

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 3 月 19 日 (19.03.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/052546 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/105119

(22) 国际申请日: 2019 年 9 月 10 日 (10.09.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201811060341.2 2018 年 9 月 11 日 (11.09.2018) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(72) 发明人: 叶鑫 (YE, Xin); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。孙乐 (SUN, Le); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。宋明娟 (SONG, Mingjuan); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。傅蓓蓓 (FU, Beibei); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。王小华 (WANG, Xiaohua); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。张蕾 (ZHANG, Lei); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康 (TAO, Weikang); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD.); 中国北京市东城区

东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层程伟 (David W. Cheng), Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2 (a))。

(54) Title: ANTI-CD38 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF, AND PHARMACEUTICAL USE

(54) 发明名称: 抗 CD38 抗体、其抗原结合片段及医药用途

(57) Abstract: The present application provides an anti-CD38 antibody, an antigen-binding fragment thereof, and pharmaceutical use. Specifically, the present application provides a murine-derived antibody, a chimeric antibody, or a humanized antibody comprising a CDR region of the anti-CD38 antibody, a pharmaceutical composition comprising the anti-CD38 antibody or the antigen-binding fragment thereof, and an application thereof as a drug. In particular, the present application provides an application of a humanized anti-CD38 antibody in preparing a drug for treating a CD38 positive disease or disorder.

(57) 摘要: 本公开提供了抗 CD38 抗体、其抗原结合片段及医药用途。具体的, 本公开提供了包含所述抗 CD38 抗体 CDR 区的鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体, 以及包含抗 CD38 抗体或其抗原结合片段的药物组合物, 以及其作为药物的用途。特别地, 本公开提供了一种人源化的抗 CD38 抗体在制备用于治疗 CD38 阳性疾病或病症的药物中的用途。



WO 2020/052546 A1

抗 CD38 抗体、其抗原结合片段及医药用途

技术领域

本公开属于生物技术领域，更具体地，本公开涉及抗 CD38 抗体及其组合物的
5 治疗性用途和用于生产所述抗体分子的方法。

背景技术

这里的陈述仅提供与本公开有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

多发性骨髓瘤 (Multiple myeloma, MM) 是一种恶性浆细胞病，其肿瘤细胞
10 起源于骨髓中的浆细胞，而浆细胞是 B 淋巴细胞发育到最终功能阶段的细胞。因此，多发性骨髓瘤也可以归到 B 淋巴细胞淋巴瘤的范围。

多发性骨髓瘤特征为骨髓浆细胞异常增生伴有单克隆免疫球蛋白或轻链 (M 蛋白) 的过度生成，极少数患者是不产生 M 蛋白的未分泌型 MM。多发性骨髓瘤常伴有多发性溶骨性损害、高钙血症、贫血、肾脏损害。由于正常免疫球蛋白的
15 生成受到抑制，因此容易出现各种细菌性感染。

中国国内发病率估计为 2 至 3 人/10 万，男女比例为 1.6: 1，大多患者年龄 >40 岁，多为 >60 岁的老人。目前，中国国内预计有 7 万左右的患者，全球大概每年新增 8 万多患者。多发性骨髓瘤在各种血液瘤中占比约 10% 左右。随着老龄化趋势的加重，患者的数量有进一步加剧的趋势。

20 目前，多发性骨髓瘤是一种无法治愈的血液系统恶性肿瘤，现有主要的治疗手段包括：骨髓移植、多重小分子药物化疗，尤其是卡非佐米 (carfilzomib) 为代表的蛋白酶抑制剂，和来那度胺 (lenalidomide) 为代表的免疫调节剂，大大延长了 MM 患者的生存期。但是，该病最后几乎都会复发，复发后平均生存周期仅 9 个月左右。在复发性或难治性 MM 患者 (Refractory multiple myeloma, RRMM)
25 身上，单用 Janssen 公司的达雷木单抗 (Daratumumab, Dara) 表现出良好效果，因而被 FDA 视为突破性药物，并于 2015 年 11 月获批上市，用于 RRMM 患者的治疗。目前在开展多个 Dara 和小分子联用的临床试验，Dara 和小分子药物的联用可以大大提高临床疗效。

CD38 是具有 256 氨基酸胞外域的 II 型跨膜多功能蛋白。一方面，通过间接方式证明 CD38 通过配体 CD31 发挥横向信号传递的作用，可引起细胞粘附，在淋巴细胞活化和 B 细胞分化等方面起作用，但是该功能未有生化方面的直接证据。另一方面，CD38 具有环化酶及水解酶的功能，可以通过环化酶的作用促进 NAD (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 转化成 cADPR (环腺苷二磷酸核糖)，也可以通过 cADPR 水解酶作用，促进 cADPR 转化成 ADPR (二磷酸腺苷核糖)。CD38 可以调节 Ca²⁺
30 流，也可以促进细胞产生腺苷从而抑制免疫，Ca²⁺流的变化可能会影响胰岛素的分泌。敲除 CD38 基因的小鼠显示能够正常存活，但存在体液免疫应答下降、胰岛

素下降、心/肺肌肉缺陷等不同症状。人体内 CD38 在造血细胞、免疫细胞及多种正常组织如脑、胰脏、肾脏、肌肉等中表达，RNA 水平检测显示在前列腺及胸腺中有较高表达，而在多种血液瘤细胞尤其是多发性骨髓瘤细胞中明显高表达，达雷木单抗的临床数据也验证了 CD38 抗体在多发性骨髓瘤领域的药效及安全性，提示 CD38 靶点开发的潜在价值。各类文献研究显示抗 CD38 的抗体在治疗 MM 中的作用机制主要包括：

- 1) ADCC、CDC、ADCP，主要和表位及 IgG1-Fc 相关的作用机制；
- 2) 凋亡引起的直接杀伤作用；
- 3) 通过抑制 CD38 酶活性对于肿瘤细胞的生存产生的影响；
- 4) 潜在的对于表达 CD38 的 Treg 细胞的清除作用。

CD38 靶点成为多发性骨髓瘤治疗的一大热点。另一个重要的靶向 CD38 的抗体是 Sanofi 的伊沙妥昔单抗 (Isatuximab)，同样开展了多个单用及与小分子药物联用的临床实验，从现有的数据来看伊沙妥昔单抗具有和达雷木单抗相当的疗效及安全性。目前还有 MOR202 (Morphasys) 及 TAK-079 (Takeda) 等抗体已进入临床，也有 CD38/CD3 双特异性抗体及 CD38-CAR-T 等在临床前研究阶段。其他针对 CD38 靶点的抗体相关专利可参见如：WO2006099875、WO2007042309、WO2008047242、WO2012092612、WO2016164656、WO2017149122 等。

继续开发具有高选择性、高亲和力和良好药效的抗体仍是目前急需的。

发明内容

本公开提供一系列亲和力 (affinity) 更高，体内抑瘤活性更好，且具有良好体内代谢活性的 CD38 抗体。具体地，本公开提供一种与人 CD38 特异性结合的单克隆抗体或抗原结合片段。

在一些实施方案中，本公开提供一种抗 CD38 抗体或其抗原结合片段，所述抗体与人 CD38 特异性结合，所述抗体或其抗原结合片段包含，如下所示的 CDR：

(i) 分别如 SEQ ID NO: 9、10、11 所示的重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3 或与 SEQ ID NO: 9、10、11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别具有 3、2 或 1 个氨基酸差异的 HCDR 变体；和分别如 SEQ ID NO: 12、13、14 氨基酸序列所示的轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3 或与 SEQ ID NO: 12、13、14 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有 3、2 或 1 个氨基酸差异的 LCDR 变体；或

(ii) 分别如 SEQ ID NO: 15、16、17 所示的重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3 或与 SEQ ID NO: 15、16、17 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别具有 3、2 或 1 个氨基酸差异的 HCDR 变体；和分别如 SEQ ID NO: 18、19、20 所示的轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3 或与 SEQ ID NO: 18、19、20 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有 3、2 或 1 个氨基酸差异的 LCDR 变体；或

(iii) 分别如 SEQ ID NO: 15、21、17 所示的重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3

或与 SEQ ID NO: 15、21、17 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别具有 3、2 或 1 个氨基酸差异的 HCDR 变体；和分别如 SEQ ID NO: 22、19、23 所示的轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3 或与 SEQ ID NO: 22、19、23 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别具有 3、2 或 1 个氨基酸差异的 LCDR 变体。

5 在一些实施方式中，所述抗 CD38 抗体或抗原结合片段的 CDR（包括 3 个重链 CDR 和 3 个轻链 CDR）具有 3、2 或 1 个氨基酸差异的 CDR 变体是经亲和力成熟方法筛选获得的具有 3、2 或 1 个氨基酸差异的 CDR 变体。

在一些实施方案中，所述抗 CD38 抗体或抗原结合片段与人 CD38 的亲和力 (KD) 小于 10^{-8} M、小于 10^{-9} M、小于 10^{-10} M 或小于 10^{-11} M。

10 在一些实施方案中，所述抗 CD38 抗体为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体，优选人源化抗体。

在一些实施方案中，所述抗体为鼠源抗体或嵌合抗体，所述抗体的重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3、5、7 所示或与 SEQ ID NO: 3、5、7 具有至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性；和/或所述的抗体的轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4、6、8 所示或与 SEQ ID NO: 4、6、8 具有至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性。

15 在一些实施方案中，所述的抗 CD38 抗体或抗原结合片段包含如下所示的重链可变区和轻链可变区：

(a)：

20 重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示或与 SEQ ID NO: 3 具有至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性，且

轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示或与 SEQ ID NO: 4 具有至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性；

(b)：

25 重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示或与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性，且

轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示或与 SEQ ID NO: 6 具有至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性；

30 (c)：

重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示或与 SEQ ID NO: 7 具有至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性，且

轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示或与 SEQ ID NO: 8 具有至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 序列同一性。

35 在一些实施方案中，所述抗体为人源化抗体，所述人源化抗体包含来源于人种系的框架 (FR) 区或框架区变体，所述框架区变体为在人抗体的轻链框架区和/

或重链框架区上分别具有至多 10 个（例如 10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个）氨基酸的回复突变。在一些实施方案中，所述人源化抗体包含选自以下（d）至（f）中的任一项：

（d）重链可变区，所述重链可变区包含：重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及重链框架区，其中：

所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示或与 SEQ ID NO: 9 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示或与 SEQ ID NO: 10 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示或与 SEQ ID NO: 11 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述重链框架区具有选自 2F、38K、44S、48I、67A、66K、69L、71V 和 73Q 中的一个或多个回复突变；和/或

轻链可变区，所述轻链可变区包含：轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3 以及轻链框架区，其中：

所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示或与 SEQ ID NO: 12 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示或与 SEQ ID NO: 13 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示或与 SEQ ID NO: 14 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述轻链框架区具有选自 2F、43S、49K 和 87F 中的一个或多个回复突变；

（e）重链可变区，所述重链可变区包含：重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及重链框架区，其中：

所述 HCDR1 氨基酸的序列如 SEQ ID NO: 15 所示或与 SEQ ID NO: 15 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示或与 SEQ ID NO: 16 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示或与 SEQ ID NO: 17 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述重链框架区具有选自 79F、82A T、91S 和 76S 中的一个或多个回复突变；和/或；

轻链可变区，所述轻链可变区包含：轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3 以及轻链框架区，其中：

所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示或与 SEQ ID NO: 18 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示或与 SEQ ID NO: 19 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示或与 SEQ ID NO: 20 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

- 5 所述轻链框架区具有选自 58I、68R 和 85T 中的一个或多个回复突变；和
 (f) 重链可变区，所述重链可变区包含：重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及重链框架区，其中：

所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示或与 SEQ ID NO: 15 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

- 10 所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示或与 SEQ ID NO: 21 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示或与 SEQ ID NO: 17 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

- 所述重链框架区具有选自 48I、77T 和 82A T 中的一个或多个回复突变；和
15 /或

轻链可变区，所述轻链可变区包含：轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3 以及轻链框架区，其中：

所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示或与 SEQ ID NO: 22 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

- 20 所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示或与 SEQ ID NO: 19 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示或与 SEQ ID NO: 23 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，

- 所述轻链框架区具有选自 4L、9A、22S、58I、60A 和 68R 中的一个或多个
25 回复突变；

其中，前述回复突变的位点根据 Kabat 编号规则编号，前述突变例如“2F”是指将第 2 位（根据 Kabat 编号规则编号的第 2 位）氨基酸回复突变为苯丙氨酸（缩写 Phe 或 F），“82A T”是指将第 82A 位（根据 Kabat 编号规则编号的第 82A 位）氨基酸回复突变为苏氨酸（缩写 Thr 或 T）。

- 30 在一些实施方案中，所述的抗体重链 FR 区序列选自人种系 IGHV1-3*01 和 hJH4.1 的组合或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性。

在一些实施方案中，所述的轻链 FR 区选自人种系 IGKV3-11*01 和 hJK4.1 的组合或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性。

- 在另一些实施方案中，所述的重链 FR 区序列选自人种系 IGHV3-7*01 和
35 hJH6.1 的 FR4 的组合或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性。

在另一些实施方案中，所述的轻链 FR 区序列选自人种系 IGKV4-1*01 和 hJK4.1 的组合或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性。

在一些实施方案中，所述的人源化抗体包含序列如 SEQ ID NO: 24、32 或 37 所示的重链可变区或其变体；其中所述的变体是在上述重链可变区中的框架区上具有 1-10 个（例如 10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个）氨基酸突变。在一些实施方案中，其中所述的氨基酸突变选自以下任一项所述：

(g)在序列如 SEQ ID NO: 24 所示的重链可变区中的框架区上具有选自 2F、38K、44S、48I、67A、66K、69L、71V 和 73Q 中的一个或多个氨基酸的回复突变；

(h)在序列如 SEQ ID NO: 32 所示的重链可变区中的框架区上具有选自 79F 和 91S 中的一个或多个氨基酸回复突变；

(i)在序列如 SEQ ID NO: 37 所示的重链可变区中的框架区上具有 48I 氨基酸回复突变。

在一些实施方案中，所述的人源化抗体包含：

序列如 SEQ ID NO: 26、27、28、29、34 或 39 所示的重链可变区，或序列与 SEQ ID NO: 26、27、28、29、34 或 39 具有至少 95%、96%、97%、98%、99% 或 100%序列同一性的重链可变区。

在一些实施方案中，所述的人源化抗体包含序列如 SEQ ID NO: 25、33 或 38 所示的轻链可变区或其变体；所述的变体是在序列 SEQ ID NO: 25、33 或 38 任一项所示的轻链可变区中的框架区上具有 1-10 个（例如 10 个、9 个、8 个、7 个、6 个、5 个、4 个、3 个、2 个或 1 个）氨基酸突变。

在一些实施方案中，其中所述的氨基酸突变选自以下 (j) 至 (l) 任一项：

(j)在序列如 SEQ ID NO: 25 所示的轻链可变区中的框架区上具有选自 2F、43S、49K 和 87F 中的一个或多个氨基酸回复突变；

(k)在序列如 SEQ ID NO: 33 所示的轻链可变区中的框架区上具有选自 58I、68R 和 85T 中的一个或多个回复突变；

(l)在序列如 SEQ ID NO: 38 所示的轻链可变区中的框架区上具有选自 4L、9A、22S、58I、60A 和 68R 中的一个或多个回复突变；

其中，所述突变的位点根据 Kabat 编号规则编号。

在一些实施方案中，所述的人源化抗体包含：序列如 SEQ ID NO: 30、31、35、36、40、41 或 42 所示的轻链可变区，或序列与 SEQ ID NO: 30、31、35、36、40、41 或 42 具有至少 95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性的氨基酸序列所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，所述的人源化抗体包含：

(m) 序列如 SEQ ID NO: 24、26、27、28 或 29 所示的重链可变区，和序列

如 SEQ ID NO:25、30 或 31 所示的轻链可变区；或

(n) 序列如 SEQ ID NO: 32 或 34 所示的重链可变区，和序列如 SEQ ID NO: 33、35 或 36 所示的轻链可变区；或

(o) 序列如 SEQ ID NO: 37 或 39 所示的重链可变区，和序列如 SEQ ID NO: 38、40、41 或 42 所示的轻链可变区；

在一些实施方案中，所述人源化抗体包含：

(p) 序列如 SEQ ID NO: 26 所示的重链可变区，和序列如 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区；或

(q) 序列如 SEQ ID NO: 32 所示的重链可变区，和序列如 SEQ ID NO: 33 所示的轻链可变区；或

(r) 序列如 SEQ ID NO: 37 所示的重链可变区，和序列如 SEQ ID NO: 38 序列所示的轻链可变区。

在一些实施方案中，所述的抗体进一步包含恒定区；优选地，其中所述抗体为嵌合抗体或人源化抗体，其重链恒定区来源于人抗体 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4，或 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的常规变体；轻链恒定区来源于人抗体 κ 、 λ 链或其常规变体。在一些具体的实施方案中，所述重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 或 44 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性，所述轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示或与其具有至少 95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性。

在一些实施方案中，所述重链如 SEQ ID NO: 46、48、49、51、52 或 54 所示，或与 SEQ ID NO: 46、48、49、51、52 或 54 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性；和/或

所述轻链如 SEQ ID NO: 47、50 或 53 所示，或与 SEQ ID NO: 47、50 或 53 具有至少 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性。

在一些实施方案中，所述抗 CD38 抗体包含：

(i) 序列如 SEQ ID NO: 46 或 48 所示的重链，和序列如 SEQ ID NO: 47 所示的轻链；或

(ii) 序列如 SEQ ID NO: 49 或 51 所示的重链，和序列如 SEQ ID NO: 50 所示的轻链；或

(iii) 序列如 SEQ ID NO: 52 或 54 所示的重链，和序列如 SEQ ID NO: 53 所示的轻链。

在一些具体的实施方案中，所述抗 CD38 抗体包含：

(iv) 序列如 SEQ ID NO: 48 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 47 所示的轻链；或

(v) 序列如 SEQ ID NO: 51 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 50 所示的轻链；或

(vi) 序列如 SEQ ID NO: 54 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 53 所示的轻链。

