



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109053892 B

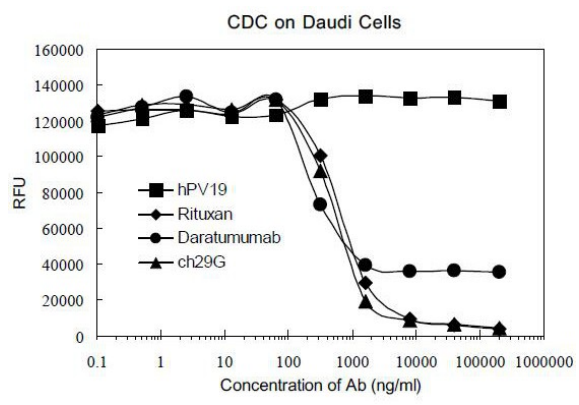
(45) 授权公告日 2021.03.26

(21) 申请号 201811090932.4
 (22) 申请日 2018.09.19
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 109053892 A
 (43) 申请公布日 2018.12.21
 (73) 专利权人 苏州思坦维生物技术股份有限公司
 地址 215100 江苏省苏州市苏州工业园区
 星湖街218号生物纳米园C11楼201室
 (72) 发明人 胡红群 宋晓琦 陈叢 马晓晓
 袁燕萍 周群敏
 (74) 专利代理机构 上海市汇业律师事务所
 31325
 代理人 王函
 (51) Int.Cl.
 C07K 16/28 (2006.01)
 C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)
 C07K 1/22 (2006.01)
 A61K 39/395 (2006.01)
 A61P 35/00 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 108350077 A, 2018.07.31
 AU 2004299833 A1, 2006.07.27
 王欢等. 原发浆细胞白血病诊疗进展. 《中国实验血液学杂志》. 2017, 第25卷 (第6期),
 Niels W C J van de Donk等. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. 《Immunological Reviews》. 2016,
 吴婷等. Daratumumab靶向治疗多发性骨髓瘤的研究进展. 《生命科学研究》. 2017, 第21卷 (第4期),
 审查员 韩婧
 权利要求书1页 说明书27页
 序列表5页 附图17页

(54) 发明名称
 特异结合人及猴CD38抗原的单克隆抗体及其制备方法与应用

(57) 摘要
 本发明公开了一种特异结合人及猴CD38抗原的单克隆抗体或其衍生体,其包含抗体轻链可变区的抗原互补决定区CDR1, CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4及SEQ ID NO:5的氨基酸序列; 抗体重链可变区的抗原互补决定区CDR1, CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9及SEQ ID NO:10的氨基酸序列。该抗体或其衍生体可作为药物组合物成分或制备成合适药物制剂, 单独给药或与其他治疗手段如化疗药物等合并使用, 用于治疗CD38表达阳性的肿瘤如人骨髓瘤, 人淋巴细胞瘤等。



1. 一种特异结合人及猴CD38抗原的单克隆抗体,其特征在于,其包含第一可变区和第二可变区,其中所述第一可变区是抗体轻链可变区,其抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3依次为SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4 及SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列;其中所述第二可变区是抗体重链可变区,其抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3依次为SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9 及SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述第一可变区是抗体轻链可变区,为SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;所述第二可变区是抗体重链可变区,为SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述第一可变区是抗体轻链可变区,为SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;所述第二可变区是抗体重链可变区,为SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或为SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1、2或3所述的抗体,其特征在于,其包含所述抗体轻链可变区和人抗体轻链恒定区,及包含所述抗体重链可变区和人抗体重链恒定区的铰链区,CH1区,CH 2区和CH3区。

5. 根据权利要求4所述的抗体,其特征在于,所述人抗体轻链恒定区来自人抗体kappa链或抗体lamda链,所述人抗体重链恒定区来自人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4亚型。

6. 一种编码权利要求2或3所述抗体的DNA分子,其特征在于,其抗体轻链可变区的编码序列为SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:13所示的核苷酸序列,抗体重链可变区的编码序列为SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:14的核苷酸序列。

7. 一种表达载体,其特征在于,它含有权利要求6所述的DNA分子序列以及与该序列操作性相连的表达调控序列。

8. 一种重组宿主细胞,其特征在于,它由权利要求7所述的表达载体转化而成。

9. 根据权利要求8所述的重组宿主细胞,其中所述重组宿主细胞表达权利要求1或5所述的抗体。

10. 一种药物或药物组合物,其特征在于,它含有药学上有效量的如权利要求1或5所述的抗体,以及药学上可接受的载体。

11. 根据权利要求10所述的药物或药物组合物在制备治疗肿瘤的药物中的应用,所述肿瘤为人骨髓瘤或B-淋巴细胞瘤。

12. 一种制备权利要求2或3所述的抗体的方法,其特征在于,该方法包括如下步骤:

a) 提供一表达载体,该表达载体含有权利要求6所述的DNA分子序列以及与该序列操作性相连的表达调控序列;

b) 用步骤a)所述的表达载体转化宿主细胞;

c) 在适合所述抗体表达的条件下培养步骤b)所得的宿主细胞;和

d) 采用亲和层析从宿主细胞培养液中分离纯化获得所述抗体。

特异结合人及猴CD38抗原的单克隆抗体及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术-单克隆抗体领域。本发明涉及一种特异结合人及猴CD38抗原的单克隆抗体及其编码序列与其制备方法和用途。

背景技术

[0002] CD38(也称为T10,一种被OKT10单抗识别的抗原)是一个分子量在45kDa左右的II型单次跨膜糖蛋白。编码人类和小鼠CD38基因的cDNA早在1990年代初就已被克隆与报道(Jackson DG and Bell JI. J. Immunol. 1990,144:2811-2815; Harada et al. J Immunol. 1993,151:3111-8);编码食蟹猴(cynomolgus macaque) CD38基因的cDNA也在2004年被克隆与报道(Ferrero E et al, BMC Immunol. 2004,5:21)。人CD38蛋白全长共有300个氨基酸,其中N-端区21个氨基酸位于细胞内,位于细胞膜上的有22个氨基酸,位于细胞膜外的C-端区有257个氨基酸。食蟹猴CD38蛋白全长共有301个氨基酸,与人CD38蛋白氨基酸序列同源性为92%,而小鼠CD38蛋白全长则有304个氨基酸,与人CD38蛋白氨基酸序列同源性为70%左右。

[0003] 最早的一项有关CD38生物学功能的报道则来源于States DJ等于1992年发表的文章(States DJ, Walseth TF and Lee HC. Trends Biochem. Sci. 1992,17:495)。在该研究报道中,States DJ等首次注意到了CD38分子与来源于海兔(Aplysia)的ADP核糖环化酶(Aplysia ADP-ribosyl cyclase)具有序列和结构上的同源性,并推测CD38应具有ADP核糖环化酶活性,可催化NAD⁺生成cADPR,而cADPR在细胞内作为第二信使,参与钙离子(Ca²⁺)的动员转运;CD38故又称为ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 1(ADPR1)。之后的其他研究也证实了这种推测并发现CD38蛋白分子还具有脱氧氢酶活性,可以进一步催化cADPR生成ADPR(Howard M et al. Science. 1993; 262:105; Summerhill RJ, Jackson DG, Galione A. FEBS Lett. 1993,335:231-3; Prasad GS et al, Nature Structural Biology 1996,3:957-964)。因此CD38具有双功能酶的活性,且其发挥这双功能酶活性位点均位于胞膜外结构区域。有关CD38分子结构及其酶活性与功能的研究可参见综述文章(Mehta K, Shahid U and Malavasi F: Human CD38, a cell-surface protein with multiple function. FASEB J. 1996,10; 1408-1417; George Shubinsky, Michael Schlesinger: The CD38 lymphocyte differentiation marker: new insight into its ectoenzymatic activity and its role as a signal transducer. Immunity 1997, 7: 315-324)。

[0004] CD38(T10)抗原则最早是由Feinnerz E及其同事于1980年报道与发现的:他们观察到来源于人的正常胸腺细胞和T-淋巴瘤细胞株MOLT-4表达一种可以被代号为OKT10的单克隆抗体特异结合的抗原,该抗原当时称之为T10(Feinnerz E et al. PNAS 1980, 77: 1588-1592)。此后的其他研究证明CD38(T10)抗原除了在T-淋巴细胞表达之外,还广泛表达在人体中的其他细胞如B-淋巴细胞、巨噬细胞、树突状细胞、血小板、骨髓浆细胞等血液、淋巴组织细胞中;此外,其他组织细胞如中枢神经系统中的神经细胞和胶质细胞、周围神经细

胞、胰腺中的胰岛细胞、骨组织中的破骨细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞和支气管上皮细胞等也表达不同水平的CD38(T10)抗原(参见综述文章:Mehta K, Shahid U and Malavasi F: Human CD38, a cell-surface protein with multiple function. FASEB J 10, 1408-1417)。

[0005] 但与其他组织细胞相比,CD38抗原在多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)及B-淋巴细胞瘤中表达水平相对最高,因此早在1990年代初CD38抗原就被认为是治疗多发性骨髓瘤及B-淋巴细胞瘤的理想靶点,并且先后有多个以靶向CD38抗原的单克隆抗体作为治疗药物,在动物体内外测试其治疗多发性骨髓瘤、B-淋巴细胞瘤的研究与报道:

[0006] 如Stevenson FK等在1991年报道了OKT10单抗经基因工程改造后,获得的人-鼠嵌合抗体体外可以通过抗体介导的依赖细胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity,ADCC)杀伤CD38表达阳性淋巴肿瘤细胞(Stevenson FK et al, Blood. 1991,7:1071-1079);

[0007] Goldmacher VS等在1994年报道了通过嫁接蓖麻毒素(ricin)到鼠抗人CD38单抗HB7,获得具免疫毒性(immunotoxin)的抗体-药物复合物(antibody-drug-conjugated, ADC),该抗体-药物复合物在体外表现出更强的杀伤CD38表达阳性肿瘤细胞的活性(Goldmacher VS et al.Blood. 1994,84:3017-25);

[0008] Ellis JH等则在1995年报道了另一个鼠源抗CD38单抗AT13/5经基因工程改造后的人源化抗体比其前身鼠源抗体具有更强的ADCC活性(Ellis JH et al, J Immunol. 1995,155:925-37)。

[0009] 然而,这些早期的研究结果其后并没有成功转化成有用的临床应用或进入临床研究。

[0010] 多发性骨髓瘤是一种恶性浆细胞病,其特征是骨髓中分泌的浆细胞潜在的积累,伴随低度增殖和延长细胞生长周期,可导致高钙血症、肾功能损伤、相邻骨髓组织摧毁及贫血等症状。在2015年之前,国内外临床上用于治疗多发性骨髓瘤的主要方法包括化疗药物如长春新碱(Vincristine)、环磷酰胺(Cyclophosphamide)、美法仑(Melphalan)、阿霉素(Adriamycin),免疫调节剂(Immunomodulators, IMiDs),蛋白酶体抑制剂(Proteasome Inhibitors, PIs)、双磷酸盐(Bisphosphonates)及激素如强的松(Prednisone)、地塞米松(Dexamethasone)及自体干细胞移植等。

[0011] 其中,免疫调节剂的代表性药物有美国新基制药(Celgene)公司先后开发上市的Thalomid(通用名 Thalidomide,1998年07月获美国FDA批准上市)、来那度胺Revlimid(通用名 lenalidomide,2005年12月获美国FDA批准上市)和泊马度胺Pomalyst(通用名 Pomalidomide,2013年02月获美国FDA批准上市)。

[0012] 蛋白酶体抑制剂的代表性药物有日本武田制药(Takeda/Millennium)开发的Velcade万珂(通用名 Bortezomib硼替佐米,2003年05月获美国FDA批准上市)、美国Onyx公司开发的Kyprolis卡非佐米(通用名 Carfilzomib,2012年07月获美国FDA批准上市)。双磷酸盐的代表性药物有诺华(Novartis)先后开发的Aredia(通用名 Pamidronate,1991年10月获美国FDA批准上市)和Zometa(通用名 Zoledronic acid,2001年08月获美国FDA批准上市)。

[0013] 但这些药物的联合用药后的完全反应率(Complete Response Rate, CRR)一般也

只有5%，患者中位生存期(Median Survival Time, MST)在首次被诊断后通常为36-48个月。因此，多发性骨髓瘤的治疗领域迫切需要开发出新的更有效的药物或治疗方法。

[0014] 多发性骨髓瘤的治疗领域在2015年11月因美国FDA批准了全球首个抗CD38单抗药物Daratumumab(达雷木单抗)用于治疗既往至少接受过三次包括Bortezomib硼替佐米和Lenalidomide来那度胺或同时对硼替佐米与来那度胺治疗后耐药的多发性骨髓瘤患者，而步入了具有革命性意义的、单抗药物靶向治疗的新时代。

[0015] Daratumumab商品名为Darzalex,是由美国强生Johnson & Johnson 子公司Janssen Biotech与丹麦Genmab公司联合开发的。Daratumumab是一种特异识别与结合人CD38抗原的全人源IgG1/kappa单抗,其最初来源于Genmab公司开发的一代号为005的抗人CD38单抗(de Weers et al. J Immunol 2001;186:1840-8;国际PCT申请号:PCT/DK2006/000166,美国专利号:US7829673B2)。前期非临床研究结果显示Daratumumab/005单抗可以通过补体依赖性细胞毒性(complement-dependent cytotoxicity, CDC),抗体依赖的细胞介导作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC),抗体依赖性细胞吞噬作用(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis, ADCP),及直接诱导肿瘤细胞发生凋亡(apoptosis)等多种机制快速杀死CD38抗原表达阳性的肿瘤如骨髓瘤。此外, Daratumumab/005单抗还能抑制CD38介导的酶活性(ADP-ribosyl cyclase)而发挥作用。

[0016] 2011年美国强生Johnson & Johnson与Genmab公司达成临床合作开发Daratumumab的协议。2013年Daratumumab因其在治疗骨髓瘤临床试验中显示出良好的单药活性,获得美国FDA快速通道指定(Fast Track Designation)及突破性疗法(Breakthrough Therapy Designation)药物产品认定。2015年11月美国FDA主要基于两项分别名为GEN501(Lokhorst HM et al, N Engl J Med. 2015, 373:1207-19)和SIRIUS(Lonial S et al, Lancet. 2016, 387:1551-60)的I/II期临床试验结果,快速批准了Daratumumab药物上市,用于四线治疗既往至少接受过三次包括bortezomib硼替佐米和lenalidomide来那度胺或同时对bortezomib硼替佐米和lenalidomide来那度胺治疗后耐药的多发性骨髓瘤患者。在GEN501和SIRIUS临床试验中,结果均显示注射剂量为16mg/kg体重的Daratumumab单抗治疗组中,患者的客观缓解率(Objective response rate, ORR)及中位无进展生存期(Progression-free survival, PFS)都有非常显著的改善。

[0017] Johnson & Johnson强生/Genmab公司在Daratumumab获批上市之后,其后又开展了代号分别为POLLUX和CASTOR的两项III期临床研究,其中POLLUX研究是评估Daratumumab与lenalidomide来那度胺及Dexamethasone地塞米松联合用药用于三线治疗骨髓瘤患者的临床疗效;该研究共入组骨髓瘤患者569例,其中Daratumumab与lenalidomide来那度胺及Dexamethasone地塞米松联合用药组286例(治疗组), lenalidomide来那度胺及Dexamethasone地塞米松联合用药治疗组283例(对照组)。研究结果显示:联用Daratumumab治疗组在12个月时无进展生存期(PFS)患者的比例为83.2%,客观缓解率(ORR)为92.9%,均显著高于对照组(PFS比例为60.1%, ORR为76.4%)(Dimopoulos et al. POLLUX Investigators, N Engl J Med. 2016, 375:1319-31)。

[0018] CASTOR研究则是评估Daratumumab与Bortezomib硼替佐米/万珂及Dexamethasone地塞米松用于三线治疗骨髓瘤患者的临床疗效;该研究共入组骨髓瘤患者498例,其中

Daratumumab与Bortezomib硼替佐米及Dexamethasone地塞米松联合用药组251例(治疗组) Bortezomib硼替佐米及Dexamethasone地塞米松联合用药对照组247例。研究结果显示联用Daratumumab治疗组在12个月时无进展生存期PFS患者的比例为60.7%，客观缓解率(ORR)为82.9%，均显著高于对照组(PFS比例为26.9%，ORR为63.2%) (Palumbo A et al, CASTOR Investigators. *N Engl J Med.* 2016, 375:754-66)。

[0019] 基于上述POLLUX和CASTOR的两项临床III期研究，美国FDA于2016年11月批准了Daratumumab与lenalidomide来那度胺及Dexamethasone地塞米松联合用药或Daratumumab与Bortezomib硼替佐米及Dexamethasone地塞米松联合用药，用于三线治疗骨髓瘤。

[0020] 基于代号为EQUULEUS (MMY1001) 的临床研究结果，美国FDA于2017年06月又批准了Daratumumab联合Pomalidomide泊马度胺及Dexamethasone地塞米松用于二线治疗骨髓瘤。在EQUULEUS (MMY1001) 临床研究中显示Daratumumab联合Pomalidomide泊马度胺及Dexamethasone地塞米松治疗骨髓瘤患者的客观缓解率(ORR)为60%，中位无进展生存期PFS为8.8个月，中位总生存期17.5个月(Ajai Chari, et al, EQUULEUS; MMY1001 Investigators: *Blood.* 2017, 130: 974-981)。

[0021] 基于代号为ALCYONE的临床研究结果，美国FDA于2018年05月又最新批准了Daratumumab与Bortezomib硼替佐米、Melphalan美法仑和Prednisone强的松一起联合用药，用于一线治疗未接受高剂量化疗和自体干细胞移植(ASCT)的新诊断骨髓瘤患者。ALCYONE研究共入组了706例骨髓瘤患者，结果显示Daratumumab联合用药组在18个月时无进展生存期(PFS)患者的比例为71.6%，客观缓解率(ORR)为90.9%，均显著高于对照组(PFS比例为50.2%，ORR为73.9%) (Mateos M-V et al, ALCYONE Investigators. *N Engl J Med.* 2018, 378:518-528)。

