



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110997723 B

(45) 授权公告日 2023.09.26

(21) 申请号 201880049994.2

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/224685 EN 2018.12.13

(22) 申请日 2018.06.08

(73) 专利权人 黑带医疗有限公司

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110997723 A

地址 英国赫特福德郡

(43) 申请公布日 2020.04.10

(72) 发明人 帕斯卡·梅希尔 安妮·古比耶

(30) 优先权数据

凯文·莫尔德 妮娜·艾斯勒

62/517,149 2017.06.08 US  
 62/517,150 2017.06.08 US  
 62/517,164 2017.06.09 US  
 62/517,165 2017.06.09 US  
 62/517,734 2017.06.09 US  
 62/517,740 2017.06.09 US  
 62/517,745 2017.06.09 US  
 62/517,753 2017.06.09 US  
 62/582,653 2017.11.07 US  
 62/582,666 2017.11.07 US  
 62/582,676 2017.11.07 US  
 62/582,681 2017.11.07 US

约瑟芬·萨利姆  
西蒙尼·菲利斯托  
贝特里兹·古耶内切亚·科尔佐  
赫曼塔·巴鲁 比安卡·普林兹

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

2020.02.03

11517

专利代理人 杜丹 顾云峰

(86) PCT国际申请的申请数据

(51) Int.CI.

PCT/EP2018/065243 2018.06.08

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

AU 2016228249 A1, 2016.10.06 (续)

审查员 邓宗碧

权利要求书2页 说明书39页  
序列表11页 附图13页

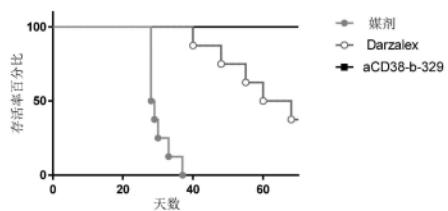
(54) 发明名称

CD38调节抗体

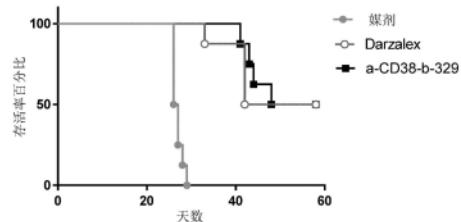
(57) 摘要

本公开提供了在结合至人CD38的抗体中发现的抗体序列。特别地,本公开提供了抗人CD38抗体的序列。包括此类序列的抗体和其抗原结合部分适用于药物制造和开发且可以以全人抗体(例如全人单克隆抗体或抗原结合片段)形式提供,所述全人抗体可用于医疗方法和组合物,特别地,可用于治疗癌症。

A)



B)



[接上页]

(56) 对比文件

CN 101626782 A, 2010.01.13  
CN 101218256 A, 2008.07.09  
GB 201300346 D0, 2013.02.20  
AU 2011202520 A1, 2011.06.23  
CA 2965745 A1, 2016.05.12  
JP 2012504801 A, 2012.02.23  
T. Li, et al.. Immuno-targeting the multifunctional CD38 using nanobody. 《SCIENTIFIC REPORTS》. 2016, 第1-11页.  
J. DECKERT ET AL. SAR650984, A Novel Humanized CD38-Targeting Antibody Demonstrates Potent Antitumor Activity in Models of Multiple Myeloma and Other CD38+ Hematologic Malignancies. 《CLINICAL CANCER RESEARCH》. 2014, 第4574-

4583页.

CIAN MCELLISTRIM ET AL. New developments in the treatment of multiple myelomab / clinical utility of daratumumab. 《BIOLOGICS: TARGETS AND THERAPY》. 2017, pages 31-43.

VAN BUEREN JEROEN LAMMERTS ET AL. Direct in Vitro Comparison of Daratumumab with Surrogate Analogs of CD38 Antibodies MOR03087, SAR650984 and Ab79. 《BLOOD》. 2014, 第3474页.

SRINIVASAN SRIMATHI S ET AL. Immunomodulatory activity of Isatuximab. 《CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH》. 2016, page B26XP002783694.

温新宇等. 抗人CD38分子单克隆抗体生物学功能研究. 《免疫学杂志》. 2007,

1. 一种抗CD38抗体或其抗原结合片段,包含
  - a) 作为可变重链互补性决定区3的SEQ ID NO:3;
  - b) 作为可变重链互补性决定区1的SEQ ID NO:1;
  - c) 作为可变重链互补性决定区2的SEQ ID NO:2;
  - d) 作为可变轻链互补性决定区1的SEQ ID NO:5;
  - e) 作为可变轻链互补性决定区2的SEQ ID NO:6; 和
  - f) 作为可变轻链互补决定区3的序列选自SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:11。
2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括含氨基酸序列SEQ ID NO:4的可变重链。
3. 根据权利要求1至2中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段还包括氨基酸序列选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的可变轻链序列。
4. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段选自以下组:
  - a) 包含以下的抗体或其抗原结合片段:含SEQ ID NO:12所示序列的重链可变区和含SEQ ID NO:15所示序列的轻链可变区;
  - b) 包含以下的抗体或其抗原结合片段:含SEQ ID NO:12所示序列的重链可变区和含SEQ ID NO:13所示序列的轻链可变区;以及
  - c) 包含以下的抗体或其抗原结合片段:含SEQ ID NO:12所示序列的重链可变区和含SEQ ID NO:14所示序列的轻链可变区。
5. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是无岩藻糖基化的。
6. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是单克隆抗体、Fab片段、F(ab')2片段、单链可变片段(scFv)、scFv-Fc片段或单链抗体(scAb)。
7. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是兔、小鼠、嵌合、人源化或全人抗原结合抗体。
8. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体选自以下组:IgG1、IgG2、IgG3及IgG4同型抗体。
9. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段被包含在双特异性抗体、多特异性抗体或免疫缀合物中,所述免疫缀合物还包含治疗剂或诊断剂。
10. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段结合人CD38的胞外域。
11. 一种核酸分子,编码根据权利要求1至10中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
12. 一种核酸载体,包含根据权利要求11所述的核酸分子。
13. 一种宿主细胞,包含根据权利要求12所述的核酸载体。
14. 一种用于生产根据权利要求1至10中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,

所述方法是通过培养根据权利要求13所述的宿主细胞实现。

15. 一种组合物,包含根据权利要求1至10中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。
16. 根据权利要求15所述的组合物,还包含药学上可接受的运载体或赋形剂。
17. 根据权利要求1至10中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或根据权利要求15所述的组合物在制备用于在受试者中治疗癌症的药物中的用途,所述癌症为CD38表达性癌症。
18. 根据权利要求17所述的用途,其中所述受试者患有实体肿瘤。
19. 根据权利要求17所述的用途,其中所述受试者患有血液癌。
20. 一种制备抗CD38抗体的方法,包括提供根据权利要求1至10中任一项所述的抗体,并使所述抗体亲和力成熟。
21. 一种制备药物组合物的方法,包括提供根据权利要求20所述的方法制备的抗体并将所述抗体与至少一种或多种药学上可接受的赋形剂共配制。
22. 一种试剂盒,包含在容器中的根据权利要求15所述的组合物。

## CD38调节抗体

### 背景技术

[0001] CD38是具有酶活性的II型膜受体糖蛋白,特别适合作为一种重要的ADP-核糖基环化酶,由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸产生环状二磷酸腺苷核糖(cADPR)。不同的胞外刺激可以诱导cADPR产生。cADPR对于动员胞内钙储备至关重要,胞内钙储备参与许多细胞功能,如细胞增殖、分化、粘着及信号转导。CD38最初被鉴别为白细胞活化标记物,但起到受体和外切酶双重作用,具有细胞信号传导和细胞动态平衡活性。CD38已与各种人类疾病相关联,包括恶性病,如慢性淋巴细胞性白血病、骨髓瘤和卵巢癌(Quarona V等人,2013;Wei W等人,2014)。

[0002] CD38可见于参与免疫反应的许多细胞类型(简称为免疫细胞)的表面上,包括效应细胞,如T和B淋巴细胞以及NK细胞,但也包括免疫抑制细胞,如调节性T和B细胞、骨髓源性抑制细胞(MDSC)或肿瘤相关巨噬细胞(Chevrier S等人,2017)。例如,在肺癌患者中,抗PD-1治疗诱导PD-1表达性T细胞增殖,这些T细胞高水平表达CD38(Kamphorst AO等人,2017)。cADPR介导和CD38介导的Ca<sup>2+</sup>信号传导对于免疫细胞的生物活性的重要性,特别是对于调节生理和病理条件下免疫反应的重要性在文献中已有描述(Morandi F等人,2015;Rah SY等人,2015)。

[0003] 处于疾病所有分期的多发性骨髓瘤患者以及预后不良的CLL患者体内的癌细胞都高水平表达CD38。通过产生主要用作CD38拮抗剂或抑制剂的化合物,已开发出各种CD38靶向疗法(de Weers M等人,2011;van de Donk NW等人,2016;Horenstein AL等人,2017)。充当CD38激动剂的抗CD38单克隆抗体(如名为IB4的单克隆抗体)也已被表征为可以诱导钙离子动员、CD38脱落、NK细胞介导的细胞毒性、细胞因子分泌(特别是白细胞介素6和干扰素 $\gamma$ )及人T淋巴细胞增殖等活性,并且被修饰用于产生免疫毒素(Malavasi F等人,2008;Hara-Yokoyama M等人,2008;Frasca L等人,2006;Karakasheva T等人,2015)。此类针对免疫细胞的积极作用可能与诱导Ca<sup>2+</sup>动员、抑制CD38酶活性和/或活化细胞内信号传导路径相关。

[0004] 已开发出靶向、直接杀灭CD38表达性肿瘤细胞的单克隆抗体并且这些单克隆抗体在临床中显示出有前景的结果。不过,此类抗CD38抗体的活性可能局限于在癌细胞表面上高水平表达CD38的肿瘤。在实体肿瘤中,CD38的表达在肿瘤细胞上一般较低或不存在,并且可能与肿瘤浸润免疫细胞(包括效应免疫细胞和抑制性免疫细胞)相关联。因此,仍需要这样一类抗CD38抗体,这些抗体呈现由不同组分的组合引起的活性,如CD38特异性激动或调节特性和靶向的细胞杀灭或活化,以及与药物开发的相容性,并且可以被开发用于治疗癌症,特别是用于治疗实体癌。

### 发明简述

[0006] 在一些实施方案中,本发明提供新颖CD38调节抗体药剂。在一些实施方案中,提供的CD38调节抗体药剂是抗体或抗原结合片段,其特异性结合至CD38,特别是人CD38,在许多实施方案中特异性结合至人CD38胞外域中的位点。

[0007] 在一些实施方案中,提供的抗体或抗原结合片段调节CD38的一个或多个特征。也

就是说,在一些实施方案中,相较于提供的抗体不存在的情形,当该抗体存在时,CD38的水平和/或活性、和/或其一种或多种下游效应被明显地改变。或者或另外,在一些实施方案中,当提供的抗体存在时,CD38的水平和/或活性、和/或其一种或多种下游效应与存在参照CD38调节抗体药剂(例如具有已知的理想属性(例如已知的激动CD38的一个或多个特征的能力)的参照抗CD-38抗体,如IB-4)时在相当的条件下所观察到的相当或更高。

[0008] 在许多实施方案中,当提供的CD38调节抗体药剂(例如抗CD38抗体或其抗原结合片段)存在时,CD38的一个或多个特征增强。例如,在一些实施方案中,提供的CD38调节抗体药剂(例如抗CD38抗体或其抗原结合片段)的存在与免疫细胞活化和/或增殖增加相关。因此,提供的CD38调节抗体药剂在本文中通常被称为“激动剂”。不过,本领域的技术人员会了解,本公开的教导不受提供的抗体或其抗原结合片段的具体作用机制限制。提供的抗体的相关结构性和/或功能性特征在本文中有描述且不言自明。

[0009] 在一些实施方案中,提供的CD38调节抗体药剂(例如CD38抗体或抗原结合片段)可以例如通过对某些免疫效应细胞(例如NK细胞和/或T细胞)的影响来表征。或者或另外,在一些实施方案中,提供的CD38调节抗体药剂(例如CD38抗体或抗原结合片段)可以例如通过对免疫抑制细胞的影响来表征。例如,在一些实施方案中,提供的CD38调节抗体药剂针对免疫效应细胞如NK细胞和T细胞展示出活化特性,并且针对高水平表达CD38的细胞如免疫抑制细胞展示出细胞毒性特性。或者或另外,在一些实施方案中,提供的CD38调节抗体药剂是通过一个或多个特征表征,这一个或多个特征与结合至人CD38胞外域中的特定表位相关联和/或使这些抗体药剂特别适合药物使用和/或制造。

[0010] 提供的技术,包括提供的CD38调节抗体药剂(例如提供的抗体或其抗原结合片段(或其变体))、包括这些抗体药剂的组合物和/或其用途可用于医药。在一些实施方案中,这些提供的技术可用于癌症疗法和/或预防。

[0011] 在一些实施方案中,提供的CD38调节抗体药剂是以在通用抗体或药剂中具有aCD38-b-329等等的序列的抗体举例说明,所述抗体药剂是或包含其一个或多个抗原结合片段或部分,例如包含作为可变重链互补性决定区3的aCD38-b-329-HCDR3氨基酸序列(SEQ ID N0:3),和/或在一些实施方案中包含aCD38-b-329 HCDR1(SEQ ID N0:1)和HCDR2(SEQ ID N0:2)序列中的一个或两个,和/或与aCD38-b-329竞争结合人CD38胞外域。在一些实施方案中,提供的抗体或其抗原结合片段结合至人CD38,其Kd在 $10^{-8}$ M范围内或更低(在 $10^{-9}$ M范围内)。在一些实施方案中,Kd是 $10^{-8}$ M至 $10^{-9}$ M。可通过标准方法,包括表面等离子体共振(SPR),如Biacore分析或使用Forte Bio Octet系统进行的分析,获得Kd以评价所述抗体或其抗原结合片段的结合亲和力。

[0012] 在一些实施方案中,提供的CD38调节抗体药剂(例如提供的抗体或其抗原结合片段)结合至人CD38上aCD38-b-329所结合的表位。在一些实施方案中,这些提供的CD38调节抗体药剂可以结合至人CD38胞外域。在一些实施方案中,提供的CD38调节抗体药剂可以结合至CD38的表位(例如当使用如本文中所描述或本领域中另外已知的一种或多种分析评估时),特别是标识为aCD38-b-ep的表位。在一些实施方案中,提供的抗体或其抗原结合片段可以按在 $10^{-8}$ M范围内的Kd值结合至人和食蟹猕猴CD38(例如结合至人和食蟹猕猴CD38上的细胞外表位)。

[0013] 在一些实施方案中,提供的抗体或其抗原结合片段结合至突变型人CD38(相较于

非突变型人CD38 (SEQ ID NO:9)) , 其中在突变型人CD38中, 274位的丝氨酸残基被苯丙氨酸取代。

[0014] 在一些实施方案中, 提供的抗体或其抗原结合片段结合至突变型人CD38 (相较于非突变型人CD38 (SEQ ID NO:9)) , 其中在突变型人CD38中, 202位的天冬氨酸残基被甘氨酸残基取代。

[0015] 在一些实施方案中, 提供的抗体或其抗原结合片段结合至突变型人CD38 (相较于非突变型人CD38 (SEQ ID NO:9)) , 其中在突变型人CD38中, 274位的丝氨酸残基被苯丙氨酸取代且202位的天冬氨酸残基被甘氨酸残基取代。

[0016] 此外, 本公开提供了可用于鉴别和/或表征如本文所描述的特别有用的CD38调节抗体药剂(例如抗CD38抗体或其抗原结合片段)的程序(图1) (例如通过某些结构性和/或功能性特征表征抗CD38抗体或其抗原结合片段, 如特异性结合至人CD38 (例如结合至其细胞外表位)、包括一个或多个如本文所描述的CDR序列元件(且尤其是包括HCDR3序列元件, 任选地与HCDR1和/或HCDR2元件相组合)、如本文所描述的细胞活化活性、如本文所描述的细胞毒性活性(例如针对在表面上具有相对较高CD38水平的免疫调节细胞)及其组合)。在一些实施方案中, 本文所描述的特别有用的抗CD38抗体是通过多种此类特征表征。在一些实施方案中, 一种或多种本文所描述的抗体可以表征为CD38调节抗体药剂。

[0017] 因此, 如本文中举例说明, 包含aCD38-b-329序列(特别是aCD38-b-329-HCDR3 (SEQ ID NO:3) 和/或aCD38-b-329-LCDR3 (SEQ ID NO:7))的某些抗体和/或抗原结合片段是通过这些所希望的结构性和/或功能性特征表征; 这些抗体和/或其抗原结合片段在本文中可称为CD38调节抗体药剂。此外, 根据本公开, 与aCD38-b-329竞争的抗体和其抗原结合片段, 可以是特别有用的抗体; 这些抗体和/或其抗原结合片段在本文中又可称为CD38调节抗体药剂。

[0018] 本文所描述的抗体(和/或其抗原结合片段)可特别适用于医药(例如特别适用于治疗和/或预防, 例如治疗癌症), 和/或用于需要或涉及靶向人CD38胞外域内的表位, 如标识为aCD38-b-ep的方法。可以制备提供的抗体或其抗原结合片段以呈现最适当的同型, 特别是选自以下组的人同型:IgG1、IgG2、IgG3及IgG4同型抗体, 更特别地是人IgG1。

[0019] 在一个方面, 本发明提供aCD38-b-329-HCDR3氨基酸序列(SEQ ID NO:3) 和包括该氨基酸序列的多肽, 例如包含aCD38-b-329-HCDR3氨基酸序列(SEQ ID NO:3) 作为可变重链互补性决定区3的抗体或抗原结合片段。在一些实施方案中, 此类抗体或抗原结合片段还可以通过另外包含如下aCD38-b-329氨基酸序列元件表征:

[0020] a) 作为可变重链互补性决定区1的aCD38-b-329-HCDR1氨基酸序列(SEQ ID NO:1) ; 和/或

[0021] b) 作为可变重链互补性决定区2的aCD38-b-329-HCDR2氨基酸序列(SEQ ID NO:2) 。

[0022] 在一些实施方案中, 提供的抗体或其抗原结合片段还可以按正确次序包含以上所定义的可变重链互补性决定区(即, aCD38-b-329氨基酸序列元件), 这些可变重链互补性决定区通过抗体框架序列特定地隔开, 如aCD38-b-329-HCDR123氨基酸序列(SEQ ID NO:4) 中所包括的框架序列, 特别是用于正确地发挥其结合和功能性特性。例如, 在一些实施方案中, 提供的抗体或其所述抗原结合片段可包含aCD38-b-329-HCDR123氨基酸序列(SEQ ID

NO:4,或其HCDR1、HCDR2和HCDR3序列)且任选地包含:

[0023] a) 作为可变轻链互补性决定区1的aCD38-b-329-LCDR1氨基酸序列 (SEQ ID NO: 5) ;

[0024] b) 作为可变轻链互补性决定区2的aCD38-b-329-LCDR2氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6) ;以及

[0025] c) 作为可变轻链互补性决定区3的aCD38-b-329-LCDR3氨基酸序列 (SEQ ID NO: 7) 。

[0026] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包括含aCD38-b-329-HCDR123氨基酸序列 (SEQ ID NO:4) 的可变重链。优选地,如实施例中所描述,这些分离的抗体或其抗原结合片段还包括含aCD38-b-329-LCDR123氨基酸序列 (SEQ ID NO:8) 的可变轻链。

[0027] 在一些实施方案中,aCD38-b-329的可变重链序列包含以下序列:

[0028] QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSDYYWGIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKS  
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDMWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:12)

[0029] 并且aCD38-b-329的可变轻链序列包含以下序列:

[0030] EIVLTQSPGTLLSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS  
GTDFTLTISRLEPDFAVYYCQQDGAVFTFGGTKVEIK (SEQ ID NO:15) 。

[0031] 本发明还提供一种抗体或其抗原结合片段,其包含作为HCDR3的aCD38-b-329-HCDR3的序列并且包含具有选自以下组的序列的LCDR3:aCD38-b-329-LCDR3、aCD38-b-329-m6-LCDR3及aCD38-b-329-m7-LCDR3。

[0032] 本发明还提供一种抗体或其抗原结合片段,其包含作为HCDR1的aCD38-b-329-HCDR1的序列、作为HCDR2的aCD38-b-329-HCDR2的序列、作为HCDR3的aCD38-b-329-HCDR3的序列、作为LCDR1的aCD38-b-329-LCDR1的序列、作为LCDR2的aCD38-b-329-LCDR2的序列,并且包含具有选自以下组的序列的LCDR3:aCD38-b-329-LCDR3、aCD38-b-329-m6-LCDR3及aCD38-b-329-m7-LCDR3。

[0033] 本发明还提供一种抗体或其抗原结合片段,其包含作为可变重链区的aCD38-b-329-HCDR123的序列并且包含具有选自以下组的序列的可变轻链区:aCD38-b-329-LCDR123、aCD38-b-329-m6-LCDR123及aCD38-b-329-m7-LCDR123。

[0034] 本发明还提供一种抗体或其抗原结合片段,其包含作为可变重链区的aCD38-b-329-VH的序列并且包含具有选自以下组的序列的可变轻链区:aCD38-b-329-VL、aCD38-b-329-m6-VL及aCD38-b-329-m7-VL。

[0035] 本发明还提供了变体抗体和其抗原结合片段,其相对于参照序列,如aCD38-b-329的CDR序列或重链或轻链可变序列具有一定同一性百分比。这些抗体和其抗原结合片段在本文中又可称为CD38调节抗体药剂。

[0036] 例如,在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变重链序列,该可变重链序列包含与SEQ ID NO:12具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变重链序列,该可变重链序列包含与SEQ ID NO:12具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变重链序列,该可变重链序列包含与SEQ ID NO:12具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。

氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变重链序列,该可变重链序列包含SEQ ID N0:12所示的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列,该可变轻链序列包含与SEQ ID N0:15具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列,该可变轻链序列包含与SEQ ID N0:15具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列,该可变轻链序列包含与SEQ ID N0:15具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列,该可变轻链序列包含SEQ ID N0:15所示的氨基酸序列。

[0038] 在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包括含与SEQ ID N0:12具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的可变重链序列以及含与SEQ ID N0:15具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的可变轻链序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包括含与SEQ ID N0:12具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的可变重链序列以及含与SEQ ID N0:15具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的可变轻链序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包括含与SEQ ID N0:12具有至少98%序列同一性的氨基酸序列的可变重链序列以及含与SEQ ID N0:15具有至少98%序列同一性的氨基酸序列的可变轻链序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包括含SEQ ID N0:12所示氨基酸序列的可变重链序列和含SEQ ID N0:15所示氨基酸序列的可变轻链序列。

[0039] 在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变重链序列,该可变重链序列包含与SEQ ID N0:4具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变重链序列,该可变重链序列包含与SEQ ID N0:4具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变重链序列,该可变重链序列包含与SEQ ID N0:4具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变重链序列,该可变重链序列包含SEQ ID N0:4所示的氨基酸序列。

[0040] 在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列,该可变轻链序列包含与SEQ ID N0:8具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列,该可变轻链序列包含与SEQ ID N0:8具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列,该可变轻链序列包含与SEQ ID N0:8具有至少98%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包含可变轻链序列,该可变轻链序列包含SEQ ID N0:8所示的氨基酸序列。

[0041] 在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包括含与SEQ ID N0:4具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的可变重链序列以及含与SEQ ID N0:8具有至少90%序列同一性的氨基酸序列的可变轻链序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包括含与SEQ ID N0:4具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的可变重链序列以及含与SEQ ID N0:8具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的可变轻链序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包括含与SEQ ID N0:4具有至少98%序列同一性的氨基酸序列的可变重链序列以及含与SEQ ID N0:8具有至少98%序列同一性的氨基酸序列的可变轻链序列。

链序列。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段包括含SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的可变重链序列和含SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的可变轻链序列。

[0042] 这些变体抗体和其抗原结合片段可以保持或展现与关于具有本文所公开的aCD38-b-329的重链和轻链可变序列的抗体和其抗原结合片段所描述的相同(或大体上相同)的功能性和药理学特性。

[0043] 此外,aCD38-b-329氨基酸序列还指由相对于以上所定义的aCD38-b-329氨基酸序列元件的取代数量而定义的抗体序列。例如,此类序列可包含作为可变重链互补性决定区3(HCDR3)的在aCD38-b-329-HCDR3(SEQ ID NO:3)内含有至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代的序列。在另一个实施方案中,aCD38-b-329氨基酸序列也指这样一些抗体序列,所述抗体序列包含作为可变重链互补性决定区1、2和3(HCDR1、HCDR2和HCDR3)的在aCD38-b-329-HCDR1、aCD38-b-329-HCDR2和aCD38-b-329-HCDR3内含有至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代的序列,并且更优选地在aCD38-b-329-HCDR123(SEQ ID NO:4)内、或在SEQ ID NO:12内含有至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代的序列。在一些实施方案中,aCD38-b-329氨基酸序列还指包含作为可变重链序列的抗体序列在可变重链序列的框架区内含有至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代的序列。呈现此类aCD38-b-329氨基酸序列元件和此类取代的抗体仍可呈现aCD38-b-329以及一般CD38调节抗体药剂的结合和/或功能性特性。

[0044] 此类aCD38-b-329氨基酸序列还可以包含在aCD38-b-329-LCDR3(SEQ ID NO:7)内含有至多1、2、3或4个氨基酸取代的序列作为可变轻链互补性决定区3(LCDR3)。在另一个实施方案中,aCD38-b-329氨基酸序列也指这样一些抗体序列,所述抗体序列包含在aCD38-b-329-LCDR1、aCD38-b-329-LCDR2和aCD38-b-329-LCDR3内含有至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代的序列,并且更优选地在aCD38-b-329-LCDR123(SEQ ID NO:8)内、或在SEQ ID NO:15内含有至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代的序列作为可变轻链互补性决定区1、2和3(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施方案中,aCD38-b-329氨基酸序列也指包含在可变轻链序列的框架区内含有至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代的序列作为可变轻链序列的抗体序列。呈现此类aCD38-b-329氨基酸序列元件和此类取代的抗体仍可呈现aCD38-b-329以及一般CD38调节抗体药剂的结合和/或功能性特性。