5 在一些实施方案中,所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段具有增强的 ADCC 活性,该活性的提高通过在改变抗体或其抗原结合片段的 Fc 区与 FcγIIIa 的亲合力实现,比如,可参照 MacroGenics 专利 WO2008140603 提到的 F243L、R292P、Y300L 突变及其组合,如 Xencor 专利 US20080260731 提到的在 IgG1Fc 区进行 S239D、I332E 突变或其组合,以及其他本领域中已经公开的其他可增强 ADCC 功

10 能的突变。

在一些实施方案中,所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、双抗体和 dsFv。

本公开还提供一种抗 CD38 抗体,所述抗体与前述任一项所述的抗体或其抗原结合片段竞争性结合人 CD38,或与前述任一项所述的抗体或其抗原结合片段结合

15 相同的 CD38 抗原表位。

本公开还提供一种药物组合物,其含有治疗有效量的如上所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段,以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。优选地,所述药物组合物单位剂量中可含有 0.01 至 99 重量%的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段;或药物组合物单位剂量中含抗体或其抗原结合片段的量优

20 选为 0.1-2000mg,更优选为 1-1000mg。

本公开还提供一种分离的核酸分子,其编码如前面任一所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段。

本公开还提供一种载体,其包含上述的核酸分子。

本公开还提供一种用如上所述的载体转化(或转导、转染)的宿主细胞。还

25 公开了一种宿主细胞,其包含如上所述的载体。所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞,在一些实施方案中,所述宿主细胞不包括任何能够发育成完整个体的人细胞,如人胚胎干细胞、受精卵、生殖细胞;优选地,所述宿主细胞为真核细胞,更优选哺乳动物细胞,其中所述的哺乳动物细胞包括但不限于 CHO、293、NSO,以及在哺乳动物细胞中进行基因编辑可改变抗体或其抗原结合片段的糖基化修饰,进而改变抗体或其抗原结合片段的 ADCC 功能的细胞,例如,敲除 FUT8 或 GnT-III

30 等基因;在一些实施方案中,所述哺乳动物细胞不包括人细胞。

本公开还提供一种制备如上所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括培养上述宿主细胞,然后回收抗 CD38 抗体或其抗原结合片段的步骤;任选地包括对抗 CD38 抗体或其抗原结合片段进行纯化步骤。

35 本公开还提供用于检测或测定人 CD38 的方法,所述方法包括使上述抗 CD38 抗体或其抗原结合片段接触待测样本。

本公开还提供用于检测或测定人 CD38 的试剂,所述试剂包含上述任一项所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段。

本公开还提供用于与人 CD38 相关的疾病的诊断剂,所述诊断剂包含根据上述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段。

- 5 本公开还提供用于诊断与人 CD38 相关的疾病的方法,所述方法包括使用上述抗 CD38 抗体或其抗原结合片段检测或测定人 CD38 或 CD38 阳性细胞。

本公开还提供上述抗 CD38 抗体或其抗原结合片段在制备与人 CD38 相关的疾病的诊断剂中的应用。

- 10 本公开还提供治疗或预防疾病的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量或预防有效量的上述抗 CD38 抗体或其抗原结合片段,或包含上述的药物组合物,或上述的核酸分子。

在一些实施方案中,所述疾病或病症为肿瘤或免疫性疾病。

在一些实施方案中,所述疾病或病症为 CD38 阳性疾病或病症。

在一些实施方案中,前述疾病或病症为肿瘤。

- 15 在一些实施方案中,前述肿瘤选自白血病、B 细胞淋巴瘤、浆细胞恶性瘤、T/NK 细胞淋巴瘤和骨髓瘤。在一些实施方案中,所述白血病选自:急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性和慢性骨髓型白血病。在一些实施方案中,所述骨髓瘤选自:多发性骨髓瘤、前髓细胞肿瘤和轻链淀粉样变性等。在一些实施方案中,所述淋巴瘤为非何杰金淋巴瘤或何杰金淋巴瘤。在一些实施方案中,前述肿瘤为 B 细胞淋巴瘤/白血病,例如选自成熟 B 细胞肿瘤或前体 B 细胞成淋巴细胞白血病/淋巴瘤,或选自 B 细胞非霍奇金淋巴瘤或 B 细胞霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,所述肿瘤选自: B 细胞慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 或小淋巴细胞性白血病 (SLL)、B 细胞急性淋巴细胞性白血病、B 细胞前淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞样淋巴瘤、套细胞淋巴瘤 (MCL)、低/中/高级滤泡性淋巴瘤 (FL)、皮肤滤泡中心淋巴瘤、边缘区 B 细胞淋巴瘤 (包括 MALT 型、淋巴结 MZBL 型、脾 MZBL 型)、毛细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤 (Burkitt 淋巴瘤)、浆细胞瘤/浆细胞骨髓瘤、浆细胞白血病、移植后淋巴增生性疾病、Waldenstrom 巨球蛋白血症、浆细胞白血病、间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)、多毛细胞淋巴瘤。

- 30 在一些实施方式实施方案中,所述肿瘤为 B-细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤。

在一些实施方案中,所述肿瘤为多发性骨髓瘤。

在一些实施方案中,前述疾病或病症为免疫性疾病,例如由表达 CD38 的 B 细胞、浆细胞、单核细胞和 T 细胞参与的免疫性疾病。

- 35 在一些实施方案中,所述免疫性疾病包括但不限于类风湿性关节炎、牛皮癣、强直性脊柱炎、关节银屑病、皮炎、系统性硬皮病及硬化症、炎症性肠病 (IBD)、Crohn 病 (克罗恩氏病)、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、胃炎、

葡萄膜炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉硬化、白细胞粘附缺陷病、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合物性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症状（如急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜）、溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、风湿关节炎（RA）、异位性皮炎、天疱疮、Graves 病、桥本氏甲状腺炎、Wegener 肉芽肿、Omenn 症候群、慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多症、多发性硬化症、HIV 和疱疹病毒相关的疾病、严重急性呼吸综合征和脉络视网膜炎（choreoretinitis）、移植物对抗宿主疾病、以及病毒感染引起的免疫性疾病（如伊波病毒（EBV）感染 B 细胞引起或介导的疾病）。

10 在一些实施方式中，所述免疫性疾病选自：类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、哮喘、炎症性肠道疾病、多发性硬化症、克罗恩氏病、胃炎、桥本氏甲状腺炎、强直性脊柱炎和移植物对抗宿主疾病。在一些实施方案中，所述疾病或病症为类风湿性关节炎。

本公开进一步提供如上所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段或如上所述的
15 药物组合物或核酸分子在制备用于治疗或预防疾病或病症的药物中的应用。

在一些实施方案中，所述疾病或病症为肿瘤或免疫性疾病。

在一些实施方案中，所述疾病或病症为 CD38 阳性疾病或病症。

在一些实施方案中，前述疾病或病症可以是肿瘤，例如疾病的特征在于存在表达 CD38 的肿瘤细胞。

20 在一些实施方案中，前述肿瘤选自白血病、B 细胞淋巴瘤、浆细胞恶性瘤、T/NK 细胞淋巴瘤和骨髓瘤。

在一些实施方案中，所述白血病选自：急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性和慢性骨髓型白血病。

25 在一些实施方案中，所述骨髓瘤选自：多发性骨髓瘤、前髓细胞肿瘤和轻链淀粉样变性。

在一些实施方案中，所述淋巴瘤为非何杰金淋巴瘤或何杰金淋巴瘤。

30 在一些实施方案中，前述肿瘤为 B 细胞淋巴瘤/白血病，例如选自成熟 B 细胞肿瘤或前体 B 细胞成淋巴细胞白血病/淋巴瘤，或选自 B 细胞非霍奇金淋巴瘤或 B 细胞霍奇金淋巴瘤。

在一些实施方案中，前述肿瘤选自：B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、小淋巴细胞性白血病（SLL）、B 细胞急性淋巴细胞性白血病、B 细胞前淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞样淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、滤泡性淋巴瘤（包括低级、中级或高级 FL）、皮肤滤泡中心淋巴瘤、边缘区 B 细胞淋巴瘤（包括 MALT 型、淋巴结 MZBL 型、脾 MZBL 型）、毛细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤（Burkitt 淋巴瘤）、浆细胞瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞白血病、移

植后淋巴增生性疾病、Waldenstrom 巨球蛋白血症、浆细胞白血病和间变性大细胞淋巴瘤（ALCL）、多毛细胞淋巴瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为 B-细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤。

在一些实施方案中，所述肿瘤为多发性骨髓瘤。

- 5 在一些实施方案中，所述疾病或病症为免疫性疾病，例如是由表达 CD38 的 B 细胞、浆细胞、单核细胞和 T 细胞参与的免疫性疾病。

- 10 在一些实施方案中，所述免疫性疾病可选自：类风湿性关节炎、牛皮癣、强直性脊柱炎、关节银屑病、皮炎、系统性硬皮病及硬化症、炎症性肠病（IBD）、Crohn 病（克罗恩氏病）、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、胃炎、葡萄膜炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉硬化、白细胞粘附缺陷病、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合物性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症状（如急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜）、溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、风湿性关节炎（RA）、异位性皮炎、天疱疮、Graves 病、桥本氏甲状腺炎、Wegener 肉芽肿、Omenn 症候群、慢性肾功能衰竭、急性
15 传染性单核细胞增多症、多发性硬化症、HIV 和疱疹病毒相关的疾病、严重急性呼吸综合征、脉络视网膜炎（choreoretinitis）、移植物对抗宿主疾病、以及病毒感染引起的免疫性疾病（如伊波病毒（EBV）感染 B 细胞引起或介导的疾病）。在一些实施方式中，所述免疫性疾病选自类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、哮喘、
20 炎症性肠道疾病、多发性硬化、克罗恩氏病、胃炎、桥本氏甲状腺炎、强直性脊柱炎和移植物对抗宿主疾病。在一些实施方案中，其中所述免疫疾病或病症是类风湿性关节炎。

本公开进一步提供一种抗 CD38 抗体或其抗原结合片段、或药物组合物、或核酸分子，其用于治疗或预防前述疾病或病症。

- 25 在一些实施方案中，所述疾病或病症为肿瘤或免疫性疾病；在一些实施方案中，所述疾病或病症为 CD38 阳性疾病或病症。

- 30 在一些实施方案中，前述疾病或病症是肿瘤，例如疾病的特征在于存在表达 CD38 的肿瘤细胞，在一些实施方案中，所述肿瘤选自白血病、B 细胞淋巴瘤、浆细胞恶性肿瘤、T/NK 细胞淋巴瘤和骨髓瘤。在一些实施方案中，所述白血病选自：急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性和慢性骨髓型白血病。在一些实施方案中，所述骨髓瘤选自：多发性骨髓瘤、前髓细胞肿瘤和轻链淀粉样变性。在一些实施方案中，所述淋巴瘤为非何杰金淋巴瘤或何杰金淋巴瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤为 B 细胞淋巴瘤/白血病，例如选自成熟 B 细胞肿瘤或前体 B 细胞成淋巴细胞白血病/淋巴瘤，
35 或选自 B 细胞非霍奇金淋巴瘤或 B 细胞霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤选自：B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、小淋巴细胞性白血病（SLL）、

B 细胞急性淋巴细胞性白血病、B 细胞前淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞样淋巴瘤、套细胞淋巴瘤 (MCL)、滤泡性淋巴瘤 (包括低级、中级或高级 FL)、皮肤滤泡中心淋巴瘤、边缘区 B 细胞淋巴瘤 (包括 MALT 型、淋巴结 MZBL 型、脾 MZBL 型)、毛细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤 (Burkitt 淋巴瘤)、浆细胞瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞白血病、移植后淋巴增生性疾病、Waldenstrom 巨球蛋白血症、浆细胞白血病和间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)、多毛细胞淋巴瘤。在一些实施方案中, 所述肿瘤为 B-细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤。在一些实施方案中, 所述肿瘤为多发性骨髓瘤。

在一些实施方案中, 前述疾病或病症为免疫性疾病, 例如是由表达 CD38 的 B 细胞、浆细胞、单核细胞和 T 细胞参与的免疫性疾病。

在一些实施方案中, 所述免疫性疾病可选自: 类风湿性关节炎、牛皮癣、关节银屑病、皮炎、系统性硬皮病及硬化症、炎症性肠病 (IBD)、Crohn 病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉硬化、白细胞粘附缺陷病、多发性硬化症、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合物性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症状 (如急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜)、溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、风湿性关节炎 (RA)、异位性皮炎、天疱疮、Graves 病、桥本甲状腺炎、Wegener 肉芽肿、Omenn 症候群、慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多征、HIV 和疱疹病毒相关的疾病、严重急性呼吸综合征、脉络视网膜炎

(choreoretinitis)、以及病毒感染引起的免疫性疾病 (如伊波病毒 (EBV) 感染 B 细胞引起或介导的疾病)。在一些实施方案中, 所述免疫性疾病选自类风湿性关节炎、系统性红斑性狼疮、哮喘、炎症性肠道疾病、多发性硬化、克罗恩氏病、胃炎、桥本氏甲状腺炎、强直性脊柱炎和移植物对抗宿主疾病。在一些实施方案中, 其中所述免疫性疾病是类风湿性关节炎。

本公开的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段在生化测试或体内外药效试验中, 均表现出良好的效果。其中, 在抗体与抗原的亲和力检测中, 本公开中的抗体 hu9E 与人 CD38 的 KD 值为 1.31nM, hu11E 与人 CD38 的 KD 值为 0.568nM, hu160E 与人 CD38 的 KD 值为 0.0585nM, 而对照抗体的 KD 为 2.35nM, 本公开中的抗体具有高亲和力 (表 18)。

在体内抑瘤活性的实验中发现, 本公开中的 hu11E 和 hu160E 抗体均能有效的抑制小鼠体内的肿瘤生长, 其中在 1mpk/kg 的剂量时, hu11E 的抑瘤率高达 93.14%, hu160E 的抑瘤率高达 70.02%, 均明显高于对照抗体 Dara (抑瘤率为 56.83%) (表 20)。

此外, 本公开 CD38 单克隆抗体或抗原结合片段在大鼠体内具有良好的的代谢动力学特性, 显示出很长的半衰期和很高的生物利用度。

附图说明

图 1A: CD38 抗体对 Molp-8 细胞的体外 ADCP 测试结果。

图 1B: CD38 抗体对 Daudi 细胞的体外 ADCP 测试结果。

5 图 2: CD38 抗体在小鼠体内抑瘤效果。

具体实施方式

术语

10 为了更容易理解本公开，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本公开所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本公开所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558 (1968) 中所述。

15 本公开所述的“抗体”指免疫球蛋白，是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。20 轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区 (Fv 区)；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区。可变区包括 3 个高变区 (HVR) 和 4 个序列相对保守的骨架区 (FR)。3 个高变区决定抗体的特异性，又称为互补性决定区 (CDR)。每条轻链可变区 (VL 或 LCVR) 和重链可变区 (VH 25 或 HCVR) 由 3 个 CDR 区和 4 个 FR 区组成，从氨基端到羧基端依次排列的顺序为：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

本公开的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体，优选人源化抗体。

30 术语“鼠源抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能制备的抗人 CD38 的单克隆抗体。制备时用 CD38 抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本公开一个优选的实施方案中，所述的鼠源 CD38 抗体或其抗原结合片段，可进一步包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链恒定区。

35 术语“嵌合抗体 (chimeric antibody)”，是将某物种 (如鼠) 的抗体的可变区与另一物种 (如人) 抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。建立嵌合抗体，要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后

从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因；再根据需要，克隆人抗体的恒定区基因；将鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中，最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。在本公开一个具体的实施方案中，所述的 CD38 嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。所述的 CD38 嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其常规变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG1 重链恒定区，更优选包含增强 CDC 的功能氨基酸突变（如 E333A 突变）的 IgG1 重链恒定区。

术语“人源化抗体（humanized antibody）”，是指将鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服由于嵌合抗体携带大量鼠蛋白成分，从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库（因特网 www.mrcpe.com.ac.uk/vbase）中获得，以及在 Kabat, E.A. 等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变（或回复突变），以保持活性。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示或酵母菌展示对 CDR 进行亲和力成熟后获得的人源化抗体。

CDR 的移植可由于与抗原接触的构架残基的变化而导致产生的抗体或其抗原结合片段对抗原的亲和力减弱。此类相互作用可以是体细胞高度突变的结果。因此，可能仍然需要将此类供体构架氨基酸移植至人源化抗体的构架。来自非人抗体或其抗原结合片段的参与抗原结合的氨基酸残基可通过检查动物单克隆抗体可变区序列和结构来鉴定。CDR 供体构架中与种系不同的的各残基可被认为是相关的。如果不能确定最接近的种系，那么可将序列与亚型共有序列或具有高相似性百分数的鼠序列的共有序列相比较。稀有构架残基被认为可能是体细胞高度突变的结果，从而在结合中起着重要作用。

在本公开一些具体的实施方案中，所述的 CD38 人源化抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其常规变体的轻链恒定区。所述的 CD38 人源化抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其常规变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG1 重链恒定区，更优选包含增强 CDC 的功能氨基酸突变（如 E333A 突变）的 IgG1 重链恒定区。

本公开中所述人抗体重链恒定区和人抗体轻链恒定区的“常规变体”是指现有技术已公开的来源于人的不改变抗体可变区结构和功能的重链恒定区或轻链恒定区的变体，示例性变体包括对重链恒定区进行定点改造和氨基酸替换的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区变体，具体替换如现有技术已知的 YTE 突变，L234A 和/或 L235A 突变、S228P 突变、E333A 突变、和/或获得 knob-into-hole 结构的突变（使得抗体重链具有 knob-Fc 和 hole-Fc 组合）等，这些突变已被证实使得抗体具

有新的性能，但不改变抗体可变区的功能。

术语“回复突变”是指将人抗体来源的FR区氨基酸残基突变成原始来源抗体对应位置的氨基酸残基，通常是为了避人源化抗体引起的免疫原性下降和活性下降，对所述的人源化抗体可变区可进行最少反向突变，以保持抗体的活性。

