



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109689690 B

(45) 授权公告日 2023.10.03

(21) 申请号 201780056511.7

(73) 专利权人 武田药品工业株式会社

(22) 申请日 2017.07.14

地址 日本大阪

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 G·史密森 J·埃斯特瓦姆
N·琼斯

申请公布号 CN 109689690 A

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

(43) 申请公布日 2019.04.26

专利代理人 傅宇昌

(30) 优先权数据

62/362,963 2016.07.15 US

(51) Int.CI.

C07K 16/28 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.14

(56) 对比文件

WO 2012/092612 A1, 2012.07.05

EP 19142422008.04.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/042128 2017.07.14

审查员 刘树柏

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/013917 EN 2018.01.18

权利要求书1页 说明书50页

序列表27页 附图18页

(54) 发明名称

用于评估对于成浆细胞和浆细胞耗竭性疗法的应答的方法和材料

(57) 摘要

本公开内容涉及抗-CD38抗体和其作为治疗剂和诊断剂的用途。本公开内容进一步涉及治疗自身免疫疾病例如系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎的方法。本公开内容进一步涉及用于鉴定具有自身免疫疾病的患者以进行治疗的诊断检定方法。

1. 抗-CD38抗体在制备用于在患者中治疗疾病的治疗剂中的用途，其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID NO:1)的抗体，所述疾病为自身免疫疾病，并且所述患者显示出在用抗-CD20抗体进行治疗之后具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平；

其中所述抗-CD38抗体包含：

a) 重链可变区，其包含：

- i) 由SEQ ID NO:3组成的第一CDR；
- ii) 由SEQ ID NO:4组成第二CDR；
- iii) 由SEQ ID NO:5组成第三CDR；和

b) 轻链可变区，其包含：

- i) 由SEQ ID NO:6组成的第一CDR；
- ii) 由SEQ ID NO:7组成第二CDR；
- iii) 由SEQ ID NO:8组成第三CDR；

其中在用抗-CD20抗体进行治疗之后从所述患者中获得的生物学样品显示出具有

i) 相对于对照受试者而言升高的表达CD38的成浆细胞和浆细胞的水平，通过对游离Ig轻链进行检定，和

ii) 相对于对照受试者而言升高的至少一种在表达CD38的细胞中富含的基因的水平，其中所述至少一种基因为CD38或IgJ，其中所述抗-CD38抗体在施用后耗竭所述成浆细胞和浆细胞；并且

其中用所述抗-CD38抗体进行治疗的患者展示出所述成浆细胞和浆细胞的剂量依赖性减少。

2. 根据权利要求1的用途，其中所述重链可变区由SEQ ID NO:9组成。

3. 根据权利要求1的用途，其中所述轻链可变区由SEQ ID NO:10组成。

4. 根据权利要求1的用途，其中所述重链可变区由SEQ ID NO:9组成，并且所述轻链可变区由SEQ ID NO:10组成。

5. 根据权利要求1的用途，其中所述重链由SEQ ID NO:21组成，并且所述轻链由SEQ ID NO:22组成。

6. 根据权利要求1的用途，其中所述抗-CD38抗体进一步包含Fc结构域。

7. 根据权利要求6的用途，其中所述Fc结构域是人的。

8. 根据权利要求6的用途，其中所述Fc结构域来自人IgG抗体。

9. 根据权利要求8的用途，其中所述IgG为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

10. 根据权利要求9的用途，其中所述IgG为IgG1。

11. 根据权利要求1的用途，其中所述抗-CD38抗体至少与SEQ ID NO:1的K121、F135、Q139、D141、E239、W241、C275、K276、F284、P291和E292相互作用。

12. 根据权利要求1的用途，其中所述自身免疫疾病选自由下列各项组成的组：类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、移植植物抗宿主病、重症肌无力、舍格伦综合征、多发性硬化和自身免疫性甲状腺炎。

13. 根据权利要求1的用途，其中所述自身免疫疾病为类风湿性关节炎。

14. 根据权利要求1的用途，其中所述自身免疫疾病为系统性红斑狼疮。

用于评估对于成浆细胞和浆细胞耗竭性疗法的应答的方法和材料

- [0001] 相关申请的交叉引用
- [0002] 根据35U.S.C. §119(e),本申请要求2016年7月15日提交的美国临时申请系列号62/362,963(其全部公开内容通过提及而合并入本文)的优先权。
- [0003] 电子提交的材料的通过提及的合并
- [0004] 与此同时提交并鉴别如下的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表以其整体通过提及而合并:2017年7月14日创建的命名为“266608SeqListing.txt,”的56千字节ACII(Text)文件。

发明领域

[0005] 本公开内容涉及抗-CD38抗体和其作为治疗剂和诊断剂的用途。本公开内容进一步涉及治疗自身免疫疾病例如系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎的方法。本公开内容进一步涉及用于鉴定具有自身免疫疾病的患者以进行治疗的诊断检定方法。

[0006] 发明背景

[0007] 浆细胞和成浆细胞是对于与系统性红斑狼疮(SLE)和类风湿性关节炎(RA)相关联的致病过程来说重要的抗体分泌性细胞(ASC)。它们已经牵涉许多由抗体驱动的自身免疫疾病,包括重症肌无力、舍格伦综合征、多发性硬化(MS)和自身免疫性甲状腺炎。参见Jacobi AM, Mei H, Hoyer BF等人, Ann Rheum Dis (2010) 69 (1) :305-8; Dörner T, Isenberg D, Jayne D等人, International Roundtable on B cells as Therapeutic Target for Intervention, Autoimmun Rev (2009) 9 (2) :82-9; Tipton CM, Fucile CF, Darce J等人, Nat Immunol (2015) 16 (7) :755-65; 和Cepok S, Rosche B, Grummel V等人, Brain (2005) 128 (Pt 7) :1667-76。成浆细胞是快速产生的终末分化性B细胞,其中大多数变成短寿的效应细胞,和少数变成长寿的浆细胞。

[0008] 大部分B细胞表达CD20,并且通过针对该细胞表面蛋白的抗体治疗剂而被有效地和持久地耗竭。参见Silverman GJ, Arthritis Rheum (2006) 54 (8) :2356-67。但是,一些B谱系细胞,例如成浆细胞和浆细胞,不表达可察觉的量的CD20,并且无法通过直接的CD20耗竭而有效地减少。参见Silverman 2006。因此,针对CD20的药物影响该细胞群体的能力被限制于耗竭可以最终分化为成浆细胞的CD20+B细胞群体,而对已经形成的成浆细胞和浆细胞具有很少的效应。参见Silverman GJ和Boyle DL, Immunol Rev (2008) 223:175-85。

[0009] 涉及SLE患者的临床研究已显示,在抗-CD20治疗之前高的成浆细胞水平与血液中的无效B细胞耗竭相关。另外,血液中成浆细胞的不完全耗竭可以具有临床后果,包括更快的复发和降低的存活。参见Vital EM, Rawstron AC, Dass S等人, Arthritis Rheum (2011) 63 (3) :603-8。对于用抗-CD20单克隆抗体进行治疗的RA患者已证明了相似的发现。参见Dass S, Rawstron AC, Vital EM等人, Arthritis Rheum (2008) 58 (10) :2993-9; 和Owczarczyk K, Lal P, Abbas AR等人, Sci Transl Med (2011) 3 (101) :101ra92。

[0010] 为了解决这些问题,已经开发了方法用于通过评价主要在这些细胞类型中表达的

mRNA转录物来间接地监测血液中的成浆细胞和浆细胞水平。参见Vital EM,Dass S,Buch MH等人,Arthritis Rheum(2011)63(10):3038-47;Streicher K,Morehouse CA,Groves CJ等人,Arthritis Rheumatol(2014)66(1):173-84;和Owczarczyk,2011。通过使用该方法,回顾性地将CD20无应答者鉴定为具有高水平的在成浆细胞和浆细胞中富含的IgJ(免疫球蛋白J链)和低水平的在CD20+非成浆细胞中表达的FCRL5(Fc受体样5蛋白)的那些患者。

[0011] 该间接方法是简单的,并且可以在大部分临床情况下使用。血液样品通过使用通常可得的样品管(例如,Paxgene管)来进行收集,并且当适当地进行贮存时,具有长期稳定性。但是,在全血中的转录物分析并不容易允许直接定量成浆细胞和浆细胞的数目,并且取决于在该细胞群体中所评价的转录物的排他性,其他细胞类型的变化可能影响结果。

[0012] 在影响B细胞的疗法之前或者作为对于影响B细胞的疗法的应答的成浆细胞和浆细胞水平的直接测量应当有助于避免该问题。但是,在静脉穿刺后成浆细胞生存力迅速下降。在使用当前的方法的情况下,监测成浆细胞水平要求当天处理,这对于在不同临床地点之间进行标准化来说是具有挑战性的。

[0013] 虽然成浆细胞和浆细胞不表达可察觉的量的CD20,但是这些细胞,连同NK细胞一起,组成性地表达高水平的CD38,正如B细胞和T细胞所做的那样,其在激活后上调CD38表达。参见Malavasi F,Deaglio S,Funaro A等人,Physiol Rev (2008) 88 (3):841-86。CD38(也称为环ADP核糖水解酶)是一种II型跨膜糖蛋白,其具有长的C-末端细胞外结构域和短的N-末端胞质结构域。CD38是一组相关的膜结合型或可溶性酶的成员,该组包括CD157和海兔属(Aplysia)ADPR环化酶。该酶家族具有将NAD转化为环ADP核糖或烟酸-腺嘌呤二核苷酸磷酸的独特能力。

[0014] 在人类中的最近研究表明,抗-CD38mAb可以耗竭多种血细胞类型,包括成浆细胞和浆细胞。

[0015] 发明简述

[0016] 当在治疗之前或期间与成浆细胞和/或浆细胞的测量相组合时,抗-CD38抗体可以用于治疗罹患类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮或其他自身免疫疾病的患者,其无法用基于CD20的疗法或者不持久地耗竭成浆细胞和/或浆细胞的其他疗法来达到疾病缓解。

[0017] 本发明的一个方面提供了在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38 (SEQ ID NO:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且所述患者显示出在用所述抗-CD38抗体进行治疗之前具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。

[0018] 本发明的另一个方面提供了在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38 (SEQ ID NO:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且所述患者显示出在用抗-CD20抗体进行治疗之后具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。

[0019] 本发明的另外一个方面提供了在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38 (SEQ ID NO:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且在用所述抗-CD38抗体进行治疗之前从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。

[0020] 本发明的一个进一步的方面提供了在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID N0:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且在用抗-CD20抗体进行治疗之后从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。

[0021] 本发明的另一个方面提供了在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID N0:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且通过对游离Ig轻链进行检定,在用所述抗-CD38抗体进行治疗之前从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的浆细胞和成浆细胞水平。

[0022] 本发明的另外一个方面提供了在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID N0:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且通过对游离Ig轻链进行检定,在用抗-CD20抗体进行治疗之后从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的浆细胞和成浆细胞水平。

[0023] 本发明的另外的一个方面提供了在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID N0:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且在用所述抗-CD38抗体进行治疗之前从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的在表达CD38的细胞中的特定mRNA或mRNA组的水平。

[0024] 本发明的一个进一步的方面提供了在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID N0:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且在用抗-CD20抗体进行治疗之后从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的总表达CD38的细胞mRNA的水平。

[0025] 本发明的另外一个方面提供了在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的第一抗-CD38抗体,其中所述第一抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID N0:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且通过流式细胞术,在用所述抗-CD38抗体进行治疗之前从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。

[0026] 本发明的另一个方面提供了在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的第一抗-CD38抗体,其中所述第一抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID N0:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且通过流式细胞术,在用抗-CD20抗体进行治疗之后从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。

[0027] 本发明的一个进一步的方面提供了用于在全血中检定表达CD38的细胞的方法,所述方法包括:

[0028] a)从受试者中获得全血样品,其中所述样品包括红细胞、白细胞和抗凝剂;

[0029] b)裂解红细胞以形成经处理的样品;

[0030] c) 在获得所述样品的大约24小时内将所述经处理的样品冷冻至大约-20℃或更低的温度以形成经冷冻的样品；

[0031] d) 在获得所述样品的大约72小时内测量在所述样品中的表达CD38的细胞的量，其中在测量表达CD38的细胞的量之前使所述经冷冻的样品升温至室温。

[0032] 在本文中提供了用于与CD38相结合的试剂和方法，以及用于通过使用CD38特异性结合试剂(包括抗-CD38抗体)来治疗CD38相关性疾病和检测CD38的方法。

[0033] 因此，在一些实施方案中，特异于人CD38 (SEQ ID N0:1) 和食蟹猴CD38 (SEQ ID N0:2) 的分离的抗体被描述用于与本发明的各个方面相联系地进行使用。在一些实施方案中，在本文中所描述的分离的抗体可以由重链可变区和轻链可变区构成，其中所述重链可变区包含三个互补决定区 (CDR)，其在本文中被描述为HCDR1、HCDR2和HCDR3，和其中所述轻链可变区包含三个CDR，其在本文中被描述为LCDR1、LCDR2和LCDR3。所述CDR的序列由下列表示：HCDR1 (SEQ ID N0:3)、HCDR2 (SEQ ID N0:4)、HCDR3 (SEQ ID N0:5)、LCDR1 (SEQ ID N0:6)、LCDR2 (SEQ ID N0:7) 和LCDR3 (SEQ ID N0:8)。

[0034] 在其他实施方案中，所述分离的抗体可以包含重链可变区，其中所述重链可变区的序列包含SEQ ID N0:9。在其他实施方案中，所述分离的抗体可以包含轻链可变区，其中所述轻链可变区的序列包含SEQ ID N0:10。在其他实施方案中，所述重链可变区包含SEQ ID N0:9，并且所述轻链可变区包含SEQ ID N0:10。

[0035] 在一些实施方案中，所述分离的抗体可以包含重链可变区，其中所述重链可变区的序列包含SEQ ID N0:21。在其他实施方案中，所述分离的抗体可以包含轻链可变区，其中所述轻链可变区的序列包含SEQ ID N0:22。在其他实施方案中，所述重链可变区包含SEQ ID N0:21，并且所述轻链可变区包含SEQ ID N0:22。重链可变区和轻链可变区的该组合被称为Ab79。在一些实施方案中，所述分离的抗体包括Fc结构域。在其他实施方案中，所述Fc结构域为人的Fc结构域。在另外其他实施方案中，所述Fc结构域为变体Fc结构域。

[0036] 在一些实施方案中，特异于人CD38 (SEQ ID N0:1) 和食蟹猴CD38 (SEQ ID N0:2) 的分离的抗体被描述用于与本发明的各个方面相联系地进行使用。在一些实施方案中，在本文中所描述的分离的抗体可以由六个CDR构成，其中该抗体的每个CDR可以与SEQ ID N0:3、SEQ ID N0:4、SEQ ID N0:5、SEQ ID N0:6、SEQ ID N0:7和SEQ ID N0:8相差0、1或2个氨基酸置换。

[0037] 在其他实施方案中，特异于人CD38 (SEQ ID N0:1) 和食蟹猴CD38 (SEQ ID N0:2) 的分离的抗体被描述用于与本发明的各个方面相联系地进行使用。在本文中所描述的分离的抗体可以由重链可变区和轻链可变区构成，其中所述重链可变区包含三个互补决定区 (CDR)，其在本文中被描述为HCDR1、HCDR2和HCDR3，和其中所述轻链可变区包含三个CDR，其在本文中被描述为LCDR1、LCDR2和LCDR3。所述CDR的序列由下列表示：HCDR1 (SEQ ID N0:13)、HCDR2 (SEQ ID N0:14)、HCDR3 (SEQ ID N0:15)、LCDR1 (SEQ ID N0:16)、LCDR2 (SEQ ID N0:17) 和LCDR3 (SEQ ID N0:18)。

[0038] 在一些实施方案中，所述分离的抗体可以包含重链可变区，其中所述重链可变区的序列包含SEQ ID N0:11。在其他实施方案中，所述分离的抗体可以包含轻链可变区，其中所述轻链可变区的序列包含SEQ ID N0:12。在一些实施方案中，所述分离的抗体可以包含重链和轻链，其中所述重链序列包含SEQ ID N0:11并且所述轻链包含SEQ ID N0:12。

[0039] 在一些实施方案中,所述分离的抗体可以包含重链可变区,其中所述重链可变区的序列包含SEQ ID NO:19。在其他实施方案中,所述分离的抗体可以包含轻链可变区,其中所述轻链可变区的序列包含SEQ ID NO:20。在一些实施方案中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:19,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:20。重链可变区和轻链可变区的该组合被称为Ab19。

[0040] 在一些实施方案中,特异于人CD38(SEQ ID NO:1)和食蟹猴CD38(SEQ ID NO:2)的分离的抗体被描述用于与本发明的各个方面相联系地进行使用。在本文中所描述的分离的抗体可以由六个CDR构成,其中该抗体的每个CDR可以与SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18相差0、1或2个氨基酸置换。

[0041] 在一些实施方案中,提供了分离的抗-CD38抗体,其特异性地与人CD38(SEQ ID NO:1)和食蟹猴CD38(SEQ ID NO:2)相结合,其中所述抗体以大约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或更大程度的KD与人CD38相结合和以大约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或更大程度的KD与食蟹猴CD38相结合。

[0042] 在一些实施方案中,提供了与Ab79和/或Ab19竞争结合人CD38和/或食蟹猴CD38的抗体。

[0043] 可以将本公开内容的方法描述为在下面的所列举的条款中任一个之中的实施方案。将会理解的是,在本文中所描述的实施方案中的任一个可以与在本文中所描述的任何其他实施方案相联系地进行使用,只要所组合的实施方案不相互矛盾。

[0044] 1. 在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID NO:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且所述患者显示出在用所述抗-CD38抗体进行治疗之前具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。

[0045] 2. 在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID NO:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且所述患者显示出在用抗-CD20抗体进行治疗之后具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。

[0046] 3. 在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID NO:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且在用所述抗-CD38抗体进行治疗之前从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。

[0047] 4. 在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID NO:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且在用抗-CD20抗体进行治疗之后从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。

[0048] 5. 在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID NO:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且通过对游离Ig轻链进行检定,在用所述抗-CD38抗体进行治疗之前从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的成浆细胞和浆细胞的水平。

[0049] 6. 在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID NO:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且通过对游离Ig轻链进行检定,在用抗-CD20抗体进行治疗之后从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。

[0050] 7. 在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID NO:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且在用所述抗-CD38抗体进行治疗之前从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的至少一种在表达CD38的细胞中富含的基因的水平。

[0051] 8. 在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的抗-CD38抗体,其中所述抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38(SEQ ID NO:1)的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且在用抗-CD20抗体进行治疗之后从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的至少一种在表达CD38的细胞中富含的基因的水平。

[0052] 9. 根据前述条款中任一项的方法,其中所述抗-CD38抗体包含:

[0053] a) 重链可变区,其包含:

[0054] i) 包含SEQ ID NO:3的第一CDR;

[0055] ii) 包含SEQ ID NO:4的第二CDR;

[0056] iii) 包含SEQ ID NO:5的第三CDR;和

[0057] b) 轻链可变区,其包含:

[0058] i) 包含SEQ ID NO:6的第一CDR;

[0059] ii) 包含SEQ ID NO:7的第二CDR;

[0060] iii) 包含SEQ ID NO:8的第三CDR。

[0061] 10. 根据条款9的方法,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:9。

[0062] 11. 根据条款9的方法,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:10。

[0063] 12. 根据条款9至11中任一项的方法,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:9,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:10。

[0064] 13. 根据条款9至11中任一项的方法,其中所述重链包含SEQ ID NO:21,并且所述轻链包含SEQ ID NO:22。

[0065] 14. 根据条款1至8中任一项的方法,其中所述抗-CD38抗体包含:

[0066] a) 重链可变区,其包含:

[0067] i) 包含SEQ ID NO:13的第一CDR;

[0068] ii) 包含SEQ ID NO:14的第二CDR;

[0069] iii) 包含SEQ ID NO:15的第三CDR;和

[0070] b) 轻链可变区,其包含:

[0071] i) 包含SEQ ID NO:16的第一CDR;

[0072] ii) 包含SEQ ID NO:17的第二CDR;

[0073] iii) 包含SEQ ID NO:18的第三CDR。

- [0074] 15.根据条款14的方法,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:11。
- [0075] 16.根据条款14的方法,其中所述轻链可变区包含SEQ ID NO:12。
- [0076] 17.根据条款14至16中任一项的方法,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:19,并且所述轻链可变区包含SEQ ID NO:20。
- [0077] 18.根据条款14至16中任一项的方法,其中所述重链包含SEQ ID NO:34,并且所述轻链包含SEQ ID NO:35。
- [0078] 19.根据条款9和14中任一项的方法,其中所述抗-CD38抗体进一步包含Fc结构域。
- [0079] 20.根据条款19的方法,其中所述Fc结构域是人的。
- [0080] 21.根据条款19的方法,其中所述Fc结构域为变体Fc结构域。
- [0081] 22.根据条款1至8中任一项的方法,其中所述抗-CD38抗体至少与SEQ ID NO:1的K121、F135、Q139、D141、E239、W241、C275、K276、F284、P291和E292相互作用。
- [0082] 23.在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的第一抗-CD38抗体,其中所述第一抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38 (SEQ ID NO:1) 的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且通过流式细胞术,在用所述抗-CD38抗体进行治疗之前从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。
- [0083] 24.在患者中治疗疾病的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的第一抗-CD38抗体,其中所述第一抗-CD38抗体为分离的特异性地结合人CD38 (SEQ ID NO:1) 的抗体,所述疾病为自身免疫疾病,并且通过流式细胞术,在用抗-CD20抗体进行治疗之后从所述患者中获得的生物学样品显示出具有相对于对照受试者而言升高的表达CD38的细胞的水平。
- [0084] 25.根据条款23和24中任一项的方法,其中用与荧光染料相缀合的第二抗-CD38抗体对所述表达CD38的细胞进行染色。
- [0085] 26.根据条款25的方法,其中所述第二抗-CD38抗体为在条款14至18中任一项之中所定义的抗体。
- [0086] 27.根据条款21至24中任一项的方法,其中所述第一抗-CD38抗体为在条款9至13中任一项之中所定义的抗体。
- [0087] 28.根据条款1至27中任一项的方法,其中所述自身免疫疾病选自由下列各项组成的组:类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、移植植物抗宿主病、重症肌无力、舍格伦综合征、多发性硬化和自身免疫性甲状腺炎。
- [0088] 29.根据条款1至27中任一项的方法,其中所述自身免疫疾病为类风湿性关节炎。
- [0089] 30.根据条款1至27中任一项的方法,其中所述自身免疫疾病为系统性红斑狼疮。
- [0090] 31.用于在全血中检定表达CD38的细胞的方法,所述方法包括:
- [0091] a)从受试者中获得全血样品,其中所述样品包括红细胞、白细胞和抗凝剂;
- [0092] b)裂解红细胞以形成经处理的样品;
- [0093] c)冷冻所述经处理的样品以形成经冷冻的样品,其中冷冻在从所述受试者中获得所述全血样品的大约24小时内发生;
- [0094] d)在获得所述样品的大约72小时内测量在所述样品中的表达CD38的细胞的量,其中在测量表达CD38的细胞的量之前使所述经冷冻的样品升温至室温。

[0095] 32. 条款31的方法,其中在测量表达CD38的细胞的量之前将所述经冷冻的样品保持在大约-20°C或更低的温度下。

[0096] 33. 根据条款1至32中任一项的方法,其中所述表达CD38的细胞为浆细胞和/或成浆细胞。

[0097] 34. 根据条款1至32中任一项的方法,其中所述表达CD38的细胞为浆细胞。

[0098] 35. 根据条款1至32中任一项的方法,其中所述表达CD38的血细胞为成浆细胞。

[0099] 通过参考下面的描述和附图,这些和其他实施方案、特征和潜在优点将会变得清晰可见。

[0100] 附图简述

[0101] 图1描绘了在淋巴谱系细胞上的CD38表达概况,其中星号指示高的CD38表达。已经在原B细胞(pro-B cells) ($CD34^+ CD19^+ CD20^-$)、经激活的B细胞($CD19^+ CD20^+$)、浆细胞($CD138^+ CD19^- CD20^-$)、经激活的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞、NKT细胞($CD3^+ CD56^+$)和NK细胞($CD56^+ CD16^+$)上鉴定到CD38表达。另外,在淋巴祖细胞($CD34^+ CD45RA^+ CD10^+ CD19^-$)上发现了CD38表达,但在淋巴干细胞上没有发现CD38表达。另外,在成熟DC和经激活的单核细胞上看到增加的CD38表达。

[0102] 图2显示了Ab79和Ab19的重链和轻链序列。

[0103] 图3描绘了人和食蟹猴CD38的序列。

[0104] 图4显示了与抗体Benchmark 1和2、Ab19和Ab79中的每一个相结合的人CD38的表位。

[0105] 图5描绘了在来自SLE患者的PMBC中的增加的CD38表达,其中使用商购可得的人CD38抗体。

[0106] 图6描绘了在按剂量给药后24小时之时在食蟹猕猴中细胞数目的百分比变化。

[0107] 图7显示了在单剂量的Ab79后耗竭的恢复。

[0108] 图8显示了在单剂量的Ab79后在所有Ig同种型的显著减少方面来自单只HuSCID小鼠的结果。

[0109] 图9与图8就在HuSCID小鼠中的Ab79耗竭活性而言是相似的,如在实施例中所描述的。

[0110] 图10描绘了在Ab79治疗后在HuSCID模型中抗破伤风应答的显著减小。

[0111] 图11再次在HuSCID模型中显示了在Ab79治疗后存活的显著增加,本质上是移植物抗宿主模型的类型。

[0112] 图12描绘了在人和小鼠PBMC中CD38抗原表达的差异,其中使用针对各自的商业抗体。

[0113] 图13显示了在炎症情景下的治疗效果,其中显示替代小鼠抗-CD38抗体从外周血中耗竭免疫细胞。

[0114] 图14显示,Ab79耗竭了血液成浆细胞($CD38^+, CD27^+$)、浆细胞($CD138^+, CD27^+$)和($CD138^+, IRF4^+$)。

[0115] 图15显示,Ab79耗竭了骨髓衍生的长寿的浆细胞($CD19^-, CD38^+, CD138^+$)。

[0116] 图16显示了样品采集、培养和实验终点。

[0117] 图17显示了通过ELISpot测量的在健康志愿者(图17a)和SLE受试者(图17b)的血液中ASC对于Ab79的敏感性。

[0118] 图18显示,Ab79减少了产生9G4(图18a)和Ro(图18b)自身抗体的ASC。

[0119] 图19显示,使用在本文中所描述的方法,通过流式细胞术分析可以在全血中检测到成浆细胞和浆细胞(CD45+,CD3-,CD19+,CD27+,CD38+)。

[0120] 图20显示了在用Ab79对健康受试者进行治疗后通过在本文中所描述的固定/冷冻方法保存的血细胞的流式细胞术分析,并且显示Ab79耗竭了成浆细胞和浆细胞。(○)安慰剂;(●)Ab79(0.03mg/kg);(▲)Ab79(0.1mg/kg);(▼)Ab79(0.3mg/kg);(■)Ab79(0.6mg/kg)。

[0121] 发明详述

[0122] 概述

[0123] CD38的细胞外结构域已显示出具有双功能酶活性,即具有ADP-核糖基环化酶以及ADP-核糖基水解酶这两种活性。因此,CD38可以催化NAD⁺至cADPR的转化(环化酶)和可以进一步将它水解为ADP-核糖(水解酶)。cADPR参与从细胞内贮备中调动出钙,其是对于细胞增殖、分化和凋亡来说重要的第二信使活性。

[0124] 已经在各种具有造血来源的疾病中记录证明了增加的CD38表达,并且已经将其描述为在慢性淋巴母细胞白血病中的负面影响标志物。此类疾病包括但不限于:多发性骨髓瘤(Jackson等人,(1988))、慢性淋巴母细胞白血病(Moribito等人,(2001);Jelinek等人,(2001);Chevalier等人,(2002);Dürig等人,(2002))、B-细胞慢性淋巴细胞白血病、急性淋巴母细胞白血病(Keyhani等人,(2000))(包括B-细胞急性淋巴细胞白血病)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、原发性全身性淀粉样变、套细胞淋巴瘤、幼淋巴细胞/早幼粒细胞白血病、急性髓性白血病(Keyhani等人,(1993))、慢性髓性白血病(Marinov等人,(1993))、滤泡型淋巴瘤、NK-细胞白血病和浆细胞白血病。如此,CD38提供了在造血系统疾病的治疗中有用的靶标。

[0125] 几种抗-CD38抗体处于用于治疗CD38-相关性癌症的临床试验中。因此,具有治疗效果和/或诊断应用的针对CD38的抗体是有用的。本发明提供了与不同的CD38的表位相结合并且结合CD38的人和食蟹猴形式两者的两个不同的抗-CD38CDR组,以及包含这些CDR的抗体。

[0126] 另外,本发明显示,抗-CD38抗体可用于诊断和/或治疗与经激活的淋巴细胞相关的炎症和/或免疫性疾病,包括特别是自身免疫性疾病。如在本文中所显示的,CD38在未成熟造血细胞中表达,在成熟细胞中下调,和在经激活的淋巴细胞和浆细胞中以高水平重表达。例如,在经激活的B细胞、浆细胞、经激活的CD4+T细胞、经激活的CD8+T细胞、NK细胞、NKT细胞、成熟树突细胞(DC)和经激活的单核细胞中看到高的CD38表达。

[0127] 本文中的发现是令人惊讶的,因为已将针对CD38的自身抗体的存在与糖尿病、慢性自身免疫性甲状腺炎和格雷夫斯病联系在一起(参见Antonelli等人,Clin.Exp.Immunol.2001 126:426-431;Mallone等人,Diabetes 50:752(2001);和Antonelli等人,J.Endocrinol.Invest.27:695-707(2004),它们全部通过提及而合并入本文)。

[0128] 因此,本发明的抗体可用于诊断和/或治疗许多疾病,包括但不限于下面所讨论的自身免疫性疾病,包括但不限于系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、炎症性肠病(IBD)和溃疡性结肠炎。

[0129] 因此,例如,可以选择具有高浆细胞含量的患者,例如展示出高浆细胞的SLE患者,以及显示出对于基于CD20的疗法无应答的RA患者。

[0130] 本发明的治疗性抗-CD38抗体与CD38阳性细胞相结合,从而导致这些细胞(例如,经激活的淋巴细胞)的耗竭,这通过多种作用机制(包括但不限于CDC、ADCC和凋亡途径)(如在本文中所概括的),从而导致自身免疫性疾病的治疗和/或改善。

[0131] 在肿瘤学临床测试中未在一些抗-CD38抗体中看到的一个优点是与食蟹猴CD38相结合的能力,因为这些灵长类可用于临床前测试,并因此可以导致按剂量给药、毒性、功效等的早期评价。

[0132] CD38蛋白

[0133] 因此,本发明提供了分离的特异性地结合人CD38蛋白(和如下面所描述的,另外地和优选地,特异性地结合灵长类CD38蛋白)的抗-CD38抗体。如在本领域中已知的,CD38存在于许多物种中。在本发明中特别有用的是与人和灵长类(特别是在临床测试中所使用的灵长类,例如食蟹猴(食蟹猕猴(*Macaca fascicularis*),在本文中有时称为“cyno”))CD38蛋白两者均结合的抗体。“人CD38”或“人CD38抗原”是指SEQ ID NO:1的蛋白质或功能性分段,例如表位,如在本文中所定义的。通常,CD38具有短的胞质内尾巴、跨膜结构域和细胞外结构域,在特别的实施方案中,本发明的抗体与CD38蛋白的细胞外部分相结合。在本文中的“食蟹猴CD38”意指SEQ ID NO:2,其与人CD38是92%同一的。