[0045] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种抗CD38抗体药剂(即,如本文所描述的抗体或其抗原结合片段,及其变体,如被突变以移除DG基元的变体)包含:

[0046] a.aCD38-b-329(或其变体,如其亲和力成熟的变体)的可变重链区序列或相较于aCD38-b-329(或其变体,如其亲和力成熟的变体)的可变重链区序列具有至多5个氨基酸取代的可变重链区序列;和/或

[0047] b.aCD38-b-329(或其变体,如其亲和力成熟的变体)的可变轻链区序列或相较于aCD38-b-329(或其变体,如其亲和力成熟的变体)的可变轻链区序列具有至多5个氨基酸取代的可变轻链区序列。

[0048] 可以引入氨基酸取代的aCD38-b-329重链包括SEQ ID NO:4和12。可以引入氨基酸取代的aCD38-b-329轻链包括SEQ ID NO:8、13、14、15、16及17。

[0049] 氨基酸取代优选地不会不利地影响,或不会严重不利地影响抗体的功能性特性。因此,这些取代可以被视为保守性氨基酸取代。优选地,当发生氨基酸取代时,这些取代是

以1:1的比率发生,由此使重链和/或轻链可变区的总长度不会变化。

[0050] 本发明还提供抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体的轻链或重链中的DG基元可以被改变以例如减少发生天冬氨酸异构化的可能性,和/或其中所述抗体的轻链或重链中的任何甲硫氨酸都可以被改变以例如减少甲硫氨酸氧化。例如,DG基元可以被改变以用不同氨基酸取代所述基元中的一个或两个氨基酸。例如,这些基元可以被突变成EG、DQ或DA。甲硫氨酸残基可以被改变以用不同氨基酸,例如亮氨酸或苯丙氨酸置换该残基。

[0051] 因此,在一些实施方案中,本文提供的抗体或其片段可以被突变以移除或修饰DG基元,特别是CDR区中出现的DG基元,这是本领域中降低对天冬氨酸异构化的敏感性的标准技术。以这种方式修饰的这些抗体可能需要在获得最终序列之前经历进一步修饰(例如亲和力成熟)。

[0052] 在本发明的一个实施方案中,提供了一种变体抗体,其具有如本文所公开的抗体的CDR1、CDR2和CDR3序列(例如aCD38-b-329的CDR1、CDR2和CDR3序列),或如本文所公开的任何抗体的可变重链和可变轻链(例如aCD38-b-329的可变重链和可变轻链),但与指定序列的不同之处在于,CDR中的至少一个DG基元(如果存在)已变成不同基元。所公开的变体可如关于aCD38-b-329所描述来使用和制剂。

[0053] 例如,aCD38-b-329在其LCDR3序列中含有DG基元。在一些实施方案中,DG基元中的天冬氨酸可以变成不同氨基酸和/或DG基元中的甘氨酸可以变成不同氨基酸。在此类实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段可以是或可以来源于例如aCD38-b-329。在一些实施方案中,所述变体抗体或其抗原结合片段具有如表4中所提供的VL CDR3序列(标记为aCD38-b-329-m6及aCD38-b-329-m7)。例如,变体LCDR3序列(例如aCD38-b-329-m6变体LCDR3序列或aCD38-b-329-m6变体LCDR3序列)可被并入包含aCD38-b-329的LCDR1和/或LCDR2序列的抗体中。在一个实施方案中,变体LCDR3序列(例如aCD38-b-329-m6变体LCDR3序列或aCD38-b-329-m7变体LCDR3序列)可被并入包含aCD38-b-329的LCDR1、LCDR2、HCDR1、HCDR2及HCDR3序列的抗体中。在一些实施方案中,所述变体抗体或其抗体结合片段可包含aCD38-b-329的可变重链和可变轻链序列,但其LCDR3序列被突变以移除DG基元(例如aCD38-b-329-m6-LCDR3或aCD38-b-329-m6-LCDR3实际上可作为LCDR3存在)。变体抗CD38抗体提供了具有亲本aCD38-b-329的任何且可能的所有结合和功能性特性的其它抗体。所公开的变体可以如关于aCD38-b-329所描述来使用和制剂。

[0054] 因此,变体抗体aCD38-b-329-m6可以表征为包括含以下序列的重链可变区:

[0055] QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKR  
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDMWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:12)

[0056] 和含以下序列的变体轻链:

[0057] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS  
GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDEAVFTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:13)。

[0058] 变体抗体aCD38-b-329-m7可以表征为包括含以下序列的重链可变区:

[0059] QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKR  
VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDMWGQGTMVTVSS (SEQ ID NO:12)

[0060] 和含以下序列的变体轻链:

[0061] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS

GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQQDSAVFTGGGKVEIK (SEQ ID NO:14)。

[0062] 本发明还提供亲和力成熟的抗体,例如来源于本文所公开的抗体中的任一种的亲和力成熟的变体。在一个实施方案中,亲和力成熟的抗体是具有改变的DG基元和/或NG基元和/或被改变以使任何甲硫氨酸残基移除或突变的亲和力成熟的抗体。所公开的亲和力成熟的变体可如关于aCD38-b-329所描述来使用和制剂。

[0063] 在一些实施方案中,本发明提供一种制备抗CD38抗体的方法,该方法包括提供如本文中所述的抗体(例如aCD38-b-329或其抗原结合片段或变体),并使所述抗体亲和力成熟,其中所制备的抗体以大于亲本抗体的亲和力结合至CD38。优选地,如例如通过Kd所测量,所制备的抗体结合至CD38的亲和力比亲本抗体结合至CD38的亲和力要高至少20%、至少30%、至少40%,更优选地高至少50%。用于测量亲和力的方法是本领域中已知的并且在以下实施例中有描述。由这些方法制备的亲和力成熟的抗体可以如本文关于其它抗CD38抗体药剂所描述来制剂和使用。

[0064] 亲和力成熟可以根据技术人员已知的任何适合方法进行。例如,体外抗体展示系统被广泛用于产生具有高亲和力的特异性抗体。在这些系统中,将表型(即,抗体片段)与基因型(即,抗体基因)相结合,由此允许直接测定抗体的序列。已开发出若干系统来实现抗体库(antibody repertoires)的展示以允许随后选择结合物,并通过增加选择的严格度,允许选择亲和力越来越高的变体。抗体片段可以在酵母、核糖体、噬菌体展示粒子中表达或通过与DNA直接偶合来表达。

[0065] 当前的抗体亲和力成熟方法属于两个诱变类别:随机诱变和非随机诱变。易错聚合酶链反应(PCR)、易突变细菌菌株(mutator bacterial strain)及饱和诱变是随机诱变方法的典型例子。非随机技术通常使用丙氨酸扫描或定点诱变来产生特定变体的有限集合。此外,也可使用获得亲本抗体的改组变体(shuffled variants)的改组方法进一步改善抗体亲和力。

[0066] 因此,在本发明的一个实施方案中,亲和力成熟方法选自以下组:随机诱变(例如易错聚合酶链反应(PCR)、易突变细菌菌株或饱和诱变)、非随机诱变(例如丙氨酸扫描或定点诱变)、改组(例如DNA改组、链改组或CDR改组)及使用CRISPR-Cas9系统引入修饰。

[0067] 亲和力成熟方法在例如Rajpal等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》,2005,102(24):8466-71;Steinwand等人,MAbs,2014,6(1):204-18;以及《治疗抗体手册(Handbook of Therapeutic Antibodies)》,Wiley,2014,第6章,抗体亲和力(第115-140页)中有描述。

[0068] 在一些实施方案中,提供一种制备药物组合物的方法,该方法包括提供根据上述方法(即,通过亲和力成熟制备抗体)制备的抗体并将所述抗体与至少一种或多种药学上可接受的赋形剂共制剂。用于制备药物组合物的抗体可以是aCD38-b-329的亲和力成熟的变体。由这些方法制备的药物组合物可以用于如本文关于其它抗CD38抗体药剂所描述的本发明的治疗方法中。

[0069] 可以以多种形式中的任一种来提供的如本文所描述的抗体和/或其抗原结合片段(例如CD38调节抗体药剂,其可以包括一个或多个aCD38-b-329氨基酸序列元件,如aCD38-b-329-HCDR3或aCD38-b-329-HCDR123;和/或可以与aCD38-b-329竞争结合至人CD38和非人灵长类动物CD38,例如食蟹猕猴CD38等)。例如,在一些实施方案中,适当形式可以是或包含

单克隆抗体、域抗体、单链抗体、Fab片段、F(ab')2片段、单链可变片段(scFv)、scFv-Fc片段、单链抗体(scAb)、适体或纳米抗体。在一些实施方案中，抗体或其抗原结合片段(且特别是单克隆抗体)可以是兔、小鼠、嵌合、人源化或全人抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，提供的抗体或其抗原结合片段可具有IgG、IgA、IgE或IgM同型(优选地人同型)，因为其可最适合于给定用途。在一些实施方案中，提供的抗体或其抗原结合片段是IgG同型，更特别地是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同型(优选地是人IgG1)。在一些实施方案中，提供的抗体或其抗原结合片段(例如作为多特异性结合剂的一部分提供，例如当期望将其它结合和/或功能性部分与CD38调节抗体药剂如aCD38-b-329氨基酸序列相结合时，分离的抗体或其抗原结合片段可以包含在本领域可用的双特异性抗体、多特异性抗体或其它多特异性形式中。

[0070] 在一些实施方案中，提供的CD38调节抗体药剂包含CD38结合实体(例如抗CD38抗体或其抗原结合片段)和缀合的有效负载，如治疗剂或诊断剂。在许多此类实施方案中，该药剂被视为和/或被称为“免疫缀合物”。可以用于产生如抗体-药物之类特定免疫缀合物的技术和化合物的实例公开于文献(Beck A等人, 2017)中并且被描述为适用于若干已知的抗CD38抗体(WO2016166304)。

[0071] 在一些实施方案中，本发明提供了标识所提供的抗体或其抗原结合片段的aCD38-b-329氨基酸序列。在一些实施方案中，这些序列标识所提供的抗体或其抗原结合片段结合人CD38胞外域中的表位(如aCD38-b-ep)，并且任选地还结合呈分离的蛋白质形式或在CD38表达性细胞(如免疫细胞或细胞系，例如Raji细胞)表面上的食蟹猕猴和/或鼠类CD38的相应表位。

[0072] 本发明还提供了结合与本发明的CD38调节抗体药剂所结合的表位相同(或类似)的表位的CD38调节抗体药剂。例如，在一个实施方案中，提供了与(aCD38-b-329(或其变体))结合相同(或类似)的表位的抗体。

[0073] 在一些实施方案中，本发明提供了特异性结合至人CD38的表位的抗CD38抗体或抗原结合片段，其中所述表位包含在SEQ ID NO:9中的氨基酸65-79(即，aCD38-b-ep)中所包含的一个或多个氨基酸残基。优选地，表位包含至少4个氨基酸，其中所述表位包含在SEQ ID NO:9中的氨基酸65-79中所包含的一个或多个氨基酸。优选地，所述表位包含至少5个氨基酸、至少6个氨基酸、至少七个氨基酸、至少八个氨基酸、至少九个氨基酸、至少十个氨基酸、至少十一个氨基酸、至少十二个氨基酸、至少十三个氨基酸、或至少十四或更多个氨基酸，其中所述表位包含在SEQ ID NO:9中的氨基酸65-79中所包含的一个或多个氨基酸。表位可以是线性的或构象的(即不连续的)。在一些实施方案中，抗CD38抗体或抗原结合片段特异性结合至人CD38的表位，其中所述表位包含在SEQ ID NO:9中的氨基酸65-79中所包含的至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个、或至少十四或更多个氨基酸残基。在一些实施方案中，抗CD38抗体或抗原结合片段结合至包含SEQ ID NO:9中的氨基酸65-79的表位。

[0074] 在一些实施方案中，本发明提供了用于筛选和/或表征抗体或其抗原结合片段的程序，所述抗体或其抗原结合片段包含aCD38-b-329氨基酸序列，和/或呈现与包含一个或多个aCD38-b-329氨基酸序列元件的抗体或其抗原结合片段相当的结合特征(例如包括

aCD38-b-329-HCDR3氨基酸序列(SEQ ID NO:3)和/或与aCD38-b-329竞争),由此允许结合至呈分离的蛋白质形式并在人CD38表达性细胞表面上的人CD38胞外域,竞争相同表位,特别是在实施例中标识为aCD38-b-ep(蛋白质序列ARCVKYTEIHPEMRH;Uniprot序列P28907(即SEQ ID NO:9)中的氨基酸65-79)的表位。

[0075] 此外,本发明还提供了用于筛选抗体或其抗原结合片段的程序,所述抗体或其抗原结合片段呈现与包含一个或多个aCD38-b-329氨基酸序列元件的抗体或其抗原结合片段相当的功能性特征,这些特征是细胞活化和细胞毒性活性,以及充当CD38调节抗体药剂。在这些范围内,可以在实施例(参见图1)中所描述的分析或本领域中已知的其它分析中测试候选抗体,以确定这些特征中的任一个的存在,而当在体外/离体分析、细胞分析和/或动物模型中评价时可测试可能所有这些特征的存在。

[0076] 在一些实施方案中,本发明提供了编码分离的抗体或其抗原结合片段的核酸分子,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含CD38调节抗体药剂,如aCD38-b-329氨基酸序列。在一些实施方案中,这些提供的核酸分子可以含有密码子优化的核酸序列,和/或可以被包括在用于在宿主细胞(如细菌、酵母、昆虫、鱼类、鼠类、猴或人细胞)中表达的适当核酸载体内的表达盒(expression cassette)中。

[0077] 在一些实施方案中,本发明提供了包含异源核酸分子(例如DNA载体)的宿主细胞,所述异源核酸分子表达所提供的CD38调节抗体药剂(例如抗体或其抗原结合片段),其具有CD38调节抗体药剂(例如包含aCD38-b-329氨基酸序列)的例如本文所描述的一种或多种特性的。在一些实施方案中,本公开提供了制备CD38调节抗体药剂(例如抗体或其抗原结合片段)的方法,所述CD38调节抗体药剂具有CD38调节药剂(例如包含aCD38-b-329氨基酸序列)的例如本文所描述的一种或多种特性。在一些实施方案中,这些方法可包括培养宿主细胞,所述宿主细胞包含核酸(例如可被包含于和/或通过载体递送至宿主细胞的异源核酸)。在一些实施方案中,这些宿主细胞(和/或异源核酸序列)被布置和构建成使得CD38调节抗体药剂(例如抗体或其抗原结合片段)从宿主细胞分泌(例如以使其可以从细胞培养物上清液分离),和/或暴露于细胞表面上(例如,如果此类aCD38-b-329氨基酸序列和序列元件意图用于这些细胞的环境或与这些细胞一起使用,如在的人工T细胞受体中将单克隆抗体的特异性移植至T细胞上)。

[0078] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段(或其变体)可以是无岩藻糖基化的。众所周知,抗体糖基化可能影响抗体(例如单克隆抗体、重组抗体和/或以其它方式工程改造或分离的抗体)和Fc-融合蛋白的活性、药物动力学和药效学,并且可以利用特定技术获得具有所希望的糖基化谱的抗体(Liu L, 2015)。可以使用降低抗体岩藻糖基化水平的方法增强效功能,所述效功能支持根据本发明使用的抗体(例如,如本文所描述的抗CD38抗体,包括例如可以是或被描述为CD38调节抗体药剂的抗体)的细胞毒性。包含呈现此类特性的特定aCD38-b-329序列元件的抗体可例如通过以下方式产生:使用对细胞系进行基因工程改造的技术表达aCD38-b-329序列,所述细胞系可产生不存在或具有减弱的岩藻糖基化能力的抗体,其中有一些是可商购的,如Potelligent (Lonza) GlyMAXX (ProBiogen);或操控制造方法,例如通过控制渗透压和/或使用酶抑制剂,也参见EP2480671中所描述的方法。

[0079] 在一些实施方案中,本发明提供了组合物(例如药物组合物),所述组合物包含具有如本文中所描述(例如关于在本文中称为CD38调节抗体药剂的抗体所描述,特定地包括

例如aCD38-b-329抗体或其抗原结合片段,及其变体)的期望特性的所提供的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,这些提供的组合物意图用于和/或被用于医学用途,如治疗、诊断或预防用途。在一些实施方案中,此类提供的这种组合物还可包含药学上可接受的运载体或赋形剂和/或可以用于治疗癌症。在一些实施方案中,药物组合物可以用本领域中已知的一种或多种运载体、赋形剂、盐、缓冲剂等制剂。本领域的技术人员将意识到并且能够容易地利用多种制剂技术,包括可能特别期望和/或可用于给定方法和/或施用部位的技术,例如用于肠胃外(例如皮下、肌肉内或静脉内注射)、粘膜、肿瘤内、肿瘤周围、口腔或局部(*topical*)给药。在许多实施方案中,所提供的包含如本文中所描述的CD38调节抗体药剂(例如抗CD38抗体或其抗原结合部分)的药物组合物被配制成供肠胃外递送(例如通过注射和/或输液)。在一些实施方案中,此类提供的药物组合物可以被提供于例如预装载的注射器或小瓶形式中。在一些实施方案中,此类提供的药物组合物可以通过例如干燥(例如冻干)形式提供和/或利用;或者,在一些实施方案中,此类提供的药物组合物可以通过液体形式(例如溶液、悬浮液、分散液、乳液等形式)、凝胶形式等提供和/或利用。

[0080] 在一些实施方案中,本发明提供了如本文所描述的CD38调节抗体药剂(例如抗CD38抗体或其抗原结合片段)(例如包含aCD38-b-329氨基酸序列元件)、和/或包含其的组合物在治疗癌症和/或制造用于治疗癌症的药物中的用途,所述癌症如B细胞恶性病、淋巴瘤(霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkins Lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、骨髓瘤)、骨髓增生病症、实体肿瘤(如乳癌、鳞状细胞癌、结肠癌、头颈癌、肺癌、泌尿生殖系统癌症、直肠癌、胃癌、肉瘤、黑素瘤、食道癌、肝癌、睾丸癌、子宫颈癌、肥大细胞瘤、血管瘤、眼癌、喉癌、口腔癌、间皮瘤、皮肤癌、直肠癌、咽喉癌、膀胱癌、乳癌、子宫癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、肾癌、胃癌、非小细胞肺癌及卵巢癌)。所述癌症也可以基于特定肿瘤相关标记物和抗原如CD20、HER2、PD-1、PD-L1、SLAM7F、CD47、CD137、CD134、TIM3、CD25、GITR、CD38、EGFR等的存在定义,或是被鉴别为具有称为高微卫星不稳定性高(microsatellite instability-high, MSI-H)或错配修复缺陷(mismatch repair deficient, dMMR)的生物标记物的癌症。此外,当定义上述癌症的癌前、非侵袭性状态时,也可考虑这些情况,如原位癌、冒烟型骨髓瘤、意义未明的单克隆丙种球蛋白病、子宫颈上皮内瘤样病变、MALTomas/GALTomes及各种淋巴增生性病症。优选地,在一些实施方案中,所治疗的受试者患有实体肿瘤。在一个实施方案中,受试者患有血液癌。在一些实施方案中,受试者患有CD38阳性肿瘤。

[0081] 因此,在一些实施方案中,本发明提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的组合物,所述组合物包含提供的如本文中所描述的CD38调节抗体药剂(例如抗CD38抗体或其抗原结合片段)(例如包含aCD38-b-329氨基酸序列)。在一些实施方案中,提供的方法还可包括同时或按任何次序依序向受试者施用至少一种其它药剂或疗法(即,由此使受试者接受组合疗法)。在一些实施方案中,此类至少一种其它药剂或疗法可以是或包含抗癌药物(例如化疗试剂、放射疗法(通过从外部向身体施加照射或通过施用放射性缀合的化合物)、抗肿瘤抗原或标记物抗体(所述抗原或标记物是例如CD4、CD25、CA125、PSMA、c-MET、VEGF、CD137、VEGFR2、CD20、HER2、HER3、SLAMF7、CD326、CAIX、CD40、CD47或EGF受体)、检查点抑制剂或免疫调节抗体(例如靶向PD-1、PD-L1、TIM3、CD25、GITR、CD134、CD134L、CD137L、CD80、CD86、B7-H3、B7-H4、B7RP1、LAG3、ICOS、TIM3、GAL9、CD28、

AP2M1、SHP-2、OX-40等的抗体)、疫苗、佐剂、标准使用方案、靶向癌细胞或刺激针对癌细胞的免疫反应的一种或多种其它化合物、或其任何组合。在某些特定实施方案中,当此类至少一种其它药剂或疗法是或包含抗体时,这些抗体的形式和/或这些抗体所靶向的抗原可以选自文献中列出的并且可能针对给定癌症进行调整(Sliwkowski M和Mellman I, 2013; Redman JM等人, 2015; Kijanka M等人, 2015)。

[0082] 又另外,本发明提供多种试剂盒或制品,其含有提供的如本文中所描述的抗体或其抗原结合片段(例如包含aCD38-b-329氨基酸序列)或相关组合物以允许此类分离的抗体或抗原结合片段的施用、储存或其它用途。优选地,所述试剂盒包括含此类组合物的器皿、注射器、小瓶或其它容器,任选地以及制品、稀释剂、试剂、固相和/或有关正确使用该试剂盒的说明书。

[0083] aCD38-b-329适用于医学用途,特别是用于治疗癌症的验证可通过在基于细胞的分析中,使用不同实验设置和/或一组癌症来源的细胞系较深入地分析其活性来执行。然而,考虑到免疫机制与CD38调节抗体药剂活性相关,也可在动物模型中产生相关数据,在所述动物模型中癌症被诱发,或在所述动物模型中,癌细胞作为异种移植植物或作为同基因/同种异体癌症源性细胞植入。另外,这些动物模型可能需要转移人细胞,如PBMC(即,人源化PBMC小鼠模型)或CD34+造血干细胞(即,CD34+人源化小鼠)以允许在小鼠系统内评价CD38调节抗体药剂对人免疫细胞的活性。

[0084] 在此之前,可将CD38调节抗体药剂序列克隆至因药物和/或技术原因而更适当的抗体构架中并在所述抗体构架环境中表达。例如,这些序列(可能为密码子优化的VH和VL编码序列)可以与人IgG1恒定区(hIgG1)一起克隆并使用适当抗体表达载体和细胞系(如CHO源性细胞系,例如CHO-S)表达。呈人IgG1形式抗体的CD38调节抗体药剂的表达和分泌可以在转染之后,在还原条件下的细胞裂解产物中以及在非还原条件下的上清液中分析,所述细胞裂解产物和所述上清液随后将用于纯化抗体(通过亲和色谱法、凝胶过滤和/或其它适当技术纯化)。呈人IgG1形式的CD38调节抗体药剂(CD38调节抗体药剂-hIgG1)的结合和功能性特性可以通过使用以下实例中描述的分析法进行分析。例如,可以使用流式细胞术评价CD38杀手激动剂-hIgG1与人和食蟹猕猴PBMC的结合。可以在流式细胞术中,通过使用针对特定免疫细胞群的特定标记物,如针对NK细胞的CD3、CD45、CD56及CD159(NKG2A)、CD14(针对单核细胞)、CD19(针对B细胞)和/或CD4/CD8(针对T细胞),评估与特定免疫细胞群的结合。

[0085] 此外,还可以评估CD38调节抗体药剂-hIgG1抗体对从人健康供体和/或患者分离的人原发肿瘤细胞和免疫细胞的影响。为了更详细地研究CD38调节抗体药剂-hIgG1抗体对个别免疫细胞群的潜在影响,可使用所述CD38调节抗体药剂-hIgG1抗体处理PBMC、从肿瘤(和/或其它器官,如淋巴结)分离的细胞和/或纯化的人CD8和CD4 T细胞、Treg细胞、MDSC细胞、树突状细胞、巨噬细胞和单核细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞以及其它细胞类型。可能的读出包含细胞因子释放、细胞杀灭、细胞增殖和/或活化、细胞凋亡、抗原特异性和/或同种异体反应,或其任何组合。或者,可以治疗小鼠或非人灵长类动物并且可以使用流式细胞术或在从动物分离各种器官和/或细胞之后跟踪细胞状态。

[0086] CD38调节抗体药剂-hIgG1抗体的其它特性可以通过研究CD38调节抗体药剂-hIgG1抗体对表达CD38的细胞(如NK细胞或T细胞):CD38酶活性、CD38诱导的Ca<sup>2+</sup>水平和蛋白

质磷酸化、CD38脱落和/或内化、CD38诱导的细胞内路径(例如NF $\kappa$ B路径)活化和/或与CD31和其它受体蛋白质(例如CD16、TCR、BCR等)相互作用的影响单独地或组合地评价。也可以使用这些后续过程的特定抑制剂对这些过程在CD38下游活性中的参与进行评价。当将aCD38调节抗体试剂-hIgG1抗体施用给食蟹猕猴时,则可在体内跟踪这些细胞作用。

[0087] 在本发明的一些实施方案中,所述抗体(以及如本文所描述的其变体,如被突变以移除DG基元的变体)可具有有利的活性特征。例如,在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段(及其变体)可以

[0088] -针对CD38+靶细胞展现抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性;

[0089] -与达雷木单抗相比较,在相同或大体上相同的条件下,针对CD38+靶细胞显示没有补体依赖性细胞毒性(CDC)或显示降低的CDC活性;

