胞7天后再给药抗体 (100 μ g/小鼠)。通过i.p.注射氯胺酮/甲苯噻嗪/阿托品混合物麻醉小鼠用于成像。以25mg/ml的剂量i.p.给药合成的D-荧光素 (钠盐, Molecular Probes)。然后将小鼠置于不透光的盒子中,3分钟后,使用液氮来冷却CCD检测器的VersArray 1300B (Roper Scientific) 来开始成像。在5分钟的曝光周期内对由荧光素酶发射的光子进行计数。在照明条件下生成纯黑及纯白图像用作参考。使用MetaVue软件 (Universal Imaging Corp) 进行数据收集和图像分析。使用GraphPad PRISM3.02版 (Graphpad Software Inc) 中Newman-Keuls事后检验进行单边变量分析,确定不同组之间差异的显著性。

[1253] 表4-体内荧光素酶实验的处理设置 (treatment settings)

实验设置	抗体处理 (接种细胞后的天数)	抗体剂量 (μ g/小鼠)
预防性设置	0	100
[1254] 治疗性设置I	7	300
治疗性设置II	14	10
治疗性设置III	7	100

[1255] 图17A和图17B所示的是-003和-005在预防性设置和治疗性设置I中抑制肿瘤细胞的生长,类似于抗CD20抗体所观察到的抑制。这两个抗体均显著优于同型体对照抗体。此外在治疗性设置II中CD38抗体减缓了Daudi-luc肿瘤细胞的生长 (图17C)。在治疗性设置III中,-003和-024对Daudi-luc肿瘤细胞生长表现出明显抑制 (图17D)。

[1256] 实施例14

[1257] 凋亡

[1258] 根据厂商说明书 (Annexin-V Apoptosis kit, BD Biosciences, Alphen a.d. Rijn, Netherlands) 进行凋亡试验。简而言之,向 2.5×10^5 细胞 (荧光素转染的Daudi细胞,于24孔板上0.5ml RPMI⁺⁺中) 中加入CD38 mAbs,其中单个-003或-005或抗CD20抗体浓度为5 μ g/ml,或者存在交叉阻断的兔抗人IgG (50 μ g/ml)。

[1259] 温育 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂, 20小时) 后,仔细收集细胞,并用结合缓冲液洗涤 (-1200rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5分钟, BD Biosciences)。将沉淀重悬在100 μ l结合缓冲液中。然后,向悬浮液中加入5 μ l Annexin-V-FITC (BD Biosciences) 和10 μ l PI (BD Biosciences),于室温下温育15分钟。加入400 μ l结合缓冲液,对样品进行测定 (在FL2上读出PI)。为了对凋亡细胞进行分析,通过使用带有CellQuest pro软件的FACScalibur流式细胞仪 (BD Biosciences) 对全部Annexin-V-阳性细胞进行计数。至少收集10,000个事件用于分析。该群体包括PI阳性以及PI阴性细胞。

[1260] 图18所示的是-003和-005不会诱导凋亡。不过,交联后,观察到靶细胞的凋亡。-003在交联后诱导的凋亡与由抗CD20抗体 (利妥昔单抗) 诱导的凋亡类似。-005不大能在交联后诱导凋亡。用RAMOS细胞作为靶细胞可获得类似结果 (数据未显示)。

[1261] 实施例15

[1262] 在RA-SCID小鼠模型中-005在组织移植B细胞上的作用

[1263] 关节组织的移植

[1264] C.B.-17/1crCr1-SCID-bg株、雄性/雌性、4-12周龄、购自Charles River Laboratories Nederland (Maastricht, the Netherlands) 的SCID-小鼠,在温度及光照的标准条件下,饲养在IVC笼子中,喂养实验室食物和任意的的水。在移植前,通过腹膜内注射1:1比例的克他命 (NIMATEK, EuroVet) 和甲苯噻嗪 (Rompun, Bayer) 来麻醉小鼠 (每个实验组3只小鼠,第0天)。使用外科手术剪在皮肤上剪开一个小伤口。将来自患有风湿性关节炎并经过关节复位手术的患者发炎关节组织,按一团6个小片段 (总共2-3mm³) 经皮下移植到小鼠的每一面的肋腹处。使用Permacol 氰基丙烯酸酯粘合剂来封闭伤口。在实验的第一天,分析残余的关节组织,以检测在发炎关节移植中的B细胞。在实验的第八天,按200μl的体积 (静脉内) 注射-005 (12mg/kg) 或对照抗体 (抗KLH, 30mg/kg)。在实验结束时 (第十四天), 通过吸入CO₂处死小鼠,将关节植入物进行外植。将一份植入物与OCT混合物 (TissueTek, Sacura Finetek Europe) 中速冻,用于以后的免疫组织化学分析,另一份浸入到液氮中冰冻,用于以后的RNA分析。

[1265] 免疫组织化学

[1266] 使用LEICA CM1900低温箱在SuperFrost (Menzel GmbH, Braunschweig) 载片上制备5μm低温切片,并保存在-80℃。将融解的切片在丙酮中固定10分钟,于室温下干燥,并在PBS中洗涤3×5分钟。所有步骤均在室温下进行。通过添加0.3%过氧化氢和0.1%叠氮化钠的PBS温育20分钟来阻断内源过氧化物酶活性。将载片在PBS中洗涤3×5分钟,与10%普通人血清 (NHS) /10%普通兔血清 (NRbS) 的PBS/1%BSA温育30分钟。然后,将稀释在添加了1%BSA/10%NHS/10%NRbS的PBS中的一抗 (小鼠mAb) 温育60分钟。在PBS中洗涤3×2分钟后,加入在PBS (添加了1%BSA/10%NHS/10%NRbS) 中按1:50稀释的HRP偶联物 (羊抗鼠Ig-HRP; DAKO P0447), 反应30分钟。使用TSATM Biotin系统 (Perkin Elmer Life Sciences, NEL700) 来增强过氧化物酶信号。将载片在PBS中洗涤3×2分钟,与在扩增缓冲液中按1:1600稀释的生物素酪胺温育30分钟。在PBS中洗涤3×2分钟后,加入在PBS (添加了1%BSA) 中按1:400稀释的抗生物素蛋白-HRP,反应30分钟。将载片在PBS中洗涤3×2分钟,与DAB溶液 (DAKO Cytomation K3465) 温育5分钟。用蒸馏水来终止显色反应。最后,用苏木精 (MERCK) 复染玻片,用流水洗涤并用Kaiser甘油和盖片覆盖。

[1267] 染色强度记分

[1268] 由两个受过训练的人以单盲方式对染色的关节组织异种移植进行记分。首先从一系列切片中选择强度最大的切片,这个参考切片被赋予最高分8分。然后在其它切片中染色强度相对于参考切片按0-8的等级记分。

[1269] 统计分析

[1270] 使用Graph Pad Prism 4.01版 (Graph Pad software, Inc., San Diego, CA, USA) 中Dunn多比较检验及其后的Kruskal-Wallis单边ANOVA来分析染色强度的记分。

[1271] 图19和图21表明抗CD38阳性血浆细胞数目在用-005处理后降低了。用抗CD138对血浆细胞的染色确认了-005会导致血浆细胞数目的降低 (图20和图22)。

[1272] 实施例16

[1273] 针对CD38的人抗体编码序列进行测序

[1274] RNA制备

[1275] 用RNeasy kit(Qiagen,Westburg,Leusden,Netherlands)根据厂商的流程,分别从表达单克隆抗体-003、-005和-024的杂交瘤细胞系的 5×10^6 细胞中制备总RNA。

[1276] -003.-005和-024cDNA的制备

[1277] 使用SMART RACE cDNA Amplification kit(Clontech),根据厂商的流程,从100ng总RNA中制备RNA的5'-RACE-互补DNA(cDNA)。

[1278] 由Isogen Bioscience(Maarssen,The Netherlands)合成寡核苷酸引物并定量。引物溶解在 H_2O 中,浓度为 $100\text{pmol}/\mu\text{l}$,保存在 -20°C 。所有PCR及测序引物的概要通过列表给出(表5)。对于PCR,根据厂商说明书使用PfuTurbo® Hotstart DNA聚合酶(Stratagene,Amsterdam,The Netherlands;product*600322)。每个反应混合物在PCR反应缓冲液(与聚合酶一起提供)中含有 $200\mu\text{M}$ dNTPs混合物(Roche Diagnostics,Almere,The Netherlands;product*1814362)、 12pmol 反向引物(对VH3003-005而言是RACEG1A1,对VH3003-003而言是RACEVHApa1,对VL3003-003和005而言是RACEVLBsiWI)、 7.2pmol UPM-Mix(UPM-Mix: $2\mu\text{M}$ ShortUPMH3及 $0.4\mu\text{M}$ LongUPMH3)、 $0.6\mu\text{l}$ 5'RACE cDNA模板、和1.5单位的PfuTurbo® Hotstart DNA聚合酶,总体积为 $30\mu\text{l}$ 。在TGradient Thermocycler 96(Whatman Biometra,Goettingen,Germany;product*050-801)上使用35个循环的程序来进行PCR反应: 95°C 变性2分钟;35个循环的 95°C 30秒、 55°C 30秒、 72°C 1.5分钟;最后在 72°C 延伸10分钟。如果适当,PCR混合物可保存在 4°C ,直到进行进一步分析或处理。

[1279] 表5-引物

[1280]

名字	序列
ShortUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGC
RACEV _L BsiWi	GAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACG
RACEV _H ApaI	GGAGGGTGCCAGGGGGAAGACCGATGGGGCCCTT
RACEG1A1	GGGAGTAGAGTCCTGAGGACTG
M13reverse	GGATAACAATTTACACAGG
LongUPMH3	TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGG TATCAACGCAGAGT
HCseq5	GGTCAGGGCGCCTGAGTTCCACG
VH3003-003for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTC CTC
VH3003-5for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGG CTT
VL3003-5exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTT CTC
VL3003-003for	GATAAGCTTGCCGCCACCATGAGGGTCCTCGCTCAGCTC CTG
VH300324exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTC GCC
VL3003-24-5exfor	GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTT CTC

[1281] 在pGEMT-VectorSystemII中克隆-003-2F5V_H和V_L及-005V_L以及-024V_H和V_L

[1282] 通过在1%TAE琼脂糖凝胶上电泳来分离反应产物,并用溴化乙锭染色。从凝胶上切下大小正确的条带,使用Qiaexll gel extraction kit(Qiagen,cat no 20021)从琼脂糖中分离DNA。

[1283] 将从凝胶中分离的PCR片段用200 μ M dATP和2.5单位Amplitaq (Perkin Elmer) 通过在72 $^{\circ}$ C温育10分钟来在末端加A,并用minielute柱(Qiagen)纯化。使用pGEMT easy vector system II kit按照流程(LJ270,page 3/4)将末端加A的PCR片段克隆到pGEMT easy载体(Promega)上。将2 μ l连接混合物转化到OneShot DH5 α T1R感受态大肠杆菌(Invitrogen)中,并涂布在LB/Amp/IPTG/Xgal平皿上。

[1284] 测序

[1285] 分别挑取20(V_H -003)、16(V_L -003)、15(V_L -005)和6(V_H 和 V_L -024)个白色克隆、分离质粒并用M13反向引物测序后,由AGOWA(Berlin,Germany)测定-003和-024的V区以及-005的 V_L 区。-005的 V_H 区通过使用引物HCseq5由PCR产物直接进行测序。序列使用Vector NTI高级程序组(Invitrogen)进行分析。

[1286] 产生抗体-003、-005、-024和Morphosys抗体3079的表达载体

[1287] 使用具有合适的限制性位点(HindIII与ApaI)用于克隆到pConG1f0.4(Lonza Biologies,Slough,UK)中的、以及理想的Kozak序列(GCCGCCACC)的引物 V_H 3003-003for和RACE V_H Apal,通过PCR从含有-003 V_H 区的pGemT质粒克隆中扩增-003的 V_H 编码区。pConG1f0.4载体含有人IgG1重链恒定区。使用HindIII和ApaI将 V_H PCR片段同框插入到pConG1f0.4载体中。通过序列分析检测构建体。

[1288] 使用具有合适的限制性位点(HindIII与ApaI)用于克隆到pConG1f0.4中的、以及理想的Kozak序列的引物VH3003-5for和RACEVHApal,通过PCR从含有-005 V_H 区的pGemT质粒克隆中扩增-005的 V_H 编码区。使用HindIII和ApaI将 V_H PCR片段同框插入到pConG1f0.4载体中。通过序列分析检测构建体。

[1289] 使用具有合适的限制性位点(HindIII与ApaI)用于克隆到pConG1f0.4中的、以及理想的Kozak序列的引物VH300324exfor和RACEVHApal,通过PCR从含有-024 V_H 区的pGemT质粒克隆中扩增-024的 V_H 编码区。使用HindIII和ApaI将 V_H PCR片段同框插入到pConG1f0.4载体中。通过序列分析检测构建体。

[1290] 基于在专利WO 2005/103083 A2中发布的数据,由GeneArt(Regensburg,Germany)合成Morphosys抗体3079的 V_H 编码区。对编码区在HEK细胞中的表达进行了密码子优化,以增强表达水平,并引入了用于克隆到pConG1f0.4中的合适的限制性位点(HindIII与ApaI)以及理想的Kozak序列。含有合成的 V_H 区的质粒用ApaI和HindIII消化,将 V_H 片段同框插入到pConG1f0.4载体中。

[1291] 使用具有合适的限制性位点(HindIII与Pfl23II)用于克隆到pConKappa0.4(Lonza Biologies)中的、以及理想的Kozak序列的引物VL3003-5exfor和RACEVLBsiWI,通过PCR从含有-005 V_L 区的pGemT质粒克隆中扩增-005的 V_L 编码区。pConKappa0.4载体含有 κ 轻链恒定区。使用HindIII和Pfl23II将 V_L PCR片段同框插入到pConKappa0.4载体中。通过序列分析检测构建体。

[1292] 使用具有合适的限制性位点(HindIII与Pfl23II)用于克隆到pConKappa0.4中的、以及理想的Kozak序列的引物VL3003-003for和RACEVLBsiWI,通过PCR从含有-003 V_L 区的pGemT质粒克隆中扩增-003的 V_L 编码区。使用HindIII和Pfl23II将 V_L PCR片段同框插入到pConKappa0.4载体中。通过序列分析检测构建体。

[1293] 使用具有合适的限制性位点(HindIII与Pfl23II)用于克隆到pConKappa0.4中的、

以及理想的Kozak序列的引物VL3003-24-5exfor和RACEVLBsiWI,通过PCR从含有-024V_L区的pGemT质粒克隆中扩增-024的V_L编码区。使用HindIII和Pfl23II将V_L PCR片段同框插入到pConKappa0.4载体中。通过序列分析检测构建体。

