

1. 一种特异地结合SEQ ID NO:1所示序列的人CD38和SEQ ID NO:2所示序列的猕猴CD38的分离抗体,其包含:

a) 重链可变区,其包含:

i) 第一CDR,由SEQ ID NO:3组成;

ii) 第二CDR,由SEQ ID NO:4组成;

iii) 第三CDR,由SEQ ID NO:5组成;以及

b) 轻链可变区,其包含:

i) 第一CDR,由SEQ ID NO:6组成;

ii) 第二CDR,由SEQ ID NO:7组成;

iii) 第三CDR,由SEQ ID NO:8组成。

2. 如权利要求1所述的分离抗体,其中所述重链可变区由SEQ ID NO:9组成。

3. 如权利要求1所述的分离抗体,其中所述轻链可变区由SEQ ID NO:10组成。

4. 如权利要求1所述的分离抗体,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. 如权利要求1所述的分离抗体,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. 一种特异地结合SEQ ID NO:1所示序列的人CD38和SEQ ID NO:2所示序列的猕猴CD38的分离抗体,其包含:

a) 重链可变区,其包含:

i) 第一CDR,由SEQ ID NO:13组成;

ii) 第二CDR,由SEQ ID NO:14组成;

iii) 第三CDR,由SEQ ID NO:15组成;以及

b) 轻链可变区,其包含:

i) 第一CDR,由SEQ ID NO:16组成;

ii) 第二CDR,由SEQ ID NO:17组成;

iii) 第三CDR,由SEQ ID NO:18组成。

7. 如权利要求6所述的分离抗体,其中所述重链可变区由SEQ ID NO:11组成。

8. 如权利要求6所述的分离抗体,其中所述轻链可变区由SEQ ID NO:12组成。

9. 如权利要求6所述的分离抗体,其中所述重链由SEQ ID NO:19组成并且所述轻链由SEQ ID NO:20组成。

10. 如权利要求6所述的分离抗体,其中所述重链由SEQ ID NO:34组成并且所述轻链由SEQ ID NO:35组成。

11. 如权利要求1或6所述的分离抗体,其进一步包含Fc域。

12. 如权利要求11所述的分离抗体,其中所述Fc域是人Fc域。

13. 如权利要求11所述的分离抗体,其中所述Fc域为变体Fc域。

14. 一种分离核酸组合物,其包含编码如权利要求2所述的重链可变区的第一核酸和编码如权利要求3所述的轻链可变区的第二核酸。

15. 一种分离核酸组合物,其包含编码如权利要求7所述的重链可变区的第一核酸和编码如权利要求8所述的轻链可变区的第二核酸。

16. 一种宿主细胞,其包含如权利要求14所述的分离核酸组合物。

17. 一种产生如权利要求1所述的抗体的方法,所述方法包括在产生所述抗体的条件下培养如权利要求16所述的宿主细胞。

18. 同SEQ ID NO:1的至少K121、F135、Q139、D141、E239、W241、C275、K276、F284、P291和E292相互作用的如权利要求1所述的抗体在制备药物中的用途,所述药物用于抑制SEQ ID NO:1所示序列的人CD38蛋白质的生物活性的方法中,所述方法通过使所述蛋白质与所述抗体接触来抑制生物活性。

19. 特异地结合SEQ ID NO:1所示序列的人CD38和SEQ ID NO:2所示序列的猕猴CD38的分离抗体在制备药物中的用途,所述药物用于治疗自身免疫疾病的方法中,其中所述自身免疫疾病选自类风湿性关节炎、系统性红斑性狼疮、炎症性肠道疾病和移植物对抗宿主疾病,所述方法包含对有需要的患者施用所述分离抗体,所述分离抗体包含:

a) 重链可变区,其包含:

i) 第一CDR,由SEQ ID NO:3组成;

ii) 第二CDR,由SEQ ID NO:4组成;

iii) 第三CDR,由SEQ ID NO:5组成;以及

b) 轻链可变区,其包含:

i) 第一CDR,由SEQ ID NO:6组成;

ii) 第二CDR,由SEQ ID NO:7组成;

iii) 第三CDR,由SEQ ID NO:8组成。

20. 如权利要求19所述的用途,其中所述的炎症性肠道疾病为溃疡性结肠炎。

21. 如权利要求6所述的分离抗体,其中所述重链可变区由SEQ ID NO:11组成并且所述轻链可变区由SEQ ID NO:12组成。

22. 一种宿主细胞,其包含如权利要求15所述的分离核酸组合物。

23. 一种产生如权利要求6所述的抗体的方法,所述方法包括在产生所述抗体的条件下培养如权利要求22所述的宿主细胞。

抗CD38抗体

[0001] 背景

[0002] 本申请根据美国法典第35篇119条(e)款要求2010年12月30日提交的USSN61/428,699;2011年3月31日提交的USSN61/470,382;2011年3月31日提交的USSN61/470,406;以及2011年5月11日提交的USSN61/485,104的权益,所述专利全部以引用的方式并入本文。

[0003] CD38,又称为环状ADP核糖水解酶,它是一种具有长的C末端细胞外域及短的N末端胞质域的II型跨膜糖蛋白。CD38是包含CD157和海兔属(Aplysia)ADPR环化酶的一组相关膜结合酶或可溶酶的成员。这个家族的酶具有将NAD转化成环状ADP核糖或烟碱酸-腺嘌呤二核苷酸磷酸的独特能力。

[0004] 此外,已报道了CD38涉及Ca²⁺移动并涉及经由许多信号传递分子的酪氨酸磷酸化的信号转导,所述信号传递分子包括磷脂酶C γ 、ZAP-70、syk以及c-cbl。基于这些观察结果,提出CD38是淋巴样细胞正常发育期间的成熟和活化中的重要信号传递分子。

[0005] 在造血细胞中,一组功能效应已被归因于CD38介导的信号传递,所述功能效应包括淋巴细胞增殖、细胞因子释放、B细胞和髓性细胞发育和存活的调节,以及树突状细胞成熟的诱导。

[0006] 然而,CD38在信号转导和造血中的确切作用尚不明确,因为大多数信号转导研究是使用异位过度表达CD38的细胞系以及为非生理学配体的抗CD38单克隆抗体。

[0007] CD38的假定天然配体是CD31(PECAM-1;血小板内皮细胞粘附分子-1)。CD31是免疫球蛋白超家族的130kD成员,所述免疫球蛋白超家族是在循环血小板、中性粒细胞、单核细胞以及初始B-淋巴细胞的表面上表达。在功能上,CD31被认为是担当粘附分子。已暗示CD38与CD31的相互作用可在促进白血病细胞的存活中起作用。

[0008] 在许多情况下,缺少单个分子的动物模型已成为用于了解所述分子在动物中的生物学作用的基本工具。隐含的假设是:如果蛋白质发挥非冗余功能,那么它的完全缺乏将导致所述功能的完全丧失。

[0009] 已产生出基因敲除CD38的小鼠。这些动物展现出组织相关NADase活性的几乎完全丧失。然而,这些动物可存活,得出的结论是CD38及其活性并非是生命所必需的。尽管如此,这些小鼠还是显示出它们的先天免疫性的缺陷和T-细胞依赖性体液应答的降低。

[0010] 与小鼠的结果形成对比,存在有力的间接证据表明人的CD38的缺少与生命不相容。来自新生儿的超过5,000个血液样本的分析未能识别出单个CD38⁻个体;暗示出:与小鼠不同,CD38是存活所必需的。因此,对小鼠的关于CD38功能所得的观察结果还不明确可被外推至人。

[0011] CD38在许多造血系统恶性肿瘤和从各种造血系统恶性肿瘤得到的细胞系中被上调,所述造血系统恶性肿瘤包括非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma,NHL)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma,BL)、多发性骨髓瘤(MM)、B慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)、B及T急性淋巴细胞性白血病(ALL)、T细胞淋巴瘤(TCL)、急性髓性白血病(AML)、毛细胞白血病(HCL)、霍奇金氏淋巴瘤(HL)以及慢性髓性白血病(CML)。另一方面,造血系统的最原始多能干细胞是CD38⁻(图1)。

[0012] 尽管近来在抗癌剂的发现和研发中取得了进展,但涉及CD38-表达的肿瘤的许多癌症形式仍具有较差的预后。因此,对于治疗这类癌症形式的改进方法存在需要。

[0013] 发明概述

[0014] 本文提供用于结合CD38的试剂及方法,和使用包括对CD38特异的抗体的CD38特异结合剂来治疗CD38相关疾病及检测CD38的方法。

[0015] 因此,在一些实施方案中,描述了对人CD38 (SEQ ID NO:1) 和猕猴CD38 (SEQ ID NO:2) 特异的分离抗体。这种抗体由重链可变区和轻链可变区组成,其中所述重链可变区由三个互补决定区 (CDR),即HCDR1、HCDR2以及HCDR3组成,并且其中所述轻链可变区也由三个CDR,即LCDR1、LCDR2以及LCDR3组成。所述CDR的序列是由以下表示:HCDR1 (SEQ ID NO:3)、HCDR2 (SEQ ID NO:4)、HCDR3 (SEQ ID NO:5)、LCDR1 (SEQ ID NO:6)、LCDR2 (SEQ ID NO:7) 以及LCDR3 (SEQ ID NO:8)。

[0016] 在其它实施方案中,所述分离抗体由重链可变区组成,其中所述重链可变区的序列由SEQ ID NO:9涵盖。在其它实施方案中,所述分离抗体由轻链可变区组成,其中所述轻链可变区的序列由SEQ ID NO:10涵盖。

[0017] 在一些实施方案中,所述分离抗体由重链可变区组成,其中所述重链可变区的序列由SEQ ID NO:9涵盖。在其它实施方案中,所述分离抗体由轻链可变区组成,其中所述轻链可变区的序列由SEQ ID NO:10涵盖。重链可变区和轻链可变区的这种组合称为Ab79。

[0018] 在一些实施方案中,所述分离抗体由重链和轻链组成,其中所述重链序列由SEQ ID NO:11涵盖并且所述轻链由SEQ ID NO:12涵盖。

[0019] 在一些实施方案中,所述分离抗体包括Fc域。在其它实施方案中,所述Fc域是人Fc域。在其它实施方案中,所述Fc域是变体Fc域。

[0020] 在一些实施方案中,提供一种编码重链SEQ ID NO:11的分离核酸。在其它实施方案中,提供一种编码轻链SEQ ID NO:12的分离核酸。

[0021] 在一些实施方案中,提供一种宿主细胞,所述宿主细胞含有编码重链SEQ ID NO:11的分离核酸和编码轻链SEQ ID NO:12的分离核酸。

[0022] 在一些实施方案中,提供一种产生本发明的抗体的方法。所述方法涵盖在表达分离核酸并且产生抗体的条件下培养宿主细胞,所述宿主细胞含有编码重链SEQ ID NO:11的分离核酸和编码轻链SEQ ID NO:12的分离核酸。

[0023] 在一些实施方案中,描述了对人CD38 (SEQ ID NO:1) 和猕猴CD38 (SEQ ID NO:2) 特异的分离抗体。这种抗体由六个CDR组成,其中所述抗体的每一个CDR可与SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7以及SEQ ID NO:8相差0、1、或2个氨基酸取代。

[0024] 在其它实施方案中,描述了对人CD38 (SEQ ID NO:1) 和猕猴CD38 (SEQ ID NO:2) 特异的分离抗体。这种抗体由重链可变区和轻链可变区组成,其中所述重链可变区由三个互补决定区 (CDR),即HCDR1、HCDR2以及HCDR3组成,并且其中所述轻链可变区也由三个CDR,即LCDR1、LCDR2以及LCDR3组成。所述CDR的序列是由以下表示:HCDR1 (SEQ ID NO:13)、HCDR2 (SEQ ID NO:14)、HCDR3 (SEQ ID NO:15)、LCDR1 (SEQ ID NO:16)、LCDR2 (SEQ ID NO:17) 以及LCDR3 (SEQ ID NO:18)。

[0025] 在其它实施方案中,所述分离抗体由重链可变区组成,其中所述重链可变区的序

列由SEQ ID NO:19涵盖。在其它实施方案中,所述分离抗体由轻链可变区组成,其中所述轻链可变区的序列由SEQ ID NO:20涵盖。

[0026] 在一些实施方案中,所述分离抗体由重链可变区组成,其中所述重链可变区的序列由SEQ ID NO:19涵盖。在其它实施方案中,所述分离抗体由轻链可变区组成,其中所述轻链可变区的序列由SEQ ID NO:20涵盖。重链可变区和轻链可变区的这种组合称为Ab19。

[0027] 在一些实施方案中,所述分离抗体由重链和轻链组成,其中所述重链序列由SEQ ID NO:21涵盖并且所述轻链由SEQ ID NO:22涵盖。

[0028] 在一些实施方案中,提供一种编码重链SEQ ID NO:21的分离核酸。在其它实施方案中,提供一种编码轻链SEQ ID NO:22的分离核酸。

[0029] 在一些实施方案中,提供一种宿主细胞,所述宿主细胞含有编码重链SEQ ID NO:21的分离核酸和编码轻链SEQ ID NO:22的分离核酸。

[0030] 在一些实施方案中,提供一种产生本发明的抗体的方法。所述方法涵盖在表达分离核酸并且产生抗体的条件下培养宿主细胞,所述宿主细胞含有编码重链SEQ ID NO:21的分离核酸和编码轻链SEQ ID NO:22的分离核酸。

[0031] 在其它实施方案中,描述了对人CD38 (SEQ ID NO:1) 和猕猴CD38 (SEQ ID NO:2) 特异的分离抗体。这种抗体由六个CDR组成,其中所述抗体的每一个CDR可与SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17以及SEQ ID NO:18相差0、1、或2个氨基酸取代。

[0032] 在一些实施方案中,提供特异地结合人CD38 (SEQ ID NO:1) 和猕猴CD38 (SEQ ID NO:2) 的分离抗CD38抗体,其中所述抗体以约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或更大的KD与人CD38结合,并且以约 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 或更大的KD与猕猴CD38结合。

[0033] 在一些实施方案中,提供与Ab79和/或Ab19竞争结合人CD38和/或猕猴CD38的抗体。

[0034] 参照以下描述和附图,这些实施方案和其它实施方案、特征以及潜在的优点将变得明显。

[0035] 附图简述

[0036] 图1描绘淋巴系细胞的CD38表达谱,星号指示高CD38表达。在祖B细胞 ($CD34^+CD19^+CD20^-$)、活化B细胞 ($CD19^+CD20^+$)、浆细胞 ($CD138^+CD19^-CD20^-$)、活化 $CD4^+$ 及 $CD8^+$ T细胞、NKT细胞 ($CD3^+CD56^+$) 以及NK细胞 ($CD56^+CD16^+$) 上识别出CD38表达。此外,在淋巴祖细胞 ($CD34^+CD45RA^+CD10^+CD19^-$) 而非淋巴干细胞上发现CD38表达。此外,在成熟DC和活化单核细胞上观察到增大的CD38表达。

[0037] 图2展示Ab79及Ab19的重链序列和轻链序列。

[0038] 图3描绘人CD38和猕猴CD38的序列。

[0039] 图4展示人CD38的抗原表位,其结合抗体: Benchmark1和Benchmark2、Ab19和Ab79中的每一个。

[0040] 图5描绘使用可商购获得的人CD38抗体时,CD38在来自SLE患者的PMBC中的增大表达。

[0041] 图6描绘在给药后24小时,cyno猴的细胞数的百分比变化。

[0042] 图7展示单剂量的Ab79后,细胞耗减的恢复。

[0043] 图8展示单剂量的Ab79后,就所有Ig同种型的显著减少而言,来自单个HuSCID小鼠的结果。

[0044] 图9类似于图8,如实施例中所述,是就HuSCID小鼠中的Ab79耗减活性而言。

[0045] 图10描绘在Ab79治疗后,HuSCID模型中的抗破伤风反应的显著减小。

[0046] 图11再次在HuSCID模型中展示在Ab79治疗后存活的显著增加,这实质上是一类移植物抗宿主模型。

[0047] 图12描绘使用各自的商业抗体时,CD38抗原在人和小鼠PBMC中的表达差异。

[0048] 图13展示炎症性设定下的治疗效果,展示出代用小鼠抗CD38抗体从外周血液耗减免疫细胞。

[0049] 发明详述

[0050] 概述

[0051] 已证实CD38的细胞外域拥有双功能酶活性,即具有ADP-核糖基环化酶活性以及ADP-核糖基水解酶活性。因此,CD38可催化NAD⁺转化为cADPR(环化酶),并且可进一步将其水解成ADP-核糖(水解酶)。cADPR涉及钙从细胞内存库的移动,所述移动是对细胞增殖、分化以及细胞凋亡重要的第二信使活性。

[0052] 已有文献记载了在各种造血来源的疾病中CD38的增大表达,并且所述增大表达已被描述为慢性淋巴母细胞性白血病的阴性预后标志。这类疾病包括但不限于多发性骨髓瘤(Jackson等(1988))、慢性淋巴母细胞性白血病(Moribito等(2001)、Jelinek等(2001)、Chevalier等(2002)、Dürig等(2002))、B细胞慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病(Keyhani等(2000))、包括B细胞急性淋巴细胞性白血病、Waldenstrom氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)、原发性系统性淀粉样变病、套细胞淋巴瘤、前淋巴细胞性白血病/前髓细胞性白血病、急性骨髓性白血病(Keyhani等(1993))、慢性骨髓性白血病(Marinov等(1993))、滤泡性淋巴瘤、NK细胞白血病以及浆细胞白血病。因此,CD38提供治疗造血系统疾病的有效靶标。

[0053] 若干抗CD38抗体处于用于治疗CD38相关癌症的临床试验中。因此,具有治疗效果和/或诊断应用的CD38的抗体为有用的。本发明提供两种不同的抗CD38组的CDR,所述CDR与CD38的不同抗原表位结合并结合人形式和猕猴形式的CD38,并且本发明提供含有这些CDR的抗体。

[0054] 此外,本发明证实抗CD38抗体适用于诊断和/或治疗与活化淋巴细胞相关的尤其包括自身免疫疾病的炎症和/或免疫病症。如本文所示,CD38是在不成熟造血细胞中表达,在成熟细胞中下调,并且在活化淋巴细胞和浆细胞中以高水平再表达。举例来说,高CD38表达见于活化B细胞、浆细胞、活化CD4+T细胞、活化CD8+T细胞、NK细胞、NKT细胞、成熟树突状细胞(DC)以及活化单核细胞中。

[0055] 本文的发现是令人惊讶的,原因在于CD38的自身抗体的存在已与糖尿病、慢性自身免疫甲状腺炎以及Graves氏病(Graves' disease)相关(参见Antonelli等,Clin.Exp.Immunol.2001126:426-431;Mallone等,Diabetes50:752(2001)以及Antonelli等,J.Endocrinol.Invest.27:695-707(2004),所有文献都以引用的方式并入。

[0056] 因此,本发明的抗体适用于诊断和/或治疗包括但不限于如以下所述的自身免疫疾病的许多疾病,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)以及溃疡性结肠炎。

[0057] 因此,例如,可选择浆细胞含量高的患者,如显示高浆细胞的SLE患者,以及对基于CD20的疗法不显示反应的RA患者。

[0058] 本发明的治疗性抗CD38抗体经由多重作用机制结合CD38阳性细胞,从而导致这些细胞(如活化淋巴细胞)的耗减,以实现自身免疫疾病的治疗和/或改善,所述作用机制包括但不限于如本文所概述的CDC、ADCC以及细胞凋亡路径。

[0059] 在肿瘤学临床测试中,在一些抗-CD38抗体中所不能见到的一个优点是它与猕猴CD38结合的能力,因为这些灵长类适用于临床前测试,因此可实现用药、毒性、效力等的早期评价。

[0060] CD38蛋白质

[0061] 因此,本发明提供分离抗CD38抗体,所述抗体特异地结合人CD38蛋白质(并且,如下所述,其它和优选特异地结合灵长类CD38蛋白质)。如本领域中所知,许多物种中都发现CD38蛋白质。尤其可用于本发明中的抗体结合人CD38蛋白质和灵长类CD38蛋白质,所述灵长类尤其是用于临床测试的灵长类,如猕猴(长尾猴(*Macaca fascicularis*))、食蟹猴,本文有时称为“cyno”)。如本文所定义,“人CD38”或“人CD38抗原”是指蛋白质SEQ ID NO:1或功能片断,如抗原表位。通常,CD38拥有短的细胞质内尾部、跨膜域以及细胞外域,在特定实施方案中,本发明的抗体结合CD38蛋白质的细胞外部分。本文中的“猕猴CD38”意思是与人CD3892%相同的SEQ ID NO:2。

[0062] CD38的同义词包括ADP核糖基环化酶1、cADPr水解酶1、Cd38-rs1、环状ADP核糖水解酶1、1-19,以及NIM-R5抗原。

[0063] 在一些实施方案中,本发明的抗CD38Ab79抗体在许多氨基酸残基处与CD38相互作用,所述氨基酸残基包括K121、F135、Q139、D141、M142、D202、V203、H205、Q236、E239、W241、S274、C275、K276、F284、C287、V288、K289、N290、P291、E292、D293。如本文所概述,与所述残基相互作用的其它抗体也适用于治疗和诊断应用。

[0064] 在一些实施方案中,本发明的抗CD38抗体任选地(并且在一些状况下优选地)不结合CD38家族的其它成员,如CD157。举例来说,本文的优选实施方案不结合为SEQ ID NO:23的人CD157(基因库入藏号NP_004325)。

[0065] 抗体

[0066] 本发明提供抗CD38抗体,大体来说提供如本文所述的治疗和/或诊断抗体。适用于本发明的抗体可采取如本文所述的许多格式,包括以下所述的传统抗体以及抗体衍生物、片段和模拟物。实质上,本发明提供含有如本文所定义的6个CDR的集合的抗体结构(包括如下所述的少量氨基酸改变)。

[0067] 传统抗体结构单元通常包含四聚体。每个四聚体通常由两对相同的多肽链组成,每一对具有一个“轻”链(通常具有的分子量为约25kDa)和一个“重”链(通常具有的分子量为约50-70kDa)。人轻链分为κ轻链及λ轻链。重链分为μ、δ、γ、α或ε,并且将所述抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA及IgE。IgG具有若干亚类,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。IgM具有的亚类包括但不限于IgM1及IgM2。因此,本文所用的“同种型”意思是通过其恒定区的化学特征和抗原特征来定义的任何免疫球蛋白的亚类。已知的人免疫球蛋白同种型为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM1、IgM2、IgD及IgE。应了解,治疗抗体也可包含

同种型和/或亚类的杂交体。

[0068] 每个链的氨基末端包括主要负责抗原辨别的具有约100至110或更多个氨基酸的可变区。在所述可变区中,具有重链和轻链的V域中的每一个聚集三个环以形成抗原结合位点。环中的每一个称为互补决定区(以下称为“CDR”),其中氨基酸序列的变化最为显著。“可变”是指可变区的某些区段的序列在抗体之间广泛不同。可变区内的可变性并非均匀分布。实际上,V区由具有15-30个氨基酸的称为框架区(FR)的相对不变伸长区组成,所述伸长区通过各自为9-15个氨基酸长或更长的称为“高变区”的极具可变性的较短区分开。