[0090] -展现抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP);和/或

[0091] -诱导免疫效应细胞活化。

[0092] 优选地,相较于达雷木单抗,在相同或大体上相同的条件下,aCD38-b-329或其抗原结合片段(或其变体)针对CD38+靶细胞显示降低的CDC活性。

[0093] 所述抗CD38抗体或其抗原结合片段的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性可以使用如实施例中所描述的分析在体外测定,例如使用CD38+Daudi细胞作为靶细胞并使用人PBMC细胞作为效应细胞测定,其中靶细胞与效应细胞的比率是约50比1至约25比1。

[0094] 针对CD38+靶细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC)活性可以使用如实施例中所描述的分析在体外测定,例如使用CD38+Daudi和/或Raji细胞,在10%的补体存在下测定。CDC活性可以在人补体存在下,通过用递增浓度至最高10 $\mu$ g/mL的抗体处理靶细胞来测定。在一些实施方案中,CDC活性可在10%的补体存在下,通过测量CD38+细胞,即CD38+Daudi细胞的最大细胞裂解百分比测定。给定抗体的最大裂解量可在各实验之间变化。因此,考虑用于测量CDC活性的其它度量是有帮助的,包括例如EC50值、和/或相较于参照抗体(如达雷木单抗)的最大裂解%倍数差异和/或EC50。因此,与达雷木单抗相比对CDC活性降低的确定可以参考最大裂解%、EC50和/或任一值相较于达雷木单抗的倍数变化。

[0095] 在本发明的一个优选实施方案中,CD38调节抗体药剂可展现CDC:

[0096] a)其EC50比达雷木单抗高至少0.5倍(或更优选地高至少1倍);或

[0097] b)在10%的补体存在下的Raji和/或Daudi细胞中测量的最大裂解%不超过达雷木单抗所展现的最大裂解%的一半;

[0098] 当然,达雷木单抗的CDC是在相同或大体上相同的条件测定以供比较。CDC活性可使用最多约10 $\mu$ g/mL的抗体浓度测定。技术人员应了解,当测定细胞的最大裂解量时,由于最大细胞裂解可能在较低抗体浓度下发生,故并不总是需要10 $\mu$ g/mL浓度,但必要时,仍可以使用10 $\mu$ g/mL。

[0099] 在一些实施方案中,与达雷木单抗相比CDC活性的降低是这样的:在相同或大体上相同条件下,抗体或其抗体结合片段的EC<sub>50</sub>比达雷木单抗的EC<sub>50</sub>高至少约0.5倍(即,高至少约1.5倍)、或优选高至少约1倍(即,高至少约2倍)。例如,在10%的补体存在下,所述抗体或其抗体结合片段针对Daudi细胞和/或Raji的EC<sub>50</sub>比达雷木单抗的EC<sub>50</sub>高至少约0.5倍、或优选地高约1倍。

[0100] 在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段(或其变体)诱导针对CD38+Daudi

和/或Raji细胞的CDC,其EC<sub>50</sub>至少约0.05μg/mL(并任选地通过CDC引起此类CD38+表达性细胞的小于60%裂解)。在一些实施方案中,所述抗体或其片段诱导针对CD38+Daudi和/或Raji细胞的CDC,其EC50至少约0.05μg/mL、至少约0.10μg/mL或至少约0.15μg/mL(并任选地,在高达约10μg/ml抗体浓度下通过CDC引起此类CD38+表达性细胞的小于60%裂解)。

[0101] 在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段(或其变体)针对CD38表达性细胞可展现抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。ADCP活性可以通过报告子细胞分析测定,其测量Fc<sub>γ</sub>RIIa在作为Fc<sub>γ</sub>RIIa表达性效应细胞的Jurkat细胞中的参与情况。效应细胞还表达NFAT诱导的荧光素酶。所述分析中的靶细胞可以是表达CD38的Raji细胞。该活性可以通过测量NFAT信号传导来确定。

[0102] 在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段(或其变体)可以诱导针对在体外产生的T<sub>reg</sub>细胞的ADCP。这可以如实施例中所论述的进行测量。

[0103] 在一些实施方案中,相较于达雷木单抗,在相同或大体上相同的条件下,抗CD38抗体或其抗原结合片段(或其变体)可诱导较大量的T细胞活化。在一些实施方案中,T细胞活化可通过测量luc\_报告基因Jurkat细胞中的NFAT信号传导来确定。在一些实施方案中,如在luc\_报告基因Jurkat细胞中所测量,由抗CD38抗体或其抗原结合片段诱导的NFAT信号传导比在相同或大体上相同的条件下测量的达雷木单抗的NFAT信号传导要高至少约10%。在一些实施方案中,NFAT信号传导比在相同或大体上相同的条件下测量的达雷木单抗的NFAT信号传导要高至少约15%、至少约20%或至少约30%。

[0104] 在Jurkat细胞中进行的NFAT luc\_报告基因分析中,可以在可溶性CD3单克隆抗体存在下以相对发光单位(relative luminescence unit, RLU)测量NFAT信号传导。CD3单克隆抗体的浓度可以是1μg/ml,并且可以用浓度为约5μg/ml至约40μg/ml(例如10μg/ml)的抗CD38抗体刺激Jurkat细胞。使用此类分析,当使用仅CD3刺激的RLU作为基线时,NFAT信号传导可比在相同或大体上相同的条件下测量的达雷木单抗的NFAT信号传导要高至少约30%。

[0105] T细胞活化还可以通过T细胞增殖增加和/或细胞因子分泌增加来表征,其中所述细胞因子可选自以下组:IL-2、TNF-α、IFN-γ、IL-10及GM-CSF。

[0106] T细胞增殖可以如实施例中所述进行测量,例如培育72小时之后在10μg/ml抗体浓度下并且在0.1μg/ml或0.5μg/ml抗CD3抗体存在下测定。在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段使CD4+和/或CD8+细胞的T细胞增殖相较于未处理细胞增加至少约20%。在一些实施方案中,T细胞增殖相较于未处理细胞增加至少约25%、至少约30%、至少约35%或至少约40%。

[0107] 优选地,抗CD38抗体或其抗原结合片段(或其变体)使CD4+和/或CD8+细胞中的T细胞增殖相较于在相同或大体上相同的条件(例如在相同抗体浓度下培育72小时)下用人IgG1处理的细胞增加至少约0.5倍(即,是它的至少1.5倍)或至少1倍(即,是它的至少2倍)或至少2倍(即,是它的至少3倍)或至少3倍(即,是它的至少4倍)。

[0108] 在一些实施方案中,抗CD38抗体或其抗原结合片段(或其变体)诱导CD4+和/或CD8+细胞中选自以下组的细胞因子的分泌:IL-2、TNF-α、IFN-γ、IL-10和/或GM-CSF,且细胞因子分泌量大于达雷木单抗在相同或大体上相同的条件下所诱导的分泌量。在一些实施方案中,相较于达雷木单抗,抗CD38抗体或其抗原结合片段使GM-CSF的分泌增加。在一些实施方案中,相较于达雷木单抗,抗CD38抗体或其抗原结合片段使IL-2的分泌增加。在一些实施方

案中,相较于达雷木单抗,抗CD38抗体或其抗原结合片段使IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-10及GM-CSF的分泌增加。细胞因子分泌可以如实施例中所示进行测量,例如在培育72小时之后在10 $\mu$ g/ml抗体浓度下测定。

[0109] 因此,抗CD38抗体或其抗原结合片段(或其变体)针对CD38+靶细胞展现抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性;相较于达雷木单抗,在相同或大体上相同的条件下,针对CD38+靶细胞显示降低的CDC活性;诱导免疫效应细胞活化;诱导T细胞增殖以及诱导细胞因子分泌增加,所述细胞因子包括IL-2、IFN  $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、GM-CSF及IL-10。

[0110] 本发明还包括抗体aCD38-b-329的变体或衍生物。变体或衍生物抗体或其抗原结合片段(例如aCD38-b-329-m6及aCD38-b-329-m7)可以与作为其来源的抗体共有相同的功能性特征(即,药理学特性)。类似地,本发明包括与aCD38-b-329(或其变体)竞争结合至CD38的抗体或抗原结合片段。此类竞争抗体可以具有与aCD38-b-329相同的功能性特征(即,药理学特性)。

[0111] 为了进一步了解所述CD38调节抗体药剂-hIgG1(例如aCD38-b-329-hIgG1抗体)与人CD38之间的分子相互作用,可测定aCD38-b-329-hIgG1抗体和人CD38蛋白质的晶体结构。可以通过溶解度研究、加速压力研究、冻融研究及正式的稳定性研究来评估aCD38-b-329-hIgG1抗体的溶解度和稳定性。可以进行目视检查、尺寸排阻色谱法以及动态光散射和OD<sub>280/320</sub>吸光度测量抗体聚集。

#### [0112] 附图简述

[0113] 图1:总结了筛选程序的流程图,该筛选程序用于将aCD38-b-329鉴别为激动性抗CD38抗体,其具有根据本发明的一种或多种特性,特别是确定CD38调节抗体药剂的特性:药学相关的靶向细胞杀灭(例如,如在ADCC、ADCP和CDC分析中测量)、对免疫细胞(如Treg、CD8和CD4 T细胞、NK细胞、树突状细胞、MDSC、巨噬细胞和/或单核细胞,用于测量如细胞活力和/或增殖、细胞因子分泌和/或活化标记物之类特性)的影响、对CD38酶活性或CD38介导的信号传导的影响、对表达(或不表达)CD38的癌细胞的影响、与其它药物(例如靶向肿瘤抗原的抗体或其它抗癌药物)的组合、和/或抗体序列和形式,用于鉴别与易聚集序列相关的稳定性问题、可变域中(例如在人IgG1框架、Fab、纳米体抗体、双特异性/多特异性抗体内、或在非抗体支架内)糖基化位点或游离半胱氨酸的存在和/或影响。

[0114] 图2:相关蛋白质序列(A) aCD38-b-329蛋白质序列。单独地指示重链(aCD38-b-329-HCDR1 (SEQ ID N0:1)、aCD38-b-329-HCDR2 (SEQ ID N0:2) 和aCD38-b-329-HCDR3 (SEQ ID N0:3)) 和轻链(aCD38-b-329-LCDR1 (SEQ ID N0:5)、aCD38-b-329-LCDR2 (SEQ ID N0:6) 和aCD38-b-329-LCDR3 (SEQ ID N0:7)) 的每个CDR并且在最初通过筛选程序鉴别的重链和轻链抗体(分别为aCD38-b-329-HCDR123 (SEQ ID N0:4) 和aCD38-b-329-LCDR123 (SEQ ID N0:8)) 的框架序列内加下划线。DG基元(加双下划线)被表示为抗体异构化和降解的热点(Sydow J等人,2014)并且可以被突变用于提供具有aCD38-b-329的任何且可能所有结合和功能性特性的替代性抗CD38抗体。(B) 人CD38的序列(Uniprot代码P28907, (SEQ ID N0:9)),其中不同方框标识细胞质域、跨膜域以及在胞外域内初步鉴别的aCD38-b-329主要表位(aCD38-b-ep)的位置与达雷木单抗表位(DARA,如W02006099875中所标识和公开,由两个人CD38区域形成,此处表示为DARAep-a和DARAep-b)的位置比较。

[0115] 图3:表征aCD38-b-329与PBMC中表达的CD38的结合,其使用人来源的细胞,在递增

抗体浓度下,通过将分析限制于CD8阳性或CD4阳性细胞并与人IgG1同型对照、达雷木单抗(DARA)或在无一次抗体存在下的情形相比较来进行。

[0116] 图4:对aCD38-b-329相较于达雷木单抗(DARA)或阴性对照抗体(抗人CD3或人IgG1同型)进行的功能性表征,该功能性表征在基于细胞的模型中,独立于任何其它靶向肿瘤的抗体的施用。(A)如各图中所指示,aCD38-b-329使TCR介导的CD4和CD8 T细胞增殖百分比增加。(IgG1和各抗CD38抗体是以10-5-2.5 $\mu$ g/ml测试;抗CD3是以0.1 $\mu$ g/ml测试)。(B) aCD38-b-329增加TCR活化的CD4/CD8 T细胞中所选细胞因子的分泌(5名测试供体中的5名都具有类似模式)。

[0117] 图5:aCD38-b-329相较于DARA在细胞毒性方面的功能性表征。(A)与达雷木单抗(DARA)中相同,这一直接抗体介导的杀灭作用伴随抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),但与DARA不同的是,不伴随补体依赖性细胞毒性(CDC,如文献中所描述,DARA的CDC特别显著)。(B)此外,如在Daudi细胞中所测定,当将aCD38-b-329与DARA相比较时,抗体交联明显诱导靶细胞杀灭,DARA的活性在抗体交联存在下的增加不明显。

[0118] 图6:对aCD38-b-329(以10mg/kg施用)在动物存活率方面的功能表征,其在两个基于静脉内注入Daudi细胞(A)和Ramos细胞(B)并指定天数的癌症模型中进行。当与阴性对照相比较时,用aCD38-b-329治疗使动物存活率增加。当与达雷木单抗(DARA)相比较时,Daudi模型中,aCD38-b-329也增加了存活率。

[0119] 图7:变体aCD38-b-329抗体A) aCD38-b-329-m6和B) aCD38-b-329-m7的相关重链和轻链蛋白质序列。重链和轻链的每个CDR在框架序列内加下划线,对于aCD38-b-329-m6分别是aCD38-b-329-m6-HCDR123 (SEQ ID NO:4) 和aCD38-b-329-m6-LCDR123 (SEQ ID NO:16);以及对于aCD38-b-329-m7分别是aCD38-b-329-m7-HCDR123 (SEQ ID NO:4) 和aCD38-b-329-m7-LCDR123 (SEQ ID NO:17)。

[0120] 图8:变体序列相较于Dara和IgG1与Daudi细胞的结合。通过添加20 $\mu$ g/mL以及随后的半对数稀释系列(7点稀释)的抗CD38一抗,随后用二抗染色来检测与CD38表达性人细胞系(Daudi)的结合。aCD38-b-329变体显示的与Daudi细胞的结合类似于亲本aCD38-b-329和DARA。

[0121] 图9:对aCD38-b-329和其变体序列相较于DARA在细胞毒性方面的功能表征。aCD38-b-329和其变体序列以及DARA通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)诱导对CD38+细胞系(Daudi)的杀灭,并且其活性(EC50或最大裂解)无明显差异。

[0122] 图10:在基于静脉内施用Raji细胞(A)和Ramos细胞(B)的两个癌症模型中,在指定天数内,aCD38-b-329以及其变体aCD38-b-329-m6和aCD38-b-329-m7(都以10mg/kg施用)在动物存活率方面的功能表征。在两个模型中,当与阴性对照相比较时,用aCD38-b-329治疗使动物存活率增加。在两个模型中,当与阴性对照相比较时,以及当与DARA相比较时,用变体aCD38-b-329-m6和a-CD38-b-329-m7治疗使动物存活率增加。

[0123] 图11:在Biacore 2000上针对纯化抗体(IgG1)与his标记的rhCD38的结合的基于SPR的分析。A) aCD38-b-329、B) aCD38-b-329-m6和C) aCD38-b-329-m7。

[0124] 图12:显示在Octet Red 96仪器上通过生物层干涉法测量的aCD38-b-329(图11A)相较于达雷木单抗(图11B)与his标记的重组人CD38的结合。将4.2nM rhCD38-his装载至Ni-NTA生物传感器上,随后装载不同浓度的抗体(如图中所示),然后使其在动力学缓冲液

中解离。

[0125] 图13:在Octet中进行的竞争分析。第一种抗体与固定的rhCD38结合之后又与第一种抗体(达雷木单抗-作为对照)或与第二种抗体(aCD38-b-329)结合。非竞争剂抗体在另一抗体存在下将结合至CD38(如图示),而结合同一表位的抗体将竞争,并且未观察到额外结合。

[0126] 图14:显示在Octet Red 96仪器上通过生物层干涉法测量的抗CD38抗体aCD38-b-329与his标记的重组人CD38的结合。将4.2nM rhCD38-his装载至Ni NTA生物传感器上,随后装载8nM的抗体,然后使其在动力学缓冲液中解离。

[0127] 某些实施详述

[0128] 以下提供本文中使用的术语、技术手段和实施方案的某些定义,其中有许多或大部分确认了本领域技术人员的通常理解。

[0129] 施用:如本文所使用,术语“施用”是指向受试者施用组合物。可通过任何适合的途径向动物受试者(例如人)施用。例如,在一些实施方案中,施用可以经支气管(包括通过支气管滴注)、经颊、肠内、动脉内、皮肤内、胃内、髓质内、肌肉内、鼻内、腹膜内、鞘内、静脉内、脑室内、特定器官或组织内(例如肝内、肿瘤内、肿瘤周围等)、粘膜、鼻、口腔、直肠、皮下、舌下、局部(topical)、气管(包括通过气管内滴注)、透皮、阴道以及玻璃体进行。施用可涉及间歇性给药。或者,施用可涉及至少在所选择的时间段内连续给药(例如灌注)。如本领域中所知,抗体疗法通常是通过肠胃外,例如通过静脉内、皮下或肿瘤内注射施用(例如特别是当希望在肿瘤内达到高剂量时)。

[0130] 药剂:如本文所使用,术语“药剂”可以指任何化学类别的化合物或实体,包括例如多肽、核酸、糖、小分子、金属或其组合。根据本发明可使用的药剂的具体实施方案包括小分子、药物、激素、抗体、抗体片段、适体、核酸(例如siRNA、shRNA、反义寡核苷酸、核糖酶)、肽、肽模拟物等。药剂可以是或包含聚合物。

[0131] 抗体:如本文所使用,术语“抗体”是指这样一种多肽,其包括足以实现与特定靶抗原特异性结合的典型免疫球蛋白序列元件,该特定靶抗原如CD38,特别是人CD38和更特别地人CD38胞外域。如本领域中所知,在自然界中产生的完整抗体是约150kD的四聚体药剂,其包含两个同样的重链多肽(各自是约50kD)和两个同样的轻链多肽(各自是约25kD),这些多肽彼此缔合形成通常被称为“Y形”结构的物质。每条重链包含至少四个域(各自是约110个氨基酸长),即一个氨基末端可变(VH)域(位于Y形结构的顶端),以及是三个恒定域:CH1、CH2和羧基末端CH3(位于Y的主干的基底)。一个称为“开关(switch)”的短区域连接重链可变区与恒定区。“铰链”将CH2和CH3域连接至抗体其余部分。这一铰链区中的两个二硫键在完整抗体中将两个重链多肽彼此连接。每条轻链包含两个域,即氨基末端可变(VL)域,随后是羧基末端恒定(CL)域,彼此通过另一个“开关”隔开。完整抗体四聚体包含两个重链-轻链二聚体,其中重链和轻链通过单个二硫键彼此连接;另外两个二硫键使重链铰链区彼此连接,由此使二聚体彼此连接并形成四聚体。天然产生的抗体也是糖基化的,典型地在CH2域上糖基化,并且每个域具有通过“免疫球蛋白折叠”表征的结构,所述“免疫球蛋白折叠”由在压缩的反平行β桶中彼此抵靠包装的两个β片层(例如3链、4链或5链片层)形成。每个可变域含有三个称为“互补性决定区”的高变环(如本领域中所理解,例如根据Kabat编号方案测定的CDR1、CDR2和CDR3)以及四个在某种程度上不变的“框架”区(FR1、FR2、FR3及FR4)。当天

然抗体折叠时,FR区形成 $\beta$ 片层,由此为所述域提供结构性框架,并且来自重链和轻链的CDR环区在三维空间中聚集在一起,使其产生位于Y结构顶端的单个高变抗原结合位点。天然存在的抗体的Fc区结合至补体系统中的元件,并且还结合至效应细胞上的受体,包括例如介导细胞毒性的效应细胞。如本领域中所知,Fc区对Fc受体的亲和力和/或其它结合属性可以通过糖基化或能改善抗体的可开发性的其它修饰进行调节(Jarasch A等人,2015)。

[0132] 在一些实施方案中,根据本发明制备和/或利用的抗体包括糖基化Fc域,包括具有修饰或工程改造的此类糖基化的Fc域。出于本发明的目的,在某些实施方案中,任何包括足够的如在天然抗体中所发现的免疫球蛋白域序列的多肽或多肽复合物都可称为和/或用作“抗体”,无论这类多肽是天然产生的(例如由生物体对抗原起反应而产生),还是通过重组工程改造、化学合成或其它人工系统或方法制备的。在一些实施方案中,抗体是以一组抗体的形式产生的多克隆或寡克隆抗体,该组抗体各自与单一抗体序列缔合并结合抗原内或多或少不同的表位(如人CD38胞外域内与不同参照抗CD38抗体结合的不同表位)。

[0133] 如文献(Kearns JD等人,2015)中所描述,多克隆或寡克隆抗体可以呈单一制剂形式提供以用于医疗用途。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体具有小鼠、兔、灵长类动物或人抗体特有的恒定区序列。在一些实施方案中,抗体序列元件是如本领域中所知的人源化、灵长类化、嵌合的等。此外,如本文所使用,术语“抗体”在适当实施方案中(除非另外说明或自上下文可知)可以指本领域中所知或被开发的在替代性表示中利用抗体结构性和功能性特征的构建体或形式中的任一种,例如下文定义的抗原结合片段形式。例如,根据本发明使用的抗体呈选自但不限于以下的形式:完整IgG、IgE和IgM、双特异性或多特异性抗体(例如Zybodies<sup>®</sup>等)、单链可变域(scFv)、多肽-Fc融合物、Fab、骆驼类抗体、重链鲨鱼抗体(IgNAR)、掩蔽的抗体(例如Probodies<sup>®</sup>)或与允许在细胞表面上表达和暴露的多肽(如在用于获得人工T细胞受体的构建体内的scFv,所述人工T细胞受体被用于将单克隆抗体的特异性移植至T细胞上)融合的融合蛋白。在一些实施方案中,抗体可缺乏在天然产生情况下将具有的共价修饰(例如聚糖连接)。或者,抗体可以含有共价修饰(例如聚糖、有效负载[例如可检测部分、治疗部分、催化部分等]或其它侧基[例如聚乙二醇等]连接)。

[0134] 抗原:如本文所使用,术语“抗原”是指引起免疫反应和/或结合至T细胞受体(例如当通过MHC分子呈递时)和/或B细胞受体的药剂。引起体液反应的抗原涉及产生抗原特异性抗体,或如关于CD38胞外域的实施例中所示,可以用于筛选抗体文库并鉴别有待进一步表征的候选抗体序列。

[0135] 抗原结合片段:如本文所使用,术语“抗原结合片段”涵盖这样一类药剂,其包括或包含如本文所描述的抗体中足以赋予抗原结合片段特异性结合至抗体所靶向的抗原的能力的一个或多个部分。例如,在一些实施方案中,所述术语涵盖了包括足以实现特异性结合的免疫球蛋白结构元件的任何多肽或多肽复合物。示例性抗原结合片段包括但不限于小模块免疫药物(Small Modular ImmunoPharmaceuticals,“SMIPs<sup>TM</sup>”)、单链抗体、骆驼类抗体、单域抗体(例如鲨鱼单域抗体)、单链或串联双功能抗体(TandAb<sup>®</sup>)、VHH、Anticalins<sup>®</sup>、Nanobodies<sup>®</sup>、微型抗体、BiTE<sup>®</sup>、锚蛋白重复序列蛋白质或DARPINs<sup>®</sup>、Avimers<sup>®</sup>、DART、TCR样抗体、Adnectins<sup>®</sup>、Affilins<sup>®</sup>、Trans-bodies<sup>®</sup>、Affibodies<sup>®</sup>、

TrimerX®、微蛋白 (MicroProteins)、Centyrins®、CoVX抗体、双环肽 (BiCyclic peptides)、Kunitz域源性抗体构建体,或任何其它抗体片段,只要它们展现所希望的生物活性即可。在一些实施方案中,所述术语涵盖其它蛋白质结构,如订书肽 (stapled peptide)、抗体样结合肽模拟物、抗体样结合支架蛋白、单功能抗体和/或其它非抗体蛋白质支架,例如文献中评述的那些 (Vazquez-Lombardi R等人,2015)。在一些实施方案中,抗原结合片段是或包含这样一种多肽,其氨基酸序列包括本领域的技术人员识别为互补性决定区 (CDR) 的一个或多个结构元件。在一些实施方案中,抗原结合片段是或包含这样一种多肽,其氨基酸序列包括至少一个参照CDR (例如至少一个重链CDR和/或至少一个轻链CDR),并且特别地,至少一个重链CDR,如HCDR3 (例如aCD38-b-329-HCDR3序列),该参照CDR与如本文中所描述的抗CD38抗体中 (例如在aCD38-b-329氨基酸序列元件中) 所发现的CDR大体上一致。在一些实施方案中,抗原结合片段是或包含这样一种多肽,其氨基酸序列包括至少一个CDR (例如至少一个重链CDR和/或至少一个轻链CDR),其与此类参照CDR的序列一致或相对于此类参照CDR含有少量 (例如1、2、3或) 或更多个氨基酸改变 (例如取代、添加或缺失;在许多情况下是取代),同时维持结合至作为参照CDR来源的抗体 (例如aCD38-b-329) 的靶标。在一些实施方案中,抗原结合片段是或包含这样一种多肽或其复合物,该多肽或其复合物包括来自参照抗体 (例如来自aCD38-b-329) 的重链或轻链的全部三个CDR (或在一些实施方案中,与其大体上一致的序列);在一些实施方案中,抗原结合片段是或包含这样一种多肽或其复合物,该多肽或其复合物包括来自参照抗体 (例如来自aCD38-b-329) 的全部六个CDR (或在一些实施方案中,与其大体上一致的序列)。在一些实施方案中,抗原结合片段是或包含这样一种多肽或其复合物,该多肽或其复合物包括参照抗体 (例如aCD38-b-329) 的重链和/或轻链可变域 (或在一些实施方案中,与其大体上一致的序列)。在一些实施方案中,术语“抗原结合片段”涵盖非肽和非蛋白质结构,如核酸适体,例如RNA适体和DNA适体。适体是结合至特定靶标 (如多肽) 的寡核苷酸 (例如DNA、RNA或其类似物或衍生物)。适体是特异性结合至各种分子靶 (如小分子、蛋白质、核酸并且甚至是细胞和组织) 的短合成单链寡核苷酸。这些小核酸分子可以形成能够特异性结合蛋白质或其它细胞靶的二级和三级结构,并且基本上是抗体的化学等效物。适体具有高度特异性,尺寸相对较小并且具有非免疫原性。适体一般由称为指数富集的配体系统进化技术 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment,SELEX) 的生物淘选方法选择 (参见例如Ellington等人,《自然 (Nature)》1990;346(6287):818-822;Tuerk等人,《科学 (Science)》1990;249(4968):505-510;Ni等人,《当今医药化学 (Curr Med Che)》2011;18(27):4206-14)。产生任何给定靶的适体的方法是本领域中众所周知的。包括亲和体 (affimer) 的肽适体也涵盖在内。亲和体是一种被工程改造用于展示肽环的高度稳定的小蛋白质,所述肽环为特定靶蛋白质提供高亲和力结合表面。它是来源于胱抑素半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族的低分子量 (12-14kDa) 蛋白质。亲和体蛋白质是由支架构成,它是基于胱抑素蛋白质折叠的一种稳定蛋白质。这些蛋白质展示两个肽环和N末端序列,其可以被随机化成以类似于抗体的高亲和力和特异性来结合不同靶蛋白质。蛋白质支架上肽的稳定化限制了该肽所能呈现的可能构象,由此使结合亲和力和特异性相较于游离肽文库增加。