[1294] 基于在W0 2005/103083中发布的数据,由GeneArt合成Morphosys抗体3079的V_L编码区。对编码区在HEK细胞中的表达进行了密码子优化,以增强表达水平,并引入了用于克隆到pConKappa0.4中的合适的限制性位点(HindIII与Pfl23II)以及理想的Kozak序列。含有合成的V_H区的质粒用Pfl23II和HindIII消化,将V_H片段同框插入到pConKappa0.4载体中。

[1295] 如实施例17中所述,通过共转染抗体的重链和轻链载体,可在HEK-293F细胞中瞬时表达抗体。

[1296] 在CHO-K1SV细胞中生成稳定细胞系

[1297] 为了生成稳定的细胞系,通过标准克隆技术将-003或-005的重链与轻链载体整合到单个双基因载体中。

[1298] 按照厂商所述的要点,线性化-003或-005的双基因载体,转染到CHO-K1SV(Lonza Biologies)细胞中。按Lonza Biologies所述使用25μM L-甲硫氨酸肌醇磷(MSX)通过选择来选取稳定的细胞系。选取高产量的克隆并在CD-CHO(Invitrogen)培养基中增殖,按实施例3所述从细胞培养物上清中纯化抗体。

[1299] 实施例17

[1300] 使用定点突变进行抗原决定簇绘图

[1301] 由Isogen Bioscience(Maarssen,The Netherlands)合成寡核苷酸引物并定量。引物溶解在H₂O中,浓度为100pmol/μl,保存在-20℃。所有PCR及测序引物的概要在表6中给出。对于PCR,根据厂商说明书使用PfuTurbo® Hotstart DNA聚合酶(Stratagene, Amsterdam,The Netherlands)。每个反应混合物在PCR反应缓冲液(与聚合酶一起提供)中含有200μM dNTPs混合物(Roche Diagnostics,Almere,The Netherlands)、10pmol正向及反向引物、100ng基因组DNA或1ng质粒DNA,以及1单位的PfuTurbo® Hotstart DNA聚合酶,总体积为20μl。在TGradient Thermocycler 96(Whatman Biometra,Goettingen, Germany;product*050-801)上使用32个循环的程序来进行PCR反应:95℃变性2分钟;30个循环的95℃30秒、60-70℃温度梯度(或另一个特定的退火稳定)30秒、72℃3分钟;最后在72℃延伸10分钟。如果适当,PCR混合物可保存在4℃,直到进行进一步分析或处理。

[1302] 根据Sambrook(Sambrook,Russell et al.2000)使用50ml 1×Tris Acetate EDTA缓冲液中的凝胶进行琼脂糖凝胶电泳。通过在凝胶中加入溴化乙锭并在UV光下观察可看到DNA。使用CCD照相机及图像分析系统来记录凝胶图像(GeneGnome;Syngene,via Westburg B.V.,Leusden,The Netherlands)。

[1303] 使用MinElute PCR Purification Kit(Qiagen,via Westburg,Leusden,The Netherlands;product*28006)根据厂商说明书对所需PCR片段进行纯化。通过UV光谱对分离的DNA进行定量(参见后文),也可通过琼脂糖凝胶电泳来估计DNA的量。

[1304] 选择性地,可通过使用1%Tris Acetate EDTA琼脂糖凝胶的琼脂糖凝胶电泳来分离PCR或消化产物(例如当存在多个片段时)。从凝胶上切下所需片段,并使用QIAEX II Gel Extraction Kit(Qiagen;product#20051)根据厂商说明书进行回收。

[1305] 可使用NanoDrop ND-1000Spectrophotometer(Isogen Life Science, Maarssen,

The Netherlands) 根据厂商说明书测定核酸的光密度。通过分析260nm处的光密度(OD)可测定DNA的浓度(1个OD₂₆₀nm单位=50μg/ml)。对于全部样品而言,均按照参考文献使用溶解核酸的缓冲液。

[1306] 从New England Biolabs(Beverly,MA,USA)或Fermentas(Vilnius,Lithuania)获取限制性内切酶及辅料并根据厂商说明书来使用。在合适的缓冲液中用5单位的酶消化DNA(100ng),终体积为10μl(反应体积可适当按比例增加)。消化物在推荐的温度下温育至少60分钟。对于需要用限制性内切酶来进行双消化的片段,若内切酶要使用不相容的缓冲液或者温度条件,可按顺序来进行消化反应。如果需要,消化产物可通过琼脂糖凝胶电泳和胶回收来纯化。

[1307] 使用Quick Ligation Kit(New England Biolabs)根据厂商说明书来对DNA片段进行连接。对于每个连接反应,将载体DNA与约3倍摩尔量的过量的插入DNA进行混合。

[1308] 根据厂商说明书,使用热休克法将质粒DNA(1-5μl DNA溶液,典型地为2μl DNA连接混合物)转化到One Shot DH5α-T1R大肠杆菌细胞(Invitrogen,Breda,The Netherlands;product*12297-016)中。随后,将细胞涂布在含有50μg/ml氨苄青霉素的Luria-Bertani(LB)琼脂平板上。将平板在37℃温育16-18小时,直至出现明显的细菌克隆。

[1309] 以pConG1seq1和pEE13.4seqrev2(表6)为引物,通过使用ThermoStart PCR Master Mix(Abgene,via Wetsburg,Leusden,The Netherlands;product*AB-938-DC15/b)的克隆PCR,来筛选其中存在含有所需序列的载体的细菌克隆。用20μl移液管顶部轻轻接触所选的克隆,并在2ml LB中蘸一下以进行小规模培养,然后将其重悬在PCR混合物中。通过TGradient Thermocycler 96使用35个循环的程序来进行PCR:95℃变性15分钟;35个循环的95℃30秒、55℃30秒、72℃2分钟;最后在72℃延伸10分钟。如果适当,PCR混合物可保存在4℃,直到通过琼脂糖凝胶电泳进行分析。

[1310] 使用下述来自Qiagen(通过Westburg,Leusden,The Netherlands)的试剂盒,根据厂商说明书,从大肠杆菌培养物中分离质粒DNA。对于大批量质粒制备(50-150ml培养物),可使用HiSpeed Plasmid Maxi Kit(product*12663)或HiSpeed Plasmid Midi Kit(product*12643)。对于小批量质粒制备(±2ml培养物),可使用Qiaprep Spin Miniprep Kit(product*27106),并用50μl洗脱缓冲液(随试剂盒提供)洗脱DNA。

[1311] HA-CD38表达载体pEE13.4HACD38的构建

[1312] 使用引物cd38forha和cd38exrev从质粒pC1puroCD38(由Prof.M.Glennie, Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, UK惠赠)上扩增人CD38的胞外结构域。通过该PCR反应引入了HA标签。该PCR产物用作使用引物SPHMM38ex和cd38exrev的第二轮PCR反应的模板。通过这轮PCR反应,引入了信号肽SPHMM、限制性位点以及用于最优表达的理想的Kozak序列(GCCGCCACC)。纯化后,将该PCR片段克隆到表达载体pEE13.4(Lonza Biologies)中,通过用引物pConKseqi、pEE13.4seqrev、cd38seq1for和cd38seq2rev(Table 6)进行测序来确定完整的编码序列。将该构建体命名为pEE13.4HACD38。

[1313] 定点突变

[1314] 构建了3种huCD38单突变蛋白,其中将237位置的T突变为A(T237A,SEQ ID No:32)、将272位置的Q突变为R(Q272R,SEQ ID No:33)、或将274位置的S突变为F(S274F,SEQ

ID No:34)。使用QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene, Amsterdam, The Netherlands)根据厂商说明书进行定点突变。该方法包括引入一个不起作用的额外的限制性位点或者缺失一个限制性位点,以筛选成功的突变(对于T237A突变是额外的XbaI位点,对于Q272R是额外的BcgI位点,对于S274F突变是缺失SspI位点。)。简而言之,将5 μ l 10 $\times$ 缓冲液,1 μ l寡核苷酸HACD38T237Afor2、HACD38Q272Rfor或HACD38S274Ffor(100pmol/ μ l),1 μ l寡核苷酸HACD38T237Arev2、HACD38Q272Rrev或HACD38S274Frev(100pmol/ μ l),1 μ l dNTP混合物,3 μ l Quicksolution,1 μ l质粒pEE13.4HACD38(50ng/ μ l)和1 μ l PfuUltra HF DNA聚合酶混合,总体积为50 μ l,并通过TGradient Thermocycler 96(Whatman Biometra, Goettingen, Germany; product*050-801)使用18个循环的程序来扩增:95 $^{\circ}$ C变性1分钟;18个循环的95 $^{\circ}$ C 50秒、60 $^{\circ}$ C 50秒、68 $^{\circ}$ C 10分钟。将PCR混合物保存在4 $^{\circ}$ C,直到进行进一步处理。接下来,将PCR混合物与1 μ l DpnI在37 $^{\circ}$ C温育10分钟以消化pEE13.4HACD38WT载体,保存在4 $^{\circ}$ C,直到进行进一步处理。将与反应混合物与5 μ l 3M NaAc和125 μ l乙醇在-20 $^{\circ}$ C温育20分钟并于4 $^{\circ}$ C、14000 $\times$ g离心20分钟来进行沉淀。用70%乙醇洗涤DNA沉淀,干燥并溶于4 μ l水中。根据厂商说明书(Invitrogen)将全部4 μ l反应体积转化到One Shot Top 10DH5 α T1R感受态大肠杆菌细胞(Invitrogen, Breda, The Netherlands)中。随后,将细胞涂布在含有50 μ g/ml氨苄青霉素的Luria-Bertani (LB)琼脂平板上。将平板在37 $^{\circ}$ C温育16-18小时,直至出现明显的细菌克隆。以pConG1seq1和pEE13.4seqrev2(表5)为引物,通过克隆PCR来筛选克隆,用相应的限制性内切酶来消化克隆以筛选突变寡核苷酸的整合。每个突变培养2个阳性克隆,并分离质粒DNA。使用引物cd38seq1for、pConG1seq1和pEE13.4seqrev2来确定完整的HACD38编码序列,从而确认存在突变以及不存在额外的非预期的突变。

[1315] DNA测序

[1316] 将质粒DNA样品送去AGOWA(Berlin, Germany)进行序列分析。使用Vector NTI高级版软件(Informax, Oxford, UK)对序列进行分析。

[1317] 在HEK-293F细胞中瞬时表达

[1318] 从Invitrogen获取FreestyleTM293-F(一种适应于悬浮生长及化学成分明确的Freestyle培养基的HEK-293亚克隆(HEK-293F))细胞,根据厂商流程使用293fectin(Invitrogen)用pEE13.4HACD38与三种带有突变T237A、Q272R及S274F的构建体转染该细胞。转化细胞的培养物上清用于ELISA进行抗CD38结合研究。

[1319] 抗CD38抗体结合

[1320] 用1 μ g抗HA抗体(Sigma, #H-9658)于4 $^{\circ}$ C过夜来包被ELISA板(Greiner, #655092),然后用2%鸡血清封闭。将转化的HEK293F细胞的培养物上清进行稀释,加到ELISA板上并于室温下温育1小时。洗涤后,加入系列稀释的HuMabs-003和-005,于室温下温育1小时。用连接羊抗人IgG抗体的HRP检测结合的抗体。检验用ABTS(Roche, #1112597)进行,使用分光光度计测定405nm处的吸光度。

[1321] 如图23A-23C所示,-003和-005均与wt人CD38结合。-003的结合不受导入突变体T237A(图23A)、Q272R(图23B)或S274F(图23C)的影响。-005能够结合带有突变T237A(图23A)的CD38。-005与带有突变Q272R的CD38的结合无论在EC₅₀还是最大结合能力上均受到剧烈影响(图23B)。-005不能与274位的丝氨酸被苯丙氨酸所替代的突变CD38相结合(图23C)。

[1322] 这些数据表明-003和-005结合到不同的抗原决定簇上。而且这些研究表明-005与CD38的结合对于272和274位的突变是敏感的。特别是S274,对于-005与CD38的结合是必需的。

[1323] 表6-引物

名字	序列
cd38forha	CTGCTGTGGCCCATGGTGTGGGCCTACCCTTACGACGTGC CTGACTACGCCAGGTGGCGCCAGACGTGGAGC
cd38exrev	AGGTCAGGTACCTCAGATCTCAGATGTGCAAG
SPHMM38ex	TATAGCCCGGGGCCGCCACCATGTGGTGGCGCCTGTGGTG GCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGCCCATGGTGTGG GCC
pConG1seq1	GAAGACTTAAGGCAGCGGCAGAA
pConKseq1	GTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGC
pEE13.4seqrev	TGCATTCATTTTATGTTTCAGGT
pEE13.4seqrev2	TCGGACATCTCATGACTTTCTTT
[1324] cd38seq1for	AGGACACGCTGCTAGGCTACCTT
cd38seq2rev	GTCCTTTCTCCAGTCTGGGCAAG
HACD38T237Arev2	TCCACCATGTATCACCCAGGCCTCTAGAGCCTGAACCTTCT CTGGTTG
HACD38T237Afor2	CAACCAGAGAAGGTTTCAGGCTCTAGAGGCCTGGGTGATACA TGGTGGA
HACD38Q272Rrev	GATATTCTTGCAGGAAAATCGAATATTCCTTTTGCTTAT
HACD38Q272Rfor	ATAAGCAAAAGGAATATTCGATTTTCCTGCAAGAATATC
HACD38S274Frev	TCTGTAGATATTCTTGCAGAAAAATTGAATGTTCTTTTGCTT ATA
HACD38S274Ffor	TATAAGCAAAAGGAACATTCAATTTTTCTGCAAGAATATCTAC AGA

[1325] 实施例18

[1326] 诱导PBMC的增殖

[1327] 在实际上如Ausiello et al., Tissue antigens 56,538-547 (2000)所述的实验中对-003、-005和-024进行检验。简而言之,在其中具有处于200 μ l RPMI⁺之中的抗体(终浓度:1.1-3.3-10⁻⁵30 μ g/ml)的平底96孔板中以1 $\times$ 10⁵细胞/孔培养来自健康捐赠者的PBMCs。将使用IL-15(以333ng/ml;Amgen Inc.,Thousand Oaks,CA,USA)刺激的细胞作为阳性对照。于37 $^{\circ}$ C温育4天后,加入30 μ l ³H-胸腺嘧啶(16.7 μ Ci/ml),持续过夜培养。使用Packard Cobra gamma计数器(Packard Instruments,Meriden,DT,USA)根据厂商说明书估定³H-胸腺嘧啶的整合。数据以来自10个捐助者的PBMCs的平均cpm($\pm$ SEM)所示。结果表明-003和-005不诱导PBMCs的明显增殖(图24A)。⁻⁰²⁴也不诱导PBMCs的明显增殖(数据未显示)。