5 “人抗体 (HuMAb)”、“人源抗体”、“全人抗体”、“完全人抗体”可以互换使用，可以是源于人的抗体或者是从一种转基因生物体中获得的抗体，该转基因生物体经“改造”以响应于抗原刺激而产生特异性人抗体，并且可以通过本领域已知的任何方法产生。在某些技术中，将人重链和轻链基因座的元件引入到源于胚胎干

10 细胞系的生物体的细胞株中，这些细胞系中的内源性重链和轻链基因座被靶向破坏。转基因生物可以合成对人抗原具有特异性的人抗体，并且该生物可以用于产生分泌人抗体的杂交瘤。人抗体还可以是一种抗体，其中重链和轻链是由源于一个或更多个人DNA来源的核苷酸序列编码的。完全人抗体还可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建，或者由体外活化的B细胞构建，所有的这些都是本领域已知的。

15 术语“全长抗体”、“完整抗体”、“完全抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用，指基本上完整形式的抗体，与下文定义的抗原结合片段相区分。该术语特别指在轻链和重链中包含恒定区的抗体。

在一些实施方案中，本公开的全长抗体包括由下表1所示的轻链可变区与轻链恒定区，重链可变区与重链恒定区连接后形成全长抗体。本领域技术人员可以根据实际需要选择不同的抗体来源的轻链恒定区、重链恒定区，例如人抗体来源的轻链恒定区（或其常规变体）和重链恒定区（或其常规变体）。同时，表1中轻链可变区和重链可变区的组合可以形成单链抗体（scFv）、Fab或其他包含scFv或Fab的抗原结合片段形式。

20

表 1：抗 CD38 人源化抗体轻链可变区和重链可变区的组合

可变区的组合	重链可变区 VH	轻链可变区 VL
h009-01V	h009 VH1	h009 VL1
h009-02V	h009 VH2	h009 VL1
h009-03V	h009 VH3	h009 VL1
h009-04V	h009 VH4	h009 VL1
h009-05V	h009 VH5	h009 VL1
h009-06V	h009 VH1	h009 VL2
h009-07V	h009 VH2	h009 VL2
h009-08V	h009 VH3	h009 VL2
h009-09V	h009 VH4	h009 VL2
h009-10V	h009 VH5	h009 VL2
h009-11V	h009 VH1	h009 VL3
h009-12V	h009 VH2	h009 VL3
h009-13V	h009 VH3	h009 VL3
h009-14V	h009 VH4	h009 VL3

h009-15V	h009 VH5	h009 VL3
h011-01V	h011 VH1	h011VL1
h011-02V	h011 VH2	h011VL2
h011-03V	h011 VH1	h011VL3
h011-04V	h011 VH2	h011VL1
h011-05V	h011 VH1	h011VL2
h011-06V	h011 VH2	h011VL3
h160-01V	h160 VH1	h160 VL1
h160-02V	h160 VH1	h160 VL2
h160-03V	h160 VH1	h160 VL3
h160-04V	h160 VH1	h160 VL4
h160-05V	h160 VH2	h160 VL1
h160-06V	h160 VH2	h160 VL2
h160-07V	h160 VH2	h160 VL3
h160-08V	h160 VH2	h160 VL4

注：例如“h009-01V”，其表示编号为 h009-01V 的轻/重链可变区对，其重链可变区为 h009VH1（SEQ ID NO：24），轻链可变区为 h009VL1（SEQ ID NO：25），其它依此类推。

- 5 术语“单克隆抗体”是指从基本上均质抗体的群体获得的抗体，即除可能的变体抗体（例如含有天然存在的突变或在制造单克隆抗体制剂的期间产生的突变，这些变体通常以少量存在）之外，构成所述群体的个别抗体相同和/或结合相同表位。与通常包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制备物不同，单克隆抗体制备物（制剂）的每个单克隆抗体是针对抗原上的单一决定簇的。因此，
- 10 修饰语“单克隆”指示如从基本上均质抗体群体获得的抗体的特性，且不应解释为需要通过任何特定方法来制造抗体。例如，根据本公开使用的单克隆抗体可通过各种技术制备，所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组 DNA 方法、噬菌体展示方法以及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法，此类方法以及用于制备单克隆抗体的其他示例性方法在本文中进行描述。
- 15 术语抗体的“抗原结合片段”或“功能片段”是指抗体的保持特异性结合抗原（例如，CD38）的能力的一个或多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来实现抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合片段”中包含的结合片段的实例包括(i) Fab 片段，由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')₂ 片段，通过铰链区上的二硫桥所连接的两个 Fab 片段形成的二价片段，(iii) 由抗体的单臂的 VH 和 VL 结构域组成的 Fv 片段；(iv) dsFv，由 VH 和 VL 经链间二硫键形成的稳定的抗原结合片段；和 (v) 包含 scFv、dsFv、Fab 等片段的双抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码，但可使用重组方法通过合成接头连接它们，从而产生单个蛋白质链，在其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子（称为单链 Fv(scFv)；参见，例如，
- 20

Bird 等人 (1988) Science 242:423-426; 和 Huston 等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。此类单链抗体也意欲包括在术语“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性能筛选片段。可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG（例如，IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型），IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM 抗体。在一些实施方案中，本公开的抗原结合片段包括 Fab、F(ab')₂、Fab'、单链抗体(scFv)、二聚化的 V 区（双抗体）、二硫键稳定化的 V 区（dsFv）等。

“Fab”是通过用蛋白酶木瓜蛋白酶（切割H链的224位的氨基酸残基）处理IgG抗体分子，在所获得的片段中具有约50,000的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段，其中H链N端侧的约一半和整个L链通过二硫键结合在一起。

本公开的Fab可以通过用木瓜蛋白酶处理本公开的单克隆抗体来生产。此外，可以通过将编码所述抗体的Fab的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达Fab来生产所述Fab。

“F(ab')₂”是指，通过胃蛋白酶消化IgG铰链区中两个二硫键的下游部分，而获得的分子量约100,000并具有抗原结合活性的抗体片段，其所包含的两个Fab区在铰链位置相连。

本公开的F(ab')₂可以通过用胃蛋白酶处理本公开的单克隆抗体来生产。此外，可以通过用硫醚键或二硫键连接下面描述的Fab'来生产所述F(ab')₂。

“Fab”是通过切割上述F(ab')₂的铰链区的二硫键而获得的分子量为约50,000并具有抗原结合活性的抗体片段。本公开的Fab'可以通过用还原剂例如二硫苏糖醇处理本公开的F(ab')₂来生产。此外，可以通过将编码抗体的Fab'片段的DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达Fab'来生产所述Fab'。

术语“单链抗体”、“单链 Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域（或区域；VH）和抗体轻链可变结构域（或区域；VL）的分子。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-VL-接头-VH-COOH 或 NH₂-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成，例如使用 1-4 个重复的变体（Holliger 等人（1993），Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448）。可用于本公开的其他接头由 Alfthan 等人（1995），Protein Eng. 8:725-731，Choi 等人（2001），Eur. J. Immuno 1.31:94-106，Hu 等人（1996），Cancer Res. 56:3055-3061，Kipriyanov 等人（1999），J. Mol. Biol. 293:41-56 和 Roovers 等人（2001），Cancer Immunol. 描述。

本公开的scFv可以通过以下步骤来生产：获得编码本公开单克隆抗体的VH和VL的cDNA，构建编码scFv的DNA，将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中，然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达scFv。

“双抗体”是其中scFv被二聚体化的抗体片段，是具有二价抗原结合活性的抗体片段。在二价抗原结合活性中，两个抗原可以是相同或不同的。

双特异性抗体和多特异性抗体是指能同时结合两个或多个抗原或抗原决定簇的抗体，其中包含能结合CD38的scFv或Fab片段。

5 本公开的双抗体可以通过以下步骤来生产：获得本公开的单克隆抗体的VH和VL的编码cDNA，构建编码scFv的DNA以使肽接头的氨基酸序列长度为8个残基或更少，将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中，然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达双抗体。

“dsFv”是通过将其中每个VH和VL中的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的多肽经由半胱氨酸残基之间的二硫键相连而获得的。可以按照已知方法（Protein Engineering, 7, 697（1994））基于抗体的三维结构预测来选择被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基。

本公开的dsFv可以通过以下步骤来生产：获得本公开的单克隆抗体的VH 和VL的编码cDNA，构建编码dsFv的DNA，将所述DNA插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中，然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达dsFv。

本文中使用的术语“框架（FR）”，是指抗体可变结构域 VL 或 VH 的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环（CDR）的支架。从本质上讲，框架区是不具有 CDR 的可变结构域。

20 术语“氨基酸差异”或“氨基酸突变”是指多肽与其变体之间，指相较于原蛋白质或多肽，变体蛋白质或多肽存在氨基酸的改变或突变，包括在原蛋白质或多肽的基础上发生 1 个、2 个、3 个或更多个氨基酸获替换、插入或缺失。

术语“互补决定区”、“CDR”或“高变区”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的 6 个高变区之一。通常，每个重链可变区中存在三个 CDR（HCDR1、HCDR2、HCDR3），每个轻链可变区中存在三个 CDR（LCDR1、LCDR2、LCDR3）。可以使用各种公知方案中的任何一种来确定 CDR 的氨基酸序列边界，包括“Kabat”编号规则（参见 Kabat 等（1991），“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD）、“Chothia”编号规则（参见 Al-Lazikani 等人，（1997）JMB 273: 927-948）和 ImMunoGenTics（IMGT）编号规则（Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132-136（1999）；Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77（2003）等。例如，对于经典格式，遵循 Kabat 规则，所述重链可变域（VH）中的 CDR 氨基酸残基编号为 31-35（HCDR1）、50-65（HCDR2）和 95-102（HCDR3）；轻链可变域（VL）中的 CDR 氨基酸残基编号为 24-34（LCDR1）、50-56（LCDR2）和 89-97（LCDR3）。遵循 Chothia 规则，VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32（HCDR1）、52-56（HCDR2）和 95-102（HCDR3）；并且 VL 中的氨基酸残基编号为 26-32（LCDR1）、50-52（LCDR2）

和 91-96 (LCDR3)。通过组合 Kabat 和 Chothia 两者的 CDR 定义, CDR 由人 VH 中的氨基酸残基 26-35 (HCDR1)、50-65 (HCDR2) 和 95-102 (HCDR3) 和人 VL 中的氨基酸残基 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2) 和 89-97 (LCDR3) 构成。遵循 IMGT 规则, VH 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 26-35 (CDR1)、51-57 (CDR2) 和 93-102 (CDR3), VL 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 27-32 (CDR1)、50-52 (CDR2) 和 89-97 (CDR3)。遵循 IMGT 规则, 抗体的 CDR 区可以使用程序 IMGT/DomainGap Align 确定。

术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位(例如, CD38 分子上的特定部位)。表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个连续或非连续的氨基酸。参见, 例如, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷, G.E.Morris, Ed. (1996)。

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常, 抗体以大约小于 10^{-8}M , 例如大约小于 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 或更小的亲和力 (KD) 结合。

术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常, 本公开的抗体以小于大约 10^{-7}M , 例如小于大约 10^{-8}M 、 10^{-9}M 或 10^{-10}M 或更小的解离平衡常数 (KD) 结合 CD38, 例如, 如使用表面等离子体共振 (SPR) 技术在 BIACORE 仪中测定的。

当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和性抗原结合蛋白或中和性抗体)的情况中, 意指在抗原结合蛋白之间的竞争, 其通过以下测定法来测定: 待检测的抗原结合蛋白(例如抗体或其功能片段)防止或抑制(例如降低)参考抗原结合蛋白(例如配体或参考抗体)与共同抗原(例如 CD38 抗原或其片段)的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争, 这些测定例如: 固相直接或间接放射免疫测定 (RIA)、固相直接或间接酶免疫测定 (EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahl 等, 1983, Methods in Enzymology 9: 242-253); 固相直接生物素-亲和素 EIA (参见例如 Kirkland 等, 1986, J.Immunol.137: 3614-3619; Cheung, 等, 1990, Virology 176: 546-552)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见例如 Harlow 和 Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual (抗体, 实验室手册), Cold Spring Harbor Press); 用 I-125 标记物的固相直接标记 RIA (参见例如 Morel 等, 1988, Molec.Immunol.25: 7-15); 和直接标记的 RIA (Moldenhauer 等, 1990, Scand.J.Immunol.32: 77-82)。通常所述测定法涉及使用纯化抗原, 其能与带有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白结合(所述抗原在固态表面或细胞表面上)。在待测抗原结合蛋白存在下, 测量结合于固态表面或细胞表面的标记的量, 来测量竞争性抑制。通常, 待测抗原结合蛋白是过量存在的。由竞争性测定(竞争性抗原结合蛋

白)鉴定的抗原结合蛋白包括:与参考抗原结合蛋白相同的表位发生结合的抗原结合蛋白;以及,与参考抗原结合蛋白结合的表位所充分接近的表位发生结合的抗原结合蛋白,所述两个表位在空间上互相妨碍结合的发生。在本公开实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争性抗原结合蛋白过量存在时,其将抑制(例如降低)至少 40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下,结合被抑制至少 80-85%、85-90%、90-95%、95-97%或更多。

本文中使用的术语“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链 DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

术语“载体”或“表达载体”是指能够运输与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中,载体是“质粒”,其是指可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。在另一个实施方案中,载体是病毒载体,其中可将另外的 DNA 区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组,从而随宿主基因组一起复制(例如,非附加型哺乳动物载体)。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法,如冷泉港的抗体实验技术指南,5-8 章和 15 章。例如,鼠可以用人 CD38 或其片段免疫,所得到的抗体能被复性、纯化,并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。同样可以用常规方法制备抗原结合片段。发明所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或多个个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件,从 ImMunoGeneTics (IMGT) 的网站 <http://imgt.cines.fr> 得到,或者从免疫球蛋白杂志,2001 ISBN 012441351 上获得。

术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括微生物(例如细菌)、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科(*enterobacteriaceae*)的成员,例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)或沙门氏菌(*Salmonella*)的菌株;芽孢杆菌科(*Bacillaceae*)例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);肺炎球菌(*Pneumococcus*);链球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血菌(*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括 CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)和 NS0 细胞。

本公开工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如,将编码重链和轻链的 cDNA 序列克隆并重组至 GS 表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种更推荐的现有技术,哺乳动物类表达系统

会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端位点。通过表达与人 CD38 特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如，用含调整过的缓冲液的 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 pH 梯度法洗脱结合的抗体，用 SDS-PAGE 检测抗体片段，收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物有时需立即冷冻，如-70℃，或者冻干。

“给予”、“施用”和“处理”当应用于动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”、“施用”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“给予”、“施用”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理细胞。“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂，例如包含本公开的任一种抗体或其抗原结合片段的组合物或编码抗体或其抗原结合片段的核酸分子，所述患者具有一种或多种疾病或症状，而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病或症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病或症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如患者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本公开的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页，（第 4 版））。另外，结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。示例性保守取代于下表 2“示例性氨基酸保守取代”中陈述。

表 2. 示例性氨基酸保守取代

原始残基	保守取代
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His; Asp
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala; Val
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

“有效量”或“有效剂量”是指得任一种或多种有益的或所需的结果所必需的药物、化合物或药物组合物的量。对于预防用途，有益的或所需的结果包括消除或降低风险、减轻严重性或延迟病症的发作，包括病症、其并发症和在病症的发展过程中呈现的中间病理表型的生物化学、组织学和/或行为症状。对于治疗应用，有益的或所需的结果包括临床结果，诸如减少各种本公开靶抗原相关病症的发病率或改善所述病症的一个或更多个症状，减少治疗病症所需的其它药剂的剂量，增强另一种药剂的疗效，和/或延缓患者的本公开靶抗原相关病症的进展。

“外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。

10 “内源性”指根据情况在生物、细胞或人体内产生的物质。

本公开所述的“突变序列”是指对本公开的核苷酸序列和氨基酸序列进行适当的替换、插入或缺失等突变修饰情况下，得到的与本公开的核苷酸序列和氨基酸序列具有不同百分比序列同一性程度的核苷酸序列和氨基酸序列。本公开中所述的序列同一性可以至少为85%、90%或95%，非限制性实施例包括85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%。

本文中“同源性”、“同一性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个DNA分子的每一个位置都被相同的碱基占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除

以比较的全部位置数×100 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个是匹配或同源的，那么两个序列为 60%同源；如果两个序列中的 100 个位置有 95 个匹配或同源，那么两个序列为 95%同源。通常，当比对两个序列时进行比较以给出最大百分比同源性。例如，可以通过 BLAST 算法执行比较，其中选择算法的参数以在各个参考序列的整个长度上给出各个序列之间的最大匹配。以下参考文献涉及经常用于序列分析的 BLAST 算法：BLAST 算法（BLAST ALGORITHMS）：Altschul， S.F.等人，（1990） J. Mol. Biol. 215:403-410； Gish， W.等人，（1993） Nature Genet. 3:266-272； Madden， T.L.等人，（1996） Meth. Enzymol. 266:131-141； Altschul， S.F.等人，（1997） Nucleic Acids Res. 25:3389-3402； Zhang， J.等人，（1997） Genome Res. 7:649-656。其他如 NCBI BLAST 提供的常规 BLAST 算法也为本领域技术人员所熟知。

本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括后代。因此，“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物，而不考虑转移数目。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下，其由上下文清楚可见。

本文使用的“聚合酶链式反应”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美国专利号 4,683,195 中所述扩增的程序或技术。一般来说，需要获得来自目标区域末端或之外的序列信息，使得可以设计寡核苷酸引物；这些引物在序列方面与待扩增模板的对应链相同或相似。2 个引物的 5' 末端核苷酸可以与待扩增材料的末端一致。PCR 可用于扩增特定的 RNA 序列、来自总基因组的特定 DNA 序列和由总细胞 RNA 转录的 cDNA、噬菌体或质粒序列等。一般参见 Mullis 等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich 编辑,(1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被视为用于扩增核酸测试样品的核酸聚合酶反应法的一个实例，但不是唯一的实例，所述方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶，以扩增或产生核酸的特定部分。