[0136] 序列同一性百分比 (%):两个序列之间的“序列同一性”百分比 (%) 可使用本领域中已知的方法测定。关于肽、多肽或抗体序列的序列同一性可定义为在比对候选序列与特

定肽或多肽序列，并在必要时引入空位以达到最大序列同一性百分比之后，并在不考虑任何保守性取代作为序列同一性的一部分的情况下候选序列中与特定肽或多肽序列中氨基酸残基一致的氨基酸残基的百分比。为了测定氨基酸序列同一性百分比而进行的比对可以是本领域技能范围内的各种方式，例如使用可公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2，包括带空位的BLAST，以及BLASTp(针对蛋白质) (Altschul SF等人(1997))或FASTA，并使用默认参数。

[0137] 生物样品.如本文所使用,术语“生物样品”或“样品”典型地是指获自或来源于如本文所描述的所关注生物来源(例如组织或生物体或细胞培养物)的样品。所关注的来源可以是生物体,如动物或人。生物样品可包含生物组织或流体。

[0138] 癌症:术语“癌症”、“恶性疾病”、“赘瘤”、“肿瘤(tumor)”、“肿瘤(tumour)”及“癌瘤”在本文中可互换地使用,意思指展现相对较异常、不受控制和/或自主性生长,使其展现以明显失去控制的细胞增殖为特征的异常生长表型的细胞。一般来说,本申请中用于检测或治疗的所关注细胞包括癌变前(例如良性)、恶性、转移前、转移性以及非转移性细胞。本公开的教导可与任何癌症和所有癌症相关。举几个非限制性实施例,在一些实施方案中,将本公开的教导应用于一种或多种癌症,如血液癌症,包括白血病、淋巴瘤(霍奇金氏(Hodgkins)淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤)、骨髓瘤和骨髓增生病症;肉瘤、黑素瘤、腺瘤、实体组织瘤、口腔、咽喉、喉和肺的鳞状细胞癌、肝癌、泌尿生殖系统癌症如前列腺癌、子宫颈癌、膀胱癌、子宫癌及子宫内膜癌,以及肾细胞癌瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、皮肤或眼内黑素瘤、内分泌系统癌症、甲状腺癌、副甲状腺癌、头颈部癌症、乳癌、胃肠癌及神经系统癌症、良性病变如乳头瘤等。本发明的抗体可以用于治疗CD38+表达性肿瘤。

[0139] CD38调节抗体药剂.术语“CD38调节抗体药剂”在本文中用以指展示如本文所描述的特定特性的CD38调节抗体药剂(例如抗CD38抗体)。在许多实施方案中,本文所描述的所希望的CD38调节抗体药剂的特征在于,其刺激免疫效应细胞和/或改变免疫细胞功能并且针对CD38表达性细胞(例如高水平表达CD38的细胞),如免疫抑制细胞或肿瘤细胞(例如在每种情况下在表面上表达CD38的细胞)具有细胞毒性或诱导对这些细胞的吞噬作用。在一些实施方案中,CD38调节抗体药剂的特点在于,其与aCD38-b-329针对免疫细胞(例如当与免疫细胞,特别是与表达CD38的免疫细胞接触时)和肿瘤细胞的活性(例如水平和/或类型)是合理地相当的。在一些实施方案中,相关活性是或包含ADCP、无CDC存在的ADCC、直接杀灭、某些CD38表达性细胞(例如高水平表达的细胞)的耗尽、效应免疫细胞活化、促进T细胞、B细胞或NK细胞扩增、调节免疫细胞活性(例如使抑制性巨噬细胞复极化成炎性巨噬细胞)、T细胞谱系偏移等,及其组合。在一些实施方案中,CD38调节抗体药剂是这样一类实体或部分,其存在或水平与CD38的水平和/或活性,和/或与CD38活性特有的一一个或多个特征或结果相关。在一些实施方案中,水平和/或活性的增加是相对于无所述实体或部分存在但其它方面条件相当的情况下所观察到的水平和/或活性评估或测定。或者或另外,在一些实施方案中,水平和/或活性的增加与存在参照CD38调节抗体药剂(例如合适的参照抗CD38抗体,在许多实施方案中是CD38激动剂抗体,如IB4)时在相当的条件下所观察到的水平和/或活性相当或更高。在许多实施方案中,根据本公开使用的CD38调节抗体药剂是或包含直接或间接地结合至CD38,典型地结合至其胞外域的实体或部分。在一些实施方案中,CD38调节抗体药剂是或包含如本文中举例说明的抗CD38抗体、其抗原结合片段(例如包含一个或多个

CDR、所有重链CDR、所有轻链CDR、所有CDR、重链可变区、轻链可变区或重链和轻链可变区)、其亲和力成熟的变体(或其抗原结合片段)或前述任一种的任何替代形式(例如嵌合、人源化、多特异性、替代同型等),或与其竞争结合至CD38。或者或另外,在一些实施方案中,本文中所描述的CD38调节抗体药剂可通过一个或多个特征表征,该一个或多个特征可以是如本文所公开的有利于筛选、制造、临床(临床前)测试,和/或有利于鉴别人CD38内的相关表位,(如标识为aCD38-b-ep的序列),和/或有利于制剂、施用和/或在特定情形(例如癌症疗法)中的功效的特征。

[0140] 组合疗法:如本文所使用的,术语“组合疗法”是指受试者同时暴露于两种或更多种治疗方案(例如两种或更多种治疗剂)的情况。在一些实施方案中,可以同时施用两种或更多种药剂。或者,这些药剂可以依序施用;另外,这些药剂是以重叠给药方案施用。

[0141] 相当的:如本文所使用,术语“相当的”是指两种或更多种药剂、实体、情况、作用、条件集合等彼此可能不一致,但具有足够相似性以允许在其间进行比较(例如通过活性的水平和/或类型比较),由此可基于所观察到的差异或相似性而合理地得出结论。这些相当的条件集合、作用、情况、个体或群体是由多个大体上一致的特征以及一个或少数变化的特征表征。本领域的普通技术人员应理解,在上下文中,在任何给定情况中两种或更多种此类药剂、实体、情况、条件集合、作用或群体等需要什么样的同一性程度可以被视为相当的。

[0142] 包含:本文中被描述为“包含”一个或多个所述元件或步骤的组合物或方法是开放式的,意味着所述元件或步骤是必需的,但是可以在所述组合物或方法的范围内添加其它元件或步骤。还应理解,被描述为“包含”(或其“包含”)一个或多个所述元件或步骤的任何组合物或方法也描述“基本上由所述元件或步骤组成”(或其“基本上由所述元件或步骤组成”)的相应、更有限的组合物或方法,意味着所述组合物或方法包括所述必需元件或步骤,并且还可以包括不会实质上影响所述组合物或方法的基本和新颖特征的额外元件或步骤。

[0143] 达雷木单抗:如本文所使用,术语“达雷木单抗”包括具有如W02006/099875中公开的VH和VL序列的抗体,并且是人IgG1单克隆抗体。例如具有包含如下文所提供的序列的可变重链和轻链序列:

[0144] 重链:

[0145] EVQLLESGGGLVQPGGLSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKREVPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK (SEQ ID NO:18)

[0146] 轻链

[0147] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPCQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGKTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC (SEQ ID NO:19)

[0148] 剂型:如本文所使用,术语“剂型”是指向受试者施用的活性剂(例如治疗剂或诊断

剂)的物理离散单元。每个单元含有预定量的活性剂。在一些实施方案中,这个数量是适合根据一种给药方案施用的单位剂量(或其整个部分),该给药方案已被确定为与向相关群体施用时(即,采用治疗性给药方案)所希望的或有利的结果相关。本领域的普通技术人员应理解,向给特定受试者的施用治疗性组合物或治疗剂的总量是由一位或多位主治医生确定并且可涉及施用多种剂型。

[0149] **给药方案:**如本文所使用,术语“给药方案”是指典型地间隔一段时间,个别地向受试者施用的一组单位剂量(典型地多于一个单位剂量)。在一些实施方案中,给定治疗剂具有推荐的给药方案,其可能涉及一次或多次剂量。在一些实施方案中,给药方案包含多次剂量,其各自彼此间隔相同长度的时间段。或者,给药方案包含多次剂量并且至少两个不同时间段隔开个别剂量。在一些实施方案中,给药方案内的所有剂量都具有相同的单位剂量的量。或者,给药方案内的不同剂量具有不同的量。在一些实施方案中,给药方案包含呈第一次剂量的量的第一次剂量,随后是呈不同于第一次剂量的量的第二次剂量的量的一次或多次额外剂量。给药方案可包含呈第一次剂量的量的第一次剂量,随后是呈与第一次剂量的量相同的第二次剂量的量的一次或多次额外剂量。在一些实施方案中,当在相关群体内施用时,给药方案与所希望的或有益的结果相关(即,治疗性给药方案)。

[0150] **表位:**如本文所使用,术语“表位”是指抗体或抗原结合片段所结合的抗原的一部分。在一些实施方案中,在抗原是多肽的情况下,表位是构象表位,因为其包含在抗原中未共价相邻,但当该抗原呈相关构象时在三维空间中彼此接近的该抗原中的部分。例如,对于CD38,构象表位是包含CD38胞外域中不相邻的氨基酸残基的表位;线性表位是包含CD38胞外域中相邻的氨基酸残基的表位。在一些实施方案中,通过参考那些与本文所提供的CD38调节抗体药剂所结合的表位(例如由aCD38-b-329所结合的表位且定义为aCD38-b-ep)提供根据本发明施用的表位。用于测定aCD38-b-329的表位的确切序列和/或特别是氨基酸残基的方式是文献中和实施例中已知的,包括与来自抗原序列的肽竞争结合至来自不同物种的CD38序列、截短和/或诱变(例如通过丙氨酸扫描或其它定点诱变)、基于噬菌体展示的筛选或(共)晶体学技术。

[0151] **患者:**如本文所使用,术语“患者”或“受试者”是指被施用或可被施用所提供的组合物例如用于实验、诊断、预防、化妆和/或治疗目的的任何生物体。典型的患者包括动物(例如哺乳动物,如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和/或人)。在一些实施方案中,患者是人。在一些实施方案中,患者罹患或易患一种或多种病症或病况。患者可展示病症或病况的一种或多种症状,或可能已被诊断患有一种或多种病症或病况(如癌症,或存在一个或多个肿瘤)。在一些实施方案中,患者正在接受或已接受用于诊断和/或治疗此类疾病、病症或病况的某种疗法。

[0152] **药学上可接受:**如本文所使用,应用于配制如本文所公开的组合物的运载体、稀释剂或赋形剂的术语“药学上可接受”意思指,所述运载体、稀释剂或赋形剂必须与该组合物的其它成分相容并且对其接受者无害。

[0153] **药物组合物:**如本文所使用,术语“药物组合物”是指将活性剂与一种或多种药学上可接受的运载体一起配制的组合物。在一些实施方案中,活性剂是以适合于施用的单位剂量的量存在于治疗方案中,当施用给相关群体时,所述治疗方案显示出统计学上显著的实现预定治疗作用的概率。药物组合物可被配制以固体或液体形式施用,包括适合于以

下的药物组合物:口服,例如灌服药(水性或非水性溶液或悬浮液)、片剂(例如旨在经颊、舌下和全身吸收的片剂)、大丸剂、散剂、颗粒剂、施加至舌部的糊剂;肠胃外施用,例如以无菌溶液或悬浮液或持续释放配制物形式通过皮下、肌肉内、静脉内、肿瘤内或硬膜外注射来施用;表面施用,例如呈乳膏、软膏或控制释放贴片或喷雾形式,施加至皮肤、肺或口腔;阴道内、直肠内、舌下、经眼、透皮、经鼻、肺施用,以及施用至其它粘膜表面。

[0154] 实体肿瘤:如本文所使用,术语“实体肿瘤”是指通常不含囊肿或液体区域的异常组织块。实体肿瘤可以是良性或恶性的。不同类型的实体肿瘤是以形成这些肿瘤的细胞类型命名。实体肿瘤的实例是肉瘤(包括由如松质骨、软骨、脂肪、肌肉、血管、造血组织或纤维状结缔组织之类组织中间质起源的转化细胞引起的癌症)、癌瘤(包括由上皮细胞引起的肿瘤)、黑素瘤、淋巴瘤、间皮瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤等。涉及实体肿瘤的癌症包括但不限于脑癌、肺癌、胃癌、十二指肠癌、食道癌、乳癌、结肠和直肠癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌、黑素瘤、口腔癌、肉瘤、眼癌、甲状腺癌、尿道癌、阴道癌、颈部癌症、淋巴瘤等。

[0155] 治疗有效量:如本文所使用,术语“治疗有效量”意思指当根据治疗性给药方案施用给罹患或易患一类疾病和/或病况的群体时足以治疗此类疾病和/或病况的量(例如药剂或药物组合物的量)。治疗有效量是降低疾病、病症和/或病况的发生率和/或严重程度,使所述疾病、病症和/或病况稳定,和/或延缓所述疾病、病症和/或病况的一种或多种症状的发作的量。本领域的普通技术人员应了解,术语“治疗有效量”实际上不需要在特定受试者中实现成功治疗。

[0156] 治疗:如本文所使用,术语“治疗(treatment)”(又称为“治疗(treat/treating)”)是指对部分或完全地缓解、改善、减轻、抑制一种或多种症状,延缓该一种或多种症状的发作,降低该一种或多种症状的严重程度,和/或降低该一种或多种症状的发生率的物质(例如提供的CD38调节抗体药剂,如例如aCD38-b-329,或任何其它药剂)的任何施用。在一些实施方案中,治疗可涉及直接施用CD38调节抗体药剂,如aCD38-b-329(例如呈可注射的水性组合物形式,任选地包含药学上可接受的运载体、赋形剂和/或佐剂,用于静脉内、肿瘤内或肿瘤周围注射),或使用一种方案施用,该方案包含从受试者(例如在基于标记物表达的存在或不存在进行或不进行选择的情况下,从血液、组织或肿瘤)获得细胞,使所述细胞与CD38调节抗体药剂如aCD38-b-329离体接触,并将这些细胞施用给受试者(在基于标记物表达的存在或不存在进行或不进行选择的情况下)。

[0157] 给药和施用.根据本发明使用的包含如本文所描述的CD38调节药剂(例如抗CD38或其抗原结合片段,例如其包含aCD38-b-329-HCDR3氨基酸序列)的药物组合物可使用本领域技术人员已知和/或可用的多种技术(technique)和/或技术(technology)中的任一种制备以便储存和/或递送。在一些实施方案中,提供的CD38调节抗体药剂是根据管理机构,如美国食品和药物管理局(FDA)和/或欧洲药物管理局(EMEA)批准的例如用于相关适应症的给药方案施用。在一些实施方案中,将提供的CD38调节抗体药剂与一种或多种其它药剂或疗法组合施用,这些药剂或疗法本身可以根据管理机构如美国食品和药物管理局(FDA)和/或欧洲药物管理局(EMEA)批准例如用于相关适应症的给药方案施用。然而,在一些实施方案中,使用提供的CD38调节药剂可以允许减少批准的与所述CD38调节抗体药剂疗法组合使用的药剂或疗法的剂量(例如降低一次或多次剂量中活性剂的量,减小剂量次数和/或降低

剂量频率)。给药和施用也可适合于同时施用的其它药物、患者的状态和/或CD38调节抗体药剂的形式(例如修饰成免疫缀合物、纳米抗体或双特异性抗体形式)。

[0158] 此外,在一些实施方案中,可能需要针对特定细胞类型、特定肿瘤或其类型、或特定患者群(例如携带遗传标记物)定制给药方案,特别地,基于时间安排和/或CD38的阈值表达水平设计依序给药方案。在一些此类实施方案中,治疗性给药方案可以与检测方法组合或根据检测方法进行调整,所述检测方法在疗法之前和/或期间评估一种或多种诱导性标记物的表达或其它标准。

[0159] 在一些实施方案中,根据本发明给药和施用利用了呈任何或多种形式的具有所希望纯度的活性剂与一种或多种生理学上可接受的运载体、赋形剂或稳定剂的组合。这些形式包括例如液体、半固体和固体剂型,如液体溶液(例如可注射和可输注的溶液)、分散液或悬浮液、片剂、丸剂、散剂、脂质体及栓剂。优选的形式可以取决于预定施用模式和/或治疗应用,典型地呈可注射或可输注溶液形式,如与用抗体治疗人类受试者的组合物类似的组合物。

[0160] 在一些实施方案中,可以将一种或多种成分可以使用防止药剂快速释放和/或降解的运载体制备,如控制释放制剂,包括植入物、透皮贴片和微囊封递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,如聚酐、聚乙醇酸、聚原酸酯以及聚乳酸。一般来说,使用与良好医疗实践相符并且适于相关药剂(例如适于如抗体之类药剂)的药物组合物和给药方案配制各活性剂,给药并以治疗有效量施用。含有活性剂的药物组合物可以通过本领域中已知的任何适当方法施用,包括但不限于经口、粘膜、通过吸入、表面、经颊、鼻、直肠或肠胃外施用(例如静脉内、输注、肿瘤内、结节内、皮下、腹膜内、肌肉内、皮内、透皮或涉及物理破坏受试者组织并通过此类裂口施用药物组合物的其它方式施用)。

[0161] 在一些实施方案中,特定活性剂的给药方案可涉及间歇或连续(例如通过灌注或缓慢释放系统)施用,以例如在受试者体内一个或多个所关注的组织或液体中获得特别希望的药物动力学特征或其它暴露模式。在一些实施方案中,组合施用的不同药剂可以通过不同递送途径和/或根据不同时程施用。或者或另外,在一些实施方案中,将一次或多次剂量的第一种活性剂与一种或多种其它活性剂大体上同时施用,并且在一些实施方案中通过常见途径和/或作为与一种或多种其它活性剂的单一组合物的一部分施用。

[0162] 当优化给定治疗方案的途径和/或给药时程时要考虑的因素可以包括例如所治疗的特定癌症(例如类型、分期、位置等)、受试者的临床状况(例如年龄、总体健康状况、体重等)、药剂的递送部位、药剂(例如抗体或基于其它蛋白质的化合物)的性质、药剂的施用模式和/或途径、组合疗法的存在或不存在以及医疗从业者已知的其它因素。

[0163] 本领域的技术人员应了解,例如具体递送途径可影响剂量的量和/或所需剂量的量可影响递送途径。例如,在特定部位或位置内(例如组织或器官内)希望具有特别高的药剂浓度时,集中递送(例如肿瘤内递送)可能是所希望的和/或有用的。在一些实施方案中,特定药物组合物和/或所用给药方案的一个或多个特征可以随时间改变(例如增加或减少任何个别剂量中活性剂的量,增加或减少各剂量之间的时间间隔等),例如以便使所希望的治疗作用或反应(例如与如本文所描述的CD38调节抗体药剂的功能性特征相关的治疗或生物反应)达到最佳。一般来说,根据本发明的活性剂的类型、量和给药频率是由当将相关药剂施用给哺乳动物,优选地人时采取的安全性和功效要求决定。一般来说,与在无治疗时所

观察到的相比,选择具有以提供特定的且典型的可检测的治疗反应的给药特征。在本发明的上下文中,示例性的所希望的治疗反应可涉及但不限于抑制和/或减少肿瘤生长、肿瘤尺寸、转移、与肿瘤相关的一种或多种症状和副作用,以及增进癌细胞的细胞凋亡,和一种或多种细胞标记物或循环标记物等的治疗相关性减少或增加。此类标准可以通过文献中公开的多种免疫学、细胞学和其它方法中的任一种容易地评估。例如,如实施例中所描述,可确定CD38调节抗体药剂(单独或与另一药剂组合)足以增强癌细胞杀灭的治疗有效量。

[0164] 作为活性剂的CD38调节抗体药剂或包含此类药剂的组合物的治疗有效量可以使用本领域中可用的技术容易地测定,包括例如考虑一个或多个因素,如所治疗的疾病或病况、疾病的分期、所治疗的哺乳动物的年龄以及健康和身体状况、疾病的严重程度、施用的特定化合物等。

[0165] 在一些实施方案中,治疗有效量是活性剂的有效剂量(和/或单位剂量),该剂量可以是至少约0.01 $\mu$ g/kg体重、至少约0.05 $\mu$ g/kg体重、至少约0.1 $\mu$ g/kg体重、至少约1 $\mu$ g/kg体重、至少约5 $\mu$ g/kg体重、至少约10 $\mu$ g/kg体重或更高剂量(例如约100 $\mu$ g/kg体重)。本领域的普通技术人员应了解,在一些实施方案中,可以针对活性剂的分子量调整这些指导原则。剂量也可根据施用途径、治疗周期或最终为剂量递增方案而变化,所述剂量递增方案可用于在以递增剂量施用所述分离的抗体或其抗原结合片段包含aCD38-b-329-HCDR3氨基酸序列时,测定与之相关的最大耐受剂量和剂量限制性毒性(如果有的话)。

[0166] 治疗组合物通常应当在制备和储存条件下无菌并且稳定。该组合物可被配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或适合于高药物浓度的其它有序结构。无菌可注射溶液可以通过以下方式制备:将所需量的抗体与以上所列成分中的一种或其组合并入适当溶剂中,随后过滤灭菌。一般来说,分散液通过将活性化合物并入含有基础分散介质和来自上文所列成分的其它所需成分的无菌媒剂中来制备。对用于制备无菌可注射溶液的粉末的情况,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,这产生了活性成分加上来自预先无菌过滤的溶液的任何其它所希望成分的粉末。可以例如通过使用包覆剂、在分散液的情况下通过维持所需粒径以及通过使用表面活性剂来维持溶液的适当流动性。注射性组合物的延长吸收可以通过使组合物包括延迟吸收的药剂,例如单硬脂酸盐和明胶来实现。

[0167] 每种药剂的配制物应当合意地为无菌的,这可以通过滤过无菌过滤膜实现,接着以适合于快速注射施用或适于连续施用的形式包装或销售。可注射配制物可以制备成单位剂量型,如在安瓿(ampule)或含有防腐剂的多剂量容器中包装或销售。供肠胃外施用的配制物包括但不限于悬浮液、溶液、油性或水性媒剂中的乳液、糊剂以及如本文所论述的可植入式持续释放或可生物降解配制物。无菌可注射配制物可以使用无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂,如水或1,3丁二醇制备。其它有用的可肠胃外施用的调配物包括含呈微晶形式、在脂质体制剂中或作为可生物降解聚合物系统的组分的活性成分的那些。供持续释放或植入的组合物可包含药学上可接受的聚合材料或疏水性材料,如乳液、离子交换树脂、微溶性聚合物或微溶性盐。

[0168] 根据本发明使用的每种药物组合物都可以包括药学上可接受的分散剂、湿润剂、悬浮剂、等渗剂、包覆剂、抗细菌剂和抗真菌剂、运载体、赋形剂、盐或稳定剂,这些在所采用的剂量和浓度下对受试者无毒。这些额外的药学上可接受的化合物的不完整清单包括缓冲液,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;含有药理学上

可接受的阴离子的盐(如乙酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、羟乙磺酸盐、乳酸盐、乳糖醛酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、碱式乙酸盐、琥珀酸盐、丹宁酸盐、酒石酸盐、茶氯酸盐、甲苯磺酸盐、三碘季铵盐及戊酸盐);防腐剂(如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵;氯化六羟季铵(hexamethonium chloride);苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、苄索氯铵(benzethonium chloride);氯化钠;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐平衡离子,如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>或聚乙二醇(PEG)。

[0169] 在一些实施方案中,在根据本发明使用两种或更多种活性剂的情况下,这些药剂可以同时或依序施用。在一些实施方案中,一种药剂的施用时间相对于另一种药剂的施用进行特别安排。在一些实施方案中,适于组合施用的药剂的相对给药方案可以使用例如离体、体内和/或体外模型评估或凭经验确定;在一些实施方案中,这种评估或经验确定是在患者或患者群中(例如由此建立相关性)在体内进行。

[0170] 在一些实施方案中,用于实践本发明的一种或多种活性剂是根据包含至少两个周期的间歇性给药方案施用。在组合施用两种或更多种药剂,并且各药剂通过此类间歇性循环方案施用的情况下,不同药剂的个别剂量可以彼此相互交叉。在一些实施方案中,一次或多次剂量的第二种药剂是在施用一剂如本文所描述的CD38调节抗体药剂一段时间之后施用的。在一些实施方案中,每剂第二种药剂都是在施用一剂如本文所描述的CD38调节抗体药剂一段时间之后施用的。在一些实施方案中,本文所描述的CD38调节抗体药剂也可以按以下方案施用,这些方案涉及在历经一周、二周、四周或更长时间的一个或多个治疗周期内,不仅通过相同途径随后施用,而且还通过替代的施用途径,如通过皮下(或肌肉内)施用和肿瘤内施用,并且取决于患者反应遵循相同方案重复此类周期(或通过延长施用之间的时间间隔)。另外,在一些实施方案中,在一个或多个周期中所遵循的精确方案(例如剂量数、剂量间隔(例如相对于彼此或相对于另一事件,如另一种疗法的施用)、剂量的量等可以不同于一个或多个其它周期)。