[1328] 实施例19

[1329] IL-6的诱导

[1330] 在如Ausiello et al., Tissue antigens 56,538-547 (2000)所述的实验中对-003、-005和-024进行检验。简而言之,在其中具有处于500 μ l RPMI⁺之中的20 μ g/ml抗体和10ng/ml LPS(Sigma-Aldrich Chemie,Zwijndrecht,The Netherlands)的48孔板中以1 $\times$ 10⁶细胞/孔培养PBMCs。于37 $^{\circ}$ C过夜温育后,收集上清并储存在-20 $^{\circ}$ C。通过ELISA(IL-6ELISA kit,U-CyTech Biosciences,Utrecht,The Netherlands)根据厂商说明书来估定IL-6的浓度。数据所示的是以pg/ml为单位的来自7个捐赠者的平均浓度($\pm$ SEM)。结果表

明-003和-005不诱导显著水平的IL-6的释放(图24B)。-024也不诱导显著水平的IL-6的释放(数据未显示)。

[1331] 实施例20

[1332] 诱导IFN- γ 的释放

[1333] 在如Ausiello et al., Tissue antigens 56, 538-547 (2000)所述的实验中对-003、-005和-024进行检验。简而言之,在其中具有处于500 μ l RPMI⁺⁺之中的20 μ g/ml抗体和1 μ g/ml OKT-3 (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands)的48孔板中以 1×10^6 细胞/孔培养PBMCs。于37 $^{\circ}$ C过夜温育后,收集上清并储存在-20 $^{\circ}$ C。通过ELISA (IFN- γ ELISA kit, U-CyTech Biosciences, Utrecht, The Netherlands)根据厂商说明书来估定IFN- γ 的浓度。数据所示的是以pg/ml为单位的来自9个捐赠者的平均浓度($\pm$ SEM)。结果表明-003和-005不诱导可检测水平的IFN- γ 的释放(图24C)。-024也不诱导可检测水平的IFN- γ 的释放(数据未显示)。

[1334] 实施例21

[1335] -003和-005与重组CD38结合的亲和力

[1336] 使用表面等离子共振对-003和-005与CD38的结合进行检测。简而言之,将纯化的抗体通过芳香树脂偶联固定到CM-5传感器芯片(Biacore, Uppsala, Sweden)上。用带有HA标签的CD38(参见实施例3)进行洗脱,使用Biacore 3000(Biacore)根据芯片表面折射率的改变来检测抗原与mAb的结合。-003(表7)和-005(表8)的结合与速率常数按3个实验的平均值 $\pm$ SD的形式总结如下,结果表明-003和-005与CD38均有很高的亲和力。

[1337] 表7-25 $^{\circ}$ C时的结合与速率常数

-003	
k_a (1/Ms)	$2.17 \times 10^5 \pm 2.65 \times 10^4$
k_d (1/s)	$1.9 \times 10^{-4} \pm 4.51 \times 10^{-6}$
K_A (1/M)	$1.14 \times 10^9 \pm 1.58 \times 10^8$
K_D (M)	$8.85 \times 10^{-10} \pm 1.2 \times 10^{-10}$

[1339] 表8-25 $^{\circ}$ C时的结合与速率常数

-005	
k_a (1/Ms)	$8.88 \times 10^4 \pm 1.95 \times 10^4$
k_d (1/s)	$5.22 \times 10^{-4} \pm 1.16 \times 10^{-6}$
K_A (1/M)	$1.7 \times 10^8 \pm 3.68 \times 10^7$
K_D (M)	$6.06 \times 10^{-9} \pm 1.21 \times 10^{-9}$

[1341] 实施例22

[1342] 抗原决定簇作图

[1343] 使用PEPSCAN法进行抗原决定簇作图

[1344] 根据已知的流程(Geysen et al. 1984. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. Proc Natl Acad Sci USA 81:3998; Slootstra et al. 1996. Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. Mol Divers 1:87; Puijk et al. 2001. Segment synthesis. In PCT, The Netherlands, p.1.),

合成覆盖人CD38 C末端138个氨基酸的可搭接的20-mer线性及15-mer环状肽。而且,基于C末端的序列,制备覆盖KNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI区、CVHNLQPEKVQTLEAWVIHGG区和CLESIIISKRNIIQFSAKNIYRC区的不同长度的单环肽。此外,设计另外的系列以重构由SKRNIIQFSCKNIIYR和EKVQTLEAWVIHGG所组成的双环区。使用丙氨酸替代天然状态的半胱氨酸。在ELISA中使用信用卡形式的迷你PEPSCAN卡来筛选肽。

[1345] 肽的合成

[1346] 使用标准的Fmoc化学法来合成肽,并使用带有捕捉剂清除剂的TFA来去保护。随后,在微阵列上,去保护的肽与0.5mM的2,6-二(溴甲基)嘧啶或2,4,6-三(溴甲基)三甲苯溶液在添加了乙腈的重碳酸铵(20mM, pH 7.9) (1:1[体积/体积])中进行反应。将微阵列完全浸于溶液内,在溶液中轻摇30-60分钟。最后,用大量的Millipore H₂O充分洗涤微阵列,于70°C在含有1%十二烷基硫酸钠、0.1%β巯基乙醇的PBS (pH 7.2)的破坏缓冲液中超声处理30分钟,然后在Millipore H₂O中继续超声处理45分钟。

[1347] PEPSCAN ELISA检验

[1348] 将含有共价连接肽的455孔信用卡形式的聚乙烯卡,于血清温育(例如,在含有5%马血清[体积/体积]和5%卵清蛋白[体积/体积]的溶液中按1:1000稀释)(4°C,过夜)。洗涤后,将肽与兔抗人Ig过氧化物酶(按1:1000稀释,25°C,1小时)温育,洗涤后加入过氧化物酶底物(2,2'-连氨基-双-3-乙基苯并噻唑啉磺酸和2μl/ml 3%H₂O₂)。一小时后,用CCD相机和图像处理系统来测定显色反应。该装置由带有55mm透镜的CCD相机(Sony CCD Video Camera XC-77RR, Nikon micro-nikkor 55mm f/2.8 lens)、相机适配器(Sony Camera adaptor DC-77RR)和图像处理软件包Optimas 6.5版(Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, U.S.A.; Optimas运行在pentium II计算机上)组成。

[1349] 抗原决定簇层递的方法

[1350] 通过可代表人CD38氨基酸序列中最小独特单元的二肽基团来鉴定特有的氨基酸。将在每个所检测的1164个肽中存在的所有二肽基团赋予针对各自全肽的ELISA值。为了将二肽基团的由强到弱结合进行分级,通过用每个独立基团的ELISA值除以来自所有1164个所检验的线性及环形肽的平均ELISA值来计算相对信号,并按降序排列。以这种方式,可了解氨基酸对构象抗原决定簇的贡献。对于每个所检验的mAb,选取所有的得分高于2.5的二肽基团(即,还有这些基团的肽的ELISA值至少比从所有1164个肽中获得的平均ELISA值高2.5倍)。通过记分系统将数据去卷积成在线性CD38序列上表现出的单个氨基酸的贡献。通过在线性CD38序列上的步移以及通过使用独特的二肽单元作为参考点,每次将一个点赋予存在于该高分肽序列中的CD38氨基酸。

[1351] 发现-003、005和-024均可与人CD38的SKRNIIQFSCKNIIYR区和EKVQTLEAWVIHGG区结合。-003尤其识别RNIQF和WVIH基团,-005尤其识别KRN和VQTL基团。

[1352] 实施例23

[1353] 酶活

[1354] 在实际上如Graeff et al., J. Biol. Chem. 269, 30260-30267 (1994)所述的实验中对人CD38的酶活进行检验。简而言之,将底物NGD⁺ (80μM)与CD38 (0.6μg/ml带有His标签的人CD38胞外结构域,参见实施例3中关于His-CD38的纯化)在含有20mM Tris-HCl, pH 7.0的缓冲液中温育。可使用分光光度计根据410nm处的发射波长(激发是在300nm)来监测cGDP

的产生。在该实施例中,使用了 340 ± 60 激发滤光器及 $430 \pm 8\text{nm}$ 的发射滤光器。

[1355] 为了检验-003、005和-024对CD38的酶活效果,在加入底物 NGD^+ 之前,将重组His-CD38蛋白与各种浓度(30、3、0.3和 $0.03\mu\text{g/ml}$)的不同抗体在室温下预温育15分钟。加入抗体后在不同的时间点上(3、6、9、12、30、45、60、75和90分钟)记录环GDP核糖(cGDPR)的产生。

[1356] 图25B所示的是-005对cGDPR的产生具有显著的抑制效果。90分钟后,加入30和 $3\mu\text{g/ml}$ -005会导致cGDPR的产量减少32%和34%(表9)。在使用不同批次的-005的独立的实验中也观察到相似结果。

[1357] 加入-003(图25B,表9)、-024(图25D,表9)或抗-KLH(图25A,表9)后没有观察到抑制cGDPR产生的效果。

[1358] 基于这些发现,预期-005也可抑制从 NAD^+ 来合成环ADP核糖(cADPR)。可根据Munshi et al., J. Biol. Chem. 275. 21566-21571 (2000)所述的HPLC方法来确定对cADPR合成的抑制。

[1359] 表9. 在存在CD38特异性抗体或抗KLH时cGDP核糖的产量

	产量 (%NGD对照)			
	30 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$	0.3 $\mu\text{g/ml}$	0.03 $\mu\text{g/ml}$
[1360] KLH	110	99	108	111
-003	99	100	107	107
-005	68	66	98	102
-024	99	100	104	105

[1361] 实施例24

[1362] 通过Morphosys抗体3079来比较-003和-005

[1363] 将抗体-003和-005与Morphosys抗体3079(TH-3079)的功能进行比较。在实施例16中描述了克隆及表达Morphosys抗体TH-3079的方法。在实施例6中描述了CDC的方法。在实施例5中描述了ADCC的方法。图26A所示的是-005和-003及TH-3079以相似的最大裂解来诱导CDC介导的CD38转染CHO细胞的裂解。当对 EC_{50} 值进行比较时,在诱导CHO-CD38细胞裂解方面,-005抗体优于TH3079,其 EC_{50} 低2倍(参见表10)。

[1364] 图26B所示的是在诱导CDC介导的Daudi荧光素酶细胞裂解中,-005优于TH-3079,-005的最大裂解比TH3079高2-3倍。当对 EC_{50} 值进行比较时,在诱导Daudi荧光素酶细胞裂解中,-005抗体与TH-3079相似(参见表10)。 EC_{50} 步诱导显著的CDC介导的Daudi荧光素酶细胞裂解。

[1365] 表10. CD38特异性抗体在CDC中的最大裂解和 EC_{50} 值

	CHO-CD38 细胞 (n=2)		Daudi-luc 细胞 (n=2)	
	$\text{EC}_{50} \mu\text{g/ml}$	% 最大裂解	$\text{EC}_{50} \mu\text{g/ml}$	% 最大裂解
[1366] -005	0.15 ± 0.007	76.5 ± 3.54	0.39 ± 0.00	70.5 ± 7.78
TH-3079	0.31 ± 0.021	81.5 ± 7.78	0.34 ± 0.26	25.5 ± 12.02
-003	4.5 ± 0.933	62.0 ± 16.79	nc	12 ± 8.49

[1367] 表11. CD38特异性抗体在ADCC中的最大裂解和 EC_{50} 值

[1368]

	Log EC50	STD log EC50	最大裂解 (%)	STD 最大裂解
-005	0.76	0.18	49.2	12.8
-003	1.17	0.23	64	14.2
TH3079	0.96	0.10	43.8	12.0

[1369] 图26C所示的是在该实验中,-005、-003和TH-3079介导通过ADCC的Daudi靶细胞的裂解。在(log)EC50和最大裂解方面没有发现差异(表11,n=5)。

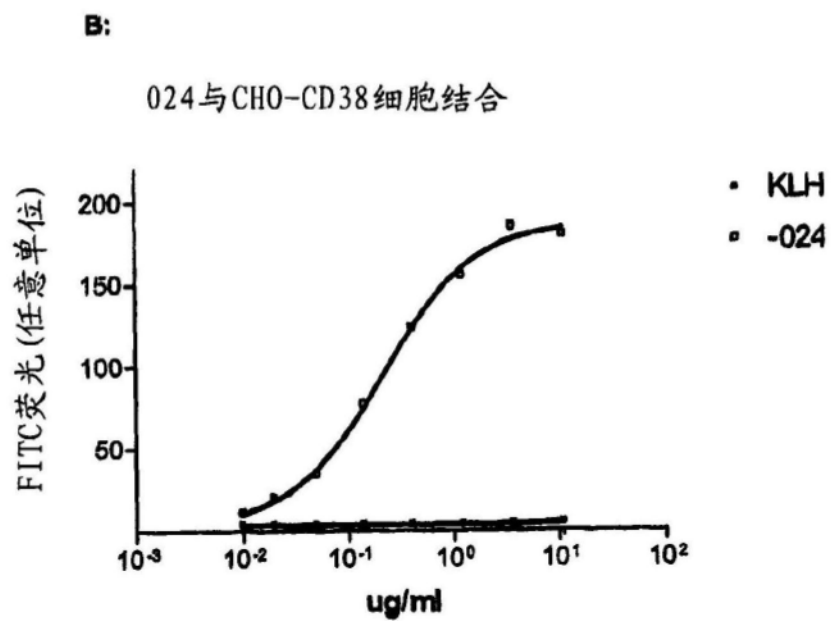
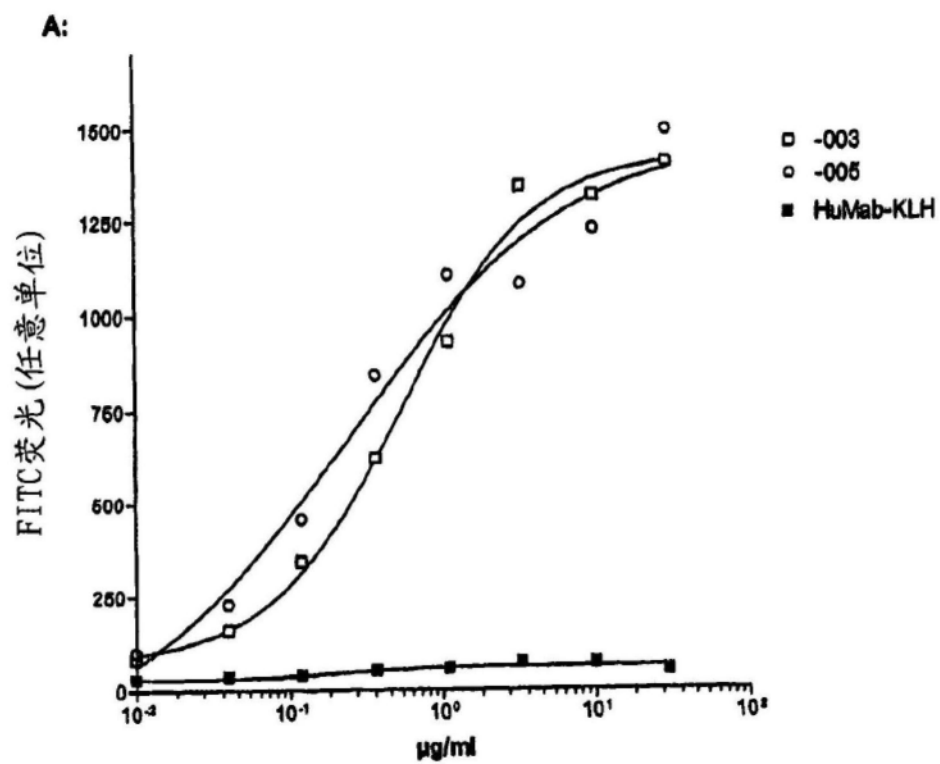