[0134] CD38的同义词包括ADP核糖基环化酶1、cADPr水解酶1、Cd38-rs1、环ADP-核糖水解酶1、1-19和NIM-R5抗原。

[0135] 在一些实施方案中,本发明的抗-CD38Ab79抗体与CD38在包括下列那些的许多氨基酸残基处相互作用:K121、F135、Q139、D141、M142、D202、V203、H205、Q236、E239、W241、S274、C275、K276、F284、C287、V288、K289、N290、P291、E292、D293。如在本文中所概括的,与这些残基相互作用的其他抗体也可用于治疗和诊断应用。

[0136] 在一些实施方案中,本发明的抗-CD38抗体任选地(和在一些情况下优选地)不与CD38家族的其他成员例如CD157相结合。例如,在本文中的优选的实施方案不与SEQ ID NO:23的人CD157(Genbank登录号NP_004325)相结合。

[0137] 抗体

[0138] 本发明提供了抗-CD38抗体,通常而言治疗性和/或诊断性抗体,如在本文中所描述的。可用于本发明的抗体可以呈现为在本文中所描述的许多形式,包括传统抗体以及抗体衍生物、片段和模拟物,如下面所描述的。基本上,本发明提供了包含在本文中所定义的6CDR组的抗体结构(包括小数目的氨基酸变化,如下面所描述的)。

[0139] 传统抗体结构单位典型地包含四聚体。每个四聚体典型地由两个相同的多肽链对组成,每个对具有一条“轻”链(典型地具有大约25kDa的分子量)和一条“重”链(典型地具有大约50-70kDa的分子量)。人轻链被分类为κ和λ轻链。重链被分类为μ、δ、γ、α或ε,并且将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。IgG具有几个亚类,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgM具有亚类,包括但不限于IgM1和IgM2。因此,在本文中所使用的“同种型”意指任何通过其恒定区的化学和抗原特征而定义的免疫球蛋白亚类。已知的人免疫球蛋白同种型为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM1、IgM2、IgD和IgE。应当理解,治疗性抗体也可以包含同种型和/或亚类的杂合体。

[0140] 每条链的氨基末端部分包括具有大约100至110个或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。在可变区中,对于重链和轻链的V结构域中的每一个来说,三个环聚集在一起以形成抗原结合位点。所述环中的每一个被称为互补性决定区(在下文中称为“CDR”),其中氨基酸序列中的变化是最显著的。“可变(的)”是指这样的事实:在抗体之间可变区的某些区段在序列方面相差很大。在可变区之内的可变性不是均匀分布的。相反,V区的组成为:具有15-30个氨基酸的被称为构架区(FR)的相对不变的序列段,其通过被称为“高变区”的具有极高可变性的更短的区域(每个长9-15个氨基酸或更长)而分隔开。

[0141] 每个VH和VL由从氨基末端至羧基末端以下列顺序布置的三个高变区(“互补性决定区”,“CDR”)和四个FR组成:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0142] 高变区通常包含来自下列的氨基酸残基:在轻链可变区中的大约氨基酸残基24-34(LCDR1;“L”表示轻链)、50-56(LCDR2)和89-97(LCDR3),以及在重链可变区中的大约31-35B(HCDR1;“H”表示重链)、50-65(HCDR2)和95-102(HCDR3)(Kabat等人,SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991));和/或形成高变环的那些残基(例如,在轻链可变区中的残基26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和91-96(LCDR3),以及在重链可变区中的26-32(HCDR1)、53-55(HCDR2)和96-101(HCDR3);Chothia和Lesk(1987)J.Mol.Biol.196:901-917)。本发明的特别的CDR描述在下面。

[0143] 在整个本说明书中,当提及在可变结构域中的残基(大约地,轻链可变区的残基1-107和重链可变区的残基1-113)时,通常使用Kabat编号系统(例如,Kabat等人,同上(1991)),其中对于Fc区使用EU编号系统。

[0144] CDR对于抗体的抗原结合位点或更特别地表位结合位点的形成做出贡献。“表位”是指与在抗体分子的可变区中的特异性抗原结合位点相互作用的决定簇,其被称为互补位。表位是分子例如氨基酸或糖侧链的集群,并且经常具有特定的结构特征,以及特定的电荷特征。单个抗原可以具有多于一个表位。例如,如在本文中所显示的,在本文中被称为“Ab19”和“Ab79”的两种不同的抗体与在CD38分子上的不同表位相结合。

[0145] 表位可以包含直接参与结合的氨基酸残基(也称为表位的免疫显性组分)和不直接参与结合的其他氨基酸残基,例如被特异地结合抗原的肽有效地阻断的氨基酸残基;换言之,所述氨基酸残基在特异地结合抗原的肽的足迹之内。

[0146] 表位可以是构象的或线性的。构象表位由来自线性多肽链的不同区段的在空间上毗连的氨基酸产生。线性表位是由在多肽链中的相邻氨基酸残基产生的表位。可以区分构象和非构象表位,因为在变性溶剂存在下,与前者的结合丧失而与后者的结合不丧失。

[0147] 典型地,表位在独特的空间构象中包括至少3个,和更经常地至少5个或8-10个氨基酸。识别相同表位的抗体可以在简单的免疫测定法(其显示出一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原的结合的能力)(例如“分箱(binning)”)中进行验证,如在实施例中所概括的。在实施例中所显示的X-射线晶体学研究已鉴定出了与本发明的抗体(包括Ab19和Ab79)和现有技术的抗体(Benchmark 1和Benchmark 2)两者均结合的氨基酸残基,如在图4中所显示的。

[0148] 在本发明中,在实施例中所概括的Ab79与CD38的许多氨基酸残基(包括K121、F135、Q139、D141、M142、E239、W241、S274、C275、K276、F284、V288、K289、N290、P291、E292和

D293) 相互作用。应当注意,这些残基在人和食蟹猕猴两者中均是相同的,除了S274在食蟹猴中实际上为F274之外。这些残基可以代表在特异性地结合抗原的肽的足迹之内的免疫显性表位和/或残基。

[0149] 在本发明中,Ab19与不同的表位(包括G91、E103、E1034、D105、Q107、M110、K111、T114、Q115、T148、V192、R194、R195、F196、A199、H228、N229、Q231、E233和K234)相结合。应当注意,这些残基在人和食蟹猕猴两者中均是相同的,除了M110在食蟹猴中为V110和A199在食蟹猴中为T199之外。

[0150] 因此,在一些实施方案中,通过在这些表位中的任一个处进行结合而与Ab79和Ab19竞争的抗体可以用于治疗自身免疫性疾病。应当注意,Ab79和Benchmark 1(BM1)具有一些重叠;因此与Ab79竞争且不是BM1的抗体可用于本发明。

[0151] 因此,本发明提供了与人和食蟹猴CD38两者均结合并且与这些残基中的至少80%、90%、95%或98%相互作用的抗体。换句话说,相互作用区域的表面积不大于这些残基的面积。

[0152] 每条链的羧基末端部分定义了恒定区,其主要负责效应子功能。Kabat等人收集了许多的重链和轻链可变区的一级序列。基于所述序列的保守程度,他们将独个一级序列分类为CDR和构架,并且制作了其列表(参见SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,第5版,NIH出版物,No.91-3242,E.A.Kabat等人;其通过提及而整体合并入本文)。

[0153] 在免疫球蛋白的IgG亚类中,在重链中存在几个免疫球蛋白结构域。在本文中的“免疫球蛋白(Ig)结构域”意指具有不同三级结构的免疫球蛋白的区域。在本发明中令人感兴趣的是重链结构域,包括恒定重链(CH)结构域和铰链结构域。在IgG抗体的情形下,IgG同种型各自具有三个CH区。因此,在IgG的情形下的“CH”结构域如下:“CH1”是指按照如在Kabat中的EU索引的位置118-220,“CH2”是指按照如在Kabat中的EU索引的位置237-340,和“CH3”是指按照如在Kabat中的EU索引的位置341-447。

[0154] 重链的Ig结构域的另一种类型为铰链区。在本文中的“铰链”或“铰链区”或“抗体铰链区”或“免疫球蛋白铰链区”意指包含在抗体的第一和第二恒定区之间的氨基酸的柔性多肽。在结构上,IgG CH1结构域在EU位置220处结束,而IgG CH2结构域在残基EU位置237处开始。因此,对于IgG,在本文中将抗体铰链定义为包括位置221(在IgG1中为D221)至236(在IgG1中为G236),其中所述编号是按照如在Kabat中的EU索引的。在一些实施方案中,例如在Fc区的情形下,包括下铰链,其中“下铰链”通常是指位置226或230。

[0155] 在本发明中特别令人感兴趣的是Fc区。在本文中所使用的“Fc”或“Fc区”或“Fc结构域”意指这样的多肽,其包含抗体的恒定区(不包括第一恒定区免疫球蛋白结构域),和在一些情况下,铰链的部分。因此,Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域,IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域,以及处于这些结构域的N-末端的柔性铰链。对于IgA和IgM,Fc可能包括J链。对于IgG,Fc结构域包含免疫球蛋白结构域C γ 2和C γ 3(C γ 2和C γ 3)以及在C γ 1(C γ 1)和C γ 2(C γ 2)之间的下铰链区。虽然Fc区的边界可能变化,但是经常将人IgG重链Fc区定义为包括残基C226或P230至其羧基末端,其中所述编号是按照如在Kabat中的EU索引的。在一些实施方案中,如下面更完全地描述的,对Fc区进行氨基酸修饰,例如以便改变与一种或多种Fc γ R受体或者与FcRn受体的结合。

[0156] 在一些实施方案中,所述抗体是全长的。在本文中的“全长抗体”意指构成抗体的

天然生物学形式的结构,包括可变区和恒定区,其包括一种或多种在本文中所概括的修饰。

[0157] 备选地,所述抗体可以是各种各样的结构,包括但不限于抗体片段、单克隆抗体、双特异性抗体、微型抗体(minibody)、结构域抗体、合成抗体(在本文中有时称为“抗体模拟物”)、嵌合抗体、人源化抗体、抗体融合物(有时称为“抗体缀合物”)和各自每一种的片段。仍然依赖...的结构

[0158] 在一个实施方案中,所述抗体为抗体片段。特别的抗体片段包括但不限于:(i) Fab 片段,其由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成;(ii) Fd 片段,其由 VH 和 CH1 结构域组成;(iii) Fv 片段,其由单个抗体的 VL 和 VH 结构域组成;(iv) dAb 片段 (Ward 等人,1989, Nature 341:544-546, 其通过提及而整体合并入本文), 其由单个可变区组成;(v) 分离的 CDR 区;(vi) F(ab')2 片段, 其是包含两个相连接的 Fab 片段的二价片段;(vii) 单链 Fv 分子 (scFv), 其中 VH 结构域和 VL 结构域通过允许这两个结构域相联合从而形成抗原结合位点的肽连接体相连接(Bird 等人,1988, Science 242:423-426; Huston 等人,1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883, 其通过提及而整体合并入本文);(viii) 双特异性单链 Fv (WO 03/11161, 其通过提及而合并入本文);和(ix) “双链抗体(diabody)”或“三链抗体(triabody)”, 其是通过基因融合而构建的多价或多特异性片段(Tomlinson 等人,2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger 等人,1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, 所有均通过提及而整体合并入本文)。

[0159] 嵌合抗体和人源化抗体

[0160] 在一些实施方案中,所述抗体可以是来自不同物种的混合物,例如嵌合抗体和/或人源化抗体。也就是说,在本发明中,可以将所述CDR组与除了在本文中通过序列而具体描述的那些之外的其他构架和恒定区一起进行使用

[0161] 通常,“嵌合抗体”和“人源化抗体”均是指组合了来自多于一个物种的区域的抗体。例如,“嵌合抗体”在传统上包含来自小鼠(或大鼠,在一些情况下)的可变区和来自人的恒定区。“人源化抗体”通常是指已经将可变结构域构架区交换为在人抗体中发现的序列的非人抗体。通常,在人源化抗体中,整个抗体(除了CDR之外)由人来源的多核苷酸编码,或者与这样的抗体相同(除了在其CDR内之外)。将CDR(其中一些或全部由源自非人生物的核酸所编码)嫁接到人抗体可变区的β-片层构架中,从而产生其特异性由所移入的CDR决定的抗体。此类抗体的产生描述在例如WO 92/11018; Jones, 1986, Nature 321:522-525; Verhoeyen 等人,1988, Science 239:1534-1536(所有均通过提及而整体合并入本文)中。为了重获在初始嫁接构建体中丧失的亲和力,常常需要将所选择的接纳者构架残基“回复突变”至相应的供者残基(US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213,所有均通过提及而整体合并入本文)。人源化抗体最佳地还将会包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区,典型地人免疫球蛋白的恒定区,并因此将会典型地包含人Fc区。人源化抗体也可以通过使用具有经基因工程改造的免疫系统的小鼠来产生。Roque 等人,2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654, 其通过提及而整体合并入本文。各种各样的用于人源化和重构非人抗体的技术和方法是本领域中熟知的(参见Tsurushita&Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), 和其中所引用的参考文献,所有均通过提及而整体合并入本文)。人源化方法包括但不限于描述在下列中的方法:Jones 等

人,1986,Nature 321:522-525;Riechmann等人,1988,Nature 332:323-329;Verhoeyen等人,1988,Science,239:1534-1536;Queen等人,1989,Proc Natl Acad Sci,USA 86:10029-33;He等人,1998,J.Immunol.160:1029-1035;Carter等人,1992,Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9;Presta等人,1997,Cancer Res.57 (20) :4593-9;Gorman等人,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:4181-4185;O'Connor等人,1998,Protein Eng 11:321-8,所有均通过提及而整体合并入本文。人源化或者其他减小非人抗体可变区的免疫原性的方法可以包括重塑表面(resurfacing)方法,其描述在例如Roguska等人,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:969-973(其通过提及而整体合并入本文)中。在一个实施方案中,亲本抗体已经是经亲和力成熟的,如本领域中已知的。可以采用基于结构的方法来进行人源化和亲和力成熟,例如如在USSN 11/004,590中所描述的。可以采用基于选择的方法来使抗体可变区人源化和/或亲和力成熟,包括但不限于描述在下列中的方法:Wu等人,1999,J.Mol.Biol.294:151-162;Baca等人,1997,J.Biol.Chem.272 (16) :10678-10684;Rosok等人,1996,J.Biol.Chem.271 (37) :22611-22618;Rader等人,1998,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:8910-8915;Krauss等人,2003,Protein Engineering 16 (10) :753-759,所有均通过提及而整体合并入本文。其他人源化方法可以涉及嫁接仅部分的CDR,包括但不限于描述在下列中的方法:USSN 09/810,510;Tan等人,2002,J.Immunol.169:1119-1125;De Pascalis等人,2002,J.Immunol.169:3076-3084,所有均通过提及而整体合并入本文。

[0162] 在一个实施方案中,本发明的抗体可以是多特异性抗体,尤其是双特异性抗体,其有时也称为“双链抗体”。这些是与两种(或更多种)不同抗原或者在相同抗原上的不同表位相结合的抗体。双链抗体可以以本领域中已知的各种方法来制造(Holliger和Winter,1993,Current Opinion Biotechnol.4:446-449,其通过提及而整体合并入本文),例如以化学方式或从杂种杂交瘤来制备。

[0163] 在一个实施方案中,所述抗体为微型抗体。微型抗体是包含与CH3结构域相连接的scFv的最小化抗体样蛋白质。Hu等人,1996,Cancer Res.56:3055-3061,其通过提及而整体合并入本文。在一些情况下,scFv可以被连接至Fc区,并且可以包括一些或整个铰链区。

[0164] 本发明的抗体通常是分离的或重组的。当用于描述在本文中所公开的各种多肽时,“分离的”意指已被鉴定并且从它所表达自的细胞或细胞培养物中分开和/或回收的多肽。一般地,分离的多肽将会通过至少一个纯化步骤来制备。“分离的抗体”是指基本上没有具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体。例如,分离的与CD38特异性地结合的抗体基本上没有特异性地结合除了CD38之外的其他抗原的抗体。

[0165] 但是,分离的与人CD38或食蟹猴CD38的表位、同工型或变体特异性地结合的抗体可以具有与其他相关抗原(例如来自其他物种的,例如CD38物种同源物)的交叉反应性。进一步地,分离的抗体可以基本上没有细胞材料和/或化学品。

[0166] 可以将具有不同特异性的分离的单克隆抗体组合在经明确定义的组合物中。因此,例如,可以将Ab79和Ab19组合在单个制剂中,如果希望。

[0167] 本发明的抗-CD38抗体特异性地结合CD38配体(例如,SEQ ID NO:1和2的人和食蟹猴CD38蛋白)。对于特定的抗原或表位,“特异性结合”或“与...特异性地结合”或“特异于”意指与非特异性相互作用可测量地不同的结合。特异性结合可以例如通过测定相比于对照

分子(其通常为不具有结合活性的有着相似结构的分子)的结合而言分子的结合来进行测量。例如,特异性结合可以通过与对照分子(其与靶标相似)的竞争来进行测定。

[0168] 对于特定抗原或表位的特异性结合可以例如通过具有下列的对于抗原或表位的KD的抗体来展示:至少大约 10^{-4} M,至少大约 10^{-5} M,至少大约 10^{-6} M,至少大约 10^{-7} M,至少大约 10^{-8} M,至少大约 10^{-9} M,备选地,至少大约 10^{-10} M,至少大约 10^{-11} M,至少大约 10^{-12} M,或更大,其中KD是指特定的抗体-抗原相互作用的解离速率。典型地,特异地结合抗原的抗体将会有相对于对照分子而言为20、50、100、500、1000、5,000、10,000或更多倍的对于所述抗原或表位的KD。

[0169] 此外,对于特定抗原或表位的特异性结合也可以例如通过具有下列的对于抗原或表位的KA或Ka的抗体来展示:对于所述表位,相对于对照而言至少20、50、100、500、1000、5,000、10,000或更多倍的,其中KA或Ka是指特定的抗体-抗原相互作用的解离速率。

[0170] 抗体修饰

[0171] 本发明进一步提供了变体抗体。即,存在许多可以对本发明的抗体进行的修饰,包括但不限于在CDR中的氨基酸修饰(亲和力成熟)、在Fc区中的氨基酸修饰、糖基化变体、其他类型的共价修饰等。

[0172] 在本文中的“变体”意指由于至少一个氨基酸修饰而不同于亲本多肽的多肽序列。氨基酸修饰可以包括置换、插入和缺失,其中前者在许多情况下是优选的。

[0173] 通常,变体可以包括任何数目的修饰,只要蛋白质的功能仍然存在,如在本文中所描述的。也就是说,在例如用Ab79或Ab19的CDR产生的氨基酸变体的情况下,所述抗体应当仍然与人和食蟹猴CD38两者均特异地结合。类似地,如果氨基酸变体用例如Fc区来产生,那么所述变体抗体应当保持对于该抗体的特定应用或适应症来说所需的受体结合功能。

[0174] 但是,通常使用1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸置换,因为目标常常是以最小数目的修饰来改变功能。在一些情况下,存在1至5个修饰,其中1-2、1-3和1-4个修饰也可用在许多实施方案中。

[0175] 应当注意,氨基酸修饰的数目可以在功能结构域之内:例如,可以希望在野生型或经改造的蛋白质的Fc区中具有1-5个修饰,以及在Fv区中具有1至5个修饰。变体多肽序列将会优选地与亲本序列(例如,关于Ab79和/或Ab19的可变区、恒定区和/或重链和轻链序列)具有至少大约80%、85%、90%、95%或者直至98或99%同一性。应当注意,取决于序列的大小,同一性百分比将会取决于氨基酸的数目。

[0176] 在本文中的“氨基酸置换”或“置换”意指将在亲本多肽序列中的特定位置处的氨基酸用另一种氨基酸进行替代。例如,置换S100A是指这样的变体多肽,其中将在位置100处的丝氨酸用丙氨酸进行替代。在本文中所使用的“氨基酸插入”或“插入”意指在亲本多肽序列中的特定位置处添加氨基酸。在本文中所使用的“氨基酸缺失”或“缺失”意指在亲本多肽序列中的特定位置处去除氨基酸。

[0177] 在本文中所使用的“亲本多肽”、“亲本蛋白质”、“前体多肽”或“前体蛋白质”意指未修饰的多肽,其后来进行修饰以产生变体。通常,在本文中的亲本多肽为Ab79和Ab19。亲本多肽可以是指多肽本身、包含亲本多肽的组合物或编码它的氨基酸序列。因此,在本文中所使用的“亲本Fc多肽”意指被修饰以产生变体的Fc多肽,并且在本文中所使用的“亲本抗体”意指被修饰以产生变体抗体的抗体。

[0178] 在本文中的“野生型”或“WT”或“天然(的)”意指在自然界中发现的氨基酸序列或核苷酸序列，包括等位基因变异。WT蛋白质、多肽、抗体、免疫球蛋白、IgG等具有未有意地进行修饰的氨基酸序列或核苷酸序列。

[0179] 在本文中的“变体Fc区”意指由于至少一个氨基酸修饰而不同于野生型Fc序列的Fc序列。Fc变体可以是指Fc多肽本身、包含Fc变体多肽的组合物或氨基酸序列。

[0180] 在一些实施方案中，在所述抗体(Ab79或Ab19)的一个或多个CDR中进行一个或多个氨基酸修饰。通常，在任何单个CDR中仅置换1或2或3个氨基酸，并且通常在CDR组中进行不多于4、5、6、7、8、9或10个变化。但是，应当意识到，在任何CDR中的无置换、1、2或3个置换的任何组合可以独立地和任选地与任何其他置换相组合。

[0181] 在一些情况下，将在CDR中的氨基酸修饰称为“亲和力成熟”。“经亲和力成熟的”抗体为在一个或多个CDR中具有一个或多个改变的抗体，其导致该抗体对于抗原的亲和力的改善，相比于不具有那些改变的亲本抗体而言。在一些情况下(虽然罕见)，可以希望降低抗体对于其抗原的亲和力，但这通常不是优选的。

[0182] 可以进行亲和力成熟以使该抗体对于抗原的结合亲和力相比于“亲本”抗体而言增加至少大约10%至50-100-150%或更多，或者1至5倍。优选的经亲和力成熟的抗体将会具有对于靶抗原的nM或甚至pM的亲和力。经亲和力成熟的抗体通过已知的程序来产生。参见例如Marks等人，1992，*Biotechnology* 10:779-783，其描述了通过可变重链(VH)和可变轻链(VL)结构域混编来进行亲和力成熟。CDR和/或构架残基的随机诱变描述在例如下列中：Barbas等人，1994，*Proc.Nat.Acad.Sci., USA* 91:3809-3813；Shier等人，1995，*Gene* 169:147-155；Yelton等人，1995，*J.Immunol.* 155:1994-2004；Jackson等人，1995，*J.Immunol.* 154(7):3310-9；和Hawkins等人，1992，*J.Mol.Biol.* 226:889-896。

[0183] 备选地，可以在本发明的抗体的一个或多个CDR中进行“沉默的”氨基酸修饰，其例如不显著地改变该抗体对于抗原的亲和力。这些可以由于许多原因而进行，包括优化表达(如可以对编码本发明的抗体的核酸来进行的)。

[0184] 因此，在本发明的CDR和抗体的定义之内包括变体CDR和抗体；即本发明的抗体可以包括在Ab79和Ab19的一个或多个CDR中的氨基酸修饰。另外，如下面所概括的，还可以在CDR之外的任何区域(包括构架区和恒定区)中独立地和任选地进行氨基酸修饰。

[0185] 在一些实施方案中，描述了特异于人CD38 (SEQ ID NO:1) 和食蟹猴CD38 (SEQ ID NO:2) 的Ab79和Ab19的变体抗体。该抗体由六个CDR构成，其中该抗体的每个CDR可以与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8相差0、1或2个氨基酸置换。在其他实施方案中，所述变体抗-CD38抗体由六个CDR构成，其中该抗体的每个CDR可以与SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18相差0、1或2个氨基酸置换。

[0186] 在一些实施方案中，本发明的抗-CD38抗体由变体Fc结构域构成。如本领域中已知的那样，抗体的Fc区与许多Fc受体和配体相互作用，从而赋予一系列称为效应子功能的重要的功能能力。这些Fc受体包括但不限于：(在人中)Fc γ RI (CD64)，包括同工型Fc γ RIa、Fc γ RIb和Fc γ RIC；Fc γ RII (CD32)，包括同工型Fc γ RIIa (包括同种异型H131和R131)、Fc γ RIIb (包括Fc γ RIIb-1和Fc γ RIIb-2) 和Fc γ RIIc；和Fc γ RIII (CD16)，包括同工型Fc γ RIIIa (包括同种异型V158和F158，其与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)相关) 和Fc γ RIIIb (包

括同种异型Fc γ RIIIb-NA1和Fc γ RIIIb-NA2)、FcRn(新生儿受体)、C1q(参与补体依赖性细胞毒性(CDC)的补体蛋白)和FcRn(参与血清半寿期的新生儿受体)。可以在一个或多个位置处进行合适的修饰,如通常所概括的那样,例如在美国专利申请11/841,654和其中所引用的参考文献、US 2004/013210、US 2005/0054832、US 2006/0024298、US 2006/0121032、US 2006/0235208、US 2007/0148170、USSN 12/341,769、美国专利号6,737,056、美国专利号7,670,600、美国专利号6,086,875(它们全部通过提及而以其整体明确地合并入本文)中,和特别地对于增加与Fc受体的结合的特殊的氨基酸置换。

[0187] 除了上面所概括的修饰外,可以进行其他修饰。例如,可以通过掺入连接VH和VL结构域的二硫桥来使所述分子稳定化(Reiter等人,1996,Nature Biotech.14:1239-1245,其通过提及而整体合并入本文)。另外,存在各种可以进行的抗体的共价修饰,如下面所概括的那样。

[0188] 抗体的共价修饰可以被包括在本发明的范围之内,并且通常(但不总是)在翻译后进行。例如,通过使抗体的特殊的氨基酸残基与能够与所选择的侧链或者N-或C-末端残基反应的有机衍生化试剂进行反应来将抗体的几种类型的共价修饰引入到所述分子中。

[0189] 最常见地,使半胱氨酸残基与 α -卤代乙酸(和相应的胺)(例如氯乙酸或氯乙酰胺)进行反应,从而给出羧甲基或羧基酰氨基甲基衍生物。也可以通过与溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基)丙酸、氯乙酰磷酸、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基2-吡啶基二硫化物、对氯汞苯甲酸、2-氯汞基-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑等进行反应使半胱氨酸残基衍生化。

[0190] 组氨酸残基通过在pH 5.5-7.0下与焦碳酸二乙酯进行反应来衍生化,因为该试剂相对地特异于组氨酸侧链。对溴苯甲酰甲基溴也是有用的;该反应优选地在处于pH 6.0的0.1M卡可酸钠中进行。

[0191] 使赖氨酸残基和氨基末端残基与琥珀酸酐或其他羧酸酐进行反应。用这些试剂进行的衍生化具有使赖氨酸残基的电荷反转的效应。其他用于使含 α -氨基的残基衍生化的合适的试剂包括:亚氨酸酯例如吡啶甲亚胺酸甲酯;磷酸吡哆醛;吡哆醛;氯氢硼化物;三硝基苯磺酸;0-甲基异脲;2,4-戊二酮;和由转氨酶催化的与乙醛酸的反应。

[0192] 精氨酸残基通过与一种或几种常规试剂(其中包括苯甲酰甲醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和茚三酮)进行反应来修饰。精氨酸残基的衍生化要求反应在碱性条件下进行,这是由于胍官能团的高pKa。此外,这些试剂可以与赖氨酸的基团以及精氨酸 ϵ -氨基基团进行反应。

[0193] 可以进行酪氨酸残基的特殊修饰,其中特别感兴趣的是通过与芳香族重氮化合物或四硝基甲烷进行反应来将光谱标记引入到酪氨酸残基中。最常见地,使用N-乙酰基咪唑和四硝基甲烷来分别形成0-乙酰基酪氨酸残基种类和3-硝基衍生物。使用 125 I或 131 I来使酪氨酸残基碘化以制备用于在放射免疫测定法中使用的经标记的蛋白质,其中上面所描述的氯胺T方法是合适的。

[0194] 通过与碳二亚胺(R'-N=C=N--R') (其中R和R'任选地为不同的烷基基团)进行反应来选择性地修饰羧基侧基团(天冬氨酸残基或谷氨酰基),所述碳二亚胺例如为1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳二亚胺或1-乙基-3-(4-氮鎓-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。此外,通过与铵离子进行反应来将天冬氨酸残基和谷氨酰基残基转化为天冬酰胺酰基和谷氨酰

胺酰基残基。

[0195] 用双官能试剂进行衍生化对于将抗体交联至水不溶性支持基质或表面以用于在各种方法(不仅仅是下面所描述的方法)中使用来说是有用的。经常使用的交联试剂包括例如1,1-双(重氮基乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯(例如与4-重氮基水杨酸的酯)、同双官能亚氨酸酯(包括二琥珀酰亚胺基酯,例如3,3'-二硫代双(琥珀酰亚胺基丙酸酯))和双官能马来酰亚胺(例如双-N-马来酰亚胺基-1,8-辛烷)。衍生化试剂例如甲基-3-[对重氮基苯基]二硫代]丙亚胺酸酯产生可光活化的中间体,其能够在光存在下形成交联。备选地,采用反应性水不溶性基质例如食蟹猴源的经溴化物活化的碳水化合物和在美国专利号3,969,287;3,691,016;4,195,128;4,247,642;4,229,537;和4,330,440(它们全部通过提及而整体合并入本文)中所描述的反应性基底用于蛋白质固定化。

[0196] 常常分别使谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基脱酰胺成相应的谷氨酰基和天冬氨酰基残基。备选地,使这些残基在略微酸性的条件下进行脱酰胺。这些残基的任何一种形式都在本发明的范围之内。

[0197] 其他修饰包括:脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸酰基或苏氨酸酰基残基的羟基基团的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基基团的甲基化(T.E.Creighton, Proteins:Structure and Molecular Properties,W.H.Freeman&Co.,San Francisco,第79-86页[1983],其通过提及而整体合并入本文),N-末端胺的乙酰化,和任何C-末端羧基基团的酰胺化。

[0198] 另外,如本领域技术人员将会意识到的,标记(包括荧光的、酶促的、磁性的、放射性的等)都可以被添加至抗体(以及本发明的其他组合物)。

[0199] 糖基化

[0200] 另一种类型的共价修饰是糖基化的改变。在另一个实施方案中,可以修饰在本文中所公开的抗体以包括一种或多种经改造的糖形。在本文中所使用的“经改造的糖形”意指共价附着至抗体的碳水化合物组合物,其中所述碳水化合物组合物在化学上不同于亲本抗体的那种。经改造的糖形对于各种目的(包括但不限于增强或降低效应子功能)可以是有用的。经改造的糖形的一个优选的形式为无岩藻糖基化,其已经显示出与ADCC功能的增加相关,据推测通过更紧密的与Fc γ RIIIa受体的结合。在该情形下,“无岩藻糖基化”意指,在宿主细胞中产生的抗体中的大多数基本上没有岩藻糖,例如90-95-98%的所产生的抗体不具有可察觉的岩藻糖作为抗体的碳水化合物部分的组分(通常附着在Fc区中的N297处)。从功能上定义,无岩藻糖基化的抗体通常至少展示出50%或更高的对于Fc γ RIIIa受体的亲和力。