“分离的”指纯化状态，并且在这种情况下意味着在指定的分子基本上不含其他生物分子，例如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物或其他材料，例如细胞碎片和生长培养基。通常，术语“分离的”并不意图指完全不存在这些材料或不存在水、缓冲液或盐，除非它们以显著干扰如本文所述的化合物的实验或治疗用途的量存在。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如，“任选包含 1-3 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述抗体或其抗原结合片段与其他化学组分的混合物，所述其他组分例如生理学/可药用的载体或赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

术语“药学上可接受的载体”指适合用于制剂中用于递送抗体或抗原结合片段的任何无活性物质。载体可以是抗粘附剂、粘合剂、包衣、崩解剂、充填剂或稀释剂、防腐剂（如抗氧化剂、抗菌剂或抗真菌剂）、增甜剂、吸收延迟剂、润湿剂、乳化剂、缓冲剂等。合适的药学上可接受的载体的示例包括水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）右旋糖、植物油（例如橄榄油）、盐水、缓冲液、缓冲的盐水和等渗剂例如糖、多元醇、山梨糖醇和氯化钠。

“CD38 阳性疾病或病症”是存在表达 CD38 的细胞的疾病或病症。非限制性地，例如由表达 CD38 的 B 细胞、浆细胞、单核细胞和 T 细胞参与的免疫性疾病，疾病的特征之一为存在表达 CD38 的肿瘤细胞的肿瘤疾病，例如表达 CD38 的白血病、B 细胞淋巴瘤、浆细胞恶性肿瘤、T/NK 细胞淋巴瘤和骨髓瘤。本公开在一些实施方案中，所述白血病选自：急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性和慢性骨髓型白血病。在一些实施方案中，所述骨髓瘤选自：多发性骨髓瘤、前髓细胞肿瘤和轻链淀粉样变性。在一些实施方案中，所述淋巴瘤为非何杰金淋巴瘤或何杰金淋巴瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤可选自 B 细胞淋巴瘤/白血病，包括但不限于：前体 B 细胞成淋巴细胞白血病/淋巴瘤、B 细胞非霍奇金淋巴瘤或 B 细胞霍奇金淋巴瘤、成熟 B 细胞肿瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤选自：B 细胞慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、小淋巴细胞性白血病（SLL）、B 细胞急性淋巴细胞性白血病、B 细胞前淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞样淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、滤泡性淋巴瘤（包括低级、中级或高级 FL）、皮肤滤泡中心淋巴瘤、边缘区 B 细胞淋巴瘤（包括 MALT 型、淋巴结 MZBL 型、脾 MZBL 型）、毛细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤（Burkitt 淋巴瘤）、浆细胞瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞白血病、移植后淋巴增生性疾病、Waldenstrom 巨球蛋白血症、浆细胞白血病和间变性大细胞淋巴瘤（ALCL）、多毛细胞淋巴瘤。在一些实施方案中，所述肿瘤为多发性骨髓瘤。在一些实施方案中，所述免疫性疾病选自：类风湿性关节炎、牛皮癣、强直性脊柱炎、关节银屑病、皮炎、系统性硬皮病及硬化症、炎症性肠病（IBD）、Crohn 病（克罗恩氏病）、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、胃炎、脑炎、葡萄膜炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉硬化、白细胞粘附缺陷病、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合物性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症状（如急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少性紫癜）、溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、风湿性关节炎（RA）、异位性皮炎、天疱疮、Graves 病、桥本氏甲状腺炎、Wegener 肉芽肿、Omenn 症候群、慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多征、多发性硬化症、HIV 和疱疹病毒相关的疾病、严重急性呼吸综合征、脉络视网膜炎（choreoretinitis）、移植物对抗宿主疾病、以及病毒感染引起的免疫性疾病（如伊波病毒（EBV）感染 B 细胞引起或介导的疾病）。在一些

实施方案中，所述免疫性疾病选自类风湿性关节炎、系统性红斑性狼疮、哮喘、炎症性肠道疾病、多发性硬化、克罗恩氏病、胃炎、桥本氏甲状腺炎、强直性脊柱炎和移植物对抗宿主疾病。在一些实施方案中，其中所述免疫疾病是类风湿性关节炎。

5 此外，本公开提供用于治疗或预防与目标抗原（例如 CD38）阳性细胞相关疾病的药剂，所述药剂包含本公开的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段作为活性成分，可以对有需要的对象给予治疗有效量或预防有效量的该药剂，以治疗或预防 CD38 阳性疾病。抗 CD38 抗体或其抗原结合片段可抑制 CD38 诱导的与疾病相关的活性或消除或降低 CD38 表达细胞的数目。所述治疗或预防有效量为单位剂量的组合物
10 中含有 0.1-3000mg（优选为 0.1-2000mg，更优选为 1-1000mg）的如前所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段。

另外，本公开涉及用于免疫检测或测定目标抗原（例如 CD38）的方法、用于免疫检测或测定目标抗原（例如 CD38）的试剂、用于免疫检测或测定表达目标抗原（例如 CD38）的细胞的方法和用于诊断与目标抗原（例如 CD38）阳性细胞相关的疾病的诊断剂，其包含本公开的特异性识别目标抗原（例如人 CD38）结合的
15 抗体或抗体片段作为活性成分。

在本公开中，用于检测或测定目标抗原（例如 CD38）的量的方法可以是任何已知方法。例如，它包括免疫检测或测定方法。

免疫检测或测定方法是使标记的抗原或抗体检测或测定抗体量或抗原量的方法。
20 免疫检测或测定方法的实例包括放射性物质标记的免疫抗体方法（RIA）、酶免疫测定法（EIA 或 ELISA）、荧光免疫测定法（FIA）、发光免疫测定法、蛋白质免疫印迹法、物理化学方法等。

上述与 CD38 阳性细胞相关的疾病可以通过用本公开的抗体或抗体片段检测或测定表达 CD38 的细胞来诊断。

25 为了检测表达多肽的细胞，可以使用已知的免疫检测方法，并优选使用免疫沉淀法、荧光细胞染色法、免疫组织染色法等。此外，可以使用利用 FMAT8100HTS 系统（Applied Biosystem）的荧光抗体染色法等。

在本公开中，对用于检测或测定目标抗原（例如 CD38）的样品没有特别限制，只要它具有包含表达目标抗原（例如 CD38）的细胞的可能性即可，例如组织细胞、
30 血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液或培养液。

根据所需的诊断方法，含有本公开的单克隆抗体或其抗体片段的诊断剂还可以含有用于执行抗原-抗体反应的试剂或用于检测反应的试剂。用于执行抗原-抗体反应的试剂包括缓冲剂、盐等。用于检测的试剂包括通常用于免疫检测或测定方法的试剂，例如识别所述单克隆抗体、其抗体片段或其结合物的标记的第二抗体
35 和与所述标记对应的底物等。

在以上说明书中提出了本公开一种或多种实施方案的细节。虽然可使用与本

文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本公开，但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书，本公开的其他特点、目的和优点将是显而易见的。

在说明书和权利要求书中，除非上下文中有清楚的另外指明，单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本公开所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本公开的优选实施方案。这些实施例不应以任何方式理解为限制本公开的范围，本公开的范围由权利要求书限定。

10

实施例与测试例

以下结合实施例与测试例进一步描述本公开，但这些实施例并非限制着本公开的范围。本公开实施例与测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

15

实施例 1. CD38 抗原的制备

以UniProt ADP-核糖环化酶/环ADP-核糖水解酶1（人CD38蛋白，Uniprot号：P28907）作为CD38的模板，设计本公开使用的抗原及检测用蛋白的氨基酸序列，可选地，在CD38蛋白基础上融合不同的标签如His标签或Fc等。分别克隆到pTT5载体上（Biovector，Cat#: 102762）或pTargeT载体上（Promega, A1410），在293细胞瞬时表达或在CHO-S细胞中稳定表达，纯化，获得本公开抗原及检测用蛋白。

20

CD38胞外域与小鼠IgG2a-Fc融合蛋白：CD38-ECD-mFc，作为免疫原；

VPRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFIS
 25 KHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTL
 LGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVWKTVSRRFAEAAAC
 DVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSRDLC
 QDPTIKELESII SKRNIQF SCKNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEIEPRGPTIKPCPP
CKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNN
 30 VEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER
TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKT
ELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK
SFSRTPGK（SEQ ID NO: 1）

30

注释：划线部分为小鼠 IgG2a-Fc 部分；

35

CD38 胞外域与人 IgG1Fc 融合蛋白：CD38-ECD-Fc，作为免疫原；

- VPRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFIS
 KHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTL
 LGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVWKTVSRRFAEAAC
 DVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSRDLC
 5 QDPTIKELESIIISKRNIFQFCKNIYRDPDKFLQCVKNPEDSSCTSEIEPKSSDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
 10 SLSPGK (SEQ ID NO: 2)
 注释: 划线部分为人 IgG1-Fc 部分;

- 带 His 标签的 CD38 胞外域融合蛋白: CD38-ECD-His, 作为免疫原或检测试剂:
 VPRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFIS
 15 KHPCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTL
 LGYLADDLTWCGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSFVWKTVSRRFAEAAC
 DVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSVEVHNLQPEKVQTLAWVIHGGREDSRDLC
 QDPTIKELESIIISKRNIFQFCKNIYRDPDKFLQCVKNPEDSSCTSEIHHHHHHH (SEQ
 ID NO: 57)
 20 注释: 划线部分为 6×His 标签;

实施例 2. CD38 相关重组蛋白的纯化

1. 带 His 标签的重组蛋白的纯化步骤:

- 将细胞表达上清样品高速离心去除杂质, 并将缓冲液置换为 PBS, 加入咪唑
 25 至终浓度为 5mM。用含有 5mM 咪唑的 PBS 溶液平衡镍柱, 冲洗 2-5 倍柱体积。
 将置换后的细胞上清样品上 Ni Sepharose excel 柱 (GE, 17-3712-02)。用含有 5mM
 咪唑的 PBS 溶液冲洗柱子, 至 A280 读数降至基线。后用 PBS+10mM 咪唑冲洗层
 析柱, 除去非特异结合的杂蛋白, 并收集流出液。再用含有 300mM 咪唑的 PBS
 溶液洗脱目的蛋白, 并收集洗脱峰。收集的洗脱液浓缩后用凝胶层析 Superdex200
 30 (GE, 28-9893-35) 进一步纯化, 流动相为 PBS。去除聚体峰, 收集洗脱峰。所
 得到的蛋白经电泳、肽图、LC-MS 鉴定为正确后分装备用。得到带 His 标签的
 CD38-ECD-His (SEQ ID NO: 57), 用作制备本公开抗体的免疫原或检测试剂。
 CD38-ECD-His 也可以通过体外化学法与 KLH 进行偶联反应后作为免疫原刺激小
 鼠免疫。

- 35 2. CD38-ECD-Fc 融合蛋白的纯化步骤:

将细胞表达上清样品高速离心去除杂质, 上清进行 MabSelect Sure (GE,

- 17-5438-01) 亲和层析。MabSelect Sure层析柱先用0.1M NaOH再生, 利用纯水冲洗后用PBS平衡柱子, 将上清结合后, 利用PBS进行洗涤至A280读数降至基线。用0.1M醋酸缓冲液在pH3.5条件下洗脱目的蛋白, 用1MTris-HCl中和。洗脱样品适当浓缩后利用PBS平衡好的凝胶层析Superdex200 (GE, 28-9893-35) 进一步纯化,
- 5 合并收集目的蛋白所在接收管浓缩至适当浓度。此方法用来纯化CD38-ECD-Fc (SEQ ID NO: 2) 融合蛋白, 该方法也可以用来纯化本公开中涉及的人源化抗体蛋白。

实施例 3. 抗人 CD38 杂交瘤单克隆抗体的获得和制备

10 1. 免疫

抗人 CD38 单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用 SJL 白小鼠, 雌性, 4-6 周龄 (北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2012-0001)。

- 饲养环境: SPF 级。小鼠购进后, 实验室环境饲养 1 周, 12/12 小时光/暗周期,
- 15 温度 20-25℃; 湿度 40-60%。将已适应环境的小鼠按不同方案免疫, 每组 3-5 只。

- 免疫抗原可以是 CD38-ECD-His、CD38-ECD-Fc、CD38-FL-CHOS (转染人 CD38 全长的 CHOS 细胞) 等, 可以使用单独一种试剂配合不同的免疫佐剂或者不同类型免疫原交叉免疫。免疫部位可以是腹腔或者背部皮下, 或者两种位置交替免疫。示例性免疫方法如用 Titermax (sigma Lot Num: T2684) 或明矾 (Thremo
- 20 Lot Num: 77161) 免疫。抗原与佐剂 (titermax) 比例为 1:1, 抗原与佐剂 (明矾) 比例为 4:1, 25-50μg 或 1×10^7 cells/只 (首次免疫), 25-50μg 或 1×10^7 cells/只 (加强免疫)。第 0 天腹膜内 (IP) 注射或皮下 (SC) 注射抗原, 首免后每两周重复免疫一次。每三周取血, 用 ELISA 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。在第 8-12 次免疫以后, 选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行
- 25 脾细胞融合前 3 天加强免疫, 腹膜内 (IP) 注射 25-50μg 或 1×10^7 cells/只的生理盐水配制的抗原溶液。

2. 细胞融合

- 选择血清中的抗体滴度高 (见测试例 1, 结合 CD38 的 ELISA 方法) 并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合, 融合前 3 天冲刺免疫所选小鼠。采用优化的
- 30 PEG 介导的融合步骤将脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞 Sp2/0 细胞 (ATCC® CRL-8287™) 进行融合得到杂交瘤细胞。融合好的杂交瘤细胞用 HAT 完全培养基 (含 20%FBS、 $1 \times$ HAT 和 $1 \times$ OPI 的 RPMI-1640 培养基) 重悬, 分装于 96 孔细胞培养板中 (1×10^5 细胞/150μl/孔), 37℃, 5%CO₂ 孵育。融合后的第 5 天加入 HAT 完全培养基, 50μl/孔, 37℃, 5%CO₂ 孵育。融合后第 7 天至 8 天, 根据细胞生长密度, 全换液, 培养基为 HT 完全培养基 (含 20%FBS、 $1 \times$ HT 和 $1 \times$ OPI 的 RPMI-1640 培养基), 200μl/
- 35 孔, 37℃, 5%CO₂ 孵育。

3. 杂交瘤细胞筛选

融合后第 10-11 天, 根据细胞生长密度, 进行结合 CD38 的 ELISA 方法检测 (见测试例 1)。并将 ELISA 检测阳性孔的细胞上清进行结合 CD38-FL-CHO-S 的 FACS 方法检测 (见测试例 2), 阳性孔换液, 并根据细胞密度及时扩大至 24 孔板中。移入 24 孔板的细胞株经过复测后进行保种和第一次亚克隆。第一次亚克隆筛选 (见测试例 1、2) 为阳性的进行保种, 并进行第二次亚克隆。第二次亚克隆为阳性 (见测试例 1、2) 的进行保种和蛋白表达。多次融合获得具有高 CD38 亲和力的杂交瘤细胞。

通过阻断实验和结合实验筛选得到杂交瘤克隆 m009、m011 和 m160, 用无血清细胞培养法进一步制备抗体, 按纯化实例纯化抗体, 供在检测例中使用。

其中测得杂交瘤克隆 009 的鼠源抗体可变区序列如下:

> m009 VH: m009 重链可变区序列

*EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTFDYNLNWVKQSNGKSLEWIGVINPKYD
AINYNQKF~~KDKATLTVDQSSSTAYMQLSSLTSEDS~~AVYYCAREGWGKALDYWGPGT
SVIVSS*

SEQ ID NO: 3

>m009 mVL: m009 轻链可变区序列

*DFVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSIYTNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIP
SRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDSGMYFCQQSNSWPLTFGAGTKLELK*

SEQ ID NO: 4

注: 上述序列中下划线为根据 Kabat 编号规则确定的 CDR 序列, 斜体为 FR 序列, 顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

杂交瘤克隆 m011 的鼠源抗体可变区序列如下:

>m011 VH: m011 重链可变区序列

*EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS~~DYGMHWVRQAPEKGLEWVAFISSGSS~~
SIYYADTVKGRFTISRDN~~AKNTLFLQMTSLRSEDTAM~~YSCARNYVSSYGYFDYWG
QGTTLTVSS*

SEQ ID NO: 5

>m011 VL: m011 轻链可变区序列

*DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASENVDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASN
LES~~GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETDDVATYYC~~QQSNKDPLTFGSGTKLEIK*

SEQ ID NO: 6

注: 上述序列中下划线为根据 Kabat 编号规则确定的 CDR 序列, 斜体为 FR 序列, 顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

杂交瘤克隆 m160 的鼠源抗体可变区序列如下：

>m160 VH： m160 重链可变区序列

*EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCVASGFTFS*DYGMHWVRQAPEKGLEWIAFISTGSS
NIYYVDKVKGRFTISRDNAKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARNYVSSYGYFDYWG
5 *QGTTLTVSS*

SEQ ID NO： 7

>m160 VL： m160 轻链可变区序列

DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSCRASESVDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASN
*LES*GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETDDVATYYCQQTNKDPLTFGGGTKLELK

10 SEQ ID NO： 8

注：上述序列中下划线为根据 Kabat 编号规则确定的 CDR 序列，斜体为 FR 序列，
顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