图1

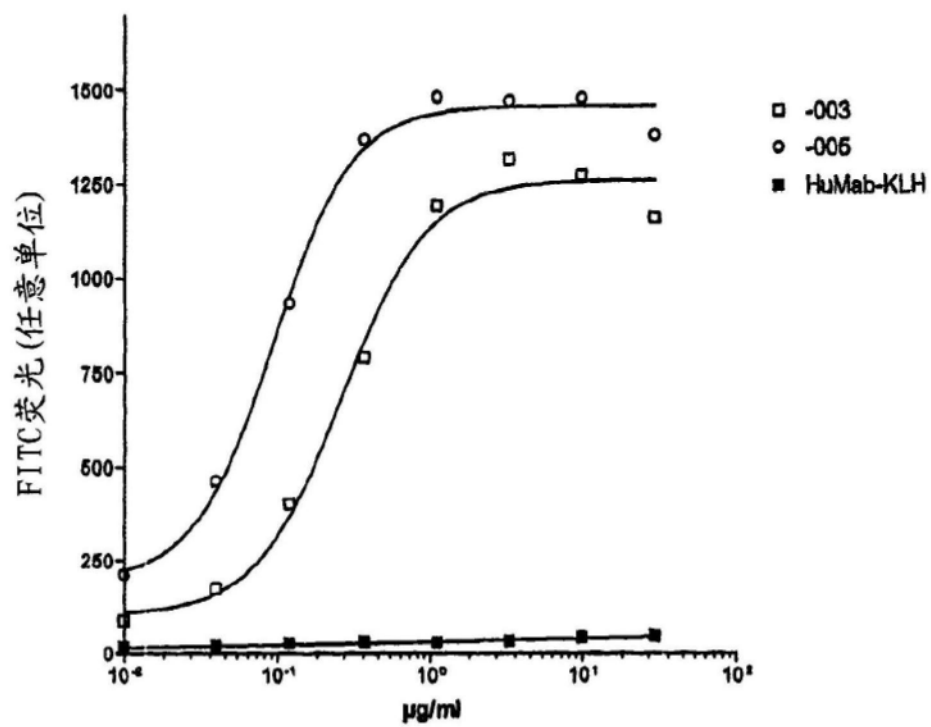
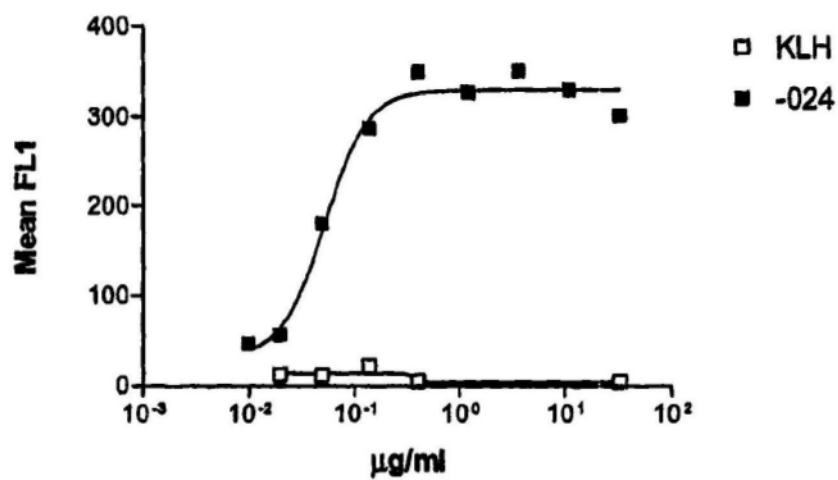
A:**B:**

图2

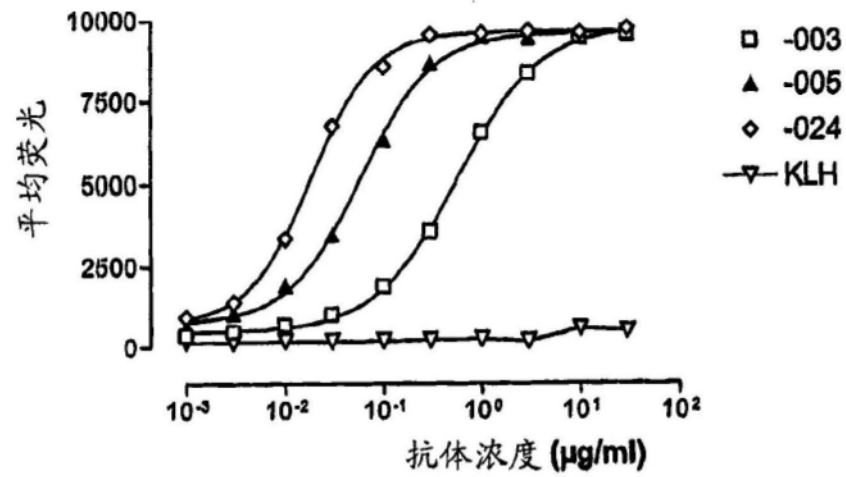
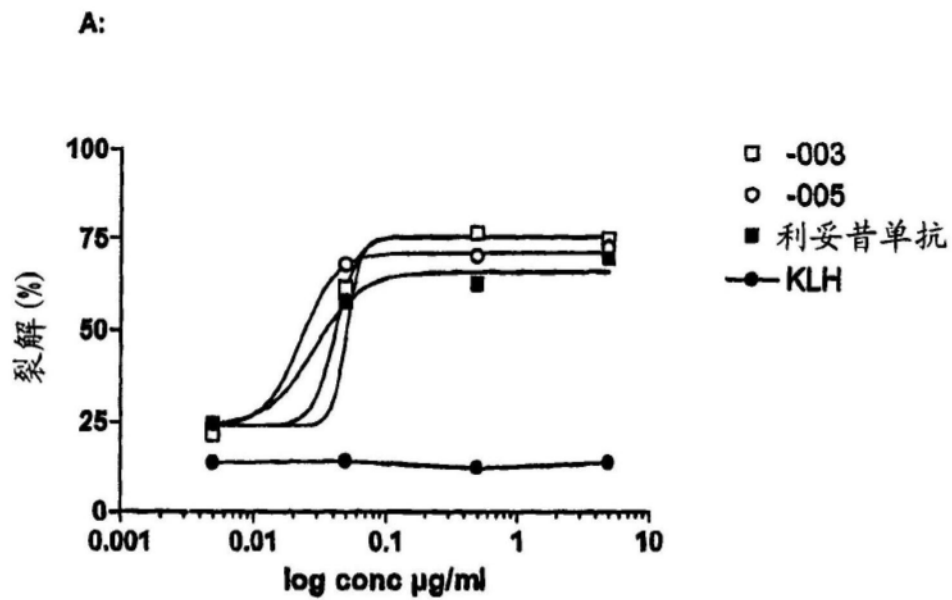


图3



B:

Daudi细胞的ADCC

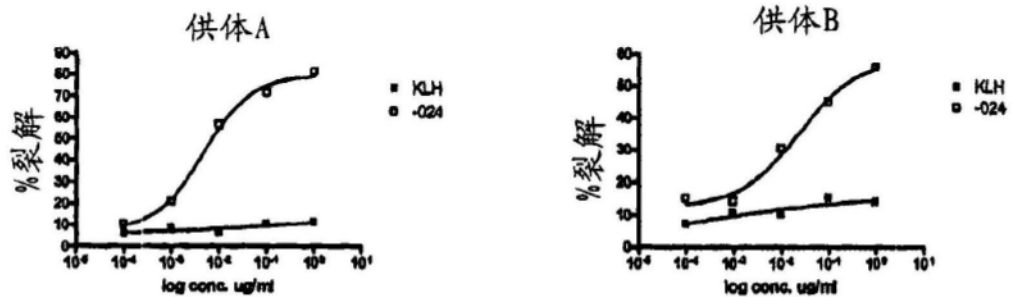


图4

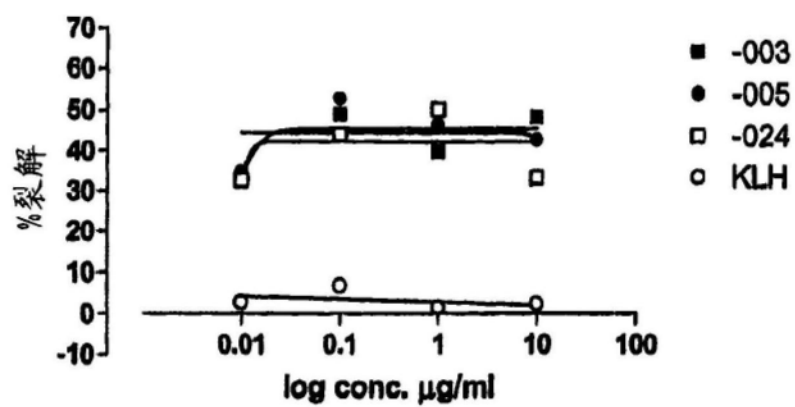
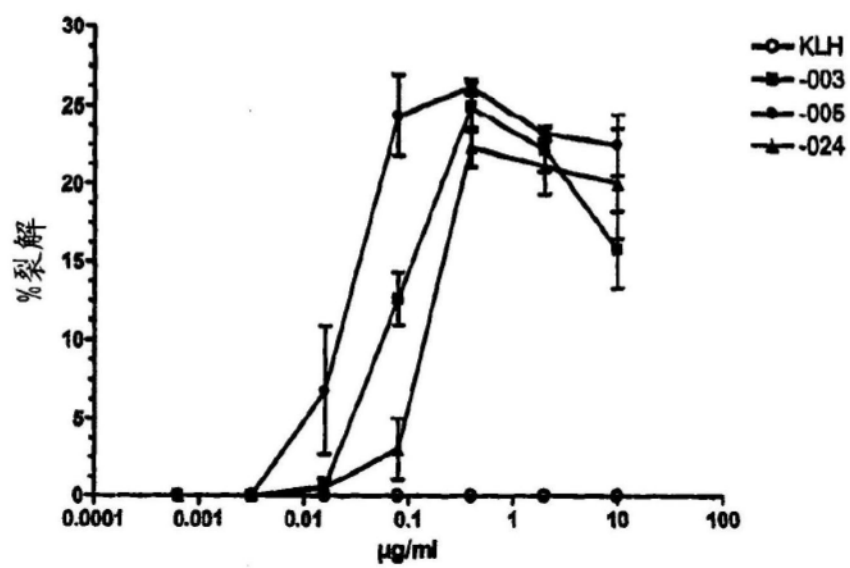
A:**B:**