[0022] 因此，Daratumumab自2015年11月首次获美国FDA批准上市之后，在短短的3年时间里便从当初的单药四线治疗骨髓瘤药物一步步晋升为一线治疗药物，并很快成为市场上畅销的重磅级药物品种。Daratumumab是目前全球唯一已获批上市的抗CD38单抗药物；目前其他已进入临床试验的抗CD38单抗药物仅有赛诺菲(Sanofi)/Immungen公司合作开发的人-鼠嵌合单抗 SAR650984 (Isatuximab) 及德国制药公司MorphoSys从phage-display抗体库中筛选获得的全人源单抗MOR202单抗，这几个抗体药物目前所开发的临床主要适应症也都是骨髓瘤。

[0023] 在中国，目前骨髓瘤的治疗主要药物为进口的Bortezomib硼替佐米/万珂、lenalidomide来那度胺等。随着Bortezomib(硼替佐米/万珂)等药物的专利到期，国内已有几十家企业研制其仿制药，其中齐鲁制药、正大天晴药业和江苏豪森药业研制的Bortezomib硼替佐米仿制药物近期均已获中国药监局(CFDA)批准上市销售，用于治疗骨髓瘤。而以CD38为靶点的单克隆抗体药物，仅有上述强生公司的Daratumumab，赛诺菲公司的SAR650984 (Isatuximab) 单抗等个别进口品种在国内已完成提交临床试验申请或刚进入临床试验，目前还未见有国内企业自主研发的抗CD38单抗药物进入临床试验申请或临床试验阶段。

[0024] 鉴于国内外骨髓瘤患者发病人数众多，用于治疗骨髓瘤药物尤其是抗体药物的严重匮乏，因此，研究与开发出新的治疗骨髓瘤的药物、尤其是靶向CD38抗原的单抗药物则很有意义与必要。

[0025] Daratumumab尽管自海外上市以来获得了临床医生、患者及市场的广泛好评,但其也还存在不少缺陷与不足,其缺陷与不足至少包括如下几点:

[0026] 1) 患者接受静脉滴注Daratumumab药物时,临床上发生输注不良反应的比例很高,且给药时间较长,如首次静脉注射需要历经8小时,此后再次注射也需5-6小时,且为期8周的第一疗程中患者需要每周接受一次治疗;

[0027] 2) 部分骨髓瘤患者临床上对Daratumumab治疗无应答疗效;另还有一些患者在接受Daratumumab治疗后疾病还是继续进展或发生耐药现象;目前还不清楚患者对Daratumumab治疗产生耐药或失败的原因与机理;

[0028] 3) Daratumumab不识别猴CD38抗原,限制了其在猴等非人类灵长类动物中开展单药或与其他药物组合使用的临床前药效、药理毒理等研究与开发应用。

[0029] 鉴于小鼠CD38与人CD38蛋白氨基酸序列同源性的70%左右,因此,理论上推测采用传统的抗原蛋白免疫小鼠及杂交瘤技术,应可以制造或开发出全新的、或针对CD38抗原不同表位(epitope)的单克隆抗体。而从这些全新的、或识别CD38抗原特异表位(epitope)的单克隆抗体中,有望开发出比现已上市的Daratumumab或正在开展临床研究的其他CD38单抗具更强的生物活性或更安全的药物。这些新的单抗可作为单药,或与目前已上市的治疗骨髓瘤的其他药物如Bortezomib硼替佐米、Lenalidomide来那度胺等药物联合或序贯使用,用于治疗CD38高表达肿瘤如骨髓瘤及淋巴瘤等疾病。

发明内容

[0030] 本发明要解决的技术问题之一是提供一种抗原结合区域/结合位点(epitope)不同与现有的Daratumumab的、全新的结合人及猴CD38抗原的、并具体内外杀伤CD38抗原高表达肿瘤等生物活性的单克隆抗体或其衍生体如抗体Fab片段、单链抗体等。

[0031] 本发明要解决的技术问题之二是提供编码上述抗体的DNA分子或基因。

[0032] 本发明要解决的技术问题之三是提供含有上述抗体的药物或药物组合物。

[0033] 本发明要解决的技术问题之四是提供含有上述抗体的药物或药物组合物在治疗CD38抗原高表达阳性肿瘤的应用。

[0034] 本发明要解决的技术问题之五是提供制备上述抗体的方法。

[0035] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:

[0036] 在本发明第一方面,提供了一种抗原结合区域/结合位点(epitope)不同于现有的Daratumumab的、全新的抗CD38的单克隆抗体或其衍生体,其包含第一可变区和第二可变区,其中所述第一可变区是抗体轻链可变区,其抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:3,SEQ ID NO:4 及SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列;其中所述第二可变区是抗体重链可变区,其抗原互补决定区CDR1,CDR2和CDR3分别为SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:9 及SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列。

[0037] 所述抗体包括人-鼠嵌合、半嵌合/半人源、人源化单克隆抗体,所述衍生体包括抗体Fab片段、单链Fab-片段、Fv-片段、单链抗体、双特异抗体(bi-specific)、抗体-药物嫁接物(antibody-drug-conjugated,ADC)、嵌合抗原T细胞受体(chimeric antigen receptor T-Cell, CAR-T)等。

[0038] 作为本发明优选的技术方案,所述第一可变区是抗体轻链可变区,为SEQ ID NO:2

所示的氨基酸序列;所述第二可变区是抗体重链可变区,为SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0039] 作为本发明优选的技术方案,所述第一可变区是抗体轻链可变区,为SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列;所述第二可变区是抗体重链可变区,为SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列或为SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列。

[0040] 作为本发明优选的技术方案,其包含所述抗体轻链可变区和人抗体轻链恒定区,及包含所述抗体重链可变区和人抗体重链恒定区的铰链区,CH1区,CH 2区和CH3区。

[0041] 作为本发明优选的技术方案,所述人抗体轻链恒定区来自人抗体kappa链或抗体lambda链,所述人抗体重链恒定区来自人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4等亚型,其中优选的为IgG1。

[0042] 在本发明第二方面,提供了一种编码上述抗体或其衍生体的DNA分子或基因,其抗体轻链可变区为SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:13所示的核苷酸序列,抗体重链可变区为SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:14的核苷酸序列。

[0043] 本发明的第三方面是提供了一种表达载体,它含有编码上述抗体或其衍生体的DNA分子/基因核苷酸序列以及与该序列操作性相连的表达调控序列。

[0044] 本发明的第四方面提供了一种重组宿主细胞,它由上述表达载体转化而成。该重组宿主细胞或其子代细胞表达上述抗体或其衍生体。该抗体包括人源化单克隆抗体,衍生体包括抗体Fab片段、单链抗体、双特异抗体(bi-specific)等。

[0045] 本发明的第五方面是提供一种药物或药物组合物,它含有药学上有效量的上述抗体或其衍生体,以及药学上可接受的载体。

[0046] 本发明的第六方面是提供上述抗体的药物或药物组合物在制备治疗肿瘤的药物中的应用,尤其在治疗CD38表达阳性的肿瘤的药物中的应用。所述CD38表达阳性的肿瘤优选为人骨髓瘤,淋巴瘤(淋巴瘤)等。在本发明的具体实施实例中,本发明描述了该抗体在体内抑制高表达CD38的人B-淋巴瘤Raji生长的应用。

[0047] 作为本发明优选的另一技术方案,本发明中的抗CD38抗体在治疗CD38表达阳性的肿瘤时,可以更多考虑采用野生型或基因改造过的人IgG1、IgM亚型抗体的恒定区,以保持或提高抗体的ADCC或CDC,达到更强的杀伤肿瘤组织与细胞的效果。野生型或基因改造过的人IgG1、IgM亚型抗体的恒定区可以采用本领域人员已知的基因工程技术克隆获得,或体外合成制备。

[0048] 本发明中的抗CD38抗体或其衍生体,还可作为靶向载体与其他抗肿瘤药物或毒素嫁接或包裹在一起,形成抗体-药物偶联物(antibody-drug-conjugated,ADC),一同靶向肿瘤组织,达到更好的杀伤肿瘤的效果。抗体与药物或毒素的嫁接或包裹方法可以采用本领域人员已知的通用技术。

[0049] 作为本发明优选的另一技术方案,本发明中的抗CD38抗体或其衍生体,还可与抗肿瘤血管增生药物或靶向免疫抑制检查点(inhibitory immune checkpoint molecules)的药物序贯或合并使用,用于治疗CD38表达阳性的肿瘤。

[0050] 其中与本发明中的抗CD38抗体或其衍生体序贯或合并使用的抗肿瘤血管增生药物可以优选靶向VEGF或VEGF受体(VEGF-R)的大分子生物药物或小分子化学药物。其中优选的靶向VEGF/或VEGF-R的大分子生物药物包括抗-VEGF单抗药物贝伐单抗(Bevacizumab,

商品名Avastin)、抗VEGF单抗Fab片段雷珠单抗(Ranibizumab,商品名Lucentis);抗-VEGFR2单抗雷莫卢单抗(Ramucirumab,商品名Gyramza)及代号为hPV19的抗-VEGF单抗(思坦维公司目前在研药物,见中国专利文献:授权专利号:201210540692X,专利名称:拮抗抑制血管内皮细胞生长因子与其受体结合的单克隆抗体及其编码序列与用途;及授权专利号为US9580498B2的美国专利文献);或VEGF受体-Fc融合蛋白药物如阿普西普(Albercept,商品名:Eylea)、康帕西普(conbercept)等。优选的靶向VEGF受体的小分子化学药物包括舒尼替尼(Sunitinib)、索拉非尼(sorafenib)、阿帕替尼(apatinib)、帕唑帕尼(Pazopanib)等。

[0051] 而与本发明中的抗CD38抗体或其衍生体序贯或合并使用的靶向免疫抑制检查点优选药物包括抗-CTLA4(Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4)Ipilimumab伊匹单抗(商品名Yervoy);抗PD-1(programmed death protein-1)单抗Nivolumab(商品名Opdivo)、Pembrolizumab(商品名Keytruda)及思坦维公司在研的抗PD-1单抗hAB21(见PCT专利申请文件:PCT/CN2017/089282,拮抗抑制人PD-1抗原与其配体结合的单克隆抗体及其制备方法与应用);抗PD-L1单抗药物包括Atezolizumab(商品名Tecentriq)、Avelumab(商品名Bavencio)、Durvalumab(商品名Imfinzi)等。

[0052] 作为本发明优选的另一技术方案,本发明中的抗CD38抗体还可先制备成嵌合抗原T细胞受体(chimeric antigen receptor T-Cell, CAR-T),体外导入到从肿瘤患者外周血液中分离获得的免疫细胞如T-淋巴细胞中,再经体外培养扩增后,这些具识别CD38抗原的淋巴细胞再回注入体内,在体内发挥靶向高表达CD38抗原的肿瘤,从而达到治疗肿瘤的效果。将本发明中的抗CD38抗体制备成嵌合抗原T细胞受体(CAR-T)可以采用本领域技术人员已知的常规技术

[0053] 本发明第七方面是提供制备上述抗体或其衍生体的方法,该方法包括:

[0054] a) 提供一表达载体,该表达载体含有上述DNA序列以及与该序列操作性相连的表达调控序列;

[0055] b) 用步骤a)所述的表达载体转化宿主细胞;

[0056] c) 在适合所述抗体表达的条件下培养步骤b)所得的宿主细胞,和

[0057] d) 从该宿主细胞培养液中分离纯化获得所述抗体。

[0058] 本文所采用的术语“单克隆抗体(单抗)”指从一纯系细胞得到的免疫球蛋白,具有相同的结构和化学特性,对单一抗原决定簇有特异性。单克隆抗体与常规多克隆抗体制剂(通常是具有针对不同决定簇的不同抗体)不同,各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体的好处还在于它们是通过杂交瘤或重组工程细胞培养获得,不会混杂有其它免疫球蛋白。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性,是从均一的抗体群中获得的,这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

[0059] 本文所采用的术语“人源化单克隆抗体”系将鼠源单克隆抗体的氨基酸序列除保留互补决定区(complementarity-determining regions, CDR)外,其它序列(包括可变区中的框架区序列)全部或大部分替换成人免疫球蛋白的氨基酸序列,以达到通过基因工程手段最大限度地降低鼠源性单克隆抗体的免疫原性。

[0060] 本文所用的术语“抗体”和“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共

价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH)。其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

[0061] 本文所用的术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中成为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(Framework regions, FR)。抗体重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈 β -折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ. No. 91-3242,卷1,647-669页(1991))。抗体恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性(Antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)或补体介导毒性(Complement-dependent cytotoxicity, CDC)。

[0062] 本发明的抗体通常可以通过以下方法来制备:

[0063] 首先,将含有编码本发明的抗体的基因插入到含有合适的表达调控序列的表达载体中。

[0064] 本文所用的术语“表达调控序列”通常指参与控制基因表达的序列。表达调控序列包括与目标基因操作性相连的启动子和终止信号。编码本发明抗体的基因(DNA)序列可用本领域技术人员熟知的常规手段,如根据本发明公开的蛋白质序列人工合成或用PCR法扩增得到。其后可用本领域熟知的各种方法将合成或PCR扩增得到的DNA片段插入到合适的表达载体中。本发明中所用的表达载体可以是本领域技术人员已知的市售表达载体,如Invitrogen公司的pCDNA3.1表达载体。

[0065] 用于接纳表达载体转化的合适宿主细胞一般包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞等。在本发明中,较佳的宿主细胞是哺乳动物细胞,尤其是中华仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0066] 表达载体转化的宿主细胞在合适的条件下(如以无血清培养基在细胞培养瓶或生物反应器中贴壁或悬浮培养)培养后,收获培养上清液,然后用包括protein-A亲和层析、离子交换层析、过滤除菌等本领域技术人员熟知的常规分离步骤或手段纯化得到本发明的抗体。

[0067] 纯化得到的本发明抗体可以溶于适当的溶剂如无菌生理盐水液体中,溶度可以制备成0.01至100 mg/ml 之间,理想的最终溶度可以制备成1至20 mg/ml 之间。

[0068] 为获得一种全新的特异结合人CD38抗原的鼠源单克隆抗体及分泌它的杂交瘤细胞系,本发明选取哺乳动物表达的重组人CD38胞膜外蛋白为免疫抗原,通过反复多次小剂量的小鼠皮下免疫,获得分泌抗CD38蛋白的多克隆抗体;再从中挑取含高效价抗体的小鼠,取其脾脏细胞,通过体外与小鼠骨髓瘤细胞融合、再经药物筛选及亚克隆等步骤而建立了多株稳定分泌抗人CD38蛋白的抗体的杂交瘤单克隆细胞。其中一代号为m29的小鼠杂交瘤

细胞株,经ELISA、流式细胞仪等多种方法鉴定,证实其所分泌的单克隆抗体不但能够高亲和力特异结合人CD38蛋白及CD38表达阳性的来源与人的多种肿瘤细胞株。此外,m29的小鼠杂交瘤细胞株分泌的抗体在体外可通过CDC杀死CD38抗原表达阳性的肿瘤细胞。

[0069] 本发明通过基因工程等手段获得了编码该鼠源抗体重链可变区及轻链可变区的基因片断,在此基础上对该抗体进行了基因工程改造,获得表达其人-鼠嵌合抗体,或人源化抗体的载体。该表达载体经转染进入中华仓鼠卵巢(CHO)细胞,获得稳定高效分泌表达人-鼠嵌合抗体,或人源化抗体的重组工程细胞,并从重组工程细胞培养液中分离纯化获得到具有生物活性的人-鼠嵌合抗体ch29蛋白或人源化抗体HH29蛋白。

[0070] 体外采用包括竞争ELISA,流式细胞仪等多种方法鉴定分析表明:该鼠源单抗m29及其人-鼠嵌合抗体(ch29)与CD38抗原的结合位点(epitope)不同与Daratumumab。体外直接ELISA及流式细胞仪等分析结果还表明:该鼠源单抗m29及其人-鼠嵌合抗体ch29也可以与猴CD38重组蛋白及表达猴CD38重组基因的CHO细胞株高亲和力特异结合;而Daratumumab单抗仅结合人CD38抗原,与猴CD38抗原无明显结合。

[0071] 在免疫缺陷小鼠(node mice)体内测试鼠源m29单抗及人-鼠嵌合m29单抗(ch29)的抗肿瘤疗效,结果表明鼠源单抗m29及其人-鼠嵌合抗体ch29体内给药后对肿瘤生长有明显的抑制作用,且疗效不亚于已上市的阳性对照药物Rituximab(商品名Rituxan,人-鼠嵌合抗人CD20单抗)或Daratumumab。

附图说明

[0072] 图1为本发明实施例1中人CD38与小鼠CD38蛋白氨基酸序列比对分析示意图。

[0073] 图2A 为本发明实施例1中以ELISA法筛选获得的分泌抗CD38抗体的各杂交瘤细胞株的代号及检测OD值的示意图。

[0074] 图2B为本发明实施例2中以CDC方法验证经ELISA筛选获得的分泌抗CD38抗体的杂交瘤细胞株上清液体外杀伤Daudi靶细胞的活性结果示意图,其中使用的靶细胞为Daudi,RFU为Relative Fluorescence Unit(相对荧光单位)的缩写。

[0075] 图3A为本发明实施例3中以CDC方法进一步检测分析小鼠杂交瘤细胞株m29上清液的CDC活性结果示意图,其中使用的靶细胞为Daudi,阳性对照样品为Daratumumab,阴性对照样品为小鼠SP2/0骨髓瘤细胞细胞株;

[0076] 图3B为本发明实施例3中阳性对照样品Daratumumab的CDC检测结果示意图;