[0069] 每个VH和VL由三个高变区(“互补决定区”,“CDR”)和四个FR组成,其以下列次序从氨基末端排列至羧基末端:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0070] 高变区通常涵盖来自轻链可变区中的约氨基酸残基24-34(LCDR1;“L”表示轻链)、50-56(LCDR2)以及89-97(LCDR3)与重链可变区中的大致约31-35B(HCDR1;“H”表示重链)、50-65(HCDR2)以及95-102(HCDR3)的氨基酸残基;Kabat等,SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,Public Health Service,第五版,National Institutes of Health,Bethesda Md.(1991)和/或形成轻链可变区中的高变环的那些残基(例如,残基26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)以及91-96(LCDR3))和形成重链可变区中的高变环的那些残基,26-32(HCDR1)、53-55(HCDR2)以及96-101(HCDR3);Chothia and Lesk(1987) J.Mol.Biol.196:901-917。以下描述本发明的特定CDR。

[0071] 贯穿本说明书,在参考可变域(大致来说,轻链可变区中的残基1-107和重链可变区中的残基1-113)中的残基时通常使用Kabat编号系统(例如,Kabat等,同上(1991)),而对Fc区使用EU编号系统。

[0072] CDR促进抗体的抗原结合位点,或更尤其抗原表位结合位点的形成。“抗原表位”是指与抗体分子可变区中的称为抗体互补位(paratope)的特异抗原结合位点相互作用的决定簇。抗原表位是成组的如氨基酸或糖侧链的分子,并且通常具有特定结构特性,以及特定电荷特性。单个抗原可能具有一个以上的抗原表位。举例来说,如本文所示,如本文称为“Ab19”和“Ab79”的两个不同抗体结合CD38分子上的不同抗原表位。

[0073] 抗原表位可能包含直接涉及结合的氨基酸残基(也称为抗原表位的免疫显性组分)和并不直接涉及结合的其它氨基酸残基,如通过特异抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基;换句话说,氨基酸残基是在特异抗原结合肽的占据区域(footprint)的内。

[0074] 抗原表位可以是构象抗原表位或线性抗原表位。构象抗原表位是由来自线性多肽链的不同片段的空间并列氨基酸产生。线性抗原表位是由多肽链中的相邻氨基酸残基产生。构象和非构象抗原表位可能的区别在于:在变性溶剂存在下,丧失与前者的结合而未丧失与后者的结合。

[0075] 抗原表位通常包括呈独特空间构象的至少3个,并且更通常至少5个或8-10个氨基酸。辨别相同抗原表位的抗体可在简单免疫测定中验证,所述免疫测定展示一个抗体阻断另一抗体与靶抗原结合的能力,例如,如实施例中所概述的“重新分级(binning)”如实施例中所示的X射线结晶学研究已识别出结合本发明的抗体(包括Ab19和Ab79)和现有技术的抗体(Benchmark1和Benchmark2)的氨基酸残基,如图4所示。

[0076] 在本发明中,如实施例中所概述,Ab79与CD38的许多氨基酸残基相互作用,所述氨基酸残基包括K121、F135、Q139、D141、M142、E239、W241、S274、C275、K276、F284、V288、K289、

N290、P291、E292以及D293。应注意,所述残基在人和cyan猴中都相同,例外的是S274实际上为cyan中的F274。所述残基可表示特异抗原结合肽占据区域内的免疫显性抗原表位和/或残基。

[0077] 在本发明中,Ab19结合不同的抗原表位,包括G91、E103、E1034、D105、Q107、M110、K111、T114、Q115、T148、V192、R194、R195、F196、A199、H228、N229、Q231、E233以及K234。应注意,所述残基在人和cyan猴中都相同,例外的是M110为cyan中的V110并且A199为cyan中的T199。

[0078] 因此,在一些实施方案中,通过结合所述抗原表位中的任一个来与AB79和Ab19竞争的抗体可用于治疗自身免疫疾病。应注意,Ab79和BM1具有一些重叠;因此,与Ab79竞争并且不是BM1的抗体适用于本发明。

[0079] 因此,本发明提供结合人CD38和cyan CD38并且与所述残基的至少80%、90%、95%或98%相互作用的抗体。换句话说,相互作用区的表面面积不超过所述残基的面积。

[0080] 每个链的羧基末端界定主要负责效应子功能的恒定区。Kabat等收集了重链和轻链的可变区的许多主要序列。基于序列保守度,Kabat等将个别主要序列分为CDR和框架且将其制成列表(参见SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,第五版,NIH publication,第91-3242号,E.A.Kabat等,以引用的方式全部并入)。

[0081] 在免疫球蛋白的IgG亚类中,重链中存在若干免疫球蛋白域。本文中的“免疫球蛋白(Ig)域”意思是具有明显不同三级结构的免疫球蛋白区。本发明所关注的是重链域,包括恒定重链(CH)域和铰链域。在IgG抗体的情形中,每个IgG同种型均具有三个CH区。因此,IgG的情形中的“CH”域如下:“CH1”是指根据如Kabat中的EU指数的位置118-220。“CH2”是指根据如Kabat中的EU指数的位置237-340,并且“CH3”是指根据如Kabat中的EU指数的位置341-447。

[0082] 另一类型的重链的Ig域为铰链区。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”意思是柔性多肽,其包含介于抗体的第一恒定域与第二恒定域之间的氨基酸。在结构上,IgG CH1域在EU位置220处结束,并且IgG CH2域在残基EU位置237处开始。因此,对于IgG来说,本文定义抗体铰链包括位置221(IgG1中的D221)至236(IgG1中的G236),其中编号是根据如Kabat中的EU指数。在一些实施方案中,例如,在Fc区的情形中,包括低级铰链,所述“低级铰链”通常是指位置226或230。

[0083] 本发明尤其关注Fc区。本文中所用的“Fc”或“Fc区”或“Fc域”意思是多肽,其包含抗体的恒定区,排除第一恒定区免疫球蛋白域,并且在一些状况下,排除铰链的部分。因此,Fc是指IgA、IgD及IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白域,IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白域,以及这些结构域的柔性铰链N-末端。对于IgA和IgM来说,Fc可包括J链。对于IgG来说,Fc域包含免疫球蛋白域C γ 2及C γ 3(C γ 2及C γ 3)以及介于C γ 1(C γ 1)与C γ 2(C γ 2)之间的低级铰链区。虽然Fc区的边界可能变化,但通常所界定的人IgG重链Fc区包括其羧基末端的残基C226或P230,其中编号是根据如Kabat中的EU指数。在一些实施方案中,如以下更全面所述,对Fc区进行氨基酸修饰例如来改变与一个或多个Fc γ R受体或FcRn受体的结合。

[0084] 在一些实施方案中,抗体为全长抗体。本文中的“全长抗体”意思是构成抗体的天然生物形式的结构,其包括可变区和恒定区,并包括如本文所概述的一个或多个修饰。

[0085] 或者,抗体可为各种结构,分别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、结构域抗体、合成抗体(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(本文中有时称为“抗体缀合物”)以及各自的片段。仍然依赖于的结构

[0086] 在一个实施方案中,抗体为抗体片段。特异抗体片段包括但不限于,(i)由VL、VH、CL和CH1域组成的Fab片段,(ii)由VH和CH1域组成的Fd片段,(iii)由单个抗体的VL和VH域组成的Fv片段,(iv)由单个可变区组成的dAb片段(Ward等,1989,Nature341:544-546,以引用的方式全部并入),(v)分离CDR区,(vi)F(ab')₂片段,其为包含两个经连接的Fab片段的二价片段,(vii)单链Fv分子(scFv),其中VH域和VL域通过肽接头连接,所述肽接头使两个结构域缔合以形成抗原结合位点(Bird等,1988,242:423-426,Huston等,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.85:5879-5883,以引用的方式全部并入),(viii)双特异性单链Fv(W003/11161,在此以引用的方式并入)以及(ix)“双功能抗体”或“三功能抗体”,它们是通过基因融合构建的多价或多特异性片段(Tomlinson等,2000,Methods Enzymol.326:461-479;W094/13804;Holliger等,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:6444-6448,以引用的方式全部并入)。

[0087] 嵌合抗体和人源化抗体

[0088] 在一些实施方案中,抗体可为来自例如嵌合抗体和/或人源化抗体的不同物种的混合物。也就是说,在本发明中,CDR集合可与不同于由本文序列所具体描述的那些的框架和恒定区一起使用。

[0089] 一般来说,“嵌合抗体”及“人源化抗体”是指组合来自一种以上物种的多个区的抗体。举例来说,“嵌合抗体”通常包含来自小鼠(或在一些情况下来自大鼠)的可变区和来自人的恒定区。“人源化抗体”一般是指可变域框架区已交换成人抗体中存在的序列的非人抗体。一般来说,在人源化抗体中,整个抗体除CDR的外,是由源自人的多核苷酸编码或者除其CDR内的外与此抗体相同。部分或全部由来源于非人生物体的核酸编码的CDR被移植入人抗体可变区的 β 折叠框架中以产生抗体,所述抗体的特异性由所移入的CDR决定。这类抗体的产生描述于例如W092/11018,Jones,1986,Nature321:522-525,Verhoeyen等,1988,Science239:1534-1536中,它们都整体地以引用的方式并入。选定接受体框架残基至对应供体残基的“回复突变(Backmutation)”经常要求重新获得初始移植的构建体中丧失的亲和力和(US5530101、US5585089、US5693761、US5693762、US6180370、US5859205、US5821337、US6054297、US6407213,它们都整体地以引用的方式并入)。人源化抗体最佳地也将包含免疫球蛋白恒定区的至少一部分,通常为人免疫球蛋白的至少一部分,并且因此通常将包含人Fc区。人源化抗体也可使用具有基因改造的免疫系统的小鼠产生。Roque等,2004,Biotechnol.Prog.20:639-654,其整体内容以引用的方式并入。用于人源化和重整非人抗体的各种技术与方法在本领域中众所周知(参见Tsurushita&Vasquez,2004,Humanization of Monoclonal Antibodies,Molecular Biology of B Cells,533-545,Elsevier Science(USA),和其中引证的参考文献,它们都整体地以引用的方式并入)。人源化方法包括但不限于描述于以下文献中的方法:Jones等,1986,Nature321:522-525;Riechmann等,1988,Nature332:323-329;Verhoeyen等,1988,Science,239:1534-1536;Queen等,1989,Proc Natl Acad Sci,USA86:10029-33;He等,1998,J.Immunol.160:1029-1035;Carter等,1992,Proc Natl Acad Sci USA89:4285-9;Presta等,1997,Cancer Res.57(20):4593-9;Gorman等,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA88:4181-4185;O'Connor等,1998,Protein

Eng11:321-8,它们都整体地以引用的方式并入。降低非人抗体可变区的免疫原性的人源化方法或其它方法可包括表面重整(resurfacing)方法,例如,Roguska等,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA91:969-973中所述,其整个内容以引用的方式并入。在一个实施方案中,亲本抗体已如本领域中所知加以亲和力成熟。可采用基于结构的方法进行人源化和亲和力成熟,例如,在USSN11/004,590中所述。可采用基于选择的方法进行抗体可变区的人源化和/或亲和力成熟,所述方法包括但不限于描述于以下文献中的方法:Wu等,1999,J.Mol.Biol.294:151-162;Baca等,1997,J.Biol.Chem.272(16):10678-10684;Rosok等,1996,J.Biol.Chem.271(37):22611-22618;Rader等,1998,Proc.Natl.Acad.Sci.USA95:8910-8915;Krauss等,2003,Protein Engineering16(10):753-759,都整个地以引用的方式并入。其它人源化方法可涉及仅移植CDR的部分,包括但不限于描述于USSN09/810,510;Tan等,2002,J.Immunol.169:1119-1125;De Pascalis等,2002,J.Immunol.169:3076-3084中的方法,所述文献都整体地以引用的方式并入。

[0090] 在一个实施方案中,本发明的抗体可为多特异性抗体,尤其双特异性抗体,有时也称为“双功能抗体(diabodies)”。所述抗体为结合两种(或更多种)不同抗原或同一抗原上的不同抗原表位的抗体。双功能抗体可以本领域中已知的各种方式制造(Holliger and Winter,1993,Current Opinion Biotechnol.4:446-449,其整体内容以引用的方式并入),例如,以化学方法制备或者从杂交的杂交瘤制备。

[0091] 在一个实施方案中,抗体为微型抗体(minibody)。微型抗体是最小化的抗体样蛋白质,其包含scFv连接至CH3域。Hu等,1996,Cancer Res.56:3055-3061,其整体内容以引用的方式并入。在一些情况下,scFv可连接至Fc区,并且可包括部分或整个铰链区。

[0092] 本发明的抗体一般是分离或重组抗体。当“分离”用以描述本文公开的各种多肽时,表示已从其得到表达的细胞或细胞培养物识别并分开和/或回收的多肽。通常,分离多肽可通过至少一个纯化步骤制备。“分离抗体”是指大致上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体。例如,特异地结合CD38的分离抗体大致上不含特异地结合不同于CD38的抗原的抗体。

[0093] 然而,特异地结合人CD38或猕猴CD38的抗原表位、同种型或变体的分离抗体可具有对其它相关抗原,例如来自其它物种(如CD38物种同系物)的相关抗原的交叉反应性。另外,分离抗体可大致上不含其它细胞材料和/或化学品。

[0094] 具有不同特异性的分离单克隆抗体可组合于定义明确的组合物中。因此例如,如有需要,那么Ab79和Ab19可组合于单一制剂中。

[0095] 本发明的抗CD38抗体特异地结合CD38配体(例如,人和猕猴CD38蛋白质SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2。“特异性结合”或“特异地结合”或“对特定抗原或抗原表位特异”意思是明显不同于非特异性相互作用的结合。特异性结合可例如通过测定分子的结合相较于对照分子的结合来测量,所述对照分子一般为不具有结合活性的结构类似分子。举例来说,特异性结合可通过与类似于标靶的对照分子的竞争来测定。

[0096] 对特定抗原或抗原表位的特异性结合可例如由对抗原或抗原表位的KD为至少约 10^{-4} M、至少约 10^{-5} M、至少约 10^{-6} M、至少约 10^{-7} M、至少约 10^{-8} M、至少约 10^{-9} M、或者至少约 10^{-10} M、至少约 10^{-11} M、至少约 10^{-12} M或更高的抗体展现,其中KD是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。通常,特异地结合抗原的抗体对于对照分子的KD为对于所述抗原或抗原表位的

20-、50-、100-、500-、1000-、5,000-、10,000-或更高倍数。

[0097] 此外,对特定抗原或抗原表位的特异性结合可例如由对于抗原或抗原表位的KA或Ka为对于对照物的至少20-、50-、100-、500-、1000-、5,000-、10,000-或更高倍数的抗体展现,其中KA或Ka是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率。

[0098] 抗体修饰

[0099] 本发明进一步提供变异抗体。也就是说,可对本发明的抗体做出许多修饰,包括但不限于CDR中的氨基酸修饰(亲和力成熟)、Fc区中的氨基酸修饰、糖化变异、其它类型的共价修饰等。

[0100] 本文的“变体”意思是与亲本多肽的序列因至少一个氨基酸修饰而不同的多肽序列。氨基酸修饰可包括取代、插入和缺失,其中前者在许多情况下都是优选的。

[0101] 一般来说,变体可包括许多修饰,只要蛋白质的功能仍存在即可,如本文所述。也就是说,在例如利用Ab79或Ab19的CDR产生氨基酸变体的情况下,所述抗体应当仍然特异地结合人和猕猴CD38。类似地,如果例如利用Fc区产生氨基酸变体,那么变异抗体应保持抗体的特定应用或适应症所需的受体结合功能。

[0102] 然而,一般来说,通常利用1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代,因为目标经常是利用最小数目的修饰改变功能。在一些情况下,存在1至5个修饰,而在许多实施方案中也可用1至2、1至3及1至4个修饰。

[0103] 应注意,氨基酸修饰的数目可在功能域以内:例如,可能需要在野生型或改造蛋白质的Fc区中具有1至5个修饰,以及在Fv区中具有1至5个修饰。变异多肽序列优选将与亲本序列(例如,对于Ab79和/或Ab19的可变区、恒定区和/或重链和轻链序列)具有至少约80%、85%、90%、95%或高至98%或99%同一性。应注意,取决于序列的大小,百分比同一性将取决于氨基酸的数目。

[0104] 本文的“氨基酸取代”或“取代”意思是亲本多肽序列中特定位置上的氨基酸被另一氨基酸替换。例如,取代S100A是指位置100上的丝氨酸被丙氨酸替换的变异多肽。本文所用的“氨基酸插入”或“插入”意思是在亲本多肽序列中特定位置上添加氨基酸。本文所用的“氨基酸缺失”或“缺失”意思是在亲本多肽序列中特定位置上去除氨基酸。

[0105] 本文所用的“亲本多肽”、“亲本蛋白质”、“前体多肽”、或“前体蛋白质”意思是随后要被修饰来产生变体的未被修饰的多肽。一般来说,本文的亲本多肽为Ab79和Ab19。亲本多肽可指多肽本身、包含亲本多肽的组合物、或编码其的氨基酸序列。因此,本文所用的“亲本Fc多肽”意思是被修饰来产生变体的Fc多肽,并且本文所用的“亲本抗体”意思是被修饰来产生变异抗体的抗体。

[0106] 本文的“野生型”或“WT”或“初始”意思是自然界中所见的氨基酸序列或核苷酸序列,包括对偶基因变异。WT蛋白质、多肽、抗体、免疫球蛋白、IgG等具有未被有意修饰的氨基酸序列或核苷酸序列。

[0107] 本文的“变异Fc区”意思是与野生型Fc序列因至少一个氨基酸修饰而不同的Fc序列。Fc变体可指Fc多肽本身、包含Fc变异多肽的组合物、或氨基酸序列。

[0108] 在一些实施方案中,可在抗体(Ab79或Ab19)的CDR的一个或多个中进行一个或多个氨基酸修饰。一般来说,任何单个CDR中仅取代1或2或3个氨基酸,并且一般来说一组CDR内进行不超过4、5、6、7、8、9或10个改变。然而应理解,任何CDR中没有取代、有1、2或3个取代

的任何组合可独立地且任选地地与任何其它取代相组合。

[0109] 在一些情况下,将CDR中的氨基酸修饰称为“亲和力成熟”。“亲和力成熟的”抗体是一个或多个CDR中具有一个或多个改变从而导致抗体对抗原的亲和力相较于不具有那些改变的亲本抗体得到改进的抗体。在一些情况下,尽管很少见,可能需要减小抗体对其抗原的亲和力,但这通常并不是优选的。

[0110] 可进行亲和力成熟以增大抗体对抗原的结合亲和力,相较于“亲本”抗体增大至少约10%至50-100-150%或更多,或1至5倍。优选的亲和力成熟抗体对标靶抗原具有纳摩尔级或甚至皮摩尔级亲和力。亲和力成熟抗体通过已知的程序产生。例如,参见Marks等,1992, *Biotechnology* 10:779-783,其描述通过可变重链(VH)及可变轻链(VL)域改组的亲和力成熟。CDR和/或框架残基的随机突变诱发描述于:例如,Barbas,等1994, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813; Shier等,1995, *Gene* 169:147-155; Yelton等,1995, *J. Immunol.* 155:1994-2004; Jackson等,1995, *J. Immunol.* 154 (7):3310-9; 以及Hawkins等,1992, *J. Mol. Biol.* 226:889-896中。

[0111] 或者,可在本发明抗体的CDR的一个或多个中进行“沉默的”氨基酸修饰,例如不显著改变抗体对抗原的亲亲和力的修饰。所进行的这些修饰可以是处于许多原因,包括使表达最佳化(如可对编码本发明抗体的核酸所做的修饰)。

[0112] 因此,本发明的CDR和抗体的定义内包括变异CDR和抗体;也就是说,本发明的抗体可包括Ab79和Ab19的CDR的一个或多个中的氨基酸修饰。此外,如以下概述,氨基酸修饰也可独立地并且任选地地在CDR以外的任何区,包括框架和恒定区中进行。

[0113] 在一些实施方案中,描述对人CD38 (SEQ ID NO:1) 和猕猴CD38 (SEQ ID NO:2) 特异的Ab79及Ab19的变异抗体。所述抗体由六个CDR组成,其中所述抗体的每一个CDR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个氨基酸取代。在其它实施方案中,变异抗CD38抗体由六个CDR组成,其中所述抗体的每一个CDR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个氨基酸取代。

[0114] 在一些实施方案中,本发明的抗CD38抗体由变异Fc域组成。如本领域中所已知,抗体的Fc区与许多Fc受体和配体相互作用,从而赋予一系列重要的功能性能力,称之为效应子功能(effector function)。所述Fc受体包括但不限于(人中)Fc γ RI (CD64),包括同种型Fc γ RIa、Fc γ RIb和Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32),包括同种型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; 以及Fc γ RIII (CD16),包括同种型Fc γ RIIIa (包括同种异型V158和F158,与抗体依赖性细胞毒性(ADCC)有关)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 (涉及补体依赖性细胞毒性(CDC)的补体蛋白质)和FcRn (涉及血清半衰期的新生儿受体)。适合的修饰可例如于以下文献中所述在一个或多个位置上进行:US专利申请11/841,654及其中引证的参考文献、US2004/013210、US2005/0054832、US2006/0024298、US2006/0121032、US2006/0235208、US2007/0148170、USSN12/341,769、US专利号6,737,056、US专利号7,670,600、US专利号6,086,875,所述专利全部明确地以其整体内容,尤其针对增加结合Fc受体的特定氨基酸取代而以引用的方式并入。

[0115] 除上文概述的修饰的外,可进行其它修饰。例如,可通过并入连接VH和VL域的二硫

桥来稳定分子(Reiter等,1996,Nature Biotech.14:1239-1245,其整体内容以引用的方式并入)。此外,存在可如以下概述所进行的各种抗体共价修饰。

[0116] 抗体的共价修饰包括在本发明的范畴以内,并且通常,但不总是,在翻译后进行。举例来说,通过使抗体的特定氨基酸残基与能够同选定侧链或N末端或C末端残基反应的有机衍生剂反应,来将几种类型的抗体共价修饰引入分子中。

[0117] 半胱胺酰残基最常见地与 α -卤乙酸盐(和对应的胺),如氯乙酸或氯乙酰胺反应,得到羧基甲基或羧酰胺甲基(carboxyamidomethyl)衍生物。半胱胺酰残基也可通过与溴三氟丙酮(bromotrifluoroacetone)、 α -溴代- β -(5-咪唑基)丙酸(α -bromo- β -(5-imidazolyl) propionic acid)、氯乙酰磷酸盐(chloroacetyl phosphate)、N-烷基顺丁烯二酰亚胺(N-alkylmaleimides)、3-硝基-2-吡啶基二硫醚(3-nitro-2-pyridyl disulfide)、甲基2-吡啶基二硫醚(methyl 2-pyridyl disulfide)、对氯汞苯甲酸盐(p-chloromercuribenzoate)、2-氯汞-4-硝基苯酚(2-chloromercuri-4-nitrophenol)、或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)等反应而衍生。