图5

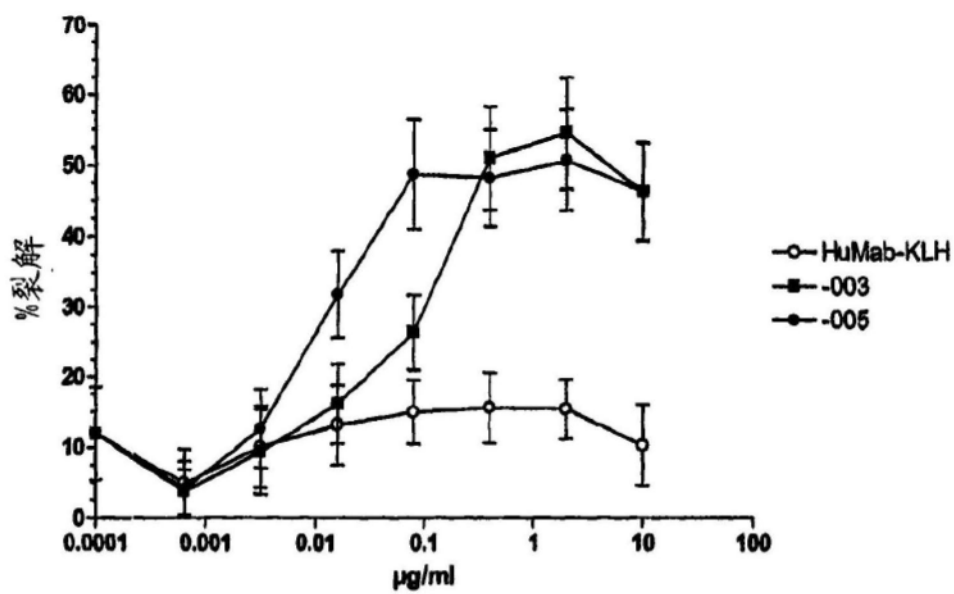


图6

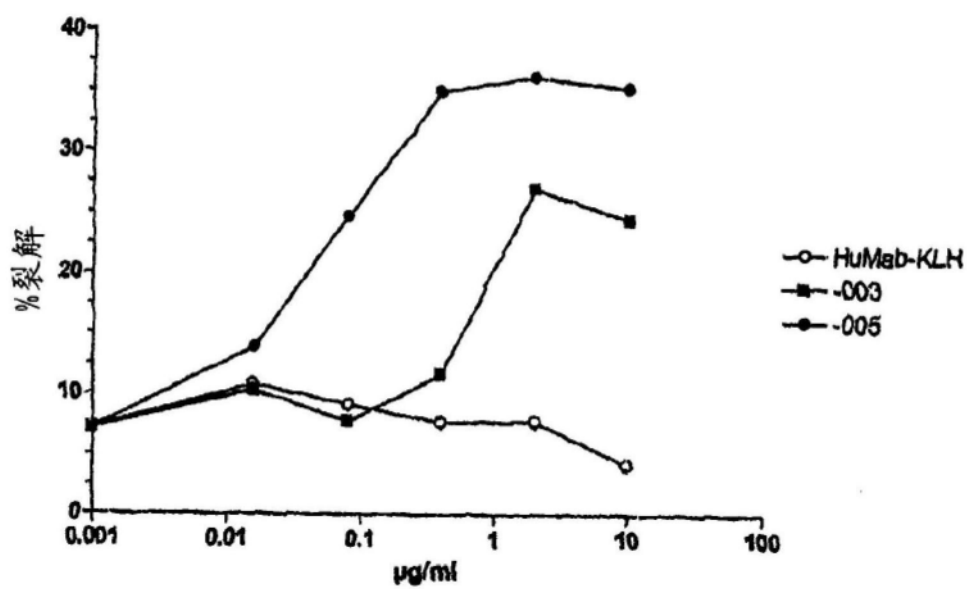


图7

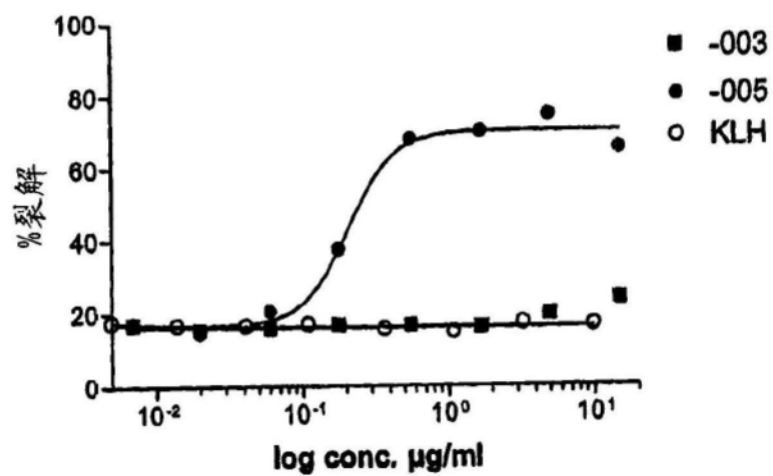


图8

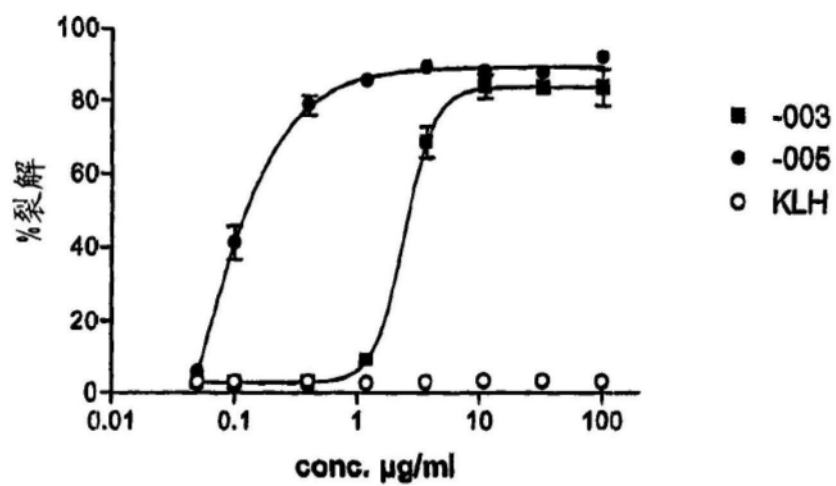
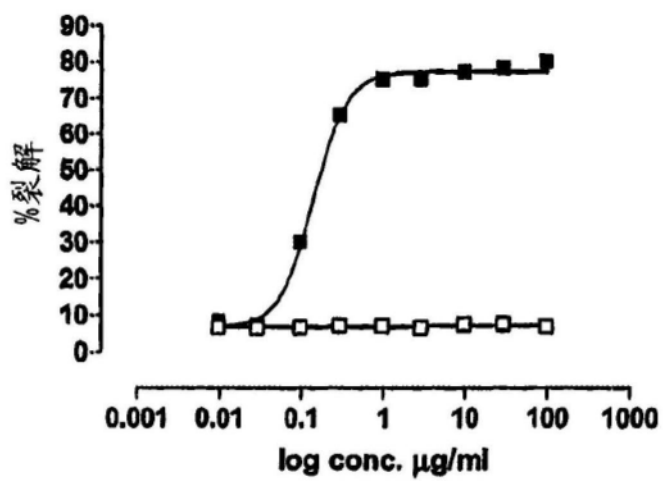
A:**B:**

图9

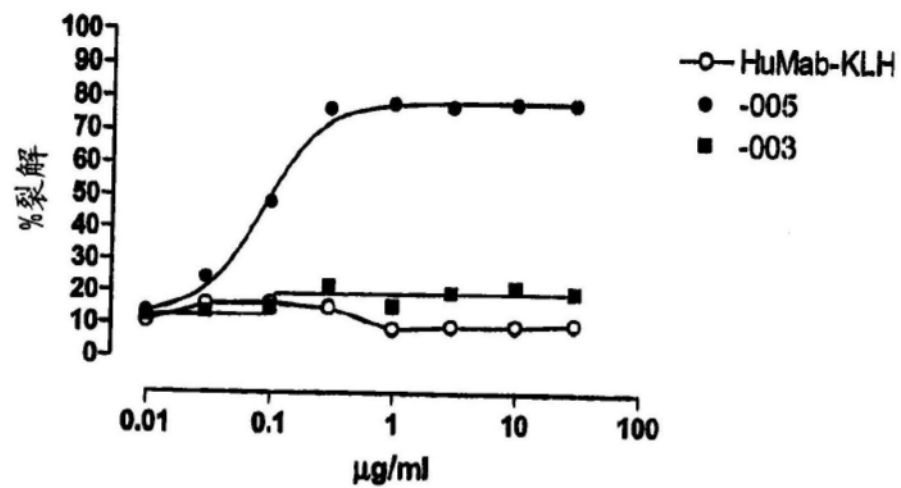
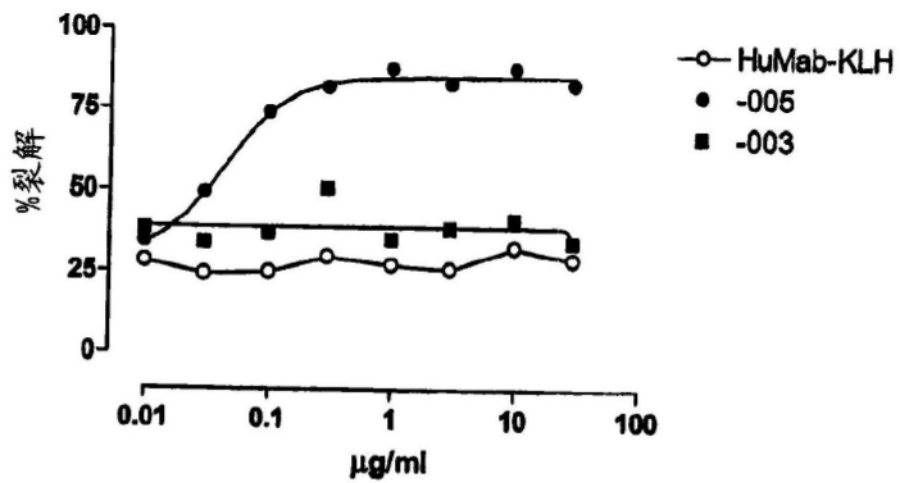
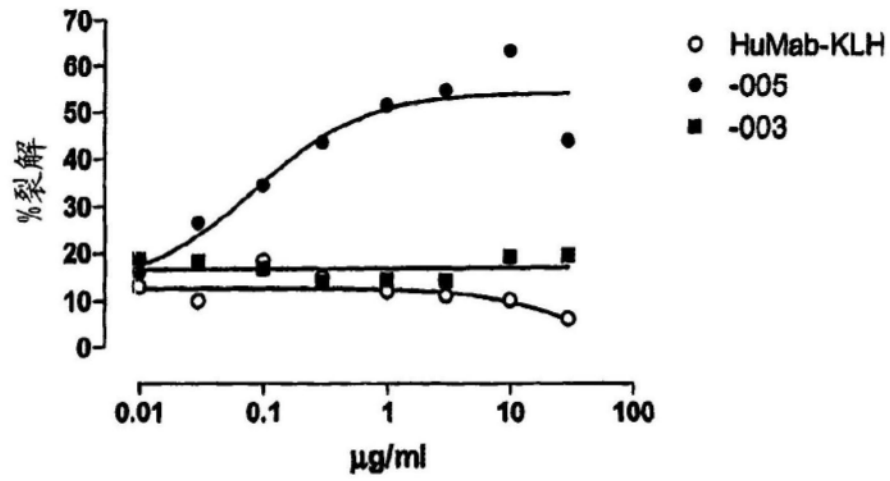
A:**B:**

图10

C:



D:

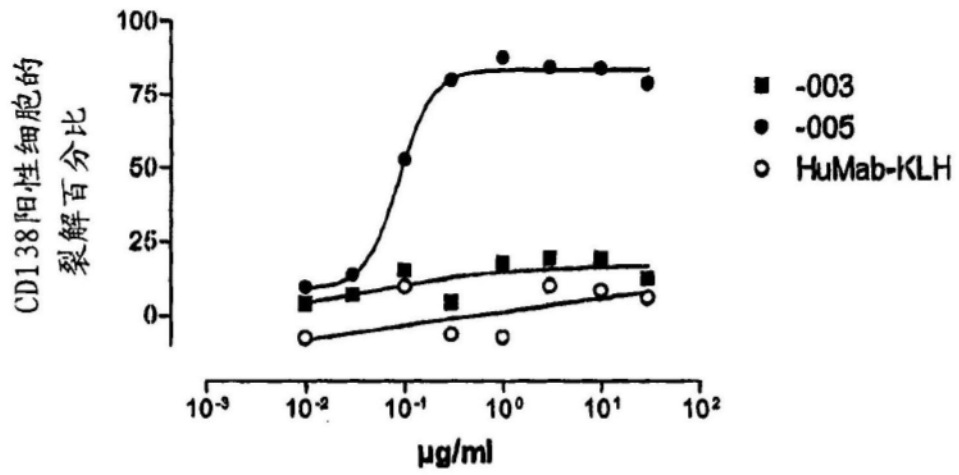


图10续1

E:

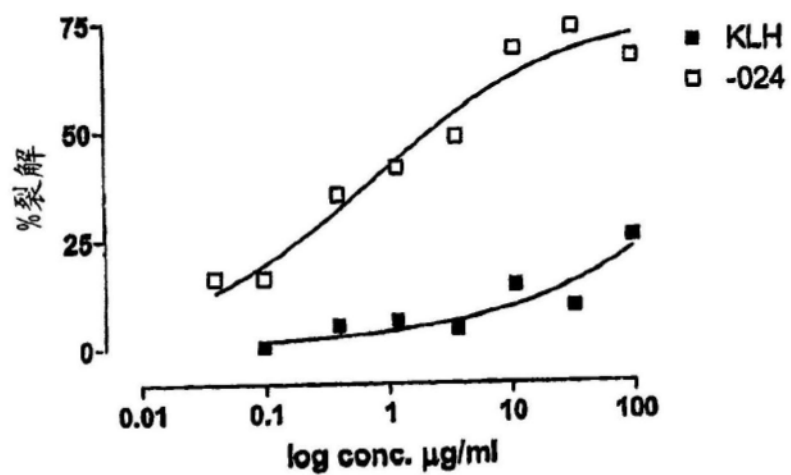


图10续2

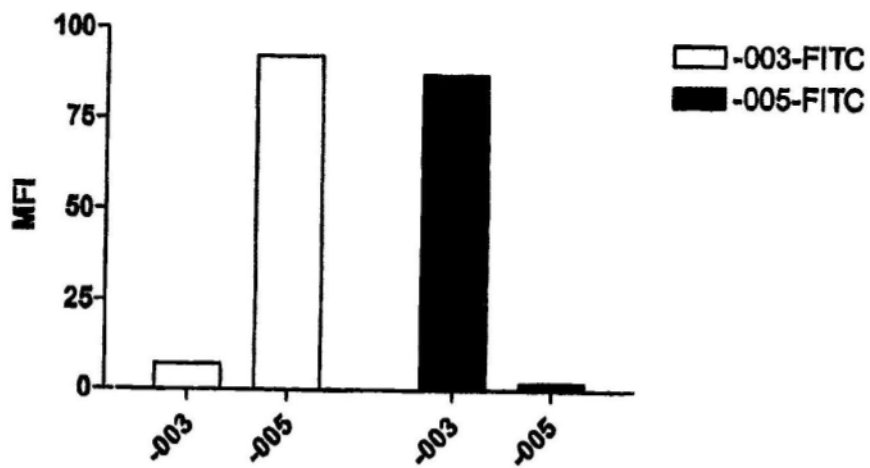


图11



图12A



图12B



图12C

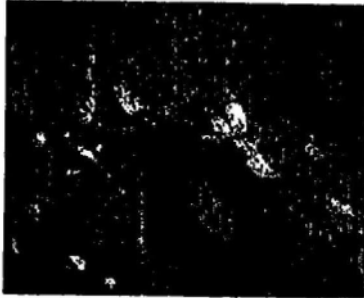


图12D



图13A



图13B

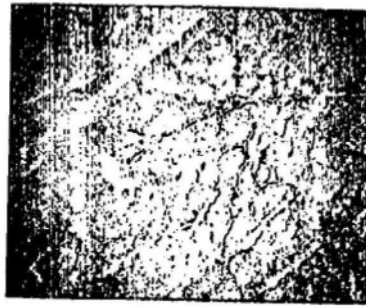


图13C

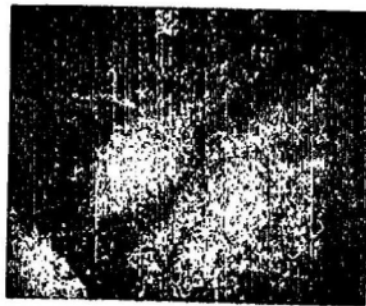


图13D

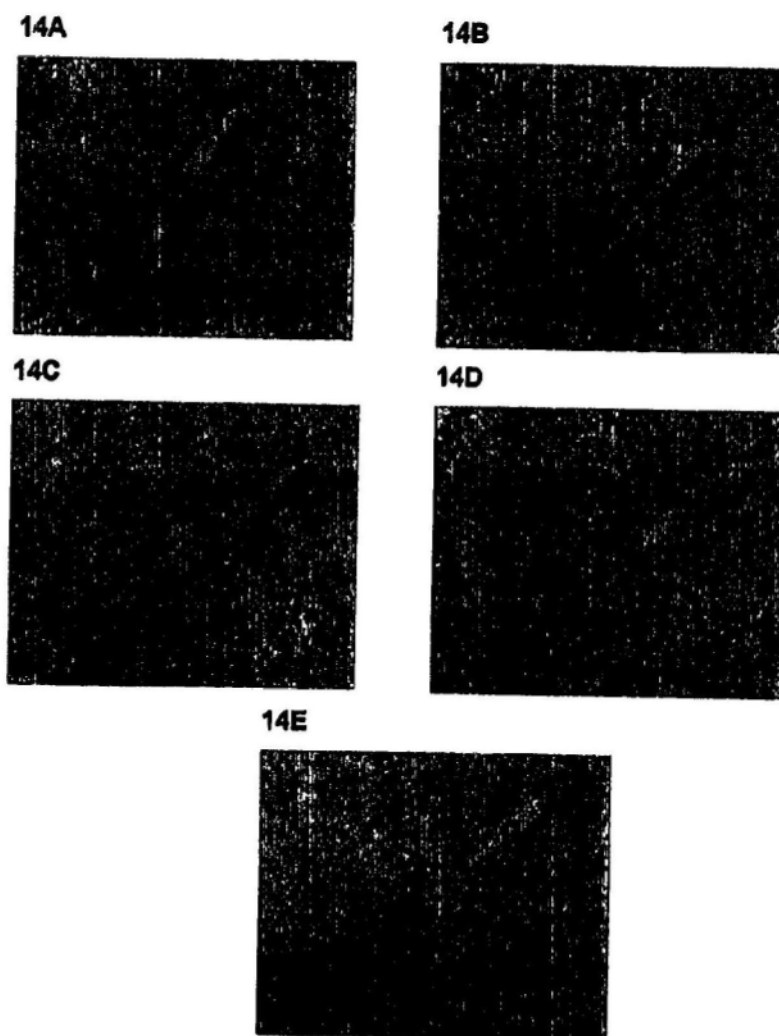


图14

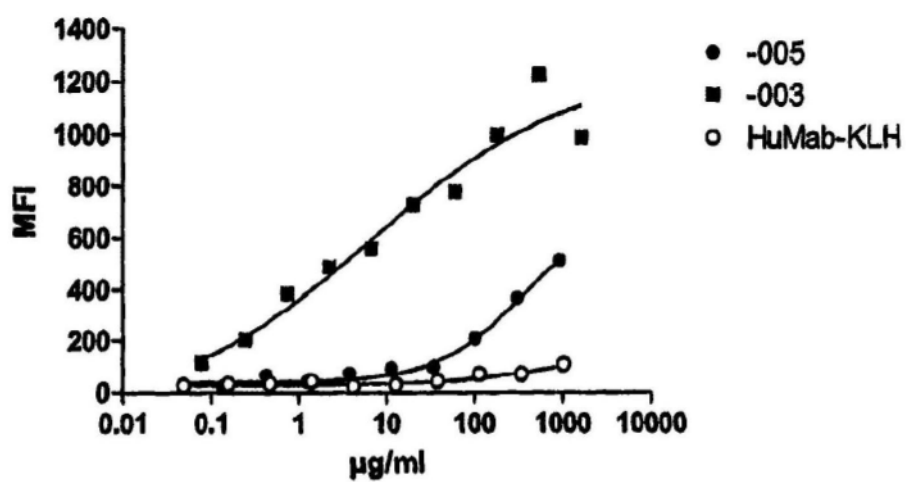


图15A

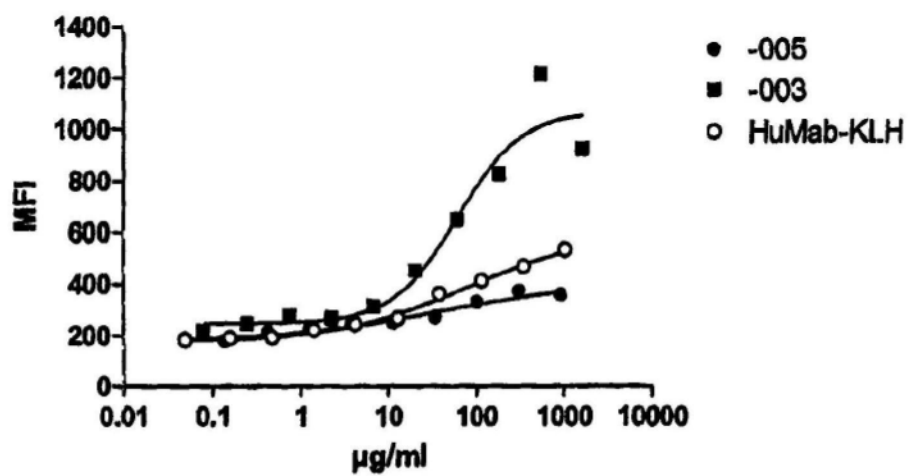


图15B

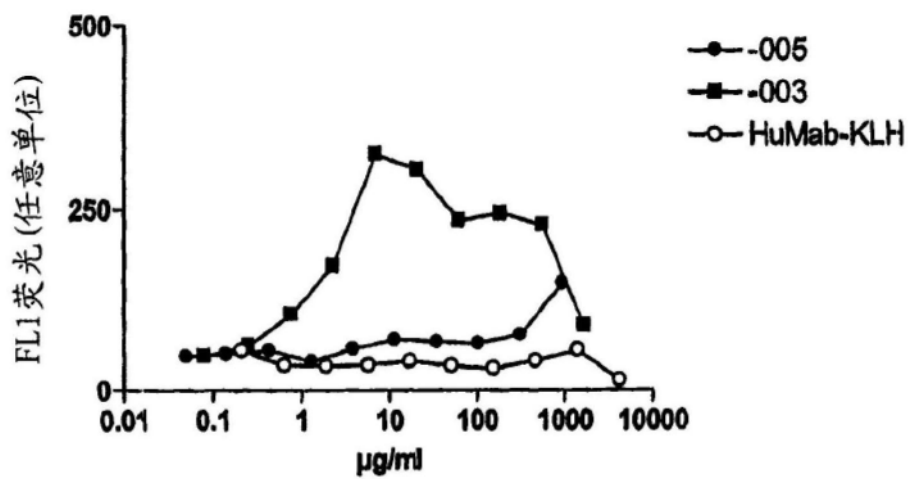


图15C

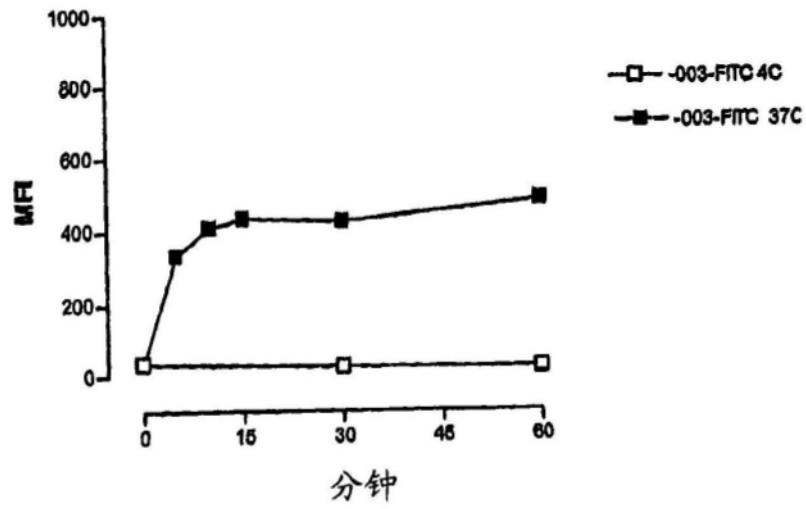


图16A

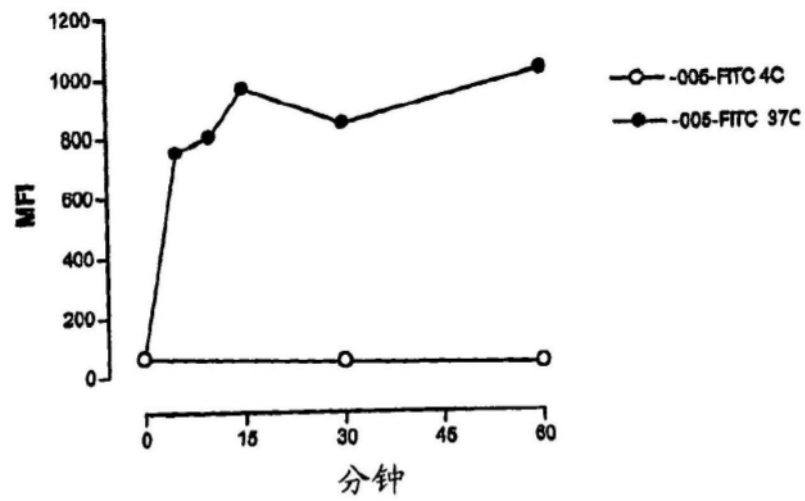


图16B

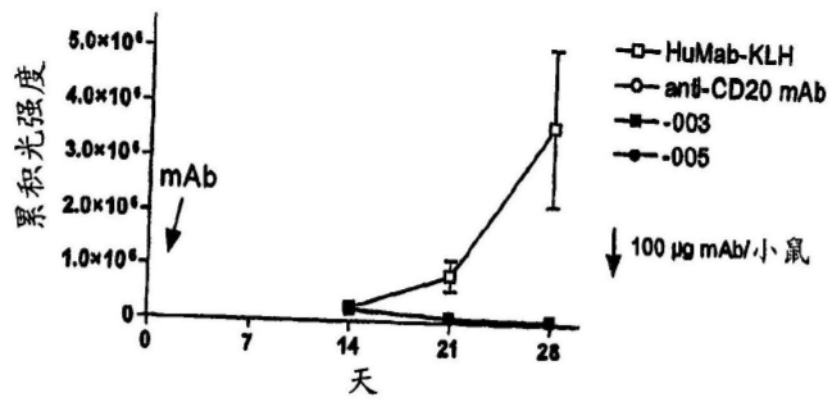


图17A