[0077] 图3C为本发明实施例3中小鼠杂交瘤细胞株m29上清液样品的CDC检测结果示意图。

[0078] 图4为本发明实施例4中以流式细胞仪检测分析小鼠杂交瘤细胞株m29上清样品与CD38抗原表达阳性的人肿瘤细胞株结合的合代表性结果图,阴性对照样品为非相关鼠源单抗mAB21(小鼠抗人PD-1 单抗);其中:

[0079] 图4A为人B-淋巴瘤细胞株Daudi的流式细胞仪检测结果图;

[0080] 图4B为人骨髓瘤细胞株RPMI-8226的流式细胞仪检测结果图;

[0081] 图4C为人T-淋巴瘤细胞株MOLT-4细胞的流式细胞仪检测结果图。

[0082] 图5为本发明实施例5中以流式细胞仪检测分析鼠源单抗m29样品及阳性对照样品Daratumumab与转染表达人CD38基因的CHO细胞(CHO-hCD38)结合的代表性结果图;阴性

对照样品为非相关鼠源单抗mAB21(小鼠抗人PD-1 单抗)或人源化hAB21单抗;其中:

[0083] 图5A为鼠源单抗m29样品的流式细胞仪检测结果图;

[0084] 图5B为阳性对照样品Daratumumab的流式细胞仪检测结果图。

[0085] 图6本发明实施例6中以竞争性ELISA检测纯化的鼠源单抗m29样品与Daratumumab相互之间竞争结合CD38的示意图;非相关人源化单抗样品hPV19(抗VEGF单抗)为阴性对照样品;其中:

[0086] 图6A为鼠源单抗m29及Daratumumab与Biotin 标记的Daratumumab样品竞争结合CD38的结果图;

[0087] 图6B为鼠源单抗m29及Daratumumab与Biotin 标记的m29单抗竞争结合CD38的结果图。

[0088] 图7为本发明实施例7中的鼠源单抗m29的可变区氨基酸序列与Daratumumab可变区氨基酸序列比对分析图,其中:

[0089] 图7A为轻链可变区氨基酸序列比对分析图;m29单抗不同于Daratumumab之处氨基酸均以“X”符号表示,方框标识的氨基酸序列区域为轻链可变区的CDR1,CDR2及CDR3;

[0090] 图7B则为重链可变区氨基酸序列比对分析图;m29单抗不同于Daratumumab单抗之处氨基酸均均以“X”符号表示,方框标识的氨基酸序列区域为重链可变区的CDR1,CDR2及CDR3。

[0091] 图8为本发明实施例 9中以流式细胞仪检测分析鼠源单抗m29样品、人-鼠嵌合抗体ch29G及阳性对照样品Daratumumab或Rituximab (Rituxan,人-鼠嵌合抗人CD20单抗)与来源于人的肿瘤细胞株结合的代表性结果图;其中:

[0092] 图8A为人B-淋巴瘤细胞株Raji的流式细胞仪检测结果图;

[0093] 图8B为人骨髓瘤肿瘤细胞株RPMI-8226的流式细胞仪检测结果图;

[0094] 图8C为人T-淋巴瘤细胞株MOLT-4的流式细胞仪检测结果图;

[0095] 图8D 为人T-淋巴瘤细胞株Jurkat的流式细胞仪检测结果图。

[0096] 图9为本发明实施例10中体外CDC检测分析鼠源单抗m29样品、人-鼠嵌合抗体ch29G样品及对照样品Daratumumab活性的结果图,其中使用的靶细胞为人B-淋巴瘤细胞株Daudi,补体来源为兔血清,阴性对照样品为非相关人源化hPV19单抗(抗VEGF单抗)。

[0097] 图10为本发明实施例11中以流式细胞仪检测鼠源单抗m29样品、人-鼠嵌合抗体ch29G样品及对照样品Daratumumab分别与稳定转染表达野生型人CD38的CHO细胞(CHO-human CD38/wild type),或稳定转染表达表达S274F点突变CD38的CHO细胞(CHO-human CD38/S274F mutation)的结合结果图,阴性对照样品为非相关人源化hAB21单抗(抗人PD-1单抗)。其中,图10A为表达野生型(wild-type)人CD38的CHO细胞的检测结果图;图10B则为表达点突变人CD38的CHO细胞(CHO/hCD38-S274F)的检测结果图。

[0098] 图11A为本发明实施例12中人CD38、猩猩CD38及食蟹猴CD38蛋白氨基酸序列比对分析结果图。

[0099] 图11B为本发明实施例12中以流式细胞仪检测单抗m29样品、人-鼠嵌合抗体ch29G样品及对照样品Daratumumab与稳定转染表达食蟹猴CD38基因的CHO细胞(CHO-cynomolgus CD38)结合结果图,其中阴性对照样品为非相关人源化hAB21单抗(抗人PD-1单抗)。

[0100] 图12为本发明实施例13中以ELISA检测比较人-鼠嵌合抗体ch29G样品及

Daratumumab单抗分别与重组人CD38蛋白(图12A)及重组食蟹猴CD38蛋白(图12B)的结合结果图,其中阴性对照样品为Rituximab (Rituxan,人-鼠嵌合抗人CD20单抗)。

[0101] 图13为本发明实施例14中CDC检测分析人-鼠嵌合抗体ch29G样品、Daratumumab及阳性对照样品Rituximab (人-鼠嵌合抗人CD20单抗)活性的结果图,补体来源为人血清,阴性对照样品为非相关人源化hPV19单抗(抗VEGF单抗),其中:

[0102] 图13A为以人B-淋巴瘤细胞株Daudi为靶细胞的CDC检测结果图;

[0103] 图13B为以人B-淋巴瘤细胞株Raji为靶细胞的CDC检测结果图;

[0104] 图13C为以人T-淋巴瘤细胞株MOLT-4为靶细胞的CDC检测结果图;

[0105] 图13D为以人T-淋巴瘤细胞株Jurkat为靶细胞的CDC检测结果图。

[0106] 图14为本发明实施例17中在裸鼠皮下种植人B-淋巴瘤Raji肿瘤模型中测试鼠源m29单抗的体内抗肿瘤疗效结果图。其中:图14A为种植肿瘤前10天的平均增长体积示意图;图14B为种植肿瘤后期的平均增长体积示意图。

[0107] 图15为本发明实施例18中在裸鼠皮下种植人B-淋巴瘤Raji肿瘤模型中测试人-鼠嵌合抗体ch29样品的体内抗肿瘤疗效结果图。

具体实施方式

[0108] 下面将结合实施实例来进一步描述本发明,这些实施例只是为了起说明作用,而不是用来限制本发明。

[0109] 本发明中使用的肿瘤细胞株及DNA引物(primer)分别见表1及表2:

[0110] 表1:本发明中使用的肿瘤细胞株名称及其特征

[0111]

细胞株名称 (ATCC 代号)	肿瘤起始来源	表面抗原特征	主要参考文献
Daudi (CCL-213)	B-lymphoblast. Burkitt's lymphoma 患者	CD20+ , CD38+ , sIgM+	Klein E, et al. Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cells. Cancer Res. 28: 1300, 1968
Raji (CCL-86)	B-lymphoblast. Burkitt's lymphoma 患者	CD38+ , CD20+ , sIgM-	Pulvertaft JV. Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma) Lancet 1: 238-240, 1964
RPMI8226 (CCL-155)	B-lymphoblast. myeloma 患者	CD19-,CD20-, CD28+,CD38+,CD49+ sIgM-	Matsuoka Y, et al. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125: 1246-1250, 1967
Molt-4 (CCL-1582)	T-lymphoblast. acute lymphoblastic leukemia 患者	CD3A (26%), CD3B (33%), CD3C (34%), CD4(55%)	Minowada J, et al. J. Natl. Cancer Inst. 49: 891-895, 1972
Jurkat (TIB-152)	T-lymphoblast, acute T-cell leukemia 患 者	CD3+, CD4+	Gillis S, Watson J. J. Exp. Med. 152: 1709-1719, 1980

[0112] 表2:本发明中使用的引物名称 (primer) 及其序列

[0113]

引物名称(primer)	序列 Sequences
1.huCD38F- HindIII-2	TTGTAAGCTTGCCGCCACCATGGCTAACTGCGAGTTCTCC (SEQ ID NO: 15)
2.huCD38-S274F-R1	CTTATCGGGCCTATAGATATTTTGCAGAAGAACGGATGTTCCGCTT GCTGATGATGC (SEQ ID NO: 16)
3.huCD38-S274F-R2- XhoI	TGGTCTCGAGTCAGATCTCGGAGGTGCAGCTGGAGTCTTCGGGGTTC TTCACGCACTGTAAAAACTTATCGGGCCTATAGATATT (SEQ ID NO: 17)
4.mKaRT	TGTCGTTCACTGCCATCAAT (SEQ ID NO: 18)
5.mGaRT	GCAAGGCTTACAACCACAATC (SEQ ID NO: 19)
6.mIgLF1	GACATTGTGATGWCMCA (W=A 或 T, M=A 或 C) (SEQ ID NO: 20)
7.mIgLCR440	CTGAGGCACCTCCAGATGTT (SEQ ID NO: 21)
8.mIgHset1	CARCTGCARCARYCT (G, R=A 或 G, Y=C 或 T) (SEQ ID NO: 22)
9.mIgHCR135	GTGCTGGAG GGG ACA GTC ACT (SEQ ID NO: 23)

[0114] 实施例1:分泌抗CD38抗体的小鼠杂交瘤细胞系的建立与筛选鉴定

[0115] 1.1人CD38蛋白的氨基酸序列与小鼠CD38蛋白的氨基酸序列比对分析

[0116] 人CD38蛋白的氨基酸序列与小鼠CD38蛋白的氨基酸序列比对分析如图1(其中的以方框斜体标注的氨基酸序列为跨细胞膜区域)。如图1所示:人CD38与小鼠CD38蛋白氨基酸序列整体相同性仅有59%,因此推测,如采用传统的抗原蛋白免疫小鼠及杂交瘤制备技术,应可以制备出针对各种不同结合区域或氨基酸结合位点的鼠抗人CD38单克隆抗体。这些抗人CD38单克隆抗体,或因其抗原结合区域/结合位点(epitope)不同于已有CD38单抗如Daratumumab,其体内外生物活性及疗效有望不同于或甚至更优于这些单抗。这类识别新位点的、全新的CD38单抗作为药物成分,一方面可与目前已上市的骨髓瘤治疗药物如Bortezomib硼替佐米、lenalidomide来那度胺等联合或序贯使用,达到增强骨髓瘤治疗疗效的作用;另一方面,这些单抗药物也有望开发成为用于治疗CD38表达阳性的其他肿瘤如B-淋巴细胞瘤,T-淋巴细胞瘤等。

[0117] 为此,本发明开展了这类全新的CD38 单抗研发与制备,其具体制备步骤如下:

[0118] 1.2分泌抗CD38抗体的小鼠杂交瘤细胞系的建立与筛选鉴定

[0119] 步骤1. 重组人CD38蛋白(免疫抗原)的来源与动物免疫

[0120] 在本发明实施例中,用于免疫的抗原为由哺乳动物表达的重组人CD38胞膜外蛋白(Human CD38 Protein-His Tag, 北京义翘神州公司产品, Catalog:10818-H08H)。该重组人CD38蛋白与弗氏完全佐剂(美国Sigma公司产品)混合后,于皮下多点注射Balb/c小鼠(100 μ l/只,每次10 μ g CD38蛋白)。首次免疫3周后用不完全佐剂混合CD38蛋白,按10 μ g/只的剂量皮下多点免疫;此后每隔2周用同样方法加强免疫2-3次,第3次加强免疫一周后取小鼠尾静脉血收集血清,用包被重组人CD38蛋白的96-板以酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测小鼠血清中抗CD38抗体的滴度。

[0121] 该ELISA检测步骤如下:以重组人CD38蛋白(2 μ g/ml, pH 9.6, 0.1 M NaHCO₃液)包被96-孔酶标板,37 $^{\circ}$ C包被2小时后,再加入2% 牛血清白蛋白(BSA)4 $^{\circ}$ C封闭过夜。次日,包被板经PBS-0.1% Tween20 液洗涤后,加入倍比稀释的免疫小鼠血清样品(以未免疫的小鼠血清为阴性对照)37 $^{\circ}$ C孵育2小时;经PBS-0.1% Tween20 液洗涤后,加入辣根过氧化物酶HRP-标记的羊抗小鼠IgG(美国Sigma公司产品),37 $^{\circ}$ C孵育1小时;再经PBS-0.1% Tween20 液充分洗涤后,加入邻苯二胺(OPD)-0.1% H₂O₂底物液显色10-15min后再加入0.1 M HCl终止反应。其后在多功能酶标仪(PerkinElmer Victor X3)中读取492nm 处OD值。取抗体滴度相对较高的小鼠的脾细胞用于下一步的细胞融合。

[0122] 步骤2、细胞融合

[0123] 在末次免疫(第4次加强免疫)后3-4天,无菌制备小鼠脾细胞悬液,与小鼠SP2/0骨髓瘤细胞(购自中国科学院上海生命科学院细胞保藏中心),以5:1或10:1的比例在50% PEG-1000(美国Sigma 公司产品)作用下融合。融合按常规法(Kohler G. and Milstein C: Nature 1975, 256:495-497), PEG用量1ml, 60秒内缓慢加完。反应90秒后,以无血清的RPMI-1640培养基终止反应,1000rpm离心10 min,去除上清液,再将离心沉淀下的细胞以含10% HAT(H为次黄嘌呤、A氨基嘌呤、T胸腺嘧啶核苷,为美国Sigma公司产品)的RPMI 1640-10% FCS培养基将细胞浓度调节至 1×10^6 /ml,加入96孔平底细胞培养板(每孔200 μ l),于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱中(美国Thermo公司产品)培养2-3周。

[0124] 步骤3、酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选抗CD38抗体分泌阳性的小鼠杂交瘤细胞

[0125] 采用上述筛选检测小鼠血清中抗CD38抗体的滴度的相同的酶联免疫吸附试验(ELISA)方法筛选小鼠杂交瘤细胞培养上清液中是否含有抗CD38抗体。

[0126] 该ELISA检测步骤如下:以重组人CD38蛋白(2 μg/ml, pH 9.6, 0.1 M NaHCO₃液)包被96-孔酶标板,37 °C包被2小时后,再加入2%牛血清白蛋白(BSA)4 °C封闭过夜。次日,包被板经PBS-0.1% Tween20 液洗涤后,加入待检杂交瘤细胞培养上清液样品(以未融合的SP2/0骨髓瘤细胞培养上清为阴性对照, CD38抗原免疫后小鼠血清样品(以1:200稀释)为阳性对照)37 °C孵育2小时;经PBS-0.1% Tween20 液洗涤后,加入辣根过氧化物酶HRP-标记的羊抗小鼠IgG(美国Sigma公司产品),37 °C孵育1小时;再经PBS-0.1% Tween20 液充分洗涤后,加入邻苯二胺(OPD)-0.1% H₂O₂底物液显色10-15min后再加入0.1M HCl终止反应。其后在多功能酶标仪(PerkinElmer Victor X3)中读取492nm处OD值。

[0127] 一共筛选了600多个小鼠杂交瘤细胞克隆,结果获得10多个分泌抗CD38抗体的阳性杂交瘤克隆(阳性克隆的判断标准:OD值比阴性对照样品的OD值高5倍以上)。

[0128] 图2A为经该ELISA筛选获得的分泌结合CD38抗原的阳性的各杂交瘤细胞株的代号及检测OD值。这些阳性杂交瘤细胞再经扩增培养后于-70 °C下冻存。

[0129] 实施例2:补体依赖细胞毒性(complement-dependent cytotoxicity,CDC)方法体外筛选与检测分析分泌抗CD38抗体阳性的杂交瘤细胞株上清液

[0130] 在本实施例中,用于体外筛选与检测分析抗CD38抗体阳性的杂交瘤细胞株上清液的补体依赖细胞毒性(complement-dependent cytotoxicity,CDC)的方法概述如下:

[0131] 2.1实验材料

[0132] 细胞培养基:RPMI-1640 Hyclone

[0133] 胎牛血清:美国GIBCO公司产品

[0134] 靶细胞:人B-淋巴瘤细胞株Daudi(人CD38+, CD20+B-lymphoma cell line或其他肿瘤细胞株,购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)

[0135] 补体来源:人血清/幼兔血清/兔补体(健康)(自制)

[0136] 供试品:抗CD38单克隆抗体阳性杂交瘤细胞株上清液(自制)

[0137] 阳性对照样品:Daratumumab(抗CD38人源化单抗),或 Rituximab(抗CD20人-鼠嵌合单抗)

[0138] 阴性对照样品:hPV19 单抗(抗VEGF人源化单抗)

[0139] 细胞活力检测盒:CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega 产品)

[0140] 96-孔细胞培养板:Corning-3610

[0141] 2.2实验步骤

[0142] 1)取10 μl稀释后的测试样品(抗体样品起始最高浓度为20-200 μg/ml,5-倍或3-倍梯度稀释;杂交瘤上清则直接取10 μl上样)加入96孔板相应孔中;

[0143] 2)收集对数生长期靶细胞(Daudi细胞或其他CD38 抗原表达阳性靶细胞),用CDC稀释液(1% FBS RPMI1640培养基)洗涤一遍,计数,细胞活率应大于90%,将重悬的细胞浓度调整至 2.5×10^5 个/ml;

[0144] 3)加入靶细胞至96孔板中(Corning-3610),80 μl/孔,每孔约 2×10^4 个细胞,放置37°C-5%CO₂培养箱孵育30分钟;

[0145] 4) 加入稀释后的幼兔血清或人血清(均先用CDC稀释液1:10或1:20稀释),10 μ l/孔,放置37度-5%CO₂培养箱孵育1-2小时;