[0118] 组氨酰残基通过与焦碳酸二乙酯在pH 5.5-7.0下反应而衍生,因为所述试剂相对地对组氨酰基侧链具特异性。对溴苯酰甲基溴(Para-bromophenacyl bromide)也有用;反应优选在0.1M二甲胂酸钠中在pH 6.0下执行。

[0119] 赖氨酰基和氨基末端残基是与琥珀酸或其它羧酸酐反应。利用所述试剂的衍生具有逆转赖氨酰残基的电荷的作用。用于衍生含 α -氨基的残基的其它适合试剂包括亚氨酸酯(imidoester),如甲基吡啶亚胺甲酯(methyl picolinimide);磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate);吡哆醛;硼氢化氯(chloroborohydride);三硝基苯磺酸;O-甲基异脲;2,4-戊二酮;以及转胺酶催化的与乙醛酸盐的反应。

[0120] 精氨酰残基通过与一种或几种常规试剂反应而修饰,所述常规试剂中有苯乙二醛(phenylglyoxal)、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮以及茚三酮(ninhydrin)。精氨酸残基的衍生要求反应在碱性条件下进行,这是因为胍官能团具有高pKa。此外,所述试剂可与赖氨酸的基团以及精氨酸 ϵ -氨基反应。

[0121] 酪氨酰残基的特定修饰可通过与芳族重氮化合物或四硝基甲烷反应来进行,尤其关注将光谱标记引入酪氨酰残基中。最常见地,使用N-乙酰基咪唑和四硝基甲烷分别形成O-乙酰基酪氨酰基物质和3-硝基衍生物。使用 ^{125}I 或 ^{131}I 碘化酪氨酰残基,以制备标记的蛋白质以供用于放射性免疫测定中,上文描述的氯胺T方法是适合的。

[0122] 羧基侧基(天冬氨酰基或谷氨酰基)通过与碳化二亚胺($\text{R}'-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$)反应进行选择修饰,所述碳化二亚胺($\text{R}'-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$)中R及R'任选地为不同烷基,如1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳化二亚胺或1-乙基-3-(4-氮阳离子-4,4-二甲基戊基)碳化二亚胺。此外,天冬氨酰和谷氨酰残基可通过与铵离子反应而转化为天冬酰胺酰和谷酰胺酰残基。

[0123] 利用双官能试剂的衍生适用于将抗体交联至水不可溶载体基质或表面以除用于以下所述的方法外,还用于各种方法中。常用的交联剂包括例如1,1-双(重氮乙酰基)-2-苯基乙烷;戊二醛;N-羟基琥珀酰亚胺酯,例如与4-叠氮基水杨酸的酯;同质双官能亚氨酸酯(homobifunctional imidoester),包括二琥珀酰亚氨基酯,如3,3'-二硫代双(琥珀酰亚氨基丙酸酯);以及双官能顺丁烯二酰亚胺,如双-N-顺丁烯二酰亚氨基-1,8-辛烷。如甲基-3-

[(对-叠氮苯基)二硫代]丙亚氨酸酯(methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimide)的衍生剂产生能够于光存在下形成交联的光可活化中间物。或者,为固定蛋白质,采用如描述于美国专利号3,969,287;3,691,016;4,195,128;4,247,642;4,229,537以及4,330,440中的如猕猴生成溴活化的碳水化合物(cynomolgusogen bromide-activated carbohydrates)的反应性水不可溶基质和反应性基体,所述专利都整体地以引用的方式并入。

[0124] 谷酰胺酰和天冬酰胺酰残基常经受去酰氨基作用,分别得到对应谷氨酰和天冬氨酰残基。或者,所述残基可于微酸性条件下经去酰氨基作用。所述残基的任一种形式属于本发明的范畴。

[0125] 其它修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化、丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 第79-86页[1983],其整体内容以引用的方式并入)、N-末端胺的乙酰化和任何C-末端羧基的酰胺化。

[0126] 此外,如本领域技术人员所了解,包括荧光、酶、磁、放射性标记等的标记都可添加至抗体(以及本发明的其它组合物)。

[0127] 糖化作用

[0128] 另一类型的共价修饰是糖化作用中的改变。在另一个实施方案中,本文公开的抗体可被修饰而包括一种或多种改造糖型(glycoform)。本文使用的“改造糖型”意思是共价连接至抗体的碳水化合物组成,其中所述碳水化合物组成在化学上不同于亲本抗体的碳水化合物组成。改造糖型可对各种目的有用,包括但不限于提高或降低效应子功能。改造糖型的优选形式是无海藻糖作用(afucosylation),其已被证实与ADCC功能的增加有关,这可能是经由与Fc γ RIIIa受体的较紧密结合而实现。在这种情形下,“无海藻糖作用”意思是宿主细胞中产生的大多数抗体大致上不含海藻糖,例如90-95-98%的所产生抗体中没有可观量的海藻糖作为抗体碳水化合物部分的组分(一般连接至Fc区中的N297处)。定义功能的无海藻糖抗体一般展现对Fc γ RIIIa受体至少50%或更高亲和力。

[0129] 改造糖型可通过本领域中已知的各种方法产生(Umaña等,1999,Nat Biotechnol17:176-180;Davies等,2001,Biotechnol Bioeng74:288-294;Shields等,2002,J Biol Chem277:26733-26740;Shinkawa等,2003,J Biol Chem278:3466-3473;US6,602,684;USN10/277,370;USN10/113,929;PCT W000/61739A1;PCT W001/29246A1;PCT W002/31140A1;PCT W002/30954A1,它们都整体地以引用的方式并入;Potelligent®技术[Biowa, Inc., Princeton, NJ];GlycoMAb®糖化改造技术[Glycart Biotechnology AG, Zürich, Switzerland])。所述技术中的许多技术是基于控制共价连接至Fc区的海藻糖化和/或平分型寡糖的含量,例如通过于各种改造或其它生物体或细胞系(例如Lec-13CHO细胞或大鼠杂交瘤YB2/0细胞)中表达IgG、通过调节涉及糖化途径的酶(例如FUT8[α 1,6-海藻糖基转移酶]和/或 β 1-4-N-乙酰基葡萄糖氨基转移酶III[GnTIII])、或通过之IgG被表达后修饰碳水化合物来进行控制。例如,Seattle Genetics的“糖改造抗体(sugar engineered antibody)”或“SEA技术”通过添加抑制生产期间的海藻糖化作用的修饰糖而起作用;参见例如20090317869,其整体内容以引用的方式并入本文。改造糖型通常是指不同碳水化合物或寡糖;因此抗体可包括改造糖型。

[0130] 或者,改造糖型可指包含不同碳水化合物或寡糖的IgG变体。如本领域中所已知,糖化模式可取决于蛋白质的序列(例如,以下所讨论的特定糖化氨基酸残基的存在或不存在)或产生蛋白质的宿主细胞或生物体二者。以下讨论特定表达系统。

[0131] 多肽的糖化作用通常是经N连接或经O连接。N连接是指碳水化合物部分连接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为除脯氨酸外的任何氨基酸)是用于碳水化合物部分至天冬酰胺侧链的酶连接的辨别序列。因此,多肽中所述三肽序列的任一者的存在创造潜在的糖化位点。经O连接的糖化作用是指N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一者连接至羟基氨基酸,最常见为丝氨酸或苏氨酸,不过也可使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0132] 糖化位点至抗体的添加宜通过改变氨基酸序列以使得其含有上述三肽序列中的一个或多个来实现(对于经N连接的糖化位点)。所述改变也可通过将个或多个丝氨酸或苏氨酸残基添加至起始序列或者通过以个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代来进行(对于经O连接的糖化位点)。为方便起见,抗体氨基酸序列优选经由DNA层次上的变化来改变,尤其通过使编码靶多肽的DNA在预选的碱基处突变以使得产生将翻译成所需氨基酸的密码子。

[0133] 增加抗体上碳水化合物部分的数目的另一手段是糖苷至蛋白质的化学或酶偶联。这些程序的有利的处在于,其不需要宿主细胞中产生具有糖化能力以用于N连接或O连接的糖化作用的蛋白质。取决于所使用的偶联方式,所述糖可连接至(a)精氨酸及组氨酸、(b)游离羧基、(c)游离巯基,如半胱氨酸的游离巯基、(d)游离羟基,如丝氨酸、苏氨酸或羟基脯氨酸的游离羟基、(e)芳族残基,如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的芳族残基、或(f)谷酰胺的酰氨基。所述方法描述于W087/05330及Aplin与Wriston,1981,CRC Crit.Rev.Biochem.,第259-306页,这二者的整体内容以引用的方式并入。

[0134] 起始抗体上存在的碳水化合物部分的去除(例如翻译后)可用化学方法或酶方法实现。化学去糖化作用需要使蛋白质暴露于化合物三氟甲烷磺酸或等效化合物。所述处理导致除连接糖(N-乙酰基葡萄糖胺或N-乙酰基半乳糖胺)以外的大部分或所有糖裂解,而留下多肽完好无损。化学去糖化作用由Hakimuddin等,1987,Arch.Biochem.Biophys.259:52及Edge等,1981,Anal.Biochem.118:131描述,这二者的完整内容以引用的方式并入。多肽上碳水化合物部分的酶裂解可通过如Thotakura等,1987,Meth.Enzymol.138:350中所描述使用各种内切糖苷酶及外切糖苷酶来实现,所述文献的整个内容以引用的方式并入。可通过如Duskin等,1982,J.Biol.Chem.257:3105中所描述使用化合物衣霉素(tunicamycin)来防止潜在糖化位点处的糖化作用。衣霉素阻断蛋白质-N-糖苷键联的形成。

[0135] 另一类型的抗体共价修饰包含以例如Nektar Therapeutics的2005-2006PEG Catalog(可从Nektar网站获得)美国专利号4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192或4,179,337中提及的方式将抗体连接至各种非蛋白质聚合物,包括但不限于各种多元醇,如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯,所述文献都整体地以引用的方式并入。此外,如本领域中所已知,氨基酸取代可于抗体内的各种位置上进行以促进如PEG的聚合物的添加。参见例如美国公布号2005/0114037A1,其整体内容以引用的方式并入。

[0136] 特定CDR和可变区实施方案

[0137] 本发明提供各自具有一组特定CDR(包括如上文概述的一些氨基酸取代)的许多抗

体。如上文所概述,抗体可由6个CDR的组、由可变区、或由全长重链和轻链(包括恒定区)定义。此外,如上文所概述,也可进行氨基酸取代。一般来说,在CDR内变化的情形下,由于CDR具有相对短的长度,所以通常按照可进行的氨基酸修饰的数目来描述氨基酸修饰。尽管这不适用于讨论可变序列、恒定序列或全长序列中可引入的氨基酸修饰的数目,但除变化的数目外,按照“同一性%”来定义所述变化也为适当的。因此,如本文中所述,本发明内包括的抗体与本文中所列的序列识别号具有80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性。

[0138] 在Ab79抗体的情形下,CDR的组如下:重链的三个CDR涵盖HCDR1SEQ ID NO:3 (HCDR1)、SEQ ID NO:4 (HCDR2)和SEQ ID NO:5 (HCDR3),并且轻链的三个CDR涵盖SEQ ID NO:6 (LCDR1)、SEQ ID NO:7 (LCDR2)和SEQ ID NO:8 (LCDR3)。

[0139] 在Ab19的情形下,CDR的组如下:HCDR1 (SEQ ID NO:13)、HCDR2 (SEQ ID NO:14)和HCDR3 (SEQ ID NO:15),和LCDR1 (SEQ ID NO:16)、LCDR2 (SEQ ID NO:17)和LCDR3 (SEQ ID NO:18)。

[0140] 本发明中特别排除SEQ ID NO:24与SEQ ID NO:25 (Benchmark 1的重链和轻链)和SEQ ID NO:26与SEQ ID NO:27 (Benchmark2的重链和轻链)的抗体。应注意,所述抗体不可与以下讨论的猕猴CD38交叉反应。

[0141] 本发明的抗体可与人和猕猴CD38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”是对来自第一哺乳动物物种的抗原的结合亲和力与对所述抗原的来自第二哺乳动物物种的同系物的结合亲和力几乎相同的抗体。物种交叉反应性可例如表示为抗体对第一哺乳动物物种的抗原的KD与同一抗体对所述抗原的来自第二哺乳动物物种的同系物的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、至多20。或者或另外,当抗体施用至第二物种后展示治疗或诊断效力时,其具有“物种交叉反应性”。因此,在当前情况下,本发明的抗体可与猕猴CD38交叉反应,在施用至猕猴灵长类动物时展示临床前效力,并且因此可视为具有交叉反应性。

[0142] 在一些实施方案中,提供与本发明的抗体(例如,与Ab79和/或Ab19)竞争结合人CD38和/或猕猴CD38的抗体,但不包括BM1或BM2。两种或更多种抗CD38抗体对结合CD38或CD38的一部分的竞争可如本领域中所已知通过任何适合的技术测定。

[0143] 本发明情形下的竞争是指在测试化合物存在下,本发明抗体(例如Ab79或Ab19)结合其特定结合拍档(例如CD38)的倾向的任何可检测的显著降低。通常,竞争意思是如通过如ELISA或Biacore®测定的标准技术所测量,在竞争者存在下本发明抗体对CD38的结合的至少约10-100%降低。因此,举例来说,有可能对竞争性设定准则,其中检测到至少约10%相对抑制作用、检测到至少约15%相对抑制作用、或检测到至少约20%相对抑制作用的后,将抗体视为具有足够竞争性。在属于竞争抗体的抗原表位于抗原中位置相近的情况下,竞争可指示为对CD38结合的高于约40%的相对抑制作用(例如至少约45%抑制作用,如至少约50%抑制作用,例如至少约55%抑制作用,如至少约60%抑制作用,例如至少约65%抑制作用,如至少约70%抑制作用,例如至少约75%抑制作用,如至少约80%抑制作用,例如至少约85%抑制作用,如至少约90%抑制作用,例如至少约95%抑制作用,或更高水平的相对抑制作用)。

[0144] 在一些情况下,如以下在诊断应用的情形下所讨论,对竞争结合测定的组分中的一个或多个进行标记。

[0145] 也可能出现的情况为,针对一个以上CD38抗原表位和/或CD38的一部分的抗CD38

抗体之间存在竞争,例如在CD38的特定区的抗体结合特性保留在其片段中的情形下,如在明确呈现的线性抗原表位位于各种测试片段中或者构象抗原表位呈现于足够大的CD38片段中以及CD38中的情况下。

[0146] 竞争的评估通常涉及使用本发明的抗体、CD38(人或猕猴CD38或二者)和测试分子评价相对抑制性结合。测试分子可包括任何分子,包括其它抗体、小分子、肽等。所述化合物混合的量足以形成比较,所述比较给出关于所讨论的分子相对于其它存在分子的选择性和/或特异性的信息。

[0147] 测试化合物、CD38和本发明的抗体的量可改变。例如,对于ELISA评估,需要约5-50 μg (例如,约10-50 μg 、约20-50 μg 、约5-20 μg 、约10-20 μg 等)的抗CD38抗体和/或CD38标靶来评估是否存在竞争。条件也应适合结合。通常,生理条件或近生理条件(例如约20-40 $^{\circ}\text{C}$ 的温度、约7-8的pH等)适合抗CD38抗体:CD38结合。

[0148] 竞争经常指示为如ELISA和/或FACS分析所测定显著高于约5%的相对抑制作用。可能需要设定更高的相对抑制作用临界值以作为特定情形中适合的竞争水平的准则/决定因素(例如,在使用竞争分析来选择或筛选利用阻断与CD38结合的另一肽或分子(例如,CD38的自然结合伴侣,如CD31,也称为CD31抗原,EndoCAM、GPIIA、PECAM-1、血小板/内皮细胞粘附分子、或自然存在的抗CD38抗体)的结合的预期功能所设计的新抗体时)。

[0149] 在一些实施方案中,本发明的抗CD38抗体特异地结合CD38中的一个或多个残基或区,并且也不与和CD38同源的其它蛋白质交叉反应,所述其它蛋白质如为BST-1(骨髓基质细胞抗原-1)和Mo5,也称为CD157。

[0150] 通常,没有交叉反应性意思是在适合的测定条件下使用足够量的分子通过ELISA和/或FACS分子评估时,分子之间存在小于约5%的相对竞争性抑制作用。

[0151] CD38活性的抑制

[0152] 所公开的抗体可阻断配体-受体相互作用或抑制受体组分相互作用。本发明的抗CD38抗体可为“阻断”或“中和”抗体。“中和抗体”意思是与CD38结合导致抑制CD38的生物活性的抗体,所述CD38的生物活性例如为其与配体相互作用的能力、酶活性、信号传递能力和特别为其引起活化淋巴细胞的能力。对CD38的生物活性的抑制作用可通过本领域中已知的几种标准体外或体内测定中的一个或多个评估(见以下实施例)。

[0153] “抑制结合”或“阻断结合”(例如在提及对CD38结合伴侣与CD38结合的抑制/阻断时)涵盖部分和完全抑制/阻断。对CD38结合伴侣与CD38结合的抑制/阻断可降低或改变没有抑制或阻断时CD38结合伴侣与CD38结合时发生的细胞信号传递的正常水平或类型。抑制及阻断也旨在包括CD38结合伴侣与CD38的结合亲和力在与抗CD38抗体接触时相较于配体未与抗CD38抗体接触时的任何可测量的降低,例如CD38结合伴侣与CD38的结合受阻断至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。

[0154] 所公开的抗CD38抗体也可抑制细胞生长。“抑制生长”包括细胞生长在与抗CD38抗体接触时相较于相同细胞未与抗CD38抗体接触时的生长的任何可测量的降低,例如细胞培养物的生长受抑制至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或100%。

[0155] 在一些实施方案中,所公开的抗CD38抗体能够耗减活化淋巴细胞和浆细胞。在此情形下的“耗减”意思是活化淋巴细胞和/或浆细胞的血清含量(例如在猕猴中所测试)相较于未治疗动物的可测量的降低。一般来说,可见至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、

80%、90%、99%或100%的耗减。此外,如以下实施例中所示,本发明的抗体展现的一个特定优势为给药后所述细胞的可恢复性;也就是说,如对于一些治疗所已知(例如利用抗CD20抗体的治疗),细胞耗减会持续长时间段,引起不需要的副作用。如本文中所示,对活化淋巴细胞和/或浆细胞的作用具可恢复性。

[0156] 本发明抗体的制备方法

[0157] 本发明进一步提供用于制备所公开的抗CD38抗体的方法。所述方法涵盖培养含有编码本发明抗体的分离核酸的宿主细胞。如本领域技术人员所了解,所述培养可取决于抗体的性质以各种方式进行。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处于可产生抗体并且可分离抗体的条件下。

[0158] 一般来说,提供编码本发明抗体的核酸。这类多核苷酸编码重链和轻链的每一者的可变区和恒定区,不过根据本文中所述的组合物本发明也涵盖其它组合。本发明也涵盖来源于所公开的多核苷酸的寡核苷酸片段和与所述多核苷酸互补的核酸序列。

[0159] 所述多核苷酸可呈RNA或DNA的形式。呈DNA、cDNA、基因组DNA、核酸类似物和合成DNA形式的多核苷酸在本发明的范畴内。DNA可为双链或单链,并且如果为单链,那么可为编码链(有义链)或非编码链(反义链)。编码多肽的编码序列可与本文提供的编码序列相同或者可为不同编码序列,所述序列由于遗传密码的冗余性或简并性而编码与本文提供的DNA相同的多肽。

[0160] 在一些实施方案中,将编码本发明抗体的核酸并入表达载体中,所述表达载体可为染色体外载体或者经设计以整合入其所引入的宿主细胞的基因组中。表达载体可含有许多适当调节序列(包括但不限于转录和翻译控制序列、启动子、核糖结合位点、增强子、复制起点等)或其它组分(选择基因等),它们都如本领域中所众所周知的可操作地连接。在一些情况下使用两个核酸并且各自置于不同表达载体中(例如重链在第一表达载体中,轻链在第二表达载体中),或者可将其置于同一表达载体中。本领域技术人员将了解,所述表达载体的设计,包括调节序列的选择,可取决于如宿主细胞的选择、所需的蛋白质表达水平等因素。

[0161] 一般来说,核酸和/或表达可引入适合的宿主细胞中以创造重组宿主细胞,所述引入使用适合于所选宿主细胞的任何方法(例如转型、转染、电穿孔、感染),以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(例如载体中、细胞中通过各过程创造的构建体中、整合入宿主细胞基因组中)。所得重组宿主细胞可维持在适合表达的条件下(例如在诱导物的存在下、在适合的非人动物中、在补充有适当盐、生长因数、抗生素、营养补充剂等的适合的培养基中),借此产生所述编码多肽。在一些情况下,重链在一种细胞中产生且轻链在另一种细胞中产生。

[0162] 可作为表达宿主获得的哺乳动物细胞系在本领域中为已知的并且包括可从美国菌种保藏中心(ATCC)(Manassas,VA)获得的许多永生化细胞系,包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HEK293细胞、NS0细胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾脏(BHK)细胞、猴肾脏细胞(COS)、人肝细胞癌细胞(例如Hep G2),以及许多其它细胞系。也可使用非哺乳动物细胞来表达重组抗体,所述非哺乳动物细胞包括但不限于细菌、酵母、昆虫和植物细胞。在一些实施方案中,抗体可于如牛或鸡的基因转殖动物中产生。

[0163] 用于抗体分子生物学、表达、纯化和筛选的一般性方法描述于例如Antibody

Engineering, Kontermann & Dubel 编辑, Springer, Heidelberg, 2001 and 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 中。

[0164] 应用和适应症

[0165] 本发明的抗体在制得后可用于各种应用, 包括 CD38 相关疾病的诊断和其治疗。

[0166] CD38 相关病况

[0167] 在一方面中, 本发明提供诊断和治疗与炎症和免疫疾病 (尤其与活化淋巴细胞相关的疾病) 相关的病况的方法。如本文中所示, CD38 表达于不成熟造血细胞中, 下调于成熟细胞中, 并且以高水平再表达于活化淋巴细胞及浆细胞中。例如, 在活化 B 细胞、浆细胞、活化 CD4+T 细胞、活化 CD8+T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、成熟树突状细胞 (DC) 以及活化单核细胞中可见高 CD38 表达。

[0168] 本发明的治疗性抗 CD38 抗体结合 CD38 阳性细胞, 从而经由包括 CDC 和 ADCC 途径的多种作用机制导致如活化淋巴细胞的所述细胞的耗减。