各重链及轻链 CDR 区序列如表 3 所示：

表 3. 重链、轻链 CDR 区序列

抗体	重链		轻链	
m009	HCDR1	DYNLN SEQ ID NO： 9	LCDR1	RASQSIYTNLH SEQ ID NO： 12
	HCDR2	VINPKYDAINYNQKFKD SEQ ID NO： 10	LCDR2	YASQSIG SEQ ID NO： 13
	HCDR3	EGWGKALDY SEQ ID NO： 11	LCDR3	QQSNWPLT SEQ ID NO： 14
m011	HCDR1	DYGMH SEQ ID NO： 15	LCDR1	RASENVVDNYGISFMH SEQ ID NO： 18
	HCDR2	FISSGSSSIYYADTVKG SEQ ID NO： 16	LCDR2	RASNLES SEQ ID NO： 19
	HCDR3	NYVSSYGYFDY SEQ ID NO： 17	LCDR3	QQSNKDPLT SEQ ID NO： 20
m160	HCDR1	DYGMH SEQ ID NO： 15	LCDR1	RASESVDNYGISFMH SEQ ID NO： 22
	HCDR2	FISTGSSNIYYVDKVKG SEQ ID NO： 21	LCDR2	RASNLES SEQ ID NO： 19
	HCDR3	NYVSSYGYFDY SEQ ID NO： 17	LCDR3	QQTNKDPLT SEQ ID NO： 23

15

4. 人 IgG1 嵌合抗体制备

杂交瘤筛选所获得的候选分子经过扩增测序可得到可变区编码基因序列。以
测序所得序列设计首尾引物，以测序基因为模板，经过 PCR 搭建各抗体的 VH/VK
基因片段，再与表达载体 pHr(带信号肽及 hIgG1/hkappa 恒定区基因(CH1-Fc/CL)

20 片段)进行同源重组，构建重组嵌合抗体全长表达质粒 VH-CH1-Fc-pHr/VL-CL-pHr，
形成杂交瘤克隆 m009、m011 和 m160 的嵌合抗体 ch-009、ch-011 和 ch-160。

实施例 4. 抗 CD38 杂交瘤单克隆抗体的人源化

通过比对 IMGT 人类抗体重和轻链可变区种系基因数据库和 MOE 软件分析，分别挑选与 m009、m011 和 m160 同源性高的重/轻链可变区种系基因作为模板。将这三个鼠源抗体的 CDR 分别移植到相应的人源模板中，形成次序为

5 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的人源化抗体可变区序列。

人源 FR 区的选择和 FR 区氨基酸的回复突变：在所获得的鼠源抗体 VH/VL CDR 典型结构的基础上，从人源种系数据库中搜索轻链可变区（VL）和重链可变区（VH）的同源序列，按 FR 的同源性由高到低排序，选取 FR 同源性最高的种系作为主要模板；将鼠源抗体的 CDR 区移植到人源模板上；进一步地，以鼠源抗体的
10 的三维结构为基础，通过软件对包埋残基、与 CDR 区有直接相互作用的残基，以及对 VL 和 VH 的构象有重要影响的残基进行回复突变；并对化学不稳定氨基酸残基优化，得到最终的人源化分子。

1. 杂交瘤克隆 m009 人源化构架选择

鼠源抗体 m009 的人源化轻链模板为 IGKV3-11*01 和 hJK4.1，人源化重链模板为 IGHV1-3*01 和 hJH4.1，将 m009 的 CDR 移植到人源模板上，获得人源化可
15 变区序列如下：

> h009VH-CDR 移植
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNLNWVRQAPGQRLEWMGVINPKY
DAINYNQKF~~KDRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGWGKALDYWGQG~~
20 *TLVTVSS*

SEQ ID NO: 24

> h009VL-CDR 移植
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIYTNLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQ~~SISGIP~~
ARFSGSGSGTDFTLT~~ISSLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGGG~~TKVEIK

SEQ ID NO: 25

注：序列中下划线为根据 Kabat 编号规则确定的 CDR 序列，斜体为 FR 序列，顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

2. 杂交瘤克隆 m009 人源化回复突变设计，见表 4：

表 4. 杂交瘤克隆 m009 的人源化回复突变

VL	VH
----	----

h009 VL1	移植	h009 VH1	移植
h009 VL2	A43S, Y49K	h009 VH2	V2F, R44S, R71V
h009 VL3	I2F, A43S, Y49K, Y87F	h009 VH3	V2F, R44S, M48I, V67A, R71V
		h009 VH4	V2F, R38K, R44S, R66K, I69L, R71V, T73Q
		h009 VH5	V2F, R38K, R44S, M48I, V67A, R66K, I69L, R71V, T73Q

注：移植代表鼠源抗体 CDR 植入人种系 FR 区；“A43S”表示在移植基础上，将第 43 位（依照 Kabat 编号系统编号）的 A 回复突变为 S，其它以此类推。

杂交瘤克隆 m009 的人源化抗体可变区序列如下：

5 > h009 VH1 (SEQ ID NO: 24)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNLNWVRQAPGQRLEWMG
VINPKYDAINYNQKFKDRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED⁵TAVYYCAREGW
GKALDYWGQGTLVTVSS

> h009 VH2 (SEQ ID NO: 26)

10 EFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNLNWVRQAPGQ⁵SLEWMGV
INPKYDAINYNQKFKDRVTIT⁵VDTSASTAYMELSSLRSED⁵TAVYYCAREGWG
KALDYWGQGTLVTVSS

> h009 VH3 (SEQ ID NO: 27)

15 EFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNLNWVRQAPGQ⁵SLEWIGVI
NPKYDAINYNQKFKDR⁵ATIT⁵VDTSASTAYMELSSLRSED⁵TAVYYCAREGWG
KALDYWGQGTLVTVSS

> h009 VH4 (SEQ ID NO: 28)

20 EFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNLNWVKQAPGQ⁵SLEWMGV
INPKYDAINYNQKFKDKVTLTV⁵DQSASTAYMELSSLRSED⁵TAVYYCAREGW
GKALDYWGQGTLVTVSS

> h009 VH5 (SEQ ID NO: 29)

EFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNLNWVKQAPGQ⁵SLEWIGVI
NPKYDAINYNQKFKDKATLTVDQSASTAYMELSSLRSED⁵TAVYYCAREGWG
KALDYWGQGTLVTVSS

25 > h009 VL1 (SEQ ID NO: 25)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIYTNLHWYQQKPGQAPRLLIYYASQS
ISGIPARFSGSGSGTDFTLT⁵ISSLEPEDFAVYYCQ⁵QNSWPLTFGGG⁵TKVEIK

> h009 VL2 (SEQ ID NO: 30)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIYTNLHWYQQKPGQSPRLLIKYASQS
ISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGGGTKVEIK
> h009 VL3 (SEQ ID NO: 31)

EFVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIYTNLHWYQQKPGQSPRLLIKYASQS
5 ISGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYFCQQSNSWPLTFGGGTKVEIK

将上述人源化轻链可变区和重链可变区分别与入种系轻链恒定区（例如人 κ 、 λ 链轻链恒定区）和重链恒定区（例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区）组合形成人源化抗体的重链和轻链，进而获得完整的人源化抗体（h009）。示例性的，上述 h009 抗体的重链可变区和轻链可变区分别与如 SEQ ID NO: 43 所示的人 IgG1 重链恒定区和序列如 SEQ ID NO: 45 所示的人 kappa 轻链恒定区组合，获得全长人源化抗体（h009-01 至 h009-15），可变区序列如表 5 所示：

表 5. h009 人源化抗体的重链可变区和轻链可变序列

可变区	h009 VL1	h009 VL2	h009 VL3
h009 VH1	h009-01	h009-06	h009-11
h009 VH2	h009-02	h009-07	h009-12
h009 VH3	h009-03	h009-08	h009-13
h009 VH4	h009-04	h009-09	h009-14
h009 VH5	h009-05	h009-10	h009-15

注：表中例如“h009-07”，其表示编号为 h009-07 的人源化抗体的重链可变区为的 h009 VH2、轻链可变区为的 h009VL2，其它抗体以此类推。

3. 杂交瘤克隆 m011 人源化构架选择

鼠源抗体 m011 的人源化轻链模板为 IGKV4-1*01 和 hJK4.1，人源化重链模板为 IGHV3-7*01 和 hJH6.1，为了消除潜在的热点（hot spot），在入种系 IGHV3-7*01 和 hJH6.1 的 FR 区引入 N 82A T（依照 Kabat 编号系统，将第 82A 位氨基酸由天冬酰胺（缩写：N 或 Asn）突变为苏氨酸（缩写：T 或 Thr））突变；和 N76S（依照 Kabat 编号系统编号，将第 76 位氨基酸由天冬酰胺（缩写：N 或 Asn）突变为苏氨酸（缩写：S 或 Ser））突变，将 m011 的 CDR 移植到人源模板上，获得人源化可变区序列如下：

> h011VH-CDR 移植

25 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISSGSS
SIYYADTVKGRFTISRDNKSSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARNYVSSYGYFDYWGQ
GTTVTVSS

SEQ ID NO: 32

> h011VL-CDR 移植

30 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASENVVDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRAS

NLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSNKDPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 33

注：序列中下划线为根据 Kabat 编号规则确定的 CDR 序列，斜体为 FR 序列，顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

5

4. 杂交瘤克隆 m011 回复突变设计，见下表 6：

表 6. 杂交瘤克隆 m011 人源化回复突变

VL		VH	
h011 VL1	移植	h011 VH1	移植, N <u>82A</u> T, N76S
h011 VL2	G68R	h011 VH2	Y79F, N <u>82A</u> T, Y91S, N76S
h011 VL3	V58I, G68R, V85T		

注：移植代表鼠源抗体 CDR 植入人种系 FR 区序列，G68R 表示在移植基础上将第 68 位（依照 Kabat 编号系统编号）的 G 回复突变为 R，其它以此类推。

10 h011 人源化抗体可变区具体序列如下：

> h011 VH1 (SEQ ID NO: 32)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEW
VAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNKSSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARNY
VSSYGYFDYWGQGTTVTVSS

15 > h011 VH2 (SEQ ID NO: 34)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEW
VAFISSGSSSIYYADTVKGRFTISRDNKSSFLQMTSLRAEDTAVYSCARNY
VSSYGYFDYWGQGTTVTVSS

> h011 VL1 (SEQ ID NO: 33)

20 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASENVDNYGISFMHWYQQKPGQPPK
LLIYRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSNKDPLTF
GGGTKVEIK

> h011 VL2 (SEQ ID NO: 35)

25 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASENVDNYGISFMHWYQQKPGQPPK
LLIYRASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQSNKDPLTF
GGGTKVEIK

> h011 VL3 (SEQ ID NO: 36)

30 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASENVDNYGISFMHWYQQKPGQPPK
LLIYRASNLESGIPDRFSGSGSRTDFTLTISLQAEDVATYYCQQSNKDPLTFG
GGGTKVEIK

将上述人源化轻链可变区和重链可变区分别与人种系轻链恒定区（例如人 κ、

- λ 链轻链恒定区)和重恒定区(例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区)组合形成人源化抗体的重链和轻链,进而获得完整的 m011 的人源化抗体(h011)。示例性的,上述 h011 抗体的重链可变区和轻链可变区分别与序列如 SEQ ID NO:43 所示的人 IgG1 重链恒定区和序列如 SEQ ID NO:45 所示的人 kappa 轻链恒定区组合,获得全长人源化抗体(h011-01 至 h011-06),其可变区序列如表 7 所示:

表 7. h0011 人源化抗体的重轻链可变区相互组合表

	h011VL1	h011VL2	h011 VL3
h011 VH1	h011-01	h011-03	h011-05
h011 VH2	h011-02	h011-04	h011-06

注: 表中例如“h011-04”,其表示编号为 h011-04 的人源化抗体的重链可变区为的 h011 VH2、轻链可变区为的 h011VL2,其它抗体以此类推。

10

5. 杂交瘤克隆 m160 人源化构架选择

- 鼠源抗体 m160 的人源化轻链模板为 IGKV4-1*01 和 hJK4.1 人源化重链模板为 IGHV3-7*01 和 hJH6.1,为了消除人种系 FR 区潜在的热点(hot spot),在人种系 IGHV3-7*01 和 hJH6.1 的 FR 区引入 S77T 突变(依照 Kabat 编号系统编号,将第 77 位氨基酸由苏氨酸(缩写: S 或 Ser)突变为苏氨酸(缩写: T 或 Thr))、N 82A T 突变(依照 Kabat 编号系统编号,将第 82A 位氨基酸由天冬酰胺(缩写: N 或 Asn)突变为苏氨酸(缩写: T 或 Thr)),将 m160 的 CDR 移植到人源模板上,获得的人源化可变区序列如下:

- > h160VH-CDR 移植
- EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISTGSS
 NIYYVDKVKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRAEDTAVYYCARNYVSSYGYFDYWG
 QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 37

- > h160VL-CDR 移植
- DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESVDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASN
 LESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTNKDPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 38

注: 序列中下划线为根据 Kabat 编号规则确定的 CDR 序列,斜体为 FR 序列,顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

6. 杂交瘤克隆 m160 的人源化回复突变设计,见下表 8:

表 8. 杂交瘤克隆 m160 人源化回复突变

VL	VH
----	----

h160 VL1	移植, D9A	h160 VH1	移植, S77T, N <u>82A</u> T
h160 VL2	M4L, D9A	h160 VH2	V48I, S77T, N <u>82A</u> T
h160 VL3	M4L, D9A, D60A, G68R		
h160 VL4	M4L, D9A, N22S, V58I, D60A, G68R		

注：移植代表鼠抗体 CDR 植入人种系 FR 区序列，“M4L”表示在移植基础上将第 4 位（依照 Kabat 编号系统编号）的 M 回复突变为 L，其它以此类推。

h160 人源化抗体可变区具体序列如下：

> h160 VH1 (SEQ ID NO: 37)

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEW
VAFISTGSSNIYYVDKVKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRAEDTAVYYCARN
YVSSYGYFDYWGGTQTTVTVSS

> h160 VH2 (SEQ ID NO: 39)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEW
10 AFISTGSSNIYYVDKVKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRAEDTAVYYCARNY
VSSYGYFDYWGGTQTTVTVSS

> h160 VL1 (SEQ ID NO: 38)

DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESDNYGISFMHWYQQKPGQPPK
LLIYRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTNKDPLTF
15 GGGTKVEIK

> h160 VL2 (SEQ ID NO: 40)

DIVLTQSPASLAVSLGERATINCRASESDNYGISFMHWYQQKPGQPPKL
LIYRASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTNKDPLTFG
GGTKVEIK

20 > h160 VL3 (SEQ ID NO: 41)

DIVLTQSPASLAVSLGERATINCRASESDNYGISFMHWYQQKPGQPPKL
LIYRASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTNKDPLTFG
GGTKVEIK

> h160 VL4 (SEQ ID NO: 42)

25 DIVLTQSPASLAVSLGERATISCRASESDNYGISFMHWYQQKPGQPPKL
LIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTNKDPLTFGG
GTKVEIK

将上述人源化轻链可变区和重链可变区分别与人种系轻链恒定区（例如人 κ 、 λ 链轻链恒定区）和重恒定区（例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区）组合形成人源化抗体的重链和轻链，进而获得完整的 m160 的人源化抗体（h160）。示例性的，上述 h160 抗体的重链可变区和轻链可变区分别与序列如

SEQ ID NO: 43 所示的人 IgG1 重链恒定区和序列如 SEQ ID NO: 45 所示的人 kappa 轻链恒定区组合, 获得全长人源化抗体 (h160-01 至 h160-08), 其可变区序列如表 9 所示:

表 9. h016 人源化抗体的重链可变区和轻链可变区

	h160 VL1	h160 VL2	h160 VL3	h160 VL4
h160 VH1	h160-01	h160-02	h160-03	h160-04
h160 VH2	h160-05	h160-06	h160-07	h160-08

- 5 注: 表中例如“h160-07”, 其表示编号为 h160-07 的人源化抗体的重链可变区为的 h160 VH2、轻链可变区为的 h160 VL3, 其它抗体以此类推。

实施例 5. 构建和表达抗人 CD38 人源化抗体 IgG1 或 IgG1-E333A 的形式

- 设计引物 PCR 搭建各人源化抗体 VH/VK 基因片段, 再与表达载体 pHr (带信号肽及恒定区基因 (CH1-FC/CL) 片段, 实验室构建) 进行同源重组, 构建抗体全长表达载体 VH-CH1-FC-pHr/VK-CL-pHr。人源化抗体的轻链恒定区可选自人 κ 、 λ 链轻链恒定区, 重链恒定区可选自人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 或其变体的重链恒定区, 非限制性实施包括对人 IgG1、IgG2、IgG4 的恒定区进行优化设计, 改善抗体功能, 例如通过 IgG1 进行 E333A 点突变获得 IgG1-E333A 恒定区, 该突变可以增强 IgG1-Fc 与 C1q 的结合能力, 进一步增强抗体 CDC 的功能 (参见 US6528624)。以下具体轻/重链恒定区并非作为本公开抗体恒定区的限制, 也可选用本领域其它已知的抗体轻/重链恒定区及其突变体。

示例性的重轻链恒定区如下所示:

IgG1 重链恒定区:

- 20 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
25 NNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

SEQ ID NO: 43

IgG1-E333A 重链恒定区:

- 30 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
AKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP

ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

SEQ ID NO: 44

kappa 轻链恒定区:

5 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 45

10 示例性地, 将前述杂交瘤克隆 m009、m011、m160 的人源化轻链可变区和重
链可变区分别与序列如 SEQ ID NO: 43 所示的人 IgG1 重链恒定区和序列如 SEQ ID
NO: 45 所示的人 kappa 轻链恒定区组合, 获得的全长人源化抗体参见表 5、表 7
和表 9 所示; 另一示例性地, 将前述杂交瘤克隆 m009、m011、m160 的人源化轻
链可变区和重链可变区分别与序列如 SEQ ID NO: 44 所示的人 IgG1-E333A 重链
恒定区和序列如 SEQ ID NO: 45 所示的人 kappa 轻链恒定区组合, 获得全长人源
化抗体, 所获得的人源化抗体的轻重链可变区序列见表 10:

15 表 10. 人源化抗体 (重链恒定区为人 IgG1-E333A, 轻链恒定区 kappa)
的可变区序列

抗体	重链可变区 VH	轻链可变区 VL
h009-01E	h009 VH1	h009 VL1
h009-02E	h009 VH2	h009 VL1
h009-03E	h009 VH3	h009 VL1
h009-04E	h009 VH4	h009 VL1
h009-05E	h009 VH5	h009 VL1
h009-06E	h009 VH1	h009 VL2
h009-07E (也标记为 hu9E)	h009 VH2	h009 VL2
h009-08E	h009 VH3	h009 VL2
h009-09E	h009 VH4	h009 VL2
h009-10E	h009 VH5	h009 VL2
h009-11E	h009 VH1	h009 VL3
h009-12E	h009 VH2	h009 VL3
h009-13E	h009 VH3	h009 VL3
h009-14E	h009 VH4	h009 VL3
h009-15E	h009 VH5	h009 VL3
h011-01E (也标记为 hu11E)	h011 VH1	h011VL1
h011-02E	h011 VH2	h011VL2
h011-03E	h011 VH1	h011VL3
h011-04E	h011 VH2	h011VL1
h011-05E	h011 VH1	h011VL2
h011-06E	h011 VH2	h011VL3

h160-01E (也标记为 hu160E)	h160 VH1	h160 VL1
h160-02E	h160 VH1	h160 VL2
h160-03E	h160 VH1	h160 VL3
h160-04E	h160 VH1	h160 VL4
h160-05E	h160 VH2	h160 VL1
h160-06E	h160 VH2	h160 VL2
h160-07E	h160 VH2	h160 VL3
h160-08E	h160 VH2	h160 VL4

示例性的, 人源化抗体 h009-07、hu9E、h011-01、hu11E、h160-01 和 hu160E 的全长氨基酸序列如下:

h009-07 抗体的重链序列:

5 EFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTDYNLNWVRQAPGQSLEWMGVIN
PKYDAINYNQKFKDRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGWGKAL
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
10 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 46

15 h009-07 抗体的轻链序列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIYTNLHWYQQKPGQSPRLLIKYASQSIG
IPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGGGKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPPREKVKQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 47

20

hu9E 抗体的重链序列:

EFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYFTDYNLNWVRQAPGQSLEWMGVIN
PKYDAINYNQKFKDRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGWGKAL
DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
25 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
30 HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 48

hu9E 抗体的轻链序列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIYTNLHWYQQKPGQSPRLLIKYASQSIG
IPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQSNSWPLTFGGGKVEIKRTVAAPS
35 VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPPREKVKQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS

KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 47

h011-01 抗体的重链序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISS
5 GSSSIYYADTVKGRFTISRDNKSSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARNYVSSYGYF
DYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
10 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 49

h011-01 抗体的轻链序列:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASENVNDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYR
15 ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSNKDPLTFGGGGTKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

20 SEQ ID NO: 50

hu11E 抗体的重链序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFISS
GSSSIYYADTVKGRFTISRDNKSSLYLQMTSLRAEDTAVYYCARNYVSSYGYF
DYWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
25 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
30 HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 51

hu11E 抗体的轻链序列:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASENVNDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYR
ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSNKDPLTFGGGGTKVE
35 IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

SEQ ID NO: 50

h160-01 抗体的重链序列:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIST
40 GSSNIYYVDKVKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRAEDTAVYYCARNYVSSYGY
FDYWQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS

HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO: 52

h160-01 抗体的轻链序列:

DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYR
ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTNDPLTFGGGTKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
10 QESVTEQDSKDYSLSSLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

SEQ ID NO: 53

hu160E 抗体的重链序列:

EVQLVESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIST
15 GSSNIYYVDKVKGRFTISRDNKNTLYLQMTSLRAEDTAVYYCARNYVSSYGY
FDYWGGGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
20 YKCKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 54

hu160E 抗体的轻链序列:

DIVMTQSPASLAVSLGERATINCRASESDNYGISFMHWYQQKPGQPPKLLIYR
25 ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTNDPLTFGGGTKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

30

SEQ ID NO: 53

本公开将抗 CD38 的抗体达雷本单抗（简称 Dara，序列来源参照 WHO Drug Information, Vol. 24, No. 1, 2010）作为对照抗体，其重链和轻链序列如下所示：

Dara 的重链序列:

EVQLLESGLLVQPGLSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSA
35 ISGSGGGTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWF
GEPVFDYWGGGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
40 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 55

Dara 的轻链序列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
NRATGIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
5 VTEQDSKDSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 56

用以下测试方法验证本公开抗体性能及有益效果。

测试例 1. CD38 抗体结合 CD38 蛋白的 ELISA 实验

- 10 抗 CD38 抗体的亲和力通过抗体与固定在 ELISA 板上 CD38 的结合的量来检测。包被 2 $\mu\text{g/ml}$ 链霉亲和素 (Abcam, CAT#ab123480) 于 96 孔 ELISA 板 (Costar, CAT#3590) 上, 洗板封闭后, 加入 2 $\mu\text{g/ml}$ 生物素标记的 CD38-ECD-His。孵育后, 加入不同浓度稀释的抗 CD38 抗体样品, 再洗板后加入辣根过氧化物酶-羊抗人 F(ab')₂ 抗体 (Jackson, CAT#109-036-097), 再洗板加入四甲基联苯胺溶液显色,
- 15 最后加入终止液, 在酶标仪上测量 OD450 并计算其 EC50 值, 结果如表 11 所示。

表 11. CD38 人源化抗体的亲和力

抗体	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)
hu9E	0.02594
hu11E	0.02762
hu160E	0.02801

结果显示本公开的人源化抗体可与 CD38 蛋白特异性结合, 并且结合能力较强。

测试例 2. CD38 抗体结合 CD38-FL-CHO-S 细胞的实验

- 20 稳定转染有全长人 CD38 (Uniprot 号: P28907) 的 CHO-S (FreeStyle™ CHO-S 细胞, Invitrogen, R80007) 细胞 (CD38-FL-CHOS) 于 CD CHO 培养基 (Gibco, REF#10743-029) 中培养, 1×10^6 细胞/ml CD38-FL-CHOS 细胞用 1%BSA 封闭后, 加入不同浓度稀释的抗 CD38 抗体样品, 洗两次后, 再加入 Alexa Fluor 488-羊抗人 (H+L) 抗体 (Invitrogen, CAT#A11013), 洗两次后, 使用流式细胞仪读取荧光信号值, 结果如表 12 所示。
- 25

表 12. CD38 人源化抗体的亲和力

抗体	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)
hu9E	0.4020
hu11E	0.4813
hu160E	0.4740

FACS 检测结果显示本公开的人源化抗体对细胞表面的天然 CD38 具有很强的结合能力。

测试例 3. CD38 抗体对 CD38 酶活抑制的实验

30

将 CD38-ECD-His 用 20 mM Tris-HCl (pH 6.5) 缓冲液配成浓度为 4 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液。同样, 将抗 CD38 抗体样品用缓冲液配成不同的浓度。各取 25 μl CD38-ECD-His 及抗 CD38 抗体样品加入底透黑壁 96 孔板 (Corning, CAT#3603)。在常温孵育 15 分钟后, 加入 50 μl 浓度为 200 μM 的底物 NGD (Sigma, CAT#N5131-25MG)。常温孵育 2 小时后, 用 FlexStation 3 (Molecular Devices) 使用发射波长 410 nm (激发光 300 nm) 检测环 GDP 核糖 (cGDPR) 的产生, 结果如表 13 所示。

表 13. CD38 人源化抗体对 CD38 酶活抑制结果

抗体	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	Imax (最大抑制率, %)
Dara	3.147	44.54
hu9E	1.559	89.63
hu11E	1.827	44.31
hu160E	1.199	47.67

实验结果显示 hu9E 的最大酶活抑制率达 89.63%, 明显优于对照抗体 Dara, 而 hu11E 和 hu160E 的最大酶活抑制率分别达 44.31% 和 47.67%, 与对照抗体相当。

测试例 4. CD38 抗体对 Molp-8、Daudi 细胞体外 ADCC 的实验

收集人多发性骨髓瘤细胞系 Molp-8 (南京科佰, CBP60562) 或人 Burkitt's 淋巴瘤细胞系 Daudi 细胞 (ATCC, CCL-123), 1000 rpm 离心 5 分钟, 用含 10% 超低 IgG 胎牛血清 (Gibco, CAT# 1921005PJ) 的无酚红 RPMI 1640 培养基 (Gibco, CAT# 11835-030) 重悬, 用细胞计数仪 (Countstar, IC1000) 计数, 稀释细胞至 1×10^5 细胞/ml。

使用 Ficoll (GE, CAT# 17-5442-02) 从新鲜人血液中分离外周血单核细胞 (PBMC), 于无酚红 RPMI 1640 培养基中重悬, 用细胞计数仪计数, 稀释细胞至 3×10^6 细胞/ml。

将 Molp-8 或 Daudi 与不同浓度的 CD38 抗体或阴性对照 IgG (C25-hIgG1 (WT), 实验室制备) 按 1:1 的比例, 在 96 孔板中各加入 50 μl , 孵育 30 分钟 (37°C, 5% CO_2) 后, 加入 50 μl 效应细胞 PBMC, 效应细胞比目标细胞比率为 30:1。孵育 4 小时 (37°C, 5% CO_2) 后, 使用 CytoTox 96 非放射细胞毒性测试试剂盒 (Promega, CAT#G1780) 检测 LDH (乳糖脱氢酶, lactate dehydrogenase) 释放。取 50 μl 细胞上清, 再加入 50 μl CytoTox 96® Reagent, 室温孵育 30 分钟后加入终止液, 用 FlexStation 3 (Molecular Devices) 检测吸收光 (490 nm), 结果如表 14 所示。

表 14. CD38 人源化抗体对靶细胞 ADCC 结果

抗体	Molp-8		Daudi	
	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	E _{max} (最大效)	IC50	E _{max} (最大)

		应率, %)	($\mu\text{g/ml}$)	效应率, %)
hu9E	4.5	83.6	4.9	102.5
hu11E	3.8	72.0	2.6	92.5
hu160E	2.7	71.5	3.1	96.7

实验结果显示本公开中的人源化抗体对 Molp-8、Daudi 细胞体外 ADCC 的作用较强, 可显著造成靶细胞裂解。

5 **测试例 5. CD38 抗体对 Molp-8、Daudi 细胞体外 CDC 的实验**

收集 Molp-8 或 Daudi 细胞后, 1000 rpm 离心 5 分钟, 重悬。用细胞计数仪 (Countstar, IC1000) 计数, 将细胞以 1×10^6 细胞/ml 重悬在含 10% 超低 IgG 胎牛血清 (Gibco, CAT# 1921005PJ) 的无酚红 RPMI 1640 培养基 (Gibco, CAT# 11835-030) 中。随后, 将细胞以 5×10^4 细胞/孔 ($50 \mu\text{l}$ /孔) 铺于 96 孔板 (Corning, CAT#3903) 中。然后, 加入 $50 \mu\text{l}$ 不同浓度的抗 CD38 抗体和阴性对照。孵育 30 分钟 (37°C , 5% CO_2) 后, 向每个孔中加入 $50 \mu\text{l}$ 人血清 (实验室制备)。孵育 2 小时 (37°C , 5% CO_2) 后, 向每个孔中加入 $16.6 \mu\text{l}$ Alamar Blue 试剂 (Thermo, CAT#DAL1025), 孵育 20 小时 (37°C , 5% CO_2)。最后, 用 FlexStation 3 (Molecular Devices) 检测发射波长 585 nm (激发波长 570 nm), 结果如表 15 所示。

15 表 15. CD38 人源化抗体对靶细胞 CDC 结果

抗体	Molp-8		Daudi	
	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	E _{max} (最大效应率, %)	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	E _{max} (最大效应率, %)
hu9E	281.4	79.7	51.1	92.8
hu11E	289.9	67.4	70.1	91.4
hu160E	393.2	61.5	65.7	88.1

实验结果显示本公开中的人源化抗体对 Molp-8、Daudi 细胞体外 CDC 的作用较强, 可显著造成靶细胞细胞裂解。

20 **测试例 6. CD38 抗体对 Molp-8、Daudi 细胞的体外 ADCP 报告系统测试**

收集 Molp-8 或 Daudi 细胞后, 1000 rpm 离心 5 分钟, 重悬。用细胞计数仪 (Countstar, IC1000) 计数, 将细胞以 1×10^6 细胞/ml 重悬在含 10% 超低 IgG 胎牛血清 (Gibco, CAT# 1921005PJ) 的无酚红 RPMI 1640 培养基 (Gibco, CAT# 11835-030) 中。随后, 将细胞以 2.5×10^4 细胞/孔 ($25 \mu\text{l}$ /孔) 铺于 96 孔板 (Corning, CAT#3903) 中, 加入 $25 \mu\text{l}$ 不同浓度的抗 CD38 抗体和阴性对照, 孵育 30 分钟 (37°C , 5% CO_2)。收集稳转全长人 Fc γ IIa (Uniprot 号: P12318) 的 Jurkat (Jurkat-Lucia™

NFAT Cells, Invivogene) 细胞作为效应细胞, 将效应细胞以 7.5×10^4 细胞/孔 ($50 \mu\text{l}$ /孔) 加入靶细胞和抗体孵育的 96 孔板中。孵育 6 小时 (37°C , $5\% \text{CO}_2$) 后吸出 $10 \mu\text{l}$ 上清到新的 96 孔板 (Corning, CAT#3903), 加入 $90 \mu\text{l}$ /孔的 QUANTI-Luc (Invivogene, rep-qlc1), 用 VITOR (VITOR3, PerkinElmer) 检测化学发光

5 Luminescence, 结果如表 16 和图 1 所示。

表 16. CD38 人源化抗体对靶细胞的体外 ADCP 报告系统测试结果

抗体	Molp-8	Daudi
	相对于 Dara 的信号比 (倍数)	
Dara	1.00	1.00
hu9E	2.00	2.30
hu11E	1.83	2.00
hu160E	1.87	1.80

实验结果显示本公开中的人源化抗体对 Molp-8、Daudi 细胞的体外 ADCP 报告系统测试效果均明显优于对照抗体 Dara。

10 测试例 7. Biacore 检测 CD38 抗体亲和力实验

用 Biacore 仪器测试本公开嵌合抗体 (ch-009、-011、-160 参见实施例 3 的制备方法)、人源化抗体及 Dara 对人 CD38-ECD-His 抗原的亲和力。

按照人 Fc 捕获试剂盒 (CAT#BR-1008-39, GE) 说明书中所述的方法, 将人 Fc 捕获分子共价偶联于 CM5 生物传感芯片 (CAT#BR-1005-30, GE) 上, 从而亲和捕获待测抗体。然后于芯片表面流经人 CD38-ECD-His 抗原, 利用 Biacore 仪器实时检测反应信号, 从而获得结合和解离曲线, 通过拟合得到亲和力数值。在实验中每个循环解离完成后, 用人 Fc 捕获试剂盒 (GE) 里配置的再生溶液将生物芯片洗净再生, 结果见表 17 和表 18。

表 17. 抗 CD38 抗体与人 CD38 亲和力的 Biacore 检测结果

抗体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
ch-009	$2.04\text{E}+06$	$4.77\text{E}-04$	$2.34\text{E}-10$
h009-07	$2.11\text{E}+06$	$2.10\text{E}-03$	$9.95\text{E}-10$
h009-08	$1.89\text{E}+06$	$2.23\text{E}-03$	$1.18\text{E}-09$
h009-09	$2.29\text{E}+06$	$4.89\text{E}-03$	$2.14\text{E}-09$
h009-10	$2.04\text{E}+06$	$4.33\text{E}-03$	$2.12\text{E}-09$
h009-11	$2.33\text{E}+06$	$1.21\text{E}-02$	$5.17\text{E}-09$
h009-12	$2.24\text{E}+06$	$9.17\text{E}-04$	$4.09\text{E}-10$
h009-13	$2.28\text{E}+06$	$1.06\text{E}-03$	$4.65\text{E}-10$
h009-14	$2.27\text{E}+06$	$1.85\text{E}-03$	$8.15\text{E}-10$

h009-15	2.28E+06	1.70E-03	7.45E-10
ch-011	7.46E+06	1.48E-03	1.99E-10
h011-01	6.68E+06	2.08E-03	3.11E-10
h011-02	6.59E+06	1.95E-03	2.97E-10
h011-03	6.97E+06	2.13E-03	3.06E-10
h011-04	6.76E+06	2.02E-03	2.99E-10
h011-05	6.89E+06	2.13E-03	3.09E-10
h011-06	6.71E+06	2.01E-03	3.00E-10
ch-160	2.74E+06	1.70E-04	6.20E-11
h160-01	1.99E+06	1.36E-04	6.87E-11
h160-02	1.93E+06	1.63E-04	8.46E-11
h160-03	2.40E+06	1.87E-04	7.79E-11
h160-04	2.12E+06	1.84E-04	8.67E-11
h160-05	2.05E+06	1.41E-04	6.91E-11
h160-06	2.09E+06	1.64E-04	7.82E-11
h160-07	2.43E+06	1.82E-04	7.48E-11
h160-08	2.29E+06	1.79E-04	7.82E-11

结果显示，本公开所得的人源化抗体对人 CD38 均有很高的亲和力。

表 18. 抗 CD38 抗体与人 CD38 亲和力的 BIAcore 检测结果

配体	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Dara	人 CD38-His	6.45E+05	1.51E-03	2.35E-09
hu9E		1.05E+06	1.38E-03	1.31E-09
hu11E		2.07E+06	1.17E-03	5.68E-10
hu160E		1.96E+06	1.15E-04	5.85E-11

结果显示本公开所得的 hu9E、hu11E、hu160E 抗体对人 CD38 均有很高的亲和力，其 KD 值小于对照抗体 Dara 的 KD 值，优于对照抗体。

体内活性生物学评价

测试例 8. CD38 抗体的体内药代动力学实验

SD 大鼠 18 只，雄性，平均分成 6 组，动物由西普尔-必凯实验动物有限公司提供；分别静脉注射和皮下注射给药，给药剂量 3mg/kg，静脉注射给药组于给药

前及给药后 5 min、8h、1 d、2 d、4 d、7 d、10d、14 d、21d、28 d 采集全血 0.2 ml，不加抗凝；取血后在 4℃放置 30min，1000g 离心 15 min；取上清（血清）置于 EP 管中，于-80℃保存；皮下注射给药组于给药前及给药后 1h、8h、1 d、2 d、4 d、7d、10d、14 d、21、28 d 采集全血，分离血清置于 EP 管中，于-80℃保存。