[0201] 经改造的糖形可以通过本领域中已知的各种方法来产生(Umaña等人,1999,Nat Biotechnol 17:176-180; Davies等人,2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields等人,2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa等人,2003, J Biol Chem 278:3466-3473; US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1(它们全部通过提及而整体合并入本文); Potelligent®技术[BioWa, Inc., Princeton, NJ]; GlycoMAb®糖基化改造技术[Glycart Biotechnology AG, Zürich, Switzerland])。这些技术中的许多基于控制共价附着至Fc区的岩藻糖化的和/或二等分的寡糖的水平,例如通过在各种经改造或相

反的生物或细胞系(例如Lec-13CHO细胞或大鼠杂交瘤YB2/0细胞)中表达IgG,通过调节参与糖基化途径的酶(例如FUT8[α 1,6-岩藻糖基转移酶]和/或B1-4-N-乙酰葡糖胺转移酶III[GnTIII]),或者通过在表达了IgG后修饰碳水化合物。例如,Seattle Genetics的“糖改造型抗体”或“SEA技术”通过在产生期间添加抑制岩藻糖基化的经修饰的糖来起作用;参见例如20090317869,其通过提及而以其整体合并入本文。经改造的糖形典型地是指不同的碳水化合物或寡糖;因此抗体可以包括经改造的糖形。

[0202] 备选地,经改造的糖形可以是指包含不同碳水化合物或寡糖的IgG变体。如本领域中已知的,糖基化模式可以取决于该蛋白质的序列(例如,下面所讨论的特定糖基化氨基酸残基的存在或不存在)或者在其中产生该蛋白质的宿主细胞或生物这两者。特别的表达系统在下面进行讨论。

[0203] 多肽的糖基化典型地是N-联的或O-联的。N-联是指碳水化合物部分附着至天冬酰胺残基的侧链。三肽序列“天冬酰胺-X-丝氨酸”和“天冬酰胺-X-苏氨酸”(其中X为除了脯氨酸之外的任何氨基酸)为关于将碳水化合物部分酶促附着至天冬酰胺侧链的识别序列。因此,这些三肽序列中的任一个在多肽中的存在产生了潜在糖基化位点。O-联糖基化是指N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖这些糖之一附着至羟氨基酸,最常见地丝氨酸或苏氨酸,虽然也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0204] 通过改变氨基酸序列以致于它包含上面所描述的三肽序列中的一个或多个来方便地完成向抗体添加糖基化位点(对于N-联糖基化位点)。所述改变也可以通过向起始序列添加或置换为一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(对于O-联糖基化位点)。为方便起见,优选地通过在DNA水平上的变化(特别是通过在预先选择的碱基处使编码靶多肽的DNA突变以致于产生将会翻译成所希望的氨基酸的密码子)来改变抗体氨基酸序列。

[0205] 增加在抗体上的碳水化合物部分的数目的另一种手段是通过将糖昔以化学或酶促方式偶联至该蛋白质。这些程序是有利的,因为它们不要求在具有关于N-联和O-联糖基化的糖基化能力的宿主细胞中产生该蛋白质。取决于所使用的偶联方式,可以将糖附着至(a)精氨酸和组氨酸,(b)游离的羧基基团,(c)游离的巯基基团,例如半胱氨酸的那些,(d)游离的羟基基团,例如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的那些,(e)芳香族残基,例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些,或者(f)谷氨酰胺的酰胺基团。这些方法描述在WO 87/05330以及Aplin和Wriston,1981,CRC Crit.Rev.Biochem.,第259-306页中,这两者通过提及而整体合并入本文。

[0206] 在起始抗体上存在的碳水化合物部分的去除(例如,在翻译后)可以以化学方式或以酶促方式来完成。化学去糖基化要求将蛋白质暴露于化合物三氟甲磺酸或等价化合物。该处理导致除了连接糖(N-乙酰葡糖胺或N-乙酰半乳糖胺)之外的大多数或所有糖的切割,同时使多肽保持完整。化学去糖基化由Hakimuddin等人,1987,Arch.Biochem.Biophys.259:52和由Edge等人,1981,Anal.Biochem.118:131进行了描述,这两者通过提及而整体合并入本文。在多肽上的碳水化合物部分的酶促切割可以通过使用各种内切和外切糖昔酶来实现,如由Thotakura等人,1987,Meth.Enzymol.138:350(其通过提及而整体合并入本文)所描述的。在潜在糖基化位点处的糖基化可以通过使用化合物衣霉素来防止,如由Duskin等人,1982,J.Biol.Chem.257:3105(其通过提及而整体合并入本文)所描述的。衣霉素阻断蛋白质-N-糖昔键的形成。

[0207] 另一种类型的抗体的共价修饰包含将抗体与各种非蛋白质聚合物(包括但不限于各种多元醇例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯)相连接,以在例如来自Nektar Therapeutics的2005-2006PEG目录(在Nektar网站上可得),美国专利4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192或4,179,337(它们全部通过提及而整体合并入本文)中所阐述的方式。另外,如本领域中已知的,可以在抗体之内的各种位置处进行氨基酸置换以促进聚合物例如PEG的添加。参见例如,美国公开号2005/0114037A1,其通过提及而整体合并入本文。

[0208] 特殊的CDR和可变区实施方案

[0209] 本发明提供了许多抗体,每个具有特殊的CDR组(包括,如上面所概括的,一些氨基酸置换)。如上面所概括的,所述抗体可以通过6CDR组,通过可变区,或者通过全长重链和轻链(包括恒定区)来进行定义。另外,如上面所概括的,还可以进行氨基酸置换。通常,在CDR内的变化的情形下,由于CDR的相对短的长度,氨基酸修饰通常依照可以进行的氨基酸修饰数目来进行描述。虽然这也适用于可以在可变、恒定或全长序列中引入的氨基酸修饰数目的讨论(除了变化数目外),但是依照“%同一性”来定义这些变化也是适当的。因此,如在本文中所描述的,在本发明内所包括的抗体与在本文中所列出的SEQ ID NO是80%、85%、90%、95%、98%或99%同一的。

[0210] 在Ab79抗体的情形下,所述CDR组如下:重链的三个CDR包括SEQ ID NO:3(HCDR1)、SEQ ID NO:4(HCDR2)和SEQ ID NO:5(HCDR3),和轻链的三个CDR包括SEQ ID NO:6(LCDR1)、SEQ ID NO:7(LCDR2)和SEQ ID NO:8(LCDR3)。

[0211] 在Ab19的情形下,所述CDR组如下:HCDR1(SEQ ID NO:13)、HCDR2(SEQ ID NO:14)和HCDR3(SEQ ID NO:15),以及LCDR1(SEQ ID NO:16)、LCDR2(SEQ ID NO:17)和LCDR3(SEQ ID NO:18)。

[0212] 从本发明中特别排除的是SEQ ID NO:24和25(Benchmark 1的重链和轻链)以及SEQ ID NO:26和27(Benchmark 2的重链和轻链)的抗体。应当注意,这些抗体不与食蟹猴CD38发生交叉反应,如下面所讨论的。

[0213] 本发明的抗体与人和食蟹猴CD38发生交叉反应,并因此是物种交叉反应性抗体。“物种交叉反应性抗体”是这样的抗体,其所具有的对于来自第一哺乳动物物种的抗原的结合亲和力与对于来自第二哺乳动物物种的该抗原的同源物的结合亲和力几乎相同。例如可以将物种交叉反应性表示为抗体对于第一哺乳动物物种的抗原的KD与同一抗体对于来自第二哺乳动物物种的该抗原的同源物的KD的比率,其中所述比率为1.1,1.2,1.3,1.4,1.5,2,5,10,15,直至20。备选地或另外地,在当施用给第二物种时它显示出治疗或诊断功效的时候,该抗体是“物种交叉反应性的”。因此,在本情况下,本发明的抗体与食蟹猴CD38发生交叉反应,当施用给食蟹猴灵长类时显示出临床前功效,并因此被认为是交叉反应性的。

[0214] 在一些实施方案中,提供了与本发明的抗体(例如,与Ab79和/或Ab19)竞争结合人CD38和/或食蟹猴CD38的抗体,但不包括BM1或BM2。可以通过任何合适的技术来测定由两种或更多种抗-CD38抗体对于与CD38或CD38的一部分结合的竞争,如本领域中已知的。

[0215] 在本发明的情形下,竞争是指在受试化合物存在下本发明的抗体(例如,Ab79或Ab19)结合其特定结合伙伴(例如CD38)的倾向的任何可检测地显著的降低。典型地,竞争意味着在竞争者存在下本发明的抗体与CD38的结合降低至少大约10-100%,如通过标准技术

例如ELISA或**Biacore®**测定法所测量的。因此,例如,可能的是设定对于竞争的标准,其中在抗体被认为是足够竞争性的之前检测到至少大约10%的相对抑制;检测到至少大约15%的相对抑制;或检测到至少大约20%的相对抑制。在属于竞争抗体的表位紧密地位于抗原中的情况下,可以通过CD38结合的大于大约40%的相对抑制(例如,至少大约45%的抑制,例如至少大约50%的抑制,例如至少大约55%的抑制,例如至少大约60%的抑制,例如至少大约65%的抑制,例如至少大约70%的抑制,例如至少大约75%的抑制,例如至少大约80%的抑制,例如至少大约85%的抑制,例如至少大约90%的抑制,例如至少大约95%的抑制,或更高水平的相对抑制)来标明竞争。

[0216] 在一些情况下,竞争性结合测定法的组分中的一种或多种是经标记的,如下面在诊断应用的情形下所讨论的。

[0217] 它也可以是这样的情况:关于多于一种CD38表位和/或CD38的一部分,在抗-CD38抗体之间可能存在竞争,例如在CD38的特定区域的抗体结合特性保留在其片段中的情形下,例如在充分呈现的位于各种所测试的片段中的线性表位或者在足够大的CD38片段中以及在CD38中呈现的构象表位的情况下。

[0218] 评估竞争典型地涉及通过使用本发明的抗体即CD38(人的或食蟹猴的或两者)和受试分子来评价相对抑制结合。受试分子可以包括任何分子,包括其他抗体、小分子、肽等。将所述化合物以足以进行比较的量相混合,所述比较披露关于所讨论的分子相对于其他存在的分子而言的选择性和/或特异性的信息。

[0219] 可以改变受试化合物、CD38和本发明的抗体的量。例如,对于ELISA评估,需要大约5-50 μ g(例如,大约10-50 μ g,大约20-50 μ g,大约5-20 μ g,大约10-20 μ g,等等)的抗-CD38抗体和/或CD38靶标来评估竞争是否存在。条件也应当是适合于结合的。典型地,生理或近生理条件(例如,大约20-40°C的温度,大约7-8的pH,等等)适合于抗-CD38:CD38结合。

[0220] 经常地,通过比大约5%显著更大的相对抑制来标明竞争,如通过ELISA和/或FACS分析所测定的。可能希望的是,设定更高的相对抑制阈值作为在特定情形下什么是合适的选择水平的标准/决定因素(例如,当使用竞争分析来选择或筛选新的抗体时,所述新的抗体被设计成具有想要的阻断另一种与CD38相结合的肽或分子(例如,CD38的天然结合伙伴,例如CD31(也称为CD31抗原),EndoCAM,GPIIA,PECAM-1,血小板/内皮细胞黏附分子,或天然出现的抗-CD38抗体)的功能。

[0221] 在一些实施方案中,本发明的抗-CD38抗体与CD38中的一个或多个残基或区域特异性地结合,但不与其他与CD38具有同源性的蛋白质例如BST-1(骨髓基质细胞抗原-1)和Mo5(也称为CD157)交叉反应。

[0222] 典型地,交叉反应性的缺乏意味着,当在合适的检定条件下使用足够量的分子通过ELISA和/或FACS分析进行评估时,在所述分子之间的相对竞争抑制小于大约5%。

[0223] CD38活性的抑制

[0224] 所公开的抗体可用于阻断配体-受体相互作用或抑制受体组分相互作用。本发明的抗-CD38抗体可以是“阻断性的”或“中和性的”。“中和抗体”旨在是指这样的抗体,其与CD38的结合导致CD38的生物学活性(例如,其与配体相互作用的能力,酶促活性,信号传导能力,和特别地其引起经激活的淋巴细胞的能力)的抑制。CD38的生物学活性的抑制可以通过本领域中已知的几种标准体外或体内测定法中的一种或多种来进行评估(参见下面的实

施例)。

[0225] “抑制结合”或“阻断结合”(例如,当提及CD38结合伙伴与CD38的结合的抑制/阻断时)包括部分的和完全的抑制/阻断两者。CD38结合伙伴与CD38的结合的抑制/阻断可以降低或改变当CD38结合伙伴在没有抑制或阻断的情况下与CD38相结合时出现的细胞信号传导的正常水平或类型。抑制和阻断还旨在包括相比于未与抗-CD38抗体相接触的配体而言,当与抗-CD38抗体相接触时CD38结合伙伴与CD38的结合亲和力的任何可测量的降低,例如CD38结合伙伴与CD38的结合被阻断至少大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。

[0226] 所公开的抗-CD38抗体还可以抑制细胞生长。“抑制生长”包括相比于未与抗-CD38抗体相接触的相同细胞的生长而言,当与抗-CD38抗体相接触时细胞生长的任何可测量的降低,例如细胞培养物的生长被抑制至少大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。

[0227] 在一些实施方案中,所公开的抗-CD38抗体能够耗竭经激活的淋巴细胞、成浆细胞和浆细胞。在该情形下的“耗竭”意指相比于未处理的动物而言经激活的淋巴细胞和/或浆细胞的血液水平的可测量的降低(例如,如在食蟹猕猴中所测试的)。通常,看到至少大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%的耗竭。另外,如在下面在实施例中所显示的,本发明的抗体所展示的一个特别的优点是在按剂量给药后这些细胞的可恢复性;即,如对于一些治疗(例如用抗-CD20抗体)所知道的,细胞耗竭可以持续长的时间段,这引起不希望的副作用。如在本文中所显示的,对于经激活的淋巴细胞和/或浆细胞的效应是可恢复的。

[0228] 用于产生本发明的抗体的方法

[0229] 本发明进一步提供了用于产生所公开的抗-CD38抗体的方法。这些方法包括培养包含编码本发明的抗体的分离的核酸的宿主细胞。如本领域技术人员将会意识到的,这可以以各种方式来进行,取决于抗体的性质。在一些实施方案中,在本发明的抗体为例如全长传统抗体的情况下,重链可变区和轻链可变区在致使产生抗体并可以分离它的条件下。

[0230] 通常,提供编码本发明的抗体的核酸。此类多核苷酸编码重链和轻链中的每一个的可变区和恒定区,虽然根据在本文中所描述的组合物,本发明还考虑其他组合。本发明还考虑源自所公开的多核苷酸和与这些多核苷酸互补的核酸序列的寡核苷酸片段。

[0231] 所述多核苷酸可以以RNA或DNA的形式。以DNA、cDNA、基因组DNA、核酸类似物和合成DNA的形式的多核苷酸在本发明的范围之内。所述DNA可以是双链的或单链的,并且如果是单链的,可以是编码(正义)链或非编码(反义)链。编码该多肽的编码序列可以与在本文中所提供的编码序列相同,或者可以是不同的编码序列,所述序列由于遗传密码的丰余性或简并性而编码与在本文中所提供的DNA相同的多肽。

[0232] 在一些实施方案中,将编码本发明的抗体的核酸掺入到表达载体中,所述表达载体可以是染色体外的或者被设计成整合到它被引入其中的宿主细胞的基因组中。表达载体可以包含任何数目的合适的调控序列(包括但不限于,转录和翻译控制序列、启动子、核糖体结合位点、增强子、复制起点等)或其他组分(选择基因等),所有这些是可操作地连接的,如本领域中熟知的。在一些情况下,使用两种核酸,并且将每一种放入不同的表达载体中(例如,重链在第一表达载体中,轻链在第二表达载体中),或者备选地,可以将它们放入相

同的表达载体中。本领域技术人员将会意识到,表达载体的设计(包括调控序列的选择)可以取决于诸如宿主细胞的选择、所希望的蛋白质的表达水平等的因素。

[0233] 通常,可以通过使用任何适合于所选择的宿主细胞的方法(例如转化、转染、电穿孔、感染)来将所述核酸和/或表达载体引入到合适的宿主细胞中以产生重组宿主细胞,从而使得所述核酸分子可操作地连接至一个或多个表达控制元件(例如,在载体中,在通过在细胞中的过程所产生的构建体中,整合到宿主细胞基因组中)。可以将所得的重组宿主细胞维持在适合于表达的条件下(例如,在诱导物存在下,在合适的非人动物中,在补充有合适的盐、生长因子、抗生素、营养补充物等的合适的培养基中),由此产生所编码的多肽。在一些情况下,在一个细胞中产生重链,而在另一个细胞中产生轻链。

[0234] 作为用于表达的宿主可得的哺乳动物细胞系是本领域中已知的并且包括许多从美国典型培养物保藏中心(ATCC),Manassas,VA可得的永生化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HEK293细胞、NS0细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、猴肾细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如,Hep G2)和许多其他细胞系。非哺乳动物细胞(包括但不限于细菌、酵母、昆虫和植物)也可以用于表达重组抗体。在一些实施方案中,所述抗体可以在转基因动物例如牛或鸡中产生。

[0235] 用于抗体分子生物学、表达、纯化和筛选的一般性方法描述在例如下列中:Antibody Engineering,由Kontermann&Dubel编辑的,Springer,Heidelberg,2001和2010; Hayhurst&Georgiou,2001,Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard&Georgiou,2000,Annu Rev Biomed Eng 2:339-76; 和Morrison,S.(1985)Science 229:1202。

[0236] 应用和适应症

[0237] 一旦制备,本发明的抗体就可用于各种各样的应用中,包括CD38-相关疾病的诊断以及其治疗。

[0238] CD38-相关状况

[0239] 在一个方面,本发明提供了诊断和治疗与炎症和免疫疾病相关联的状况,特别是与经激活的淋巴细胞相关联的疾病的方法。如在本文中所显示的,CD38在未成熟造血细胞中表达,在成熟细胞中下调,和在经激活的淋巴细胞和浆细胞中以高水平重表达。例如,在经激活的B细胞、浆细胞、经激活的CD4+T细胞、经激活的CD8+T细胞、NK细胞、NKT细胞、成熟树突细胞(DC)和经激活的单核细胞中看到高的CD38表达。

[0240] 本发明的治疗性抗-CD38抗体与CD38阳性细胞相结合,从而导致这些细胞(例如,经激活的淋巴细胞)的耗竭,这通过多种作用机制(包括CDC和ADCC途径两者)。

[0241] 因此,任何展示出增加的CD38表达或增加的表达CD38的细胞的数目(作为该疾病的组分)的自身免疫疾病可以通过使用本发明的抗体来进行治疗。这些包括但不限于:同种异体胰岛移植物排斥、斑秃、强直性脊椎炎、抗磷脂综合征、自身免疫性艾迪生病、抗嗜中性白细胞胞质自身抗体(ANCA)、肾上腺的自身免疫疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性心肌炎、自身免疫性中性白细胞减少症、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少症、自身免疫性荨麻疹、贝赫切特病、大疱性类天疱疮、心肌病、卡斯尔曼综合征、乳糜泻-皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、丘-斯综合征、瘢痕性类天疱疮、CREST综合征、冷凝集素病、克罗恩病、皮肌炎、盘状狼疮、特发性混合性冷球蛋白血症、凝血因子VIII缺乏、纤维肌痛-纤维肌炎、肾小球肾炎、格

雷夫斯病、吉-巴综合症、古德帕斯丘综合症、移植物抗宿主病(GVHD)、桥本甲状腺炎、血友病A、特发性肺纤维化、特发性血小板减小性紫癜(ITP)、IgA神经病、IgM多发性神经病、免疫介导的血小板减少症、幼年关节炎、川崎病、扁平苔藓、红斑狼疮、梅尼埃病、混合性结缔组织病、多发性硬化、1型糖尿病、重症肌无力、寻常性天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺综合征、风湿性多肌痛、多发性肌炎和皮肌炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病关节炎、雷诺现象、赖特尔综合征、类风湿性关节炎、结节病、硬皮病、舍格伦综合征、实体器官移植排斥、僵人综合征、系统性红斑狼疮、高安动脉炎、颤动脉炎/巨细胞动脉炎、血栓性血小板减少性紫癜、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎例如疱疹样皮炎血管炎、白斑和韦格纳肉芽肿病。

[0242] 在一些实施方案中，特别有用的是将本发明的抗体用于在诊断和/或治疗许多疾病(包括但不限于，自身免疫疾病，包括但不限于系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、炎症性肠病(IBD)、溃疡性结肠炎和移植物抗宿主病)中使用。

[0243] 因此，例如，可以选择具有高浆细胞含量的患者，例如展示出高浆细胞的SLE患者，以及显示出对于基于CD20的疗法无应答的RA患者。

[0244] 本领域中已知，某些状况与表达CD38的细胞相关联，而某些状况与在细胞表面上CD38的过表达、高密度表达或上调的表达相关联。细胞群体是否表达CD38可以通过本领域中已知的方法来测定，例如在给定群体中被特异地结合CD38的抗体标记的细胞的百分比的流式细胞术测定或者免疫组织化学测定法，如下面对于诊断应用所概括性地描述的。例如，其中在大约10-30%的细胞中检测到CD38表达的细胞群体可以被认为具有关于CD38的弱阳性；而其中在大于大约30%的细胞中检测到CD38表达的细胞群体可以被认为具有关于CD38的明确阳性(如在Jackson等人，(1988)，Clin. Exp. Immunol. 72:351-356中那样)，虽然可以使用其他标准来确定细胞群体是否表达CD38。在细胞表面上的表达密度可以通过使用本领域中已知的方法来测定，例如已经通过使用特异地结合CD38的抗体进行了荧光标记的细胞的平均荧光强度的流式细胞术测量。

[0245] 用于体内施用的抗体组合物

[0246] 通过将具有所希望的纯度的抗体与任选的在药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.Ed.[1980])相混合，以冻干制剂或水溶液的形式来制备根据本发明所使用的抗体的制剂以用于储存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂是在所采用的剂量和浓度下对于接受者无毒性的，并且包括缓冲液，例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂(例如，氯化十八烷基二甲基苄基铵；六甲氯铵；苯扎氯铵，苄索氯铵；苯酚，丁醇或苄醇；对羟基苯甲酸烷基酯，例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；儿茶酚；雷琐酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚)；低分子量(少于大约10个残基)多肽；蛋白质，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，例如EDTA；糖类，例如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐抗衡离子，例如钠；金属络合物(例如，Zn-蛋白质络合物)；和/或非离子型表面活性剂，例如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0247] 在本文中的制剂还可以包含多于一种对于正进行治疗的特定适应症来说必需的

活性化合物，优选地具有不会不利地相互影响的互补活性的那些。例如，可以希望的是提供具有其他特异性的抗体。备选地，或另外地，所述组合物可以包含细胞毒性试剂、细胞因子、生长抑制试剂和/或小分子拮抗剂。此类分子合适地以对于所想要的目的来说有效的量相组合地存在。

[0248] 也可以将活性成分包载在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如，分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)胶微囊)中，包载在胶体药物递送系统(例如，脂质体、白蛋白微球、微乳状液、纳米颗粒和纳米胶囊)中，或者包载在粗滴乳状液中。此类技术公开在Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, 0sol, A.Ed. (1980) 中。

[0249] 待用于体内施用的制剂应当是无菌的或几乎是无菌的。这经由通过无菌过滤膜的过滤而容易地实现。

[0250] 可以制备持续释放制备物。持续释放制备物的合适的例子包括包含所述抗体的固体疏水性聚合物的半渗透性基质，所述基质以成形制品(例如薄膜或微胶囊)的形式。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如，聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和L-谷氨酸- γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物例如LUPRON DEPOTTM(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙立德组成的可注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物例如乙烯乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸使得分子的释放能够超过100天，但是某些水凝胶释放蛋白质的时间段较短。

[0251] 当经包囊的抗体长时间留在身体中时，它们可以由于在37°C下暴露于水分而变性或聚集，这导致生物学活性的丧失和免疫原性的可能变化。可以取决于所涉及的机制来设想出合理的策略以用于稳定化。例如，如果发现聚集机制为通过硫-二硫化物互换的分子间S-S键形成，那么稳定化可以通过修饰巯基残基、从酸性溶液进行冻干、控制水分含量、使用合适的添加剂和开发特殊的聚合物基质组合物来实现。

[0252] 施用样式

[0253] 按照已知的方法，例如以推注方式或通过在一段时间内的连续输注的静脉内施用，通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径，将本发明的抗体施用给患者。所述抗体的静脉内或皮下施用是优选的。

[0254] 治疗样式

[0255] 在本发明的方法中，使用疗法来提供关于疾病或状况的正的治疗应答。“正的治疗应答”意指疾病或状况的改善，和/或与所述疾病或状况相关联的症状的改善。例如，正的治疗应答将会是指疾病的下列改善中的一项或多项：(1) 贼生性细胞数目的减少；(2) 贼生性细胞死亡的增加；(3) 贼生性细胞存活的抑制；(5) 肿瘤生长的抑制(即，在一定程度上放慢，优选地停止)；(6) 患者存活率增加；和(7) 与所述疾病或状况相关联的一个或多个症状的一些缓解。

[0256] 在任何给定疾病或状况中的正的治疗应答可以通过对于那种疾病或状况来说特异的标准化应答标准来测定。可以通过使用筛选技术例如磁共振成像(MRI)扫描、X-射线摄影成像、计算机辅助体层摄影(CT)扫描、骨扫描成像、内窥镜检查术和肿瘤活组织检查取样(包括骨髓抽吸(BMA)和循环中的肿瘤细胞的计数)，就肿瘤形态学(即，总肿瘤负荷、肿瘤大

小等)的变化来评估肿瘤应答。

[0257] 除了这些正的治疗应答外,经历疗法的受试者可以体验到与所述疾病相关联的症状的改善的有益效果。

[0258] 因此,对于B细胞肿瘤,所述受试者可以体验到所谓的B症状(即盗汗、发热、体重减轻和/或荨麻疹)的减少。对于恶化前状况,用抗-CD38治疗试剂进行的疗法可以在发展出相关的恶性状况(例如,在罹患意义未定的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)的受试者中发展出多发性骨髓瘤)之前阻滞和/或拖延时间。

[0259] 疾病的改善可以被表征为完全应答。“完全应答”意指不存在临可检测的疾病,其中具有任何先前异常的放射摄影术研究、骨髓和脑脊液(CSF)或者异常的单克隆蛋白质(在骨髓瘤的情况下)的正常化。

[0260] 在按照本发明的方法进行治疗后,这样的应答可以持续至少4至8周,或者有时6至8周。备选地,疾病的改善可以被归类为部分应答。“部分应答”意指在新损伤不存在下所有可测量的肿瘤负荷(即,在受试者中存在的恶性细胞的数目,或所测得的肿瘤块的体积,或异常单克隆蛋白质的量)的至少大约50%的减少,其可以持续4至8周,或6至8周。

[0261] 根据本发明的治疗包括“治疗有效量”的所使用的药物。“治疗有效量”是指以所需的剂量和时间段对于取得所希望的治疗结果来说有效的量。

[0262] 治疗有效量可以根据诸如下列的因素而变化:个体的疾病状态、年龄、性别和体重,和药物在该个体中引发所希望的应答的能力。治疗有效量还是这样的量,其中在治疗上有益的效应胜过所述抗体或抗体部分的任何毒性效应或有害效应。

[0263] 关于肿瘤疗法的“治疗有效量”也可以通过其使疾病进展稳定的能力来进行测量。化合物耗竭B-细胞的能力可以在能预测在人自身免疫疾病方面的功效的动物模型系统中进行评价。

[0264] 备选地,组合物的该特性可以通过经由熟练医师已知的体外测定法检查该化合物耗竭B-细胞群体的能力来进行评价。治疗有效量的治疗性化合物可以耗竭B-细胞群体,或者改善受试者中的症状。本领域普通技术人员将能够基于诸如下列的因素来确定这样的量:受试者的尺寸、受试者症状的严重性和所选择的特定的组合物或施用途径。

[0265] 调整剂量制度以提供最佳的所希望的应答(例如,治疗应答)。例如,可以施用单次推注,可以随时间施用几个分开剂量,或者可以如由治疗情境的紧急程度所指出的按比例减少或增加剂量。可以将肠胃外组合物配制成剂量单位形式以为了易于施用和剂量一致。在本文中所使用的剂量单位形式是指适合作为用于待治疗的受试者的单位剂量的在物理上分开的单位;每个单位包含为了产生所希望的治疗效果而计算出的预定量的活性化合物,以及与之相联合的所需要的药学载体。

[0266] 关于本发明的剂量单位形式的规格受下列支配并且直接取决于下列:(a)活性化合物的独特特征和待取得的特定治疗效果,和(b)在配制此类活性化合物以用于在个体中治疗敏感性的领域之中的固有限制。

[0267] 关于在本发明中所使用的抗-CD38抗体的有效的剂量和剂量制度取决于待治疗的疾病或状况并且可以由本领域技术人员来确定。

[0268] 关于在本发明中所使用的抗-CD38抗体的治疗有效量的示例性的、非限制性的范围为大约0.1-100mg/kg,例如大约0.1-50mg/kg,例如大约0.1-20mg/kg,例如大约0.1-

10mg/kg,例如大约0.5、大约0.3、大约1或大约3mg/kg。在另一个实施方案中,以1mg/kg或更多的剂量,例如1至20mg/kg的剂量,例如5至20mg/kg的剂量,例如8mg/kg的剂量来施用所述抗体。

[0269] 具有本领域中的普通技能的医学专业人员可以容易地确定并开出所需的有效量的药用组合物。例如,医生或兽医可以比为了取得所希望的治疗效果所需要的水平低的水平来开启在该药用组合物中所采用的药物剂量,并且逐渐增加剂量直至取得所希望的效果。

[0270] 在一个实施方案中,通过以10至500mg/kg,例如200至400mg/kg的周剂量进行输注来施用所述抗-CD38抗体。可以重复这样的施用,例如1至8次,例如3至5次。所述施用可以通过在2至24小时,例如2至12小时的时间段内的连续输注来进行。

[0271] 在一个实施方案中,如果需要减小副作用(包括毒性),那么通过在长的时间段(例如超过24小时)内的缓慢连续输注来施用所述抗-CD38抗体。

[0272] 在一个实施方案中,以250mg至2000mg,例如300mg、500mg、700mg、1000mg、1500mg或2000mg的周剂量来施用所述抗-CD38抗体,直至8次,例如4至6次。所述施用可以在2至24小时,例如2至12小时的时间段内的连续输注来进行。如果需要,这样的制度可以重复一次或多次,例如在6个月或12个月后。通过在施用后经由例如取出生物学样品并使用靶向抗-CD38抗体的抗原结合区域的抗独特型抗体来测量血液中的本发明的化合物的量,可以对剂量进行测定或调整。

[0273] 在一个进一步的实施方案中,每周一次施用所述抗-CD38抗体,持续2至12周,例如3至10周,例如4至8周。

[0274] 在一个实施方案中,通过维持疗法来施用所述抗-CD38抗体,例如一周一次并持续6个月或更长的时间段。

[0275] 在一个实施方案中,通过包括下列操作的制度来施用所述抗-CD38抗体:抗-CD38抗体的一次输注,随后为与放射性同位素相缀合的抗-CD38抗体的输注。该制度可以重复,例如7至9天后。