[0169] 因此, 展现 CD38 的表达增加或表达 CD38 的细胞的数目增加的任何自身免疫疾病可使用本发明的抗体治疗。所述疾病包括但不限于同种异体性胰岛移植物排斥 (allogenic islet graft rejection)、圆秃 (alopecia areata)、僵直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis)、抗磷脂症候群 (antiphospholipid syndrome)、自身免疫性爱迪生病 (autoimmune Addison's disease)、抗中性粒细胞胞质抗体 (antineutrophil cytoplasmic autoantibodies; ANCA)、肾上腺自身免疫疾病、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、自身免疫性中性粒细胞减少症、自身免疫性卵巢炎及睾丸炎、自身免疫性血小板减少症、自身免疫性荨麻疹、贝赛特氏病 (Behcet's disease)、大疱性类天疱疮 (bullous pemphigoid)、心肌症、卡斯托曼症候群 (Castleman's syndrome)、乳糜泻-皮肤炎 (celiac spruce-dermatitis)、慢性疲劳免疫功能障碍症候群 (chronic fatigue immune dysfunction syndrome)、慢性炎症性脱髓鞘多神经病变 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)、Churg-Strauss 症候群、瘢痕性类天疱疮 (cicatricial pemphigoid)、CREST 症候群、冷凝集素病 (cold agglutinin disease)、克罗恩症 (Crohn's disease)、皮炎、圆板状狼疮 (discoid lupus)、原发性混合型冷凝球蛋白血症 (essential mixed cryoglobulinemia)、因数 VIII 缺陷、纤维肌痛-纤维肌炎 (fibromyalgia-fibromyositis)、肾丝球肾炎 (glomerulonephritis)、Grave 氏病、格林-巴厘症候群 (Guillain-Barre)、古巴士德氏症候群 (Goodpasture's syndrome)、移植物抗宿主疾病 (GVHD)、桥本氏甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、A 型血友病、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA 神经病变、IgM 多神经病变、免疫介导的血小板减少症、幼年关节炎 (juvenile arthritis)、川崎氏病 (Kawasaki's disease)、扁平苔藓 (lichen planus)、红斑狼疮、梅尼尔氏病 (Meniere's disease)、混合性结缔组织疾病、多发性硬化症、1 型糖尿病、重症肌无力、寻常天疱疮 (pemphigus vulgaris)、恶性贫血 (pernicious anemia)、结节性多动脉炎 (polyarteritis nodosa)、多软骨炎 (polychondritis)、多腺体症候群 (polyglandular syndromes)、风湿性多肌痛 (polymyalgia rheumatica)、多发性肌炎及皮炎 (polymyositis and dermatomyositis)、原发性丙种球蛋白缺乏症 (primary agammaglobulinemia)、原发性

胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis)、牛皮癣、牛皮癣关节炎、雷诺氏现象(Reynauld's phenomenon)、莱特氏症候群(Reiter's syndrome)、类风湿性关节炎、类肉瘤病(sarcoidosis)、硬皮病、修格兰氏症候群(Sjorgen's syndrome)、固体器官移植排斥、僵硬人症候群(stiff-man syndrome)、系统性红斑狼疮、高安氏动脉炎(takayasu arteritis)、颞动脉炎/巨细胞动脉炎(temporal arteritis / giant cell arteritis)、血栓性血小板减少性紫癜、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、如疱疹样皮炎血管炎(dermatitis herpetiformis vasculitis)的血管炎病(vasculitides)、白斑(vitiligo)以及韦格纳肉芽肿(Wegner's granulomatosis)。

[0170] 在一些实施方案中的特定用途为使用本发明的抗体用于许多疾病的诊断和/或治疗,所述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、和移植物抗宿主疾病。

[0171] 因此,例如,可选择具有高浆细胞含量的患者,如展现高浆细胞的SLE患者,以及经显示对基于CD20的疗法无反应的RA患者。

[0172] 在一方面中,本发明提供治疗与表达CD38的细胞增殖有关的病况的方法,其包含对患者施用药学有效量的所公开抗体。在某些实施方案中,病况为癌症,并且在特定实施方案中,癌症为血液系统癌症。在其它特定实施方案中,病况为多发性骨髓瘤、慢性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、浆细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、B细胞白血病或伯基特氏淋巴瘤。

[0173] 本领域中已知,某些病况与表达CD38的细胞有关,并且某些病况与细胞表面上CD38的过度表达、高密度表达或上调的表达有关。细胞群是否表达CD38可通过本领域中已知的方法测定,例如给定群中由特异地结合CD38的抗体标记的细胞百分比的流式细胞术测定、或免疫组织化学测定,如以下对于诊断应用所一般性描述者。举例来说,在约10-30%的细胞中检测到CD38表达的细胞群可视为对CD38具有弱阳性;而在高于约30%的细胞中检测到CD38表达的细胞群可视为对CD38具有明确阳性(如Jackson等(1988), Clin.Exp.Immunol.72:351-356中),不过可使用其它准则来判定细胞群是否表达CD38。细胞表面上的表达密度可使用本领域中已知的方法测定,如(例如)已使用特异地结合CD38的抗体进行荧光标记的细胞的平均荧光强度的流式细胞术测量。

[0174] 在一些实施方案中,本发明的组合物和方法应用于癌症,如“血液系统癌症”,所述术语是指血液形成组织的恶性赘生物并涵盖白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。与CD38表达相关的病况的非限制性实例包括但不限于多发性骨髓瘤(Jackson等(1988), Clin.Exp.Immunol.72:351-356)、B慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL) Dürig等(2002), Leukemia16:30-5;Morabito等(2001), Leukemia Research25:927-32;Marinov等(1993), Neoplasma40(6):355-8;及Jelinek等(2001), Br.J.Haematol.115:854-61)、急性淋巴母细胞性白血病(Keyhani等(1999), Leukemia Research24:153-9;及Marinov等(1993), Neoplasma40(6):355-8)、慢性骨髓性白血病(Marinov等(1993), Neoplasma40(6):355-8)、急性骨髓性白血病(Keyhani等(1999), Leukemia Research24:153-9)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病或慢性骨髓性白血病(CML)、急性髓细胞性白血病或急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞白血病(HCL)、骨髓发育较差症候群(MDS)或急变期的慢性髓细胞性白血病(CML-BP)以及所述白血病的通过本领域技术人

员众所周知的形态学、组织化学和免疫学技术定义的所有亚型。

[0175] “赘生物”或“赘生性病况”是指与以正常控制的丧失为特征的细胞增殖有关的病况,所述正常控制的丧失导致包括不受调控的生长、缺少分化、局部组织侵入及转移的一个或多个症状。

[0176] 在本发明的一些实施方案中,血液系统癌症选自慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性髓细胞性白血病 (CML)、急性髓细胞性白血病 (AML) 和急性淋巴细胞性白血病 (ALL) 的组。

[0177] 此外,本领域中已知,CD38表达是具有如(例如)B慢性淋巴细胞性白血病 (Dürig等(2002), *Leukemia*16:30-5;和Morabito等(2001), *Leukemia Research*25:927-32) 和急性髓细胞性白血病 (Keyhani等(1999), *Leukemia Research*24:153-9) 的病况的患者的预后指标。

[0178] CLL是西方世界成人中最常见的白血病。CLL涉及牵涉淋巴结和其它淋巴组织的趋于成熟的淋巴细胞的克隆扩增,并且伴随骨髓的渐进性浸润和外周血液中的存在。B细胞形式 (B-CLL) 代表几乎所有情况。

[0179] B-CLL

[0180] B-CLL是以无反应性 (anergic) 单克隆B谱细胞的渐进性增加为特征的不可治疾病,所述细胞以持久的方式聚积在骨髓和外周血液中许多年。CD38的表达被视为B-CLL的独立较差预后因数。Hamblin等, *Blood*99:1023-9 (2002)。

[0181] 当今的B-CLL标准疗法是缓和性的并且主要利用细胞抑制剂氯芥苯丁酸 (chlorambucil) 或氟达拉滨 (fludarabine) 来进行。发生复发时,常常启动使用氟达拉滨、环磷酰胺组合利妥昔单抗 (rituximab) (针对CD20的单克隆抗体) 或campath (针对CD52的单克隆抗体) 的组合疗法。因此,对B-CLL的治疗存在至关重要的未得到满足的医学需要。在一些实施方案中,提供使用所公开的抗CD38抗体治疗B-CLL的方法(如以下所概述,所述治疗可使用任选地且独立地包括任何上述药物的组合疗法来进行)。

[0182] B-CLL是以两种亚型,即缓慢型 (indolent) 和侵袭性 (aggressive) 为特征。所述临床表型与免疫球蛋白重链可变区 (IgVH) 基因中体细胞突变的存在或不存在有关。如本文中所用,缓慢型B-CLL是指具有突变的IgVH基因和/或呈现与缓慢型B-CLL有关的一种或多种临床表型的受试者中的病症。如本文中所用,短语侵袭性B-CLL是指具有未突变的IgVH和/或呈现与侵袭性B-CLL有关的一种或多种临床表型的受试者中的病症。

[0183] 多发性骨髓瘤

[0184] 多发性骨髓瘤是B细胞谱的以骨髓中浆细胞的赘生性增殖为特征的恶性病症。当前治疗方案展现中等反应率。然而,整个存活期中仅观测到边际变化并且中位存活期大约为3年。因此,对多发性骨髓瘤的治疗存在至关重要的未得到满足的医药需要。在一些实施方案中,提供使用所公开的抗体治疗多发性骨髓瘤的方法。

[0185] CD38高度表达于浆细胞上,所述浆细胞在末期分化成B细胞。

[0186] 骨髓瘤细胞的增殖引起各种效应,包括骨骼中的溶解性病灶 (lytic lesion) (孔洞)、红血球数量减少、异常蛋白质的产生(伴随对肾脏、神经及其它器官的损害)、免疫系统功能降低以及血钙含量升高(高钙血症)。

[0187] 当前治疗选择包括化学疗法,优选在可能时与自身干细胞移植 (ASCT) 结合。

[0188] 未明意义的单克隆伽玛免疫球蛋白病变和焖燃型多发性骨髓瘤

[0189] 在一些实施方案中,提供使用所公开的抗体治疗单克隆伽玛免疫球蛋白病变的方法。在其它实施方案中,提供使用所公开的抗体治疗焖燃型多发性骨髓瘤的方法。

[0190] 未明意义的单克隆伽玛免疫球蛋白病变(MGUS)和焖燃型多发性骨髓瘤(SMM)是以骨髓中单克隆浆细胞增殖和不存在终末器官损伤(end-organ damage)为特征的无症状、恶性肿瘤前(pre-malignant)病症。

[0191] 焖燃型多发性骨髓瘤(SMM)是浆细胞的无症状增殖性病症,具有进展至有症状、或具明显症状(active)的多发性骨髓瘤的高风险(N.Engl.J.Med.356(25):2582-2590(2007))。

[0192] 2003年采用定义SMM的国际共识准则,其要求患者具有>30g/L的M-蛋白质含量和/或>10%的骨髓同源浆细胞(clonal plasma cell)(Br.J.Haematol.121:749-57(2003))。患者必须无器官或相关组织损伤,包括骨骼病灶或症状(Br.J.Haematol.121:749-57(2003))。

[0193] 近来研究已识别出SMM的两个亚组;i)进展型疾病的患者和ii)非进展型疾病的患者(Br.J.Haematol.121:631-636(2003))。定义MGUS的国际共识准则要求患者具有<30g/L的M-蛋白质含量、<10%的骨髓浆细胞及不存在器官或相关组织损伤,包括骨骼病灶或症状(Br.J.Haematol.121:749-57(2003))。

[0194] SMM在不存在终末器官损伤时类似于未明意义的单克隆伽玛免疫球蛋白病变(MGUS)(N.Engl.J.Med.356(25):2582-2590(2007))。然而临床上,SMM在20年很有可能进展至具明显症状的多发性骨髓瘤或淀粉样变病(SMM的78%可能性相对于MGUS的21%)(N.Engl.J.Med.356(25):2582-2590(2007))。

[0195] 供体内施用的抗体组合物

[0196] 根据本发明使用的抗体的制剂通过将具有所需纯度的抗体与任选地使用的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A.编[1980])一起混合成冻干制剂或水性溶液的形式来制备以供储存。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒性,并且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六羟季铵(hexamethonium chloride)、氯化苯二甲羟铵(benzalkonium chloride)、氯化苄甲乙氧铵(benzethonium chloride)、苯酚、丁醇或苄醇、对羟苯甲酸烷酯(如对羟苯甲酸甲酯或丙酯)、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇以及间-甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、凝胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯基吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷酰氨酸、天冬酰氨酸、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖以及其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐相对离子,如钠离子;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0197] 本文中的制剂也可含有所治疗的特定适应症所需要的一种以上活性化合物,优选为具有互补活性并且不会对彼此有不利影响的化合物。例如,可能需要提供具有其它特异性的抗体。或者或此外,组合物可包含细胞毒性剂、细胞因子、生长抑制剂和/或小分子拮抗剂。此等分子适当地以对预期的目的有效的量组合存在。

[0198] 所述活性成分也可围堵在例如通过凝聚技术或界面聚合作用制备的微胶囊(例如

分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊及聚(甲基丙酸甲酯)微胶囊)中、胶状药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子及纳米胶囊)中、或巨乳液中。此等技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)中。

[0199] 将要体内施用的制剂应当无菌或接近无菌。这可通过经无菌过滤膜过滤来轻易实现。

[0200] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的适合实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述基质呈成形物品例如膜、或微胶囊的形式。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸与 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚体、不可降解乙烯-乙酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚体如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚体和乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球)以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸共聚体的聚合物能够释放分子超过100天,而某些水凝胶释放蛋白质较短的时间。

[0201] 当囊封的抗体保留在体内长时间时,其可能会因暴露于37℃下的湿气而变性或聚集,从而使生物活性丧失且可能使免疫原性发生变化。可视所涉及的机制而定设计出合理策略以实现稳定。例如,如果发现聚集机制是经由硫代-二硫键交换而形成分子内S-S键,那么可通过修饰巯基残基、自酸性溶液冻干、控制湿气含量、使用适当添加剂以及开发特定聚合物基质组合物来实现稳定。

[0202] 施用模态

[0203] 本发明的抗体和化学治疗剂根据已知方法施用至受试者,所述已知方法如作为丸剂形式或连续输注一段时间的静脉内施用、通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑液内、鞘内、经口、局部或吸入途径。抗体的静脉内或皮下施用是优选的。

[0204] 治疗模态

[0205] 在本发明的方法中,使用疗法来针对疾病或病况提供正性治疗反应。“正性治疗反应”意思是疾病或病况的改善,和/或与疾病或病况相关的症状的改善。例如,正性治疗反应将指疾病的以下改善中的一个或多个:(1)赘生性细胞的数目减少;(2)赘生性细胞死亡的增加;(3)赘生性细胞存活的抑制;(5)肿瘤生长的抑制(也就是说,在一定程度上减慢,优选停止);(6)患者存活率增加;以及(7)从与疾病或病况相关的一种或多种症状得到一定缓解。

[0206] 任何给定疾病或病况的正性治疗反应可通过对所述疾病或病况具特异性的标准化反应准则测定。可使用筛选技术如磁共振成像(MRI)扫描、x射线成像、计算机断层(CT)扫描、骨扫描成像、内视镜检法以及肿瘤活检采样,包括骨髓抽吸(BMA)和循环中肿瘤细胞的计数。

[0207] 除所述正性治疗反应的外,接受疗法的受试者可经历与疾病有关的症状的改善的有益作用。

[0208] 因此,对于B细胞肿瘤,受试者可经历所谓的B症状,也就是说盗汗、发热、重量减轻和/或荨麻疹的减少。对于恶性肿瘤前病况,利用抗CD38治疗剂的疗法可阻断相关恶性肿瘤病况的发展和/或延长其发展前的时间,例如遭受未明意义的单克隆伽玛免疫球蛋白病变(MGUS)的受试者中多发性骨髓瘤的发展。

[0209] 疾病的改善可表征为完全反应。“完全反应”意思是不存在临床上可检测的疾病,

并且任何先前在骨髓瘤情况下的异常射线研究、骨髓以及脑脊髓液 (CSF) 或异常单克隆蛋白质正常化。

[0210] 所述反应可在根据本发明的方法治疗的后持续至少4至8周或有时6至8周。或者,疾病的改善可归类为部分反应。“部分反应”意思是所有可测量肿瘤负荷(也就是说,受试者中存在的恶性肿瘤细胞的数目,或所测量的肿瘤块的体积或异常单克隆蛋白质的数量)在不存在新病灶下减少至少约50%,其可持续4至8周或6至8周。

[0211] 根据本发明的治疗包括“治疗有效量”的所用药剂。“治疗有效量”是指在所需的剂量和持续时间下有效实现所需治疗结果的量。

[0212] 治疗有效量可根据如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及药剂在个体中引发所需反应的能力等因素变化。治疗有效量也为治疗有益作用超过抗体或抗体部分的任何毒性或有害作用的量。

[0213] 用于肿瘤治疗的“治疗有效量”也可通过其稳定疾病进展的能力来测量。化合物抑制癌症的能力可于预知在人肿瘤中的效力的动物模型系统中进行评价。

[0214] 或者,可利用熟练从业人员已知的体外测定以检测化合物抑制细胞生长或诱导细胞凋亡的能力,来评价组合物的所述特性。治疗化合物的治疗有效量可减小肿瘤大小或以其它方式改善受试者中的症状。本领域技术人员将能够基于如受试者的体型、受试者症状的严重程度和所选的特定组合物或施用途径等因素来确定此等量。

[0215] 调整剂量方案以提供最佳的所需反应(例如治疗反应)。例如,可施用单次丸剂,可随时时间施用几次分开剂量,或者可按照治疗情形的紧张程度所指示,按比例减少或增加剂量。为施用方便和剂量均匀,肠胃外组合物可调配成剂量单位形式。本文使用的剂量单位形式是指对于要治疗的受试者适合作为剂量单位的物理离散单位;每一单位含有经计算产生所需治疗作用的预定量活性化合物与所需医药载体结合。

[0216] 本发明的剂量单位形式的规格受支配于并且直接依赖于(a)活性化合物的独特特征和要实现的特定治疗作用,和(b)混配所述种活性化合物以用于治疗个体中敏感性的技术领域中国有的限制因素。

[0217] 本发明中使用的抗CD38抗体的有效剂量和剂量方案取决于要治疗的疾病或病况并可由本领域技术人员确定。

[0218] 本发明中使用的抗CD38抗体的治疗有效量的示例性、非限制性范围是约0.1–100mg/kg,如约0.1–50mg/kg,例如约0.1–20mg/kg,如约0.1–10mg/kg,例如约0.5、约0.3、约1或约3mg/kg。在另一个实施方案中,抗体的施用剂量为1mg/kg或1mg/kg以上,如1至20mg/kg的剂量,例如5至20mg/kg的剂量,例如8mg/kg的剂量。

[0219] 本领域技术人员的医疗专业人员可容易地确定并规定所需的药物组合物的有效量。例如,医师或兽医可以低于实现所需治疗作用的所需水平的水平起始药物组合物中采用的药剂的剂量并逐步增加剂量直至实现所需作用。

[0220] 在一个实施方案中,抗CD38抗体通过输注以10至500mg/kg如200至400 mg/kg的每周剂量施用。这种施用可重复例如1至8次,如3至5次。所述施用可通过连续输注2至24小时如2至12小时来进行。

[0221] 在一个实施方案中,按需要通过缓慢连续输注历时长时间如超过24小时以降低包括毒性的副作用来施用抗CD38抗体。

[0222] 在一个实施方案中,抗CD38抗体以250mg至2000mg,如(例如)300mg、500mg、700mg、1000mg、1500mg或2000mg的每周剂量施用至多8次,如4至6次。所述施用可通过连续输注2至24小时如2至12小时来进行。所述方案可按需要重复一或多次,例如6个月或12个月后。可通过测量本发明化合物在施用后在血液中的量来确定或调节剂量,所述测量是例如通过取出生物样本且使用靶向抗CD38抗体的抗原结合区的抗遗传型(anti-idiotypic)抗体来进行。

[0223] 在再一个实施方案中,抗CD38抗体每周施用一次,历时2至12周,如3至10周,如4至8周。

[0224] 在一个实施方案中,抗CD38抗体通过维持疗法施用,如(例如)一周一次,持续6个月或6个月以上。

[0225] 在一个实施方案中,抗CD38抗体通过包括一次抗CD38抗体输注、接着与放射性同位素缀合的抗CD38抗体的输注的方案施用。所述方案可重复,例如7至9天后。

[0226] 作为非限制性实施例,根据本发明的治疗可以每天约0.1-100mg/kg,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的量作为抗体的每日剂量,于治疗起始后第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天中的至少一者,或者第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20周中的至少一者,或其任何组合来提供,使用每24、12、8、6、4或2小时的单次或分次剂量或其任何组合。

[0227] 在一些实施方案中,其抗CD38抗体分子与一种或多种其它治疗剂例如化学治疗剂组合使用。DNA破坏化学治疗剂的非限制性实例包括拓扑异构酶I抑制剂制剂(例如,伊立替康(irinotecan)、拓扑替康(topotecan)、喜树碱(camptothecin)及其类似物或代谢产物以及小红莓(doxorubicin));拓扑异构酶II抑制剂制剂(例如,依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)以及柔红霉素(daunorubicin));烷化剂(例如,美法仑(melphalan)、氯芥苯丁酸、白消安(busulfan)、噻替派(thiotepa)、异环磷酰胺(ifosfamide)、卡氯芥(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、司莫司汀(semustine)、链佐菌素(streptozocin)、达卡巴嗪(decarbazine)、甲氨喋呤(methotrexate)、丝裂霉素C以及环磷酰胺);DNA嵌入剂(例如,顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)以及卡铂(carboplatin));DNA嵌入剂和自由基产生剂,如博来霉素(bleomycin);以及核苷模拟物(例如,5-氟尿嘧啶、卡培他滨(capecitabine)、吉西他滨(gemcitabine)、氟达拉滨、阿糖胞苷、巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁(pentostatin)以及羟基脲)。

[0228] 干扰细胞复制的化学治疗剂包括:紫杉醇(paclitaxel)、欧洲紫杉醇(docetaxel)以及相关类似物;长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastin)以及相关类似物;沙利度胺(thalidomide)、雷利度胺(lenalidomide)以及相关类似物(例如CC-5013及CC-4047);蛋白质酪氨酸激酶抑制剂制剂(例如,甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate)和吉非替尼(gefitinib));蛋白酶体抑制剂制剂(例如,硼替佐米(bortezomib));NF- κ B抑制剂制剂,包括I κ B激酶抑制剂制剂;结合癌症中过度表达的蛋白质并且因而下调细胞复制的抗体(例如,曲妥珠单抗(trastuzumab)、利妥昔单抗、赛妥昔单抗(cetuximab)以及贝伐单抗(bevacizumab));以及已知于癌症中上调、过度表达或活化的蛋白质或酶的其它抑制剂制剂,其抑制下调细胞复制。

[0229] 在一些实施方案中,本发明抗体的使用可在Velcade®(硼替佐米)的前、同时或的后。

[0230] 诊断用途

[0231] 所提供的抗CD38抗体也可用于与CD38有关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,本文中所述的抗体是用于诊断和治疗二者,或单独用于诊断。当抗CD38抗体用于诊断和治疗二者时,一些实施方案依赖于针对两个不同抗原表位的两种不同抗CD38抗体,以使得诊断抗体不与治疗抗体竞争结合,不过在一些情况下两者可使用同一抗体。例如,在一些情况下,Ab19抗体用于诊断(一般如以下所讨论进行标记)而Ab79用于治疗,或反之Ab19抗体用于治疗而Ab79用于诊断。因此本发明包括包含诊断抗体和治疗抗体的组合物,并且在一些实施方案中,诊断抗体如本文中所述加以标记。此外,治疗和诊断抗体的组合物也可如本文中所概述与其它药物共同施用。