[0146] 5) 在加入细胞活力检测试剂前,将细胞培养板和细胞活力检测(CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability kit)和96孔板避光放置30分钟平衡至室温,再每孔加入100uL配置好的试剂,室温避光显色10-15分钟后,应用多功能酶标仪(PerkinElmer Victor X3)检测荧光强度RFU(Relative Fluorescence Unit,或Relative Luminescent Unit,RLU相对荧光单位)。

[0147] 2.3 CDC活性结果计算

[0148] CDC活性可以以荧光强度RFU直接数值标识或按下列公式计算CDC细胞杀伤率:

[0149] 细胞杀伤率(%)=100 \times (1- (RFU样品孔) / ((RFU细胞+血清孔)));

[0150] 细胞活率则以下列公式进行计算:

[0151] 细胞活率(%)=100 \times ((RFU样品孔) / (RFU细胞+血清孔))

[0152] 2.4 CDC活性检测结果

[0153] 图2B为以该CDC法检测分析分泌抗CD38抗体的杂交瘤细胞株上清液体外杀伤Daudi靶细胞的活性结果(RFU直接数值);其中一代号为m29的杂交瘤细胞上清液表现有明显的CDC活性(与其他样品相比,RFU数值下降达95%以上),而其他杂交瘤细胞培养上清液样品均无明显的CDC活性(RFU数值无明显下降)。

[0154] 实施例3:鼠源m29单抗的亚型鉴定及其补体依赖细胞毒性(CDC)的再次验证

[0155] 鼠源m29单抗的经采用市售的小鼠单克隆抗体IgG亚类检测卡(北京博奥龙免疫技术有限公司产品,货号BF06038)进行鉴定,结果显示为IgG2b型抗体。其后,使用与实施例2中相同的方法再次验证了m29杂交瘤细胞株上清液样品的体外经CDC杀伤Daudi靶细胞的活性,结果如图3。

[0156] 其中图3A为m29杂交瘤细胞株上清液样品未经稀释后直接加入CDC测试板中的RFU读数结果;结果再次显示m29杂交瘤细胞株上清液表现有明显的CDC活性(与阴性对照样品相比,RFU数值下降达95%以上)。

[0157] 图3B为不同溶度的阳性对照样品Daratumumab的体外CDC杀伤Daudi靶细胞的活性测试结果,结果显示有明显的剂量-反应曲线。

[0158] 图3C为含不同溶度的m29单抗上清的体外CDC杀伤Daudi靶细胞的活性CDC活性测试结果,结果也显示有明显的剂量-反应曲线。

[0159] 实施例4:流式细胞仪检测分析鼠源单抗m29与来源与人的CD38抗原表达肿瘤细胞株的结合

[0160] 在本实施例中,以m29杂交瘤细胞株上清液样品,或非相关鼠源单抗mAB21(小鼠抗人PD-1单抗)样品为一抗,以FITC荧光标记的羊抗小鼠IgG为二抗,采用流式细胞仪检测分析样品与CD38抗原表达阳性的人肿瘤细胞株的结合。

[0161] 为此,将已知CD38抗原表达阳性的人肿瘤细胞株(B-淋巴瘤细胞株Daudi、骨髓瘤细胞株RPMI-8226及T-淋巴瘤细胞株MOLT-4,均购自中国科学院上海生命科学院细胞保藏中心)分别与m29杂交瘤细胞株上清液样品,或非相关单抗鼠源mAB21(小鼠抗人PD-1单抗)样品4 $^{\circ}$ C孵育1小时,经PBS-0.1% FCS液洗涤后,加入FITC-标记的羊抗小鼠IgG(1:200稀释,Sigma公司产品);4 $^{\circ}$ C孵育1小时,再经PBS-0.1% FCS液洗涤后,将样品上样至

Accuri C6 Plus Flow Cytometer流式细胞仪检测(美国Becton Dickinson公司, Mountain view, CA)。

[0162] 图4为该流式细胞仪检测的代表性结果。如图4所示:与非相关单抗mAB21(鼠抗人PD-1 单抗)样品相比,m29杂交瘤细胞株上清液样品可明显与CD38抗原表达阳性的人B-淋巴瘤细胞株Daudi(图4A)、骨髓瘤细胞株RPMI-8226(图4B)及T-淋巴瘤细胞株MOLT-4(图4C)特异结合。

[0163] 实施例5:流式细胞仪检测分析m29杂交瘤细胞株上清液样品及Daratumumab与稳定转染表达人CD38基因的CHO细胞(CHO-hCD38)结合

[0164] 5.1 稳定表达人CD38基因的CHO细胞株(CHO-hCD38)的建立

[0165] 根据Genebank数据库公布的人CD38基因序列(Gene ID: 952),委托苏州金唯智生物科技有限公司合成编码CD38的cDNA片段,并将其克隆到细胞表达载体pQY-DHFR(自建)中,转化大肠杆菌,通过酶切验证方法鉴定阳性重组表达质粒pQY-DHFR-hCD38。其后将重组质粒pQY-DHFR-hCD38与Fugen-6脂质体(Roche 公司产品)混合后共转染入CHO-dhfr-细胞后,利用含胎牛血清的IMDM培养基筛选出稳定表达人CD38 基因的CHO细胞株(CHO-hCD38)

[0166] 5.2流式细胞仪检测分析鼠源m29杂交瘤上清液样品及Daratumumab与稳定表达人CD38基因的CHO细胞(CHO-hCD38)结合

[0167] 在本实施例中,以鼠源m29杂交瘤上清液样品或阳性样品Daratumumab为一抗,分别以FITC荧光标记的羊抗小鼠IgG或FITC荧光标记的羊抗人IgG为二抗,采用流式细胞仪检测分析样品与稳定表达人CD38基因的CHO细胞(CHO-hCD38)结合。

[0168] 为此,将CHO-hCD38细胞分别与鼠源m29杂交瘤上清液样品,阳性单抗样品Daratumumab,或非相关鼠源单抗mAB21(小鼠抗人PD-1 单抗)或其人源化hAB21单抗样品4℃孵育1小时,经PBS-0.1% FCS 液洗涤后,分别加入FITC-标记的羊抗小鼠IgG(1:200稀释, Sigma 公司产品)或对于Daratumumab样品,则加入FITC-标记的羊抗人IgG-Fc,1:200稀释, Sigma 公司产品);4℃孵育1小时,再经PBS-0.1% FCS 液洗涤后,将样品上样至Accuri C6 Plus Flow Cytometer流式细胞仪检测(美国Becton Dickinson公司, Mountain view, CA)。

[0169] 图5为该流式细胞仪检测CHO-hCD38代表性结果。如图5所示:与阴性对照样品mAB21或hAB21相比,鼠源m29杂交瘤上清液样品(图5A)及Daratumumab样品(图5B)均可明显与CHO-hCD38细胞结合,其中m29单抗样品与CHO-hCD38细胞的结合强度不亚于Daratumumab单抗。

[0170] 实施例6 鼠源m29单抗的分离纯化及体外竞争ELISA法检测m29单抗与Daratumumab竞争结合CD38

[0171] 6.1鼠源m29单抗的分离纯化

[0172] 将m29杂交瘤细胞扩增,并驯化为无血清培养基(KD-Hybri, 珠海恺瑞公司产品)培养。收集一定量的无血清细胞培养上清,经离心及0.45μm滤膜过滤后,上样至Protein-G亲和层析柱(Protein G-Sepharose Fast Flow,美国通用电气GE公司产品),经1xPBS漂洗后,用缓冲液(0.05M醋酸钠,pH=3.2)洗脱并获得m29抗体,然后使用超滤管(Millipore UFC903096,30kD)离心更换缓冲液为甘氨酸-Tris(pH=6.0)后,经测试定量标记后,将纯化获得的m29抗体置于4℃保存。

[0173] 6.2 体外竞争性ELISA法检测分析鼠源m29单抗与Daratumumab竞争结合CD38

[0174] 该竞争性ELISA法的基本原理与过程是：先将不同浓度的m29单抗样品或Daratumumab与固定浓度的生物素标记的m29单抗(biotin-m29)或生物素标记的Daratumumab (biotin- Daratumumab)混合,之后再将混合物转入预先包被有CD38-His重组蛋白的96-孔板,经孵育及洗脱后,加入酶标记的Avidin(如辣根过氧化物酶标记的Avidin);再经孵育及洗脱后,加入底物显示并测定OD值。

[0175] 其中,在实施例7中,该竞争性ELISA法检测的具体步骤如下:

[0176] 1)用重组人CD38胞膜外蛋白(北京义翘神州公司产品)包被96-孔板(包被浓度:2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;

[0177] 2)经PBS液漂洗及5% 牛奶(稀释在 PBS-0.1% tween20液中)室温封闭后,分别加入不同浓度的抗CD38 单抗(m29, Daratumumab)或非相关抗体(抗VEGF单抗hPV19)与含固定浓度的生物素标记的生物素标记Daratumumab (biotin-Daratumumab, 1:1000稀释)或m29单抗 (biotin-m29, 1:1000稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5h;

[0178] 3)经PBS-T洗脱后,加入辣根过氧化物酶标记的Avidin(1:5000稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h;

[0179] 4)经PBS-T洗脱后,加入显色液(邻苯二胺)-3% 双氧水,室温10min至显色;

[0180] 5)加入 1MHCL终止反应,以酶联免疫仪测定492 nm波长处各孔的吸光值。

[0181] 图6为该竞争性ELISA法的代表性检测结果示意图;其中:

[0182] 图6A为m29单抗及Daratumumab与生物素标记Daratumumab (biotin-Daratumumab)的体外竞争结合CD38蛋白的结果;如图所示:加入不同浓度的m29单抗或Daratumumab与固定浓度的biotin-Daratumumab样品中,各孔显色反应 OD值与加入的标记的单抗样品量成反比关系:即加入的m29单抗或Daratumumab单抗量越高,其显色OD值越低;此结果表明,与Daratumumab一样,m29单抗体外可与biotin-Daratumumab样品拮抗竞争结合CD38;且m29单抗几乎也达到与Daratumumab一样的竞争结合CD38的效果

[0183] 图6B则为m29单抗及Daratumumab与生物素标记m29单抗(biotin-m29单抗)的体外竞争结合CD38蛋白的结果;如图所示,加入不同浓度的m29单抗与固定浓度的biotin-m29样品中,各孔显色反应 OD值与加入的未标记的m29单抗样品量成反比关系:即加入的m29单抗量越高,其显色OD值越低;而Daratumumab或非相关单抗样品hPV19的加入量多少对各孔OD值影响不大。此结果表明Daratumumab体外不与m29 单抗竞争结合CD38。

[0184] 综合分析该竞争性ELISA结果可知m29单抗结合人CD38蛋白的位点(epitope)不同与Daratumumab, m29 单抗可竞争阻断Daratumumab与人CD38蛋白的结合,而Daratumuma无法竞争阻断m29 单抗与人CD38蛋白的结合

[0185] 实施例7:鼠源m29单抗可变区编码基因的克隆

[0186] 在此,先从小鼠杂交瘤m29细胞中提取出总RNA中,再以该RNA为模板,采用简并引物(degenerate primers),以Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法(Wang Y 等:Degenerated primer design to amplify the heavy chain variable region from immunoglobulin cDNA. BMC Bioinformatics. 2006; 7 Suppl (4): S9)分别克隆扩增获得m29抗体重链可变区及轻链可变区的cDNA基因片段。

[0187] 其中该cDNA基因克隆步骤如下:

[0188] 步骤1、采用试剂盒(江苏海门碧云天公司产品)从小鼠m29杂交瘤细胞中提取出总RNA;

[0189] 步骤2、采用逆转录PCR(RT-PCR)方法在eppendorf管获得cDNA模板。

[0190] 其中用于m29抗体轻链可变区逆转录PCR引物mKaRT序列为:TGT CGT TCA CTG CCA TCA AT ;

[0191] 用于m29抗体重链可变区逆转录PCR引物mGaRT序列为:GCA AGG CTT ACA ACC ACA ATC;

[0192] RT-PCR反应体系如下:

[0193]	引物	2 μ l
[0194]	RNA模板	30 μ l
[0195]	72 $^{\circ}$ C孵育10分钟,然后冰上放置2分钟;	
[0196]	随后加入:	
[0197]	5 \times RT-PCR反应缓冲液	10 μ l
[0198]	dNTPs	5 μ l
[0199]	PrimeScript 逆转录酶	1.5 μ l
[0200]	蒸馏水	1.5 μ l
[0201]	<hr/>	
[0202]	总体积	50 μ l

[0203] 于42 $^{\circ}$ C温度下反应1小时,随后温度升至75 $^{\circ}$ C,15分钟灭活后将获得的cDNA 置于-20 $^{\circ}$ C,保存备用。

[0204] 步骤3、编码m29抗体轻链可变区及重链可变区基因的PCR克隆扩增

[0205] 用于简并引物(degenerate primers)PCR法克隆扩增该m29抗体轻链可变区基因的一对引物为:

[0206] 正向引物mIgLF1:GACATTGTGATGWCM CA ;

[0207] 反向引物mIgLCR440:CTGAGGCACCTCCAGATGTT .

[0208] 其中 W=A或T, M= A或C。

[0209] 而用于简并引物(degenerate primers)PCR法克隆扩增m29抗体重链可变区基因的一对引物为:

[0210] 正向引物mIgHset1:CARCTGCARCARYCTG;

[0211] 其中R= A或G,Y=C或T。

[0212] 反向引物mIgHCR135:GTGCTGGAGGGGACAGTCACT.

[0213] PCR扩增得到的DNA产物在1.5% agarose 胶中电泳分析。电泳结束后,将分离的DNA条带切下并分别进行测序获得抗体轻链及重链可变区DNA的核苷酸序列。测得的该抗体轻链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO.: 1,由该DNA核苷酸序列推测得到的抗体轻链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO.:2。该轻链抗原互补决定区(complementarity-determining regions,CDR)的 CDR1、CDR2及CDR3的氨基酸序列分别见SEQ ID NO.:3、SEQ ID NO.:4 和SEQ ID NO.:5。

[0214] 测得的该抗体重链可变区DNA的核苷酸序列见SEQ ID NO.:6,由该DNA的核苷酸序列推测得到的抗体重链可变区氨基酸序列见SEQ ID NO.:7。该重链抗原互补决定区的

CDR1、CDR2及CDR3的氨基酸序列分别见SEQ ID NO.:8、SEQ ID NO.:9 和SEQ ID NO.:10。

[0215] 图7A为编码m29抗体的轻链可变区与Daratumumab轻链可变区的氨基酸序列比对分析结果：其中m29单抗轻链可变区氨基酸序列中不同于Daratumumab之处均以“X”符号表示，方框标识的氨基酸序列为各单抗轻链可变区的CDR1,CDR2及CDR3；对比分析结果显示m29单抗轻链可变区及其CDR序列显著不同于Daratumumab。

[0216] 图7B则为编码m29抗体的重链可变区与Daratumumab重链可变区的氨基酸序列比对分析结果：其中m29单抗重链可变区氨基酸序列中不同于Daratumumab之处均以“X”符号表示，方框标识的氨基酸序列为各单抗重链可变区的CDR1,CDR2及CDR3；对比分析结果显示m29单抗轻链可变区及其CDR序列显著不同于Daratumumab。

[0217] 实施例8：鼠源m29抗体的人-鼠嵌合抗体(ch29G)的构建

[0218] 将上述实施例7中克隆扩增获得的m29抗体轻链可变区基因和重链可变区基因分别与人-kappa轻链恒定区(C-domain)和人IgG1-重链恒定区基因片段融合,获得人-鼠嵌合轻链基因(ch29L)及人-鼠嵌合重链基因(ch29H)。其后将轻链嵌合基因与重链嵌合基因先后克隆至pQY-DHFR-Hex表达质粒中,转入大肠杆菌扩增,分离获得大量含人-鼠嵌合抗体基因的表达质粒。

[0219] 含人-鼠嵌合抗体基因的表达质粒再与X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent脂质体(Roche产品)混合后共转染入CHO-dhfr-细胞。细胞转染后2-3天,取培养上清液,用包被CD38-his蛋白的96-孔板,用HRP酶标记的羊抗人IgG(Goat-anti-human-IgG,购自上海西塘生物公司)为检测二抗,以ELISA法检测上清中的嵌合抗体(ch29G)与人CD38-his蛋白结合。

[0220] 下表3为该ELISA代表性检测结果：

[0221] 表3 ELISA法检测瞬时转染嵌合抗体ch29G基因的CHO细胞培养上清液与人CD38-his蛋白的结合

[0222]

上清液 稀释倍数	1	2	4	8	16	32	64	128
OD492 显色值	0.953	0.865	0.698	0.518	0.321	0.230	0.113	0.077

[0223] 表3结果表明,转染人-鼠嵌合抗体基因ch29表达质粒转染的CHO细胞培养上清可与人CD38的蛋白特异结合。

[0224] 之后,将上述转染细胞传代至培养皿,并加入条件培养基进行稳定表达株的筛选。经过2-3周的培养,将生长良好的细胞克隆挑选至96孔板培养,2-3天后取上清用ELISA方法检测上清蛋白表达量,最后筛选出表达较高ch29抗体蛋白的CHO细胞株。将此细胞株用无血清培养基(CHO-M-B01,上海百安医疗投资有限公司)进行驯化,驯化成功后,扩增培养并收集上清。上清经离心及0.45 μm滤膜过滤后,上样至Protein-A亲和层析柱(proteinA-Sepharose Fast Flow,美国通用电气GE公司产品),经分离纯化,及置换成(甘氨酸-Tris,pH=7.0),获得纯度达99%以上的人-鼠嵌合抗体(ch29G,或简称ch29)抗体。

[0225] 实施例9：流式细胞仪检测比较鼠源单抗m29、人-鼠嵌合抗体ch29G及Daratumumab与表达CD38抗原的人肿瘤细胞的结合

[0226] 在本实施例中,以纯化的鼠源m29单抗、人-鼠嵌合抗体ch29G及Daratumumab或非

相关hAB21单抗(人源化抗人PD-1 单抗)样品为一抗,以FITC荧光标记的羊抗小鼠IgG或羊抗人IgG为二抗,采用如实施例4中的流式细胞仪法检测分析样品与CD38抗原表达阳性的肿瘤细胞株的结合。