[0276] 作为非限制性的例子,可以以下述方式来提供根据本发明的治疗:作为以每天大约0.1-100mg/kg,例如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的量的抗体的日剂量,在治疗开始后第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天中的至少一天,或者备选地第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周中的至少一周,或者其任何组合,其中使用每24、12、8、6、4或2小时的单剂量或分开剂量,或其任何组合。

[0277] 诊断用途

[0278] 所提供的抗-CD38抗体还可用于与CD38相关联的肿瘤或自身免疫疾病状态的体外或体内成像。在一些实施方案中,在本文中所描述的抗体用于诊断和治疗两者,或者用于单独的诊断。当将抗-CD38抗体用于诊断和治疗两者时,一些实施方案依赖于针对两个不同表位的两种不同的抗-CD38抗体,从而使得诊断性抗体不与治疗性抗体竞争结合,虽然在一些情况下对于这两者可以使用相同的抗体。例如,在一些情况下,将Ab19抗体用在诊断方面

(通常如下面所讨论的那样进行标记),而将Ab79用在治疗方面,或者反过来。因此,在本发明中包括包含诊断性抗体和治疗性抗体的组合物,并且在一些实施方案中,所述诊断性抗体如在本文中所描述的那样进行标记。另外,还可以将治疗性抗体和诊断性抗体的组合物与在本文中所概括的其他药物一起共施用。

[0279] 在许多实施方案中,对诊断性抗体进行标记。在本文中的“经标记的”意指,在本文中所公开的抗体附着有一种或多种成分、同位素或化学化合物,以使得能够在筛选或诊断程序中进行检测。通常,标记物归为几类:a)免疫标记物,其可以是被抗体所识别的作为融合伙伴而掺入的表位;b)同位素标记物,其可以是放射性同位素或重同位素;c)小分子标记物,其可以包括荧光和比色染料(例如异硫氰酸荧光素,也称为FITC),或者使得其他标记方法成为可能的分子例如生物素;和d)标记物,例如颗粒(包括用于超声标记的气泡)或允许身体成像的顺磁标记物。可以将标记物在任何位置处掺入到所述抗体中,并且可以在蛋白质表达期间在体外或在体内掺入,如本领域中已知的。

[0280] 诊断要么可以通过施用允许全身成像的诊断性抗体(如下面所描述的)在体内进行,要么可以在从患者中获得的样品或生物学样品上在体外进行。在该情形下,“样品”或“生物学样品”包括任何数目的物品,包括但不限于体液(包括但不限于全血、血浆、尿、血清、淋巴、唾液、肛门和阴道分泌物、汗和精液)以及组织样品(例如得自相关组织的活组织检查的)。在一些实施方案中,所述生物学样品为全血样品。

[0281] 在一些实施方案中,进行体内成像,包括但不限于超声、CT扫描、X-射线、MRI和PET扫描,以及光学技术,例如使用用于近身体表面的肿瘤的光学标记物的那些。

[0282] 与CD38相关联的疾病的体内成像可以通过任何合适的技术来进行。例如,⁹⁹Tc-标记或用另一种发射 β -射线的同位素进行的标记可以用于标记抗-CD38抗体。该技术上的变化可以包括使用磁共振成像(MRI)以相较于伽玛相机技术而言改善成像。相似的免疫闪烁显像方法和原理描述在例如Srivastava(编辑),Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy(Plenum Press 1988),Chase,"Medical Applications of Radioisotopes,"Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Gennaro等人(编辑),第624-652页(Mack Publishing Co.,1990),和Brown,"Clinical Use of Monoclonal Antibodies",Biotechnology And Pharmacy 227-49,Pezzuto等人(编辑)(Chapman&Hall 1993)中。

[0283] 在一个实施方案中,本发明提供了体内成像方法,其中将抗-CD38抗体与检测促进剂相缀合,将经缀合的抗体施用给宿主,例如通过注射到血流中,并且检定在所述宿主中经标记的抗体的存在和位置。通过该技术和在本文中所提供的任何其他诊断方法,本发明提供了用于在人患者或取自人患者的生物学样品中筛选疾病相关细胞存在的方法。

[0284] 对于诊断成像,可以将放射性同位素直接地或者通过使用中间官能团间接地结合至抗-CD38抗体。有用的中间官能团包括螯合剂,例如乙二胺四乙酸和二亚乙基三胺五乙酸(参见例如美国专利号5,057,313)。在此类涉及缀合有放射性同位素的抗-CD38抗体的诊断测定法中,递送给患者的经缀合的抗-CD38抗体的剂量典型地通过就最短半寿期、最短体内停留时间和最小同位素量的最佳组合来选择同位素而维持在尽可能低的水平,这将会允许检测和精确测量。

[0285] 除了放射性同位素和不透射线的试剂外,诊断方法还可以通过使用与染料(例如

用生物素-链霉抗生物素蛋白复合物)、造影剂、荧光化合物(例如异硫氰酸荧光素,也称为 FITC)或分子和用于磁共振成像(MRI)的增强试剂(例如顺磁离子)(参见美国专利号6,331,175,其描述了MRI技术和与MRI增强试剂相缀合的抗体的制备)相缀合的抗-CD38抗体来进行。此类诊断/检测试剂可以选自用于在磁共振成像中使用的试剂,和荧光化合物。

[0286] 为了给抗-CD38抗体加载放射性金属或顺磁离子,可能必需使它与具有长尾巴(在其上附着了多个用于结合所述离子的螯合基团)的试剂进行反应。这样的尾巴可以是聚合物例如聚赖氨酸、多糖或者其他具有侧基(在其上可以结合螯合基团,例如卟啉、多胺、冠醚、双缩氨基硫脲、多肟和已知可用于该目的的类似基团)的经衍生或可衍生的链。

[0287] 可以通过使用标准化学来将螯合物偶联至抗-CD38抗体。通常通过使得能够以最小的免疫反应性损失以及最小的聚集和/或内部交联形成与所述分子的键合的基团来将螯合物连接至抗-CD38抗体。

[0288] 潜在地有用的金属螯合物组合的例子包括2-苯基-DTPA以及其一甲基和环己基类似物,其与在60至4,000keV的一般能量范围内的诊断性同位素例如¹²⁵I、¹²³I、¹²⁴I、⁶²Cu、⁶⁴Cu、¹⁸F、¹¹¹In、⁶⁷Ga、⁹⁹Tc、⁹⁴Tc、¹¹C、¹³N、⁵O和⁷⁶Br一起使用,以用于放射成像。

[0289] 标记物包括放射性核素、放射学造影剂、顺磁离子、金属、荧光标记物、化学发光标记物、超声造影剂和光活化试剂。此类诊断试剂是众所周知的,并且可以使用任何这样的已知诊断试剂。诊断试剂的非限制性例子可以包括放射性核素例如¹¹⁰In、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁸F、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、⁹⁴mTc、⁹⁴Tc、⁹⁹mTc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴-¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、⁵²mMn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、⁸²mRb、⁸³Sr或者其他 γ -发射体、 β -发射体或正电子发射体。

[0290] 有用的顺磁离子可以包括铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钕(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镝(III)、钬(III)或铒(III)。金属造影剂可以包括镧(III)、金(III)、铅(II)或铋(III)。

[0291] 超声造影剂可以包括脂质体,例如充气脂质体。不透射线的诊断试剂可以选自化合物,钡化合物、镓化合物和铊化合物。

[0292] 这些和相似的螯合物,当与非放射性金属例如锰、铁和钆相络合时,与抗-CD38抗体相联系地可用于MRI诊断方法。大环螯合物例如NOTA、DOTA和TETA与各种各样的金属和放射性金属一起(最特别地分别与镓、钇和铜的放射性核素一起)是有用的。可以通过使环大小适应目的金属来使得此类金属螯合物络合物非常稳定。对于稳定地结合核素例如²²³Ra来说令人感兴趣的其他环类型螯合物例如大环多醚,在诊断方法中也可以是合适的。

[0293] 抗-CD38抗体还可用于例如检测在特殊的表达CD38的细胞(例如成浆细胞和浆细胞)、组织或血清中目的抗原的表达。在一些实施方案中,在本文中所描述的抗-CD38抗体可用于检测在表达CD38的成浆细胞和浆细胞中目的抗原的表达。对于诊断应用,典型地将会将所述抗体用用于体外测定法的可检测部分进行标记。如本领域技术人员将会意识到的,存在广泛多样的用于在体外测试中使用的合适的标记物。用于在本发明的该方面中使用的合适的染料包括但不限于,荧光镧系元素络合物(包括铕和铽的那些)、荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、伊红、赤藓红、香豆素、甲基香豆素、量子点(也称为“纳米晶体”;参见美国系列号09/315,584,其通过提及而合并入本文)、芘、孔雀石绿、芪、Lucifer Yellow、Cascade Blue.TM.、德克萨斯红、Cy染料(Cy3、Cy5等)、alexa染料(包括Alexa)、藻红蛋白、bodipy和

在Richard P.Haugland的Molecular Probes Handbook的第6版(其通过提及而明确合并入本文)中所描述的其他染料。

[0294] 因此,本发明提供了诊断性的抗-CD38抗体缀合物,其中将所述抗-CD38抗体缀合物缀合至造影剂(例如用于磁共振成像、计算机辅助体层摄影术或超声对比增强剂)或放射性核素(其可以为例如发射 γ 、 β 、 α 、俄歇电子或正电子的同位素)或可检测部分(例如荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、伊红、赤藓红、香豆素等)。在一些实施方案中,与本发明相联系的诊断性抗-CD38抗体缀合物可以为与异硫氰酸荧光素(也称为FITC)相缀合的抗-CD38抗体。在一些实施方案中,所述经缀合的抗-CD38抗体可以被称为抗-CD38抗体-荧光素缀合物。本领域技术人员将会意识到,本领域中已知的其他试剂也可以用于将荧光素缀合至抗-CD38抗体;并且在每个这样的情况下,可以将所得的缀合物称为抗-CD38抗体-荧光素缀合物。在本文中所描述的此类抗-CD38抗体-荧光素缀合物可以在体外测定法例如流式细胞术中使用。

[0295] 检定方法

[0296] 用于与本发明相联系地进行使用的适用的检定方法包括但不限于,流式细胞术、用于游离“*Ig*”轻链的测定法、mRNA转录物分析等。将会意识到的是,本领域中已知用于进行此类检定方法的任何常规手段可以与本发明相联系地进行使用。

[0297] 在一些实施方案中,可以通过使用流式细胞术作为用于定量在从患者中获得的生物学样品中的表达CD38的细胞的手段来施行在本文中所描述的方法。将会意识到的是,如在本文中所使用的,从患者中获得的生物学样品可以为全血样品、血清样品或经处理的血液的样品。在一些实施方案中,从患者中获得的生物学样品为全血样品。将会意识到的是,从患者中获得的生物学样品可以包括一种或多种细胞类型,包括但不限于红细胞,和在图1中所显示的细胞类型中的任一种。在本文中所使用的“表达CD38的细胞”意指任何显示出表达CD38的细胞,包括但不限于原B细胞($CD34^+CD19^+CD20^-$)、经激活的B细胞($CD19^+CD20^+$)、成浆细胞($CD19^+CD27^+$)、长寿的浆细胞($CD138^+CD19^-CD20^-$)、短寿的浆细胞($CD138^+CD19^+CD20^-$)、经激活的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞、NKT细胞($CD3^+CD56^+$)和NK细胞($CD56^+CD16^+$)。另外,在淋巴祖细胞($CD34^+CD45RA^+CD10^+CD19^-$)上发现了CD38表达,但在淋巴干细胞上没有发现CD38表达。另外,在成熟DC和经激活的单核细胞上看到增加的CD38表达。

[0298] 将会意识到的是,流式细胞术可以通过使用任何适用的流式细胞术仪器经由本领域中已知的任何手段来进行。此类方法包括本领域中与流式细胞术相联系地通常已知的用于样品制备的常规手段。在一些实施方案中,通过染色方法来施行流式细胞术方法以帮助区分在生物学样品中的细胞。将会意识到的是,可以使用本领域中通常已知用于与流式细胞术相联系地进行使用的任何染色方法。在一些实施方案中,使一种或多种经标记的抗体或抗体缀合物与在本文中所描述的全血样品相接触。本领域中已充分地确立,通过使用多色流式细胞术可以计数多个细胞靶标。参见例如Baumgarth,N和Roeder,M,J Immun Methods (2000) 243:77-97。在一些实施方案中,可以将至少一种经标记的抗体或抗体缀合物与在本文中所描述的流式细胞术相联系地进行使用,以鉴定在从患者中获得的生物学样品中所包含的细胞。在一些实施方案中,用于与在本文中所描述的流式细胞术方法相联系地进行使用的至少一种经标记的抗体或抗体缀合物为抗-CD38抗体-荧光素缀合物。在一些实施方案中,所述抗-CD38抗体-荧光素缀合物为Ab19-荧光素或Ab79-荧光素。

[0299] 在一些实施方案中,本发明提供了进行流式细胞术测定法的方法,其包括使从患者中获得的生物学样品与裂解/固定溶液例如FACSTM裂解溶液相接触(也称为重悬浮),所述溶液包含至少一种能够裂解某些细胞(例如红细胞)的组分和至少一种能够固定该样品的组分(例如醛或醇)。与本发明相联系地有用的在能够固定细胞的裂解/固定溶液中的合适组分包括醇,例如甲醇或乙醇,其被本领域技术人员已知为能够使蛋白质凝聚的沉淀或变性固定剂,或者醛,例如甲醛或戊二醛。将会意识到的是,甲醛可以聚合成低聚甲醛(PFA),并且在甲醇存在下,甲醛可能不会聚合成低聚甲醛。进一步将会意识到的是,对于使用无醇甲醛作为在裂解/固定溶液中的组分的应用,所述裂解/固定可以可选地包含缓冲液,例如PBS缓冲液。在一些实施方案中,所述生物学样品为全血。在一些实施方案中,可以使来自患者的全血样品与裂解/固定溶液例如FACSTM裂解溶液相接触,以裂解在所述全血样品中所包含的红细胞(参见Einwallner,E,Subbasic,A,Strasser,A等人,J ImmunMethods (2013) 390:127-132;和Tiirikainen,M.Cytometry (1995) 20:341-348,这两者通过提及而合并入本文)。在一些实施方案中,使从患者中获得的生物学样品与FACSTM裂解溶液相接触,以在冷冻该样品以用于储存之前形成经处理的样品。在一些实施方案中,使从患者中获得的生物学样品与FACSTM裂解溶液相接触,以紧接在流式细胞术分析之前形成经处理的样品,而无需冷冻经处理的样品以用于储存。在一些实施方案中,可以使从患者中获得的生物学样品与FACSTM裂解溶液相接触大约2分钟至大约30分钟。在一些实施方案中,可以使所述生物学样品与FACSTM裂解溶液相接触大约4分钟至大约20分钟,或者大约5分钟至大约10分钟。

[0300] 在一些实施方案中,将在使从患者中获得的生物学样品与裂解/固定溶液例如FACSTM裂解溶液相接触后获得的经处理的样品冷却至大约-20℃或更低的温度以形成经冷冻的样品。在一些实施方案中,将经处理的样品冷却至大约-80℃。在一些实施方案中,将经处理的样品冷却至大约-78℃。在一些实施方案中,将经处理的样品冷却至大约-70℃。在一些实施方案中,将经处理的样品冷却至大约-60℃。在一些实施方案中,将经处理的样品冷却至大约-50℃。在一些实施方案中,将经处理的样品冷却至大约-40℃。在一些实施方案中,将经处理的样品冷却至大约-30℃。在一些实施方案中,将经处理的样品冷却至大约-20℃。在一些实施方案中,将经处理的样品冷却至大约-80℃至-20℃。在一些实施方案中,将在使从患者中获得的生物学样品与裂解/固定溶液例如FACSTM裂解溶液相接触后获得的经处理的样品在接触后大约24小时或更短的时间内进行冷却。在一些实施方案中,将经处理的样品在裂解后大约12小时或更短的时间内进行冷却。在一些实施方案中,将经处理的样品在大约6小时或更短的时间内进行冷却。

[0301] 在冷冻经处理的样品后,在一些实施方案中,可以在通过流式细胞术对在生物学样品中的细胞进行计数之前,将经冷冻的样品升温至大约室温。在一些实施方案中,可以在冷却后大约78小时或更短的时间内,将经冷冻的样品升温至大约室温。在一些实施方案中,可以在冷却后大约72小时或更短的时间内,将经冷冻的样品升温至大约室温。在一些实施方案中,可以在冷却后大约54小时或更短的时间内,将经冷冻的样品升温至大约室温。在一些实施方案中,可以在冷却后大约48小时或更短的时间内,将经冷冻的样品升温至大约室温。在一些实施方案中,可以在冷却后大约30小时或更短的时间内,将经冷冻的样品升温至大约室温。在一些实施方案中,可以在冷却后大约24小时或更短的时间内,将经冷冻的样品升温至大约室温。在一些实施方案中,可以在冷却后大约72小时至大约78小时内,将经冷冻

的样品升温至大约室温。在一些实施方案中,可以在冷却后大约48小时至大约54小时内,将经冷冻的样品升温至大约室温。在一些实施方案中,可以在冷却后大约24小时至大约30小时内,将经冷冻的样品升温至大约室温。

[0302] 在一些实施方案中,本发明提供了用于在全血中检定表达CD38的细胞的方法,所述方法包括:从受试者中获得全血样品,其中所述样品包括红细胞和抗凝剂;裂解红细胞以形成经处理的样品;将所述经处理的样品在获得所述样品的大约24小时内冷却至大约-20℃或更低的温度以形成经冷冻的样品;和在获得所述样品的大约72小时内测量在所述样品中的表达CD38的细胞的量,其中在测量表达CD38的细胞的量之前使所述经冷冻的样品升温至室温。

[0303] 将会意识到的是,在从患者中获得的生物学样品中存在的成浆细胞或浆细胞的数目的变化可以通过用于游离Ig轻链(FLC)的测定法来进行监测。本领域技术人员已知的任何用于游离Ig轻链的测定法可以用于测量游离Ig轻链,例如**FREELIGHT®**测定法(BindingSite,UK)。参见例如Fassbinder T,Saunders U,Mickholz E等人,Arthritis Res Ther (2015);Draborg AH,Lydolph MC,Westergaard M等人,PLoS One (2015) 10 (9):e0138753.doi:10.1371/journal.pone.0138753.eCollection 2015。SLE导致浆细胞的多克隆激活,患者相比于健康受试者而言具有κ和λ轻链的增加,并且抗体和浆细胞的该增加被认为是疾病发病机理的一部分(Draborg,2015)。血清FLC已被报道为关于SLE的标志物,并且尿FLC已被报道为关于III/IV类狼疮肾炎的标志物。血清FLC随着利妥昔单抗或吗替麦考酚酯(MMF)治疗而变化并且与其他血液成浆细胞和浆细胞标志物相关(Fassbinder,2015;Draborg,2015)。

[0304] 在一些实施方案中,本发明提供了就下述方面来测量生物标志物的方法:在从患者中获得的生物学样品中的至少一种由表达CD38的细胞所富含的基因的相比于在从对照受试者中获得的生物学样品中所述由表达CD38的细胞所富含的基因的表达水平而言升高的表达水平。在一些实施方案中,本发明提供了就下述方面来测量生物标志物的方法:在从患者中获得的生物学样品中的由表达CD38的细胞所富含的基因的相比于关于所述由表达CD38的细胞所富含的基因的阈值而言升高的表达水平。在某些实施方案中,所述由表达CD38的细胞所富含的基因为IgJ。在某些实施方案中,所述由表达CD38的细胞所富含的基因为CD38。在某些实施方案中,所述生物标志物包含mRNA。在某些实施方案中,所述生物学样品为全血。在一些实施方案中,所述患者已接受了至少一种先期治疗。在一些实施方案中,所述至少一种先期治疗包括用抗-CD20抗体进行治疗。

[0305] 在一些实施方案中,本发明提供了预测患者对于疗法的应答的方法,其包括在从所述患者中获得的生物学样品中就至少一种由表达CD38的细胞所富含的基因的升高的表达水平来测量生物标志物的表达,并且将在患者的生物学样品中所述至少一种由表达CD38的细胞所富含的基因的表达与在从对照受试者中获得的生物学样品中相同的至少一种由表达CD38的细胞所富含的基因的表达或者与关于所述至少一种由表达CD38的细胞所富含的基因的阈值进行比较,其中在患者的生物学样品中所述至少一种由表达CD38的细胞所富含的基因的相比于在对照受试者的生物学样品中的表达或相比于阈值而言升高的表达预示了所述患者对于所述疗法的应答。在某些实施方案中,所述由浆细胞/成浆细胞所富含的基因为IgJ。在某些实施方案中,测量至少一种基因的表达包括测量mRNA。在一个进一步的

实施方案中,测量mRNA包括PCR方法、RNA测序(RNAseq)或微阵列芯片。在某些实施方案中,所述生物学样品包含全血。在一些实施方案中,所述患者已接受了至少一种先期治疗。在一些实施方案中,所述至少一种先期治疗包括用抗-CD20抗体进行治疗。

[0306] 将会意识到的是,由表达CD38的细胞所富含的基因的表达水平的测量可以通过本领域中已知的任何常规手段来进行。例如,mRNA水平可以通过微阵列来测量。在另一个方面,基因表达通过聚合酶链反应(PCR)、RNAseq或实时定量聚合酶链反应(qPCR)来测量。在另一个方面,基因表达通过多重PCR来测量。根据另一个实施方案,在下述情况下,在患者的生物学样品中目的基因的表达被认为相比于对照受试者的生物学样品的目的基因的表达而言是升高的:在患者的样品中目的基因的相对mRNA水平是对照受试者的mRNA的水平的2倍。根据另一个实施方案,在患者的样品中目的基因的相对mRNA水平相比于在对照受试者的样品中的水平而言是3倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍或30倍。在另一个实施方案中,在下述情况下,在患者的生物学样品中目的基因的表达被认为相比于对照受试者的生物学样品的目的基因的表达而言是低的:在患者的样品中目的基因的相对mRNA水平是对照受试者的mRNA的水平的1/2。根据另一个实施方案,在下述情况下,在患者的生物学样品中目的基因的表达被认为相比于对照受试者的生物学样品的目的基因的表达而言是低的:在患者的样品中目的基因的相对mRNA水平相比于在对照受试者的样品中的水平而言是1/3、1/5、1/10、1/15、1/20、1/25或1/30。

[0307] mRNA的水平可以通过本领域技术人员熟知的各种方法来测量和定量,包括使用商购可得的试剂盒和试剂。一种这样的方法为聚合酶链反应(PCR)。另一种用于定量用途的方法为实时定量PCR或qPCR。参见例如Innis MA等人,编辑,Academic Press, Inc. (1990),“Current Protocols in Molecular Biology”(F.M.Ausubel等人,编辑,1987,和定期更新);和“PCR:The Polymerase Chain Reaction,”(Mullis等人,编辑,1994)。另一种用于定量用途的方法为RNAseq。参见Wang,Zhong;Gerstein,Mark;Snyder,Michael.“RNA-Seq:a revolutionary tool for transcriptomics”.Nature Reviews Genetics 10(1):57-63。

[0308] 在另一个方面,所述基因表达水平通过PCR方法或微阵列方法来测量。在一个实施方案中,所述微阵列方法包括使用微阵列芯片,其具有一个或多个可以在严紧条件下与编码上面所提及的基因的核酸分子杂交的核酸分子。在一个实施方案中,所述PCR方法为qPCR。在一个实施方案中,所述PCR方法为多重PCR。微阵列是一种多重技术,其典型地使用一个阵列化系列的数千个核酸探针来在高严紧条件下与例如cDNA或cRNA样品进行杂交。探针-靶标杂交典型地通过检测经荧光团、银或化学发光标记的靶标来进行检测和定量,以测定在所述靶标中的核酸序列的相对丰度。在典型的微阵列中,通过与化学基质的共价键(经由环氧硅烷、氨基硅烷、赖氨酸、聚丙烯酰胺或其他)来将探针附着至固体表面。所述固体表面为例如玻璃、硅芯片或微细珠。各种微阵列是商购可得的,包括例如由Affymetrix, Inc. 和 Illumina, Inc. 制造的那些。

[0309] 制品

[0310] 在其他实施方案中,提供了包含可用于治疗上面所描述的病症的材料的制品。所述制品包含容器和标签。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器和试管。所述容器可以由各种各样的材料例如玻璃或塑料来形成。所述容器容纳对于治疗所述状况来说有效的组合物,并且可以具有无菌的进入孔(例如,所述容器可以是静脉内溶液袋或具有由皮下注射针

头可刺穿的塞子的小瓶)。在所述组合物中的活性试剂为抗体。在所述容器上或与所述容器相联的标签指明,所述组合物用于治疗所选择的状况。所述制品可以进一步包含第二个容器,其包含在药学上可接受的缓冲液,例如磷酸盐缓冲盐水、林格溶液和右旋糖溶液。它可以进一步包括其他从商业和使用者的立场所希望的材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器和具有使用说明的包装插入物。

实施例

- [0311] 提供下面的实施例以举例说明而不是限制本发明。
- [0312] 实施例1:包含编码人、食蟹猴和小鼠CD38的多核苷酸的表达载体的构建
- [0313] 为了构建表达人CD38 (huCD38) 的载体,从获得自Origene Technologies Trueclone®human的cDNA中分离出编码huCD38的多核苷酸。将分离出的huCD38克隆到包含新霉素抗性(neo^R) 基因(其允许选择出抗G418(遗传霉素)的转染子)的稳定表达载体(XOMA, Inc.) 中。对在所选择的转染子中存在的huCD38基因进行测序以识别任何序列错误。将偏离Genbank登录号NM_001775的在该序列中的错误通过PCR位点定向诱变来进行纠正。通过5' 测序来确认最终的载体DNA。
- [0314] 为了构建表达食蟹猴CD38(cyCD38) 的载体,从获得自Biochain Institute的cDNA(猴(食蟹猴)-正常脾组织)的DNA中分离出编码cyCD38的多核苷酸。将分离出的cyCD38克隆到包含neo^R基因(其允许选择出抗G418(遗传霉素)的转染子)的稳定表达载体(XOMA, Inc.) 中。对在所选择的转染子中存在的cyCD38基因进行测序以识别任何序列错误。将偏离Genbank登录号AY555148的在该序列中的错误通过PCR位点定向诱变来进行纠正。通过测序来确认最终的载体DNA。
- [0315] 为了构建表达小鼠CD38(moCD38) 的载体,从获得自Origene's TrueORF收藏的DNA中分离出编码moCD38的多核苷酸。将分离出的moCD38克隆到包含neo^R基因(其允许选择出抗G418(遗传霉素)的转染子)的稳定表达载体(XOMA, Inc.) 中。对在所选择的转染子中存在的moCD38基因进行测序以识别任何序列错误。将偏离Genbank登录号NM_007646的在该序列中的错误通过PCR位点定向诱变来进行纠正。通过测序来确认最终的载体DNA。
- [0316] 实施例2:表达CD38的中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞的开发
- [0317] 为了开发表达huCD38、muCD38和cyCD38的CHO细胞,用线性化的DNA转染CHO细胞。在选择下一周后,将细胞通过流式细胞术来进行分选,并且将表达最高的huCD38、muCD38或cyCD38的细胞(前15%) 在96-孔平板中进行铺板以产生单个集落。将其余的细胞也在选择下进行铺板以产生备用集落。在铺板后大约12-14天,鉴定单个集落并转移至96-深孔平板。在第二次传代后通过FACS分析来筛选克隆。使前几个生产性克隆进行传代并扩展至摇瓶。将前2个克隆进行冷冻和/或进行培养以用于支原体AVA测试和放大。
- [0318] 为了构建用于弥散性异种移植植物模型的萤光素酶报道基因,使用包含CMV启动子/萤光素酶基因/新霉素选择标记的商业载体(Promega, Madison, WI) 来在Daudi伯基特淋巴瘤细胞中产生稳定的转染子品系。
- [0319] 实施例3:噬菌体展示文库和结合CD38的试剂的筛选
- [0320] 从噬菌体展示文库中靶标特异性抗体的选择按照由Marks等人(2004, Methods Mol. Biol. 248:161-76) 所描述的方法来进行。简而言之,将噬菌体展示文库与100pmol的经

生物素化的CD38一起在室温下温育1小时,然后通过使用100 μ L的链霉抗生物素蛋白珠粒悬浮液(**DYNABEADS®**M-280链霉抗生物素蛋白,Invitrogen)来捕获所形成的复合物。通过用洗涤缓冲液(在PBS中的5%牛奶)洗涤所述珠粒来去除非特异性噬菌体。将经结合的噬菌体用0.5ml的100nM三乙胺(TEA)来进行洗脱,并且立即通过添加等体积的1M TRIS-C1(pH 7.4)来进行中和。将洗脱出的噬菌体汇集物用于感染在对数期中进行生长的TG1大肠杆菌(E.coli)细胞,并且拯救噬菌粒,如在Marks等人(同上)中所描述的。将选择重复总共三轮。

[0321] 备选地,针对经固定化的CD38(R&D systems)来对噬菌体展示文库进行淘选,以鉴定一组具有结合CD38的能力的抗体片段。淘选通过使用标准的实验方案来进行(参见例如,Methods in Molecular Biology,第178卷:由P.M.O'Brien和R.Aitken编辑的Antibody Phage Display:Methods and Protocols,Human Press;"Panning of Antibody Phage-Display Libraries,"Coomber,D.W.J.,第133-145页;和"Selection of Antibodies Against Biotinylated Antigens,"Chames等人,第147-157页)。简而言之,用50 μ L的在PBS中以10 μ g/ml的浓度的重组CD38(R&D Systems)包被**NUNC®MAXISORP**平板的三个孔。在4°C下过夜温育后,将游离的结合位点在室温下用在PBS中的5%牛奶封闭一小时。然后,向经封闭的孔添加大约200 μ L的在5%牛奶/PBS中的噬菌体文库,并且在室温下温育大约一至两小时。洗涤孔并且通过使用标准方法来洗脱经结合的噬菌体(参见例如Sam brook和Russell,Molecule Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001)。通过感染处于对数生长期的大肠杆菌TG1宿主细胞来扩增洗脱出的噬菌体。将被感染的TG1细胞通过在2,500RPM下离心五分钟来进行回收,在15cm 2YT-氨苄青霉素-2%葡萄糖琼脂平板上进行铺板,并且在30°C下温育过夜。然后,通过使用经扩增的噬菌体来重复该淘选过程。将淘选、洗脱和扩增的循环重复三轮。

[0322] 在淘选完成后,将来自经铺板的TG1细胞的单个集落用于接种在96-孔平板中的培养基。使微量培养物生长至0.6的OD600,在该点时通过添加1mM IPTG并在处于30°C的摇床中温育过夜来诱导可溶性scFv的表达。通过离心来使细菌形成粒状沉淀,并且将周质提取物用于通过使用标准ELISA测定法和FACS-结合测定法来测试与经固定化的CD38的scFv结合。

[0323] 对于FACS结合筛选,将稳定地表达CD38的CHO细胞用于就其结合天然的、膜结合的CD38的能力来筛选在周质提取物(PPE)中的scFv。将亲本和CHO转染子(表达人CD38或食蟹猕猴CD38或小鼠CD38的细胞系)以 2×10^6 个细胞/ml分开地重悬浮在PBS(Life Technologies)、0.5%BSA(Sigma-Aldrich)和0.1%NaN3(Sigma-Aldrich)(FACS缓冲液)中。使用不表达CD38的亲本CHO细胞作为阴性对照。将25 μ L的细胞等分试样在V形底的96-孔平板(Costar Cat#3897)中进行铺板并且向细胞添加25 μ L的包含加有myc标签的scFv抗体片段的周质提取物,然后将混合物在4°C下温育30分钟。然后洗涤细胞两次,之后将粒状沉淀重悬浮在25 μ L的小鼠抗c-myc(1/1000,在FACS缓冲液中)(Roche)中并再次在4°C下温育30分钟。然后洗涤细胞两次并重悬浮在25 μ L的在FACS缓冲液中的抗小鼠IgG-PE的1/200稀释物(Jackson labs)中并再次在4°C下温育30分钟。然后洗涤细胞两次以去除过量的未结合的抗体并重悬浮在70 μ L FACS缓冲液中并在BD **FACScan®**上进行分析。使用FlowJo软件(TreeStar,Inc.)来评价所获取的数据。通过将经CD38转染的CHO细胞的中值荧光强度