[0171] 通过使用如本文所描述的施用途径、剂量和/或方案中的任一种,例如考虑使用活检体、血液样品和/或其它临床标准在患者中进行测量的一个或多个标准,可以鉴别、表征和/或验证如本文中所描述的CD38调节抗体药剂。在一些实施方案中,作为直接评价肿瘤尺寸和/或转移的替代或补充,可通过多种方法测定如本文中所描述的CD38调节抗体药剂的治疗功效,这些方法评价一个或多个不同的通用标准:针对癌细胞的直接细胞毒性(癌细胞凋亡和坏死)、肿瘤浸润免疫细胞(如CD4阳性和/或CD8阳性肿瘤浸润T细胞)增加、血液中循环的免疫细胞(淋巴细胞、NK细胞、单核细胞、树突状细胞、巨噬细胞、B细胞等总群体或特定亚群)增加和/或仅在有反应患者或无反应患者中治疗前相对于治疗后呈现一定差异表达(如通过RNA测序、大规模流量细胞测量术和/或其它大规模测序方法测定)。或者或另外,在一些实施方案中,此类鉴别、表征和/或验证可涉及在分子水平上,通过筛选一种或多种特定蛋白质或蛋白质集合的mRNA和/或蛋白质表达进行跟踪。在一些实施方案中,一种或多种

此类技术可允许鉴别相关信息以评估针对如本文所描述的CD38调节抗体药剂的反应,所述相关信息例如可与组织分布和/或肿瘤内(或附近)和/或在血液中循环的特定细胞群的标记物有关。

[0172] 这些方法和免疫生物学数据不仅可允许测定一种或多种功效和/或安全性参数或特征,而且在一些实施方案中,还可以为选择特定剂量、途径或给药方案提供基本原理,所述剂量、途径或给药方案可以例如单独和/或组合其它药物、标准护理方案或可提供其它治疗益处的免疫疗法一起用于关于给定适应症的一个或多个临床试验中。因此,在本发明的一系列其它实施方案中,在RNA和/或蛋白质水平上确定用此类制剂物治疗后或治疗前罹患疾病(如癌症)患者的细胞或组织(如肿瘤、血液样品或血液层分)中一个或多个基因的表达的组合存在(和/或不存在)之后,将如本文中所描述的CD38调节抗体药剂用于治疗该患者或预防疾病(如癌症)的方法中。因此,这些方法可允许定义一种或多种生物标记物,或更复杂的基因表达特征(或细胞群分布),其与所希望的CD38调节抗体药剂的治疗有效量、预测受试者在用CD38调节抗体药剂治疗之后可能具有抗肿瘤或抗感染反应的治疗相关的生物标记物,或预测受试者在用CD38调节抗体药剂治疗之后可能对化合物治疗起反应的治疗相关的生物标记物相关联。

[0173] 或者或另外地,在一些实施方案中,本文所公开的特定CD38调节抗体药剂的给药和施用可以根据人癌症和/或其它人组织中的CD38表达,例如通过采集各种癌症、组织和/或患者中基质和/或免疫细胞亚群中有关CD38分布的数据来初步确定和/或随后评价。这些数据可通过对常见癌症类型和/或组织(中枢神经系统、食道、胃、肝、结肠、直肠、肺、膀胱、心脏、肾脏、甲状腺、胰腺、子宫、皮肤、乳房、卵巢、前列腺及睾丸)使用常见技术(如流式细胞术、大规模细胞测量术、免疫组织化学或mRNA表达文库)产生,以鉴别各种免疫与非免疫亚群中的CD38表达之间的关系和/或其与癌细胞或免疫细胞亚群相关的细胞浸润量度和/或癌症相关标记物(如Foxp3和PD-1/PD-L1)的关系。CD38表达可以被限制于(或不限于)肿瘤组织中的免疫细胞亚群(如NK细胞和其它效应细胞或调节性免疫细胞),并且如果有的话,可以确定CD38表达与免疫检查点抑制剂之间的相关性,由此表明CD38调节抗体药剂与靶向此类免疫检查点抑制剂的化合物进行组合的适当用途。

[0174] 制品和试剂盒:在本发明的一些实施方案中,以独立制品形式提供如本文中所描述的CD38调节抗体药剂。在本发明的一些实施方案中,在带标签的容器中或和带标签的容器一起提供含有CD38调解抗体药剂的制品。适合的容器可包括例如瓶子、小瓶、注射器及试管。在一些实施方案中,容器可以由如玻璃或塑料之类任何材料或多种材料形成。在一些实施方案中,容器含有有效用于治疗特定疾病、病症或病况、或其分期或类型的组合物。在一些实施方案中,容器可具有无菌接取口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。例如,在一些实施方案中,将包含如本文中所描述的CD38调节抗体药剂的组合物包装于带有橡胶塞和铝密封的透明玻璃小瓶中。在容器上或容器所附的标签指示,所述组合物用于治疗所选病况。

[0175] 在一些实施方案中,制品还可包括含药学上可接受的缓冲剂(如磷酸盐缓冲生理盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)和右旋糖溶液)的独立容器,和/或还可包括从商业和使用者的观点看合乎需要的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器及附有使用说明书的包装插入件。例如,在一些实施方案中,制品可允许提供各药剂的静脉内配

制剂,该静脉内配制物呈无菌水溶液形式,其含有总计2mg、5mg、10mg、20mg、50mg或更高剂量,用适当稀释剂和缓冲剂配制0.1mg/ml、1mg/ml、10mg/ml的最终浓度或更高浓度。

[0176] 在一些实施方案中,可以在多部件试剂盒中,以冻干形式或使用任何相容性药物运载体的其它类型剂量单元形式本文中所描述的CD38调节抗体药剂,冻干的药剂可以用任何适当水溶液(随或不随试剂盒一起提供)复水。可以在包装或施配器装置中提供CD38调节抗体药剂的一个或多个单位剂型。此类包装或装置可以例如包含金属或塑料箔,如泡罩包装。为了正确地使用此类多部件试剂盒,其还可以包含缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器及带有关于癌症治疗的使用说明书的包装插入件。

[0177] 在一些实施方案中,可以以标签、传单、出版物、记录、图式或任何其它构件形式呈现本文中所描述的制品或试剂盒所附说明书,其可用于告知药剂、配制物以及制品中和/或试剂盒中的其它材料的正确使用方法和/或监测其可能的影响。说明书可以与制品一起提供和/或提供于试剂盒中。

## 实施例

[0178] 实施例1:在体外产生结合CD38的抗体

[0179] 材料与方法

[0180] CD38抗原的制备。从Sino Biological Inc.购得组氨酸标记的重组人、食蟹猕猴(Cyno)和鼠类CD38蛋白质的胞外域。使用EZ-Link 碘基-NHS-生物素化试剂盒(Thermo Scientific, 目录号21425)进行蛋白质试剂生物素化。将CD38抗原浓缩至约1mg/mL并将缓冲液更换成PBS,随后添加摩尔比为1:7.5的生物素化试剂(EZ-Link 碘基-NHS-生物素化试剂盒, Thermo Scientific, 目录号21425)。将混合物保持在4°C下过夜,随后再进行缓冲液交换以移除溶液中的游离生物素。通过链霉亲和素传感器与标记的蛋白质的结合来确定生物素化。

[0181] 用于分离抗CD38抗体的文库询问和选择方法。如先前所描述的(Xu Y等人, 2013; W02009036379; W02010105256; W02012009568),设计并生成八个多样性各为约10<sup>9</sup>的天然人合成酵母库(naive human synthetic yeast libraries),繁殖表达单克隆抗体的酵母细胞系并对其进行高通量筛选和择取。用八个天然文库针对单体人CD38进行八轮平行选择。

[0182] 对于前两轮选择,基本上如(Siege1等人, 2004)所描述,利用Miltenyi MACS系统进行磁珠分选。简而言之,在室温下,将酵母细胞(约10<sup>10</sup>个细胞/文库)与3ml的100nM生物素化的单体人CD38抗原在含0.1% BSA的FACS洗涤缓冲液PBS中一起培育15分钟。在用50ml冰冷的洗涤缓冲液洗涤一次之后,使细胞团块重悬于40mL洗涤缓冲液中,并将500μl链霉亲和素微珠(德国的Miltenyi Biotec, 目录号130-048-101)添加至酵母细胞中并在4°C下培育15分钟。接下来,使酵母细胞沉淀,重悬于5mL洗涤缓冲液中,并将其装载至MACS LS柱(德国的Miltenyi Biotec, 目录号130-042-401)上。在装载5mL之后,用3ml FACS洗涤缓冲液洗涤柱3次。从磁场中移出柱,用5mL生长培养基洗脱酵母细胞,然后使其生长过夜。

[0183] 在两轮MACS之后,使用流式细胞术(FACS)进行五轮分选。对于第一轮FACS选择,使约4×10<sup>7</sup>个酵母细胞沉淀,用洗涤缓冲液洗涤三次,并分别与100nM生物素化单体人、鼠类和食蟹猕猴CD38抗原一起在室温下培育10分钟。接着,洗涤酵母细胞两次,并在4°C下,用以1:100稀释的山羊抗人F(ab')2κ-FITC(美国的Southern Biotech; 目录号2062-02)以及二

抗,即以1:500稀释的链霉亲和素-Alexa Fluor 633(美国的Life Technologies;目录号S21375)或以1:50稀释的Extravidin-藻红蛋白(美国的Sigma-Aldrich;目录号E4011)染色15分钟。在用冰冷的洗涤缓冲液洗涤两次之后,使细胞团块重悬于0.4mL洗涤缓冲液中并将其转移至滤网封盖的分选管中。使用FACS ARIA分选仪(BD Biosciences)执行分选并确定分选门(sort gate)仅选择CD38结合。将来自第一轮FACS的鼠类和食蟹猕猴选择的群体组合成两个池。接着,针对人CD38结合对这些池进行分选以在第二轮FACS中鉴别交叉反应性结合物,由此减少试剂的多特异性结合物(reagent polyspecific binders)(Xu Y等人,2013)。第四轮FACS主要由使用100nM生物素化单体CD38作为抗原进行的阳性选择组成。将所选克隆的样品涂板并测序。

[0184] 使在天然选择(*naïve selection*)中鉴别的克隆亲和力成熟。来自第四轮FACS分选输出的重链被用来制备轻链多样化文库以用于额外的四轮选择。第一轮选择涉及了Miltenyi MACs珠粒与作为抗原的100nM生物素化单体人CD38或200nM生物素化单体鼠类CD38缀合。在MAC珠粒选择之后,执行三轮FACS分选。第一轮FACS涉及100nM或10nM的人CD38或200nM的鼠类CD38。在进行上述第二轮FACS的同时,用75-100nM的竞争剂IgG进行了竞争选择。在选择之后,用1或10nM的人CD38进行第三次阳性分选,并随后涂板。从每轮FACS选择拣选出个别克隆进行IgG测序。

[0185] IgG和Fab的制备与纯化。使酵母克隆生长至饱和,然后在振荡于30℃下诱导48小时。诱导之后,使酵母细胞沉淀并收集上清液进行纯化。使用蛋白质A柱纯化IgG并用pH 2.0的乙酸洗脱。用木瓜蛋白酶消化产生Fab片段并在CaptureSelect IgG-CH1亲和基质(Life Technologies;目录号1943200250)上纯化。

[0186] 抗CD38抗体的亲和力(affinity)测量。用Forte Bio测量CD38抗体的K<sub>D</sub>测定这些抗体的亲和力。Forte Bio亲和力测量如(Estep P等人,2013)所描述,通过将IgG在线装载至AHQ传感器上来执行。简而言之,传感器在分析缓冲液中离线平衡30分钟,然后在线监测60秒以确定基线。为测量所希望的结合,使装载有IgG的传感器与200nM的人、食蟹猕猴或鼠类CD38接触3分钟,随后将其转移至分析缓冲液中,保持3分钟,以测量解离速率。通过将生物素化CD38单体装载于SA传感器上,随后暴露于200nM抗体,获得单价结合测量值。使用Forte Bio提供的数据分析软件中的1:1结合模型拟合动力学数据。在本分析中确定的参照激动性抗CD38抗体的K<sub>D</sub>值如下:IB4对于人CD38的K<sub>D</sub>值是 $0.9 \times 10^{-8}$  M,且IB4不结合至食蟹猕猴CD38。

[0187] 抗CD38抗体的亲合结合力(avidity)测量:Ni-NTA传感器在分析缓冲液中离线平衡30分钟,然后在线监测60秒以确定基线。向其中装载4.2nM抗原(HIS标记的重组人CD38),保持50分钟,随后将其转移至分析缓冲液中,洗涤0.5分钟,并且再在分析缓冲液中保持1分钟以测定基线。接着,使抗体在不同浓度(如图14和12中所描述)下结合30-50分钟。随后,将其转移至分析缓冲液中,保持20-30分钟,以测量解离速率。使用Forte Bio提供的数据分析软件中的1:1结合模型拟合动力学数据。

[0188] 或者,通过在25℃的环境实验温度下,使用CM-5传感器芯片在Biacore 2000中,以SPR测量抗人CD38抗体的K<sub>D</sub>,测定所述抗体的亲和力。先将抗人抗体在分析缓冲液(pH7.4,10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05% Tween 20)中固定于所有流槽(flow cells),经10分钟达到在12,000-14,000之间的RU。随后,将配体(抗体测试物)装载至54-208RU之间的

捕捉水平。接着,使分析物(his标记的重组人CD38)在分析缓冲液中缔合6分钟,所述分析物从3200nM开始2倍稀释,且最低浓度是0.78nM。在分析缓冲液中解离10分钟。在各样品浓度之间,在3M MgCl<sub>2</sub>中执行再生步骤三次,保持0.5分钟。在整个过程中维持25μl/min的流动速率。在由Biacore提供的分析软件上,使用全局拟合来拟合动力学数据,并扣除参照物。

[0189] 表位分组(epitope binning):抗体的表位分组是在Forte Bio Octet Red384系统(Pall Forte Bio Corp.,美国)上使用标准夹心分组分析法执行。将抗人CD38抗体装载至AHQ传感器上并用不相关的人IgG1抗体阻断传感器上未被占据的Fc结合位点。传感器与100nM靶抗原接触,随后与第二种抗CD38抗体(即参照单克隆激动性小鼠抗人CD38抗体(1B4))接触,由意大利都灵大学(Univ.Torino, Italy)的F.Malavasi教授友情提供)。使用Forte Bio数据分析软件7.0处理数据。在抗原缔合之后第二种抗体的其它结合表示有未被占据的表位,而无结合表示表位被阻断。

[0190] 抗CD38抗体与CD38表达性细胞的结合通过分析与人PBMC的结合来评价候选匹配物(hit)。为此,用来自3名人供体的全血制备PBMC并与最终浓度是1μM、200nM、40nM、8nM、1.6nM、320pM、64pM、13pM及2.5pM的aCD38-b-329或DARA一起培育30分钟。接着,洗涤细胞并用AF488二抗标记。接着,将细胞与其它表面染色抗体一起培育:抗CD3 PE-Cy7、抗CD4 APC和抗CD8 BV451。使用8色(三色激光)BD FACSCanto II细胞仪,在BD FACSDiva软件(BD Biosciences)上运行,以获取样品。使用FCS Express(v3.0)软件(DeNovo software)进行后分析处理。不同细胞群的相对比例(%)和中值荧光强度(Median Fluorescence Intensity,MFI)数据的报告到小数点后2位。

[0191] 在哺乳动物细胞中表达的作为人IgG1的aCD38-b-329的再克隆、制备和表征。由Genewiz合成所述抗体的密码子优化的VH和VL编码序列。将可变区的cDNA克隆至抗体表达载体(Icosagen,EST)中,所述表达载体含有人IgG1重链和κ轻链恒定区(分别是P01857和P01834)。通过在最终载体中测序来验证全长重链和轻链cDNA,然后再克隆,使用QMCF技术(Icosagen)(即稳定游离型表达系统)将其表达出来,该表达系统使用了基于CHO的细胞(CHOEBNALT85)和用于制备重组蛋白(即抗体)的适当载体,用1μg表达质粒转染CHOEBNALT85细胞以制备抗体。转染后48小时,将700μg/ml G418添加至含有所选质粒的细胞群体中。为了制备重组蛋白,将温度转变至30℃额外喂送培养液。在制备结束时,通过离心(1000g,30分钟和15℃)使培养物上清液澄清,添加PMSF并处理或冷冻上清液直至纯化。通过MabSelect SuRe亲和色谱法并随后在25mM NaOAc pH 5.5、50mM NaCl或PBS中进行Superdex 200凝胶过滤,来纯化hIgG1抗体。在CHOEBNALT85细胞中产生的人IgG1抗体通过对重组人CD38的亲和力、在使用重组兔CD38(65003-T08H-20;Sino Biological)和重组大鼠CD38(80229-R08H-2;Sino Biological)情况下与鼠类、大鼠、兔及食蟹猕猴CD38的交叉反应性和相对于所选CD38结合抗体的表位分组来表征。

[0192] aCD38-b-329的表位定位(epitope mapping)。使用固相Fmoc合成法合成呈现人CD38序列(Uniprot记录号P28907)的数组不同的线性、单环、β转角模拟物、二硫桥模拟物、不连续二硫桥、不连续表位模拟肽(Pepscan BV, The Netherlands; Timmermann P等人, 2007; Langedijk JP等人, 2011)。在基于pepscan的ELISA(Pepscan, The Netherlands)中测试抗体与各合成肽的结合。将肽阵列与一抗溶液一起培育(在4℃下培育过夜)。洗涤之后,将肽阵列与1/1000稀释的适当抗体过氧化酶缀合物(2010-05; Southern Biotech)一起在

25°C下培育一小时。洗涤后,添加过氧化酶底物2,2'-次偶氮基-二-3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐(2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate,ABTS)和20μl/ml的3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。一小时之后,测量显色情况。用电荷耦合装置(charge coupled device,CCD)相机和图像处理系统对显色进行定量。类似于标准96孔板ELISA读取器,从CCD相机获得的值在0至3000mAU范围内。为了验证合成肽的质量,平行合成一组独立的阳性和阴性对照肽并用不相关的对照抗体进行筛选。

[0193] 抗人CD38抗体的竞争测定:在Forte Bio Octet Red96系统(Pall Forte Bio Corp.,美国)上,使用标准依序结合测定法进行抗体竞争分析。将0.625μg/mL his标记的重组人CD38装载至Ni-NTA生物传感器上,保持300秒。洗涤15秒以及对动力学缓冲液进行60秒的基线步骤之后,将传感器与66.6nM的第一种抗体(达雷木单抗)接触600秒,随后与第二种抗CD38抗体(达雷木单抗(对照)或aCD38-b-329)接触(也是66.6nM,保持600秒)。使用Forte Bio数据分析软件9.0处理数据。额外的第二种抗体的结合表示有未被占据的表位(不竞争表位),而不结合表示对表位的表位阻断(竞争)。

#### [0194] 结果

[0195] 如材料与方法中所描述,使用基于酵母的抗体呈现文库分离出结合至重组人CD38胞外蛋白质序列(rhCD38)的单克隆抗体(mAb)。对这些抗体测序并在酵母细胞中产生独特克隆(Barnard GC等人,2010)。对每个表达独特抗体序列的酵母克隆的细胞培养物上清液进行针对rhCD38结合的筛选。

[0196] 所选抗体的KD值(用于测量亲和力(affinity)和亲合结合力(avidity))和交叉分组分析提供于表1中:

#### [0197] 表1:

[0198]	抗体	表位交叉分组的组	亲和力 (affinity)		亲合结合力 (avidity)	
			K <sub>D</sub> 单价人CD38-HIS (M) (Octet)	同型	K <sub>D</sub> 单价人CD38-HIS (M) (Biacore)	K <sub>D</sub> 单价人CD38-HIS (M) (Octet)
	aCD38-b-329	B	3.38E-09	IgG1	0.62E-09	-
	达雷木单抗	F	8.28E-08	IgG1	-	1.80E-10

[0199] 由Octet和Biacore测量的抗CD38抗体与重组单价人CD38的结合及与达雷木单抗的比较显示于图11A、12和14中。

[0200] 基于与rhCD38的结合,鉴别了一组mAb的序列独特性和表达水平。进一步表征这些抗体与重组食蟹猕猴和小鼠CD38胞外域蛋白质序列的结合。此外,执行表位分组(epitope binning)以确定所鉴别的抗体是否结合至与参照激动性抗CD38抗体IB4的表位重叠的表位(Ausiello CM等人,2000;Ferrero E等人,2004)。表征IgG与单价rhCD38和/或重组食蟹猕猴CD38胞外蛋白质序列的结合值包括10<sup>-8</sup>M与10<sup>-10</sup>M之间的克隆。此外,抗体被表征为与参照激动性抗CD38抗体IB4(或可商购的达雷木单抗,即DARA)竞争或不竞争。如表1中所示,所选抗体属于不同的交叉分组(cross binning groups)。另外,通过流式细胞术,使用CHO-S细胞作为阴性对照,以与大量表达CD38的人细胞(如淋巴母细胞样的Raji细胞)的结合水平评价抗体克隆。此外,确定与人PBMC的结合(图3)。

[0201] 最后,为了消除易于聚集和易于发生非特异性相互作用的抗体序列,在多重特异

性试剂 (Poly Specific Reagent, PSR) 测定和亲和捕捉自相互作用纳米粒子光谱法 (Affinity-Capture Self-Interaction Nanoparticle Spectroscopy, AC-SINS) 中筛选抗体, 所述AC-SINS是一种允许高通量筛选以进行早期抗体开发的方法 (Liu Y等人, 2014)。在后面的分析中的抗体都未评为阳性并因此不从该组中移除。

[0202] 在如上所述测序并表征的所选匹配物 (hit) 中, aCD38-b-329克隆是呈现新颖互补性决定区 (CDR) 的抗体 (图2), 其不与IB4和达雷木单抗竞争结合人CD38。实际上, 使用Pepscan技术执行的表位定位研究指示, aCD38-b-329结合人CD38中不仅不同于关于达雷木单抗所公开的区域 (含有氨基酸233-246和267-280的两个β链; 图2B) 或关于其它抗人CD38抗体所报导的区域 (参见W02015123687中的表2) 的区域, 并且以在 $10^{-9}$ M范围内的Kd值结合人CD38胞外蛋白质序列。抗体竞争分析显示, 达雷木单抗不与aCD38-b-329竞争相同表位 (图13)。

[0203] 因此, aCD38-b-329序列 (图2A) 定义了特异性结合CD38的抗体, 并且其激动性活性可以通过基于细胞的测定或动物模型进行功能评价, 所述激动性活性与用来定义CD38调节抗体药剂 (如本文所使用的术语) 的功能性特征相关。对aCD38-b-329-LCDR3的分析显示存在DG (Asp-Gly) 基元, 其可能代表在制造期间进行修饰的目标, 该修饰可能影响抗体的部分特性。在这一范围内, 基于aCD38-b-329的抗体文库, 其中一个残基被取代或两个残基都被取代, 且在所有这些突变体中, 仅有有限数量的突变体维持了与人CD38 (例如表达于Daudi细胞的表面上的人CD38) 的结合 (参见实施例2)。以这种方式, 可以测试相应的基于aCD38-b-329的抗体变体是保持CD38调节抗体药剂的全部特性, 还是仅具有CD38结合特性。通过使用实施例中公开的测定可以进一步验证这些变体。

[0204] 实施例2: 用于验证CD38调节抗体药剂的基于细胞的模型

[0205] 材料与方法

[0206] 体外T细胞活化测定: 用eFluor450荧光染料 (Life Technologies) 标记预先冷冻的原代人全T细胞 (Stemcell Technologies) 并在预先涂布抗CD3抗体 (0.1 $\mu$ g/ml涂布浓度, 克隆OKT3, eBiosciences) 和以10、5和2.5 $\mu$ g/ml浓度涂布的抗CD38调节抗体的96孔板中的含有10%FBS (Sigma)、2mM L-谷氨酰胺 (Life Technologies) 和10,000U/ml青霉素-链霉素 (Sigma) 的RPMI 1640 (Life Technologies) 中以每孔 $0.15 \times 10^6$ 个细胞培育72小时。在流式细胞仪上, 通过排除用活力染料 (Zombie NIR, BioLegend) 标记的死细胞并用荧光染料标记的抗体 (CD8-FITC克隆HIT8a eBiosciences、CD25-PE克隆M-A251Biolegend、CD4-BV510克隆RPA-T4 BioLegend、CD38-PE-Cy7克隆HB\_7eBiosciences、CD137-APC克隆4B4-1 BioLegend) 染色来辨识表面标记物, 由此进行T细胞增殖的读出。使用Meso Scale Discovery MSD平台, 根据制造商的说明书 (多路分析试剂盒, Meso Scale Discovery) 测定IFNg、IL-2、IL-10、TNFa及GM-CSF的表达, 以进行上清液中的细胞因子分析 (图中的星号表示超出拟合曲线范围的值)。

[0207] 体外ADCC测定: 使用Daudi (CD38阳性) 人细胞系作为靶细胞且人PBMC作为效应细胞来源, 执行抗体依赖性细胞介导的细胞毒性测定 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC测定) 以表征抗人CD38抗体。用最高浓度10 $\mu$ g/ml紧随一系列对数 (7个点) 浓度 (三个平行孔) 的待评价测试物 (抗CD38一抗或利妥昔单抗 (Rituximab) 作为对照) 在37°C和5%CO<sub>2</sub>下保持4小时来评估50比1或25比1的效应细胞与靶细胞的比率。用IL-2激