[0227] 为此,将已知表达CD38抗原的人肿瘤细胞株(人Burkitt B-淋巴瘤细胞株Raji、人骨髓瘤细胞株RPMI-8226、人T-淋巴瘤细胞株MOLT-4及人T-淋巴瘤细胞株Jurkat细胞,均购自中国科学院上海生命科学院细胞保藏中心)分别与鼠源m29单抗、人-鼠嵌合抗体ch29G及Daratumumab或非相关hAB21 单抗样品4 °C孵育1小时,经PBS-0.1% FCS 液洗涤后,分别加入FITC-标记的羊抗小鼠IgG(1:200稀释,Sigma 公司产品)或FITC-标记的羊抗人IgG(1:200稀释,Sigma 公司产品) 4 °C孵育1小时,再经PBS-0.1% FCS 液洗涤后,将样品上样至Accuri C6 Plus Flow Cytometer流式细胞仪检测(美国Becton Dickinson公司,Mountain view, CA)。

[0228] 图8为该流式细胞仪检测的代表性结果;其中:

[0229] 图8A为人Burkitt B-淋巴瘤细胞株Raji 的检测结果:与非相关单抗hAB21相比,小鼠m29单抗、人-鼠嵌合抗体ch29G及Daratumumab均可明显与人Burkitt B-淋巴瘤细胞株结合;其中鼠源m29单抗及其人-鼠嵌合抗体ch29G与Raji细胞结合的阳性比例与信号强度与Daratumumab样品几乎相同。

[0230] 图8B为人骨髓瘤细胞株RPMI-8226的检测结果:与非相关单抗hAB21相比,小鼠m29单抗、人-鼠嵌合抗体ch29G及Daratumumab均可明显与人Burkitt B-淋巴瘤细胞株结合;其中鼠源m29单抗及其人-鼠嵌合抗体ch29G与RPMI-8226细胞结合的阳性比例与信号强度与Daratumumab样品也几乎相同。

[0231] 图8C为人T-淋巴瘤细胞株MOLT-4的检测结果:其中鼠源m29单抗及其人-鼠嵌合抗体ch29G与

[0232] MOLT-4细胞结合的阳性比例与信号强度稍低于Daratumumab。

[0233] 图8D为人T-淋巴瘤细胞株Jurkat的检测结果:其中鼠源m29单抗及其人-鼠嵌合抗体ch29G与Jurkat

[0234] 细胞结合的阳性比例与信号强度低于Daratumumab。

[0235] 实施例10:体外分析对比鼠源单抗m29、人-鼠嵌合单抗ch29G及Daratumumab的CDC活性

[0236] 采用与实施例2中相同的CDC检测方法体外分析对比了鼠源m29单抗、人-鼠嵌合单抗ch29G及Daratumumab的CDC活性。其中在本实施例中,使用的靶细胞为经典的Daudi细胞,使用的补体为10%的兔血清(自制)。

[0237] 图9为该CDC的测试结果;结果显示鼠源m29单抗及其人-鼠嵌合单抗ch29G均具有比Daratumumab更强的CDC活性。鼠源m29单抗及其人-鼠嵌合单抗ch29G的CDC活性最高值达95%以上,EC50值在 30 ng/ml左右;而Daratumumab 的CDC活性最高值仅为55%左右, EC50值为100 ng/ml。

[0238] 实施例11:流式细胞仪方法检测鼠源单抗m29、人-鼠嵌合抗体ch29G及Daratumumab与点突变CD38的结合

[0239] 11.1稳定表达人CD38基因点突变的CHO细胞 (CHO/hCD38-S274F) 株的建立

[0240] 为将人CD38中C-端第274位丝氨酸(serine,S)突变为苯丙氨酸(F),以实施例5.1

中合成的人CD38 cDNA为模板,设计引物,进行PCR扩增:

[0241] 上游引物huCD38F- HindIII-2:

[0242] TTGTAAGCTTGCCGCCACCATGGCTAACTGCGAGTTCTCC;

[0243] 下游引物huCD38-S274F-R1:

[0244] CTTATCGGGCCTATAGATATTTTTGCAGAAGAACTGGATGTTCCGCTTGCTGATGATGC

[0245] 得到的DNA产物在1.5% agarose 胶中电泳分离目的DNA条带,并以回收的DNA片段为模板,利用如下引物进行第二轮PCR,得到完整的hCD38-S274F基因:

[0246] 上游引物huCD38F-HindIII-2:

[0247] TTGTAAGCTTGCCGCCACCATGGCTAACTGCGAGTTCTCC;

[0248] 下游引物huCD38-S274F-R2- XhoI:

[0249] TGGTCTCGAGTCAGATCTCGGAGGTGCAGCTGGAGTCTTCGGGGTCTTCACGCACTGTAAAACTTATCGGGCCTATAGATATT

[0250] 将hCD38-S274F基因片段克隆到细胞表达载体pQY-DHFR(自建)中,转化大肠杆菌,通过酶切验证方法鉴定阳性重组表达质粒pQY-DHFR-hCD38-S274F。

[0251] 其后将重组质粒pQY-DHFR-hCD38S274F与Fugen-6脂质体(Roche)混合后共转染入CHO-dhfr-细胞后,利用含胎牛血清的IMDM培养基筛选出稳定表达人CD38基因点突变的CHO细胞细胞株(CHO/hCD38-S274F)。

[0252] 11.2流式细胞仪方法检测鼠源单抗m29、人-鼠嵌合单抗ch29G及Daratumumab与表达野生型(wild-type)或点突变人CD38的CHO细胞(CHO/hCD38-S274F)结合

[0253] 在本实施例中,采用流式细胞仪检测分析了鼠源单抗m29、人-鼠嵌合单抗ch29G单抗及Daratumumab与表达野生型(wild-type)及点突变人CD38的CHO细胞结合。

[0254] 其中检测主要步骤如下:为此,分别将稳定表达野生型(wild-type)或点突变人CD38的CHO细胞与含鼠源单抗m29、人-鼠嵌合单抗ch29G或Daratumumab的样品4℃孵育1小时,经PBS-0.1% FCS 液洗涤后,加入FITC荧光标记的羊抗小鼠IgG或FITC荧光标记的羊抗人IgG 4℃孵育1小时,再经PBS-0.1% FCS 液洗涤后,将样品上样至流式细胞仪(Accuri C6 Plus Flow Cytometer,美国BD公司)检测。

[0255] 图10为该流式细胞仪检测的代表性结果示意图,其中:

[0256] 图10A为表达野生型(wild-type)人CD38的CHO细胞的检测结果,结果显示与鼠源单抗m29一样,人-鼠嵌合单抗ch29保持有与表达野生型CD38的CHO细胞(CHO/hCD38-wild-typ)的结合,其两者的结合强度与Daratumumab的结合强度相近。

[0257] 图10B则为表达点突变人CD38的CHO细胞(CHO/hCD38-S274F)的检测结果,结果显示与鼠源单抗m29一样,人-鼠嵌合单抗ch29G也保持有表达该点突变CD38的CHO细胞(CHO/hCD38-wild-typ)的结合,而Daratumumab与表达该点突变CD38的CHO细胞无明显结合。

[0258] 实施例12:稳定表达食蟹猴CD38的CHO细胞株(CHO/mkCD38)的建立及流式细胞仪法检测鼠源单抗m29,人-鼠嵌合抗体(ch29G)及Daratumumab与其结合

[0259] 12.1稳定表达食蟹猴CD38(CHO/mkCD38)株的建立

[0260] 人CD38蛋白的氨基酸序列与食蟹猴(Macaca fascicularis,Cynomolgus monkey)CD38及黑猩猩(Chimpanzee,Pan troglodytes)CD38蛋白的氨基酸序列比对分析见图11A;如图11A所示:黑猩猩CD38(ChiCD38)蛋白的氨基酸序列与人CD38蛋白(huCD38)的氨基酸

序列几乎相同,而食蟹猴CD38 (mkCD38) 蛋白的氨基酸序列与人CD38蛋白氨基酸序列整体同源率为91%,两者氨基酸序列不同之处则有16个之多。

[0261] 根据Genebank数据库公布的食蟹猴CD38基因序列(Gene ID: 102126394),委托苏州金唯智生物科技有限公司合成编码食蟹猴(cynomolgus) CD38的cDNA片段,并将其克隆到细胞表达载体pQY-DHFR(自建)中,转化大肠杆菌,通过酶切验证方法鉴定阳性重组表达质粒pQY-DHFR-mkCD38。

[0262] 其后将重组质粒pQY-DHFR-mkCD38与Fugen-6脂质体(Roche)混合后共转入CHO-dhfr-细胞后,利用含胎牛血清的IMDM培养基筛选出稳定表达食蟹猴CD38蛋白的CHO细胞株(CHO-cynomolgus CD38)。

[0263] 12.2流式细胞仪方法检测鼠源单抗m29、人-鼠嵌合抗体(ch29G)及Daratumumab与稳定表达食蟹猴CD38 (CHO-cynomolgus CD38)细胞株的结合

[0264] 采用与实施例11中 11.2节描述的方法以流式细胞仪检测分析了鼠源单抗m29、人-鼠嵌合抗体(ch29G)及Daratumumab与稳定表达食蟹猴CD38蛋白的CHO细胞株(CHO-cynomolgus CD38)。

[0265] 图11B为该流式细胞仪检测的代表性结果示意图,结果显示:人-鼠嵌合单抗ch29G保持有与鼠源单抗m29几乎一样的高亲和力结合表达食蟹猴CD38的CHO细胞株,而Daratumumab与表达食蟹猴CD38的CHO细胞株的结合活性强度下降达90%以上。

[0266] 实施例13: ELISA检测人-鼠嵌合抗体ch29G及Daratumumab与人CD38蛋白或食蟹猴CD38蛋白的结合

[0267] 本实施例中,采用直接ELISA方法来检测人-鼠嵌合抗体ch29及Daratumumab与重组人CD38蛋白或重组食蟹猴CD38蛋白的结合。为此,分别以重组人CD38-his蛋白或重组食蟹猴(cynomolgus) CD38-his蛋白(均为北京义翘神州公司产品)包被96-孔板(1 μ g/ml, 50 μ l/孔,4度过夜),5%牛奶封闭后,将人-鼠嵌合抗体ch29样品, Daratumumab及阴性对照抗体Rituximab(抗人CD20 单抗)用稀释液(含0.5%牛奶的PBST)稀释至1 μ g/ml,上样至包被了CD38蛋白的96-孔板中,2倍梯度稀释12孔,室温孵育1小时, PBS-0.1% Tween20 液充分洗涤后,再加入以HRP酶标记的 Goat-anti-human-IgG为检测二抗(1:1000稀释,购自上海西塘生物公司) 室温孵育1小时,再经PBS-0.1% Tween20 液充分洗涤后,加入邻苯二胺(OPD)-0.1% H2O2底物液显色10-15min后再加入0.1M HCl终止反应。其后在多功能酶标仪(PerkinElmer Victor X3)中读取492nm 处OD值。

[0268] 图12为该ELISA的检测结果。如图所示:人-鼠嵌合抗体ch29G及Daratumumab均可高亲和力与人CD38蛋白结合(图12A)。人-鼠嵌合抗体ch29G也可与食蟹猴CD38蛋白高亲和力结合;而Daratumumab与食蟹猴CD38蛋白无明显结合(图12B)。

[0269] 实施例14:体外补体依赖细胞毒性(complement-dependent cytotoxicity,CDC)检测对比分析人-鼠嵌合单抗ch29G及Daratumumab的活性

[0270] 14.1 实验材料及方法

[0271] 本实施例中,采用如本实施例中2的体外补体依赖细胞毒性(complement-dependent cytotoxicity,CDC)方法检测人-鼠嵌合单抗ch29G对多种靶细胞(包括Daudi, Raji, MOLT-4及Jurket等)的CDC活性,并将结果与Daratumumab的CDC活性结果作对比。其中采用的补体来源于健康人血清(10%,自制),CDC阳性对照样品为 Rituximab(抗CD20

人-鼠嵌合单抗),阴性对照样品为hPV19 单抗(抗VEGF人源化单抗)。

[0272] 图13为该CDC的检测结果,其中:

[0273] 图13A 为以Daudi为靶细胞的CDC测试结果,结果显示人-鼠嵌合抗体ch29G具有与阳性对照样品Rituximab相近的CDC活性,且两者的CDC活性均强于Daratumumab。

[0274] 图13B为以Raji为靶细胞的CDC测试结果,结果显示人-鼠嵌合抗体ch29G也具有与阳性对照样品Rituximab相近的CDC活性,Daratumumab的CDC活性与人-鼠嵌合抗体ch29G的活性也相近。

[0275] 图13C为以MOLT-4为靶细胞的CDC测试结果,结果显示人-鼠嵌合抗体ch29G, Daratumumab及Rituximab 均无明显的CDC活性。

[0276] 图13D为以Jurket为靶细胞的CDC测试结果,结果显示人-鼠嵌合抗体ch29G, Daratumumab及Rituximab 也均无明显的CDC活性。

[0277] 实施例15:鼠源m29抗体的人源化基因工程改造

[0278] 在ELISA法、CDC等检测初步证明人-鼠嵌合抗体ch29G保持有与人CD38蛋白高亲和力结合,及CDC活性的基础上,采用PCR等系列基因工程克隆手段将该嵌合抗体轻链中的抗原互补决定区(CDR)基因片段移植到对应人kappa-轻链可变区骨架(framework regions, FR)上,获得人源化抗体轻链,再将此轻链与嵌合重链组合,即获得轻链人源化HH29G抗体。

[0279] 15.1鼠源m29抗体轻链的人源化基因工程改造

[0280] 通过氨基酸序列分析,确定人免疫球蛋白Kappa轻链第一V区胚系基因的表达产物(IgKV2D-29, NCBI Gene ID: 28882)与鼠源m29抗体轻链可变区具有最高同源性。据此,将m29抗体轻链骨架区(FR)用人IgKV2D-29的同源序列替换,然后将替换后的可变区基因与人免疫球蛋白IgG-Kappa轻链的恒定区编码序列拼接,最后成功获得人源化的轻链编码基因(h29-L)。其中人源化m29抗体轻链可变区的氨基酸序列见SEQ ID NO.:11,其核苷酸序列为SEQ ID NO:13所示。

[0281] 15.2鼠源m29抗体重链的人源化基因工程改造

[0282] 通过氨基酸序列分析,确定人免疫球蛋白Kappa重链第一V区胚系基因的表达产物(IGHV1-69, NCBI Gene ID:28461)与m29重链可变区具有最高同源性。据此,将m29重链骨架区(FR)用人IGHV1-69的同源序列替换,然后将替换后的可变区基因与人免疫球蛋白IgG-的重链恒定区编码序列拼接,最后成功获得人源化的轻链编码基因(h29-h)。其中人源化m29抗体重链可变区的氨基酸序列见SEQ ID NO.:12,其核苷酸序列为SEQ ID NO:14所示。

[0283] 实施例16:稳定高效分泌表达人源化或半人源化HH29单抗(HH29)的CHO细胞工程株的建立及抗体蛋白的分离纯化

[0284] 将含人-鼠嵌合重链基因(ch29H)、人源化轻链基因(HH29L)分步克隆到pQY-Dhfr-Hex 表达载体,转入大肠杆菌后扩增分离获得含人源化或半人源化HH29单抗(HH29)单抗表达质粒。其后将表达轻链人源化抗体HH29的重组质粒瞬时转染CHO细胞。转染24小时后,吸取孔内细胞培养上清,以CD38-his蛋白为包被抗原,HRP酶标记的 Goat-anti-human-IgG为检测二抗(购自上海西塘生物公司),OPD为显色底物,以直接ELISA法检测转染细胞上清中抗体与人CD38蛋白抗原结合的活性。

[0285] 下表4为该ELISA代表性检测结果。

[0286] 表4 ELISA分析瞬时转染细胞培养上清结合人CD38蛋白活性

上清稀释 倍数	OD 显色值	
	ch29	HH29
2	0.989	1.177
4	0.945	1.163
8	0.789	1.105
16	0.603	0.811
32	0.431	0.508
64	0.313	0.325
128	0.212	0.178
256	0.121	0.110

[0288] 如表4中结果所示：与人-鼠嵌合型ch29G单抗抗体一样，半人源化HH29单抗（轻链人源化）保持与人CD38蛋白结合的活性。

[0289] 上述转染细胞经克隆筛选及无血清培养基悬浮培养驯化后，成功获得多个稳定高效分泌表达半人源化单抗（轻链人源化）HH29的CHO细胞工程株。

[0290] 其后，从中选取一细胞工程株再经无血清培养基放大扩增培养后，收集培养上清液，上清液经离心及0.45 μm滤膜过滤后，上样至包括含Protein A亲和层析柱（proteinA-Sepharose Fast Flow, 美国通用电气GE公司）、离子交换析柱、病毒去除/灭活、及过滤除菌（0.22 μm滤膜过滤）在内的多个分离纯化步骤后，最终获得高纯度（蛋白纯度达99%以上）的HH29抗体。纯化的HH29单抗抗体溶于甘氨酸-Tris缓冲液（pH=7.0）中（1-10 mg/ml），低温（4 °C左右）保存。

[0291] 实施例17：小鼠体内测试鼠源m29单抗抗肿瘤疗效

[0292] 在本实施例中，采用裸鼠皮下种植人B-淋巴瘤Raji肿瘤模型在动物体内测试鼠源m29单抗的抗肿瘤疗效，并采用人-鼠嵌合抗CD20 单抗Rituximab为阳性对照药物。该试验首先在裸鼠皮下种植人B-淋巴瘤细胞株Raji；试验动物成瘤后，再分组给药及观察记录肿瘤生长。