[0232] 在许多实施方案中,将诊断抗体标记。本文中的“标记”意思是本文公开的抗体上附着有一种或多种元素、同位素或化学化合物以在筛选或诊断程序中实现检测。一般来说,标记分为几类:a)免疫标记,其可为被并入作为由抗体辨别的融合伴侣的抗原表位,b)同位素标记,其可为放射性或重同位素,c)小分子标记,其可包括荧光和比色分析染料,或如能够进行其它标记方法的生物素的分子,以及d)如粒子(包括用于超音波标记的气泡)或允许身体成像的顺磁性标记的标记。如本领域中所已知,标记可并入抗体中的任何位置且可在蛋白质表达期间体外或体内并入。

[0233] 诊断可在体内通过施用如以下所述允许全身成像的诊断抗体、或体外在从患者取出的样本上进行。这种情形下的“样本”包括许多事物,包括但不限于体液(包括但不限于血液、尿液、血清、淋巴液、唾液、肛门和阴道分泌物、汗液和精液)以及如得自相关组织的活检的组织样本。

[0234] 在一些实施方案中,进行体内成像,包括但不限于超音波、CT扫描、X射线、MRI和PET扫描,以及光学技术,如在身体表面的附近使用肿瘤的光学标记者。

[0235] 与CD38相关的疾病的体内成像可通过任何适合的技术进行。例如,可使用⁹⁹Tc标记或以另一发射β射线的同位素的标记来对抗-CD38抗体进行标记。对所述技术的变化可包括使用磁共振成像(MRI)以相对于γ相机技术改良成像。类似免疫闪烁成像方法及原则描述于例如Srivastava(ed.),Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy(Plenum Press1988),Chase,“Medical Applications of Radioisotopes,”in Remington’s Pharmaceutical Sciences,第18版,Gennaro等,(编),第624-652页(Mack Publishing Co.,1990),及Brown,“Clinical Use of Monoclonal Antibodies,”in Biotechnology And Pharmacy227-49,Pezzuto等,(编)(Chapman&Hall1993)中。

[0236] 在一个实施方案中,本发明提供体内成像方法,其中将抗CD38抗体与检测促进剂缀合,将经缀合的抗体施用至宿主,如通过注射至血流中,并且测定宿主中被标记抗体的存在和位置。经由所述技术和本文中提供的任何其它诊断方法,本发明提供用于筛选人患者中或取自人患者的生物样本中疾病相关细胞的存在的方法。

[0237] 对于诊断成像,可将放射性同位素直接或通过使用中间官能团而间接地结合至抗CD38抗体。有用的中间官能团包括螯合剂,如乙二胺四乙酸和二乙三胺五乙酸(参见例如美国专利号5,057,313)。在涉及缀合放射性同位素的抗CD38抗体的此等诊断测定中,递送至

患者的缀合抗CD38抗体的剂量通常经由同位素的选择而维持在尽可能低的水平,以实现将允许检测和准确测量的最小半衰期、体内最少滞留时间和最小同位素量的最佳组合。

[0238] 除放射性同位素及不透射线剂(radio-opaque agent)的外,也可使用与染料(如以生物素-链霉亲和素复合物)、对比剂、荧光化合物或分子和用于磁共振成像(MRI)的增强剂(例如顺磁性离子)(参见例如美国专利号6,331,175,其描述MRI技术和与MRI增强剂缀合的抗体的制备方法)缀合抗CD38抗体来执行诊断方法。这类诊断/检测剂可选自用于磁共振成像中的试剂和荧光化合物。

[0239] 为了在抗CD38抗体上载入放射性金属或顺磁性离子,可能需要使其与具有长尾部的试剂反应,所述长尾部上附着有众多螯合基团以供结合所述离子。这个尾部可为聚合物,如聚赖氨酸、多糖,或其它衍生或可衍生链,所述链具有侧基,其上可结合螯合基团,如(例如)卟啉、多胺、冠醚、双硫代半卡唑(bisthiosemicarbazone)、聚脲以及已知对所述目的有用的类似基团。

[0240] 螯合剂可使用标准化学偶联至抗CD38抗体。螯合剂通常通过一个基团连接至抗CD38抗体,所述基团能够在最小免疫反应性丧失和最少聚集和/或内部交联的下与分子形成键结。

[0241] 可能有用的金属-螯合剂组合的实例包括2-苄基-DTPA和其单甲基与环己基类似物,对于放射成像,与60至4,000keV的总体能量范围内的诊断同位素一起使用,所述同位素如 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{18}F 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{99}Tc 、 ^{94}Tc 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 以及 ^{76}Br 。

[0242] 标记包括放射性核素、放射性对比剂、顺磁性离子、金属、荧光标记、化学发光标记、超音波对比剂和感光剂(photoactive agent)。这类诊断剂是众所周知的并可使用任何此等已知的诊断剂。诊断剂的非限制性实例可包括放射性核素,如 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{94}mTc 、 ^{94}Tc 、 ^{99}mTc 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{154}Gd 、 ^{32}P 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{51}Mn 、 ^{52}Mn 、 ^{55}Co 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{82}mRb 、 ^{83}Sr 、或其它 γ -、 β -或正电子发射体。

[0243] 有用的顺磁性离子可包括铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钐(III)、铈(III)、钕(III)、钐(II)、铽(III)、镨(III)、钆(III)、或铈(III)。金属对比剂可包括钆(III)、金(III)、铅(II)、或铋(III)。

[0244] 超音波对比剂可包含脂质体,如填充气体的脂质体。不透射线的诊断剂可选自化合物、钡化合物、镓化合物以及铈化合物。

[0245] 这些和类似的螯合剂在与如锰、铁和钐的非放射性金属错合时,可连同抗CD38抗体适用于MRI诊断方法。如NOTA、DOTA以及TETA的巨环螯合剂可与各种金属和放射性金属一起使用,最特别地分别与放射性核素镓、钐和铜一起使用。这类金属-螯合剂络合物可通过调整环大小以使其适合所关注的金属而变得非常稳定。其它环类型螯合剂如巨环聚醚因稳定结合如 ^{223}Ra 的核素而受到关注,也可适用于诊断方法中。

[0246] 因此,本发明提供诊断性抗CD38抗体缀合物,其中抗CD38抗体缀合物是被缀合至对比剂(如用于磁共振成像、计算机断层扫描术、或超音波对比增强剂)或可为例如发射 γ 、 β 、 α 、俄歇电子(Auger electron)或正电子的同位素的放射性核素。

[0247] 抗CD38抗体也可适用于例如检测特定细胞、组织或血清中所关注抗原的表达。对于诊断应用,通常使用用于体外测定的可检测部分对抗体进行标记。如本领域技术人员所

了解,存在供用于体外测试中的广泛各种适合的标记。适用于本发明的这个方面中的染料包括但不限于荧光性镧系元素络合物,包括铈和铽的荧光络合物,荧光素、若丹明、四甲基若丹明、曙红、赤藻红、香豆素、甲基-香豆素、量子点(也称为“纳米晶”;见美国专利号09/315,584,其以引用的方式并入本文)、苾、孔雀绿(Malachite green)、苾、荧光黄(Lucifer Yellow)、瀑布蓝(Cascade Blue).TM.、德克萨斯红(Texas Red)、Cy染料(Cy3、Cy5等)、alexa染料(包括Alexa、藻红蛋白、氟硼荧(bodipy)以及描述于Richard P.Haugland编的Molecular Probes Handbook第6版中的其它染料,所述文献明确地以引用的方式并入本文。

[0248] 接着可评估染色组织的放射性计数,作为肿瘤中CD38相关肽的量的指示。通过使用这类技术获得的影像可用于评估患者、哺乳动物或组织中CD38的生物分布,例如在使用CD38作为侵袭性癌细胞的存在的生物标志的情形下。

[0249] 制品

[0250] 在其它实施方案中,提供含有适用于治疗上述病症的材料的制品。所述制品包括容器和标签。适合的容器包括例如瓶、小瓶、注射器和试管。所述容器可由如玻璃或塑料的各种材料形成。容器保存对治疗病况有效的组合物并且可具有无菌入口(sterile access port)(例如,容器可为具有可经皮下注射用注射针刺破的塞子的静脉输液袋或小瓶)。组合物中的活性剂为抗体。容器上或与容器相关的标签指示组合物用于治疗所选的病况。制品可进一步包括第二容器,其包含药学上可接受的缓冲剂如磷酸盐缓冲食盐水、林格氏溶液及右旋糖溶液。其可进一步包括从商业和使用者观点来说所想要的其它材料,包括其它缓冲剂、稀释剂、筛检程序、针、注射器以及带有使用说明书的药品包装说明书。

实施例

[0251] 提供以下实施例以说明而非限制本发明。

[0252] 实施例1:包含编码人、猕猴和小鼠CD38的多核苷酸的表达载体的构建

[0253] 为构建表达人CD38(huCD38)的载体,从得自Origene Technologies Trueclone®人的cDNA分离编码huCD38的多核苷酸。将分离huCD38选殖入含有新霉素抗性(neo^R)基因的稳定表达载体(XOMA, Inc.)中,其允许选择G418(遗传霉素)抗性转染株。对选定转染株中存在的huCD38基因测序以识别任何序列错误。来源于基因库入藏号NM_001775的序列中的错误通过PCR定点突变诱发校正。最终载体DNA通过5'测序确认。

[0254] 为构建表达猕猴CD38(cyCD38)的载体,从得自Biochain Institute's cDNA-猴(猕猴)-正常脾组织的DNA分离编码cyCD38的多核苷酸。将分离cyCD38选殖入含有neo^R基因的稳定表达载体(XOMA, Inc.)中,其允许选择G418(遗传霉素)抗性转染株。对选定转染株中存在的cyCD38基因测序以识别任何序列错误。来源于基因库入藏号AY555148的序列中的错误通过PCR定点突变诱发校正。最终载体DNA通过测序确认。

[0255] 为构建表达小鼠CD38(moCD38)的载体,从得自Origene's TrueORF collection的DNA分离编码moCD38的多核苷酸。将分离moCD38选殖入含有neo^R基因的稳定表达载体(XOMA, Inc.)中,其允许选择G418(遗传霉素)抗性转染株。对选定转染株中存在的moCD38基因测序以识别任何序列错误。来源于基因库入藏号NM_007646的序列中的错误通过PCR定点突变诱发校正。最终载体DNA通过测序确认。

[0256] 实施例2:表达CD38的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的开发

[0257] 为开发表达huCD38、muCD38和cyCD38的CHO细胞,用线性化DNA转染CHO细胞。接受选择一周后,通过流式细胞术进行细胞分选,并且将表达最高huCD38、muCD38或cyCD38的细胞(顶端15%)接种在96孔板中以产生单个集落。剩余细胞也在选择下接种以产生备用集落。接种大约12-14天后,识别单个集落,转移至96深孔板中。第二次传代后通过FACS分析筛选克隆。使顶端产生克隆传代并扩增至摇瓶。冷冻和/或培养顶端2个克隆以用于霉菌菌(mycoplasmal)AVA测试并按比例扩大(scale-up)。

[0258] 为构建用于扩散性异种移植模型(disseminated xenograft model)的荧光素酶报告基因,使用含有CMV启动子荧光素酶基因/新霉素可选标志的商业载体(Promega, Madison, WI)以在Daudi Burkitt's淋巴瘤细胞中产生稳定转染株。

[0259] 实施例3:结合CD38的试剂的噬菌体呈现文库和筛选

[0260] 根据Marks等(2004, Methods Mol. Biol. 248:161-76)描述的方法自噬菌体呈现文库选择靶特异性抗体。简要说,将噬菌体呈现文库与100pmol的生物素化CD38一起在室温孵育1小时,接着使用100μL链霉亲和素珠粒混悬液(DYNABEADS® M-280Streptavidin, Invitrogen)捕获所形成的复合物。用洗涤缓冲液(PBS中5%牛奶)洗涤珠粒以去除非特异性噬菌体。利用0.5ml的100nM三乙胺(TEA)溶离已结合的噬菌体,并且立即通过添加等体积的1M TRIS-Cl (pH7.4)中和。使用溶离的噬菌体池感染在对数生长期生长的TG1大肠杆菌细胞,并且如Marks等同前文中所述援救噬菌粒。总共重复三轮选择。

[0261] 或者,针对固定CD38(R&D systems)淘洗噬菌体呈现文库以便识别能够结合CD38的抗体片段组。淘洗是使用标准方案进行(参见例如Methods in Molecular Biology,第178卷:Antibody Phage Display:Methods and Protocols Edited by:P.M.O'Brien and R.Aitken, Humana Press;"Panning of Antibody Phage-Display Libraries,"Coomber, D.W.J.,第133-145页,和"selection of Antibodies Against Biotinylated Antigens,"Chames等,第147-157页)。简要说,向NUNC®MAXISORP板的三个孔以PBS中10μg/ml的浓度涂布50μL重组CD38(R&D Systems)。在4℃下过夜孵育的后,室温下用PBS中5%牛奶阻断自由结合位点一小时。接着向被阻断的孔中添加大约200μL的在5%牛奶/PBS中的噬菌体文库并在室温下孵育大约一至两个小时。洗涤孔且使用标准方法溶离已结合的噬菌体(参见例如Sam brook and Russell, Molecule Cloning:A Laboratory Manual,第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)。经由感染对数生长期的大肠杆菌TG1宿主细胞来扩增所溶离的噬菌体。通过以2,500RPM离心五分钟回收感染的TG1细胞,接种在15cm²YT-安比西林-2%葡萄糖琼脂板上,并且在30℃下孵育过夜。接着使用经扩增的噬菌体重复淘洗过程。将淘洗、溶离和扩增的循环重复三轮。

[0262] 淘洗完成后,使用来自所接种TG1细胞的单个集落对96孔板中的培养基进行免疫接种。使微量培养物生长至0.6的OD₆₀₀,这时添加1mM IPTG且在30℃下在振荡器中过夜孵育以诱导可溶scFv的表达。细菌离心成团,并且使用周质萃取物(periplasmic extract),利用标准ELISA测定和FACS结合测定测试scFv与固定CD38的结合。

[0263] 对于FACS结合筛选,使用稳定表达CD38的CHO细胞针对结合初始、结合膜的CD38的能力筛选周质萃取物(PPE)中的scFv。亲代和CHO转染株(表达人CD38或猕猴CD38或小鼠CD38的细胞系)分别以2×10⁶细胞/ml再混悬在PBS(Life Technologies)、0.5%BSA(Sigma-

Aldrich) 和 0.1% Na₃N (Sigma-Aldrich) (FACS 缓冲液) 中。不表达 CD38 的亲代 CHO 细胞用作阴性对照物。将 25 μL 细胞等分试样接种在 V 型底 96 孔板 (Costar Cat#3897) 并且向细胞添加 25 μL 含有加 myc 标签 (myc-tagged) 的 scFv 抗体片段的周质萃取物, 接着在 4℃ 下孵育混合物 30 分钟。接着洗涤细胞两次, 之后将团块再混悬在 25 μL 小鼠抗 c-myc 抗体 (在 FACS 缓冲液中 1/1000) (Roche) 中, 再次以 4℃ 孵育 30 分钟。接着洗涤细胞两次且再混悬在 25 μL 的在 FACS 缓冲液中的 1/200 稀释抗小鼠 IgG-PE 抗体 (Jackson labs) 中, 再次以 4℃ 孵育 30 分钟。接着洗涤细胞两次以去除过量未结合抗体, 再混悬在 70 μL FACS 缓冲液中且在 BD FACScan® 上分析。使用 FlowJo 软件 (TreeStar, Inc.) 评价所获取的数据。通过比较经 CD38 转染的 CHO 细胞的中位荧光强度与亲代 CHO 细胞系 (CD38⁻) 的中位荧光强度, 识别阳性样本。

[0264] 对结合人 CD38 的抗体克隆测序以识别独特克隆。接着基于 Biacore® 分析所测定的解离速率 (off-rate) 对独特 scFv 克隆划分等级。200RU 至 500RU 的人重组 CD38 (R&D Systems' cat#2404-AC 或均等物) 通过标准胺偶联化学 (Biacore®) 固定至 CM5 或均等晶片。也制备参照斑点, 其可在蛋白质不固定时经活化且接着经阻断。通过在乙酸盐缓冲液 (pH 5.0) 中稀释抗原至 1–3 μg/ml 且注射至活化表面的上直至所需的含量固定 (3–5) 分钟来进行此。接着以乙醇胺阻断表面。周质萃取物以测定电泳缓冲液 10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA (乙二胺四乙酸) 以及含 2mg/mL BSA (牛血清白蛋白) 的 0.05% 聚山梨醇酯 20 (pH 7.4) 一比一稀释。经稀释的周质萃取物于 30 分钟时注射至表面等离子体共振 (SPR) 表面的上持续 300 秒, 其中另外监测 900 秒的解离时间。利用单次 8 秒的 100mM HCl 注射进行再生。得自参照斑点的数据从得自活性表面的数据中扣除, 接着使用 1:1 解离模型于 Biacore® T100 软件中拟合解离曲线。

[0265] 将顶端等级的 scFv 克隆变换至 IgG1 抗体。使用亲代 CHO 细胞和表达人、鼠和猕猴 CD38 的 CHO 细胞对 IgG1 改造 (IgG1 reformatting) 克隆重复 FACS 结合筛选以确保保留结合特性并评估物种交叉反应性。IgG 改造克隆的 FACS 表征如上文所述进行, 但由添加抗 c-myc 抗体和抗小鼠 IgG-PE 抗体组成的步骤替换为通过添加缀合藻红蛋白的抗人 IgG 抗体 (Jackson Labs) 来检测全长人 IgG 的结合的单一步骤。

[0266] 实施例 4: IgG 改造克隆的体外基于细胞的测定

[0267] 将约 150 个克隆改造为人 IgG1 抗体并如以下所述使用一系列测定完全评价五个抗体 (Ab19、Ab43、Ab72、Ab79 以及 Ab110)。IgG 改造纯是在体外和体内测定中的表达与两个抗体 BMTK4-1 (也称为 benchmark-1、BM-1、或 BMTK-1) (SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 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) 相比较, 所述两个抗体的氨基酸序列分别来源于已知的抗 CD38 抗体达拉莫单抗 (daratumumab) (也称为 HuMax-CD38, 公开于国际公布号 W006/099875 中) 和 SAR650984 (公开于国际公布号 W008/047242) 的序列。帕利珠单抗 (Palivizumab; SYNAGIS®) (MedImmune) 作为一种临床上核准的辨别呼吸道合胞病毒的抗体, 充当 CD38 结合的阴性对照物。

[0268] 实施例 5: 通过免疫荧光检测 Ab79 结合

[0269] 将经 Alexa Fluor®-488 染料标记的 Ab79 施加至正常人结直肠组织、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

物。所得免疫荧光影像如图4所示。对Ab79观测到的染色图案与利用市面上可购得的多株抗CD38抗体在正常人结直肠组织、前列腺和淋巴结上所见的染色图案(数据未显示)一致。

[0270] 经Alexa Fluor®-488染料标记的Ab79也施加至正常和多发性骨髓瘤骨髓试样(数据未显示)。Ab79结合正常骨髓中细胞的约10%,而>90%的多发性骨髓瘤骨髓细胞在4个测试样本中的4个中显示Ab79结合。

[0271] 也检测Ab79结合多种细胞系(MOLP-8、DAUDI、RPMI以及MCF7)的能力。MOLP-8(人多发性骨髓瘤)、DAUDI(来源于伯基特氏淋巴瘤患者的淋巴胚细胞)以及RPMI(自慢性髓鞘形成白血病(chronic myelogenesis leukemia)患者建立的细胞系)细胞都显示由Ab79结合。乳腺癌细胞系MCF7表达出对Ab79结合的高程度阴性(数据未显示)。

[0272] 缀合Alexa Fluor® 488的抗体在8μm低温恒温冷冻切片上染色,所述切片固定在乙醇/丙酮混合物中5分钟,之后在室温下在控制湿度的腔室中与抗体一起孵育1小时。接着洗涤切片,添加含DAPI的封固剂(Vector Laboratories, cat#H1500),并且施加盖玻片。

[0273] 实施例6:多发性骨髓瘤(MM)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)上Ab79表达的评价

[0274] Ab79与来自多发性骨髓瘤患者的骨髓样本的结合于针对CD138⁺细胞富集后通过流式细胞术或通过对CD138⁺CD45⁻¹⁰细胞的门控作用进行分析(图7A)。发现Ab79在来自六个多发性骨髓瘤样本中的四个的>95%细胞上表达。Ab79的结合模式表达出与临床实验中使用的抗CD38抗体的结合模式高度类似。此外,Ab79结合来自慢性淋巴细胞性白血病患者的细胞(图7B)。

[0275] 为了通过FACS测量Ab79与MM和CLL的结合,在24小时内加工患者样本。通过Ficoll-Paque™(GE Healthcare)根据制造商说明书分离外周血液单核细胞。表达分析使用以下抗体组和括弧内的克隆进行。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)。将5μL经PE、PerCP、或APC标记的抗体或10μL经Alexa Fluor®-488标记的抗体或同种型对照物添加至含有100μL 0.2x10⁶ PBMC或来自骨髓抽吸的CD138富集细胞的每一孔或试管。室温下孵育样本30分钟,之后使用BD Pharmlyse根据制造商说明书溶解红细胞。所有样本于FACS缓冲液中洗涤三次。将样本固定在1%多聚甲醛中且于BD FACSCanto™II或BD FACSCaliber™上分析。

[0276] 实施例7:抗CD38抗体诱导CDC测定

[0277] 测试猕猴交叉反应性克隆诱导补体依赖性细胞毒性(CDC)的能力。将MOLP-8细胞以每孔10,000细胞的密度接种在黑色96孔平底组织培养板中的50μL完全培养基(补充有10%胎牛血清的RPMI)。将50μL 2x抗CD38抗体、对照IgG抗体、或单独的培养基添加至每一孔,并且在室温下孵育10分钟。取决于细胞系向每一孔添加不同量(2-15μL)的纯化兔补体(cat#CL3441 Cedarlane Laboratories, Canada),对照孔除外。在37℃下孵育一小时后,使板达到室温,每孔添加100μL细胞滴定CytoTox Glo™试剂(Promega G7571/G7573),振荡板5至7分钟,在EnVision®(Perkin Elmer)发光板式读取器上读取发光。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。使用以下等式计算% CDC:

[0278] $100 - (RLU_T / RLU_C) \times 100$,

[0279] 其中RLU_T为测试样本的相对发光单位,而RLU_C为仅有补体的样本的相对发光单位。

使用PRISM软件进行统计分析。从%CDC相对于抗体浓度的曲线确定EC₅₀值,如表1中所示。

[0280] 实施例8:抗CD38抗体诱导ADCC测定

[0281] 使用Daudi、MOLP-8以及RPMI-8226细胞系作为靶细胞评估抗体依赖性细胞介导细胞毒性(ADCC)。通过从得自Stanford Blood Center(Palo Alto,CA)的有核细胞层(buffy coat)或LRS的Ficoll-Plaque™分离,分离出PBMC作为效应细胞。试样利用PBS中的2%FBS进行1:3稀释。15mL Ficoll-Plaque™(GE Healthcare)轻轻成层在35mL经稀释试样下方并且以1800rpm离心(刹车)25分钟。收集含有PBMC的浑浊中间相,在PBS中的2%FBS中洗涤3次,并且在10%DMSO/FBS中冷冻每等分试样 50×10^6 细胞/mL的等分试样。需要时,将PBMC的冷冻等分试样解冻并以 2×10^6 /mL于10%FBS/RPMI+5ng/mL重组人IL2(R&D systems#202-IL)中培养过夜。

[0282] 对于ADCC测定,所有步骤在完全培养基中进行。96孔板中每孔接种5000靶细胞,添加50μL的3x抗CD38抗体、对照IgG、或单独的培养基,之后添加50μL人效应PBMC,其比率为1:25至1:50之间的靶:效应(T:E)细胞。以800rpm短暂离心板约30秒以使所有细胞紧密接近。37℃下4小时的后,以1100rpm离心板5分钟,转移100μL上清液至白色板。向上清液添加100μL CytoTox Glo™试剂(Promega cat#G9292)且使板在室温下(RT)振荡20-30分钟。于EnVision®(Perkin Elmer)发光板式读取器上读取发光,并且使用以下等式计算特异性溶解百分比:

[0283] $(RLU_T/RLU_{E/T}) / (RLU_L/RLU_{E/T}) \times 100$

[0284] 其中RLU_T为测试样本的相对发光单位,RLU_{E/T}为含有单独的靶细胞并且效应细胞的样本的相对发光单位,并且RLU_L为以Triton X-100溶解的细胞的相对发光单位。使用PRISM软件进行统计分析。从%特异性溶解相对于抗体浓度的曲线确定EC₅₀值,如表1中所示。

[0285] 表1 IgG改造抗体的CDC、ADCC和激动剂活性

抗体	CDC EC ₅₀ nM (MOLP-8)	ADCC EC ₅₀ nM (DAUDI)	ADCC EC ₅₀ nM (MOLP-8)	ADCC EC ₅₀ nM (RPMI-8226)	细胞凋亡 EC ₅₀ 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
[0286] 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

[0287] 实施例9:亲和力的FACS测定

[0288] 表达CD38的MOLP-8细胞以大约2百万细胞/mL的活细胞浓度混悬在1%FBS缓冲液中。在1xPBS中在两个96孔板上的孔之间连续稀释(2倍)要测试的单克隆抗体(mAb)。每一滴定的最后一孔仅含有缓冲液。向每一孔添加其它PBS和细胞混悬液,使得终体积为300~L/孔并且每一孔含有大约100,000细胞。下面列出mAb,以及用于滴定的对应mAb结合位点终浓度(2X分子浓度)范围:

[0289] Benchmark1, [mAb] 结合位点=50.8nM-49.7pM

[0290] Benchmark2, [mAb] 结合位点=49.5nM-48.3pM

[0291] Ab43, [mAb] 结合位点=49.3nM-48.2pM

[0292] Ab110, [mAb] 结合位点=204nM-49.9pM

[0293] Ab79, [mAb] 结合位点=103nM-25.3pM

[0294] Ab72, [mAb] 结合位点=103nM-25.2pM

[0295] Ab19, [mAb] 结合位点=100nM-12.2pM。

[0296] 将板在4℃下置于板振荡器中5小时,之后利用1X PBS以4℃洗涤板3次。然后向每一孔添加200μl的99nM Cy5山羊抗人IgG Fc特异性多株抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, #109-175-008),在4℃下振荡板30分钟。再次利用1X PBS在4℃下洗涤板2次,接着使用FACSCanto™II HTS流式细胞仪为含有独特mAb结合位点浓度的每一孔记录5000次事件的平均荧光强度(MFI)。使用以下等式利用Scientist3.0软件非线性拟合平均荧光强度作为抗体结合位点浓度函数的曲线以估计KD:

[0297]
$$F = p \left[\frac{(KD + LT + n(M)) - \{(KD + LT + n(M))^{2-4n(M)} (LT)\}^{1/2}}{2+B} \right]$$

[0298] 其中F(平均荧光强度)、LT(总mAb结合位点浓度)、p(使任意荧光单位与已结合mAb关联的比例常数)、M(以摩尔浓度计的细胞浓度;0.553fM基于300μl中的100,000细胞)、n(每孔受体的数目)、B(背景信号)以及KD=平衡解离常数。

[0299] 对于每一抗体滴定曲线,在P、n、B以及KD在非线形分析中自由浮动时获得KD估计值。对于以上等式的详细推导,参见Drake and Klakamp(2007), "A rigorous multiple independent binding site model for determining cell-based equilibrium dissociation constants," J. Immunol. Methods 318:157-62, 其以引用的方式并入本文。表3按亲和力减少的次序列出所有抗体得到的KD,以及括弧内每一拟合的95%信赖区间。使用抗体结合位点浓度(2X分子浓度)进行非线性曲线拟合。

[0300] 实施例10:亲和力的Biacore®测定

[0301] 通过表面等离子体共振(SPR)分析,在Biacore™A100上在22℃下测定IgG抗体对可溶CD38胞外域(ectodomain;ECD)的亲和力。将山羊抗人IgG多株抗体(Caltag H10500)固定至CM5生物感测器晶片,它是使用与晶片的所有四个流式细胞(flow cell)内的斑点1、2、4和5的标准胺偶联。每一斑点上的固定含量在5865RU至6899RU的范围内。从R&D Systems获得人CD38(Cat#2404-AC, Lot#PEH020812A)。CD38的原液浓度使用Pace等(1995) "How to measure and predict molar absorption coefficient of a protein" Protein Science 4(11):2411-23和Pace and Grimsley(2004) "Spectrophotometric determination of protein concentration," in Current Protocols in Protein Science, 第3章:第3.1节中详述的方法测定,每一参考文献的教导以引用的方式并入本文。

[0302] 通过将HEPES缓冲食盐水、0.005%聚山梨醇酯20脱气并添加经过滤BSA至100μg/mL

的终浓度,制备电泳缓冲液。所有八个纯化mAb使用电泳缓冲液稀释至大约2 μ g/mL。初步实验估计要捕获的每一mAb的量以便保持表面容量 (R_{max}) 不大于约100RU。对于每一mAb捕获/抗原注射循环,在每一流式细胞内的斑点1和5的上捕获mAb,其中并置的斑点2和4充当各自的参照表面。每种稀释mAb以10 μ L/min的流速捕获1分钟,接着流动电泳缓冲液三分钟以实现表面稳定。在所有四个流式细胞的上以30 μ L/min在193.7nM-3.0nM (2x连续稀释) 的浓度范围内注射HuCD38历时120秒,接着15分钟的解离期。样本都在电泳缓冲液中制备并且以三次重复随机注射,其中为了双重参照,穿插七次缓冲液注射。利用两个20秒的10mM甘氨酸 (pH1.7) 脉冲使表面再生。

[0303] 所有传感图数据可利用Scrubber2.0c软件处理且在Scrubber2.0c中全体拟合成1:1相互作用模型。所得结合常数如表2中所示。

[0304] 表2

抗体	FACS KD (nM) MOLP-8	FACS KD (pM) RPMI-8226	Biacore Ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	Biacore Kd (s ⁻¹)	Biacore KD (nM)
BM-1	1.1 (0.9)	802	4.49 x 10 ⁴	2.46 x 10 ⁻³	54.8
BM-2	1.6 (0.6)	428	4.24 x 10 ⁵	2.27 x 10 ⁻³	5.4
Ab19	0.4 (0.3)	-	1.54 x 10 ⁵	8.10 x 10 ⁻⁴	5.3
Ab79	1.2 (1.1)	508	1.22 x 10 ⁵	6.75 x 10 ⁻⁴	5.5
Ab72	0.6 (0.4)	-	1.44 x 10 ⁴	1.82 x 10 ⁻³	126
Ab110	1.0 (0.1)	-	1.22 x 10 ⁵	1.71 x 10 ⁻¹	1400
Ab43	1.1 (0.3)	-	2.72 x 10 ⁵	1.46 x 10 ⁻¹	537
Ab164	1.4 (0.7)	-	1.99 x 10 ⁵	7.15 x 10 ⁻²	359

[0306] 实施例11:免疫荧光内化测定

[0307] 使用免疫荧光技术评价抗CD38抗体在MOLP-8细胞中的内化。收集MOLP-8细胞且在RPMI-1640中4℃下以1 μ g直接缀合Alexa Fluor® 488的每一抗CD38抗体染色5 $\times$ 10⁶个细胞10分钟。在含有1%BSA的PBS中洗涤细胞,并且于4℃或37℃孵育1 $\times$ 10⁶个细胞3或6小时。4℃下使用2 μ g兔抗Alexa Fluor®-488抗体 (Invitrogen) 淬灭表面染色30分钟。洗涤细胞,固定在含1%PFA的PBS中,转移至Microtest96孔板 (BD Biosciences),并且使用FACSCanto™II (BD Biosciences) 流式细胞仪通过流式细胞术评价或者使用 ImageXpress® Micro (Molecular Devices) 以20x放大倍数成像。

[0308] 实施例12:通过Biacore®的抗原表位重新分级 (Binning)

[0309] 使用Biacore® A100仪器重新分级两个benchmark抗体以及Ab19和Ab79。首先使用NHS/EDC偶联化学在CM5晶片上以高密度和低密度固定抗体。对于抗原表位重新分级实验的每一循环,首先在所述表面的上注射CD38。类似于ELISA格式中的夹心测定,接着在含有CD38/抗体复合物的表面的上注射独特抗体 (取自被固定抗体的组)。在每一循环结束时使用磷酸的脉冲使表面再生。在22℃下使用补充有BSA的HBS-P (10mM10HEPES pH7.4、150mM NaCl、0.005%P-20) 收集数据。所得传感图在Biacore® A100Evaluation软件包以及用于A100数据集的试验版本Scrubber中使用“抗原表位定位”模块进行处理。使用重复数据从两个独立实验为以上4种mAb产生二元4 $\times$ 4矩阵,如表3中所示。

[0310] 表3

[0311]

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

[0312] 实施例13:体内肿瘤学分析

[0313] 在人淋巴瘤的扩散性Daudi-荧光素酶模型中测试Ab19和Ab79的体内效力。对来自Taconic Laboratories的6至8周大雌性CB.17SCID小鼠静脉内注射 1×10^6 个Daudi-Luc肿瘤细胞。在研究第7天,用以下经腹膜内处理小鼠:帕利珠单抗、Ab79、Ab19、Benchmark1以及Benchmark2。使用IVIS Xenogen系统(Caliper Life Sciences)从第21天开始每周进行生物荧光成像以监控肿瘤负荷。为了成像,在成像前10分钟对动物腹膜内注射荧光素酶底物(150mg/kg),接着在异氟烷下麻醉动物并成像。结果如图8和图9所示。

[0314] 实施例14:炎症性/免疫性疾病相关性

[0315] 显示CD38在活化后的PBMC细胞中急剧上调。在来自正常供体的静止PBMC中,小于20%的静止细胞表达CD38,其中受体数目被计算为每细胞大约10,000-20,000。再次来自正常供体的活化PBMC显示60-75%的细胞表达CD38,其中受体数目显示为每细胞110,000至160,000。

[0316] 此外,如图5中所示,CD38显示在来自SLE患者的PBMC中的表达增加。

[0317] 以免疫组织学方法测试样本中CD38的过度表达。分析19个来自SLE患者的样本,获得B和T记忆细胞以及pDC上CD38表达增加的观测结果。分析3个RA患者,显示所有三个患者的滑膜组织中CD38浆细胞的浸润,以及滑膜组织以Ab79的染色增加。分析7个克罗恩症患者和6个溃疡性结肠炎患者,显示结肠的平滑肌中表达CD38的浆细胞的浸润(对来自患者的两个原代细胞样本进行测试。应注意测试了相同数目的正常患者,未显示所述结果。

[0318] 实施例15:使用抗CD38抗体的耗减

[0319] 对猕猴的Ab79给药显示淋巴细胞、B和T细胞以及NK细胞的显著减少。抗体经由30分钟的静脉内输注给药,剂量如图6中所示,其中在24小时收集数据。第4、7、11以及18天显示类似数据。

[0320] 然而,pK/pD数据显示给药后动物的恢复。如图7中所示,淋巴细胞计数在单次静脉内30分钟输注剂量一定天数后返回类似于对照计数,即使在最高剂量后也如此,表明淋巴祖细胞不存在问题。

[0321] 实施例16:自身免疫疾病模型

[0322] 使用三种不同模型。

[0323] HuScid小鼠模型充当假移植物抗宿主(pseudo-graft-v-host)模型以及用于抗破伤风反应、IgG耗减以及总存活期的模型。对CB17/HuSCID小鼠注射ASGM1以耗减NK细胞,接着一天后注射人PBMC。使植入继续7-10天,收集血清用于人Ig随机化。一天后,对小鼠注射10mg/kg的Ab79接着注射TTd,4天后第二剂量,3天后第三剂量,之后收集血清用于人Ig计数,3天后进行抗破伤风检测(与第一剂量相隔共10天)。图8显示来自单个小鼠供体的结果,

其显示治疗后所有Ig同种型的显著降低。图9显示每一组接受者的平均Ig含量的结果,其中每一数据点代表每组的平均值(n=5至n=10)。图10显示AB79治疗后抗破伤风反应的显著降低。最后,图11显示使用Ab79治疗的总显著存活期。

[0324] 代用小鼠实验

[0325] 由于Ab79不与啮齿动物CD38交叉反应,所以开发代用抗体。作为初步研究,使用针对人CD38的商业抗体和针对小鼠CD38的商业抗体,CD38表达水平在人与小鼠的细胞类型之间显示显著差异(见图12),表明疾病的生物学不同。因此,在猴模型中使用与猴CD38交叉反应的抗体可得出显著更好的结果。

[0326] 开发代用抗体,显示自脾脏、血液和骨髓(数据未显示)以及自外周血液(见图13)收获的CD38+细胞的类似耗减。此外,图14中显示耗减的动力学,其中在单次剂量的10mg/kg小鼠代用品的后第1、2或3天收集脾脏、血液和骨髓。24小时内显示血液中B细胞的快速耗减,而脾脏和骨髓中显示较慢的耗减。

[0327] 小鼠SLE模型

[0328] 在MRL/lpr模型中测试代用小鼠抗CD38抗体,使用以下临时读出结果(例如每两周),来自血液:抗dsDNA自身抗体、CBC、用于T/B细胞耗减的FACS、尿液中的白蛋白以及皮肤炎症。终点读取结果包括但不限于,来自血液:抗dsDNA自身抗体、CBC、用于T/B细胞耗减的FACS,来自脾脏、淋巴结和骨髓:器官重量、免疫细胞数目、用于T/B细胞耗减的FACS,对于猴:器官重量、组织病理学(H&E和PAS)、IC处置、炎症细胞以及皮肤炎症(组织病理学)。

[0329] 胶原蛋白诱导关节炎(CIA)模型

[0330] 以7组小鼠使用小鼠代用抗体来利用小鼠CIA模型,以评价前预防性(prophylactic)、预防性和治疗性效力。所有小鼠在第0天以CII/CFA免疫,第21天追加CII/CFA,总体上使疾病的发展从第21天达到第42天(研究终止)。第1组(10只小鼠)一周两次经腹膜内注射10mg/kg代用抗体,在第0天开始(前预防性)。第2组(n=10)类似地给药,但在第21天开始。第3组(n=10)在疾病发作时(第25-28天)进行类似注射。第4组(n=10)以相同水平给药,但第0天给予hIgG1(例如同种型)。第5组(n=10)以hIgG1的相同水平给药,但在第21天开始。第6组(n=10)在第21天以0.5mg/1地塞米松水溶液给药,并且第7组(n=5)未被处理。

[0331] 进行猕猴CIA研究,每一组使用n=3,第1组为未处理的动物,只有媒介。第2组为3mg/kg或10mg/kg的单次剂量Ab79,q1w(预防性治疗在胶原蛋白免疫后第7天开始)。第3组为3mg/kg或10mg/kg的Ab79,q1w,用于治疗性治疗,在疾病发作时即第21天或第28天开始。第4组也在疾病发作时以0.1mg/kg的地塞米松处理,q1d。

[0332] 序列表

[0333] SEQ ID NO:1 (CD38智人;NP_001766.2)

[0334] MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPRWRQQWSPGTTKRFPE TVLARC VKYTEIHP EMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVKTVSRRFAEACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESII SKRNIQFSCKNIRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

[0335] SEQ ID NO:2 (CD38长尾猴;AAT36330.1)

[0336]

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQVCLGVCLLVLLILVVVVAVVLPRWRQQWSPGTTSRFPETVLARC VKYTEVHPE

MRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNITEEDYQPLVKLGTQTVPCNKTLLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYL
ADDLTWCGEFNTFEINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRSKIFDKN
STFGSVEVHNLQPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSC
LSGI

[0337] SEQ ID NO:3 (HCDR1 Ab79)

[0338] GFTFDDYG

[0339] SEQ ID NO:4 (HCDR2 Ab79)

[0340] ISWNGGKT

[0341] SEQ ID NO:5 (HCDR3 Ab79)

[0342] ARGSLFHDSSGFYFGH

[0343] SEQ ID NO:6 (LCDR1 Ab79)

[0344] SSNIGDNY

[0345] SEQ ID NO:7 (LCDR2 Ab79)

[0346] RDS

[0347] SEQ ID NO:8 (LCDR3 Ab79)

[0348] QSYDSSLGS

[0349] SEQ ID NO:9 (重链Ab79)

[0350] EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMVWRQAPGKGLEWVSDISWNGGKTHYVDSVKGQFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFHDSSGFYFGHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA

[0351] SEQ ID NO:10 (轻链Ab79)

[0352] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL

[0353] SEQ ID NO:11 (重链Ab19)

[0354] EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDKDYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYGFSGPSMDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA

[0355] SEQ ID NO:12 (轻链Ab19)

[0356] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEEL

[0357] SEQ ID NO:13 (HCDR1 Ab19)

[0358] GFTFNNG

[0359] SEQ ID NO:14 (HCDR2 Ab19)

[0360] ISYDGSDK

[0361] SEQ ID NO:15 (HCDR3 Ab19)

[0362] ARVYYYGFSGPSMDV

[0363] SEQ ID NO:16 (LCDR1 Ab19)

[0364] NSNIGSNT

[0365] SEQ ID NO:17 (LCDR2 Ab19)

[0366] SDS

[0367] SEQ ID NO:18 (LCDR3 Ab19)

- [0368] QSYDSSLGSRSEQ ID NO:19 (重链Ab19) 含恒定区
- [0369] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNDYMTWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSDKDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYYGFSGPSMDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLT
- [0370] VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0371] SEQ ID NO:20 (轻链Ab 1 9) 含恒定区
- [0372] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
- [0373] SEQ ID NO:21 (重链Ab79)
- [0374] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMWVRQAPGKGLEWVSDISWNGGKTHYVDSVKGQFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFHDSSGFYFGHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPK KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE E QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK G FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0375] SEQ ID NO:22 (轻链Ab79)
- [0376] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP G AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
- [0377] SEQ ID NO:23 (CD 1 57 智人;NP_004325)
- [0378] MAAQGCAASRLQLLLQLLLLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDLFLGRCAEYRALLSPEQRNKNCTA IWEAFKVALDKDPCSVLPDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQ KND SGLDYQSCPTS
- [0379] EDCENNPVDSFWKRASIQYSKDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGGFADYEIPNLQKEKITRIEIVWMHE IGGPNVESC GEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAPSLYTEQRAGLI I PLFLVLASRTQL
- [0380] SEQ ID NO:24 (Benchmark 1;重链可变区)
- [0381] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEVFDYWGQGTLVTVSS
- [0382] SEQ ID NO:25 (Benchmark 1;轻链可变区)
- [0383] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKR
- [0384] SEQ ID NO:26 (Benchmark 2;重链可变区)
- [0385] QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPQGQLEWIGTYPGDGDTGYAQKFQ GKATL TADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGDYYSNSLDYWGQGTSTVTVSS

[0386] SEQ ID NO:27 (Benchmark 2;轻链可变区)

[0387] DIVMTQSHLSMSTSLGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYSASYRYIGVPDRFTGSGAGT
DFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSPPYTFGGGTKLEIKR

[0388] SEQ ID NO:28 (重链Ab43)

[0389] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSRINSDGSSTSYADSMKGQFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGYYYYAMDVWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0390] SEQ ID NO:29 (轻链Ab43)

[0391] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGGSSNIGYKTVNWWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGLVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG
AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0392] SEQ ID NO:30 (重链Ab72)

[0393] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNWRQAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSNYDFWSGYYYGMDVWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

[0394] SEQ ID NO:31 (轻链Ab72)

[0395] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSKTVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCSSYAARSTNIIFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG
AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0396] SEQ ID NO:32 (重链Ab110)

[0397] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSIISGGSTYYADSVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRATWGGATHDYWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0398] SEQ ID NO:33 (轻链Ab110)

[0399] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRNNRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLNGLVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG
AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0400] SEQ ID NO:34 (重链Ab19) 含恒定区EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQ

APGKGLEWVAVISYDGSDDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYGFGSPGSDVWGQGT

LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0401] SEQ ID NO:35 (轻链Ab19) 含恒定区

[0402] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSNRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLSGSRVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYP
GAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSQRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0403] 已详细描述本发明并且已参考本发明的特定实施方案,显然在不脱离附加权利要求书所界定的本发明的范畴的情况下,修改和变化都是可能的。更具体来说,虽然本发明的一些方面在本文中被认定是尤其有利的,但是应了解,本发明并不必限于本发明的所述特定方面。

序列表

<110> 武田药品有限公司
 Elias, Kathleen A.
 Landes, Gregory
 Singh, Shweta
 Korver, Wouter
 Drake, Andrew W.
 Haak-Frendscho, Mary
 Snell, Gyorgy P.
 Bhaskar, Vinay

 <120> 抗CD38抗体
 <130> 101588-5005-WO
 <140> 待指定的PCT专利申请号
 <141> 2011-12-30

 <150> 61/428,699
 <151> 2010-12-30

 <150> 61/470,382
 <151> 2011-03-31

 <150> 61/470,406
 <151> 2011-03-31

 <150> 61/485,104
 <151> 2011-05-11

 <160> 35
 <170> PatentIn 3.5版

 <210> 1
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 1
 Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
 1 5 10 15

 Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val
 20 25 30

 Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln
 35 40 45

 Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu
 50 55 60

 Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val
 65 70 75 80

 Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys
 85 90 95

 His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu
 100 105 110

 Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile
 115 120 125

 Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr
 130 135 140

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys
 145 150 155 160
 Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp
 165 170 175
 Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val
 180 185 190
 Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu
 195 200 205
 Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser
 210 215 220
 Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala
 225 230 235 240
 Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp
 245 250 255
 Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln
 260 265 270
 Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
 275 280 285

[0002]

Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
 290 295 300

<210> 2
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> 长尾猴

<400> 2

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
 1 5 10 15
 Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Val Cys Leu Gly Val Cys Leu Leu Val
 20 25 30
 Leu Leu Ile Leu Val Val Val Val Ala Val Val Leu Pro Arg Trp Arg
 35 40 45
 Gln Gln Trp Ser Gly Ser Gly Thr Thr Ser Arg Phe Pro Glu Thr Val
 50 55 60
 Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Val His Pro Glu Met Arg His
 65 70 75 80
 Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser
 85 90 95
 Lys Tyr Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Val Lys
 100 105 110

Leu Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Thr Leu Leu Trp Ser Arg
115 120 125

Ile Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe
130 135 140

Thr Leu Glu Asp Met Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp
145 150 155 160

Cys Gly Glu Phe Asn Thr Phe Glu Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp
165 170 175

Trp Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr
180 185 190

Val Ser Arg Arg Phe Ala Glu Thr Ala Cys Gly Val Val His Val Met
195 200 205

Leu Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly
210 215 220

Ser Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Ala Leu Glu
225 230 235 240

Ala Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln
245 250 255

[0003]

Asp Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile
260 265 270

Arg Phe Phe Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys
275 280 285

Val Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Leu Ser Gly Ile
290 295 300

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab79重链CDR1

<400> 3

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab79重链CDR2

<400> 4

Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr
1 5

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab79重链CDR3

<400> 5

Ala Arg Gly Ser Leu Phe His Asp Ser Ser Gly Phe Tyr Phe Gly His
1 5 10 15

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab79轻链CDR1

<400> 6

Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn Tyr
1 5

<210> 7
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab79轻链CDR2

<400> 7

[0004]

Arg Asp Ser
1

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab79轻链CDR3

<400> 8

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 135
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab79重链可变区

<400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

	35	40	45
	Ser Asp Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr His Tyr Val Asp Ser Val 50 55 60		
	Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Ala Arg Gly Ser Leu Phe His Asp Ser Ser Gly Phe Tyr Phe Gly His 100 105 110		
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly 115 120 125		
	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala 130 135		
	<210> 10 <211> 129 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> Ab79轻链可变区		
	<400> 10		
[0005]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln 1 5 10 15		
	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn 20 25 30		
	Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu 35 40 45		
	Ile Tyr Arg Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60		
	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg 65 70 75 80		
	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu 85 90 95		
	Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln 100 105 110		
	Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu 115 120 125		
	Leu		
	<210> 11 <211> 134 <212> PRT		

<213> 人工序列

<220>

<223> Ab19重链

<400> 11

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

[0006]

Ser Val Phe Pro Leu Ala
130

<210> 12

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ab19轻链

<400> 12

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu
130

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab19重链CDR1

<400> 13

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Asp
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab19重链CDR2

<400> 14

[0007] Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys
1 5

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab19重链CDR3

<400> 15

Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab19轻链CDR1

<400> 16

Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr
1 5

<210> 17
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab19轻链CDR2

<400> 17

Ser Asp Ser
1

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ab19轻链CDR3

<400> 18

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Arg
1 5 10

<210> 19

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ab19重链

<400> 19

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

[0008]

Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

	180	185	190
	Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn 195 200 205		
	His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser 210 215 220		
	Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu 225 230 235 240		
	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu 245 250 255		
	Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser 260 265 270		
	His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu 275 280 285		
	Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr 290 295 300		
	Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn 305 310 315 320		
	Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro 325 330 335		
[0009]	Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln 340 345 350		
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val 355 360 365		
	Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val 370 375 380		
	Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro 385 390 395 400		
	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr 405 410 415		
	Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val 420 425 430		
	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu 435 440 445		
	Ser Pro Gly Lys 450		
	<210> 20		
	<211> 217		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		

<220>

<223> Ab19轻链

<400> 20

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Ser Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

[0010]

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 21

<211> 453

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ab79重链

<400> 21

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

	20	25	30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35	40	45
Ser Asp Ile Ser Trp Asn Gly Gly Lys Thr His Tyr Val Asp Ser Val	50	55	60
Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Arg Gly Ser Leu Phe His Asp Ser Ser Gly Phe Tyr Phe Gly His	100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly	115	120	125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly	130	135	140
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val	145	150	155
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe	165	170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val	180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val	195	200	205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys	210	215	220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	225	230	235
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	260	265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	305	310	315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala			

[0011]

	325	330	335
	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
	340	345	350
	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
	355	360	365
	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
	370	375	380
	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
	385	390	395
	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
	405	410	415
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	420	425	430
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	435	440	445
	Leu Ser Pro Gly Lys		
	450		
[0012]	<210> 22		
	<211> 216		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> Ab79轻链		
	<400> 22		
	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		
	1	5	10
	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asp Asn		
	20	25	30
	Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu		
	35	40	45
	Ile Tyr Arg Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
	50	55	60
	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg		
	65	70	75
	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu		
	85	90	95
	Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln		
	100	105	110
	Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu		
	115	120	125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 23
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 23

Met Ala Ala Gln Gly Cys Ala Ala Ser Arg Leu Leu Gln Leu Leu Leu
 1 5 10 15

[0013]

Gln Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gly Gly Ala Arg Ala
 20 25 30

Arg Trp Arg Gly Glu Gly Thr Ser Ala His Leu Arg Asp Ile Phe Leu
 35 40 45

Gly Arg Cys Ala Glu Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Pro Glu Gln Arg Asn
 50 55 60

Lys Asn Cys Thr Ala Ile Trp Glu Ala Phe Lys Val Ala Leu Asp Lys
 65 70 75 80

Asp Pro Cys Ser Val Leu Pro Ser Asp Tyr Asp Leu Phe Ile Asn Leu
 85 90 95

Ser Arg His Ser Ile Pro Arg Asp Lys Ser Leu Phe Trp Glu Asn Ser
 100 105 110

His Leu Leu Val Asn Ser Phe Ala Asp Asn Thr Arg Arg Phe Met Pro
 115 120 125

Leu Ser Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Ala Asp Phe Leu Ser Trp Cys
 130 135 140

Arg Gln Lys Asn Asp Ser Gly Leu Asp Tyr Gln Ser Cys Pro Thr Ser
 145 150 155 160

Glu Asp Cys Glu Asn Asn Pro Val Asp Ser Phe Trp Lys Arg Ala Ser
 165 170 175

Ile Gln Tyr Ser Lys Asp Ser Ser Gly Val Ile His Val Met Leu Asn
 180 185 190
 Gly Ser Glu Pro Thr Gly Ala Tyr Pro Ile Lys Gly Phe Phe Ala Asp
 195 200 205
 Tyr Glu Ile Pro Asn Leu Gln Lys Glu Lys Ile Thr Arg Ile Glu Ile
 210 215 220
 Trp Val Met His Glu Ile Gly Gly Pro Asn Val Glu Ser Cys Gly Glu
 225 230 235 240
 Gly Ser Met Lys Val Leu Glu Lys Arg Leu Lys Asp Met Gly Phe Gln
 245 250 255
 Tyr Ser Cys Ile Asn Asp Tyr Arg Pro Val Lys Leu Leu Gln Cys Val
 260 265 270
 Asp His Ser Thr His Pro Asp Cys Ala Leu Lys Ser Ala Ala Ala Ala
 275 280 285
 Thr Gln Arg Lys Ala Pro Ser Leu Tyr Thr Glu Gln Arg Ala Gly Leu
 290 295 300
 Ile Ile Pro Leu Phe Leu Val Leu Ala Ser Arg Thr Gln Leu
 305 310 315

[0014]

<210> 24
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Benchmark 1重链

<400> 24

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Benchmark 1轻链

<400> 25

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

[0015]

<210> 26
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Benchmark 2重链

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
 65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Benchmark 2轻链

<400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

[0016]

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 28
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab43重链

<400> 28

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Met
50 55 60

Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0017]

Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300	
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315	320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	355	360	365	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	370	375	380	
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	385	390	395	400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 29

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ab43轻链

<400> 29

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ser Ser Asn Ile Gly Tyr Lys
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

[0018]

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 30
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab72重链

<400> 30

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0019]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Asn Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 355 360 365
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380
 [0020] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 31
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> Ab72轻链
 <400> 31
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Lys
 20 25 30

Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Ala Arg Ser
 85 90 95
 Thr Asn Ile Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110
 Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125
 Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160
 Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190
 Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205
 Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

[0021]

<210> 32
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Ab110重链

<400> 32

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ile Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

[0022]

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Arg Ala Thr Trp Gly Gly Ala Thr His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 33

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Ab110轻链

<400> 33

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

[0023]

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 34
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab119重链

<400> 34

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0024] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Tyr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Pro Ser Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
325 330 335

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

[0025]

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Lys
450

<210> 35
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Ab19轻链

<400> 35

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

[0026]

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn	20	25	30	
Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	35	40	45	
Ile	Tyr	Ser	Asp	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	50	55	60	
Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg	65	70	75	80
Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ser	Leu	85	90	95	
Ser	Gly	Ser	Arg	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	100	105	110	
Gln	Pro	Lys	Ala	Asn	Pro	Thr	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	115	120	125	
Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	130	135	140	
Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Val	145	150	155	160
Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	165	170	175	
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	180	185	190	
His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	195	200	205	
Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser								210	215		

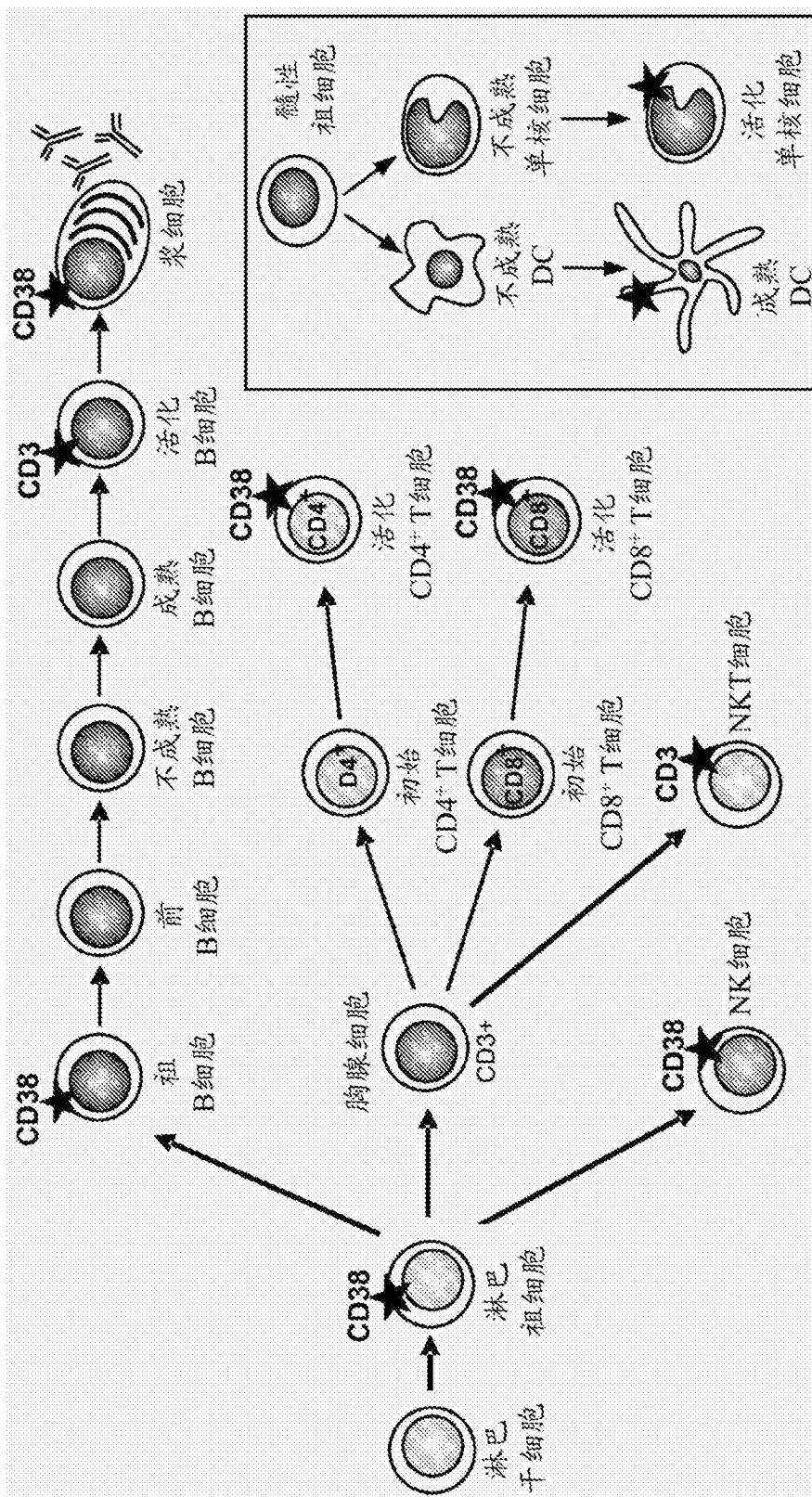


图1

Ab79重链(SEQ ID NO:21)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFDDYGM SWVRQAPGKGLEWVSDIS
WNGGKTHYVDSVKGQFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSLFH
DSSGFYFGHWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ab79轻链(SEQ ID NO:22)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNYVSWYQQLPGTAPKLLIYRDSQ
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSGVFEGGKLT
VLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVK
AGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECS

Ab19重链(SEQ ID NO:11)

EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFNNDMTWVRQAPGKGLEWVAVI
SYDGSDKDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVYYY
GFGSPSMDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图2A

Ab19轻链(SEQ ID NO:12)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSNSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDSN
RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGSGRVFEGGKLT
TVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV
KAGVETTKPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP
TECS

图2B

CD38智人(入藏号NP_001766.2 ; SEQ ID NO:1)

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQLCLGVSLVLILVVVLAVVVPRWRQQWSGPGTTR
FPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLMKLGTQT
VPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLOYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCP
DWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQ
PEKVQTLAEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIIISKRNIFSCCKNIYRPDKFLQCVKNPE
DSSCTSEI

CD38长尾猴/猕猴/食蟹猴(入藏号AAT36330.1 ; SEQ ID NO:2)

MANCEFSPVSGDKPCCRLSRRAQVCLGVCLLVLLILVVVVAVVLPRWRQQWSGSGTTS
RFPETVLARCVKYTEVHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKYPCNITEEDYQPLVKLGTQ
TVPCNKTLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDMLLGYLADDLTWCGEFTFEINYQSC
PDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAETACGVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNL
QPEKVQALEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIIISKRNIRFFCKNIYRPDKFLQCVKN
PEDSSCLSGI