活PBMC并在共培养测定期间存在IL-2。在体外培养之前,用1 $\mu$ M钙黄绿素AM标记靶细胞系并将其与2.5mM丙磺舒(probenecid)一起培育。裂解的细胞将装载的钙黄绿素释放至上清液中,由此允许测量荧光。通过excel和GraphPad软件分析来分析钙黄绿素AM释放,通过归一化生成剂量反应曲线,其中将使用1%皂昔处理值测定最大裂解。在XY图上标绘靶细胞裂解百分比,将归一化的钙黄绿素AM释放百分比相对于浓度的对数作图,并且将数据拟合成非线性回归曲线,由此计算EC50。

[0208] 体外CDC测定:通过用最高浓度为10 $\mu$ g/ml及随后的对数稀释系列(7个点)(三个平行孔)的测试物(抗CD38一抗或利妥昔单抗作为对照)和最终浓度是10%正常人血清补体处理细胞,检查针对表达CD38的人细胞系(Daudi)的CDC活性。在37°C和5%CO<sub>2</sub>下培养样品3小时。在培养条件后,洗涤细胞并使其重悬于含5 $\mu$ g/ml最终浓度的碘化丙啶(PI)的1×PBS中,随后进行流式细胞术分析。在样品获取期间,通过流式细胞术检查总细胞。在XY图上标绘PI阳性细胞的百分比,以PI百分比相对于浓度的对数作图,并将数据拟合成非线性回归曲线,由此计算EC50。

[0209] 直接细胞死亡测定。通过用最高浓度为10 $\mu$ g/ml及随后的对数稀释系列(7个点)(三个平行孔)的测试物(抗CD38一抗)或作为对照的利妥昔单抗处理细胞,检查针对表达CD38的人细胞系(Daudi)的直接促细胞凋亡活性。通过用最高浓度为10 $\mu$ g/ml及随后的对数连续稀释(7个点)(三个平行孔)的测试物(抗CD38一抗或作为对照的利妥昔单抗)处理细胞,随后用5 $\mu$ g/ml兔抗人Fc $\gamma$ F(ab')2(二抗)处理细胞,来检查由Fc $\gamma$ 受体介导的交联活性引起的细胞死亡。在37°C和5%CO<sub>2</sub>下培养样品24小时。在培养条件后,洗涤细胞并使其再悬浮于膜联蛋白V结合缓冲液和7-AAD中,通过流式细胞术分析检查细胞死亡情况。在样品获取期间,通过流式细胞术检查总细胞。在XY图上标绘晚期凋亡细胞的百分比,以膜联蛋白V阳性和7-AAD阳性细胞的百分比相对于浓度的对数作图,并将数据拟合成非线性回归曲线,由此计算EC50。

[0210] 统计学. 使用Prism软件(GraphPad)执行曲线拟合并测定EC50值和最大活性。

#### [0211] 结果

[0212] 由ADCC和CDC测定得到的EC50值和裂解百分比结果显示于表2和3中,与在相同实验中达雷木单抗的结果形成比较:

[0213] 表2-靶Daudi细胞的ADCC数据:

[0214]	抗体	实验	EC50 $\mu$ g/ml	最大裂解%	EC50 $\mu$ g/ml DARA	最大裂解 DARA
	aCD38-b-329	1	0.011	50	0.004	36
	aCD38-b-329	2	0.0062	49	0.0025	58

[0215] 表3-CDC数据-10%补体,靶Daudi细胞:

[0216]	抗体	实验	EC50 $\mu$ g/ml	最大裂解%	EC50 $\mu$ g/ml DARA	最大裂解 DARA
	aCD38-b-329	9	NA	NA	0.11	92

[0217] 进一步针对免疫细胞评价在实施例1中作为其它抗体表征的aCD38-b-329候选抗体。在第一系列实验中,aCD38-b-329显示出与人T细胞的剂量依赖性结合(图3)。当使用T细胞测试时,例如当使用aCD38-b-329涂布用于培养此类细胞的板时,aCD38-b-329使人T细胞活化明显增加,而参照抗CD38抗体(DARA)展示的激动剂活性要弱得多(图4A)。当与DARA相

比较时,aCD38-b-329触发人T细胞大量分泌促炎性细胞因子,由此进一步突显aCD38-b-329的激动剂活性(图4B)。此外,aCD38-b-329和DARA在ADCC分析中显示出相当的活性,但仅DARA呈现CDC活性(图5A)。aCD38-b-329触发较弱的CDC作用,以提供一种因输液部位反应减弱而安全性增加的抗CD38抗体。DARA和aCD38-b-329在人PBMC杀灭表达CD38的肿瘤细胞(Daudi)方面也显示出相当的活性,不过aCD38-b-329仅在抗体交联情况下呈现增强的活性(图5B)。

[0218] 总体而言,aCD38-b-329被表征为示例性抗CD38抗体,其在不同实验中都呈现对免疫细胞的CD38调节抗体药剂的活性。

[0219] 实施例3:在动物模型中验证CD38调节抗体药剂

[0220] 材料与方法

[0221] 基于淋巴瘤细胞的模型.

[0222] 在含有2mM L-谷氨酰胺且补充有10%胎牛血清+1mM丙酮酸钠+4.5g/L葡萄糖+10mM Hepes的RPMI 1640中培养Daudi和Ramos人伯基特氏淋巴瘤(Burkitt Lymphoma)细胞。从Charles River获得健康雌性cb17 SCID小鼠。通过将含 $5 \times 10^5$ 个Daudi细胞或 $10^6$ 个Ramos细胞的200 $\mu$ L RPMI 1640静脉内注射至动物的尾静脉中来诱发肿瘤。在用 $\gamma$ 源(每只小鼠1.44Gy,60Co,法国布雷泰尼埃(Bretenières,France)的BioMep)全身照射之后24至72小时,执行细胞注射。根据体重将小鼠随机分入治疗组中,每组8只小鼠。连续三周(TW×3),第1组动物一周两次接受静脉内注射的5ml/kg媒剂。连续三周(TW×3),第2组动物一周两次接受静脉内注射的DARA,每次注射10mg/kg。连续三周(TW×3),第3组动物一周两次接受静脉内注射的aCD38-b-329,每次注射10mg/kg。在最长8周之后,处死小鼠。

[0223] 结果

[0224] aCD38-b-329的治疗特性可在人癌症动物模型中,特别地,使用免疫功能不全小鼠进行测试,其可以更适当地评估CD38调节抗体药剂在杀灭人肿瘤细胞方面的特性。aCD38-b-329显示其明显提高了静脉内注射两种不同类型人淋巴瘤细胞的小鼠的存活率,这一作用在Daudi模型中优于达雷木单抗(DARA)(图6A),并且在两个模型中优于对照组(图6A和B)。

[0225] 如文献(Morton JJ等人,2016;Holzapfel BM等人,2015)中所描述,在动物存活率以及同时存在的免疫作用方面的这些特性可以在人肿瘤(特别是实体癌)的其它体内模型中以及离体模型中进一步研究,所述体内模型是基于注射人癌症细胞系或人原代癌细胞,其中实体肿瘤在皮下生长;所述离体模型是基于使用从患者直接分离的肿瘤细胞,从所述患者分离出肿瘤细胞和免疫细胞并在体外测试其对抗CD38抗体的反应,所述反应是通过细胞活化、增殖、细胞因子产生和/或细胞死亡测量。可通过施用不同剂量和/或与其它抗癌剂(如激酶或其它酶的抑制剂、抗体、放射疗法/化学疗法、佐剂或疫苗)组合的aCD38-b-329评价其它特征,如所选组织或生物材料中基因表达的远端效应或变化。

[0226] 实施例4:产生aCD38-b-329的变体

[0227] 为防止天冬氨酸异构化,生成了VL CDR3 DG序列的可能性取代的文库。生成了关于aCD38-b-329的两个酵母展示文库以便移除DG基元。第一个文库是基于天冬氨酸和甘氨酸周围的简并引物NNKNNK。这一文库具有400的多样性。第二个文库是基于集中于天冬氨酸的简并引物NNK,同时保留甘氨酸,多样性是20。针对10nM人CD38单体对这些文库进行一轮

分选。如上所述,对来自各谱系的96种进行测序、制备和表征。此外,从NNKNNK文库拣选出总计五个96孔板以在Octet中针对与rhCD38的结合进行筛选。有限数量的取代是容许的并选出显示最佳亲和力的变体,并在Octet中测试这些变体与rhCD3的结合。选出显示最佳亲和力的变体进行哺乳动物制备并使用如上文在实施例2中所描述的测定进一步表征。

[0228] 变体的功能性表征:在含有2mM L-谷氨酰胺且补充有10%胎牛血清+1mM丙酮酸钠+4.5g/L葡萄糖+10mM Hepes的RPMI 1640中培养基于淋巴瘤细胞的模型:Raji和Ramos人伯基特氏淋巴瘤细胞。从Charles River获得健康雌性cb17 SCID小鼠。通过将含 $5 \times 10^5$ 个Raji细胞或 $10^6$ 个Ramos细胞的200 $\mu$ L RPMI 1640静脉内注射至动物的尾静脉中来诱发肿瘤。在用 $\gamma$ 源(每只小鼠1.44Gy,60Co,法国布雷泰尼埃的BioMep)全身照射之后24至72小时,执行细胞注射。根据体重将小鼠随机分入治疗组中,每组10只小鼠。连续三周(TW×3),第1组动物一周两次接受静脉内注射的5ml/kg媒剂。连续三周(TW×3),第2组动物一周两次接受静脉内注射的DARA,每次注射10mg/kg。连续三周(TW×3),第3组动物一周两次接受静脉内注射的aCD38-b-329,每次注射10mg/kg。连续三周(TW×3),第4组小鼠一周两次接受静脉内注射的aCD38-b-329-m6,每次注射10mg/kg,连续三周(TW×3),第5组小鼠一周两次接受静脉内注射的aCD38-b-329-m7,每次注射10mg/kg。在图中指示的时间,处死小鼠。

[0229] 结果

[0230] 变体抗体VH和VL链的CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3序列显示于图7中(针对aCD38-b-329-m6的SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:16;针对aCD38-b-329-m7的SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:17)。Daudi细胞结合实验确定,变体抗体与CD38的结合类似于亲本克隆和达雷木单抗,表4(图8和图11)。

[0231] 表4:

	LCDR3 序列	Octet 亲和力 $K_D$ (M)	Biacore 亲和力 $K_D$ (M)	EC50 μg/ml	Max MFI
[0232]	aCD38-b-329	QQDGAVFT (SEQ ID NO: 7)	2.38E-09	0.62E-09	0.734
	aCD38-b-329-m6	QQDEAVFT (SEQ ID NO: 10)	1.99E-08	4.70E-09	0.651
	aCD38-b-329-m7	QQDSAVFT (SEQ ID NO: 11)	2.60E-08	4.90E-09	0.745
	达雷木单抗	-	-	0.945	2495

[0233] 这些变体显示出与亲本克隆和达雷木单抗相当的ADCC活性(图9)。与亲本品系相比,所述变体具有较低的针对ADCC活性的EC50(μg/ml),但具有相当的最大裂解(表5)。

[0234] 表5-ADCC靶裂解:

	EC50μg/ml	最大裂解%
aCD38-b-329	0.0062	49
aCD38-b-329-m6	0.0024	47
aCD38-b-329-m7	0.0035	43
达雷木单抗	0.0025	58
IgG1同型	NA	0

[0236] 通过DTT还原和碘乙酰胺基化制备肽定位样品,使用胰蛋白酶消化并在LC-UV-MS系统上分析。测定异构化和未异构化肽的水平且异构化肽的百分比显示于表6中:

[0237] 表6:

[0238]	抗体	% isOD
	aCD38-b-329	7.4%
	aCD38-b-329-m6	0.0%
	aCD38-b-329-m7	0.0%

[0239] 在人癌症动物模型中,特别地,使用免疫功能不全小鼠测试aCD38-b-329和其变体aCD38-b-329-m6以及aCD38-b-329-m7的治疗特性,使用免疫功能不全小鼠可以更适当地评价CD38调节抗体药剂在杀灭人肿瘤细胞方面的特性。在两种模型(Raji和Ramos)中,aCD38-b-329变体aCD38-b-329-m6和aCD38-b-329-m7在增加静脉内注射两种不同类型人淋巴瘤细胞的小鼠的存活率方面显示出显著效力,这一作用优于达雷木单抗(DARA)(图10)。

[0240] 实施例5:抗体结合至突变型CD38

[0241] 材料与方法:构建人CD38的两种突变形式。在一种形式中,202位的D突变成G(D202G),并且在第二种形式中,274位的S突变成F(S274F)。

[0242] 评估了aCD38-b329与各突变CD38蛋白质的结合,并与达雷木单抗相比较。

[0243] 结果

[0244] 结果显示,在人CD38中引入突变D202G或突变S274F不会影响aCD38-b-329与其的结合。这与达雷木单抗形成比较,在达雷木单抗情况下,在人CD38中引入突变S274影响抗体结合,但引入突变D202G不影响该结合。这些结果确定,aCD38-b-329结合至与达雷木单抗所结合不同的表位。

[0245] 本申请中包括的序列概述提供于下:

SEQ ID NO	抗体序列的说明	又称为:
1	aCD38-b-329 可变重链 CDR1	aCD38-b-329-HCDR1
2	aCD38-b-329 可变重链 CDR2	aCD38-b-329-HCDR2
3	aCD38-b-329 可变重链 CDR3	aCD38-b-329-HCDR3
4	aCD38-b-329 可变重链 CDR 1、2、3 以及 FR 2、3	aCD38-b-329-HCDR123 aCD38-b-329-m6-HCDR123 aCD38-b-329-m7-HCDR123
5	aCD38-b-329 可变轻链 CDR1	aCD38-b-329-LCDR1
6	aCD38-b-329 可变轻链 CDR2	aCD38-b-329-LCDR2
7	aCD38-b-329 可变轻链 CDR3	aCD38-b-329-LCDR3
8	aCD38-b-329 可变轻链 CDR 1、2、3 以及 FR 2、3	aCD38-b-329-LCDR123
9	人 CD38	Uniprot 序列 P28907
10	aCD38-b-329-m6 可变轻链 CDR3	aCD38-b-329-m6 – LCDR3
11	aCD38-b-329-m7 可变轻链 CDR3	aCD38-b-329-m7 – LCDR3
12	aCD38-b-329 可变重链 CDR 1、2、3 以及 FR 1、2、3、4,	aCD38-b-329-VH aCD38-b-329-m6-VH aCD38-b-329-m7-VH
13	aCD38-b-329-m6 可变轻链 CDR 1、2、3 以及 FR 1、2、3、4,	aCD38-b-329-m6-VL
14	aCD38-b-329-m7 可变轻链 CDR 1、2、3 以及 FR 1、2、3、4,	aCD38-b-329-m7-VL
15	aCD38-b-329 可变轻链 CDR 1、2、3 以及 FR 1、2、3、4,	aCD38-b-329-VL
16	aCD38-b-329-m6 可变轻链 CDR 1、2、3 以及 FR 2、3	aCD38-b-329-m6-LCDR123
17	aCD38-b-329 m7-可变轻链 CDR 1、2、3 以及 FR 2、3	aCD38-b-329-m7-LCDR123
18	达雷木单抗可变重链	
19	达雷木单抗可变轻链	

[0247] 等效物和范围

[0248] 本领域的技术人员应理解,本发明是由所附权利要求书而非实施例或本文所包括的某些实施方案的其它说明界定。

[0249] 类似地,除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一个(种) (a/an)”以及“所述”包括多个(种)参照物。

[0250] 除非上文另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的一般技术人员通常所理解相同的含义。与本文所描述的方法和材料类似或等效的任何和方法和材料均可用于实践或测试本发明。一般来说,与本文所描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、遗传学以及蛋白质和核酸化学结合使用的命名法及其技术是本领域中众所周知且常用的命名法和技术,或根据制造商的规范的命名法和技术。

[0251] 本文中提到的所有出版物均以引用的方式并入本文中以公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。

[0252] 参考文献

[0253] Ausiello CM等人,2000.《组织抗原(Tissue Antigens.)》56:539-47。

[0254] Barnard GC等人,2010.《工业微生物学与生物技术杂志(J Ind Microbiol

- Biotechnol.)》37:961-71。
- [0255] Beck A等人,2017.《自然评论:药物发现(Nat Rev Drug Discov.)》16:315-337。
- [0256] Chevrier S等人,2017.《细胞(Cell.)》169:736-749。
- [0257] de Weers M等人,2011.《免疫学杂志(J Immunol.)》186:1840-8。
- [0258] Estep P等人,2013MAbs.5:270-8。
- [0259] Ferrero E等人,2004.《BMC免疫学(BMC Immunol.)》5:21。
- [0260] Frasca L等人,2006.《血液(Blood)》107:2392-2399。
- [0261] Hara-Yokoyama M等人,2008.《国际免疫药理学(Int Immunopharmacol.)》8:59-70。
- [0262] Holzapfel BM等人,2015.《干细胞(Stem Cells.)》33:1696-704。
- [0263] Horenstein AL等人,2017.《人抗体(Hum Antibodies.)》25:75-85。
- [0264] Jarasch A等人,2015.《药物科学杂志(J Pharm Sci.)》104:1885-1898。
- [0265] Kamphorst AO等人,2017.《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A.)》114:4993-4998。
- [0266] Karakasheva T等人,2015.《癌症研究(Cancer Res)》75:4074-85。
- [0267] Kearns JD等人,2015.《分子癌症治疗学(Mol Cancer Ther.)》14:1625-36。
- [0268] Kijanka M等人,2015.《纳米医学(Nanomedicine.)》10:161-174。
- [0269] Langedijk JP等人,2011.《分析生物化学(Analytical Biochemistry.)》417:149-155。
- [0270] Liu L,2015.《药物科学杂志》104:1866-84。
- [0271] Liu Y等人,2014.MAbs.6:483-92。
- [0272] Malavasi F等人,2008.《生理学评论(Physiol Rev.)》88:841-86。
- [0273] Morandi F等人,2015.《免疫学杂志》195:965-72。
- [0274] Morton JJ等人,2016.《癌症研究》76:6153-6158。
- [0275] Quarona V等人,2013.《细胞测量学B部分:临床细胞测量学(Cytometry B Clin Cytom.)》84:207-17。
- [0276] Rah SY等人,2015.《科学报告(Sci Rep.)》5:9482。
- [0277] Redman JM等人,2015.《分子免疫学(Mol Immunol.)》67:28-45。
- [0278] Siegel RW等人,2004.《免疫学方法杂志(J Immunol Methods.)》286:141-53。
- [0279] Sliwkowski M和Mellman I,2013.《科学(Science.)》341:1192-8。
- [0280] Sydow J等人,2014.《科学公共图书馆综合卷(PLoS One.)》9:e100736。
- [0281] Timmermann P等人,2007,《分子识别杂志(J.Mol.Recognit.)》,20,283-99。
- [0282] van de Donk NW等人,2016.《免疫学评论(Immunol Rev.)》270:95-112。
- [0283] Vazquez-Lombardi R等人,2015.《今日药物发现(Drug Discov Today.)》20:1271-83。
- [0284] Xu Y等人,2013.《蛋白质工程、设计和精选(Protein Eng Des Sel.)》26:663-70
- [0285] Wei W等人,2014.《世界生物化学杂志(World J Biol Chem.)》5:58-67
- [0286] Rajpal等人,《美国国家科学院院刊》,2005,102(24):8466-71。
- [0287] Steinwand等人,MAbs,2014,6(1):204-18。

- [0288] Ellington等人,《自然(Nature.)》1990;346(6287):818-822。
- [0289] Tuerk等人,《科学》1990;249(4968):505-510。
- [0290] Ni等人,《当代药物化学(Curr Med Che)》2011;18(27):4206-14。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 塔斯克医疗有限公司
- [0003] <120> CD38调节抗体
- [0004] <130> P115677W0
- [0005] <160> 19
- [0006] <170> PatentIn 3.5版
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 11
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 智人
- [0011] <400> 1
- [0012] Gly Ser Ile Ser Ser Ser Asp Tyr Tyr Trp Gly
- [0013] 1 5 10
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 16
- [0016] <212> PRT
- [0017] <213> 智人
- [0018] <400> 2
- [0019] Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
- [0020] 1 5 10 15
- [0021] <210> 3
- [0022] <211> 16
- [0023] <212> PRT
- [0024] <213> 智人
- [0025] <400> 3
- [0026] Ala Arg Gly Gln Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Ala Tyr Pro Phe Asp Met
- [0027] 1 5 10 15
- [0028] <210> 4
- [0029] <211> 87
- [0030] <212> PRT
- [0031] <213> 智人
- [0032] <220>
- [0033] <221> HCDR1
- [0034] <222> (1) .. (11)
- [0035] <220>
- [0036] <221> HCDR2
- [0037] <222> (26) .. (41)
- [0038] <220>

[0039] <221> HCDR3  
[0040] <222> (72) .. (87)  
[0041] <400> 4  
[0042] Gly Ser Ile Ser Ser Ser Asp Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro  
[0043] 1 5 10 15  
[0044] Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser  
[0045] 20 25 30  
[0046] Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp  
[0047] 35 40 45  
[0048] Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala  
[0049] 50 55 60  
[0050] Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gln Tyr Ser Ser Gly Trp  
[0051] 65 70 75 80  
[0052] Tyr Ala Tyr Pro Phe Asp Met  
[0053] 85  
[0054] <210> 5  
[0055] <211> 12  
[0056] <212> PRT  
[0057] <213> 智人  
[0058] <400> 5  
[0059] Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala  
[0060] 1 5 10  
[0061] <210> 6  
[0062] <211> 7  
[0063] <212> PRT  
[0064] <213> 智人  
[0065] <400> 6  
[0066] Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
[0067] 1 5  
[0068] <210> 7  
[0069] <211> 8  
[0070] <212> PRT  
[0071] <213> 智人  
[0072] <400> 7  
[0073] Gln Gln Asp Gly Ala Val Phe Thr  
[0074] 1 5  
[0075] <210> 8  
[0076] <211> 74  
[0077] <212> PRT

[0078] <213> 智人

[0079] <220>

[0080] <221> LCDR1

[0081] <222> (1) .. (12)

[0082] <220>

[0083] <221> LCDR2

[0084] <222> (28) .. (34)

[0085] <220>

[0086] <221> LCDR3

[0087] <222> (67) .. (74)

[0088] <400> 8

[0089] Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln

[0090] 1 5 10 15

[0091] Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg

[0092] 20 25 30

[0093] Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

[0094] 35 40 45

[0095] Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr

[0096] 50 55 60

[0097] Tyr Cys Gln Gln Asp Gly Ala Val Phe Thr

[0098] 65 70

[0099] <210> 9

[0100] <211> 300

[0101] <212> PRT

[0102] <213> 智人

[0103] <400> 9

[0104] Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys

[0105] 1 5 10 15

[0106] Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val

[0107] 20 25 30

[0108] Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln

[0109] 35 40 45

[0110] Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu

[0111] 50 55 60

[0112] Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val

[0113] 65 70 75 80

[0114] Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys

[0115] 85 90 95

[0116] His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu

[0117]	100	105	110
[0118]	Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile		
[0119]	115	120	125
[0120]	Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr		
[0121]	130	135	140
[0122]	Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys		
[0123]	145	150	155
[0124]	Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp		
[0125]	165	170	175
[0126]	Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val		
[0127]	180	185	190
[0128]	Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu		
[0129]	195	200	205
[0130]	Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser		
[0131]	210	215	220
[0132]	Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala		
[0133]	225	230	235
[0134]	Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp		
[0135]	245	250	255
[0136]	Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln		
[0137]	260	265	270
[0138]	Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val		
[0139]	275	280	285
[0140]	Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile		
[0141]	290	295	300
[0142]	<210> 10		
[0143]	<211> 8		
[0144]	<212> PRT		
[0145]	<213> 智人		
[0146]	<400> 10		
[0147]	Gln Gln Asp Glu Ala Val Phe Thr		
[0148]	1	5	
[0149]	<210> 11		
[0150]	<211> 8		
[0151]	<212> PRT		
[0152]	<213> 智人		
[0153]	<400> 11		
[0154]	Gln Gln Asp Ser Ala Val Phe Thr		
[0155]	1	5	

[0156]	<210>	12															
[0157]	<211>	124															
[0158]	<212>	PRT															
[0159]	<213>	智人															
[0160]	<220>																
[0161]	<221>	HCDR1															
[0162]	<222>	(27) .. (37)															
[0163]	<220>																
[0164]	<221>	HCDR2															
[0165]	<222>	(52) .. (67)															
[0166]	<220>																
[0167]	<221>	HCDR3															
[0168]	<222>	(98) .. (113)															
[0169]	<400>	12															
[0170]	Gln	Leu	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	
[0171]	1				5				10					15			
[0172]	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	
[0173]					20				25				30				
[0174]	Asp	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	
[0175]					35				40				45				
[0176]	Trp	Ile	Gly	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	
[0177]					50				55				60				
[0178]	Leu	Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	
[0179]					65				70				75		80		
[0180]	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	
[0181]						85				90			95				
[0182]	Cys	Ala	Arg	Gly	Gln	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	Tyr	Ala	Tyr	Pro	Phe	Asp	
[0183]						100				105			110				
[0184]	Met	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
[0185]						115				120							
[0186]	<210>	13															
[0187]	<211>	107															
[0188]	<212>	PRT															
[0189]	<213>	智人															
[0190]	<220>																
[0191]	<221>	LCDR1															
[0192]	<222>	(24) .. (35)															
[0193]	<220>																
[0194]	<221>	LCDR2															