[0293] 为此，将数量为 1×10^7 的来源于人的B-淋巴瘤细胞株Raji细胞（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库）接种于裸鼠（购自南京大学动物中心），待接种的肿瘤体积长至约黄豆大小（约100mm³，肿瘤细胞接种后第6-7天左右）时将动物随机分为以下3组：

[0294] A组：生理盐水阴性对照组（n=2，等体积生理盐水）

[0295] B组：阳性对照药物Rituximab单抗治疗组（n=4，给药剂量为 10 mg/kg体重）

[0296] C组：m29单抗药物治疗组（n=4，给药剂量为 10 mg/kg体重）

[0297] 动物自分组当天起(即接种肿瘤后第6-7天),每周腹腔注射(i.p.)给药2次(每隔3-4天),连续给药6次(给药共3周)。期间每天观察动物一般临床症状,每隔3-4天测量肿瘤长径(mm)和短径(mm)及动物体重。肿瘤体积计算公式为:体积(mm³)=长径(mm)x短径(mm)x短径(mm)x0.5。如测量时肿瘤体积超过3000 mm³ 则对测试动物实行安乐死(euthanized)。

[0298] 试验结果:

[0299] 图14为各组试验组动物肿瘤的平均增长体积趋势,其中:

[0300] 图14A为种植肿瘤前10天的平均增长体积示意图,结果显示各组之间无明显差别;

[0301] 图14B为种植肿瘤后期的平均增长体积示意图,结果显示,与生理盐水阴性对照组相比,m29单抗药物治疗组及阳性对照药Rituximab单抗治疗组的肿瘤明显缩小甚至彻底消失。

[0302] 实施例18:小鼠体内测试人-鼠嵌合ch29G抗体的抗肿瘤疗效

[0303] 在本实施例中,采用与上述实施例17中相同的裸鼠皮下种植人B-淋巴瘤Raji肿瘤模型测试人-鼠嵌合ch29G单抗的抗肿瘤疗效,并采用Daratumumab单抗为阳性对照药物。该试验首先在裸鼠皮下种植人B-淋巴瘤Raji细胞;在试验动物在成瘤后,再分组给药分组及观察记录肿瘤生长。

[0304] 为此,将数量为1x10⁷的来源于人的B-淋巴瘤Raji细胞接种于裸鼠(购自南京大学动物中心),待接种的肿瘤体积长至约黄豆大小(约100 mm³,肿瘤细胞接种后第6-7天左右)时将动物随机分为以下3组:

[0305] A组:生理盐水阴性对照组(n=10,等体积生理盐水)

[0306] B组:阳性对照药物Daratumumab组(n=10,给药剂量为 5 mg/kg体重)

[0307] C组:ch29G单抗药物治疗组(n=10,给药剂量为2.5 mg/kg体重)

[0308] 动物自分组当天起(即接种肿瘤后第6-7天),每周腹腔注射(i.p.)给药2次(每隔3-4天),连续给药6次(给药共3周)。期间每天观察动物一般临床症状,每隔3-4天测量肿瘤长径(mm)和短径(mm)及动物体重。肿瘤体积计算公式为:体积(mm³)=长径(mm)x短径(mm)x短径(mm)x0.5。如测量时肿瘤体积超过3000 mm³ 则对测试动物实行安乐死(euthanized)。

[0309] 试验结果:

[0310] 图15为各组试验组动物肿瘤的平均增长体积趋势:结果显示,与生理盐水阴性对照组相比,ch29G单抗药物治疗组及阳性对照药Daratumumab治疗组的治疗增长受到明显抑制,其中给药剂量为2.5 mg/kg体重的ch29G单抗的疗效与给药剂量为5 mg/kg体重的Daratumumab疗效相近似。

[0311] 参考文献

[0312] 1.Jackson DG and Bell JI.Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation.

[0313] J. Immunol. 1990,144:2811-2815.

[0314] 2.Harada N, Santos-Argumedo L, Chang R, Grimaldi JC, Lund FE, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Heath AW, Parkhouse RM, et al.Expression cloning of a cDNA encoding a novel murine B cell activation marker. homology to human CD38.J Immunol.1993,151:3111-8.

- [0315] 3.Ferrero E, Orciani M, Vacca P, Ortolan E, Crovella S, Titti F, Saccucci F, Malavasi F.Characterization and phylogenetic epitope mapping of CD38 ADPR cyclase in the cynomolgus macaque.BMC Immunol.2004,5:21.
- [0316] 4.States DJ, Walseth TF and Lee HC.Similarities in amino acid sequences of Aplysia ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38.Trends Biochem. Sci.1992,17:495.
- [0317] 5.Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, Parkhouse RM, Walseth TF, Lee HC: Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38.Science.1993,262:105.
- [0318] 6.Summerhill RJ, Jackson DG, Galione A.Human lymphocyte antigen CD38 catalyzes the production of cyclic ADP-ribose.FEBS Lett. 1993,335:231-233.
- [0319] 7.Sridhar Prasad, Duncan E. McRee, Enrico A. Stura,David G. Levitt, Hon Cheung Lee & C. David Stout.
- [0320] Crystal structure of Aplysia ADP ribosyl cyclase, a homologue of the bifunctional ectozyme CD38.
- [0321] Nature Structural Biology 1996,3: 957-964.
- [0322] 8.Mehta K, Shahid U and Malavasi F (Review): Human CD38, a cell-surface protein with multiple function. FASEB J. 1996,10; 1408-1417.
- [0323] 9 George Shubinsky, Michael Schlesinger (Review):The CD38 Lymphocyte Differentiation Marker: New Insight into Its Ectoenzymatic Activity and Its Role as a Signal Transducer. Immunity 1997, 7:315-324.
- [0324] 10. Stevenson FK, Bell AJ, Cusack R, Hamblin TJ, Slade CJ, Spellerberg MB, Stevenson GT.
- [0325] Preliminary studies for an immunotherapeutic approach to the treatment of human myeloma using chimeric anti-CD38 antibody. Blood. 1991,77: 1071-1079.
- [0326] 11. Goldmacher VS, Bourret LA, Levine BA, Rasmussen RA, Pourshadi M, Lambert JM, Anderson KC.
- [0327] Anti-CD38-blocked ricin: an immunotoxin for the treatment of multiple myeloma. Blood. 1994,84:3017-25.
- [0328] 12. Ellis JH, Barber KA, Tutt A, Hale C, Lewis AP, Glennie MJ, Stevenson GT, Crowe JS. Engineered anti-CD38 monoclonal antibodies for immunotherapy of multiple myeloma. J Immunol. 1995,155:925-937.
- [0329] 13. de Weers M, Tai YT, van d V, Bakker JM, Vink T, Jacobs DC, et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. J Immunol. 2011, 186:1840-1848.
- [0330] 14. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, Nahi H, Gimsing P, Hansson M, et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. N

Engl J Med. 2015,373:1207-1219.

[0331] 15. Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, Singhal S, Chari A, Bahlis NJ, et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. Lancet. 2016,387:1551-1560.

[0332] 16. Nijhof IS, Groen RW, Noort WA, van KB, de Jong-Korlaar R, Bakker J, et al. Preclinical evidence for the therapeutic potential of CD38-targeted immuno-chemotherapy in multiple myeloma patients refractory to lenalidomide and bortezomib. Clin Cancer Res. 2015,21:2802-10.

[0333] 17. Plesner T, Arkenau HT, Gimsing P, Krejcik Lemech C, Minnema MC, et al. Phase 1/2 study of daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. Blood. 2016,128:1821-28.

[0334] 18. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, et al (CASTOR Investigators) Daratumumab, bortezomib, and dexamethasone for multiple myeloma. N Engl J Med. 2016,375:754-66.

[0335] 19. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, San-Miguel J, Bahlis NJ, Usmani SZ, et al (POLLUX Investigators). Daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. N Engl J Med. 2016,375:1319-1331.

[0336] 20. Ajai Chari, et al (EQUULEUS; MMY1001 Investigators):Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone in relapsed and/or refractory multiple myeloma. Blood. 2017,130: 974-981.

[0337] 21. Mateos M-V et al (ALCYONE Trail Investigators). Daratumumab plus bortezomib, melphalan and prednisone for untreated myeloma. N Engl J Med. 2018, 378:518-528.

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	苏州思坦维生物技术股份有限公司
[0003]	<120>	特异结合人及猴CD38抗原的单克隆抗体及其制备方法与应用
[0004]	<130>	WH-NP-18-100055
[0005]	<160>	23
[0006]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0
[0007]	<210>	1
[0008]	<211>	336
[0009]	<212>	DNA
[0010]	<213>	小鼠 (Mus musculus)
[0011]	<400>	1
[0012]		gacattgtga tgacceaaac tccactctcc cttcctgtcg gtcttggaga tcaagcctcc 60
[0013]		atctcttgca gatctagtca gagccttcta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
[0014]		tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
[0015]		tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
[0016]		agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattttctgct ctcaaagttc acatcttccg 300
[0017]		tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336
[0018]	<210>	2
[0019]	<211>	112
[0020]	<212>	PRT
[0021]	<213>	小鼠 (Mus musculus)
[0022]	<400>	2
[0023]		Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Gly Leu Gly
[0024]		1 5 10 15
[0025]		Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
[0026]		20 25 30
[0027]		Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0028]		35 40 45
[0029]		Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0030]		50 55 60
[0031]		Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0032]		65 70 75 80
[0033]		Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
[0034]		85 90 95
[0035]		Ser His Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0036]		100 105 110
[0037]	<210>	3
[0038]	<211>	16

[0039] <212> PRT
 [0040] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0041] <400> 3
 [0042] Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 [0043] 1 5 10 15
 [0044] <210> 4
 [0045] <211> 7
 [0046] <212> PRT
 [0047] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0048] <400> 4
 [0049] Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 [0050] 1 5
 [0051] <210> 5
 [0052] <211> 10
 [0053] <212> PRT
 [0054] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0055] <400> 5
 [0056] Ser Gln Ser Ser His Leu Pro Trp Thr Phe
 [0057] 1 5 10
 [0058] <210> 6
 [0059] <211> 357
 [0060] <212> DNA
 [0061] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0062] <400> 6
 [0063] caggttcagc tgcagcagtc tgtttctgaa ctgaggagtc ctgggtcttc agtaaagctt 60
 [0064] tcatgcaagg attttgattc agaggtttct cctacttctt atatgagttg ggtaggcag 120
 [0065] aagcctgggc atggatttga gtggattgga gacatactcc caaatattgg tagaatattc 180
 [0066] tatggagaga aatttgagga caaagccaaa ctggatgcag acacagtgtc caacacagcc 240
 [0067] tacttggagc tcaccagcctgtcatctgag gactctgcta tctactattg tgcaagggag 300
 [0068] gcctacggca gtatccttgg ttactggggc caagggactc tggctgctgt ctctgca 357
 [0069] <210> 7
 [0070] <211> 119
 [0071] <212> PRT
 [0072] <213> 小鼠 (Mus musculus)
 [0073] <400> 7
 [0074] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Val Ser Glu Leu Arg Ser Pro Gly Ser
 [0075] 1 5 10 15
 [0076] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Thr
 [0077] 20 25 30

[0078]	Ser Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Lys Pro Gly His Gly Phe Glu Trp
[0079]	35 40 45
[0080]	Ile Gly Asp Ile Leu Pro Asn Ile Gly Arg Ile Phe Tyr Gly Glu Lys
[0081]	50 55 60
[0082]	Phe Glu Asp Lys Ala Lys Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser Asn Thr Ala
[0083]	65 70 75 80
[0084]	Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Ser Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
[0085]	85 90 95
[0086]	Cys Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ile Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly
[0087]	100 105 110
[0088]	Thr Leu Val Ala Val Ser Ala
[0089]	115
[0090]	<210> 8
[0091]	<211> 8
[0092]	<212> PRT
[0093]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[0094]	<400> 8
[0095]	Ser Glu Val Phe Pro Thr Ser Tyr
[0096]	1 5
[0097]	<210> 9
[0098]	<211> 16
[0099]	<212> PRT
[0100]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[0101]	<400> 9
[0102]	Asp Ile Leu Pro Asn Ile Gly Arg Ile Phe Tyr Gly Glu Lys Phe Glu
[0103]	1 5 10 15
[0104]	<210> 10
[0105]	<211> 9
[0106]	<212> PRT
[0107]	<213> 小鼠 (Mus musculus)
[0108]	<400> 10
[0109]	Glu Ala Tyr Gly Ser Ile Leu Gly Tyr
[0110]	1 5
[0111]	<210> 11
[0112]	<211> 112
[0113]	<212> PRT
[0114]	<213> 人工序列 (未知)
[0115]	<400> 11
[0116]	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly

[0117]	1	5	10	15
[0118]	Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser			
[0119]	20	25	30	
[0120]	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
[0121]	35	40	45	
[0122]	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
[0123]	50	55	60	
[0124]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
[0125]	65	70	75	80
[0126]	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser			
[0127]	85	90	95	
[0128]	Ser His Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0129]	100	105	110	
[0130]	<210> 12			
[0131]	<211> 118			
[0132]	<212> PRT			
[0133]	<213> 人工序列(未知)			
[0134]	<400> 12			
[0135]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser			
[0136]	1	5	10	15
[0137]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Ser Glu Val Phe Pro Thr Ser			
[0138]	20	25	30	
[0139]	Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[0140]	35	40	45	
[0141]	Gly Asp Ile Leu Pro Asn Ile Gly Arg Ile Phe Tyr Gly Glu Lys Phe			
[0142]	50	55	60	
[0143]	Glu Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[0144]	65	70	75	80
[0145]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0146]	85	90	95	
[0147]	Ala Arg Glu Ala Tyr Gly Ser Ile Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
[0148]	100	105	110	
[0149]	Leu Val Ala Val Ser Ala			
[0150]	115			
[0151]	<210> 13			
[0152]	<211> 336			
[0153]	<212> DNA			
[0154]	<213> 人工序列(未知)			
[0155]	<400> 13			

[0156]	gacatcgtga tgacccagac ccctctgtct ttaagcgtga cccccggtca gcccgttcc	60
[0157]	atcagctgtc gtagctccca gtctttactg cactccaacg gcaacaccta tttacactgg	120
[0158]	tatttacaga agccccgcca gtcccctcag ctgctgatct acaaggtgtc caaccggttc	180
[0159]	tccggcgtgc ccgatcgttt ttccggttct ggctccggca ccgacttcac tttaaaaatt	240
[0160]	tctcgtgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgct cccagtcctc ccatttacct	300
[0161]	tggacctttg gcggcggcac caagctggag atcaag	336
[0162]	<210>	14
[0163]	<211>	354
[0164]	<212>	DNA
[0165]	<213>	人工序列(未知)
[0166]	<400>	14
[0167]	caagttcagc tgggtgcagtc cggcgtgag gtgaagaagc ccggtccag cgtgaaggtg	60
[0168]	tcttgtaagg cctcctccga ggtgttcccc acctcctaca tgtcttgggt gaggcaagct	120
[0169]	cccggtaag gtttagagtg gatgggcgac attttaccca acatcggtcg tatcttctac	180
[0170]	ggcgagaagt tcgaggatcg tgtgaccatc accgccgaca agtccacctc caccgcctac	240
[0171]	atggagctgt cctctttaag gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc tcgtgaggct	300
[0172]	tacggctcca ttttaggcta ttggggccaa ggtacactgg tggccgtgtc cgcc	354
[0173]	<210>	15
[0174]	<211>	40
[0175]	<212>	DNA
[0176]	<213>	人工序列(未知)
[0177]	<220>	
[0178]	<221>	misc_feature

Identities: 177/300 (59%) Positive:220/300 (73%)

```

hCD98 1  MANCEFSPVSGDKPCCLSRRAQQLGLGVSLVLIILVWVLAVVV--PFWRQQWNSGPGTTK 57
MAN EFS VSGD+P CRLSR-AQ+ LGV +LVLI +VV VV+ FR W+G TTK
mCD98 1  MANNYF8QVSGDRPGCLSRRAQIGLGLVGLLVLIILVWVGIWVILLRPRSLLVWVTGEPITK 60

hCD98 56  RFPETVLARCVKYTEI-KPEMRHVDCQ8VWDAFKGAFISKHPONITEEDVQPLMKLGTQT 116
F + L RC+ YT+I PEMR +CQ + PKGAF-SK+PCNIT EDY EL+KL TQT
mCD98 61  HFSDFLGRCLIVTQILRPEMRDQNCQEILSTFKGAFVSKHPONITREDVAPLVKLVITQT 120

hCD98 117  VPCNKILLWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLEDTLGLVADDLTWGQEPNISKINWQ8CPDW 176
+PCNK L WS- K LAHQ-T +Q MFTLEDTLGLV-ADDL WCG+ -TS -NV SCP W
mCD98 121  IPONKTLFWSKSKHLAQVTVIQGRMFTLEDTLGLVIADDLRWCGD8P8D8MNVV8CPHW 180

hCD98 177  RKDC8NIPV8VFWKIV8RAF8A8ACDVV8V8M8L8G88R8KIF8DKN8T8F88VE8V8N8L8Q8EK8V8 236
++C NNP++VFWK +8++FAE AC VV WMLNG8 + F KN8T8F88VE8 +L P KV
mCD98 181  8ENC8P8N8P8IV8FWK8V8IS8Q8K8FA8E8AC8GV8V8Q8V8M8L8G88L8R8P8F8V8K8N8T8F88VE8V8F8L8D8N8K8V8 240

hCD98 237  TLEAWVINGGRED8RDLCQDPTIKELESII8K8R8NI8Q88CK8N8IV8P8DK8FL8Q8CV8KN8PE888C 296
L+AWV+H S + C ++ EL+ I+ KRN+F+C + Y8P +FL8Q8CV8KN8PE 8C
mCD98 241  KLQAWVMHDIEG888NAC88888LNE8L8K8M8IV8Q8R8N8M8IF8AC8VD8N8Y88A8R8FL8Q8CV8KN8PE888C 300