图3

BM2		BM1		TSF19		TSF79	
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

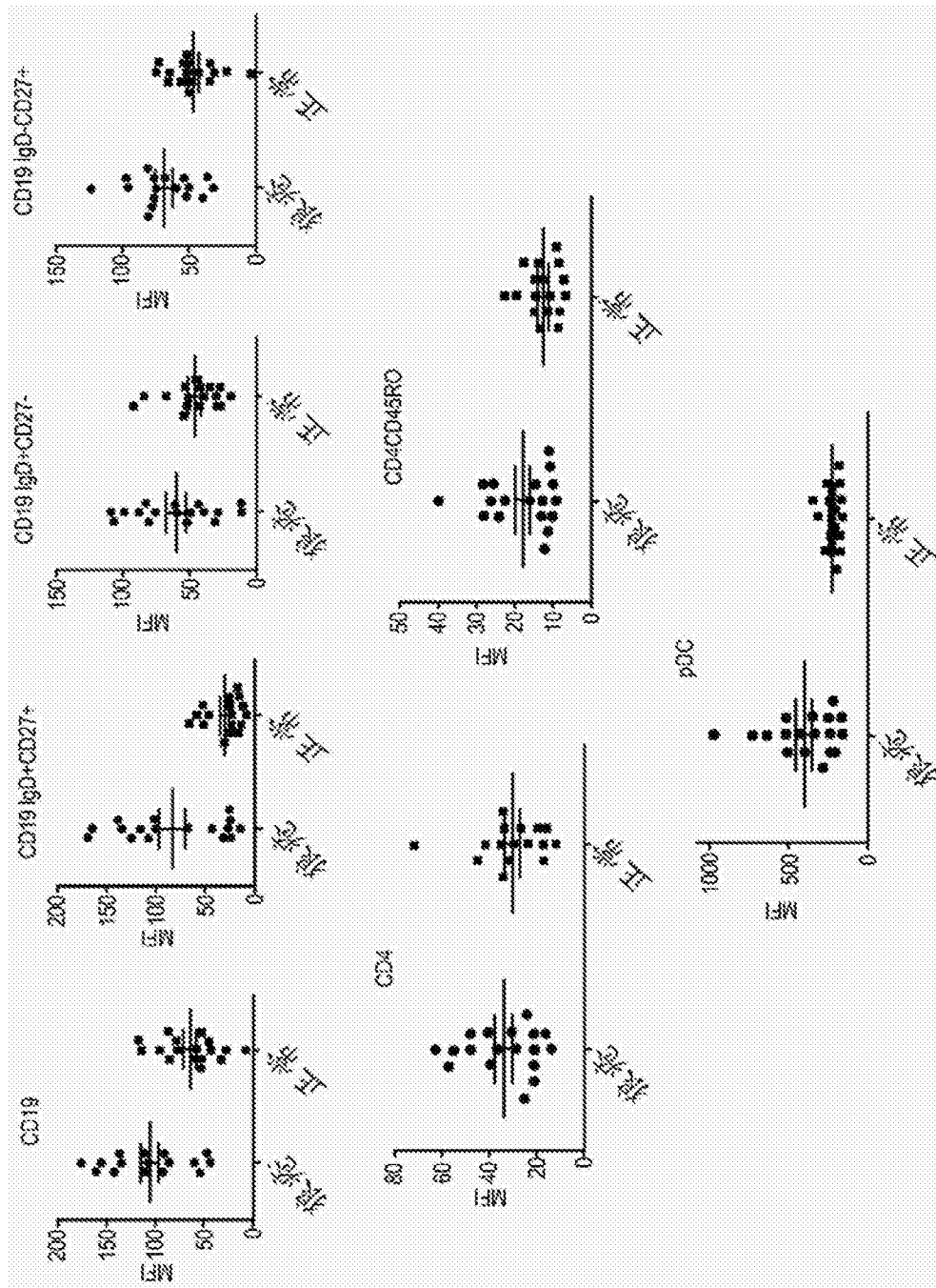


图5

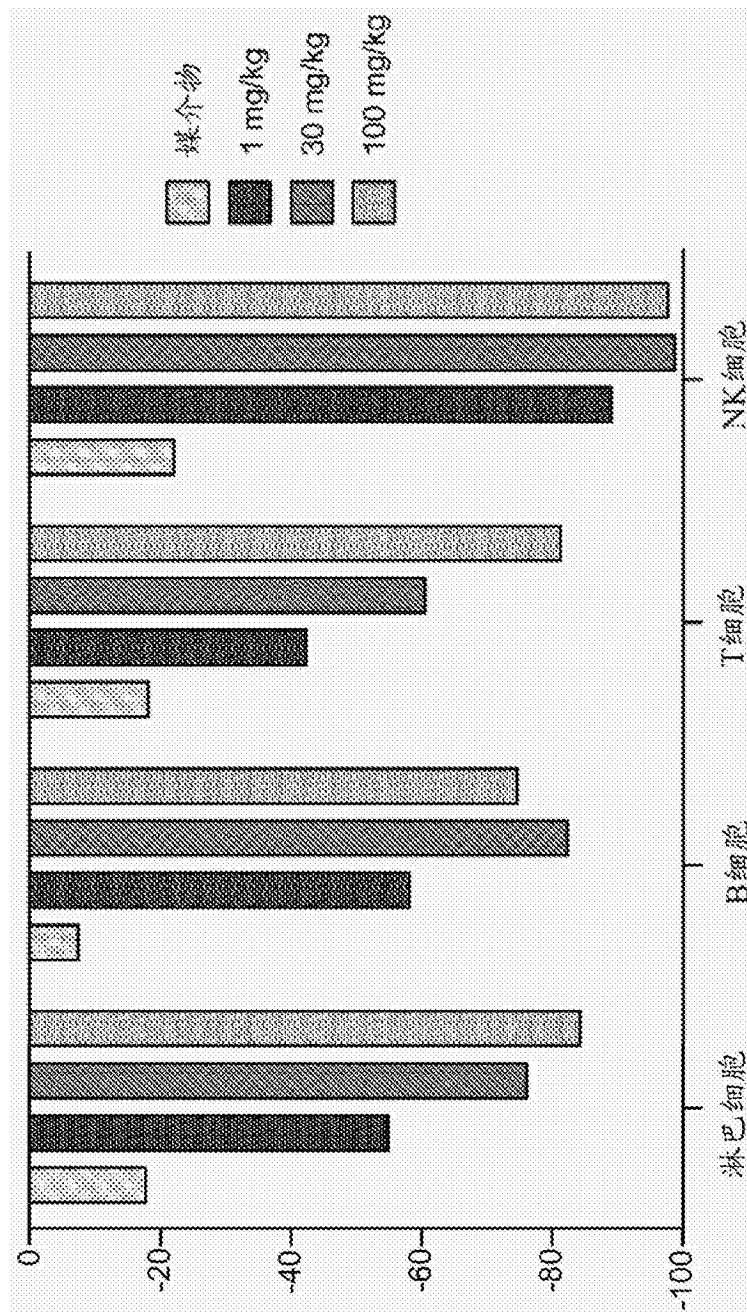


图6

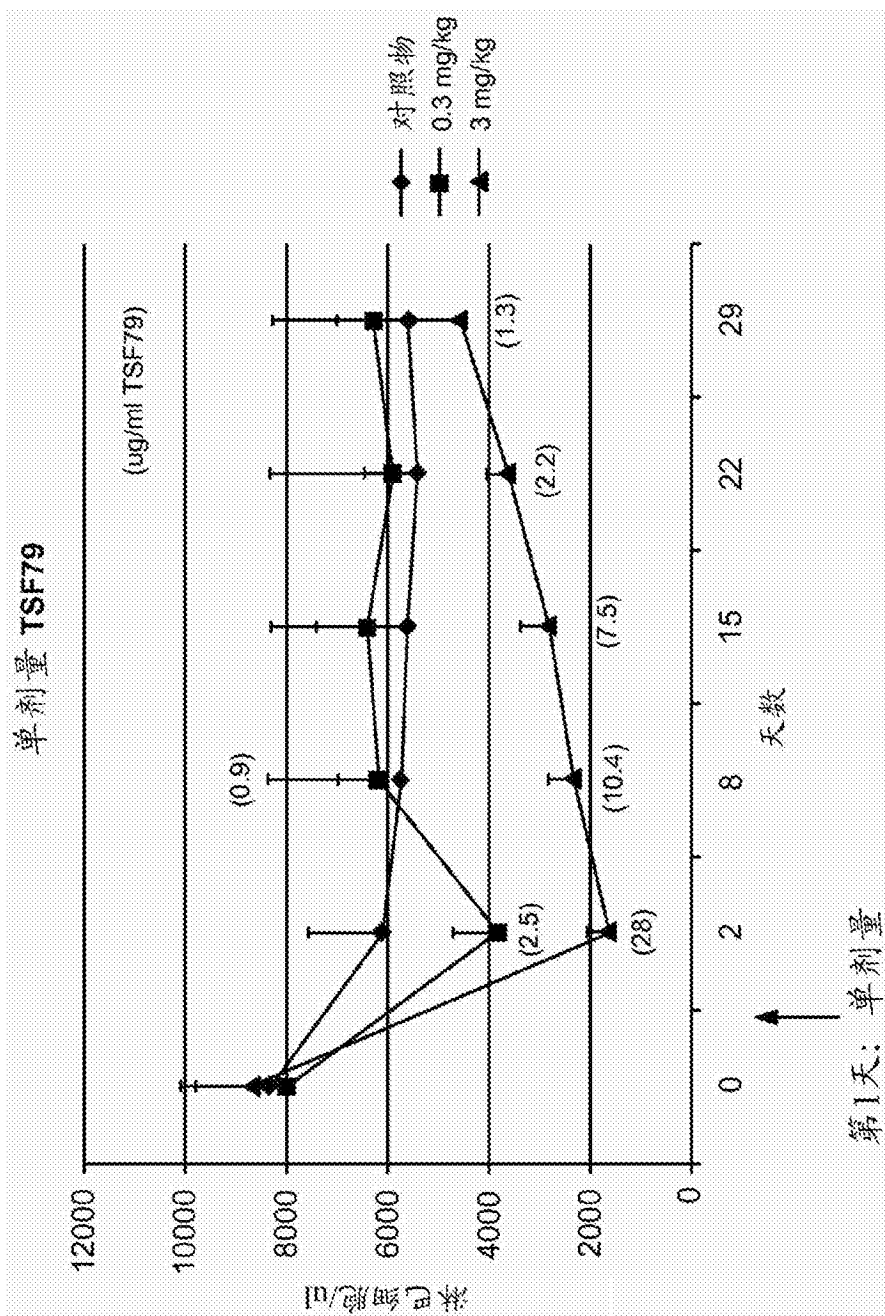


图7

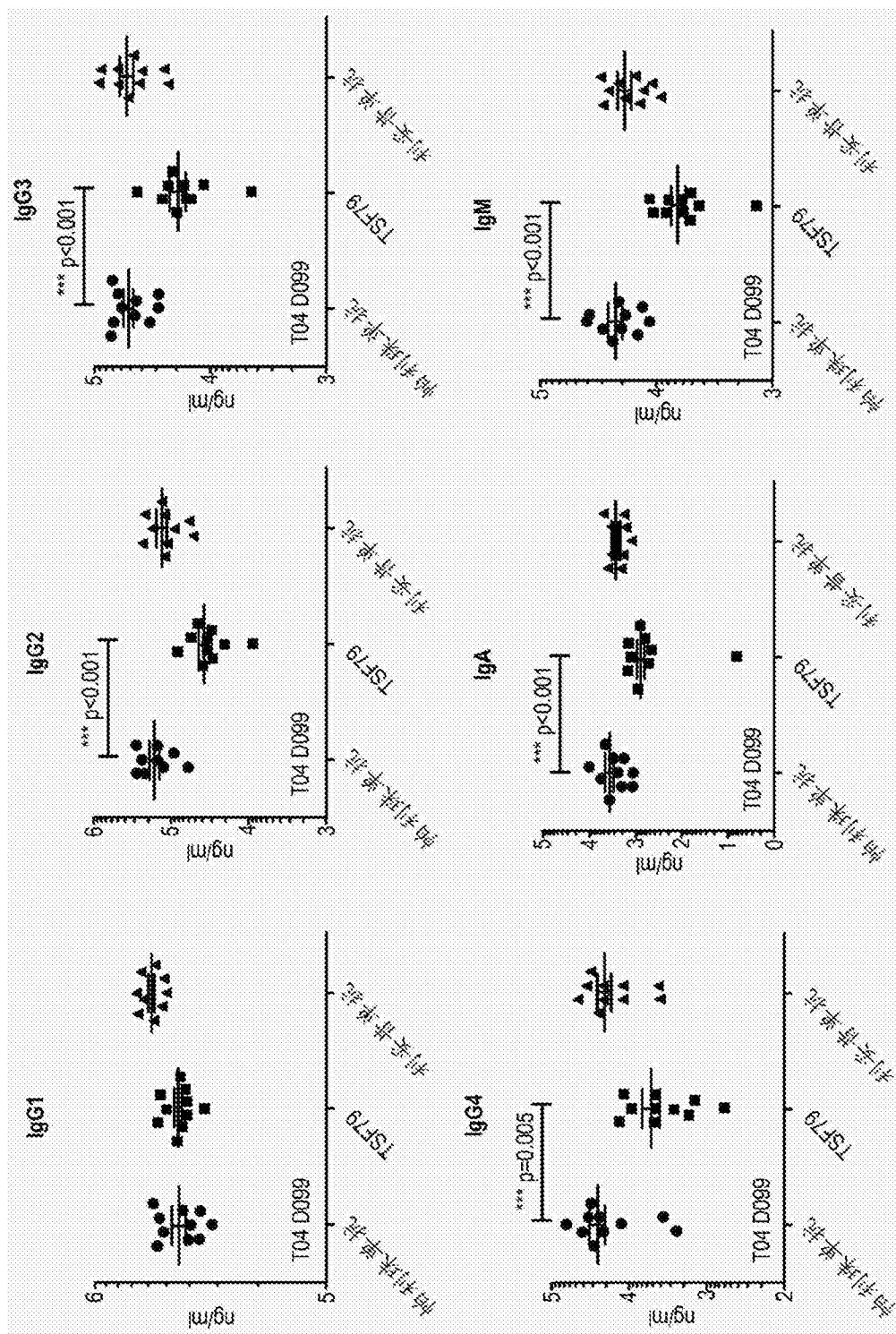


图8

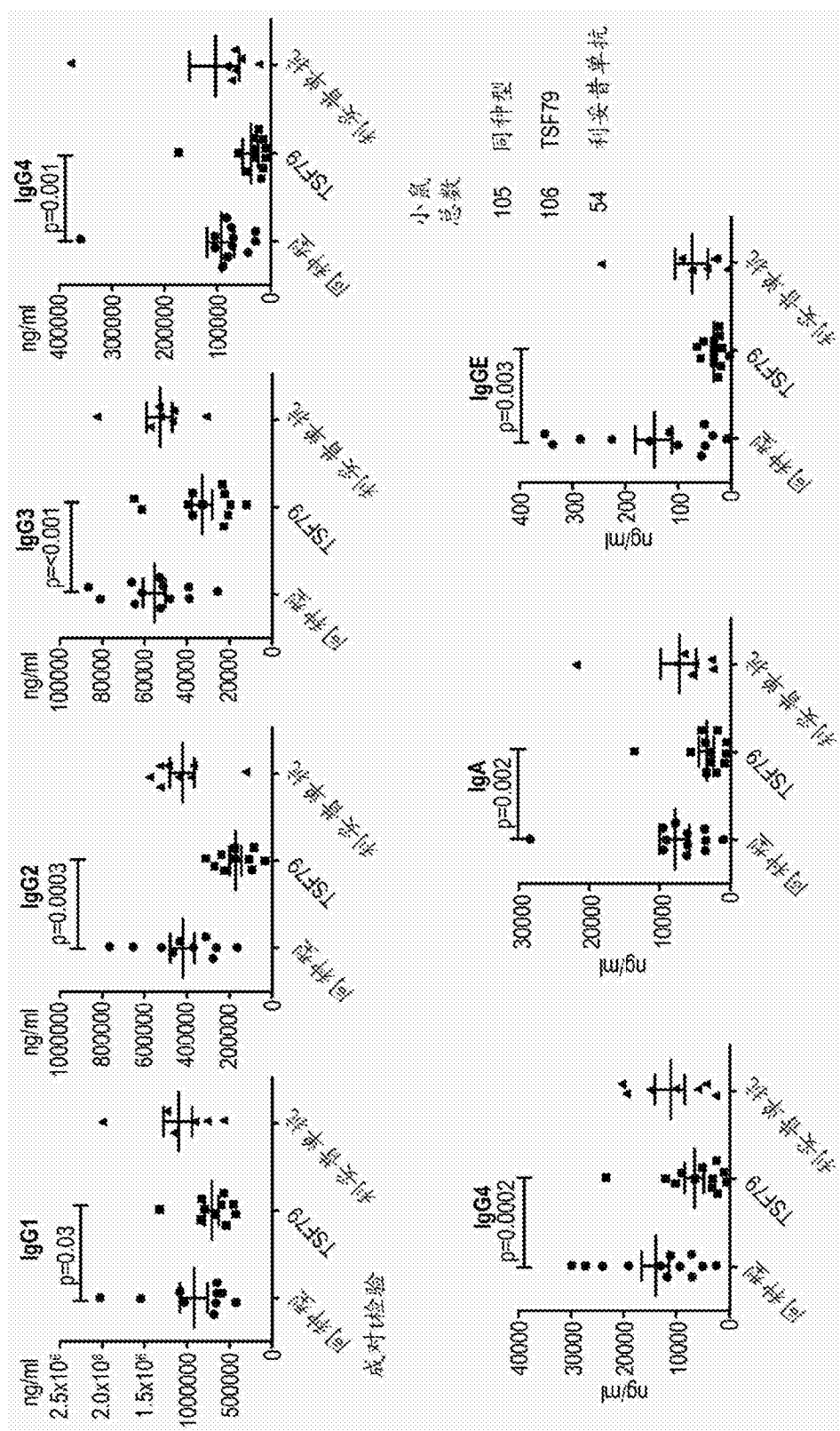


图9

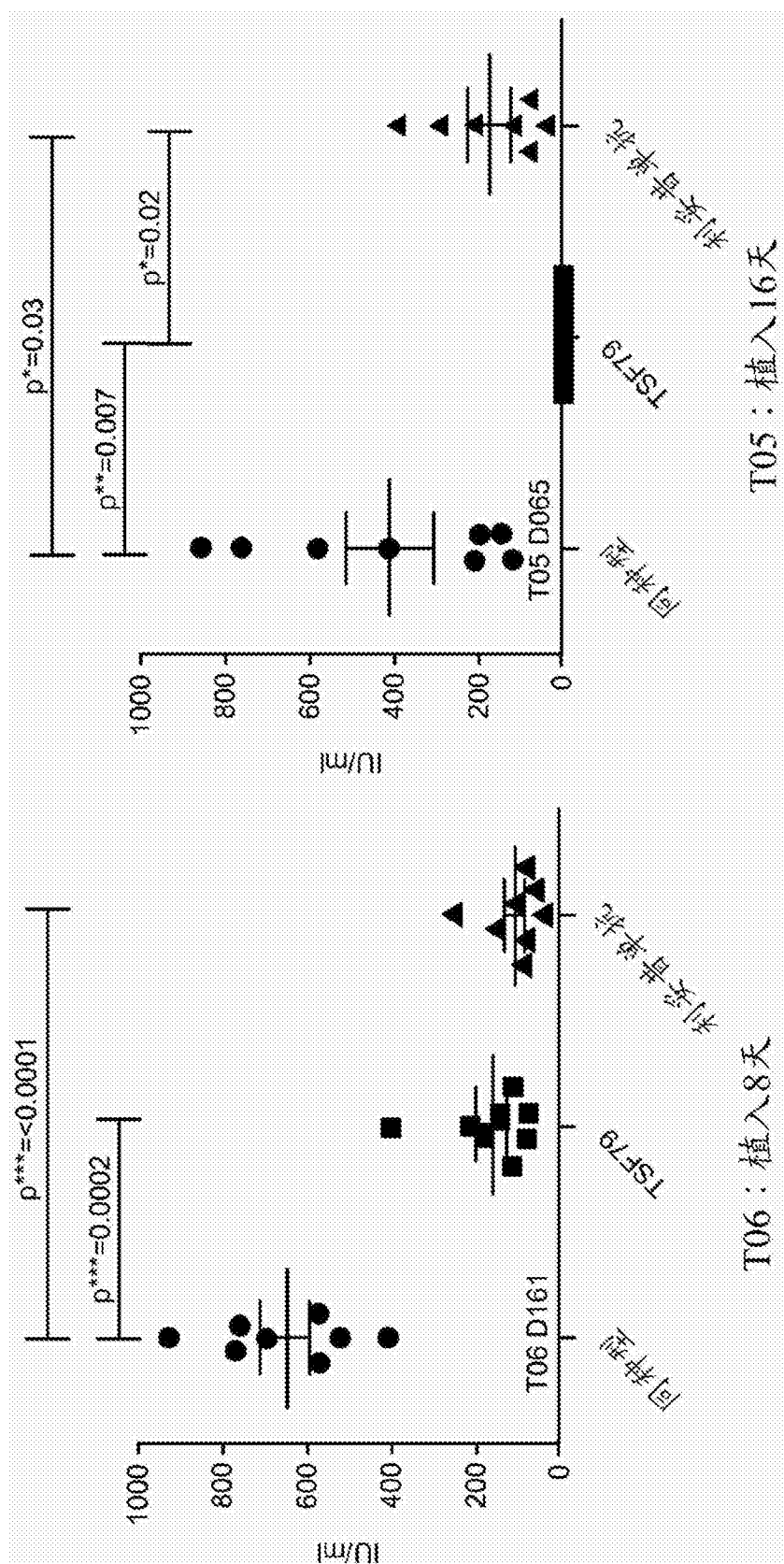


图10

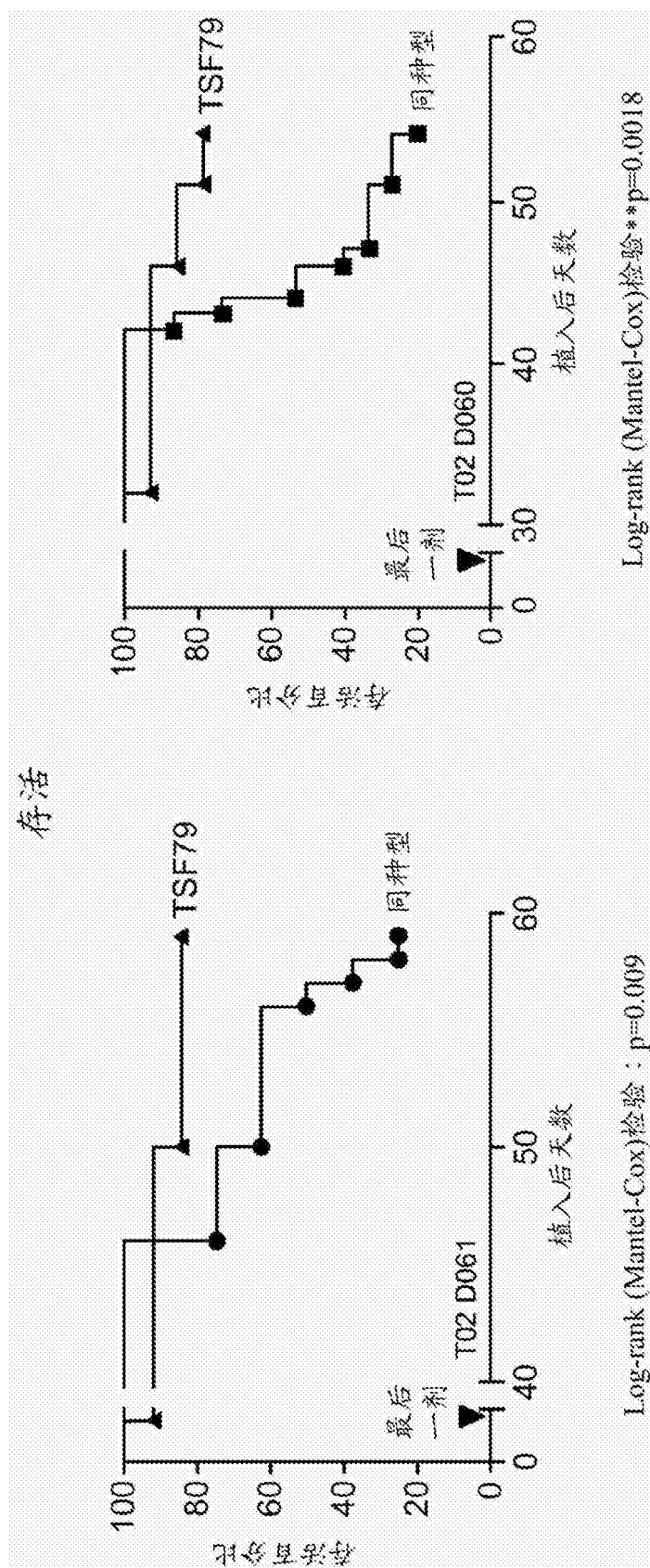


图11

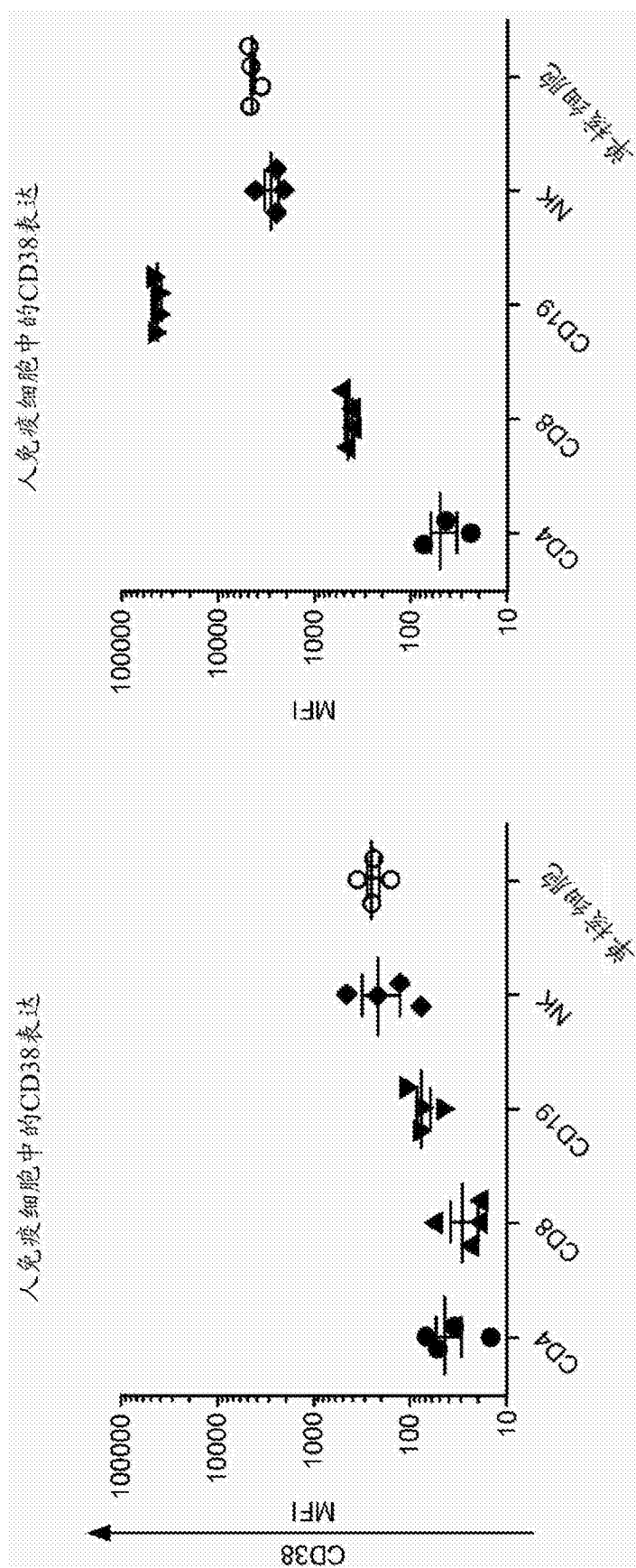


图12

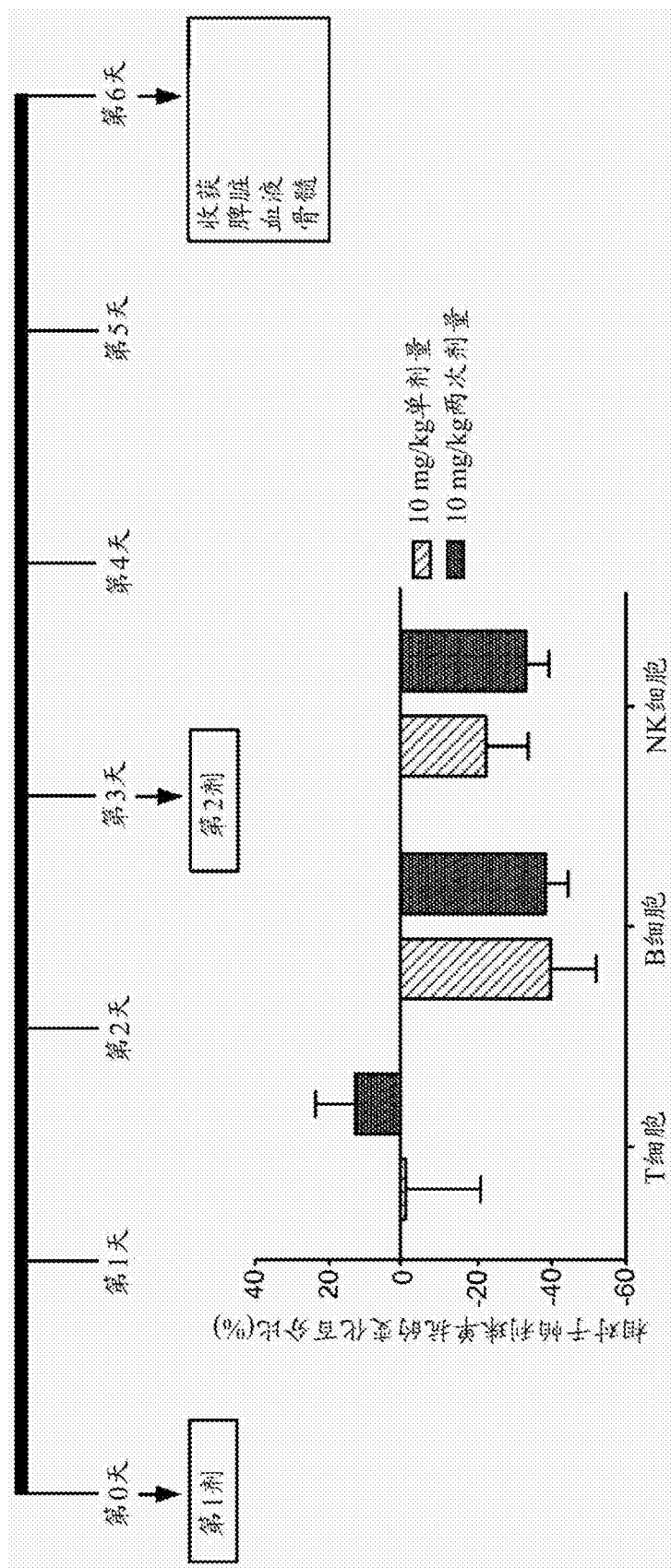


图13