[0195]	<222>	(51) .. (57)		
[0196]	<220>			
[0197]	<221>	LCDR3		
[0198]	<222>	(90) .. (97)		
[0199]	<400>	13		
[0200]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
[0201]	1	5	10	15
[0202]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser			
[0203]		20	25	30
[0204]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
[0205]		35	40	45
[0206]	Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
[0207]		50	55	60
[0208]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu			
[0209]		65	70	75
[0210]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Glu Ala Val Phe			
[0211]		85	90	95
[0212]	Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[0213]		100	105	
[0214]	<210>	14		
[0215]	<211>	107		
[0216]	<212>	PRT		
[0217]	<213>	智人		
[0218]	<220>			
[0219]	<221>	LCDR1		
[0220]	<222>	(24) .. (35)		
[0221]	<220>			
[0222]	<221>	LCDR2		
[0223]	<222>	(51) .. (57)		
[0224]	<220>			
[0225]	<221>	LCDR3		
[0226]	<222>	(90) .. (97)		
[0227]	<400>	14		
[0228]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
[0229]	1	5	10	15
[0230]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser			
[0231]		20	25	30
[0232]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
[0233]		35	40	45

[0234] Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
[0235] 50 55 60  
[0236] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
[0237] 65 70 75 80  
[0238] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ser Ala Val Phe  
[0239] 85 90 95  
[0240] Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
[0241] 100 105  
[0242] <210> 15  
[0243] <211> 107  
[0244] <212> PRT  
[0245] <213> 智人  
[0246] <220>  
[0247] <221> LCDR1  
[0248] <222> (24) .. (35)  
[0249] <220>  
[0250] <221> LCDR2  
[0251] <222> (51) .. (57)  
[0252] <220>  
[0253] <221> LCDR3  
[0254] <222> (90) .. (97)  
[0255] <400> 15  
[0256] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
[0257] 1 5 10 15  
[0258] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser  
[0259] 20 25 30  
[0260] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
[0261] 35 40 45  
[0262] Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
[0263] 50 55 60  
[0264] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
[0265] 65 70 75 80  
[0266] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Gly Ala Val Phe  
[0267] 85 90 95  
[0268] Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
[0269] 100 105  
[0270] <210> 16  
[0271] <211> 74  
[0272] <212> PRT

[0273] <213> 智人  
[0274] <220>  
[0275] <221> LCDR1  
[0276] <222> (1) .. (12)  
[0277] <220>  
[0278] <221> LCDR2  
[0279] <222> (28) .. (34)  
[0280] <220>  
[0281] <221> LCDR3  
[0282] <222> (67) .. (74)  
[0283] <400> 16  
[0284] Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
[0285] 1 5 10 15  
[0286] Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg  
[0287] 20 25 30  
[0288] Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
[0289] 35 40 45  
[0290] Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr  
[0291] 50 55 60  
[0292] Tyr Cys Gln Gln Asp Glu Ala Val Phe Thr  
[0293] 65 70  
[0294] <210> 17  
[0295] <211> 74  
[0296] <212> PRT  
[0297] <213> 智人  
[0298] <220>  
[0299] <221> LCDR1  
[0300] <222> (1) .. (12)  
[0301] <220>  
[0302] <221> LCDR2  
[0303] <222> (28) .. (34)  
[0304] <220>  
[0305] <221> LCDR3  
[0306] <222> (67) .. (74)  
[0307] <400> 17  
[0308] Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
[0309] 1 5 10 15  
[0310] Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg  
[0311] 20 25 30

[0312]	Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
[0313]	35	40	45	
[0314]	Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr			
[0315]	50	55	60	
[0316]	Tyr Cys Gln Gln Asp Ser Ala Val Phe Thr			
[0317]	65	70		
[0318]	<210> 18			
[0319]	<211> 452			
[0320]	<212> PRT			
[0321]	<213> 智人			
[0322]	<400> 18			
[0323]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0324]	1 5 10 15			
[0325]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe			
[0326]	20 25 30			
[0327]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0328]	35 40 45			
[0329]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
[0330]	50 55 60			
[0331]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0332]	65 70 75 80			
[0333]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys			
[0334]	85 90 95			
[0335]	Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp			
[0336]	100 105 110			
[0337]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
[0338]	115 120 125			
[0339]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr			
[0340]	130 135 140			
[0341]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
[0342]	145 150 155 160			
[0343]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
[0344]	165 170 175			
[0345]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr			
[0346]	180 185 190			
[0347]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn			
[0348]	195 200 205			
[0349]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser			
[0350]	210 215 220			

[0351]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu			
[0352]	225	230	235	240
[0353]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
[0354]	245	250	255	
[0355]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
[0356]	260	265	270	
[0357]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
[0358]	275	280	285	
[0359]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
[0360]	290	295	300	
[0361]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
[0362]	305	310	315	320
[0363]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			
[0364]	325	330	335	
[0365]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
[0366]	340	345	350	
[0367]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
[0368]	355	360	365	
[0369]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
[0370]	370	375	380	
[0371]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
[0372]	385	390	395	400
[0373]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
[0374]	405	410	415	
[0375]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
[0376]	420	425	430	
[0377]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
[0378]	435	440	445	
[0379]	Ser Pro Gly Lys			
[0380]	450			
[0381]	<210> 19			
[0382]	<211> 214			
[0383]	<212> PRT			
[0384]	<213> 智人			
[0385]	<400> 19			
[0386]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
[0387]	1	5	10	15
[0388]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr			
[0389]	20	25	30	

[0390]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
[0391]	35	40	45	
[0392]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
[0393]	50	55	60	
[0394]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
[0395]	65	70	75	80
[0396]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro			
[0397]	85	90	95	
[0398]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
[0399]	100	105	110	
[0400]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
[0401]	115	120	125	
[0402]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
[0403]	130	135	140	
[0404]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
[0405]	145	150	155	160
[0406]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
[0407]	165	170	175	
[0408]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
[0409]	180	185	190	
[0410]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
[0411]	195	200	205	
[0412]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
[0413]	210			

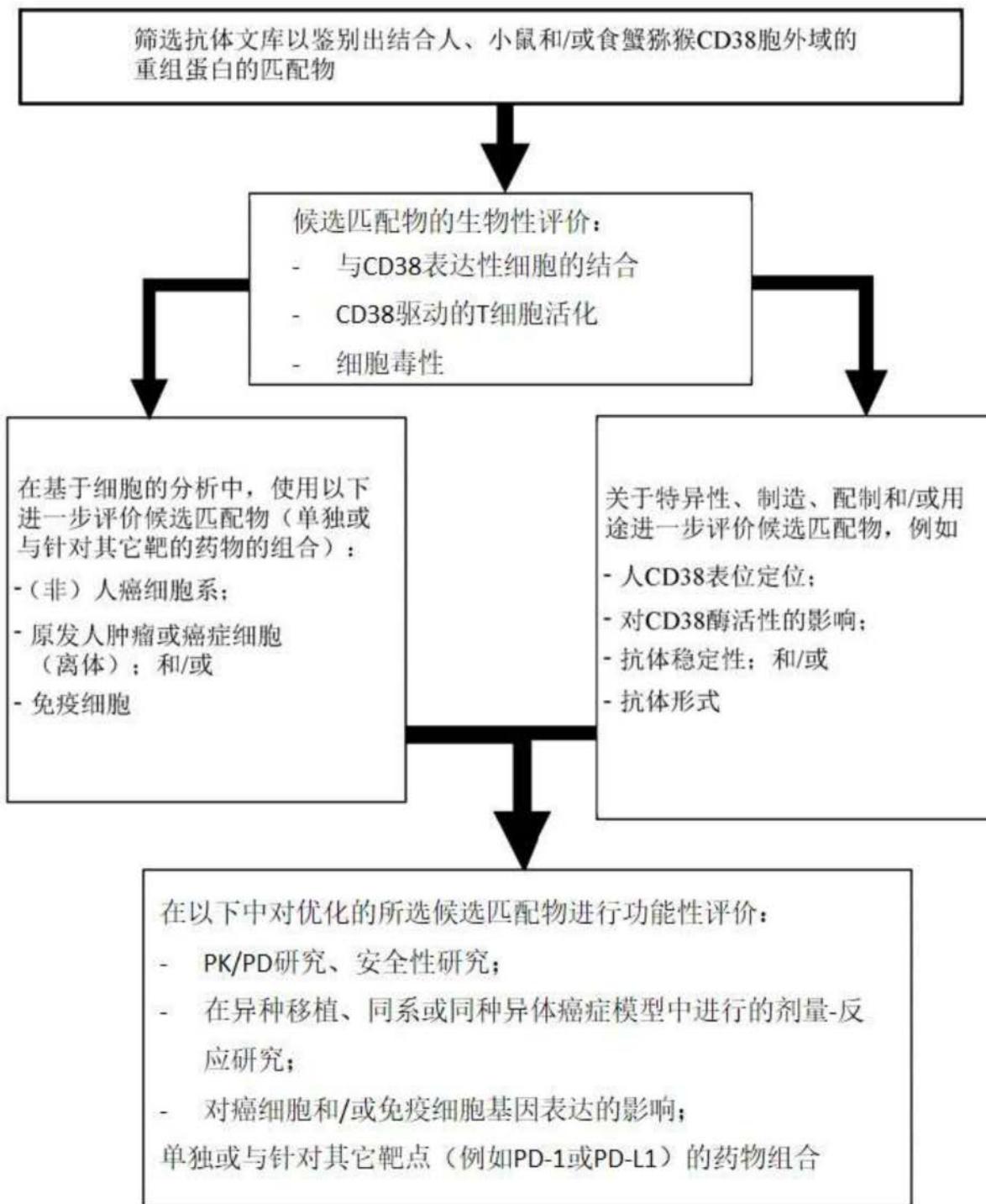


图1

A)

**CD38-b-329-HCDR1**

GSISSSDYYWG

**aCD38-b-329-HCDR2**

SIYYSGSTYYNPSLKS

**aCD38-b-329-HCDR3**

ARGQYSSGKYAYPFDM

**aCD38-b-329-HCDR123**GSISSSDYYWGIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKS  
RVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARGQYSSGKYAYPFDM**aCD38-b-329-LCDR1**

RASQSVRSSYLA

**aCD38-b-329-LCDR2**

GASSRAT

**aCD38-b-329-LCDR3**

QQDGAFT

**aCD38-b-329-LCDR123**RASQSVRSSYLA  
WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL  
EPEDFAVYYCQQDGAFT

B)

细胞质域		跨膜域		
10	20	30	40	50
MANCEFSPVS	GDKPCCRLSR	RAOLCLGVSI	LVLILVVVLA	VVMPRWRQQW
<b>aCD38-b-ep</b>				
60	70	80	90	100
SGPGTTKRFP	ETVILARCVKY	TEIHEPEMRHV	DCQSVWDAFK	GAFISKHPCN
110	120	130	140	150
ITEEDYQPLM	KLGTQTVPCN	KILLWSRIKD	LAHQFTQVQR	DMFTLEDTLL
160	170	180	190	200
GYLADDLTWC	GEFNNTSKINY	QSCPDWRKDC	SNNPVSVFWK	TVSRRFAEAA
<b>DARAep-a</b>				
210	220	230	240	250
CDVVHVMLNG	SRSKIFDKNS	TFGSVEVHNL	QPEKVOTLEA	WVIHGGREDS
<b>DARAep-b</b>				
260	270	280	290	300
RDLCQDPTIK	ELESIIISKRN	IQFSCKNIYR	PDKFLQCVKN	PEDSSCTSEI

图2

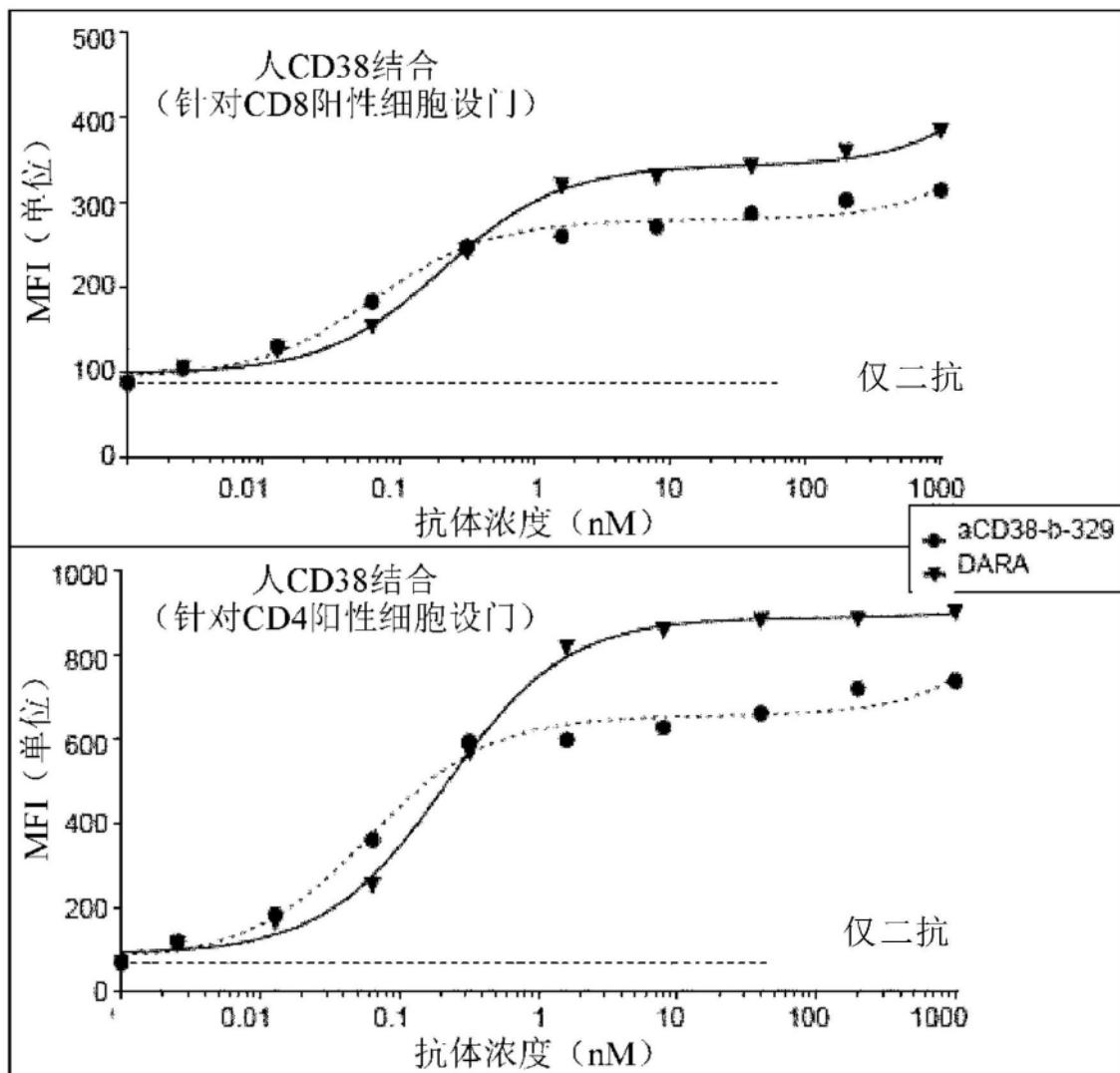
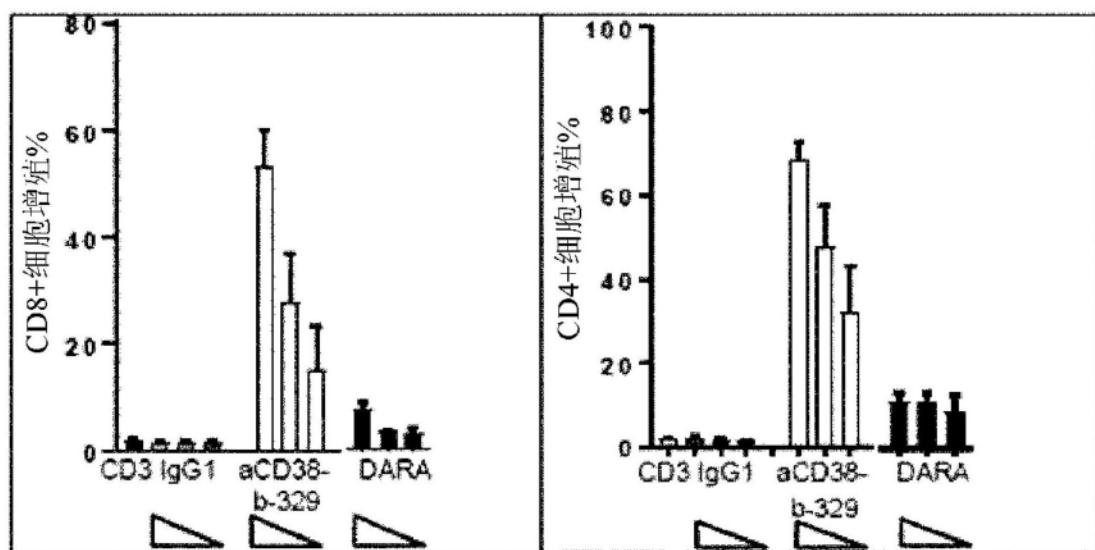


图3

A)



B)

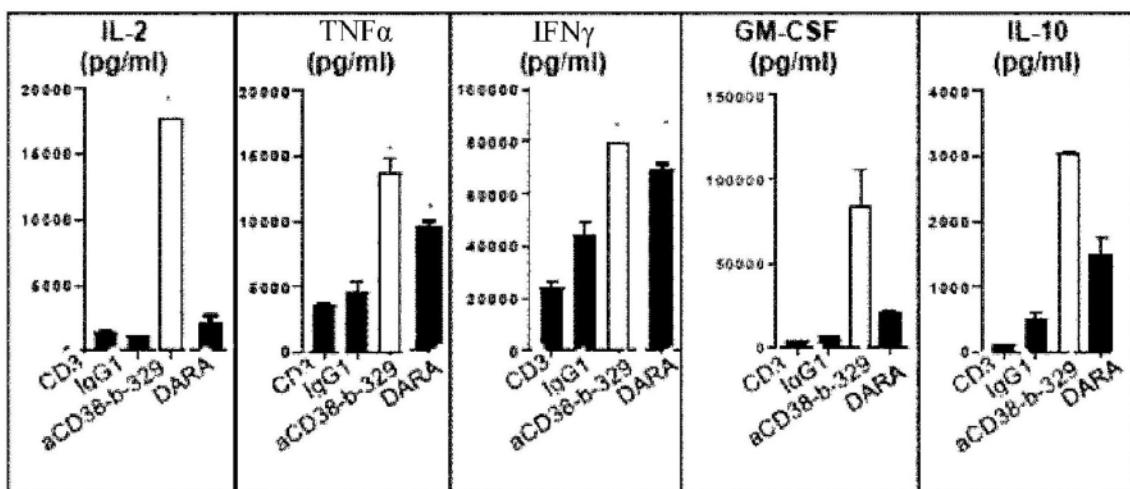
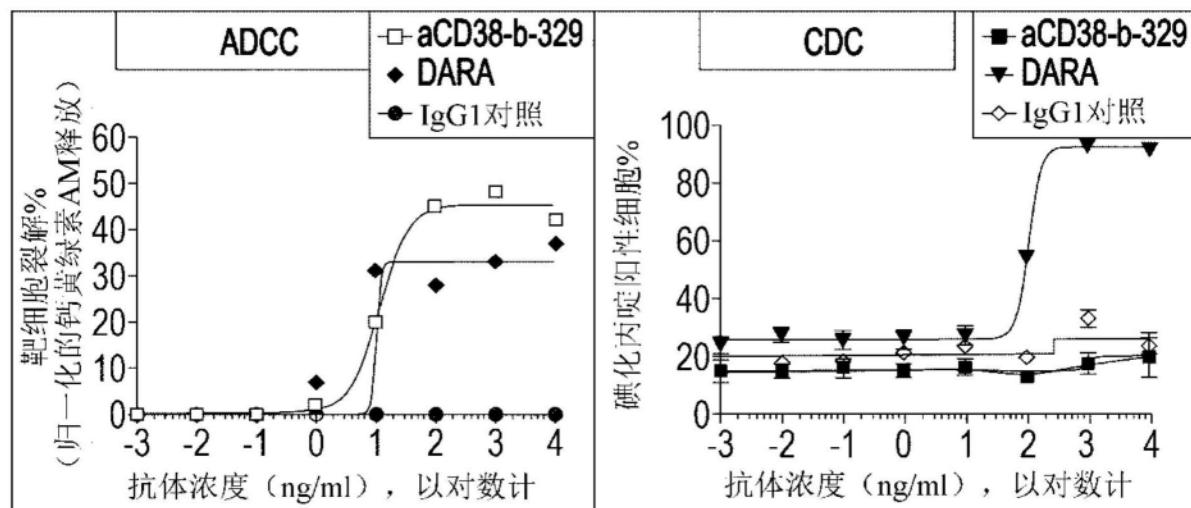


图4

A)



B)

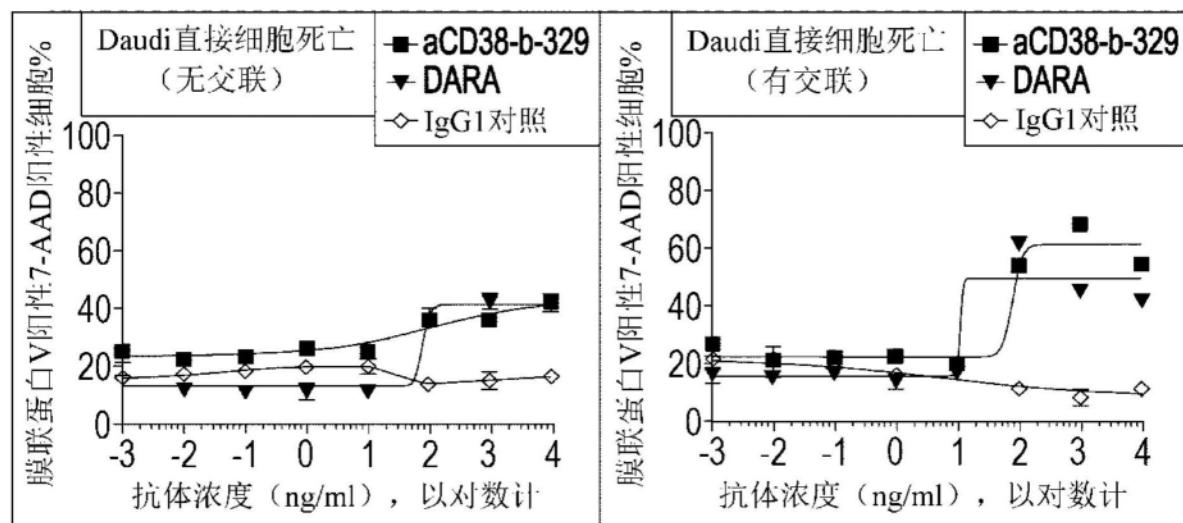
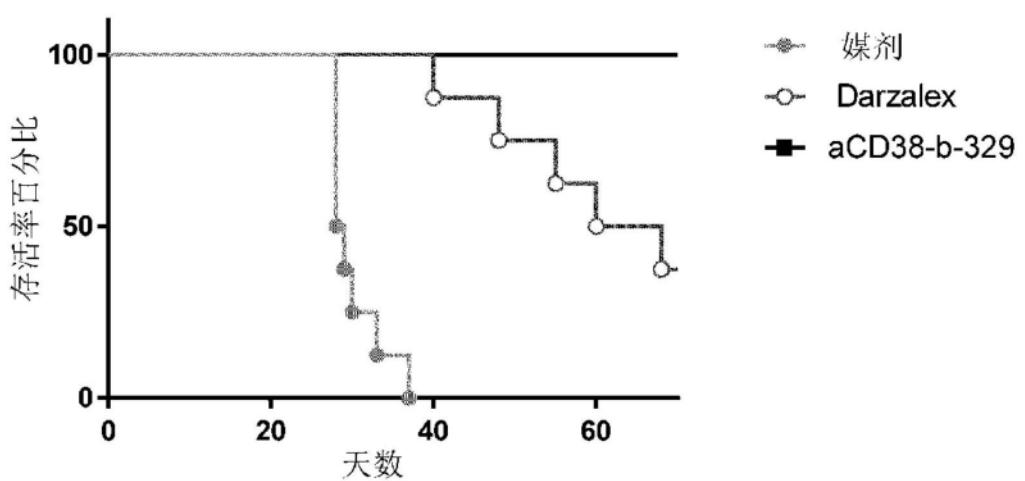


图5

A)



B)

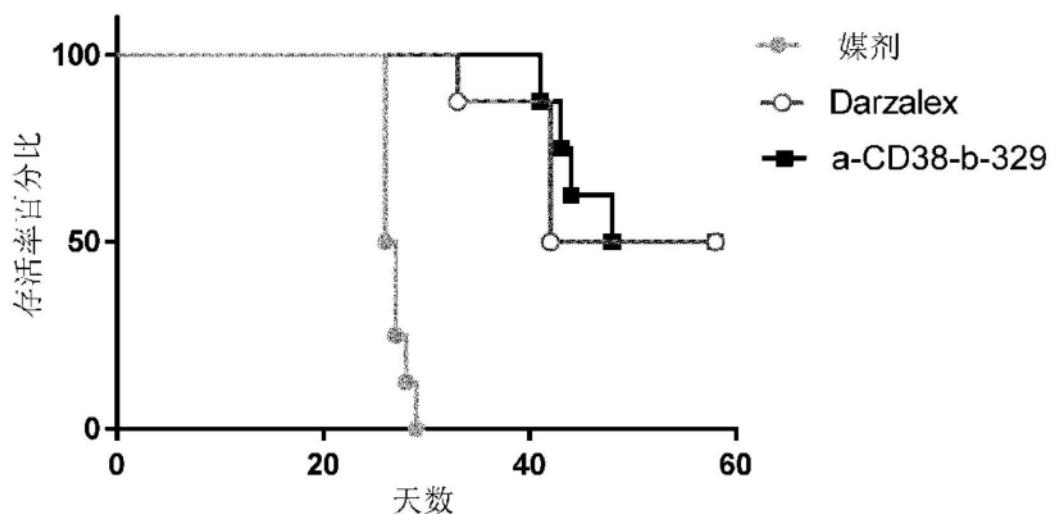


图6

A)

aCD38-b-329-m6-HCDR123:

GSISSSDYYWGIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK  
LSSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDM

aCD38-b-329-m6-LCDR123:

RASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL  
EPEDFAVYYCQQDEAVFT

B)

aCD38-b-329-m7-HCDR123:

GSISSSDYYWGIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK  
LSSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDM

aCD38-b-329-m7-LCDR123:

RASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL  
EPEDFAVYYCQQQDSAVFT

图7

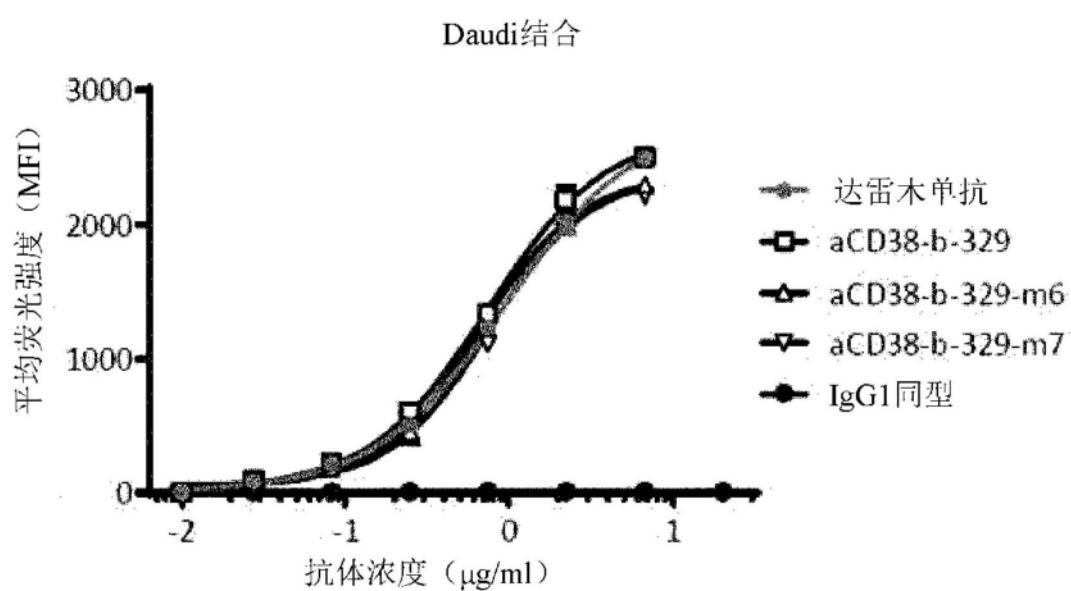
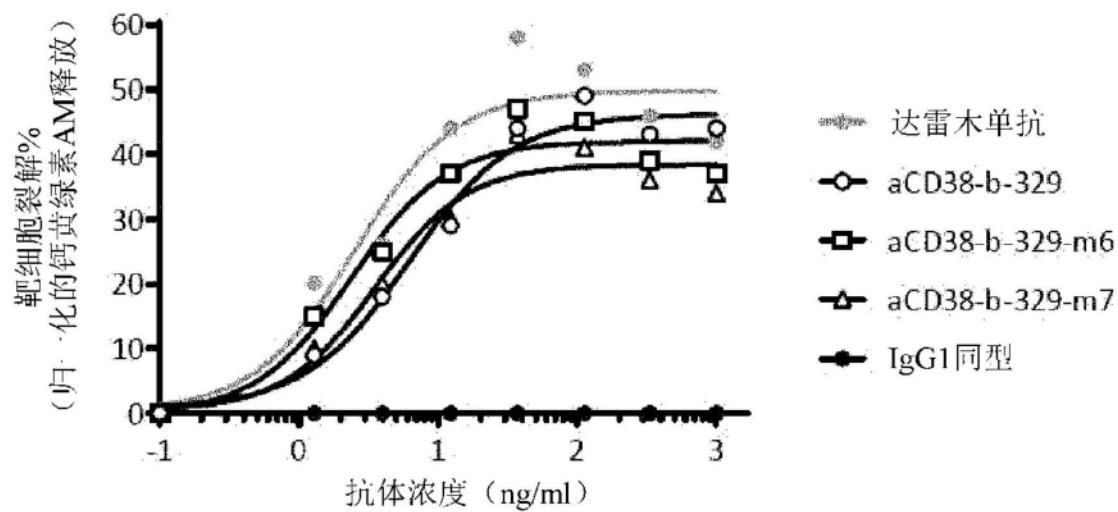
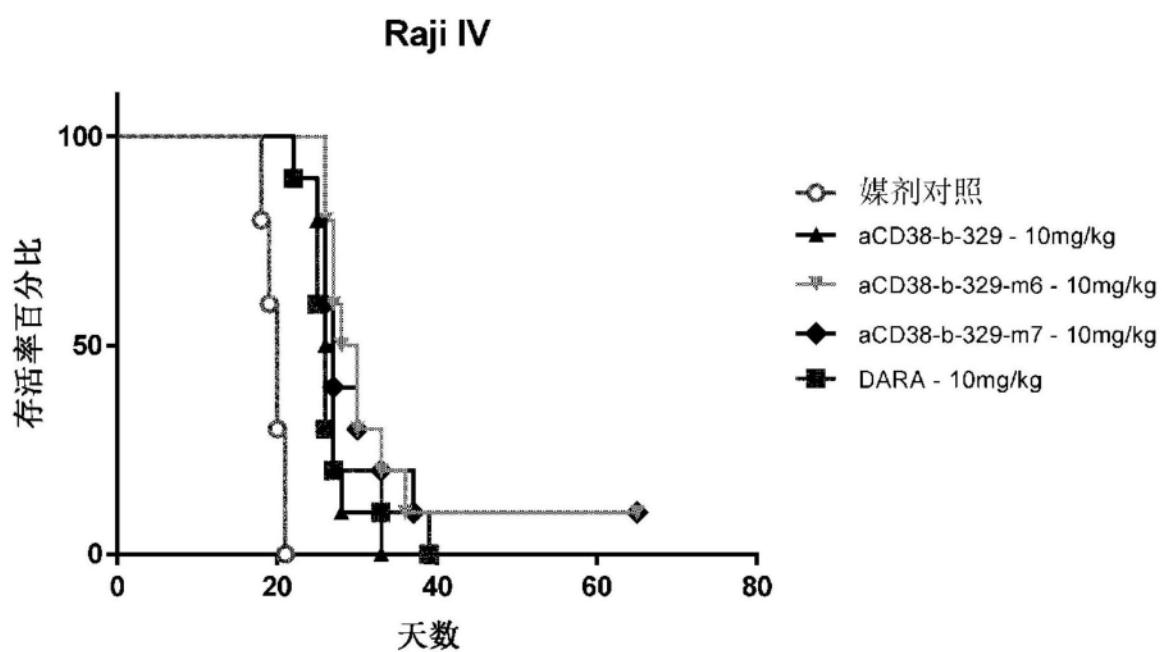


图8

Daudi ADCC 4小时钙黄绿素AM释放  
供体3627



A)



B)

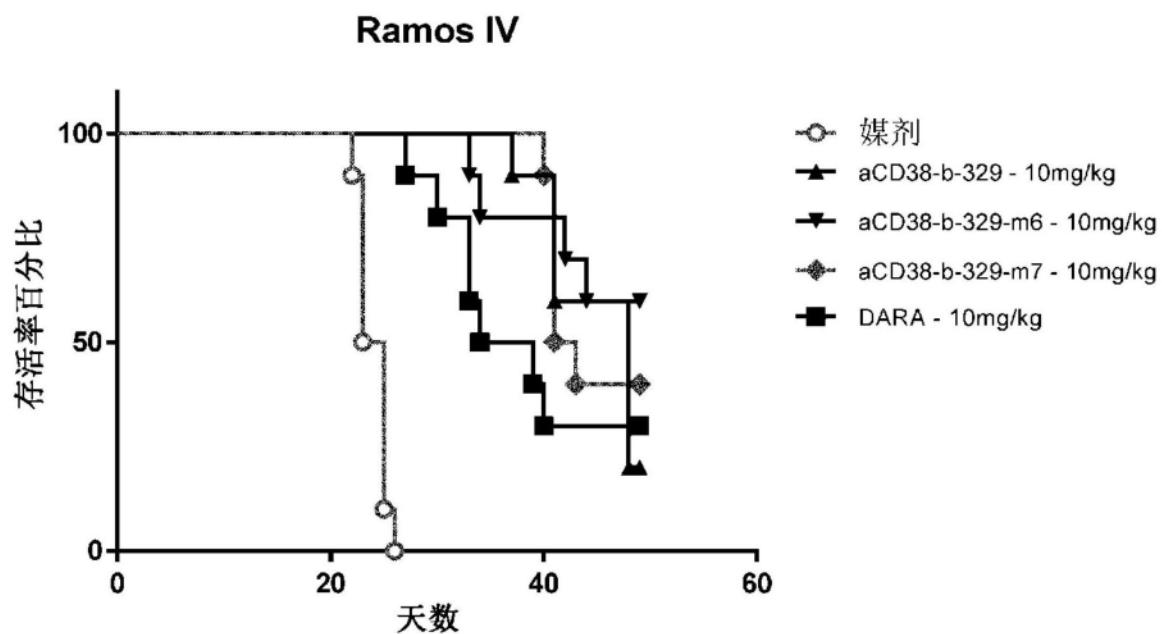
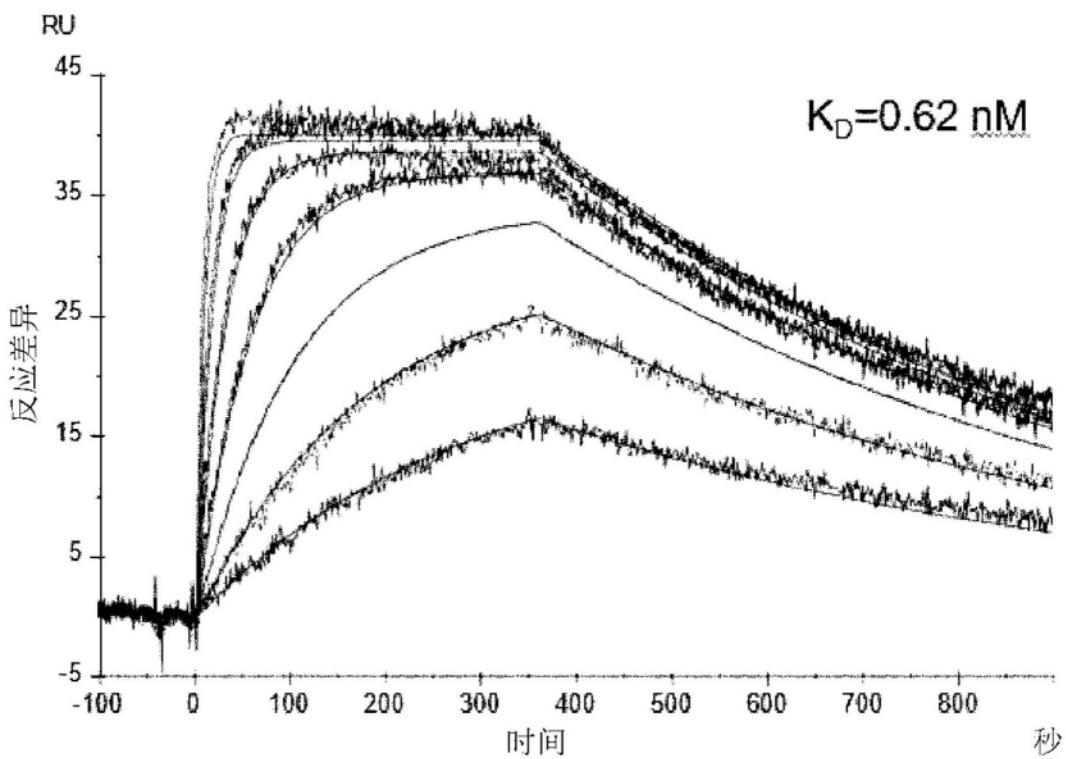


图10

A)



B)

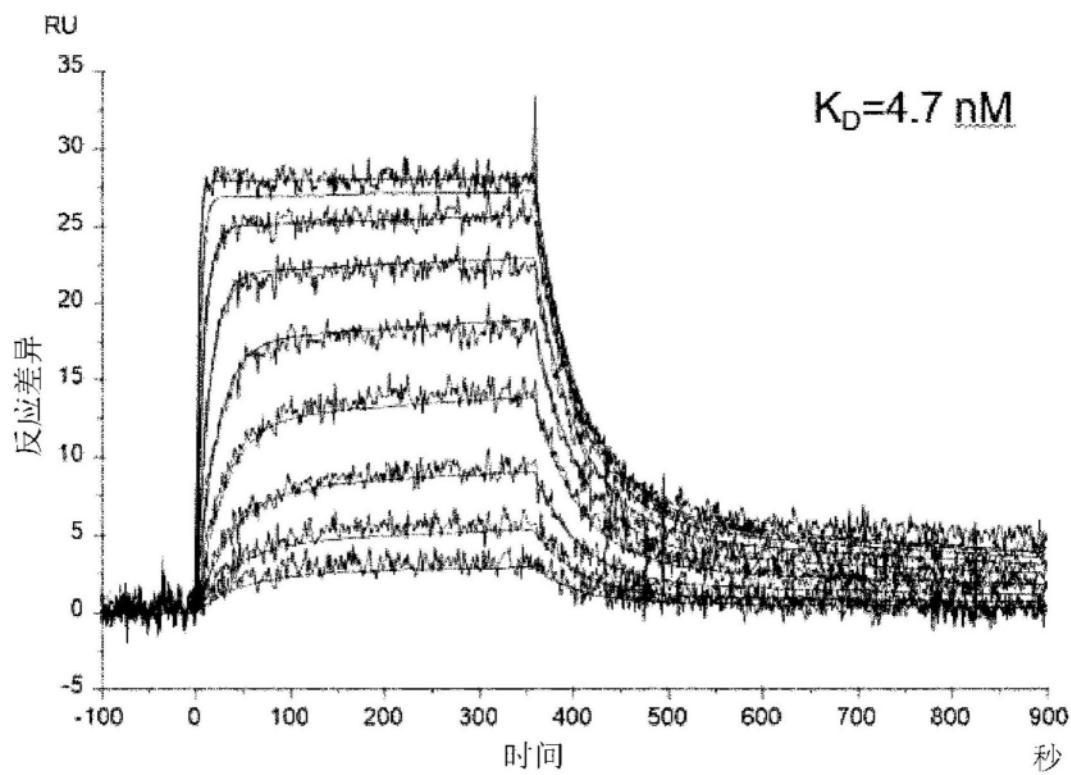


图11

C)

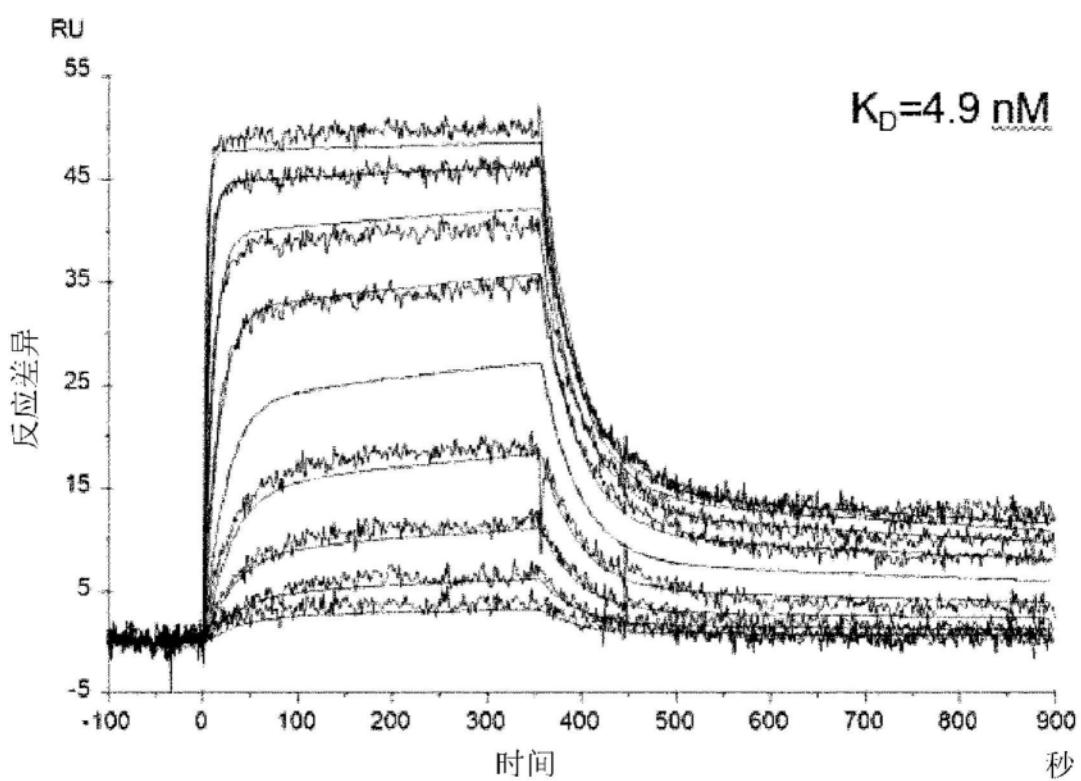


图11(续)

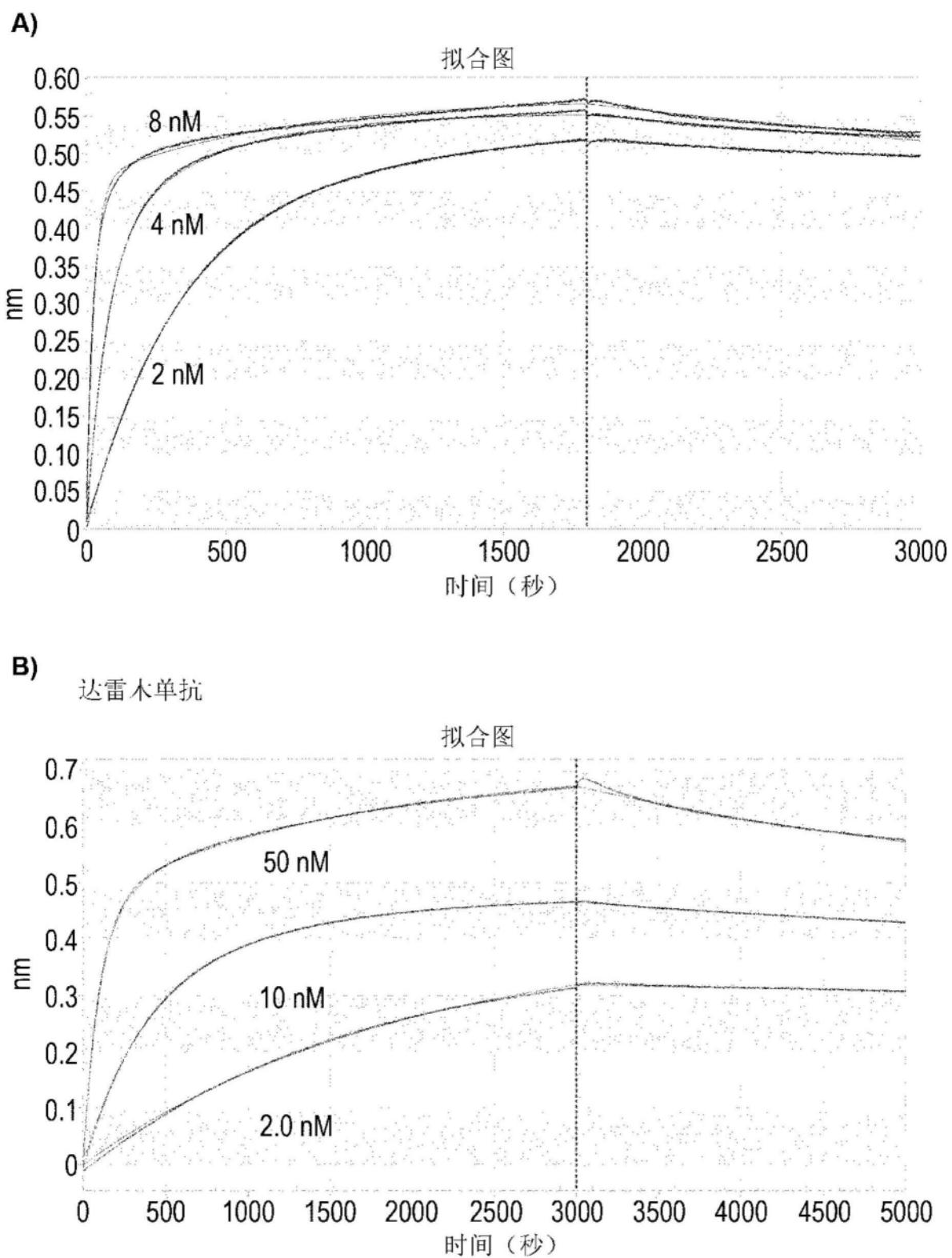


图12

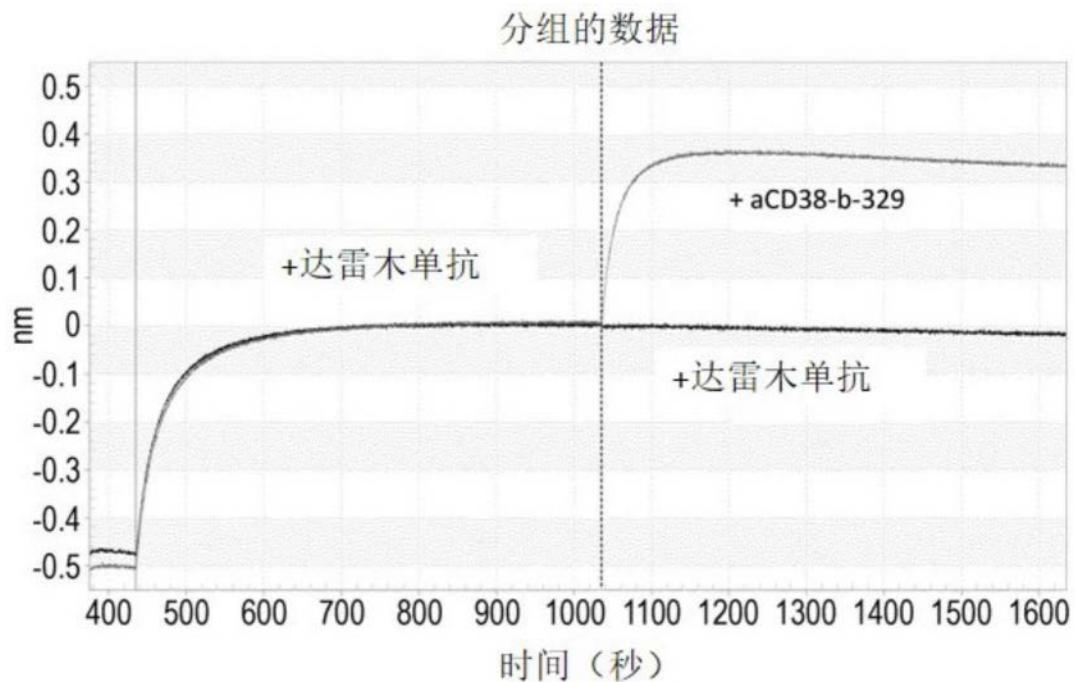


图13

在Octet Red 96仪器上关于纯化的aCD38-b-329 (IgG1) 与rhCD38-his  
标签的生物层干涉法结合分析

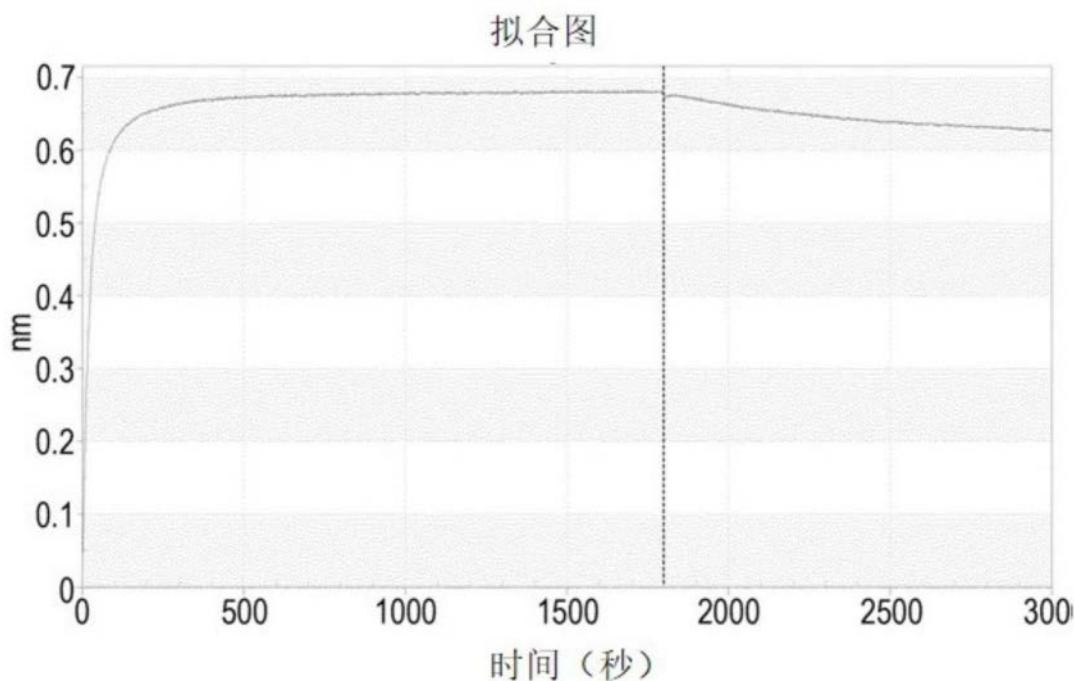


图14