- 5 根据测试例 1 抗 CD38 抗体结合 CD38 蛋白的 ELISA 实验中的方法作不同样品的标准曲线，血清样品 1：1000 代替抗 CD38 抗体加入反应体系后根据 OD450 换算不同时间点抗 CD38 抗体于血清中的浓度，所得数据由 Phoenix WinNonlin 软件分析计算药代动力学相关参数。hu9E、hu11E 和 hu160E 抗体的体内药代动力学结果分别如表 19 所示。

10 表 19. 抗体大鼠药代动力学评价表

剂量	hu9E		hu11E		hu160E	
	IV 3mg/kg	SC 3mg/kg	IV 3mg/kg	SC 3mg/kg	IV 3mg/kg	SC 3mg/kg
生物利用度	-	81.4%	-	113.8%	-	113.9%
T1/2 (天)	11.4	11.1	13.3	12.1	13.6	10.9

备注：表中 T1/2 表示半衰期，IV 表示静脉注射，SC 表示皮下注射。

- 在大鼠中测定了 hu9E、hu11E 和 hu160E 3mpk 剂量下静脉注射和皮下注射的 PK (pharmacokinetics, 药物代谢动力学)，结果显示三者均具有良好的大鼠体内 PK 表现：皮下注射均具有较高的生物利用度，静脉注射平均 T1/2 分别为 11.4 天，13.3 天和 13.6 天；皮下注射平均 T1/2 分别为 11.1 天，12.1 天和 10.9 天，提示大鼠体内抗体稳定性良好，具有开发皮下制剂的可能性。

测试例 9. CD38 抗体小鼠肿瘤体内药效实验

- 20 Balb/c裸鼠，SPF，14-16g，雌性，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。Balb/c裸鼠于实验室环境适应性饲养6d（天），在右肋部皮下接种AMO-1细胞（南京科佰，CBP60242， $5 \times 10^6 + 50\%$ matrigel基质胶/只，Matrigel基底膜基质胶，BD公司，货号#356237），9天后分组，8只/组，平均瘤体积约 $197.21 \pm 9.25 \text{ mm}^3$ （d0），共7组，分别为：

- 25 空白对照IgG（3mg/kg）（C25-hIgG1（WT），实验室制备）组、
Dara（1mg/kg）组、
Dara（3mg/kg）组、
hu11E（1mg/kg）组、
hu11E（3mg/kg）组、
30 hu160E（1mg/kg）组、
hu160E（3mg/kg）组；

腹腔注射，一周二次，连续给药3周。每周测量2次瘤体积和体重，记录数据。
给药全部结束观察至要求的时间，处死小鼠，取瘤。

使用 Excel 2003 统计软件：平均值以 avg 计算；SD 值以 STDEV 计算；SEM 值以 STDEV/SQRT 计算；组间差异 P 值以 TTEST 计算。

5

$$\text{肿瘤体积 (V) 计算公式为: } V = 1/2 \times L_{\text{长}} \times L_{\text{短}}^2$$
$$\text{相对体积 (RTV)} = V_T / V_0$$
$$\text{抑瘤率 (\%)} = (C_{\text{RTV}} - T_{\text{RTV}}) / C_{\text{RTV}} (\%)$$

其中 V₀、V_T 分别为实验开始时及实验结束时的肿瘤体积。C_{RTV}、T_{RTV} 分别为实验结束时的对照组及实验组的相对肿瘤体积，结果如表 20 和图 2 所示。

10

表 20. 抗 CD38 抗体体内抑瘤结果

抗体	剂量	抑瘤率 (%)
Dara	1mpk	56.83
	3mpk	87.44
hu11E	1mpk	93.14
	3mpk	99.52
hu160E	1mpk	70.02
	3mpk	89.89

备注：mpk 表示 mg/kg

小鼠肿瘤体内药效实验结果显示，本公开的人源化抗体 hu11E 和 hu160E 均能够明显的抑制肿瘤生长。相比空白对照 IgG（3mg/kg）组，hu11E（1mg/kg）组和 hu160E（1mg/kg）组抑瘤率分别达 93.14%和 70.02%；hu11E（3mg/kg）组和 hu160E（3mg/kg）组抑瘤率分别达 99.52%和 89.89%。给药过程中各组动物体重正常，提示本公开的抗体无明显毒副作用。

15

权利要求书

1. 一种抗 CD38 抗体或其抗原结合片段, 所述抗 CD38 抗体或抗原结合片段与人 CD38 特异性结合, 所述抗体或其抗原结合片段包含:

5 (i) 重链 HCDR1, 所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示或与 SEQ ID NO: 9 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

重链 HCDR2, 所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示或与 SEQ ID NO: 10 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

10 重链 HCDR3, 所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示或与 SEQ ID NO: 11 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

轻链 LCDR1, 所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示或与 SEQ ID NO: 12 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

轻链 LCDR2, 所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示或与 SEQ ID NO: 13 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异, 和

15 轻链 LCDR3, 所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示或与 SEQ ID NO: 14 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异; 或者

(ii) 重链 HCDR1, 所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示或与 SEQ ID NO: 15 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

20 重链 HCDR2, 所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示或与 SEQ ID NO: 16 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

重链 HCDR3, 所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示或与 SEQ ID NO: 17 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

轻链 LCDR1, 所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示或与 SEQ ID NO: 18 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

25 轻链 LCDR2, 所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示或与 SEQ ID NO: 19 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异, 和

轻链 LCDR3, 所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示或与 SEQ ID NO: 20 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异; 或者

30 (iii) 重链 HCDR1, 所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示或与 SEQ ID NO: 15 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

重链 HCDR2, 所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示或与 SEQ ID NO: 21 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

重链 HCDR3, 所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示或与 SEQ ID NO: 17 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

35 轻链 LCDR1, 所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示或与 SEQ ID NO: 22 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异,

轻链 LCDR2, 所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示或与 SEQ ID NO: 19 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异, 和

轻链 LCDR3, 所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示或与 SEQ ID NO: 23 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异。

5

2. 根据权利要求 1 所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体为鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

3. 根据权利要求 2 所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的鼠源抗体或嵌合抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

(a) 所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示或与 SEQ ID NO: 3 具有至少 95% 序列同一性, 且所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示或与 SEQ ID NO: 4 具有至少 95% 序列同一性;

(b) 所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示或与 SEQ ID NO: 5 具有至少 95% 序列同一性, 且所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示或与 SEQ ID NO: 6 具有至少 95% 序列同一性; 或

(c) 所述重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示或与 SEQ ID NO: 7 具有至少 95% 序列同一性, 且所述轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示或与 SEQ ID NO: 8 具有至少 95% 序列同一性。

20

4. 根据权利要求 2 所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体为人源化抗体, 所述人源化抗体包含来源于人抗体的框架区或框架区变体, 所述框架区变体在人抗体的轻链框架区和/或重链框架区上分别具有至多 10 个氨基酸的回复突变;

25 优选地, 所述人源化抗体包含选自以下 (d) 至 (f) 中的任一项:

(d) 重链可变区, 所述重链可变区包含: 重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及重链框架区, 其中, 所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示或与 SEQ ID NO: 9 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异, 所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示或与 SEQ ID NO: 10 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异, 所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示或与 SEQ ID NO: 11 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异, 所述重链框架区包含选自以下一个或更多个回复突变: 2F、38K、44S、48I、67A、66K、69L、71V 和 73Q; 和/或

轻链可变区, 所述轻链可变区包含: 轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3 以及轻链框架区, 其中, 所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示或与 SEQ ID NO: 12 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异, 所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示或与 SEQ ID NO: 13 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异, 所述 LCDR3 的氨基酸

35

序列如 SEQ ID NO: 14 所示或与 SEQ ID NO: 14 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述轻链框架区包含选自以下一个或更多个回复突变：2F、43S、49K 和 87F；

(e) 重链可变区，所述重链可变区包含：重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及重链框架区，其中，所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示或与 SEQ ID NO: 15 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示或与 SEQ ID NO: 16 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示或与 SEQ ID NO: 17 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述重链框架区包含选自以下一个或更多个回复突变：79F、82A T、91S 和 76S；和/或；

轻链可变区，所述轻链可变区包含：轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3 以及轻链框架区，其中，所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示或与 SEQ ID NO: 18 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示或与 SEQ ID NO: 19 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 或与 SEQ ID NO: 20 序列具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述轻链框架区包含选自以下一个或更多个回复突变：58I、68R 和 85T；和

(f) 重链可变区，所述重链可变区包含：重链 HCDR1、HCDR2、HCDR3 以及重链框架区，其中，所述 HCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示或与 SEQ ID NO: 15 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述 HCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示或与 SEQ ID NO: 21 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示或与 SEQ ID NO: 17 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述重链框架区包含选自以下一个或更多个回复突变：48I、77T 和 82A T；和/或

轻链可变区，所述轻链可变区包含：轻链 LCDR1、LCDR2、LCDR3 以及轻链框架区，其中，所述 LCDR1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示或与 SEQ ID NO: 22 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述 LCDR2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示或与 SEQ ID NO: 19 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述 LCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示或与 SEQ ID NO: 23 具有 3、2 或 1 个氨基酸差异，所述轻链框架区包含选自以下一个或更多个回复突变：4L、9A、22S、58I、60A 和 68R；

其中，所述回复突变的位点根据 Kabat 编号规则编号。

5. 根据权利要求 4 所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段，其中所述的人源化抗体包含：序列如 SEQ ID NO: 24、32 或 37 所示的重链可变区或其变体，所述变体在序列如 SEQ ID NO: 24、32 或 37 所示的重链可变区中的框架区上具有 1-10 个氨基酸突变。

6. 根据权利要求 5 所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段，其中所述的变体

选自以下 (g) 至 (i) 中的任一项:

(g) 在序列如 SEQ ID NO: 24 所示的重链可变区中的框架区上具有选自以下一个或更多个回复突变: 2F、38K、44S、48I、67A、66K、69L、71V 和 73Q;

5 (h) 在序列如 SEQ ID NO: 32 所示的重链可变区中的框架区上具有选自以下一个或更多个回复突变: 79F 和 91S; 和

(i) 在序列如 SEQ ID NO: 37 所示的重链可变区中的框架区上具有 48I 回复突变;

优选地, 其中所述的人源化抗体包含:

序列如 SEQ ID NO: 26、27、28、29、34 或 39 所示的重链可变区、或

10 序列与 SEQ ID NO: 26、27、28、29、34 或 39 具有至少 95% 序列同一性的重链可变区。

7. 根据权利要求 4 所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的人源化抗体包含序列如 SEQ ID NO: 25、33 或 38 所示的轻链可变区或其变体, 所述的
15 变体在序列如 SEQ ID NO: 25、33 或 38 所示的轻链可变区中的框架区上具有 1-10 个氨基酸突变。

8. 根据权利要求 7 所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段, 其中所述的变体选自以下 (j) 至 (l) 任一项:

20 (j) 在序列如 SEQ ID NO: 25 所示的轻链可变区中的框架区上具有选自以下一个或更多个回复突变: 2F、43S、49K 和 87F;

(k) 在序列如 SEQ ID NO: 33 所示的轻链可变区中的框架区上具有选自以下一个或更多个回复突变: 58I、68R 和 85T;

25 (l) 在序列如 SEQ ID NO: 38 所示的轻链可变区中的框架区上具有选自以下一个或更多个回复突变: 4L、9A、22S、58I、60A 和 68R;

优选地, 其中所述的人源化抗体包含:

序列如 SEQ ID NO: 30、31、35、36、40、41 或 42 所示的轻链可变区、或

序列与 SEQ ID NO: 30、31、35、36、40、41 或 42 具有至少 95% 序列同一性的轻链可变区。

30

9. 根据权利要求 1 所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段, 其包含:

(m) 序列如 SEQ ID NO: 24、26、27、28 或 29 所示的重链可变区, 和序列如 SEQ ID NO: 25、30 或 31 所示的轻链可变区;

35 (n) 序列如 SEQ ID NO: 32 或 34 所示的重链可变区, 和序列如 SEQ ID NO: 33、35 或 36 所示的轻链可变区; 或

(o) 序列如 SEQ ID NO: 37 或 39 所示的重链可变区, 和序列如 SEQ ID NO:

38、40、41 或 42 所示的轻链可变区；

优选地，所述人源化抗体包含：

(p) 序列如 SEQ ID NO: 26 所示的重链可变区和序列如 SEQ ID NO: 30 所示的轻链可变区；或

5 (q) 序列如 SEQ ID NO: 32 所示的重链可变区和序列如 SEQ ID NO: 33 所示的轻链可变区；或

(r) 序列如 SEQ ID NO: 37 所示的重链可变区和序列如 SEQ ID NO: 38 所示的轻链可变区。

10 10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段，其中，所述的抗体包含恒定区；

优选地，所述抗体为嵌合抗体或人源化抗体，其重链恒定区来源于人抗体 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4，或 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的常规变体，轻链恒定区来源于人抗体 κ 、 λ 链，或 κ 、 λ 链的常规变体；

15 更优选地，所述重链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 或 44 所示或与 SEQ ID NO: 43 或 44 具有至少 95% 序列同一性，

更优选地，所述轻链恒定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 45 所示或与 SEQ ID NO: 45 具有至少 95% 序列同一性。

20 11. 根据权利要求 10 所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段，其包含：

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 46、48、49、51、52 或 54 所示或与 SEQ ID NO: 46、48、49、51、52 或 54 具有至少 85% 序列同一性的重链；和/或

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47、50 或 53 所示或与 SEQ ID NO: 47、50 或 53 具有至少 85% 序列同一性的轻链。

25

12. 根据权利要求 11 所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含：

序列如 SEQ ID NO: 46 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 47 所示的轻链；

序列如 SEQ ID NO: 48 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 47 所示的轻链；

30 序列如 SEQ ID NO: 49 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 50 所示的轻链；

序列如 SEQ ID NO: 51 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 50 所示的轻链；

序列如 SEQ ID NO: 52 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 53 所示的轻链；或

序列如 SEQ ID NO: 54 所示的重链和序列如 SEQ ID NO: 53 所示的轻链。

35 13. 一种分离的单克隆抗体或其抗原结合片段，其与权利要求 1 至 12 中任一项所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段竞争性结合人 CD38。

14. 一种药物组合物，其含有：
治疗有效量的权利要求 1 至 13 中任一项所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段，以及
一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

5

15. 一种分离的核酸分子，其编码权利要求 1 至 13 中任一项所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段。

16. 一种载体，其包含权利要求 15 所述的核酸分子。

10

17. 一种宿主细胞，其包含权利要求 16 所述的载体；优选地，所述宿主细胞选自原核细胞和真核细胞，优选为真核细胞，更优选哺乳动物细胞。

15

18. 一种制备权利要求 1 至 13 中任一项所述抗 CD38 抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括步骤：

培养权利要求 17 所述的宿主细胞，
回收所述抗 CD38 抗体或其抗原结合片段；
任选地，对所述抗 CD38 抗体或其抗原结合片段进行纯化。

20

19. 一种用于检测或测定人 CD38 的方法，所述方法包括：
使权利要求 1 至 13 中任一项所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段接触待测样本；
确定所述待测样本中人 CD38 的存在或水平。

25

20. 一种用于检测或测定人 CD38 的试剂，所述试剂包含：
权利要求 1 至 13 中任一项所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段；或
权利要求 16 所述的药物组合物。

30

21. 选自以下 (m) 至 (o) 任一项的物质在制备治疗或预防疾病或病症的药物中的用途：

(m) 权利要求 1 至 13 中任一项所述的抗 CD38 抗体或其抗原结合片段，
(n) 权利要求 14 所述的药物组合物，和
(o) 权利要求 15 所述的核酸分子；
优选地，所述疾病或病症为肿瘤或免疫性疾病。

35

22. 根据权利要求 21 所述的用途，其中所述疾病或病症为 CD38 阳性疾病或病症。

23. 根据权利要求 21 或 22 所述的用途，其中：

所述疾病或病症为肿瘤或免疫性疾病，

所述免疫性疾病选自：类风湿性关节炎、牛皮癣、强直性脊柱炎、关节银屑病、皮炎、系统性硬皮病及硬化症、炎症性肠病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、胃炎、葡萄膜炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉硬化、白细胞粘附缺陷病、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合物性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症状、溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、风湿关节炎、异位性皮炎、天疱疮、Graves 病、桥本氏甲状腺炎、Wegener 肉芽肿、Omenn 症候群、慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多征、多发性硬化症、HIV 和疱疹病毒相关的疾病、严重急性呼吸综合征和脉络视网膜炎、移植物对抗宿主疾病、以及病毒感染引起的免疫性疾病；

优选地，所述免疫性疾病选自：类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、哮喘、炎症性肠病、多发性硬化症、克罗恩氏病、胃炎、桥本氏甲状腺炎、强直性脊柱炎、移植物对抗宿主疾病、免疫介导的血小板减少症状；

优选地，所述免疫介导的血小板减少症状是急性特发性血小板减少性紫癜或慢性特发性血小板减少性紫癜；

更优选地，所述免疫性疾病为类风湿性关节炎；

所述肿瘤选自：白血病、B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤、NK 细胞淋巴瘤、浆细胞恶性肿瘤和骨髓瘤；

优选地，所述 B 细胞淋巴瘤选自：成熟 B 细胞肿瘤、前体 B 细胞成淋巴细胞白血病/淋巴瘤、B 细胞非霍奇金淋巴瘤、B 细胞霍奇金淋巴瘤；

更优选地，所述肿瘤选自：急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性或慢性骨髓型白血病、多发性骨髓瘤、前髓细胞肿瘤、轻链淀粉样变性、B 细胞慢性淋巴细胞性白血病、小淋巴细胞性白血病、B 细胞急性淋巴细胞性白血病、B 细胞前淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞样淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、皮肤滤泡中心淋巴瘤、边缘区 B 细胞淋巴瘤、毛细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、浆细胞瘤、浆细胞骨髓瘤、浆细胞白血病、移植后淋巴增生性疾病、Waldenstrom 巨球蛋白血症、浆细胞白血病和间变性大细胞淋巴瘤、多毛细胞淋巴瘤；