```

图1

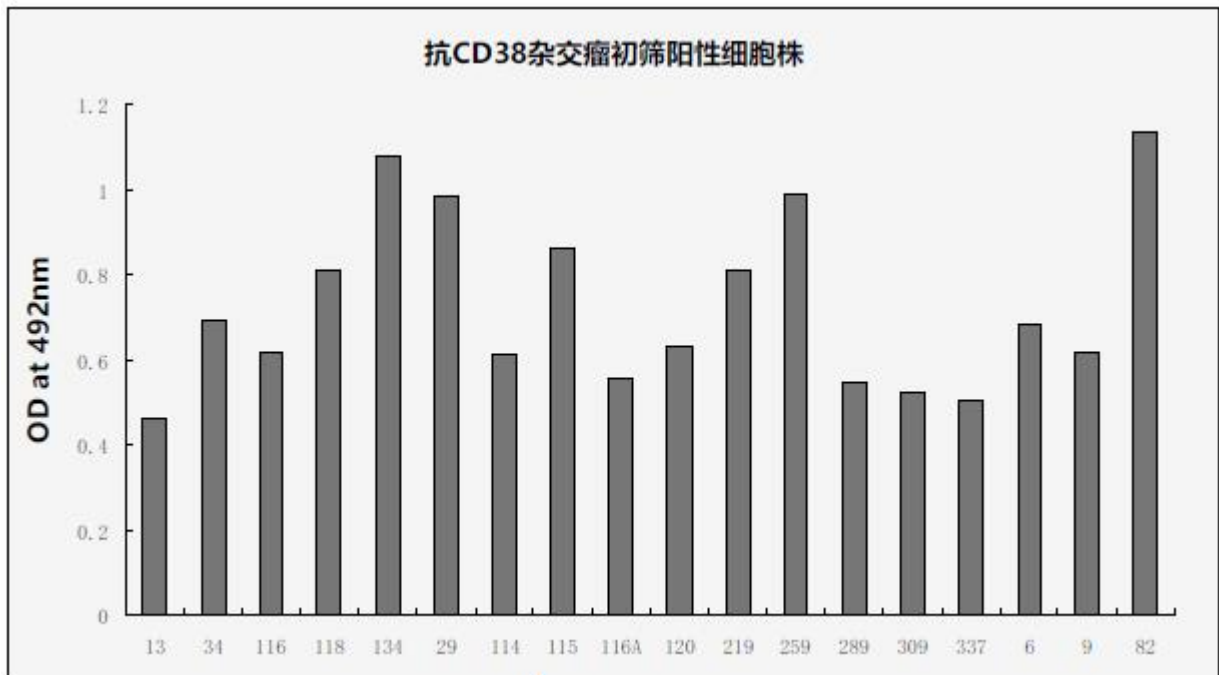


图2A

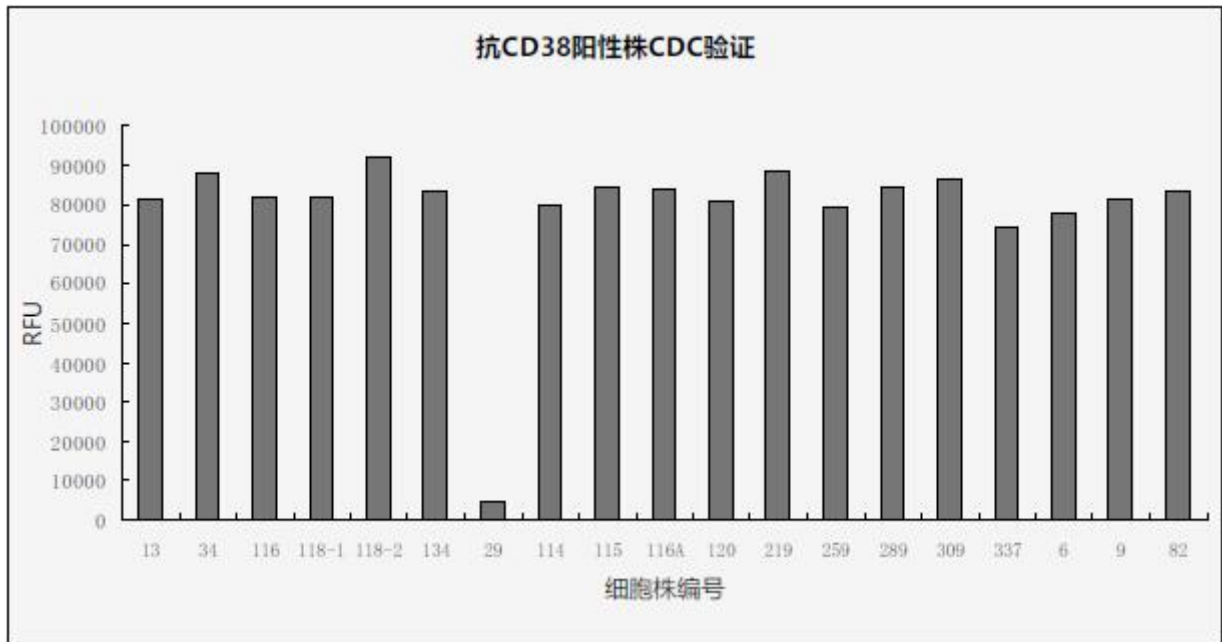


图2B

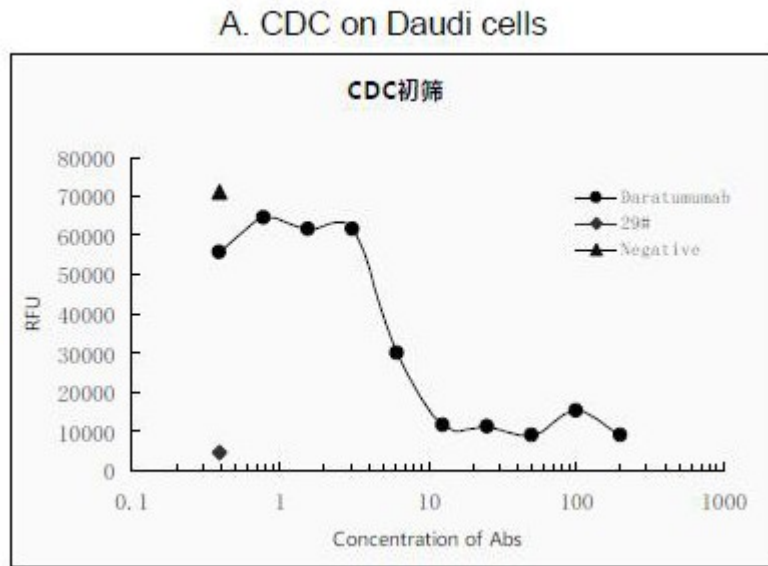


图3A

B. CDC on Daudi cells

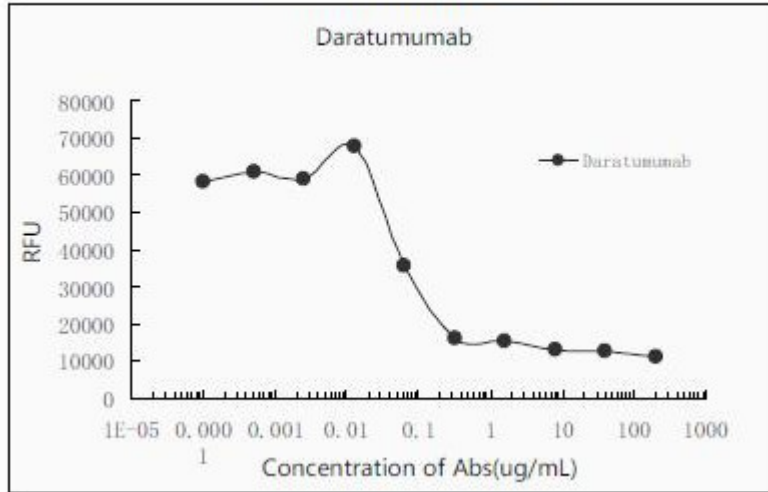


图3B

C. CDC on Daudi cells

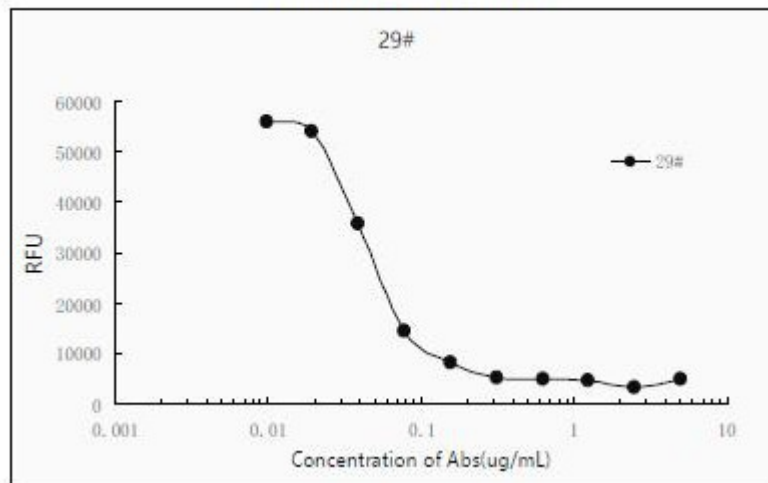


图3C

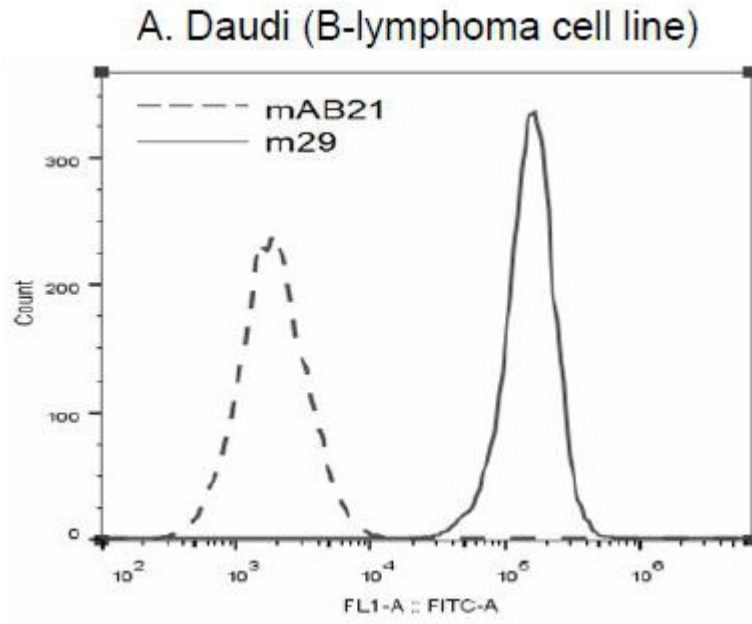


图4A

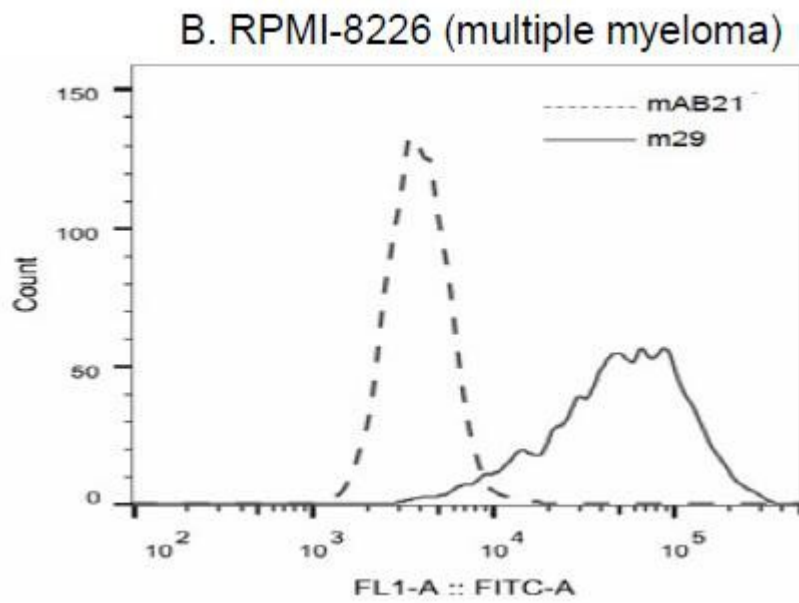


图4B

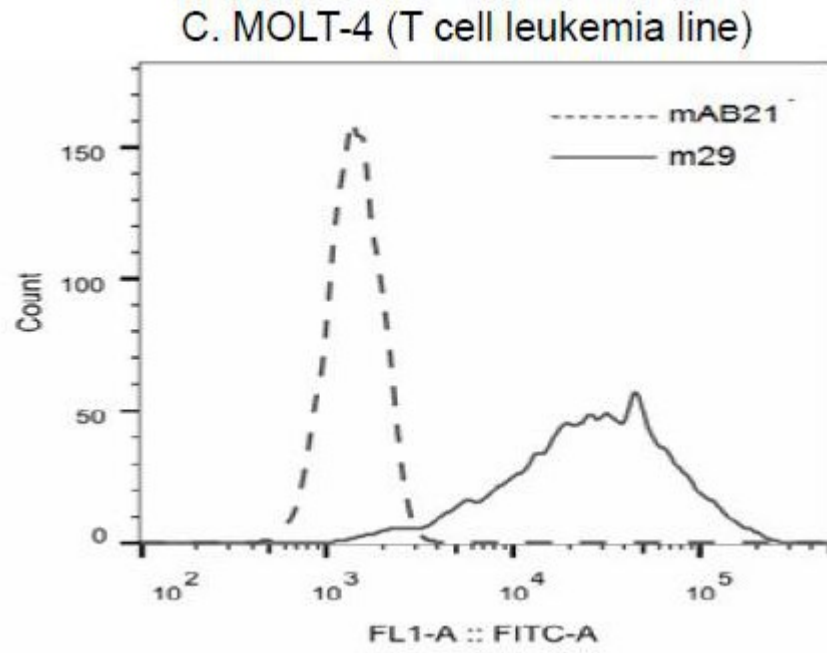


图4C

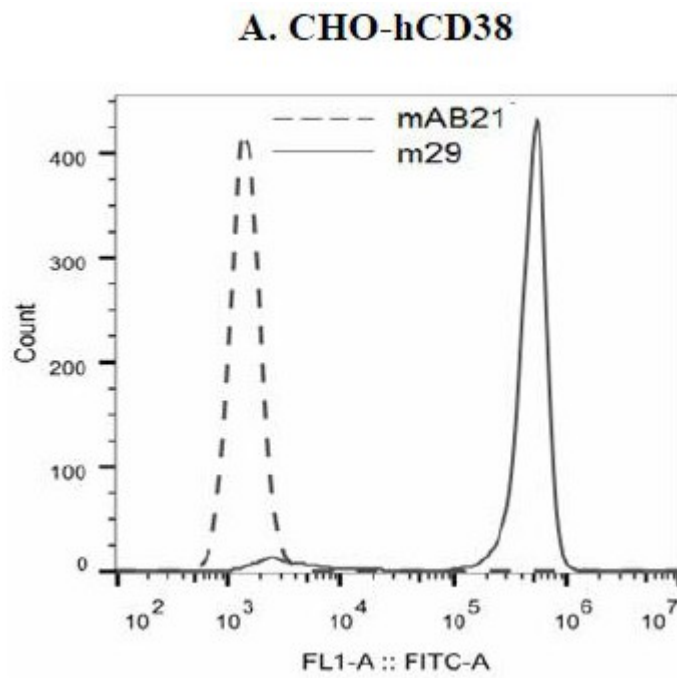


图5A

B. CHO-hCD38

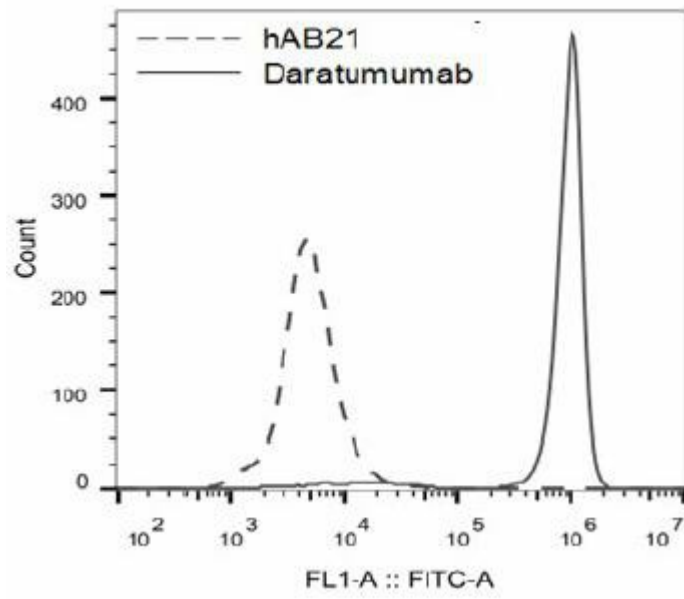


图5B

A. Daratumumab and m29 blocked binding of biotin-Daratumumab to human CD38 protein

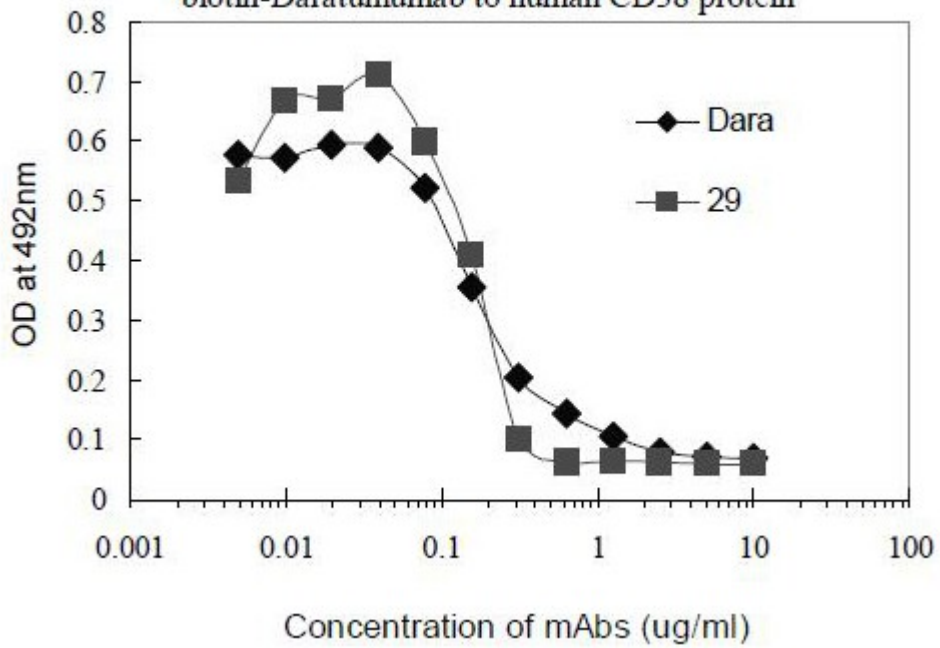


图6A

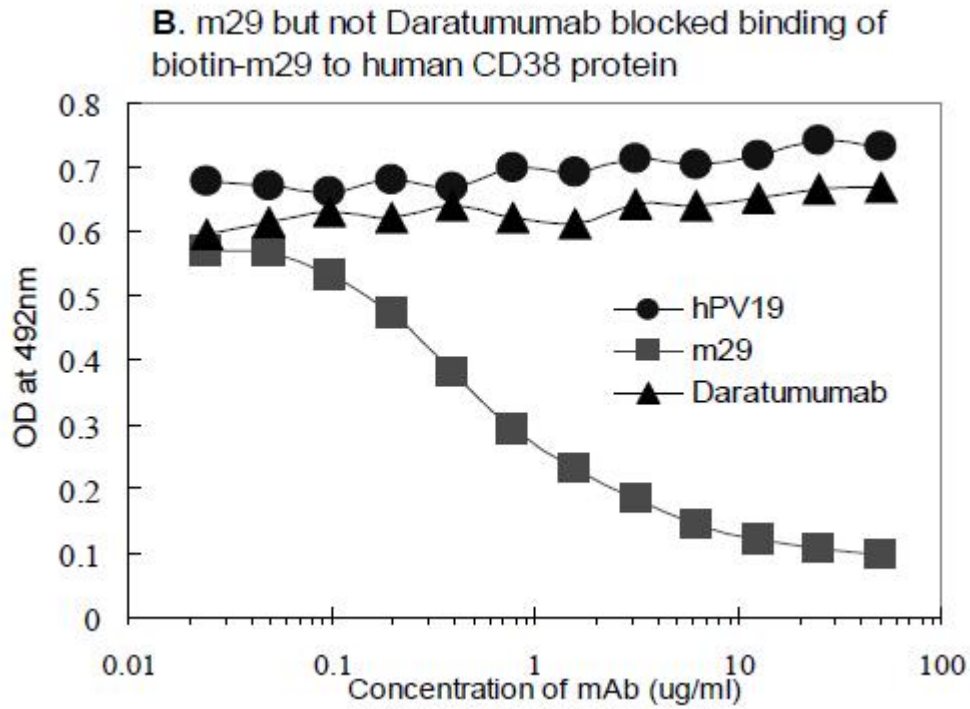


图6B

A. Identities: 66/112 (59%)

```

m39L  1  XIVXTQXPXXLXXXXGXXAXISCRXSQSXXXXXXXXTYLXWYXQKPGQXPLLIYXXSNXXX61
      IV+TQ+P +L + G++A++SCR+SQS+      ++YL WY QKPGQ+P+LLIY  SNR
DaraL  1  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV-----SSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRAT56

m39L  62  GXPXRFSGSGSGTDFTLXISXXEXEDXXVYXCXQXSXXPXTFGXGTKXEIK112
      G+P RFSGSGSGTDFTL IS +E  ED  VY+C Q S+ P TFG  GTK+EIK
DaraL  57  GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYQCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK107
    
```

图7A

B. Identities: 50/123(41%)

```

39H 1  XVQLXXSXXXLXXPGXSXXLSXXXXXXFXFTSYMSWVRQXPGXGXEWXXIXXXXXGXXX60
      +VQL +S  L  PG S++LSC  F +  MSWVRQ PG G EW+  I + G +
DaraH 1  EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCA-VSGTFNSFA59MSWVRQAPGKGLEWVS59AISGSGGGTY59

39H  61  YXXXXXNXXXXXXXXDXNNTXVYLXXXSLXNEDXAXYXCAXXX---XG-XXXXYWGQGTLVXVSX115
      Y + + + +  D  NT YL++ SL +ED+A+Y+CA++  +G +  YWGQTLV VS+
DaraH  60  YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEPVFDYWGQGTLVTVSS122

```

图7B

A. Raji Cells

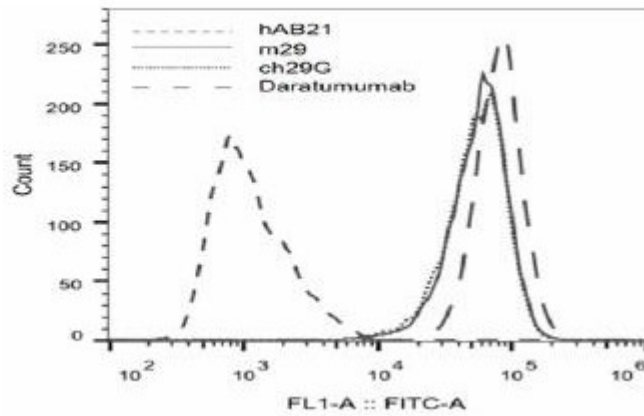


图8A

B. RPMI-8226 Ce