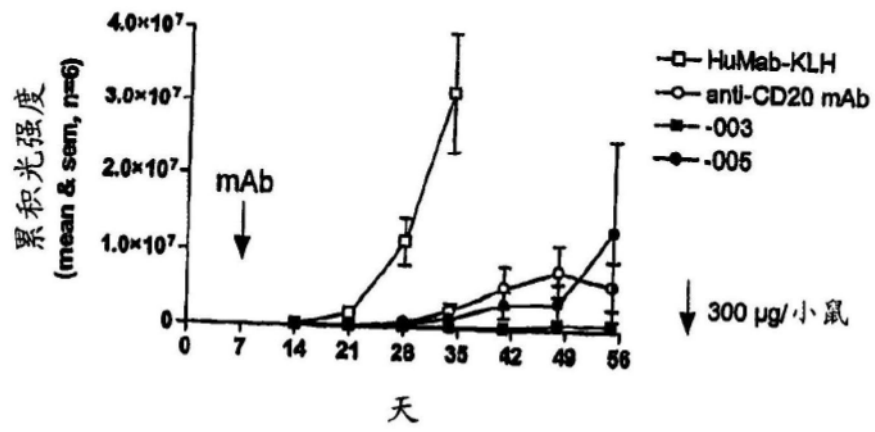


图17B

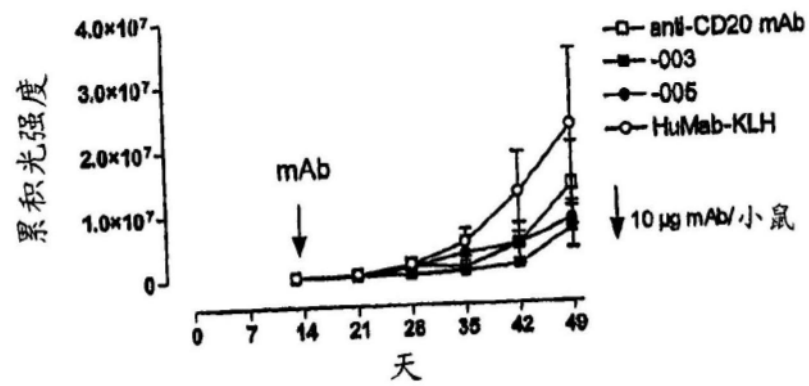


图17C

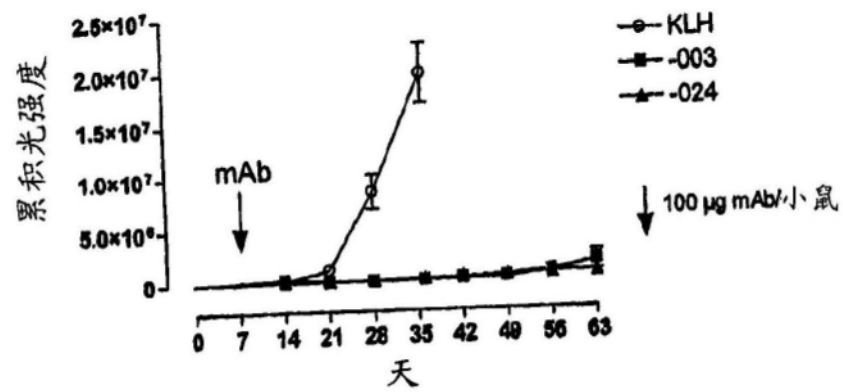


图17D

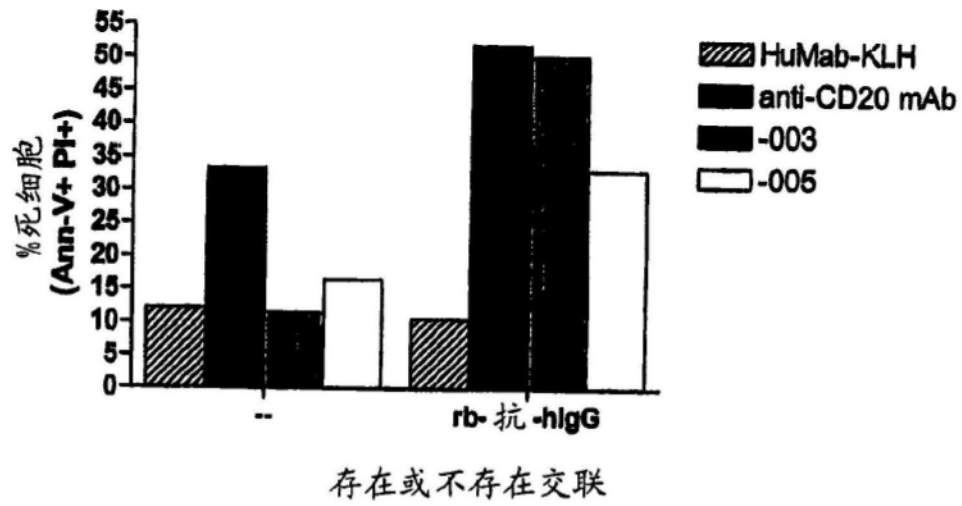


图18

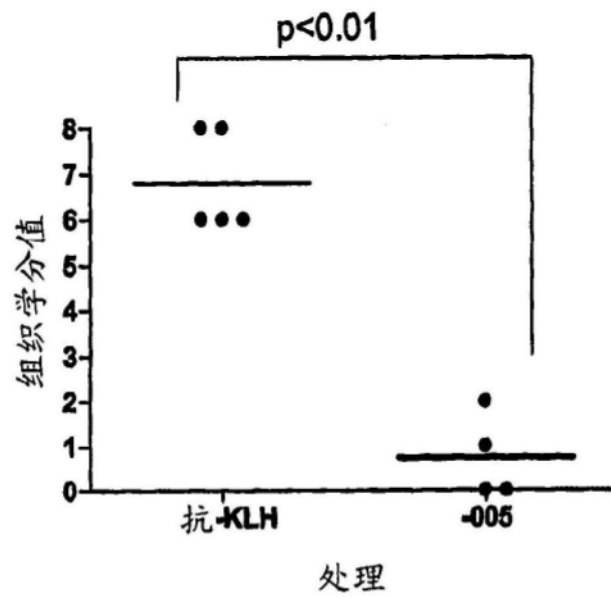


图19

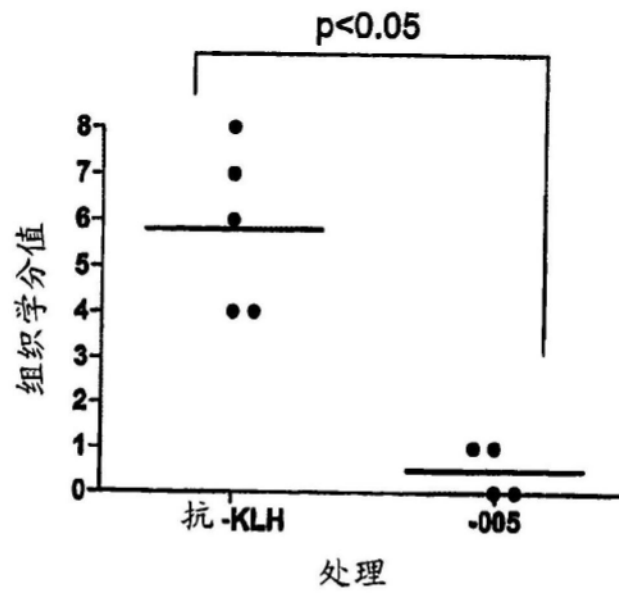


图20

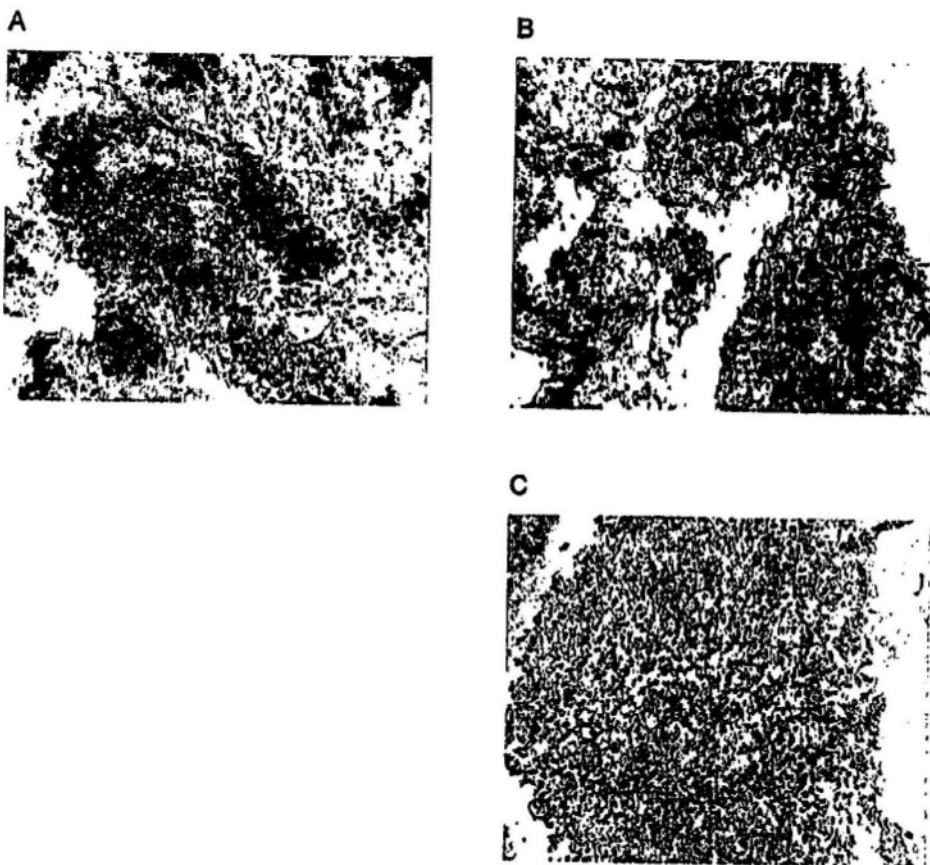


图21

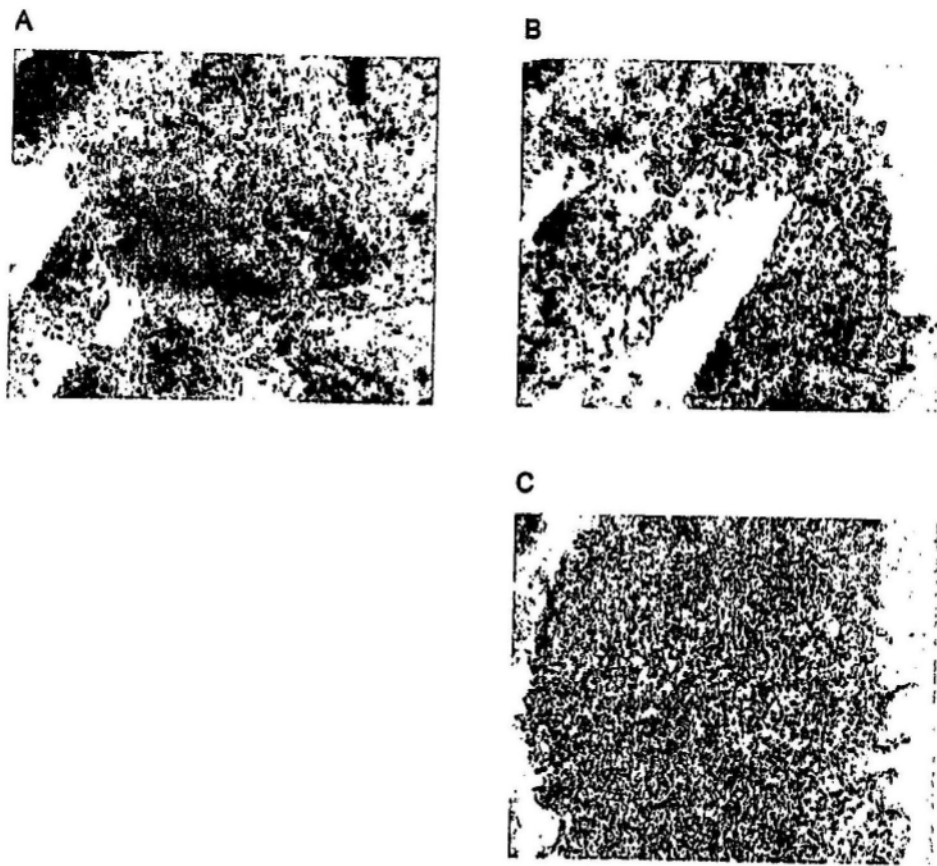


图22

A:

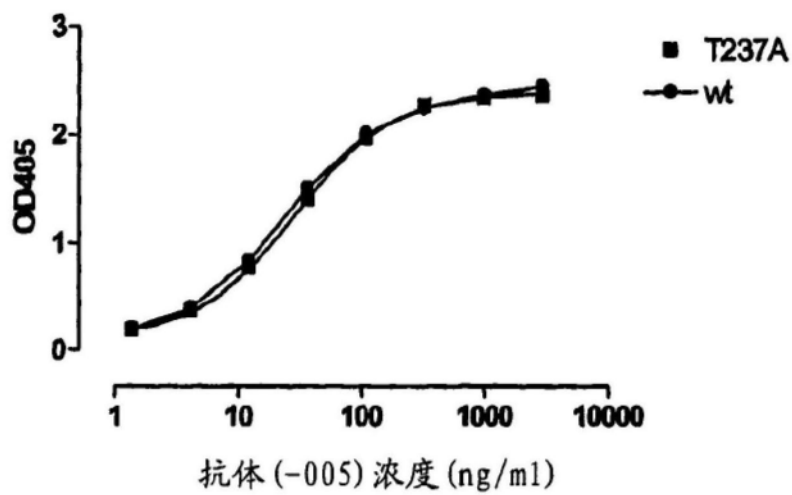
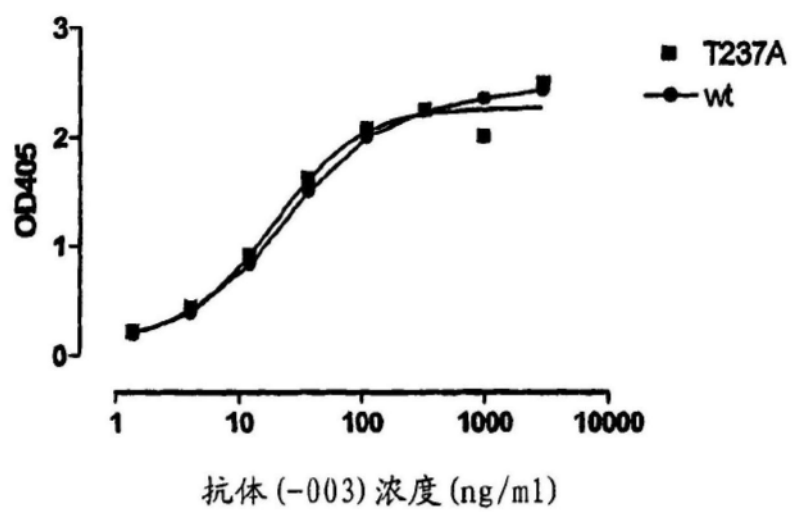


图23

B:

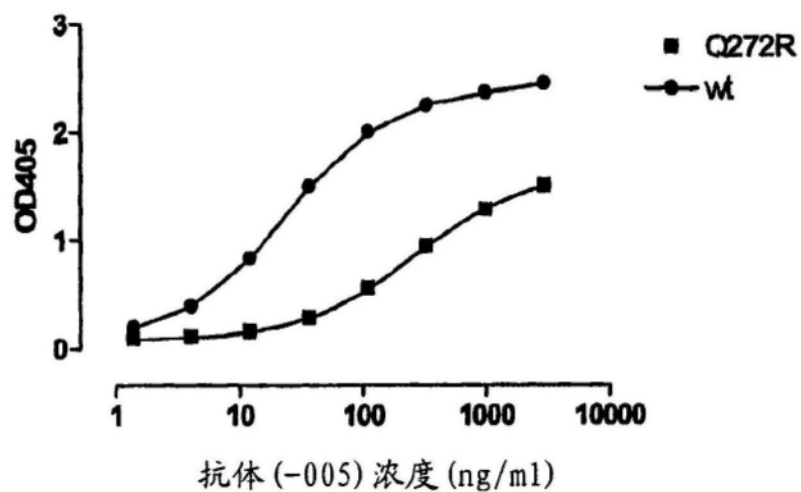
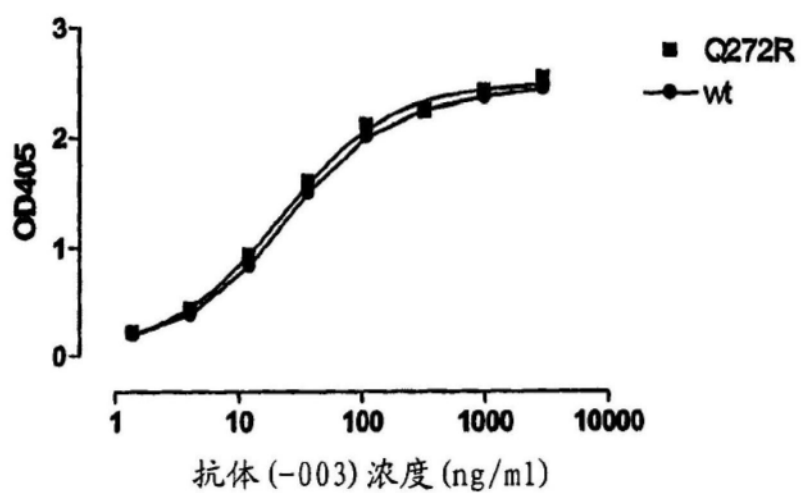


图23续1

C:

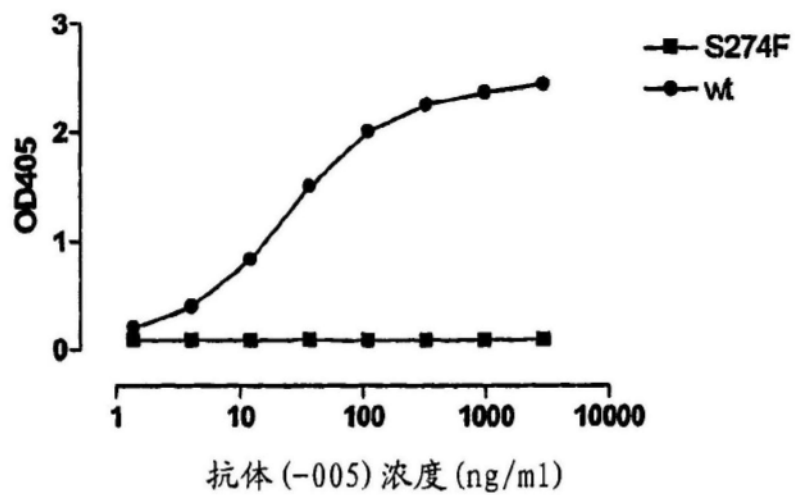
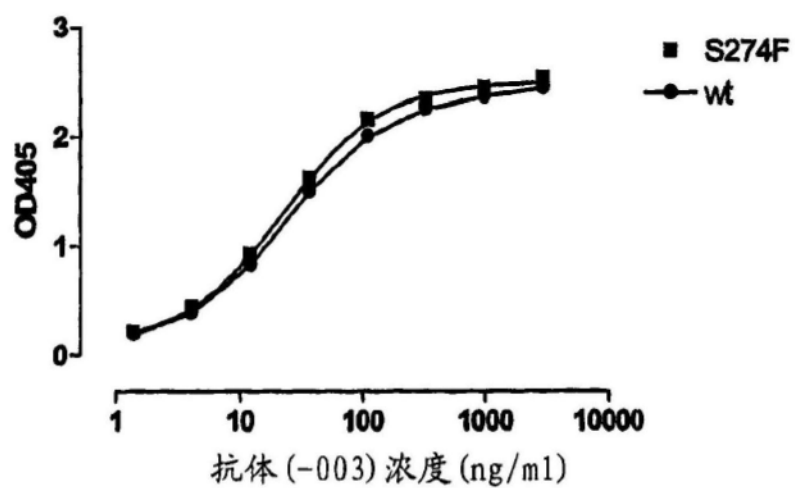