更优选地，所述肿瘤是多发性骨髓瘤。

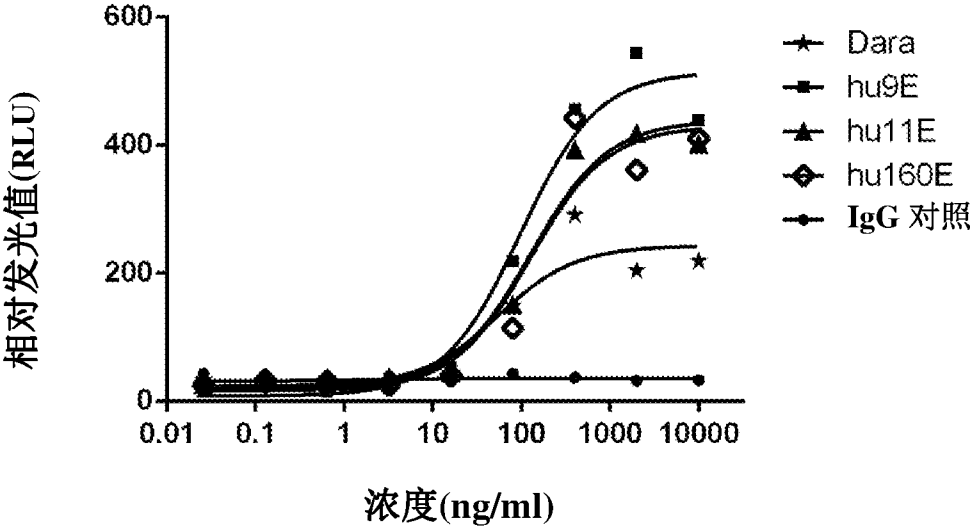


图 1A

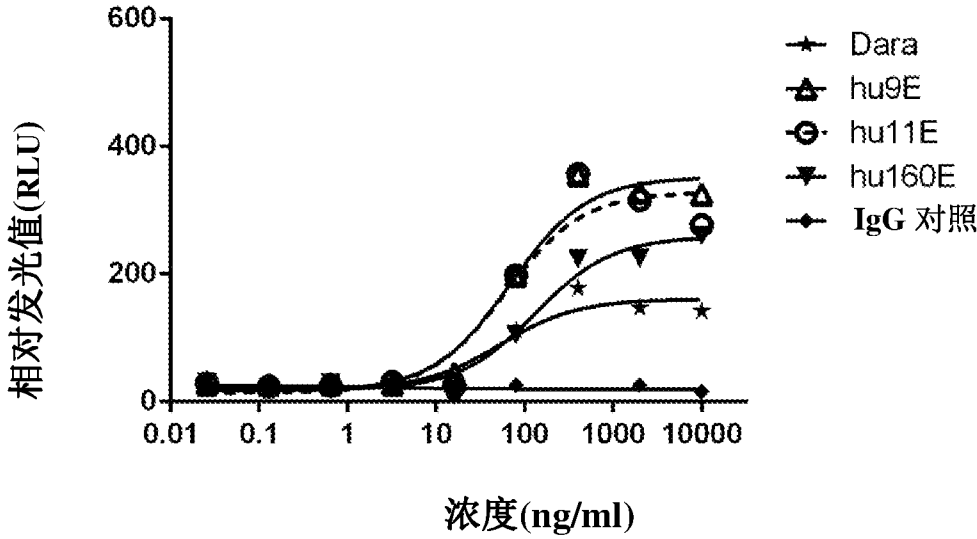


图 1B

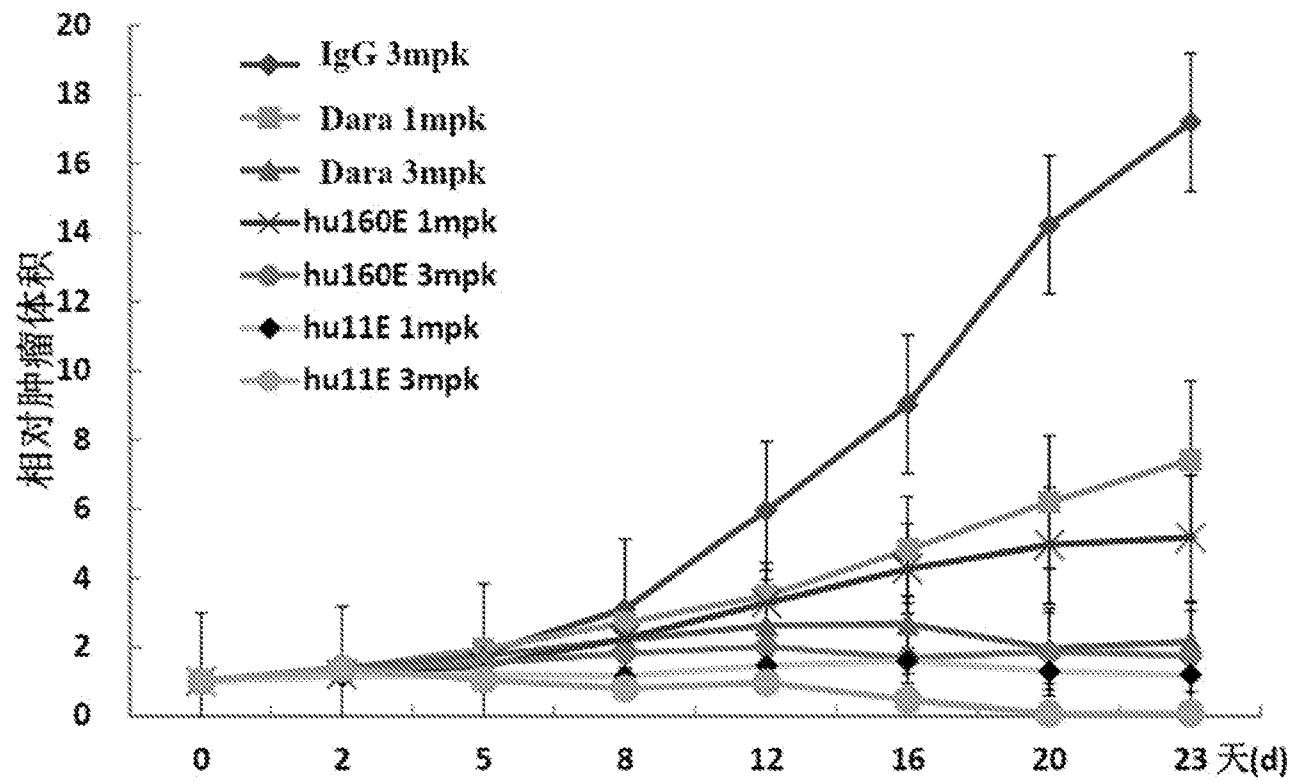


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/105119

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; G01N; A61K; A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNTXT, CNKI and key words: CD38, 抗体, 等; DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI_Web of Science and key words: CD38, antibody, et al.; Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 9-23, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT and Search sequence: SEQ ID NO: 9-23														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 107921122 A (SORRENTO THERAPEUTICS INC.) 17 April 2018 (2018-04-17) claims 1-15</td> <td>1-12, 14-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 107365385 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 21 November 2017 (2017-11-21) claims 1-10</td> <td>1-12, 14-23</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2009076249 A1 (MICHEL, D.W. et al.) 19 March 2009 (2009-03-19) claim 1, and description, paragraphs 1-141</td> <td>1-12, 14-23</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	CN 107921122 A (SORRENTO THERAPEUTICS INC.) 17 April 2018 (2018-04-17) claims 1-15	1-12, 14-23	A	CN 107365385 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 21 November 2017 (2017-11-21) claims 1-10	1-12, 14-23	A	US 2009076249 A1 (MICHEL, D.W. et al.) 19 March 2009 (2009-03-19) claim 1, and description, paragraphs 1-141	1-12, 14-23
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	CN 107921122 A (SORRENTO THERAPEUTICS INC.) 17 April 2018 (2018-04-17) claims 1-15	1-12, 14-23												
A	CN 107365385 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 21 November 2017 (2017-11-21) claims 1-10	1-12, 14-23												
A	US 2009076249 A1 (MICHEL, D.W. et al.) 19 March 2009 (2009-03-19) claim 1, and description, paragraphs 1-141	1-12, 14-23												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 28 November 2019		Date of mailing of the international search report 10 December 2019												
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/105119

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **1-8, 10, 11, 13, 14-23**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
 - [1] (1) An anti-CD38 antibody or an antigen-binding fragment thereof defined in claims 1-8, 10, 11 and 14-23 contains an HCDR variant or LCDR variant which has three, two or one amino acid difference with HCDR1-3 or LCDR1-3 defined a specific sequence, or definitions of a heavy chain and light chain of the anti-CD38 antibody or an antigen-binding fragment thereof comprise a case where they are defined based on a sequence identity percentage, or only one of the heavy chain or light chain of the antibody is specifically defined but the other chain does not defined, which all results in that the claims are not supported by the description, and the degree of non-compliance thereof results in that no meaningful search can be performed.
 - [2] The international search will be carried out with regard to the subject matter that may be expected to be claimed, that is, the subject matter defined due to a fact that the protection scope of claim 1 excludes all CDR variants "with three, two or one amino acid difference", and the other subject matter thus defined due to referring to claim 1.
 - [3] (2) Claim 13 only defines an antibody or an antigen-binding fragment thereof based on the binding activity of the antibody, but does not provide a technical feature of a chemical structure which is necessary to realize the result. A person skilled in the art needs undue experimentation to screen out an antibody or an antigen-binding fragment with the expected activity so that the claim is not supported by the description, and the degree of non-compliance thereof results in that no meaningful search is performed.
 - [4] No international search will be performed on claim 13.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/105119

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107921122	A	17 April 2018	EP	3280443	A4	26 December 2018
				JP	2018513149	A	24 May 2018
				AR	104213	A1	05 July 2017
				US	2019048092	A1	14 February 2019
				TW	201702264	A	16 January 2017
				US	2017291959	A1	12 October 2017
				US	10059774	B2	28 August 2018
				US	2016297888	A1	13 October 2016
				EP	3280443	A2	14 February 2018
				WO	2016164669	A2	13 October 2016
				US	9951144	B2	24 April 2018
				WO	2016164656	A1	13 October 2016
				WO	2016164669	A3	12 January 2017
CN	107365385	A	21 November 2017	EA	201390993	A1	30 December 2013
				JP	6563446	B2	21 August 2019
				EP	2658871	A1	06 November 2013
				US	9790285	B2	17 October 2017
				JP	5843884	B2	13 January 2016
				BR	112013017009	A2	25 July 2017
				HU	E038535	T2	29 October 2018
				EP	3284754	A1	21 February 2018
				JP	2014509837	A	24 April 2014
				JP	2018029581	A	01 March 2018
				SG	191211	A1	31 July 2013
				MX	350903	B	25 September 2017
				PL	2658870	T3	30 November 2018
				US	10336833	B2	02 July 2019
				US	2015203587	A1	23 July 2015
				US	8362211	B2	29 January 2013
				AR	084747	A1	05 June 2013
				EP	2658870	A1	06 November 2013
				EP	3284755	A1	21 February 2018
				KR	20190015764	A	14 February 2019
				WO	2012092612	A1	05 July 2012
				NZ	705848	A	29 July 2016
				US	2015291702	A1	15 October 2015
				TW	201247705	A	01 December 2012
				CO	6761368	A2	30 September 2013
				KR	101945002	B1	07 February 2019
				KR	20140032963	A	17 March 2014
				PL	2658871	T3	30 November 2018
				LT	2658871	T	10 September 2018
				CA	2822061	A1	05 July 2012
				AU	2011351921	B2	13 April 2017
				MY	160499	A	15 March 2017
				JP	6148984	B2	14 June 2017
				EP	2658871	B1	02 May 2018
				US	2014155584	A1	05 June 2014
				JP	2018019689	A	08 February 2018
				ES	2674175	T3	27 June 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/105119

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		AU 2017204571 B2	19 September 2019
		JP 6425635 B2	21 November 2018
		WO 2012092616 A1	05 July 2012
		ES 2690095 T3	19 November 2018
		EP 2658870 B1	25 April 2018
		CN 103282383 A	04 September 2013
		PT 2658870 T	03 July 2018
		MA 34763 B1	03 December 2013
		EA 029303 B1	30 March 2018
		ZA 201304696 B	25 September 2014
		NZ 612272 A	24 April 2015
		RS 57526 B1	31 October 2018
US 2009076249 A1	19 March 2009	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/105119

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; G01N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNTXT, CNKI和关键词: CD38, 抗体, 等; DWPI, SIPOABS, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI Web of Science和关键词: CD38, antibody, 等; Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 9-23, 等

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107921122 A (索伦托治疗有限公司) 2018年 4月 17日 (2018 - 04 - 17) 权利要求1-15	1-12, 14-23
A	CN 107365385 A (武田药品工业株式会社) 2017年 11月 21日 (2017 - 11 - 21) 权利要求1-10	1-12, 14-23
A	US 2009076249 A1 (DE WEERS MICHEL等) 2009年 3月 19日 (2009 - 03 - 19) 权利要求1, 说明书第1-141段	1-12, 14-23

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 11月 28日

国际检索报告邮寄日期

2019年 12月 10日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

杨振宇

电话号码 86-(10)-62412204

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
2. ☒ 权利要求： 1-8、10、11、13、14-23
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
 - [1] (1) 权利要求1-8、10、11和14-23中所限定的抗CD38抗体或其抗原结合片段中包含与定义了明确序列的HCDR1-3或LCDR1-3具有3、2或1个氨基酸差异的HCDR变体或LCDR变体，或者对抗CD38抗体或其抗原结合片段的重链和轻链的定义包含以序列同一性百分比进行限定的情形，或者仅具体限定了抗体的重链或轻链之一而对另一链不做限定，均导致权利要求得不到说明书的支持，其不符合程度导致不能进行任何有意义的检索。
 - [2] 国际检索将针对预期可能要求保护的主题进行，即，权利要求1的保护范围中排除了所有“具有3、2或1个氨基酸差异”的CDR变体而限定出的主题，以及由此引用该权利要求1而定义的其他主题。
 - [3] (2) 权利要求13仅以抗体的结合活性来对抗体或其抗原结合片段进行限定，而没有提供实现该结果所必须的化学结构技术特征，本领域技术人员需要过度的实验才能筛选出具备该期望活性的抗体或抗原结合片段，从而该权利要求得不到说明书的支持，其不符合程度导致不能进行任何有意义的检索。
 - [4] 对权利要求13将不进行国际检索。
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/105119

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107921122	A	2018年 4月 17日	EP	3280443	A4	2018年 12月 26日
				JP	2018513149	A	2018年 5月 24日
				AR	104213	A1	2017年 7月 5日
				US	2019048092	A1	2019年 2月 14日
				TW	201702264	A	2017年 1月 16日
				US	2017291959	A1	2017年 10月 12日
				US	10059774	B2	2018年 8月 28日
				US	2016297888	A1	2016年 10月 13日
				EP	3280443	A2	2018年 2月 14日
				WO	2016164669	A2	2016年 10月 13日
				US	9951144	B2	2018年 4月 24日
				WO	2016164656	A1	2016年 10月 13日
				WO	2016164669	A3	2017年 1月 12日
CN	107365385	A	2017年 11月 21日	EA	201390993	A1	2013年 12月 30日
				JP	6563446	B2	2019年 8月 21日
				EP	2658871	A1	2013年 11月 6日
				US	9790285	B2	2017年 10月 17日
				JP	5843884	B2	2016年 1月 13日
				BR	112013017009	A2	2017年 7月 25日
				HU	E038535	T2	2018年 10月 29日
				EP	3284754	A1	2018年 2月 21日
				JP	2014509837	A	2014年 4月 24日
				JP	2018029581	A	2018年 3月 1日
				SG	191211	A1	2013年 7月 31日
				MX	350903	B	2017年 9月 25日
				PL	2658870	T3	2018年 11月 30日
				US	10336833	B2	2019年 7月 2日
				US	2015203587	A1	2015年 7月 23日
				US	8362211	B2	2013年 1月 29日
				AR	084747	A1	2013年 6月 5日
				EP	2658870	A1	2013年 11月 6日
				EP	3284755	A1	2018年 2月 21日
				KR	20190015764	A	2019年 2月 14日
				WO	2012092612	A1	2012年 7月 5日
				NZ	705848	A	2016年 7月 29日
				US	2015291702	A1	2015年 10月 15日
				TW	201247705	A	2012年 12月 1日
				CO	6761368	A2	2013年 9月 30日
				KR	101945002	B1	2019年 2月 7日
				KR	20140032963	A	2014年 3月 17日
				PL	2658871	T3	2018年 11月 30日
				LT	2658871	T	2018年 9月 10日
				CA	2822061	A1	2012年 7月 5日
				AU	2011351921	B2	2017年 4月 13日
				MY	160499	A	2017年 3月 15日
				JP	6148984	B2	2017年 6月 14日
				EP	2658871	B1	2018年 5月 2日
				US	2014155584	A1	2014年 6月 5日
				JP	2018019689	A	2018年 2月 8日
				ES	2674175	T3	2018年 6月 27日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/105119

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		AU 2017204571 B2	2019年 9月 19日
		JP 6425635 B2	2018年 11月 21日
		WO 2012092616 A1	2012年 7月 5日
		ES 2690095 T3	2018年 11月 19日
		EP 2658870 B1	2018年 4月 25日
		CN 103282383 A	2013年 9月 4日
		PT 2658870 T	2018年 7月 3日
		MA 34763 B1	2013年 12月 3日
		EA 029303 B1	2018年 3月 30日
		ZA 201304696 B	2014年 9月 25日
		NZ 612272 A	2015年 4月 24日
		RS 57526 B1	2018年 10月 31日
US 2009076249 A1	2009年 3月 19日	无	