相对于亲本CHO细胞系(CD38⁻)的中值荧光强度进行比较来鉴定阳性样品。

[0324] 对结合人CD38的抗体克隆进行测序以鉴定独特的克隆。然后，基于通过**Biacore®**分析所测定的解离速率来对独特的scFV克隆进行分级。通过标准的胺偶联化学(**Biacore®**)来将200RU至500RU的人重组CD38(R&D Systems的cat#2404-AC或等价物)固定至CM5或等价芯片。还制备了参考斑点，其被活化然后封闭而没有蛋白质的固定化。这通过在乙酸盐缓冲液(pH 5.0)中将抗原稀释至1-3μg/ml并注射在经活化的表面上直至固定了所需要的水平(3-5分钟)来进行。然后用乙醇胺来封闭表面。用测定法运行缓冲液10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA(乙二胺四乙酸)和0.05%聚山梨酯20(处于pH 7.4)(具有2mg/mL BSA(牛血清白蛋白))一比一稀释周质提取物。在30分钟时将经稀释的周质提取物注射在表面等离子体共振(SPR)表面上300秒，其中具有监测解离时间的额外的900秒。再生用100mM HC1的单次8秒注射来进行。从来自活性表面的数据中减去来自参考点的数据，然后通过使用在**Biacore®**T100软件中的1:1解离模型来拟合解离曲线。

[0325] 将分级最高的scFV克隆转换为IgG1抗体。通过使用亲本CHO细胞以及表达人、鼠类和食蟹猴CD38的CHO细胞来在IgG1-重新格式化的克隆上重复FACS结合筛选以确保结合特性得到保留并且评估物种交叉反应性。IgG-重新格式化的克隆的FACS表征如上面所描述的那样来进行，但是将由添加抗-c-myc抗体和抗小鼠IgG-PE组成的步骤替换为其中通过添加缀合有藻红蛋白的抗人IgG(Jackson Labs)来检测全长人IgG的结合的单个步骤。

[0326] 实施例4:IgG-重新格式化的克隆的基于细胞的体外测定法

[0327] 大约150个克隆被重新格式化为人IgG1抗体，并且通过使用一组测定法来详尽地评价五种抗体(Ab19、Ab43、Ab72、Ab79和Ab110)，如下面所描述的。将在体外和体内测定法中IgG-重新格式化的克隆的性能与两种抗体BMTK4-1(也称为benchmark-1、BM-1或BMTK-1)(SEQ ID NO:24和25；重链和轻链可变区)和BMTK4-2(也称为benchmark-2、BM-2或BMTK-2)(SEQ ID NO:26和27；重链和轻链可变区)进行比较，其氨基酸序列分别源自已知的抗-CD38抗体达雷木单抗(daratumumab)(也称为HuMax-CD38，公开在国际公开号W0 06/099875中)和SAR650984(公开在国际公开号W008/047242中)的序列。帕利珠单抗(**SYNAGIS®**) (MedImmune) (一种在临幊上经批准的识别呼吸道合胞病毒的抗体)充当关于CD38结合的阴性对照。

[0328] 实施例5:通过免疫荧光来检测Ab79结合

[0329] 将经Alexa **Fluor®**-488染料标记的Ab79施加至正常人结肠直肠组织、前列腺和淋巴的冷冻切片。经Alexa **Fluor®**-488染料标记的帕利珠单抗(**Synagis®**)充当阴性染色对照。所得的免疫荧光图像显示在图4中。对于Ab79所观察到的染色模式与在正常人结肠直肠组织、前列腺和淋巴结上用商购可得的多克隆抗-CD38抗体所看到的相同(数据未显示)。

[0330] 还将经Alexa **Fluor®**-488染料标记的Ab79施加至正常的和多发性骨髓瘤的骨髓样本(数据未显示)。Ab79与~10%的来自正常骨髓的细胞结合，而在4个所测试的样品中的4个之中>90%的多发性骨髓瘤骨髓细胞显示出Ab79结合。

[0331] 还检查了Ab79结合许多细胞系(MOLP-8、DAUDI、RPMI和MCF7)的能力。MOLP-8(人多

发性骨髓瘤)、DAUDI(源自具有伯基特淋巴瘤的患者的淋巴母细胞)和RPMI(从具有慢性髓鞘发生白血病的患者中建立的细胞系)细胞都显示出被Ab79结合。乳腺癌细胞系MCF7看起来对于Ab79结合在很大程度上是阴性的(数据未显示)。

[0332] 在8μm恒冷箱冷冻切片上进行缀合有Alexa Fluor®488的抗体的染色,将所述冷冻切片在乙醇/丙酮混合物中固定5分钟,随后与所述抗体一起在湿度受控的室中在室温下温育1小时。然后,洗涤切片,添加包含DAPI的封固剂(Vector Laboratories,cat#H1500),并盖上盖玻片。

[0333] 实施例6:在多发性骨髓瘤(MM)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)上评价Ab79表达

[0334] 在对于CD138⁺细胞进行富集后或者经由对CD138⁺CD45^{-/lo}细胞进行门控,通过流式细胞术来分析与来自多发性骨髓瘤患者的骨髓样品的Ab79结合(图7A)。发现Ab79在>95%的来自六个多发性骨髓瘤样品中的四个的细胞上表达。Ab79的结合模式看起来与在临床实验室中使用的抗-CD38抗体的结合模式在很大程度上相似。进一步地,Ab79结合来自具有慢性淋巴细胞白血病的患者的细胞(图7B)。

[0335] 为了通过FACS来测量与MM和CLL的Ab79结合,在24小时内处理患者样品。按照制造商的说明书,用Ficoll-Paque™(GE Healthcare)来分离外周血单核细胞。表达分析通过使用下列抗体组来进行,括号中是克隆。MM组:Ab79-Alexa Fluor®-488、CD45-PerCP(2D1)、CD138-APC(MI15)。CLL组:Ab79-Alexa Fluor®-488、CD5-PE(UCHT2)、CD45-PerCP(2D1)、CD19-APC(SJ25C1)。向包含100μL的0.2×10⁶PBMC或经CD138富集的来自骨髓抽出物的细胞的每个孔或管中添加5μL的经PE、PerCP或APC标记的抗体或10μL的经Alexa Fluor®-488标记的抗体或同种型对照。将样品在室温下温育30分钟,之后按照制造商的说明书使用BD Pharmlyse来裂解红细胞。将所有样品在FACS缓冲液中洗涤三次。将样品在1%低聚甲醛中进行固定,并且在BD FACSCanto™ II或BD FACSCaliber™上进行分析。

[0336] 实施例7:由抗-CD38诱导的CDC测定法

[0337] 就诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力来测试食蟹猴交叉反应性克隆。将MOLP-8细胞以10,000个细胞/孔的密度在黑色96-孔平底组织培养板中在50μL的完全培养基(RPMI,补充有10%胎牛血清)中进行铺板。向每个孔添加50μL的2x抗-CD38抗体、对照IgG抗体或单独的培养基,并且让其在室温下温育10分钟。除了对照孔之外,取决于细胞系,向每个孔添加变化量(2-15μL)的经纯化的兔补体(cat#CL 3441Cedarlane Laboratories, Canada)。在37°C下进行一个小时的温育后,将平板带至室温,每个孔添加100μL的细胞滴度CytoTox Glo™试剂(Promega G7571/G7573),将平板摇动5至7分钟,并且在EnVision®(Perkin Elmer)发光平板阅读器上读取发光。所测试的条件:单独的细胞;细胞+补体;细胞+IgG对照+补体;细胞+抗体+补体。通过使用下述等式来计算%CDC:

[0338] $100 - (\text{RLU}_T / \text{RLU}_C) \times 100$,

[0339] 其中RLU_T为受试样品的相对发光单位,和RLU_C为具有单独的补体的样品的相对发光单位。统计学分析通过使用PRISM软件来进行。从%CDC对抗体浓度的标绘图所确定的EC₅₀值显示在表1中。

[0340] 实施例8:由抗-CD38诱导的ADCC测定法

[0341] 使用Daudi、MOLP-8和RPMI-8226细胞系作为靶细胞来评估抗体依赖性细胞介导的

细胞毒性(ADCC)。通过从获得自斯坦福血液中心(Palo Alto, CA)的暗黄覆盖层或LRS中的Ficoll-PlaqueTM分开来分离出PBMC作为效应细胞。将样本用在PBS中的2% FBS进行1:3稀释。将15mL的Ficoll-PlaqueTM(GE Healthcare)轻轻地分层放置在35mL的经稀释的样本之下，并且以1800rpm(制动松开)离心25分钟。收集包含PBMC的混浊的界面，于在PBS中的2% FBS中洗涤3次，并且冷冻在10%DMSO/FBS中的以每个等分试样 50×10^6 个细胞/mL的等分试样。当需要时，将冷冻的PBMC等分试样解冻，并且以 2×10^6 /mL在10%FBS/RPMI+5ng/mL重组人IL2(R&D systems#202-IL)中培养过夜。

[0342] 对于ADCC测定法，所有步骤都在完全培养基中进行。在96-孔平板中每个孔铺板5000个靶细胞，添加50μL的3x抗-CD38、对照IgG中或单独的培养基，随后为50μL的人效应PBMC，以1:25至1:50的靶细胞:效应细胞(T:E)的比例。将平板以800rpm简短地离心~30秒以使所有细胞紧密靠近。在37°C下4小时后，将平板以1100rpm离心5分钟，并将100μL上清液转移至白色平板。向上清液添加100μL CytoTox GloTM试剂(Promega cat#G9292)并让平板在室温下摇动20-30分钟。在**EnVision®**(Perkin Elmer)发光平板阅读器上读取发光，并且使用下述等式来计算特异性裂解百分比：

$$[0343] \quad (\text{RLU}_T / \text{RLU}_{E/T}) / (\text{RLU}_L / \text{RLU}_{E/T}) \times 100$$

[0344] 其中RLU_T为受试样品的相对发光单位，和RLU_{E/T}为包含单独的靶细胞和效应细胞的样品的相对发光单位，并且RLU_L为关于用Triton X-100裂解的细胞的相对发光单位。统计学分析通过使用PRISM软件来进行。从%特异性裂解对抗体浓度的标绘图所确定的EC₅₀值显示在表1中。

[0345] 表1. 关于IgG-重新格式化的抗体的CDC、ADCC和激动剂活性

抗体	CDC EC50 nM (MOLP-8)	ADCC EC50 nM (DAUDI)	ADCC EC50 nM (MOLP-8)	ADCC EC50 nM (RPMI-8226)	凋亡 EC50 nM (DAUDI)
BM-1	0.48 ± 0.16	0.03 ± 0.02	0.036 ± 0.013	0.13 ± 0.03	0.057
BM-2	0.65 ± 0.18	0.04 ± 0.02	0.024 ± 0.005	0.15 ± 0.04	0.062
Ab19	0.98 ± 0.26	0.08 ± 0.03	0.038 ± 0.008	0.46 ± 0.15	0.032
Ab43	2.2	0.12 ± 0.09	0.027 ± 0.018	3.84 ± 1.34	1.56
Ab72	0.66 ± 0.49	0.14 ± 0.12	0.193 ± 0.037	2.35 ± 0.99	0.35
Ab79	1.1 ± 0.39	0.03 ± 0.02	0.047 ± 0.012	0.46 ± 0.19	0.048
Ab110	1.99 ± 0.71	0.24 ± 0.17	0.874 ± 0.804	2.98 ± 0.91	0.40
Ab164	2.00 ± 0.83	ND	0.165 ± 0.154	1.2 ± 0.24	0.31

[0346] [0347] 实施例9:通过FACS的亲和力测定

[0348] 将表达CD38的MOLP-8细胞以大约2百万个细胞/mL的活细胞浓度悬浮在1%FBS缓冲液中。跨越两个96-孔平板的孔，将待测试的mAb在1x PBS中进行系列稀释(2-倍)。每个滴定的最后一个孔仅包含缓冲液。向每个孔添加额外的PBS和细胞悬浮液，从而使得最终体积为300~L/孔并且每个孔包含大约100,000个细胞。所述mAb列在下面，具有相应的用于滴定的最终mAb结合位点浓度(2X分子浓度)范围：

[0349] Benchmark 1, [mAb]结合位点=50.8nM-49.7pM;

[0350] Benchmark 2, [mAb]结合位点=49.5nM-48.3pM;

[0351] Ab 43, [mAb]结合位点=49.3nM-48.2pM;

[0352] Ab 110, [mAb]结合位点=204nM-49.9pM;

[0353] Ab 79, [mAb]结合位点=103nM-25.3pM;

[0354] Ab 72, [mAb]结合位点=103nM-25.2pM;

[0355] Ab 19, [mAb]结合位点=100nM-12.2pM。

[0356] 将平板放置入平板摇动器在4℃下5小时,之后在4℃下用1X PBS洗涤平板3次。然后,向每个孔中添加200μl的99nM Cy5山羊抗人IgG Fc特异性多克隆抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, #109-175-008),并将平板在4℃下摇动30分钟。将平板用1X PBS在4℃下再次洗涤2次,然后使用FACSCanto™ II HTS流式细胞仪来对于每个包含独特mAb结合位点浓度的孔记录5000个事件的平均荧光强度(MFI)。通过使用下述等式用Scientist 3.0软件非线性地拟合作为抗体结合位点浓度的函数的平均荧光强度的标绘图,以估计KD:

[0357] $F = p [(KD + LT + n(M)) - \{(KD + LT + n(M)) 2 - 4n(M)(LT)\}^{1/2}] / 2 + B$ 其中F(平均荧光强度)、LT(总mAb结合位点浓度)、p(比例常数,其将任意荧光单位与经结合的mAb相关联)、M(以体积摩尔浓度的细胞浓度;0.553fM,基于在300μl中的100,000个细胞)、n(受体数目/细胞)、B(背景信号)和KD=平衡解离常数。

[0358] 对于每条抗体滴度曲线,获得关于KD的估计值,因为P、n、B和KD在非线性分析中自由浮动。对于上面的等式的详细推导,参见Drake和Klakamp(2007), "A rigorous multiple independent binding site model for determining cell-based equilibrium dissociation constants," J. Immunol. Methods 318:157-62,其通过提及而合并入本文。表3以亲和力降低的顺序列出了对于所有抗体所得的KD,连同在括号中的每个拟合的95%置信区间。对于非线性曲线拟合,使用抗体结合位点浓度(2X分子浓度)。

[0359] 实施例10:通过Biacore®的亲和力测定

[0360] 在22℃下在Biacore™ A100上通过表面等离子体共振(SPR)分析来测定IgG抗体与可溶性CD38胞外结构域(ECD)的亲和力。通过使用标准的胺偶联来将山羊抗人IgG多克隆抗体(目录H10500)固定至CM5生物传感器芯片,其中固定至在芯片的所有四个流动池内的斑点1、2、4和5。在每个斑点上的固定化水平从5865RU变动至6899RU。人CD38获得自R&D Systems(Cat#2404-AC, Lot#PEH020812A)。通过使用在Pace等人(1995) "How to measure and predict molar absorption coefficient of a protein" Protein Science 4(11): 2411-23以及Pace和Grimsley(2004) "Spectrophotometric determination of protein concentration", Current Protocols in Protein Science, 第3章:第3.1单元中详细描述的方法来测定关于CD38的储液浓度,每篇参考文献的教导通过提及而合并入本文。

[0361] 运行缓冲液通过使经HEPES缓冲盐水、0.005%聚山梨酯20脱气并添加经过滤的BSA至100μg/mL的最终浓度来制备。用运行缓冲液将所有八种经纯化的mAb稀释至大约2μg/mL。初步实验估计待捕获的每种mAb的量,以便保持不大于~100RU的表面容量(R_{max})。对于每个mAb捕获/抗原注射循环,在每个流动池内的斑点1和5上捕获mAb,其中并置的斑点2和4充当各自的参考表面。以10μL/分钟的流速捕获每种经稀释的mAb 1分钟,随后为使运行缓冲液流动三分钟以用于表面稳定化。在所有四个流动池上在193.7nM-3.0nM(2x系列稀释)的浓度范围内以30μL/分钟注射HuCD38 120秒,随后为15分钟的解离阶段。样品都在运行缓冲液中进行制备并且以三次重复随机进行注射,其中间插有七次缓冲液注射以用于双参考。用10mM甘氨酸(pH 1.7)的两次20秒脉冲来使表面再生。

[0362] 用Scrubber 2.0c软件来处理所有传感图，并且在Scrubber 2.0c中整体拟合为1:1相互作用模型。将所得的结合常数显示在表2中。

[0363] 表2

抗体	FACS KD (nM) MOLP-8	FACS KD (pM) RPMI-8226	Biacore Ka (M⁻¹s⁻¹)	Biacore Kd (s⁻¹)	Biacore KD (nM)
BM-1	1.1 (0.9)	802	4.49×10^4	2.46×10^{-3}	54.8
BM-2	1.6 (0.6)	428	4.24×10^5	2.27×10^{-3}	5.4
Ab19	0.4 (0.3)	-	1.54×10^5	8.10×10^{-4}	5.3
Ab79	1.2 (1.1)	508	1.22×10^5	6.75×10^{-4}	5.5

Ab72	0.6 (0.4)	-	1.44×10^4	1.82×10^{-3}	126
Ab110	1.0 (0.1)	-	1.22×10^5	1.71×10^{-1}	1400
Ab43	1.1 (0.3)	-	2.72×10^5	1.46×10^{-1}	537
Ab164	1.4 (0.7)	-	1.99×10^5	7.15×10^{-2}	359

[0366] 实施例11:免疫荧光内化测定法

[0367] 使用免疫荧光技术来评价抗-CD38抗体向MOLP-8细胞中的内化。收集MOLP-8细胞，并且用1μg的直接与Alexa Fluor® 488相缀合的每种抗-CD38抗体在RPMI-1640中在4℃下将 5×10^6 个细胞染色10分钟。将细胞在包含1%BSA的PBS中进行洗涤，并且在4℃或37℃下将 1×10^6 个细胞温育3或6小时。通过使用2μg的兔抗-Alexa Fluor® - 488抗体(Invitrogen)，在4℃下将表面染色猝灭30分钟。洗涤细胞并在具有1%PFA的PBS中进行固定，转移至Microtest 96-孔平板(BD Biosciences)，并且要么使用FACSCanto™ II (BD Biosciences)流式细胞仪通过流式细胞术来进行评价，要么使用ImageXpress® Micro (Molecular Devices)在20x放大倍数下进行成像。

[0368] 实施例12:通过Biacore®的表位分箱(Binning)

[0369] 使用Biacore® A100仪器来对两种benchmark抗体以及Ab 19和Ab 79进行分箱。首先通过使用NHS/EDC偶联化学以高和低密度将抗体固定在CM5芯片上。对于每个循环的表位分箱实验，首先将CD38注射在这些表面上。然后，与以ELISA形式的“夹心测定法”类似地，将独特的抗体(取自经固定化的抗体的组)注射在包含CD38/抗体复合物的表面上。在每个循环结束时，使用磷酸脉冲来使表面再生。使用补充有BSA的HBS-P(10mM 10HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 0.005% P-20)在22℃下收集数据。通过使用在Biacore® A100评价软件包中的“表位作图(Epitope Mapping)”模块以及用于A100数据组的Scrubber的试验版本来处理所得的传感图。使用重复数据来从两次分开的实验产生关于上面的4种mAb的二元4x 4矩阵，如在表3中所显示的。

[0370] 表3

	Ab79	BM1	Ab19	BM2
Ab79	0	0	1	1
BM1	0	0	1	0
Ab19	1	1	0	0
BM2	1	0	0	0

[0372] 实施例13:在肿瘤学中的体内分析

[0373] 在人淋巴瘤的弥散性Daudi-萤光素酶模型中测试了Ab19和Ab79的体内功效。用 1×10^6 个Daudi-Luc肿瘤细胞静脉内注射来自Taconic Laboratories的6-8周龄雌性CB.17SCID小鼠。在第7个研究日,用帕利珠单抗、Ab79、Ab19、Benchmark 1和Benchmark 2以腹膜内方式处理小鼠。使用IVIS Xenogen系统(Caliper Life Sciences)从第21天开始每周进行生物发光成像以监测肿瘤负荷。对于成像,在成像前10分钟用萤光素酶底物(150mg/kg)IP注射动物,然后在异氟烷下麻醉动物并进行成像。结果显示在图8和图9中。

[0374] 实施例14:炎性/免疫性疾病相关性

[0375] CD38显示出在激活后在PBMC细胞中大幅上调。在来自正常供者的静息PMBC中,少于20%的静息细胞表达CD38,以大致10,000-20,000/细胞来计算受体数目。经激活的PMBC(再次来自正常供者)显示出60-75%的细胞表达CD38,其中受体数目显示为110,000-160,000/细胞。

[0376] 另外,如在图5中所显示的,在来自SLE患者的PMBC中CD38显示出增加的表达。

[0377] 将样品就CD38的过表达以免疫组织学方式进行测试。分析了来自SLE患者的19个样品,导致在B和T记忆细胞和pDC上观察到增加的CD38表达。分析了3名RA患者,其中显示了在所有三名患者中在滑膜组织中CD38浆细胞的浸润,以及增加的通过Ab79的滑膜组织的染色。分析了7名克罗恩病患者和6名溃疡性结肠炎患者,并且他们显示出在结肠的平滑肌中表达CD38的浆细胞的浸润(在来自患者的两个原代细胞样品上所测试的)。应当注意的是,测试了相同数目的正常患者,但没有显示这些结果。

[0378] 实施例15:使用抗-CD38抗体的耗竭

[0379] 用Ab79对食蟹猴进行按剂量给药显示出淋巴细胞、B和T细胞以及NK细胞的显著下降。以在图6中所显示的剂量经由30分钟IV输注来按剂量给予抗体,其中在24小时时采集数据。在第4、7、11和18天时显示了相似的数据。

[0380] 但是,pK/pD数据显示出在按剂量给药后动物的恢复。如在图7中所显示的,在单次IV 30分钟输注剂量后数天的时间段之后,甚至在最高剂量后,淋巴细胞计数返回至与对照计数相似,这表明用淋巴祖细胞不存在问题。

[0381] 实施例16:自身免疫疾病模型

[0382] 使用三个不同的模型

[0383] HuScid小鼠模型充当假移植物抗宿主模型以及关于抗破伤风应答、IgG耗竭和总存活的模型。用ASGM1对CB17/HuSCID小鼠进行注射以耗竭NK细胞,然后在一天后用人PBMC进行注射。让移入进行7-10天,其中收集血清以用于人Ig随机化。在一天后,以10mg/kg用Ab79对小鼠进行注射,随后为TTd,在4天后用第二个剂量,在那后3天用第三个剂量,其中收集血清以用于在那后3天(从第一个剂量起共10天)的人Ig计数和抗破伤风检测。图8显示了来自单个小鼠供者的结果,其指明了在治疗后所有Ig同种型的显著降低。图9显示了关于每个接受者组的平均Ig水平,其中每个数据点表示平均值/组(n=5至n=10)。图10显示了在AB79治疗后抗破伤风应答的显著减小。最后,图11显示了使用Ab79治疗的总的显著存活。

[0384] 替代小鼠实验

[0385] 由于Ab79不与啮齿类CD38交叉反应,因而开发了替代抗体。作为初步事项,通过使用针对人CD38的商业抗体和针对小鼠CD38的商业抗体,在人和小鼠之间在细胞类型之中的

CD38表达水平方面显示出显著的差异(参见图12),这显示疾病的生物学是不同的。因此,通过使用在猴模型中与猴CD38交叉反应的抗体,可以给出显著地更好的结果。

[0386] 开发了替代抗体,其显示出从脾、血液和骨髓中(数据未显示)以及从外周血中(参见图13)收获的CD38+细胞的相似的耗竭。另外,用在以10mg/kg的单剂量的小鼠替代物后1、2或3天时收集的脾、血液和骨髓,在图14中显示了耗竭动力学。在24小时内显示出在血液中的B细胞的快速耗竭,而在脾和骨髓中显示出更慢的耗竭。

[0387] 小鼠SLE模型

[0388] 在MRL/lpr模型中测试了替代小鼠抗-CD38,其中使用下面的暂时性读数(例如,每两周),来自血液:抗-dsDNA自身抗体、CBC、关于T/B细胞耗竭的FACS、尿中的蛋白质白蛋白和皮肤炎症。终末读数包括但不限于,来自血液:抗-dsDNA自身抗体、CBC、关于T/B细胞耗竭的FACS,来自脾、淋巴结和骨髓:器官重量、免疫细胞数目、关于T/B细胞耗竭的FACS,对于肾:器官重量、组织病理学(H&E和PAS)、IC沉积、炎性细胞和皮肤炎症(组织病理学)。

[0389] 胶原诱导的关节炎(CIA)模型

[0390] 通过使用小鼠替代抗体,以7组小鼠来使用小鼠CIA模型,以评价前预防(prophylactic)、预防和治疗功效。所有小鼠在第0天用CII/CFA进行免疫接种,在第21天用CII/CFA加强进行免疫接种,这通常从第21天至第42天(研究结束)导致疾病进展。第1组(10只小鼠)从第0天开始一周两次用10mg/kg替代抗体进行IP注射(前预防)。第2组(n=10)类似地进行按剂量给药,但在第21天开始。第3组(n=10)在疾病发作时(第25-28天)类似地进行注射。第4组(n=10)在第0天以相同的水平进行按剂量给药,但用hIgG1(例如,同种型)。第5组(n=10)以相同的水平用hIgG1进行按剂量给药,但在第21天开始。第6组(n=10)在第21天用0.5mg/1水的地塞米松进行按剂量给药,和第7组(n=5)不进行治疗。

[0391] 进行食蟹猴CIA研究,其中对于每个组使用n=3,第1组为幼稚动物,仅载料。第2组为以q1w以3mg/kg或10mg/kg的单剂量的Ab79(预防性治疗在胶原免疫接种后第7天时开始)。第3组为以q1w以3mg/kg或10mg/kg的Ab79,用于治疗性治疗,在疾病发作时(第21天或第28天)开始。第4组也在疾病发作时以0.1mg/kg q1d用地塞米松进行治疗。

[0392] 实施例17:Ab79在体外耗竭人浆细胞/成浆细胞

[0393] 在使用人外周血单核细胞(PBMC)或骨髓单核细胞(BMMC)的体外培养系统中,Ab79的添加耗竭PB/PC群体,其以CD27、CD38和CD138的细胞表面表达以及细胞内浆细胞标志物IRF4为特征(图14)。Ab79耗竭短寿的浆细胞(CD19+浆细胞)和来自骨髓的长寿的浆细胞(CD19-浆细胞)两者(图15)。浆细胞和成浆细胞是在身体中的初级抗体分泌细胞(ASC)。参见Hibi T和Dosch HM.Eur J Immunol(1986)16(2):139-145。通过ELISpot(图16)直接测量的ASC在健康受试者和SLE患者样品中减少(图17)。在上图版中在来自健康受试者的样品中,Ab79治疗导致来自血液和骨髓的IgG生成细胞的数目的70%减少。在SLE患者样品中看到相似的耗竭。另外,产生自身抗原特异性抗体VH4-34 9G4+和抗-Ro的细胞的数目减少(图18)。这些结果强调了Ab79单克隆抗体作为用于通过PB/PC耗竭来对SLE进行治疗的治疗剂的潜力。通过靶向在所有PB/PC细胞上高表达的分子CD38,Ab79有效地耗竭短寿的和长寿的ASC两者。

[0394] 实施例18:使用适合于在临床情景下和在用Ab79进行治疗的受试者中进行使用的方法来检测在全血中的PB/PC

[0395] 来自健康志愿者的全血的流式细胞术分析显示,CD38在PB/PC上高表达,并且使用下面所描述的固定/冷冻方法用Ab19mAb进行的染色清楚地辨别B细胞的CD45+, CD3-, CD19+, CD38+, CD27+亚群,包括PB和PC两者(图19a-d)。

[0396] 将从健康志愿者中收集的全血用CD3-PE、CD27-APC、CD45-AF700、CD19-V450、CD38-FITC进行染色。对于流式细胞术分析,对细胞进行门控以鉴定单个细胞,然后使用“前向散射(FSC)”对“侧向散射(SSC)”来比较血液相对大小和粒度(A),并且在此基础上鉴定单核细胞淋巴细胞的CD45+染色(B)。在该群体内的B细胞被鉴定为CD3-CD19+细胞(C)。成浆细胞和浆细胞都被鉴定为CD27+CD38明亮细胞(图版D)。

[0397] 为了对全血样品进行染色,将包含供者样品等分试样的管以500RCF离心5分钟,倾析出上清液,并且对所述管进行架上耙刮以分散细胞粒状沉淀。将细胞用2mL的具有1%BSA的PBS进行洗涤,以500RCF离心5分钟,倾析出上清液,并且对所述管进行架上耙刮以分散细胞粒状沉淀。对于每个样本进行细胞计数,并且用具有1%BSA的PBS将细胞计数调整在 20×10^6 个细胞/mL和 40×10^6 个细胞/mL之间,如果需要。将200μL吸移到经适当地标记的管中。向每只管中添加合适量的人血清,涡旋振荡,并放置在黑暗中以温育10分钟。每只管接收合适量的抗体。将所有样品充分涡旋振荡,并且在室温下在黑暗中温育30分钟。在温育后,用2mL的具有1%BSA的PBS洗涤细胞。将所述管以500RCF离心5分钟,倾析出上清液,并且对所述管进行架上耙刮以分散细胞粒状沉淀。在离心后,将细胞在500μL 1%低聚甲醛中重构。在BD FACSCantoII流式细胞仪上获取样品。获取大约1,000,000个总事件或者直至已经达到240秒。下列试剂用于进行染色:

[0398] CD3PE(克隆:SK7)-BD,目录号347347;

[0399] CD27APC(克隆:M-T271)-BD Pharmingen,目录号558664;

[0400] CD45AF700(克隆:HI30)-Biolegend,目录号304024;

[0401] CD19V450(克隆:HIB19)-BD Horizon,目录号560353;

[0402] CD38(Ab19);

[0403] 1X FACSlyse;

[0404] 具有1%BSA的PBS;

[0405] 1%低聚甲醛溶液;

[0406] Quantum MESF FITC校准珠粒(LabCorp Analytical Systems);

[0407] Quantum MESF APC校准珠粒(LabCorp Analytical Systems)。

[0408] 实施例19:在没有固定剂的或者用FACSLyse进行处理并冷冻的全血中PB/PC稳定性的比较

[0409] 传统储存方法和流式细胞术

[0410] 将五个健康供者全血样本收集入包含肝素钠抗凝剂的管中。在第0天(收集后<2小时)由两名独立的操作者以三次重复对样品进行测试。然后,将样本保持在环境温度下,并且在收集后第1天(24-30小时)、第2天(48-54小时)和第3天(72-48小时)以单次进行测试。然后,如对于实施例18所描述的那样进行染色。