图23续2

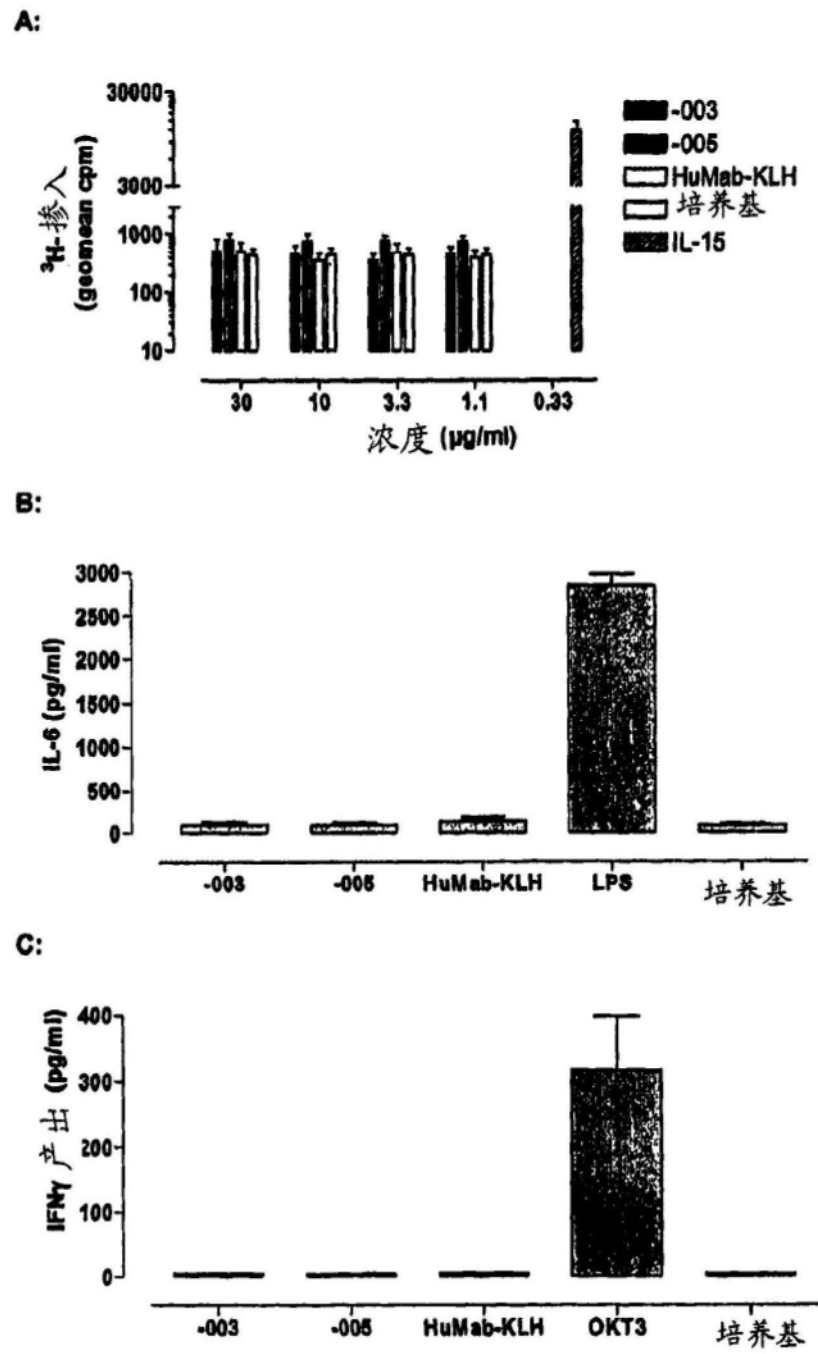
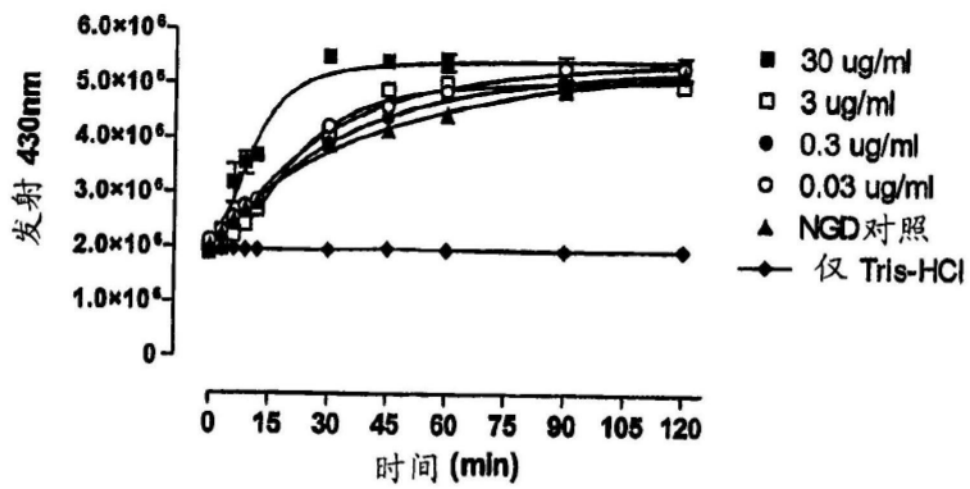


图24

A



B

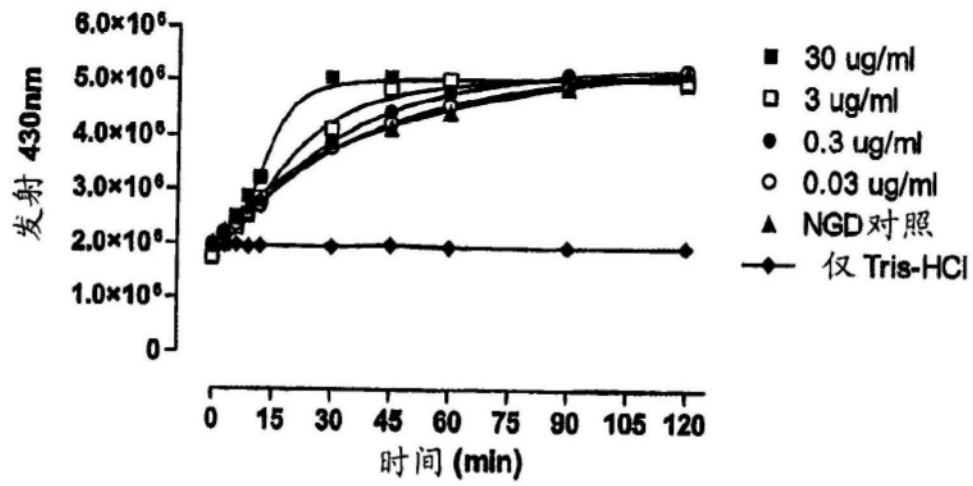
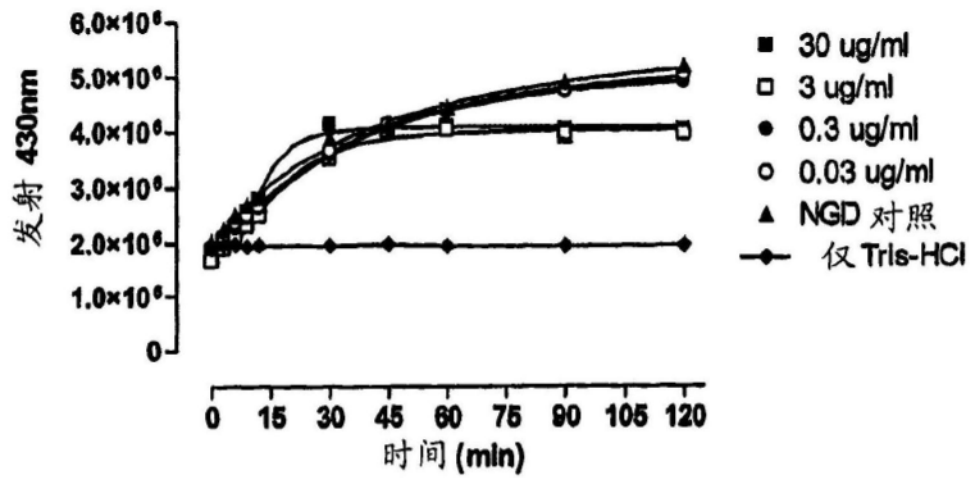


图25

C



D

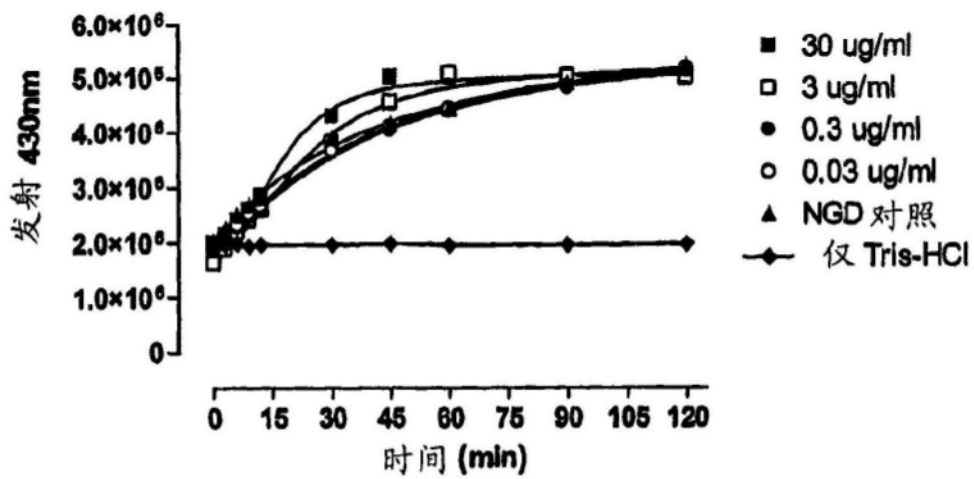
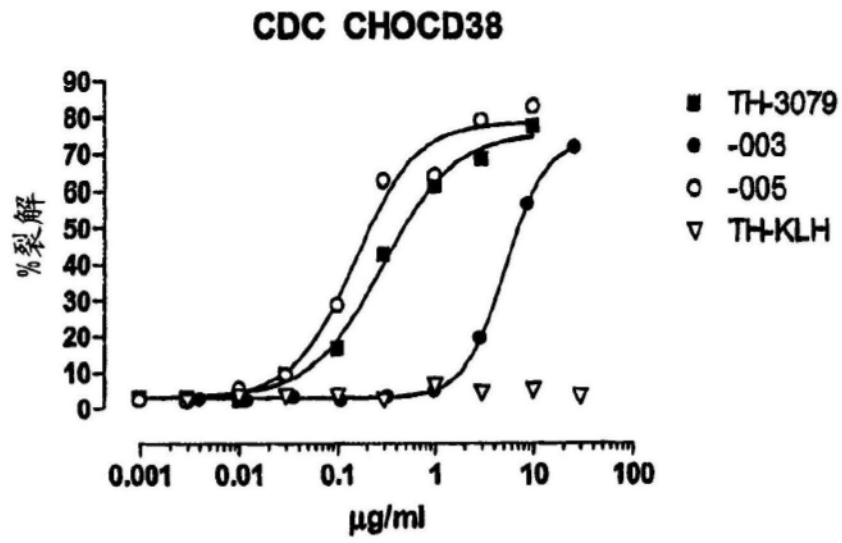


图25续

A



B

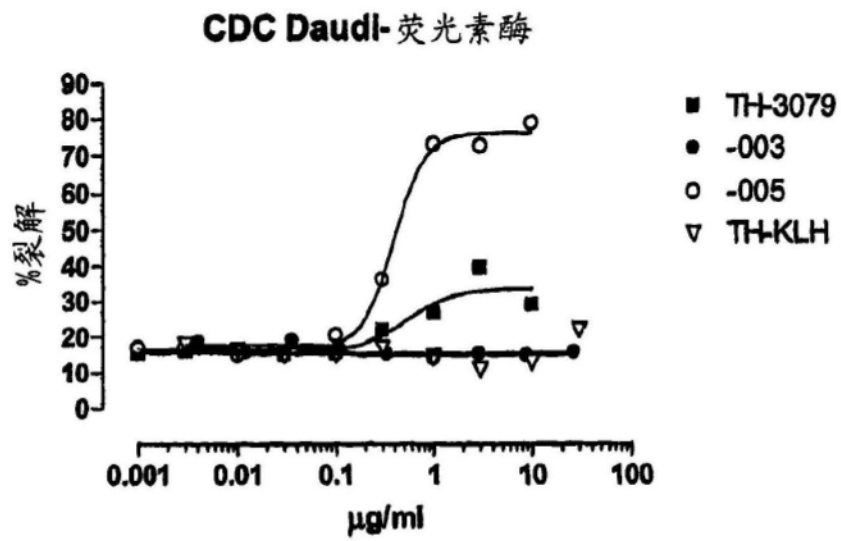


图26

C

Daudi细胞供体B

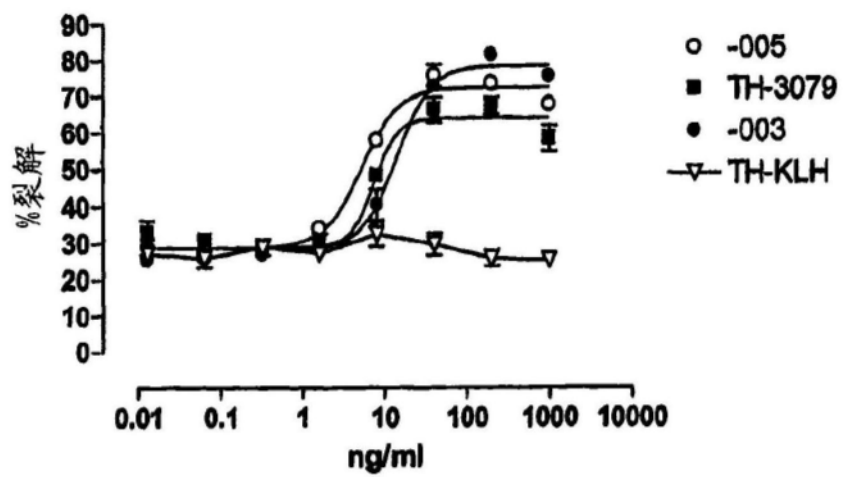


图26续