[0411] 结果显示在表4中。

[0412] 表4

供者	收集后 第 天	所收集的 总事件	为 CD38++/CD27++ 的 CD19+ B 细胞的 %
供者 1	0	1104419	0.85
	1	226287	0.14
	2	1066353	0.13
	3	1094968	0.17
供者 2	0	885060	0.64
	1	232424	0.40
	2	615546	0.16
	3	500499	0.20
[0413] 供者 3	0	241812	0.58
	1	830574	0.14
	2	853470	0.15
	3	528552	0.07
供者 4	0	754839	2.23
	1	1046385	0.64
	2	964089	0.29
	3	577233	0.27
供者 5	0	1112831	3.80
	1	1098387	0.99
	2	1126494	0.61
	3	625239	0.42

[0414] c. 固定/冷冻储存方法和流式细胞术

[0415] 收集五个健康供者全血样本(肝素钠抗凝剂),并且将样品分成四个等分试样。将第一个等分试样按照FACSLyse方法新鲜地进行测试(没有冷冻步骤),以建立成浆细胞的基线测量。在第0天(收集后<2小时)由两名独立的操作者以三次重复对新鲜样品进行测试。将其他三个等分试样在与FACSLyse一起温育10分钟后于-80°C进行冷冻。在第1天(24-30小时)将第二个等分试样在38°C水浴中解冻并进行处理。在收集后第2天(48-54小时)将第三个等分试样解冻,和在收集后第3天(72-78小时)将第四个等分试样解冻。关于第1-3天的处理以单次进行。

[0416] 在38°C水浴中解冻经冷冻的等分试样直至在锥形器皿中样本为流体,然后放置在样品摇荡器上以完成解冻过程。将所述管以500RCF离心5分钟,倾析出上清液,并且对所述管进行架上耙刮以分散细胞粒状沉淀。将细胞用2mL的具有1%BSA的PBS进行洗涤,以500RCF离心5分钟,倾析出上清液,并且对所述管进行架上耙刮以分散细胞粒状沉淀。对于每个样本进行细胞计数,并且用具有1%BSA的PBS将细胞计数调整在 20×10^6 个细胞/mL和 40×10^6 个细胞/mL之间,如果需要。将200μL吸移到经适当地标记的管中。向每只管中添加合适量的人血清,涡旋振荡,并放置在黑暗中以温育10分钟。每只管接收合适量的抗体。将

所有样品充分涡旋振荡，并且在室温下在黑暗中温育30分钟。在温育后，用2mL的具有1% BSA的PBS洗涤细胞。将所述管以500RCF离心5分钟，倾析出上清液，并且对所述管进行架上耙刮以分散细胞粒状沉淀。在离心后，将细胞在500μL 1% 低聚甲醛中重构。在BD FACSCantoII流式细胞仪上获取样品。获取大约1,000,000个总事件或者直至达到240秒。结果显示在表5中。

[0417] 表5

供者	收集后 第 天	所收集的 总事件	为 CD38++/CD27++的 CD19+ B 细胞的%
供者 1	0	1000000	0.14
	1	830650	0.10
	2	908750	0.09
	3	737475	0.12
供者 2	0	230400	0.94
	1	794125	1.03
	2	662925	1.05
	3	714550	1.08
[0418] 供者 3	0	248500	0.17
	1	934225	0.21
	2	315400	0.24
	3	842975	0.20
供者 4	0	892050	0.32
	1	1000000	0.49
	2	528175	0.32
	3	600675	0.24
供者 5	0	257450	0.48
	1	1000000	0.49
	2	962875	0.43
	3	1000000	0.47

[0419] 实例例20:Ab79不抑制用CD38-特异性mAb Ab19进行的染色

[0420] 收集五个健康供者全血样本(肝素钠抗凝剂)，并且在37℃下换入Ab79(10μg/mL和零)一小时。在温育后，将样品分成四个等分试样。将第一个等分试样按照FACSLyse方法新鲜地进行测试(没有冷冻步骤)，以建立成浆细胞的基线测量。在第0天(收集后<2小时)由两名独立的操作者以三次重复对新鲜样品进行测试。将其他三个等分试样在与FACSLyse一起温育10分钟后于-80℃进行冷冻。在第1天(24-30小时)将第二个等分试样在38℃水浴中解冻并进行处理。在收集后第2天(48-54小时)将第三个等分试样解冻，和在收集后第3天(72-78小时)将第四个等分试样解冻。关于第1-3天的处理以单次进行。

[0421] 在38℃水浴中解冻经冷冻的等分试样直至在锥形器皿中样本为流体，然后放置在

样品摇荡器上以完成解冻过程。将所述管以500RCF离心5分钟，倾析出上清液，并且对所述管进行架上耙刮以分散细胞粒状沉淀。将细胞用2mL的具有1% BSA的PBS进行洗涤，以500RCF离心5分钟，倾析出上清液，并且对所述管进行架上耙刮以分散细胞粒状沉淀。对于每个样本进行细胞计数，并且用具有1% BSA的PBS将细胞计数调整在 20×10^6 个细胞/mL和 40×10^6 个细胞/mL之间，如果需要。将200μL吸移到经适当地标记的管中。向每只管中添加合适量的人血清，涡旋振荡，并放置在黑暗中以温育10分钟。每只管接收合适量的抗体。将所有样品充分涡旋振荡，并且在室温下在黑暗中温育30分钟。在温育后，用2mL的具有1% BSA的PBS洗涤细胞。将所述管以500RCF离心5分钟，倾析出上清液，并且对所述管进行架上耙刮以分散细胞粒状沉淀。在离心后，将细胞在500μL 1% 低聚甲醛中重构。在BD FACSCantoII流式细胞仪上获取样品。获取大约1,000,000个总事件或者直至达到240秒。结果显示在表6中。

[0422] 表6

[0423]	健康的 血液供者	所收集的 总事件	为 CD38++/CD27++ 的 CD19+ B 细胞 的 %	所收集的 总事件	为 CD38++/CD27++ 的 B 细胞 (CD19+) 的 %
	在 10 μg/ml Ab79 存在下		未添加 Ab79		
	供者 1	1000000	0.14	1000000	0.14
	供者 2	818625	0.86	230400	0.94
	供者 3	247425	0.18	248500	0.17
	供者 4	255675	0.28	892050	0.32
	供者 5	255400	0.48	257450	0.48

[0424] 实施例21：用Ab79进行治疗的健康受试者展示出PB/PC的剂量依赖性减少，如通过使用固定/冷冻方法和流式细胞术分析所测量的

[0425] 在健康受试者中的Ab79随机化的、双盲的、安慰剂-控制的单剂量研究的最高剂量群组之中评价PB/PC水平。将Ab79或安慰剂要么作为2-小时IV输注要么作为以多个剂量水平的SC施用来进行施用。在临床场所收集全血。将在治疗之前(2个筛选时间，第-1天和剂量前第1天)收集的样品用于建立基线。取决于施用途径，在1小时直至78小时的时间段内在14个时间点处收集治疗后的样品。在经SC治疗的受试者中收集大多数的PB/PC数据。使用上面所描述的固定/冷冻方法来保存所有样品，并且使用多色流式细胞术分析来进行分析。

[0426] 在经SC治疗的受试者中中值血液PB/PC细胞计数的比较显示，在安慰剂治疗后存在随时间的PB/PC水平的变化，但是用Ab79进行的治疗导致在Ab79治疗组中PB/PC的始终如一的下降，其持续直至20天。结果显示在图20中。

[0427] 序列表

[0428] SEQ ID NO:1 (CD38智人 (Homo sapiens) ;NP_001766.2)

[0429] MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPRWRQQWSGP GTTKRFPETVLARCVK
YTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKGQTVPCKNILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLE
DTLLGYLADDLTWC GefNTSKINYQSCP DWRKDCSNNPVSFWKTVSRRFAEAACDVHVMLNGRSKIFDKNSTFG
SVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIQFSCKNIYRPDKFLQCVKNP PEDSSCTSEI

- [0430] SEQ ID NO:2 (CD38食蟹猕猴 (*Macaca fascicularis*) ; AAT36330.1) MANCEFSPVSG DKPCCRLSRRAQVCLGVCLLVLILVVVVAVVLPRWRQQWSGSGTTSRFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWD AFKGAFISKYPCNITEEDYQPLVKLGTQTPCNKTLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLTWCGEFN TFEINYQSCPDWRKDCSNNPVSFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQALEAW VIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIFFCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCLSGI
- [0431] SEQ ID NO:3 (HCDR1Ab79)
- [0432] GFTFDDYG
- [0433] SEQ ID NO:4 (HCDR2Ab79)
- [0434] ISWNGGKT
- [0435] SEQ ID NO:5 (HCDR3Ab79)
- [0436] ARGSLFHDSSGFYFGH
- [0437] SEQ ID NO:6 (LCDR1Ab79)
- [0438] SSNIGDNY
- [0439] SEQ ID NO:7 (LCDR2Ab79)
- [0440] RDS
- [0441] SEQ ID NO:8 (LCDR3Ab79)
- [0442] QSYDSSLGS
- [0443] SEQ ID NO:9 (重链Ab79)
- [0444] EVQLLESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSDISWNGKTHYVDSVKGQFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFHDSSGFYFGHWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLA
- [0445] SEQ ID NO:10 (轻链Ab79)
- [0446] QSVLQTQPPSASGTPGQRTVTISCGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQRPSGPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL
- [0447] SEQ ID NO:11 (重链Ab19)
- [0448] EVQLLESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDKDYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYGFSGPSMDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLA
- [0449] SEQ ID NO:12 (轻链Ab19)
- [0450] QSVLQTQPPSASGTPGQRTVTISCGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSGPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL
- [0451] SEQ ID NO:13 (HCDR1Ab19)
- [0452] GFTFNNYD
- [0453] SEQ ID NO:14 (HCDR2Ab19)
- [0454] ISYDGSDK
- [0455] SEQ ID NO:15 (HCDR3Ab19)
- [0456] ARVYYYGFSGPSMDV
- [0457] SEQ ID NO:16 (LCDR1Ab19)
- [0458] NSNIGSNT
- [0459] SEQ ID NO:17 (LCDR2Ab19)
- [0460] SDS

- [0461] SEQ ID NO:18 (LCDR3Ab19)
- [0462] QSYDSSLSGR
- [0463] SEQ ID NO:19 (重链Ab19) w/恒定
- [0464] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDKDYADSVKGRFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYGFGPSMDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0465] SEQ ID NO:20 (轻链Ab19) w/恒定
- [0466] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSGPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP
GAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
- [0467] SEQ ID NO:21 (重链Ab79)
- [0468] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVDISWNGKTHYVDSVKQFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFHDSGXFYFGHWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
KSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0469] SEQ ID NO:22 (轻链Ab79)
- [0470] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQRPSGPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSVFGGGKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG
AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
- [0471] SEQ ID NO:23 (CD157智人;NP_004325)
- [0472] MAAQGCAASRLLQLLLQLLLLLLAAGGARARWRGEHTSAHLRDIFLGRCAEYRALLSPEQRNKNCTA
IWEAFKVALDKDPCSVLPDSYDLFINLSRHISPRDKSLFWENSHLLVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQ
KNDSGLDYQSCPTS
- [0473] EDCENNPDWFKRASIQYSKDSSGVIVHMLNGSEPTGAYPIKGFADYEIPNLQKEKITRIEIWMHE
IGGPNVESCSEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAPSLYTEQRAGLI
PLFLVLASRTQL
- [0474] SEQ ID NO:24 (Benchmark 1; 重链可变区)
- [0475] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTYYADSVKGRFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWQGQGTLTVSS
- [0476] SEQ ID NO:25 (Benchmark 1; 轻链可变区)
- [0477] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTLKVEIKR
- [0478] SEQ ID NO:26 (Benchmark 2; 重链可变区)
- [0479] QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGTIYPGDGDTGYAQKFQGKAT

LTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGDYYGSNSLDYWQGQTSVTVSS

[0480] SEQ ID NO:27 (Benchmark 2;轻链可变区)

[0481] DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRIYSASYRYIGPDRFTGSGAGT
DFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGTKLEIKR

[0482] SEQ ID NO:28(重链Ab43)

[0483] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSINSDGSSSYADSMKGQFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYYYYAMDVGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPABLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTVKDKRVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGK

[0484] SEQ ID NO:29(轻链Ab43)

[0485] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGGSSNIGYKTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGLVFGGKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG
AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0486] SEQ ID NO:30(重链Ab72)

[0487] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWVRQAPGKGLEWVGISGSGSTYYADSVKGRFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSNYDFWSGYGGMDVGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPABLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTVKDKRVE
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
EEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSSLSPG
K

[0488] SEQ ID NO:31(轻链Ab72)

[0489] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSKTVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCSSYARSTNIIFGGGKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG
AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0490] SEQ ID NO:32(重链Ab110)

[0491] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSIYSGGSTYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRATWGGATHDYGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPABLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTVKDKRVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSSLSPGK

[0492] SEQ ID NO:33(轻链Ab110)

[0493] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLNGLVFGGKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG
AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0494] SEQ ID NO:34(重链Ab19)w/恒定

[0495] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDKDYADSVKGRFT
ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYGFSGPSMDVWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0496] SEQ ID NO:35(轻链Ab19) w/恒定

[0497] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSGPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYYDSSLGSRVFGGTKLTVLGQPKANPTVLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP
GAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0498] 已经详细地并通过参考其具体的实施方案描述了本发明,因而将会显然的是,修饰和改变是可能的,而不背离在所附的权利要求书中所定义的本发明的范围。更特别地,虽然本发明的一些方面在本文中被鉴定为是特别有利的,但是所打算的是,本发明并非必需局限于本发明的这些特定方面。

- [0001] 序列表
[0002] <110> Takeda Pharmaceutical Company Limited
[0003] SMITHSON, Glennda
[0004] ESTEVAM, Jose
[0005] JONES, Nicholas
[0006] <120> 用于评估对于成浆细胞和浆细胞耗竭性疗法的应答的方法和材料
[0007] <130> 67376-266608
[0008] <140> 待分配的PCT专利申请号
[0009] <141> 2017-07-14
[0010] <150> 62/362.963
[0011] <151> 2016-07-15
[0012] <160> 35
[0013] <170> PatentIn version 3.5
[0014] <210> 1
[0015] <211> 300
[0016] <212> PRT
[0017] <213> 智人
[0018] <400> 1
[0019] Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
[0020] 1 5 10 15
[0021] Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val
[0022] 20 25 30
[0023] Leu Ile Leu Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln
[0024] 35 40 45
[0025] Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu
[0026] 50 55 60
[0027] Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val
[0028] 65 70 75 80
[0029] Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys
[0030] 85 90 95
[0031] His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu
[0032] 100 105 110
[0033] Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile
[0034] 115 120 125
[0035] Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr
[0036] 130 135 140
[0037] Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys
[0038] 145 150 155 160

[0039]	Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp			
[0040]		165	170	175
[0041]	Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val			
[0042]		180	185	190
[0043]	Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu			
[0044]		195	200	205
[0045]	Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser			
[0046]		210	215	220
[0047]	Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala			
[0048]		225	230	235
[0049]	Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp			
[0050]		245	250	255
[0051]	Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln			
[0052]		260	265	270
[0053]	Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val			
[0054]		275	280	285
[0055]	Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile			
[0056]		290	295	300
[0057]	<210> 2			
[0058]	<211> 301			
[0059]	<212> PRT			
[0060]	<213> 食蟹猕猴			
[0061]	<400> 2			
[0062]	Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys			
[0063]		1	5	10
[0064]				15
[0065]	Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Val Cys Leu Gly Val Cys Leu Leu Val			
[0066]		20	25	30
[0067]	Leu Leu Ile Leu Val Val Val Ala Val Val Leu Pro Arg Trp Arg			
[0068]		35	40	45
[0069]	Gln Gln Trp Ser Gly Ser Gly Thr Thr Ser Arg Phe Pro Glu Thr Val			
[0070]		50	55	60
[0071]	Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Val His Pro Glu Met Arg His			
[0072]		65	70	75
[0073]	75	80	85	90
[0074]	Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser			
[0075]		95	100	105
[0076]	Lys Tyr Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Val Lys			
[0077]		110	115	120
[0078]	Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Thr Leu Leu Trp Ser Arg			
[0079]		125	130	135

[0078]	Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe		
[0079]	130	135	140
[0080]	Thr Leu Glu Asp Met Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp		
[0081]	145	150	155
[0082]	Cys Gly Glu Phe Asn Thr Phe Glu Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp		160
[0083]	165	170	175
[0084]	Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr		
[0085]	180	185	190
[0086]	Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Thr Ala Cys Gly Val Val His Val Met		
[0087]	195	200	205
[0088]	Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly		
[0089]	210	215	220
[0090]	Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Ala Leu Glu		
[0091]	225	230	235
[0092]	Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln		
[0093]	245	250	255
[0094]	Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile		
[0095]	260	265	270
[0096]	Arg Phe Phe Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys		
[0097]	275	280	285
[0098]	Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Leu Ser Gly Ile		
[0099]	290	295	300
[0100]	<210> 3		
[0101]	<211> 8		
[0102]	<212> PRT		
[0103]	<213> 人工序列		
[0104]	<220>		
[0105]	<223> Ab79重链CDR1		
[0106]	<400> 3		
[0107]	Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly		
[0108]	1	5	
[0109]	<210> 4		
[0110]	<211> 8		
[0111]	<212> PRT		
[0112]	<213> 人工序列		
[0113]	<220>		
[0114]	<223> Ab79重链CDR2		
[0115]	<400> 4		
[0116]	Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr		

- [0117] 1 5
- [0118] <210> 5
- [0119] <211> 16
- [0120] <212> PRT
- [0121] <213> 人工序列
- [0122] <220>
- [0123] <223> Ab79重链CDR3
- [0124] <400> 5
- [0125] Ala Arg Gly Ser Leu Phe His Asp Ser Ser Gly Phe Tyr Phe Gly His
- [0126] 1 5 10 15
- [0127] <210> 6
- [0128] <211> 8
- [0129] <212> PRT
- [0130] <213> 人工序列
- [0131] <220>
- [0132] <223> Ab79轻链CDR1
- [0133] <400> 6
- [0134] Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn Tyr
- [0135] 1 5
- [0136] <210> 7
- [0137] <211> 3
- [0138] <212> PRT
- [0139] <213> 人工序列
- [0140] <220>
- [0141] <223> Ab79轻链CDR2
- [0142] <400> 7
- [0143] Arg Asp Ser
- [0144] 1
- [0145] <210> 8
- [0146] <211> 10
- [0147] <212> PRT
- [0148] <213> 人工序列
- [0149] <220>
- [0150] <223> Ab79轻链CDR3
- [0151] <400> 8
- [0152] Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser
- [0153] 1 5 10
- [0154] <210> 9
- [0155] <211> 135

[0156] <212> PRT
 [0157] <213> 人工序列
 [0158] <220>
 [0159] <223> Ab79重链可变区
 [0160] <400> 9
 [0161] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0162] 1 5 10 15
 [0163] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 [0164] 20 25 30
 [0165] Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0166] 35 40 45
 [0167] Ser Asp Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr His Tyr Val Asp Ser Val
 [0168] 50 55 60
 [0169] Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0170] 65 70 75 80
 [0171] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0172] 85 90 95
 [0173] Ala Arg Gly Ser Leu Phe His Asp Ser Ser Gly Phe Tyr Phe Gly His
 [0174] 100 105 110
 [0175] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 [0176] 115 120 125
 [0177] Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 [0178] 130 135
 [0179] <210> 10
 [0180] <211> 129
 [0181] <212> PRT
 [0182] <213> 人工序列
 [0183] <220>
 [0184] <223> Ab79轻链可变区
 [0185] <400> 10
 [0186] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 [0187] 1 5 10 15
 [0188] Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn
 [0189] 20 25 30
 [0190] Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 [0191] 35 40 45
 [0192] Ile Tyr Arg Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 [0193] 50 55 60
 [0194] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

[0195]	65	70	75	80
[0196]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu			
[0197]		85	90	95
[0198]	Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln			
[0199]		100	105	110
[0200]	Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu			
[0201]		115	120	125
[0202]	Leu			
[0203]	<210> 11			
[0204]	<211> 134			
[0205]	<212> PRT			
[0206]	<213> 人工序列			
[0207]	<220>			
[0208]	<223> Ab19重链			
[0209]	<400> 11			
[0210]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0211]	1 5 10 15			
[0212]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr			
[0213]		20 25 30		
[0214]	Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0215]		35 40 45		
[0216]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val			
[0217]		50 55 60		
[0218]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0219]	65 70 75 80			
[0220]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0221]		85 90 95		
[0222]	Ala Arg Val Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val Trp			
[0223]		100 105 110		
[0224]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
[0225]		115 120 125		
[0226]	Ser Val Phe Pro Leu Ala			
[0227]		130		
[0228]	<210> 12			
[0229]	<211> 130			
[0230]	<212> PRT			
[0231]	<213> 人工序列			
[0232]	<220>			
[0233]	<223> Ab19轻链			

- [0234] <400> 12
- [0235] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
- [0236] 1 5 10 15
- [0237] Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
- [0238] 20 25 30
- [0239] Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
- [0240] 35 40 45
- [0241] Ile Tyr Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
- [0242] 50 55 60
- [0243] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
- [0244] 65 70 75 80
- [0245] Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
- [0246] 85 90 95
- [0247] Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
- [0248] 100 105 110
- [0249] Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
- [0250] 115 120 125
- [0251] Glu Leu
- [0252] 130
- [0253] <210> 13
- [0254] <211> 8
- [0255] <212> PRT
- [0256] <213> 人工序列
- [0257] <220>
- [0258] <223> Ab19重链CDR1
- [0259] <400> 13
- [0260] Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Asp
- [0261] 1 5
- [0262] <210> 14
- [0263] <211> 8
- [0264] <212> PRT
- [0265] <213> 人工序列
- [0266] <220>
- [0267] <223> Ab19重链CDR2
- [0268] <400> 14
- [0269] Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys
- [0270] 1 5
- [0271] <210> 15
- [0272] <211> 15

- [0273] <212> PRT
[0274] <213> 人工序列
[0275] <220>
[0276] <223> Ab19重链CDR3
[0277] <400> 15
[0278] Ala Arg Val Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val
[0279] 1 5 10 15
[0280] <210> 16
[0281] <211> 8
[0282] <212> PRT
[0283] <213> 人工序列
[0284] <220>
[0285] <223> Ab19轻链CDR1
[0286] <400> 16
[0287] Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr
[0288] 1 5
[0289] <210> 17
[0290] <211> 3
[0291] <212> PRT
[0292] <213> 人工序列
[0293] <220>
[0294] <223> Ab19轻链CDR2
[0295] <400> 17
[0296] Ser Asp Ser
[0297] 1
[0298] <210> 18
[0299] <211> 11
[0300] <212> PRT
[0301] <213> 人工序列
[0302] <220>
[0303] <223> Ab19轻链CDR3
[0304] <400> 18
[0305] Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Arg
[0306] 1 5 10
[0307] <210> 19
[0308] <211> 452
[0309] <212> PRT
[0310] <213> 人工序列
[0311] <220>

[0312]	<223> Ab19重链															
[0313]	<400> 19															
[0314]	Glu	Val	Gln													
[0315]	1	5	10													
[0316]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Asn	Tyr
[0317]	20	25	30													
[0318]	Asp	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[0319]	35	40	45													
[0320]	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asp	Lys	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[0321]	50	55	60													
[0322]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[0323]	65	70	75	80												
[0324]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0325]	85	90	95													
[0326]	Ala	Arg	Val	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Phe	Ser	Gly	Pro	Ser	Met	Asp	Val	Trp
[0327]	100	105	110													
[0328]	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
[0329]	115	120	125													
[0330]	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
[0331]	130	135	140													
[0332]	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
[0333]	145	150	155	160												
[0334]	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
[0335]	165	170	175													
[0336]	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
[0337]	180	185	190													
[0338]	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
[0339]	195	200	205													
[0340]	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
[0341]	210	215	220													
[0342]	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
[0343]	225	230	235	240												
[0344]	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
[0345]	245	250	255													
[0346]	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
[0347]	260	265	270													
[0348]	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
[0349]	275	280	285													
[0350]	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr

[0351]	290	295	300
[0352]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
[0353]	305	310	315
[0354]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
[0355]	325	330	335
[0356]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
[0357]	340	345	350
[0358]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
[0359]	355	360	365
[0360]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val		
[0361]	370	375	380
[0362]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
[0363]	385	390	395
[0364]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		
[0365]	405	410	415
[0366]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
[0367]	420	425	430
[0368]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
[0369]	435	440	445
[0370]	Ser Pro Gly Lys		
[0371]	450		
[0372]	<210> 20		
[0373]	<211> 217		
[0374]	<212> PRT		
[0375]	<213> 人工序列		
[0376]	<220>		
[0377]	<223> Ab19轻链		
[0378]	<400> 20		
[0379]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		
[0380]	1 5 10 15		
[0381]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn		
[0382]	20 25 30		
[0383]	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu		
[0384]	35 40 45		
[0385]	Ile Tyr Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
[0386]	50 55 60		
[0387]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg		
[0388]	65 70 75 80		
[0389]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu		

[0390]	85	90	95
[0391]	Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
[0392]	100	105	110
[0393]	Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu		
[0394]	115	120	125
[0395]	Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe		
[0396]	130	135	140
[0397]	Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val		
[0398]	145	150	155
[0399]	Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys		
[0400]	165	170	175
[0401]	Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser		
[0402]	180	185	190
[0403]	His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu		
[0404]	195	200	205
[0405]	Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
[0406]	210	215	
[0407]	<210> 21		
[0408]	<211> 453		
[0409]	<212> PRT		
[0410]	<213> 人工序列		
[0411]	<220>		
[0412]	<223> Ab79重链		
[0413]	<400> 21		
[0414]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0415]	1	5	10
[0416]	15		
[0417]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr		
[0418]	20	25	30
[0419]	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0420]	35	40	45
[0421]	Gly		
[0422]	Ser Asp Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr His Tyr Val Asp Ser Val		
[0423]	50	55	60
[0424]	Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0425]	65	70	75
[0426]	80		
[0427]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0428]	85	90	95
[0429]	Ala Arg Gly Ser Leu Phe His Asp Ser Ser Gly Phe Tyr Phe Gly His		
[0430]	100	105	110
[0431]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		

[0429]	115	120	125
[0430]	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
[0431]	130	135	140
[0432]	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
[0433]	145	150	155
[0434]	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
[0435]	165	170	175
[0436]	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
[0437]	180	185	190
[0438]	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
[0439]	195	200	205
[0440]	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys		
[0441]	210	215	220
[0442]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
[0443]	225	230	235
[0444]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[0445]	245	250	255
[0446]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[0447]	260	265	270
[0448]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0449]	275	280	285
[0450]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
[0451]	290	295	300
[0452]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
[0453]	305	310	315
[0454]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[0455]	325	330	335
[0456]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
[0457]	340	345	350
[0458]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
[0459]	355	360	365
[0460]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0461]	370	375	380
[0462]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0463]	385	390	395
[0464]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0465]	405	410	415
[0466]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0467]	420	425	430

[0468]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser			
[0469]	435	440	445	
[0470]	Leu Ser Pro Gly Lys			
[0471]	450			
[0472]	<210> 22			
[0473]	<211> 216			
[0474]	<212> PRT			
[0475]	<213> 人工序列			
[0476]	<220>			
[0477]	<223> Ab79轻链			
[0478]	<400> 22			
[0479]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
[0480]	1 5 10 15			
[0481]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn			
[0482]	20 25 30			
[0483]	Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
[0484]	35 40 45			
[0485]	Ile Tyr Arg Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
[0486]	50 55 60			
[0487]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg			
[0488]	65 70 75 80			
[0489]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu			
[0490]	85 90 95			
[0491]	Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln			
[0492]	100 105 110			
[0493]	Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu			
[0494]	115 120 125			
[0495]	Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr			
[0496]	130 135 140			
[0497]	Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys			
[0498]	145 150 155 160			
[0499]	Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr			
[0500]	165 170 175			
[0501]	Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His			
[0502]	180 185 190			
[0503]	Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys			
[0504]	195 200 205			
[0505]	Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
[0506]	210 215			

[0507]	<210>	23		
[0508]	<211>	318		
[0509]	<212>	PRT		
[0510]	<213>	智人		
[0511]	<400>	23		
[0512]	Met Ala Ala Gln Gly Cys Ala Ala Ser Arg Leu Leu Gln Leu Leu Leu			
[0513]	1	5	10	15
[0514]	Gln Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Gly Ala Arg Ala			
[0515]	20	25	30	
[0516]	Arg Trp Arg Gly Glu Gly Thr Ser Ala His Leu Arg Asp Ile Phe Leu			
[0517]	35	40	45	
[0518]	Gly Arg Cys Ala Glu Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Pro Glu Gln Arg Asn			
[0519]	50	55	60	
[0520]	Lys Asn Cys Thr Ala Ile Trp Glu Ala Phe Lys Val Ala Leu Asp Lys			
[0521]	65	70	75	80
[0522]	Asp Pro Cys Ser Val Leu Pro Ser Asp Tyr Asp Leu Phe Ile Asn Leu			
[0523]	85	90	95	
[0524]	Ser Arg His Ser Ile Pro Arg Asp Lys Ser Leu Phe Trp Glu Asn Ser			
[0525]	100	105	110	
[0526]	His Leu Leu Val Asn Ser Phe Ala Asp Asn Thr Arg Arg Phe Met Pro			
[0527]	115	120	125	
[0528]	Leu Ser Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Ala Asp Phe Leu Ser Trp Cys			
[0529]	130	135	140	
[0530]	Arg Gln Lys Asn Asp Ser Gly Leu Asp Tyr Gln Ser Cys Pro Thr Ser			
[0531]	145	150	155	160
[0532]	Glu Asp Cys Glu Asn Asn Pro Val Asp Ser Phe Trp Lys Arg Ala Ser			
[0533]	165	170	175	
[0534]	Ile Gln Tyr Ser Lys Asp Ser Ser Gly Val Ile His Val Met Leu Asn			
[0535]	180	185	190	
[0536]	Gly Ser Glu Pro Thr Gly Ala Tyr Pro Ile Lys Gly Phe Phe Ala Asp			
[0537]	195	200	205	
[0538]	Tyr Glu Ile Pro Asn Leu Gln Lys Glu Lys Ile Thr Arg Ile Glu Ile			
[0539]	210	215	220	
[0540]	Trp Val Met His Glu Ile Gly Gly Pro Asn Val Glu Ser Cys Gly Glu			
[0541]	225	230	235	240
[0542]	Gly Ser Met Lys Val Leu Glu Lys Arg Leu Lys Asp Met Gly Phe Gln			
[0543]	245	250	255	
[0544]	Tyr Ser Cys Ile Asn Asp Tyr Arg Pro Val Lys Leu Leu Gln Cys Val			
[0545]	260	265	270	

[0546]	Asp His Ser Thr His Pro Asp Cys Ala Leu Lys Ser Ala Ala Ala Ala			
[0547]	275	280	285	
[0548]	Thr Gln Arg Lys Ala Pro Ser Leu Tyr Thr Glu Gln Arg Ala Gly Leu			
[0549]	290	295	300	
[0550]	Ile Ile Pro Leu Phe Leu Val Leu Ala Ser Arg Thr Gln Leu			
[0551]	305	310	315	
[0552]	<210> 24			
[0553]	<211> 122			
[0554]	<212> PRT			
[0555]	<213> 人工序列			
[0556]	<220>			
[0557]	<223> Benchmark 1重链			
[0558]	<400> 24			
[0559]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0560]	1 5 10 15			
[0561]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe			
[0562]	20 25 30			
[0563]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0564]	35 40 45			
[0565]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
[0566]	50 55 60			
[0567]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0568]	65 70 75 80			
[0569]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys			
[0570]	85 90 95			
[0571]	Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp			
[0572]	100 105 110			
[0573]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0574]	115 120			
[0575]	<210> 25			
[0576]	<211> 108			
[0577]	<212> PRT			
[0578]	<213> 人工序列			
[0579]	<220>			
[0580]	<223> Benchmark 1轻链			
[0581]	<400> 25			
[0582]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
[0583]	1 5 10 15			
[0584]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr			

[0585]	20	25	30
[0586]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
[0587]	35	40	45
[0588]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
[0589]	50	55	60
[0590]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
[0591]	65	70	75
[0592]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro		
[0593]	85	90	95
[0594]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
[0595]	100	105	
[0596]	<210> 26		
[0597]	<211> 120		
[0598]	<212> PRT		
[0599]	<213> 人工序列		
[0600]	<220>		
[0601]	<223> Benchmark 2重链		
[0602]	<400> 26		
[0603]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr		
[0604]	1 5 10 15		
[0605]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
[0606]	20 25 30		
[0607]	Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0608]	35 40 45		
[0609]	Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe		
[0610]	50 55 60		
[0611]	Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr		
[0612]	65 70 75 80		
[0613]	Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0614]	85 90 95		
[0615]	Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln		
[0616]	100 105 110		
[0617]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
[0618]	115 120		
[0619]	<210> 27		
[0620]	<211> 108		
[0621]	<212> PRT		
[0622]	<213> 人工序列		
[0623]	<220>		

[0624]	<223> Benchmark 2轻链			
[0625]	<400> 27			
[0626]	Asp	Ile	Val	Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
[0627]	1		5	10 15
[0628]	Asp	Pro	Val	Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
[0629]			20	25 30
[0630]	Val	Ala	Trp	Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
[0631]			35	40 45
[0632]	Tyr	Ser	Ala	Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[0633]			50	55 60
[0634]	Ser	Gly	Ala	Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
[0635]	65		70	75 80
[0636]	Glu	Asp	Leu	Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
[0637]			85	90 95
[0638]	Thr	Phe	Gly	Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[0639]			100	105
[0640]	<210> 28			
[0641]	<211> 449			
[0642]	<212> PRT			
[0643]	<213> 人工序列			
[0644]	<220>			
[0645]	<223> Ab43重链			
[0646]	<400> 28			
[0647]	Glu	Val	Gln	Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0648]	1		5	10 15
[0649]	Ser	Leu	Arg	Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0650]			20	25 30
[0651]	Gly	Met	His	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0652]			35	40 45
[0653]	Ser	Arg	Ile	Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Met
[0654]			50	55 60
[0655]	Lys	Gly	Gln	Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0656]	65		70	75 80
[0657]	Leu	Gln	Met	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0658]			85	90 95
[0659]	Ala	Arg	Gly	Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
[0660]			100	105 110
[0661]	Thr	Leu	Val	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
[0662]			115	120 125

[0663]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
[0664]	130	135	140	
[0665]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
[0666]	145	150	155	160
[0667]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
[0668]	165	170	175	
[0669]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
[0670]	180	185	190	
[0671]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
[0672]	195	200	205	
[0673]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
[0674]	210	215	220	
[0675]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
[0676]	225	230	235	240
[0677]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
[0678]	245	250	255	
[0679]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
[0680]	260	265	270	
[0681]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
[0682]	275	280	285	
[0683]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
[0684]	290	295	300	
[0685]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
[0686]	305	310	315	320
[0687]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
[0688]	325	330	335	
[0689]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
[0690]	340	345	350	
[0691]	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
[0692]	355	360	365	
[0693]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
[0694]	370	375	380	
[0695]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
[0696]	385	390	395	400
[0697]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
[0698]	405	410	415	
[0699]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
[0700]	420	425	430	
[0701]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			

[0702]	435	440	445
[0703]	Lys		
[0704]	<210> 29		
[0705]	<211> 216		
[0706]	<212> PRT		
[0707]	<213> 人工序列		
[0708]	<220>		
[0709]	<223> Ab43轻链		
[0710]	<400> 29		
[0711]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		
[0712]	1 5 10 15		
[0713]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Tyr Lys		
[0714]	20 25 30		
[0715]	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu		
[0716]	35 40 45		
[0717]	Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
[0718]	50 55 60		
[0719]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg		
[0720]	65 70 75 80		
[0721]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu		
[0722]	85 90 95		
[0723]	Asn Gly Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln		
[0724]	100 105 110		
[0725]	Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu		
[0726]	115 120 125		
[0727]	Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr		
[0728]	130 135 140		
[0729]	Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys		
[0730]	145 150 155 160		
[0731]	Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr		
[0732]	165 170 175		
[0733]	Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His		
[0734]	180 185 190		
[0735]	Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys		
[0736]	195 200 205		
[0737]	Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
[0738]	210 215		
[0739]	<210> 30		
[0740]	<211> 455		

[0741]	<212> PRT		
[0742]	<213> 人工序列		
[0743]	<220>		
[0744]	<223> Ab72重链		
[0745]	<400> 30		
[0746]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0747]	1	5	10 15
[0748]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0749]	20	25	30
[0750]	Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0751]	35	40	45
[0752]	Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0753]	50	55	60
[0754]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0755]	65	70	75 80
[0756]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0757]	85	90	95
[0758]	Ala Lys Asp Ser Asn Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met		
[0759]	100	105	110
[0760]	Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr		
[0761]	115	120	125
[0762]	Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser		
[0763]	130	135	140
[0764]	Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu		
[0765]	145	150	155 160
[0766]	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		
[0767]	165	170	175
[0768]	Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser		
[0769]	180	185	190
[0770]	Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys		
[0771]	195	200	205
[0772]	Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu		
[0773]	210	215	220
[0774]	Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
[0775]	225	230	235 240
[0776]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
[0777]	245	250	255
[0778]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
[0779]	260	265	270

[0780]	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
[0781]	275	280	285	
[0782]	Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
[0783]	290	295	300	
[0784]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
[0785]	305	310	315	320
[0786]	Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu			
[0787]	325	330	335	
[0788]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
[0789]	340	345	350	
[0790]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys			
[0791]	355	360	365	
[0792]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
[0793]	370	375	380	
[0794]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
[0795]	385	390	395	400
[0796]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
[0797]	405	410	415	
[0798]	Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser			
[0799]	420	425	430	
[0800]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
[0801]	435	440	445	
[0802]	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[0803]	450	455		
[0804]	<210> 31			
[0805]	<211> 216			
[0806]	<212> PRT			
[0807]	<213> 人工序列			
[0808]	<220>			
[0809]	<223> Ab72轻链			
[0810]	<400> 31			
[0811]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
[0812]	1	5	10	15
[0813]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Lys			
[0814]	20	25	30	
[0815]	Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
[0816]	35	40	45	
[0817]	Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
[0818]	50	55	60	

[0819]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg			
[0820]	65	70	75	80
[0821]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Ala Arg Ser			
[0822]	85	90	95	
[0823]	Thr Asn Ile Ile Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln			
[0824]	100	105	110	
[0825]	Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu			
[0826]	115	120	125	
[0827]	Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr			
[0828]	130	135	140	
[0829]	Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys			
[0830]	145	150	155	160
[0831]	Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr			
[0832]	165	170	175	
[0833]	Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His			
[0834]	180	185	190	
[0835]	Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys			
[0836]	195	200	205	
[0837]	Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
[0838]	210	215		
[0839]	<210> 32			
[0840]	<211> 449			
[0841]	<212> PRT			
[0842]	<213> 人工序列			
[0843]	<220>			
[0844]	<223> Ab110重链			
[0845]	<400> 32			
[0846]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0847]	1	5	10	15
[0848]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
[0849]	20	25	30	
[0850]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0851]	35	40	45	
[0852]	Ser Ile Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
[0853]	50	55	60	
[0854]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu			
[0855]	65	70	75	80
[0856]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
[0857]	85	90	95	

[0858]	Arg Arg Ala Thr Trp Gly Gly Ala Thr His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0859]	100	105	110	
[0860]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
[0861]	115	120	125	
[0862]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
[0863]	130	135	140	
[0864]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
[0865]	145	150	155	160
[0866]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
[0867]	165	170	175	
[0868]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
[0869]	180	185	190	
[0870]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
[0871]	195	200	205	
[0872]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
[0873]	210	215	220	
[0874]	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
[0875]	225	230	235	240
[0876]	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
[0877]	245	250	255	
[0878]	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
[0879]	260	265	270	
[0880]	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
[0881]	275	280	285	
[0882]	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
[0883]	290	295	300	
[0884]	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
[0885]	305	310	315	320
[0886]	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
[0887]	325	330	335	
[0888]	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
[0889]	340	345	350	
[0890]	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
[0891]	355	360	365	
[0892]	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
[0893]	370	375	380	
[0894]	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
[0895]	385	390	395	400
[0896]	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			

[0897]	405	410	415
[0898]	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
[0899]	420	425	430
[0900]	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0901]	435	440	445
[0902]	Lys		
[0903]	<210> 33		
[0904]	<211> 216		
[0905]	<212> PRT		
[0906]	<213> 人工序列		
[0907]	<220>		
[0908]	<223> Ab110轻链		
[0909]	<400> 33		
[0910]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		
[0911]	1 5 10 15		
[0912]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn		
[0913]	20 25 30		
[0914]	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu		
[0915]	35 40 45		
[0916]	Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
[0917]	50 55 60		
[0918]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg		
[0919]	65 70 75 80		
[0920]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu		
[0921]	85 90 95		
[0922]	Asn Gly Val Leu Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln		
[0923]	100 105 110		
[0924]	Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu		
[0925]	115 120 125		
[0926]	Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr		
[0927]	130 135 140		
[0928]	Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys		
[0929]	145 150 155 160		
[0930]	Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr		
[0931]	165 170 175		
[0932]	Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His		
[0933]	180 185 190		
[0934]	Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys		
[0935]	195 200 205		

[0936]	Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
[0937]	210	215		
[0938]	<210> 34			
[0939]	<211> 452			
[0940]	<212> PRT			
[0941]	<213> 人工序列			
[0942]	<220>			
[0943]	<223> Ab119重链			
[0944]	<400> 34			
[0945]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0946]	1 5 10 15			
[0947]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr			
[0948]	20 25 30			
[0949]	Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0950]	35 40 45			
[0951]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val			
[0952]	50 55 60			
[0953]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[0954]	65 70 75 80			
[0955]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0956]	85 90 95			
[0957]	Ala Arg Val Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val Trp			
[0958]	100 105 110			
[0959]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro			
[0960]	115 120 125			
[0961]	Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr			
[0962]	130 135 140			
[0963]	Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			
[0964]	145 150 155 160			
[0965]	Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro			
[0966]	165 170 175			
[0967]	Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr			
[0968]	180 185 190			
[0969]	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn			
[0970]	195 200 205			
[0971]	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser			
[0972]	210 215 220			
[0973]	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu			
[0974]	225 230 235 240			

[0975]	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			
[0976]		245	250	255
[0977]	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
[0978]		260	265	270
[0979]	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu			
[0980]		275	280	285
[0981]	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr			
[0982]		290	295	300
[0983]	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn			
[0984]		305	310	315
[0985]	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro			
[0986]		325	330	335
[0987]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln			
[0988]		340	345	350
[0989]	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val			
[0990]		355	360	365
[0991]	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val			
[0992]		370	375	380
[0993]	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro			
[0994]		385	390	395
[0995]	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
[0996]		405	410	415
[0997]	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
[0998]		420	425	430
[0999]	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
[1000]		435	440	445
[1001]	Ser Pro Gly Lys			
[1002]		450		
[1003]	<210> 35			
[1004]	<211> 217			
[1005]	<212> PRT			
[1006]	<213> 人工序列			
[1007]	<220>			
[1008]	<223> Ab19轻链			
[1009]	<400> 35			
[1010]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
[1011]		1	5	10
[1012]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn			
[1013]		20	25	30

[1014]	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
[1015]	35	40	45	
[1016]	Ile Tyr Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
[1017]	50	55	60	
[1018]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg			
[1019]	65	70	75	80
[1020]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu			
[1021]	85	90	95	
[1022]	Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
[1023]	100	105	110	
[1024]	Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu			
[1025]	115	120	125	
[1026]	Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe			
[1027]	130	135	140	
[1028]	Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val			
[1029]	145	150	155	160
[1030]	Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys			
[1031]	165	170	175	
[1032]	Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser			
[1033]	180	185	190	
[1034]	His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu			
[1035]	195	200	205	
[1036]	Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
[1037]	210	215		

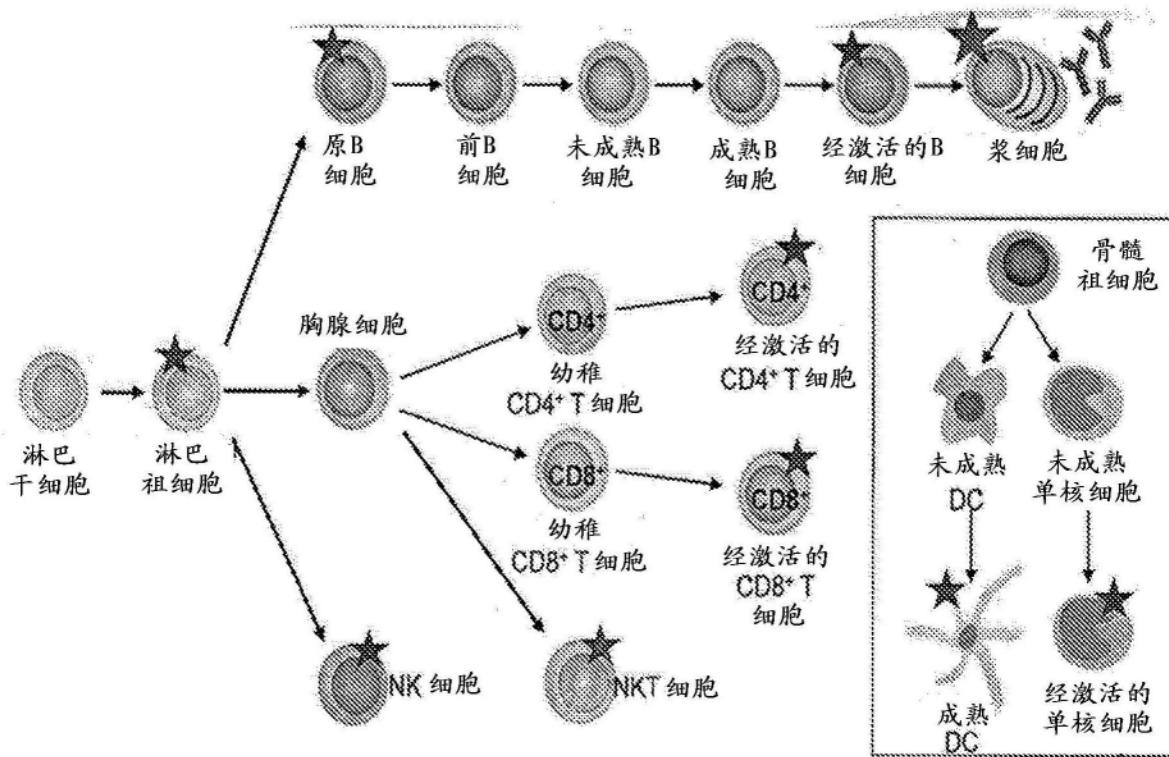


图1

Ab79 重链 (SEQ ID NO:21)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMswVRQAPGKGLEWVSDISWNGGK
 THYVDSVKQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFHDSSGFYFGHWG
 QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFP A VLQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ab79 轻链 (SEQ ID NO:22)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQRPSGV
 DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQS YDSSLGSVFGG KLT VLGQPKANPTV
 TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYA
 ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Ab19 重链 (SEQ ID NO:11)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSD
 KDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYGFSGPSMDVWG
 QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFP A VLQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
 GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图2A

Ab19 轻链 (SEQ ID NO:12)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSGV
DRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGKTLTQLGQPKANPT
VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKY
AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

图2B

CD38智人(Homo sapiens)(登录号 NP_001766.2; SEQ ID NO:1)

MANCEFSPVSGDKPCCRRLSRRALCLGVSLVLILVVVLAVVPRWRQQWSPGTTKR
FPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKGQT
VPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDLLGYLADDLTWC GefNTSKINYQSCP
DWRKDCSNNPVSFWKTVSRRFAEAACDVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQ
PEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNQFSCKNIYRPDKFLQCVKNP
EDSSCTSEI

CD38 食蟹猴(Macaca fascicularis) (登录号 AAT36330.1; SEQ
ID NO:2)

MANCEFSPVSGDKPCCRRLSRRAQVCLGVCLVLILVVVVAVVLPWRQQWSPGSGTT
SRFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNITEEDYQPLVKG
QTVPCKTLLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLTWC GefNTFEINYQ
SCPDWRKDCSNNPVSFWKTVSRRFAETACGVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVH
NLQPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCV
KNPEDSSCLSGI

图3

BM2		BM1		Ab19		Ab79	
E	76	N	120	G	91	K	121
H	79	K	121	E	103	F	135
E	104	F	135	E	104	Q	139
Q	107	Q	139	D	105	D	141
M	110	D	141	Q	107	M	142
K	111	D	202	M	110	E	239
L	112	V	203	K	111	W	241
G	113	H	205	T	114	S	274
T	114	Q	236	Q	115	C	275
Q	115	T	237	T	148	K	276
T	116	E	239	V	192	F	284
V	117	W	241	R	194	V	288
C	119	Q	272	R	195	K	289
T	148	F	273	F	196	N	290
L	150	S	274	E	198	P	291
T	191	C	275	A	199	E	292
V	192	K	276	H	228	D	293
R	194	F	284	N	229	S	294
R	195	P	291	Q	231		
F	196	E	292	E	233		
E	198	T	297	K	234		
A	199	S	298				
Q	231						
E	233						
K	234						

图4

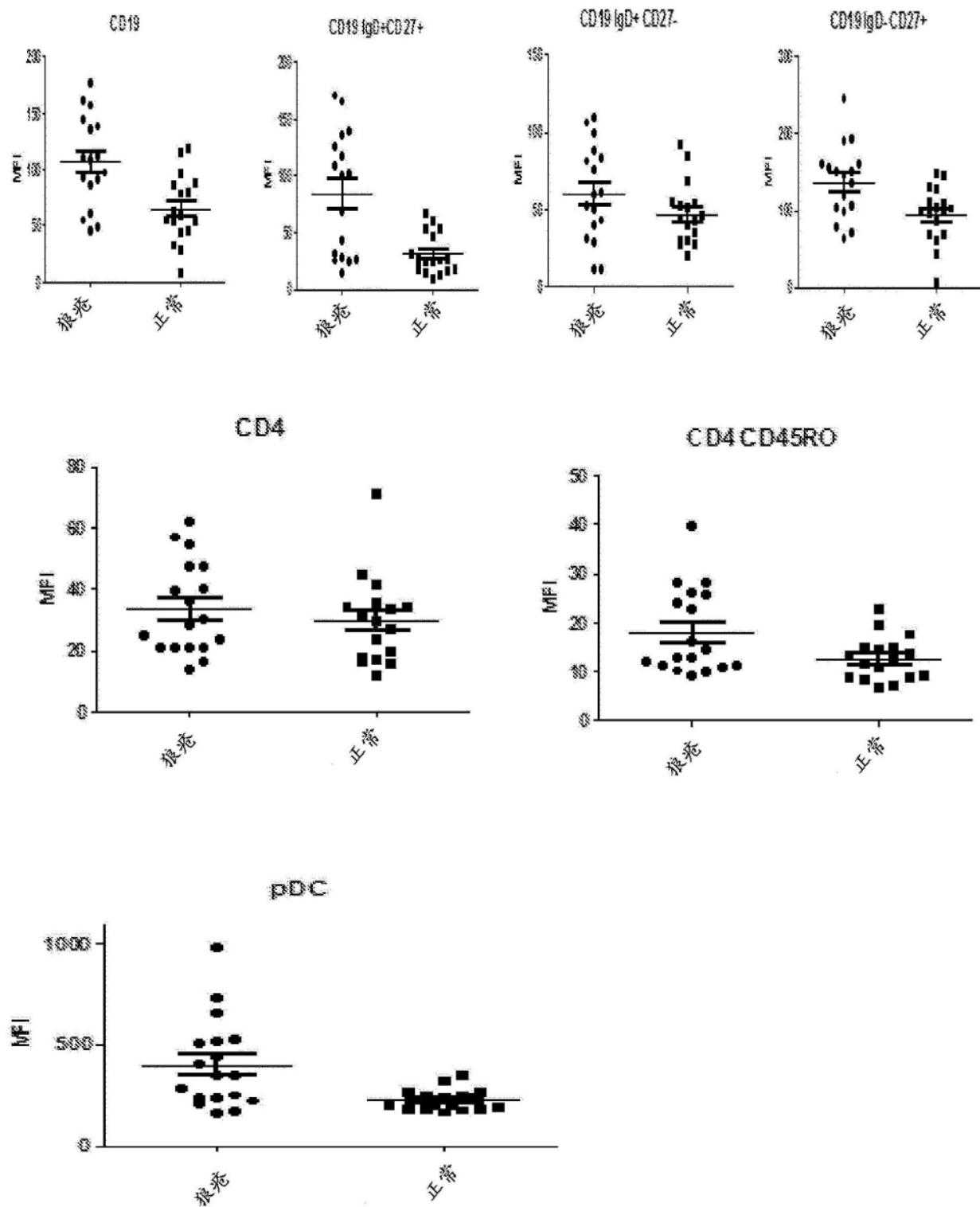


图5

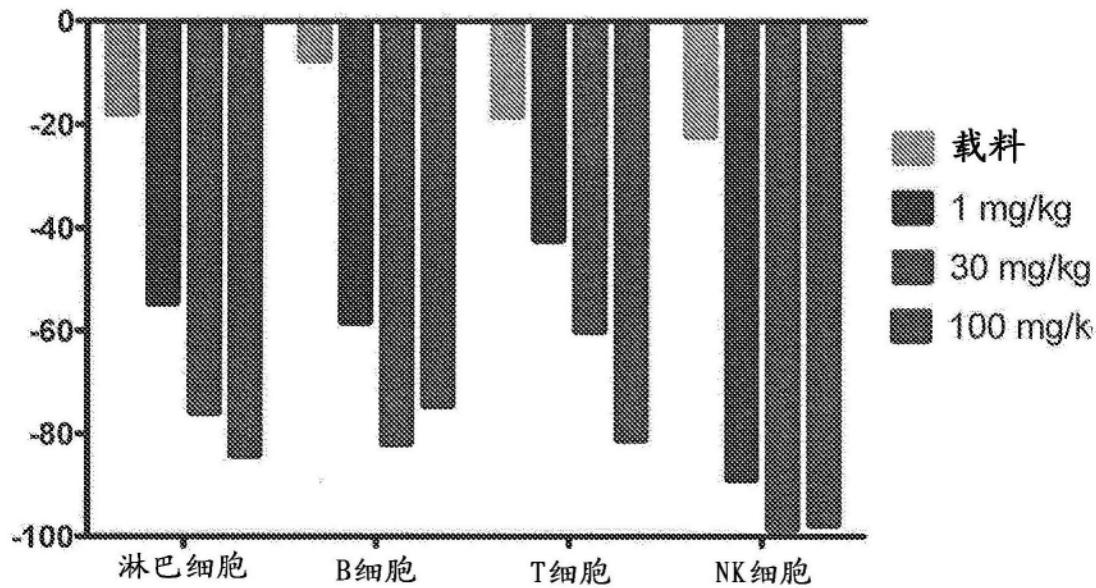


图6

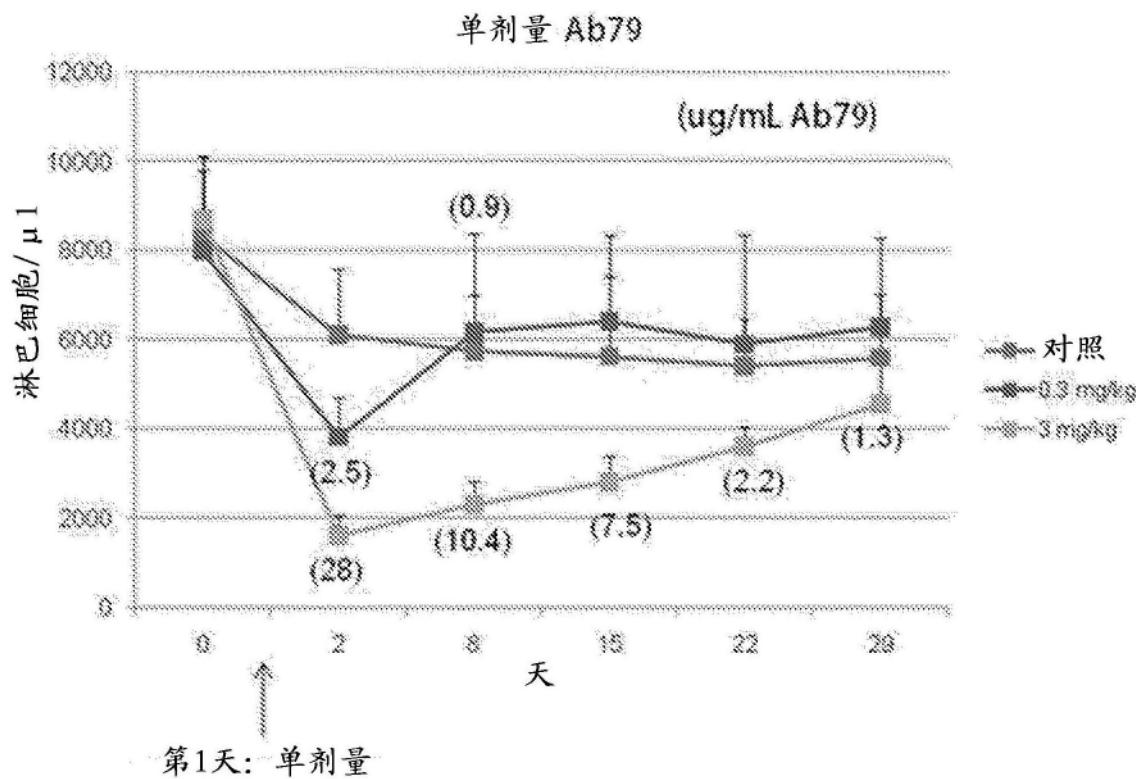


图7

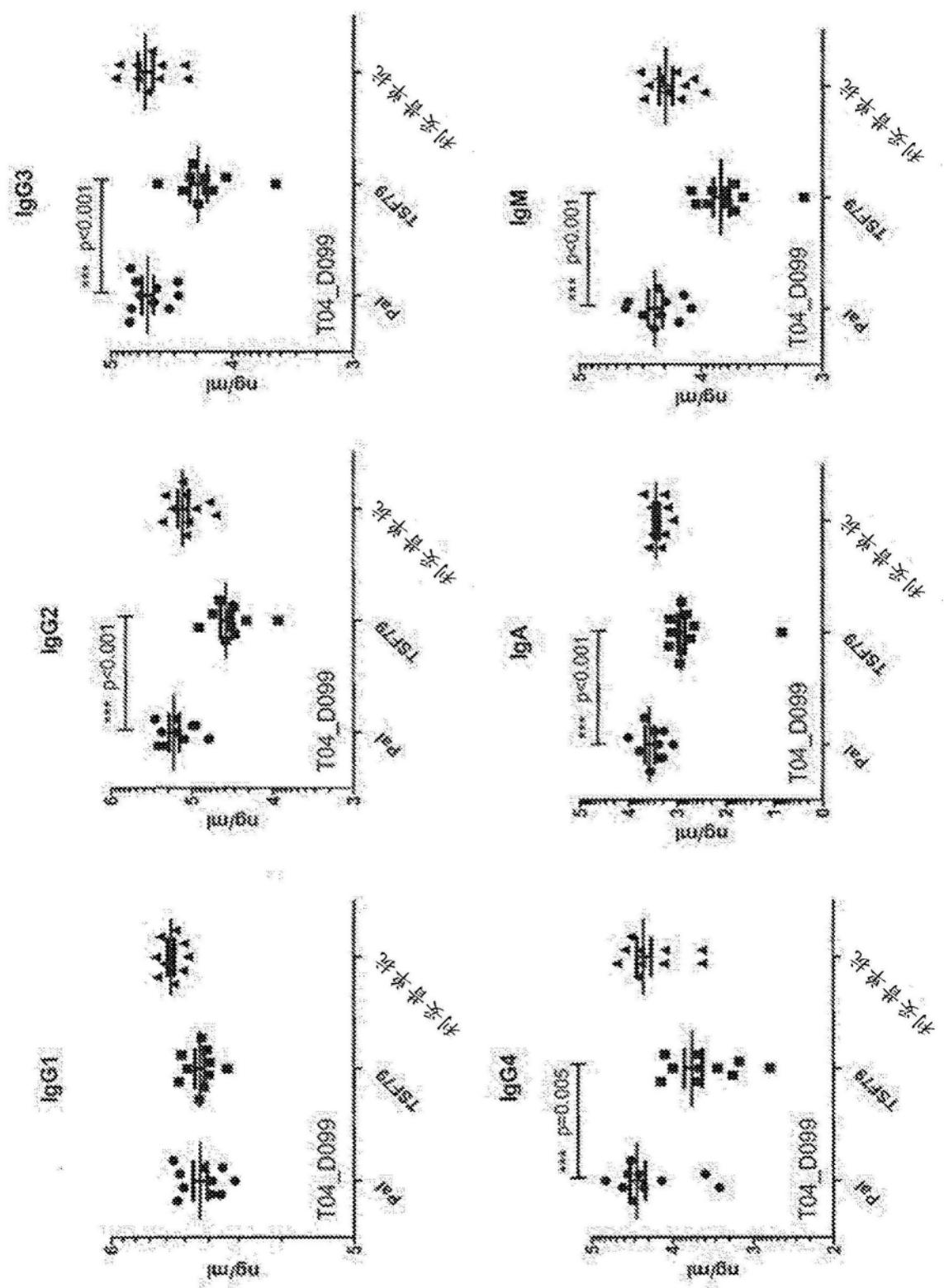


图8

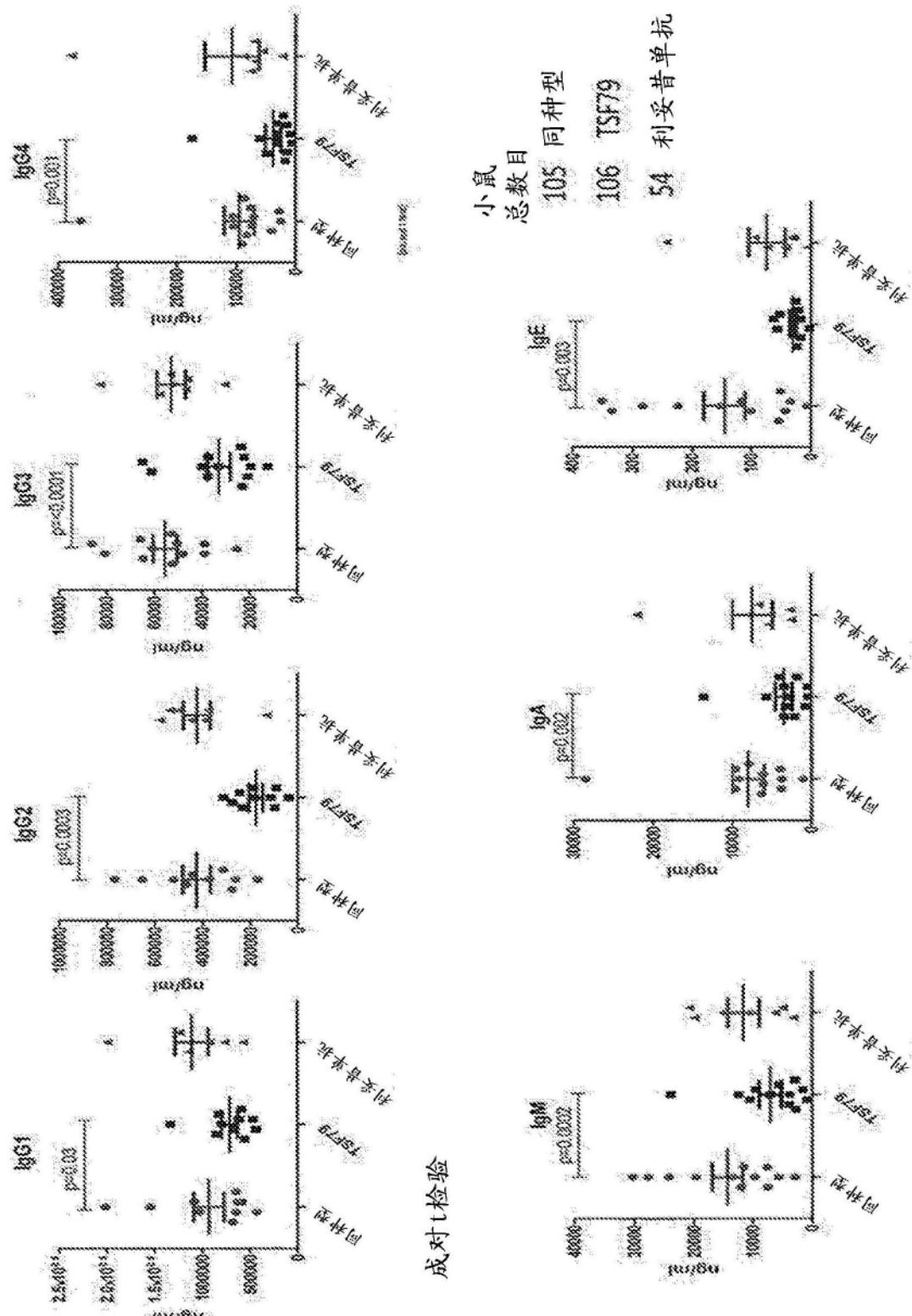


图9

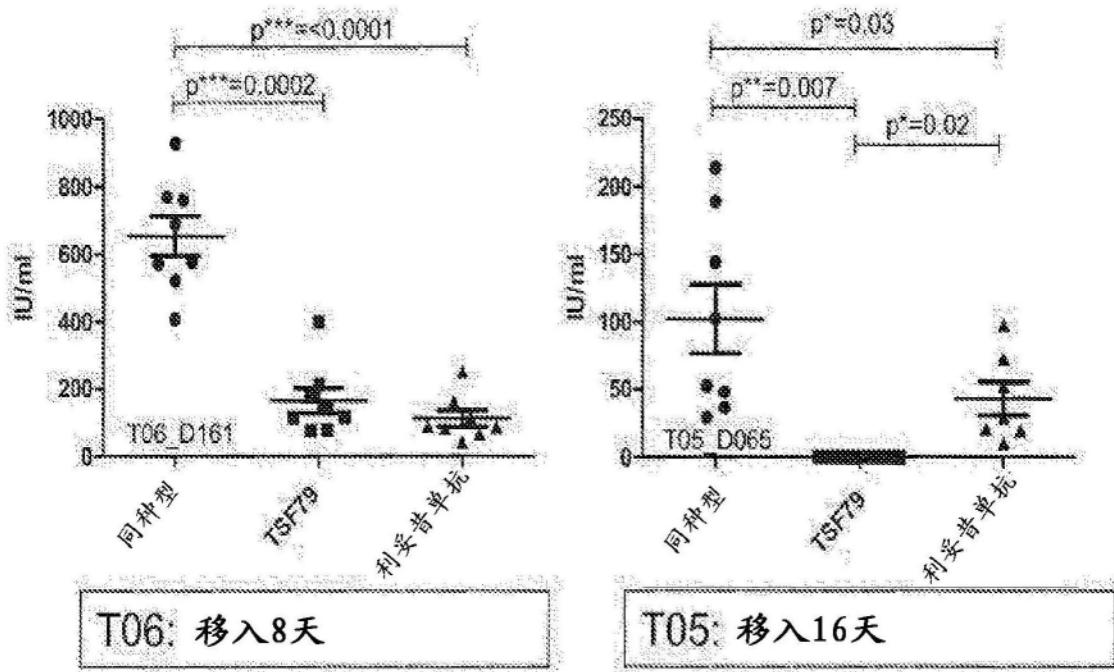


图10

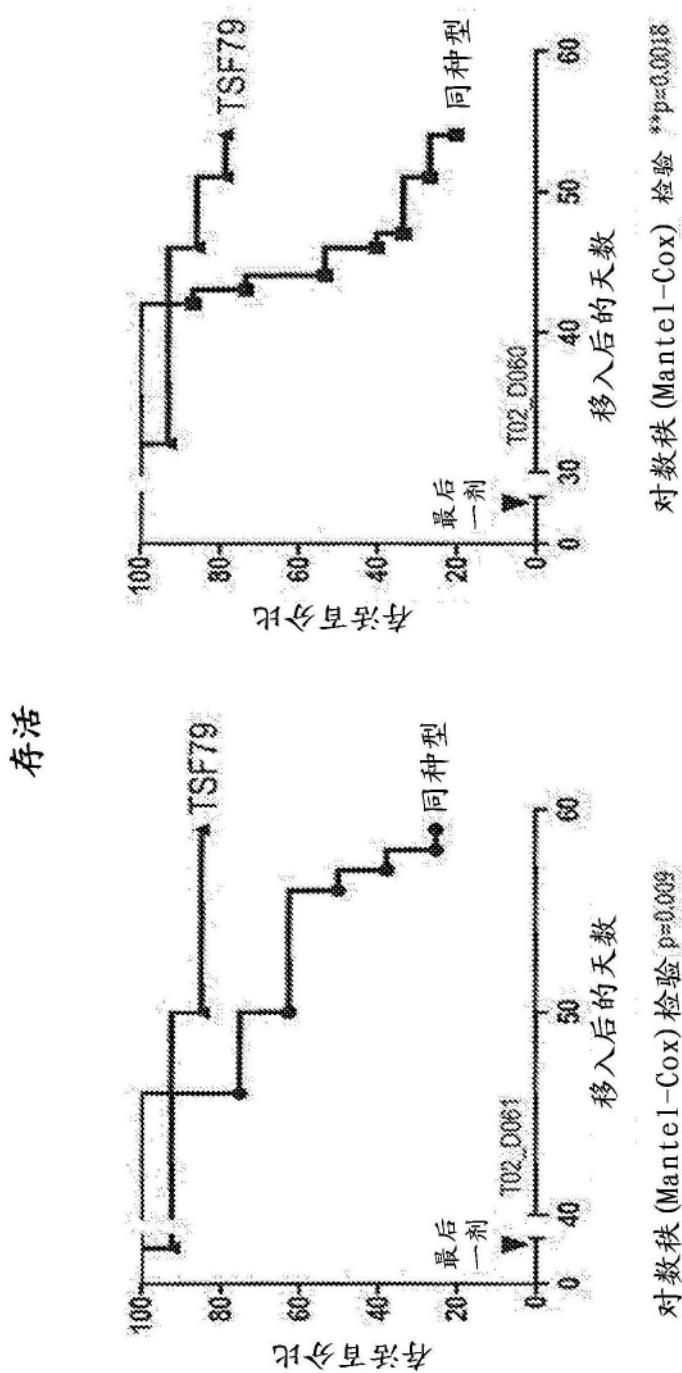


图11

在人免疫细胞
中的CD38表达

在小鼠免疫细胞
中的CD38表达

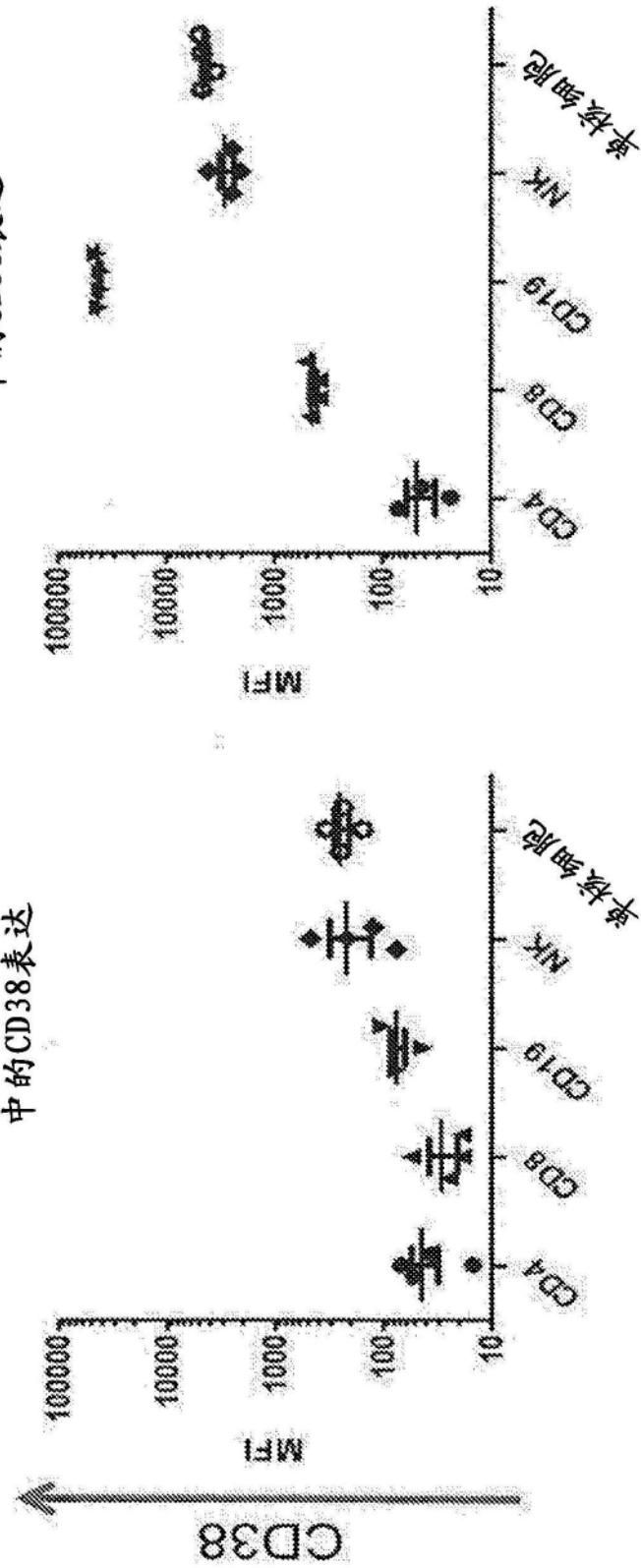


图12

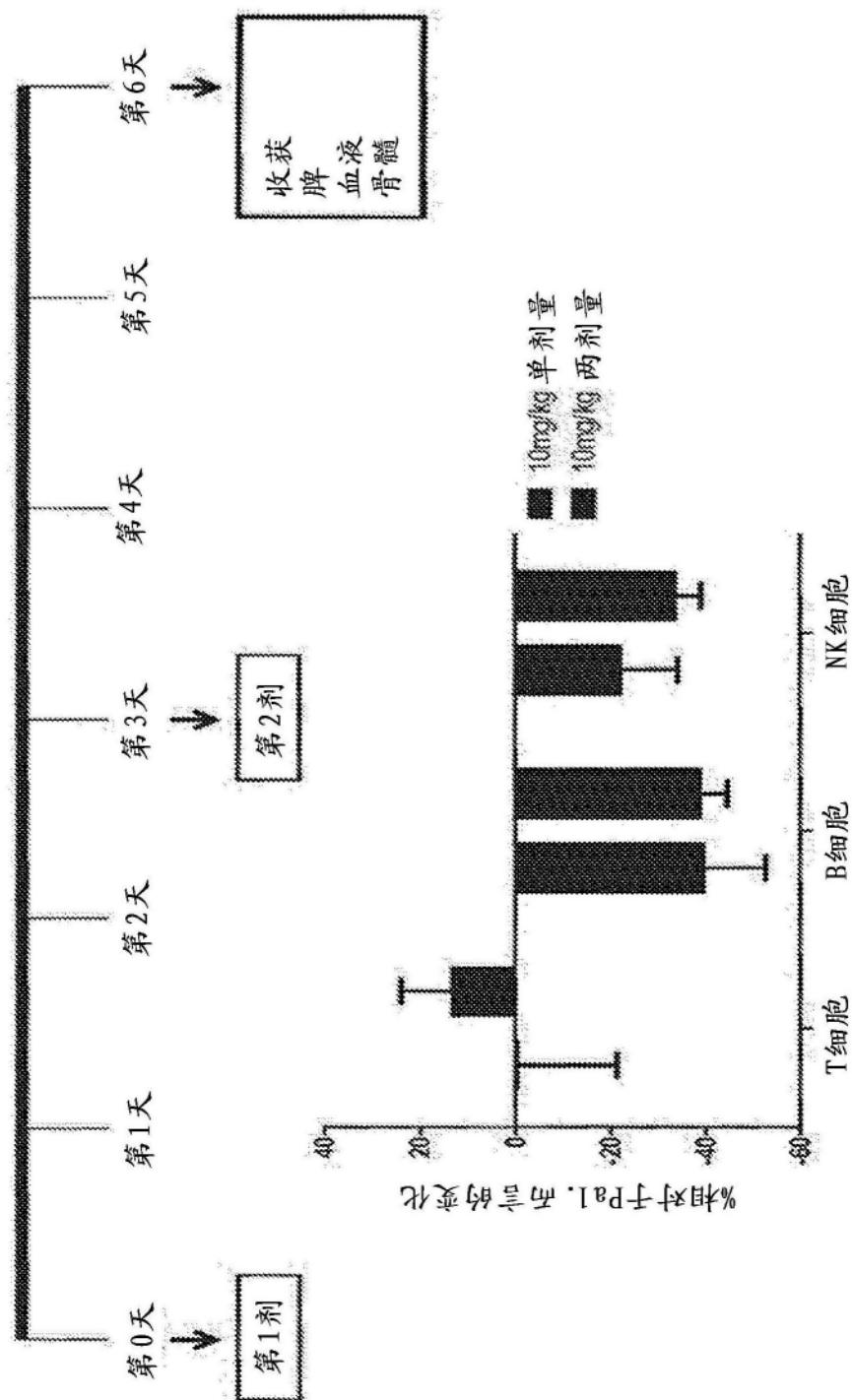


图13

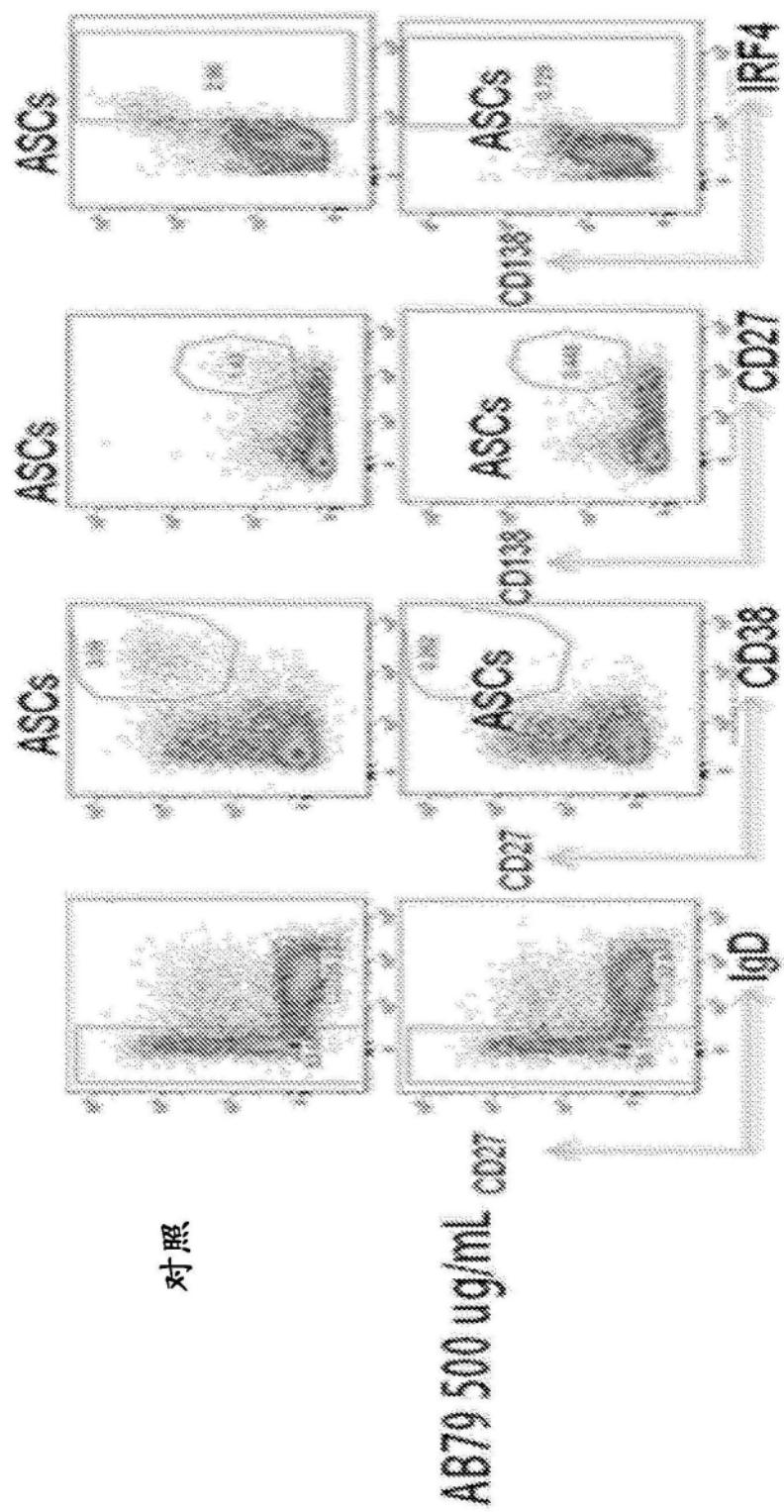


图14

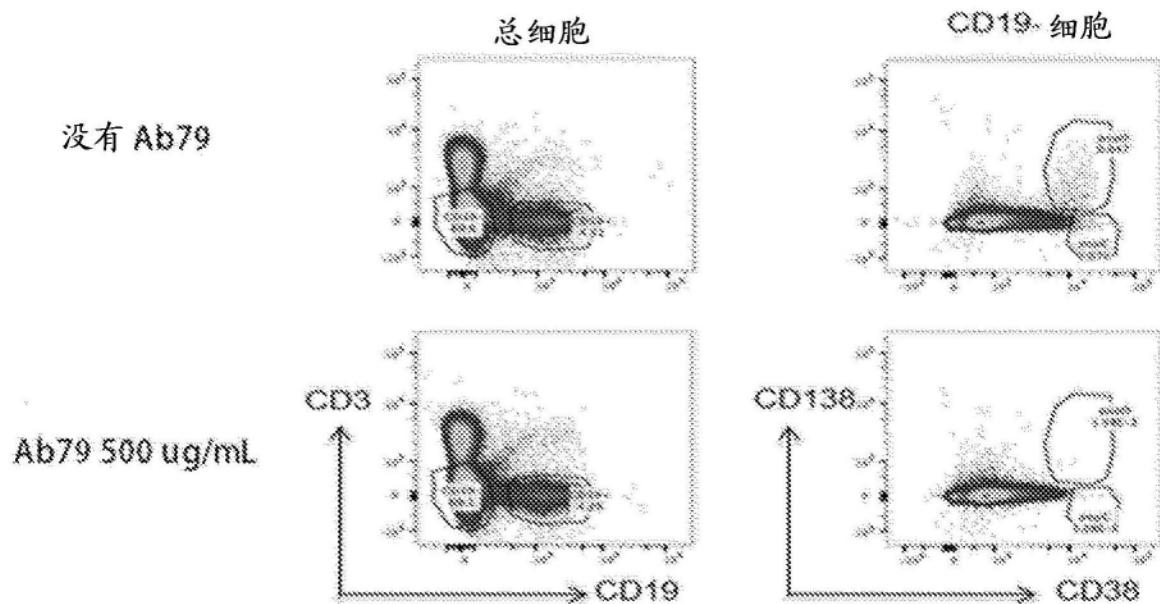


图15

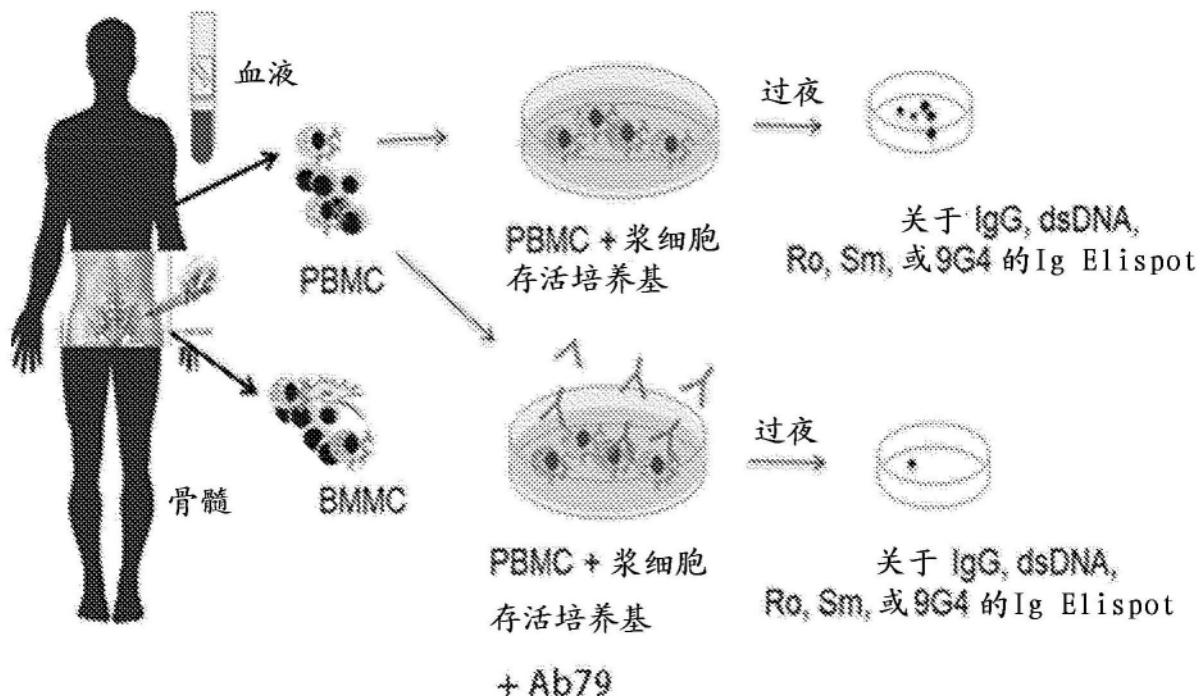


图16

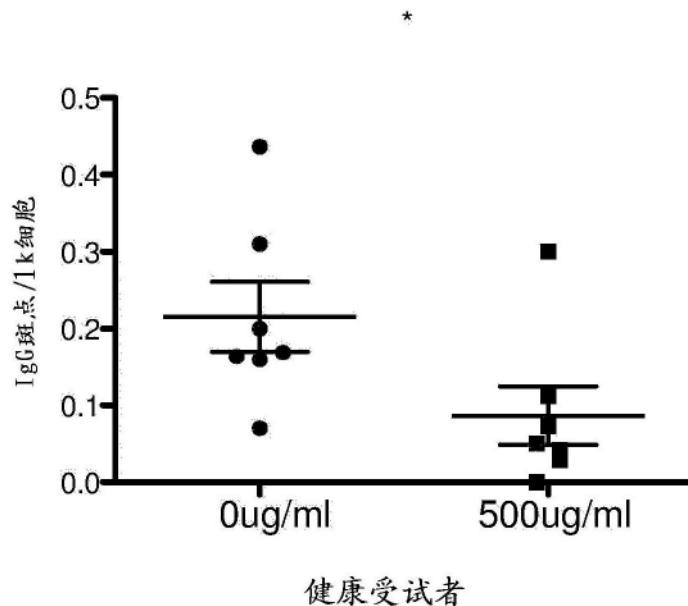


图17a

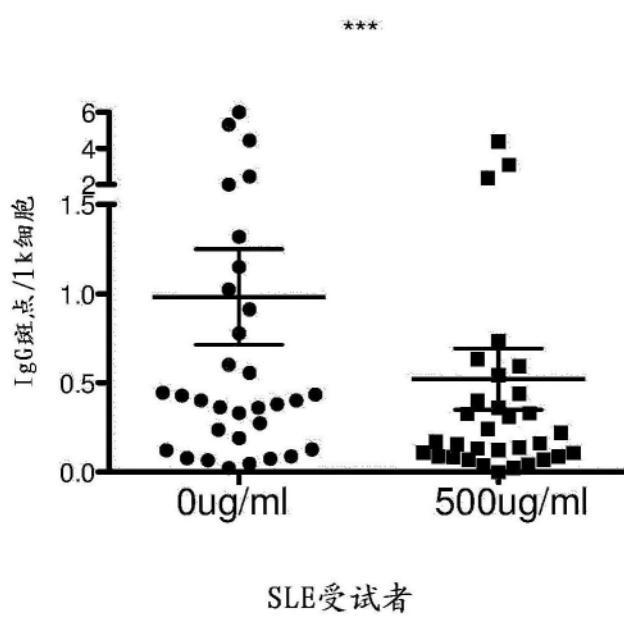


图17b

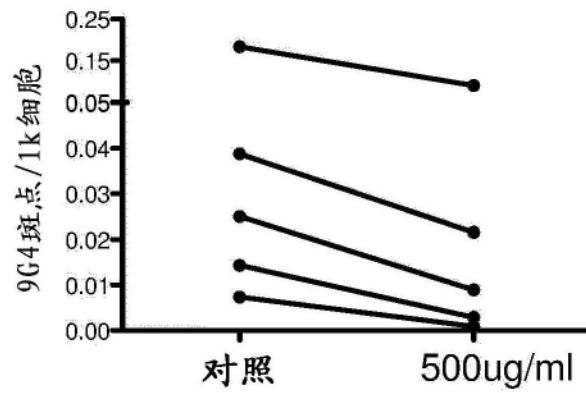


图18a

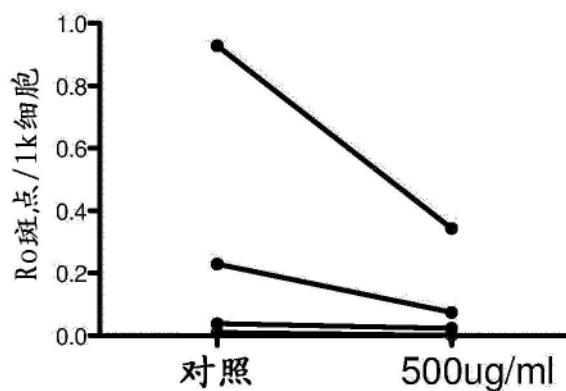


图18b

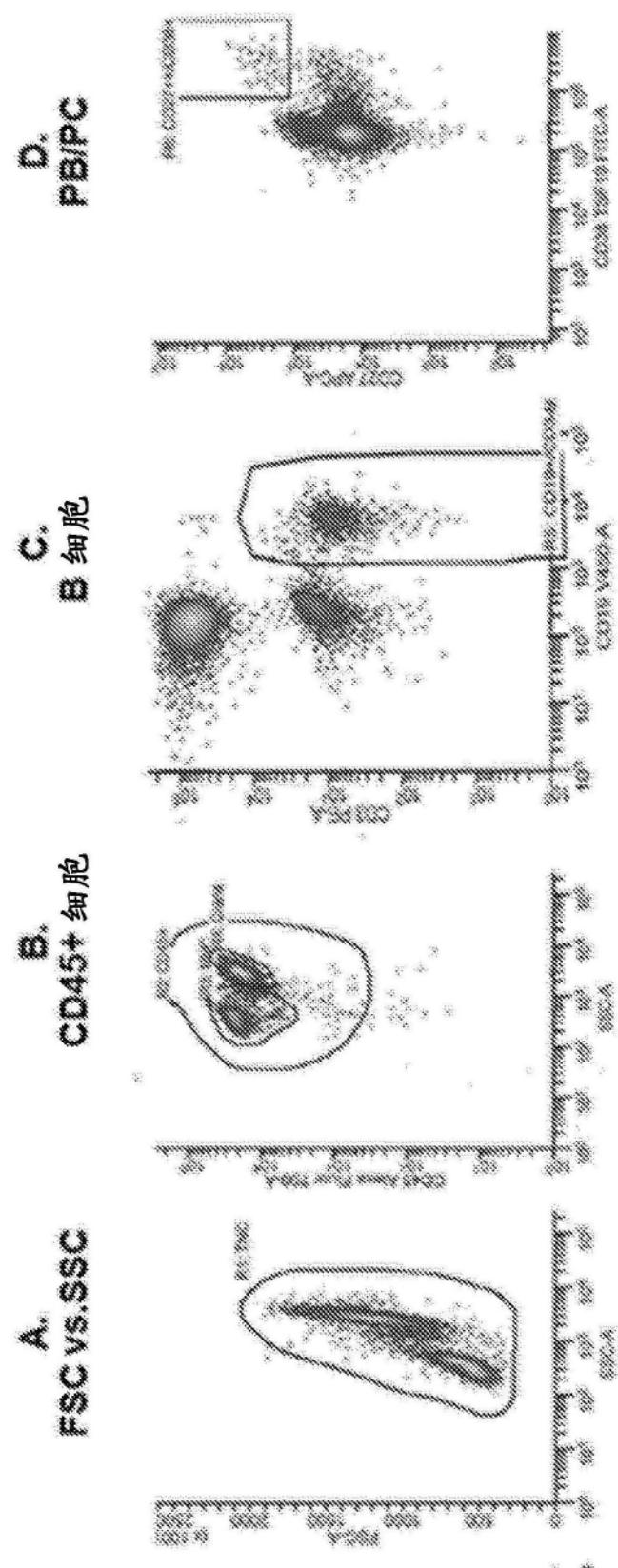


图19

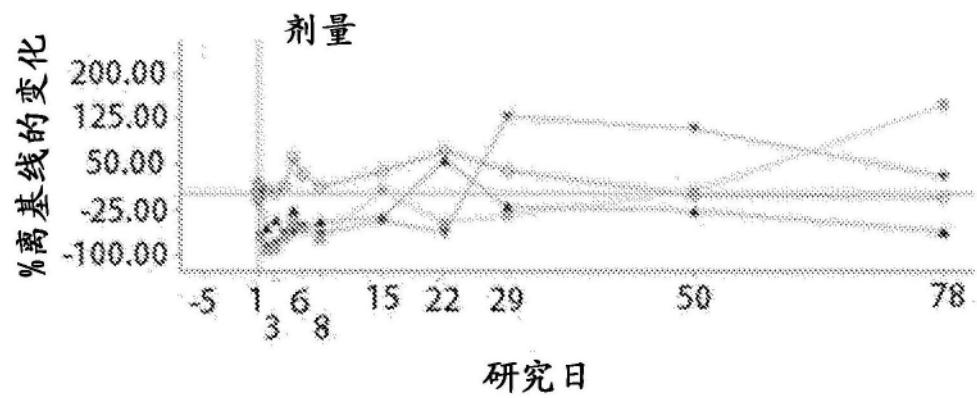


图20