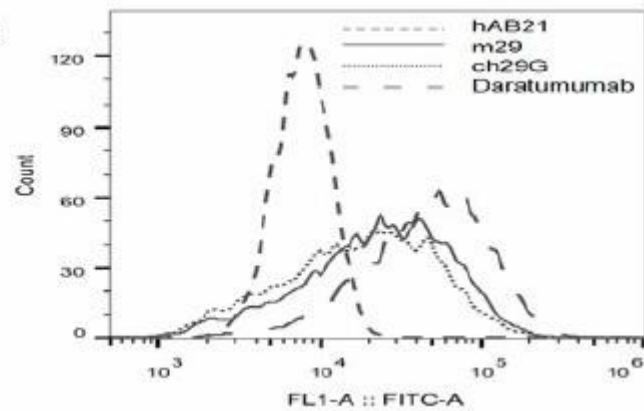


图8B

C. Molt-4 Cells

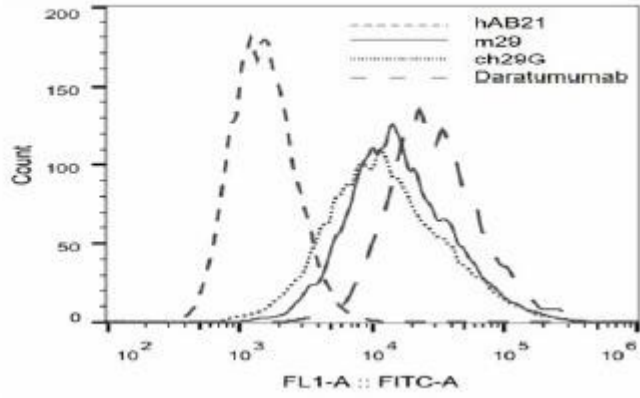


图8C

D. Jurkat Cells

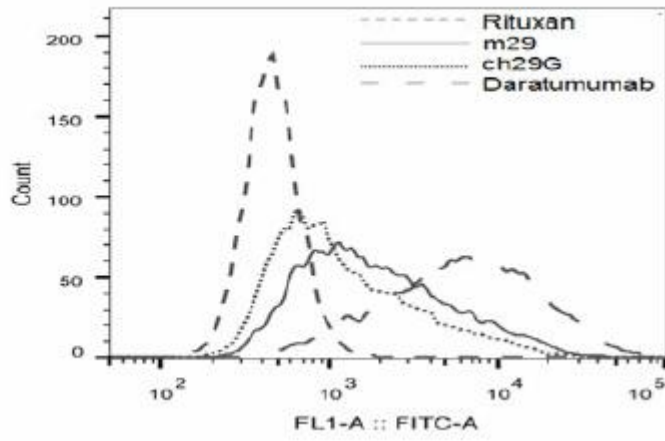


图8D

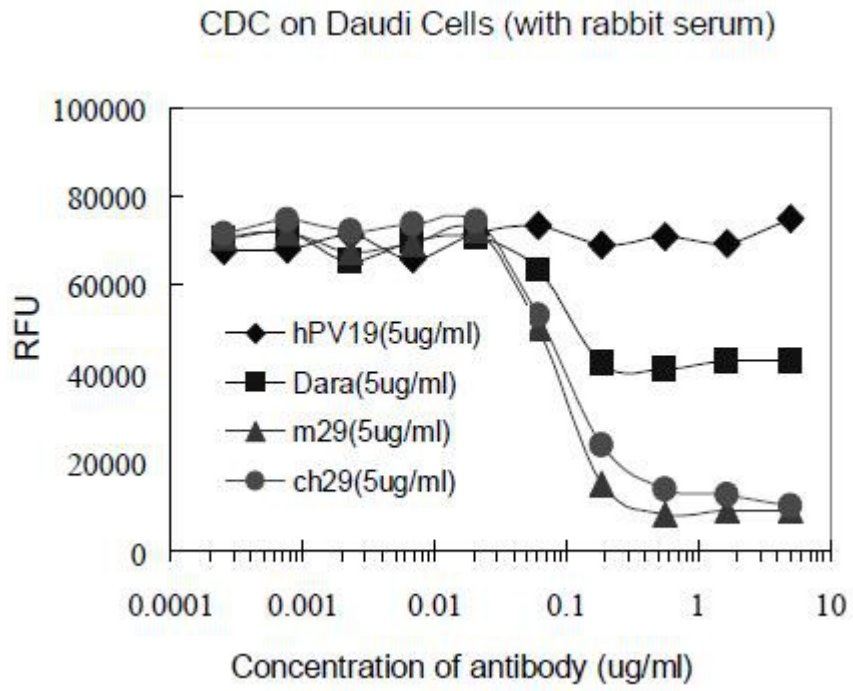


图9

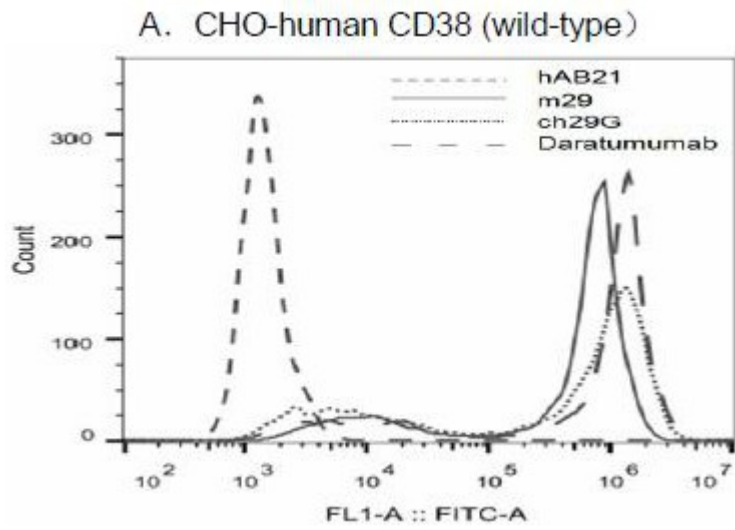


图10A

B. CHO-human CD38 (S_{274F} mutation)

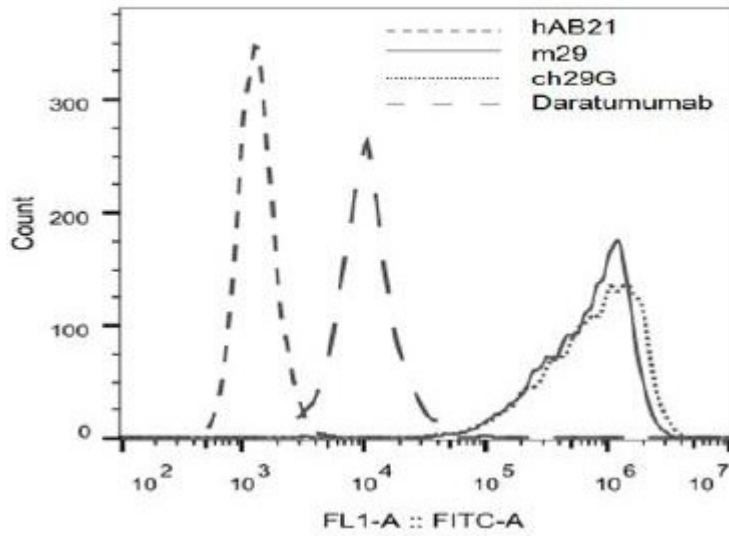


图10B

Identities between human CD38 (huCD38) and monkey CD38 (MkCD38): 275/301(91%)
 黑猩猩 (Chimpanzee)CD38 (ChCD38) 与人 CD38 (huCD38) 仅有三个氨基酸不同

```

ChCD38 1 MANCEFSPVSGDKPCCRLSRF[AQLCLGVSIILVLLVWVLA/VV] PRNRQQWSGPGTTIKRF60
huCD38 1 MANCEFSPVSGDKPCCRLSRF[AQLCLGVSIILVLLVWVLA/VV] PRNRQQWSG[S][T][I][R]FP60
MkCD38 1 MANCEFSPVSGDKPCCRLSRF[AQVCLGVCLLVLLVWVVA/VV] PRNRQQWSG[S][T][S][R]FP61

ChCD38 61 ETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPQNIITEEDYQPLMKLGTQTVPCN120
huCD38 61 ETVLARCVKYTE[H]HPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPQNIITEEDYQPL[I]KLGTQTVPCN120
MkCD38 62 ETVLARCVKYTE[H]HPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKVPCNIITEEDYQPL[I]KLGTQTVPCN121

ChCD38 121 KILLWSRIKDLAQFTQVQRDMFTLEDTLGLYLADDLTWGGEFNISKINYSQSPDWRKDC180
huCD38 121 K[I]LLNSRIKDLAQFTQVQ[Q]DMFTLED[I]LLGLYLADDLTWGGEF[S][T][S]EINYSQSPDWRKDC180
MkCD38 122 K[I]LLNSRIKDLAQFTQVQ[Q]DMFTLED[I]LLGLYLADDLTWGGEF[S][T][S]EINYSQSPDWRKDC181

ChCD38 181 SNNFVSVFWKTVSRRAFAEAACDVVHVMLNGSRSKIIFDKNSIFGSVEVHNLQPEKVTLEA240
huCD38 181 SNNFVSVFWKTVSRRAFAE[A][C]VVHVMLNGSRSKIIFDKNSIFGSVEVHNLQPEKVC[Q]LEA240
MkCD38 182 SNNFVSVFWKTVSRRAFAE[A][C][S]VVHVMLNGSRSKIIFDKNSIFGSVEVHNLQPEKVC[Q]LEA241

ChCD38 241 WVIHGREDSDRLCQDPTIKELESIIISKPNIQF[S]CKNIYRDKFLQCVKNPEDSSCTSEI300
huCD38 241 WVIHGREDSDRLCQDPTIKELESIIISKPNI[I][F][S]CKNIYRDKFLQCVKNPEDSS[C][S][I]300
MkCD38 242 WVIHGREDSDRLCQDPTIKELESIIISKPNI[I][F][S]CKNIYRDKFLQCVKNPEDSS[C][S][I]301
    
```

图11A

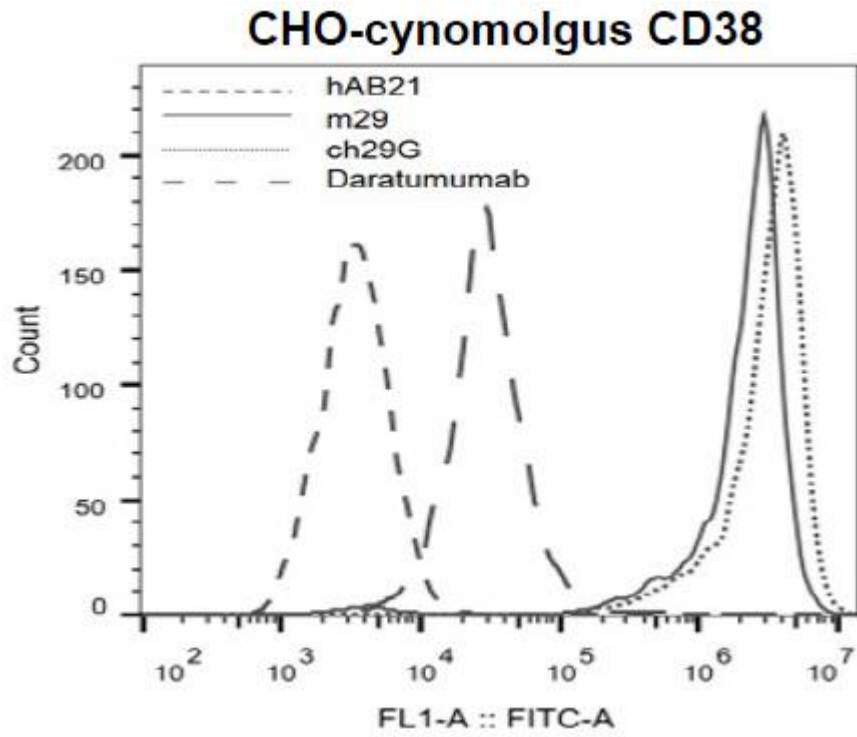


图11B

A: Binding to human CD38 protein

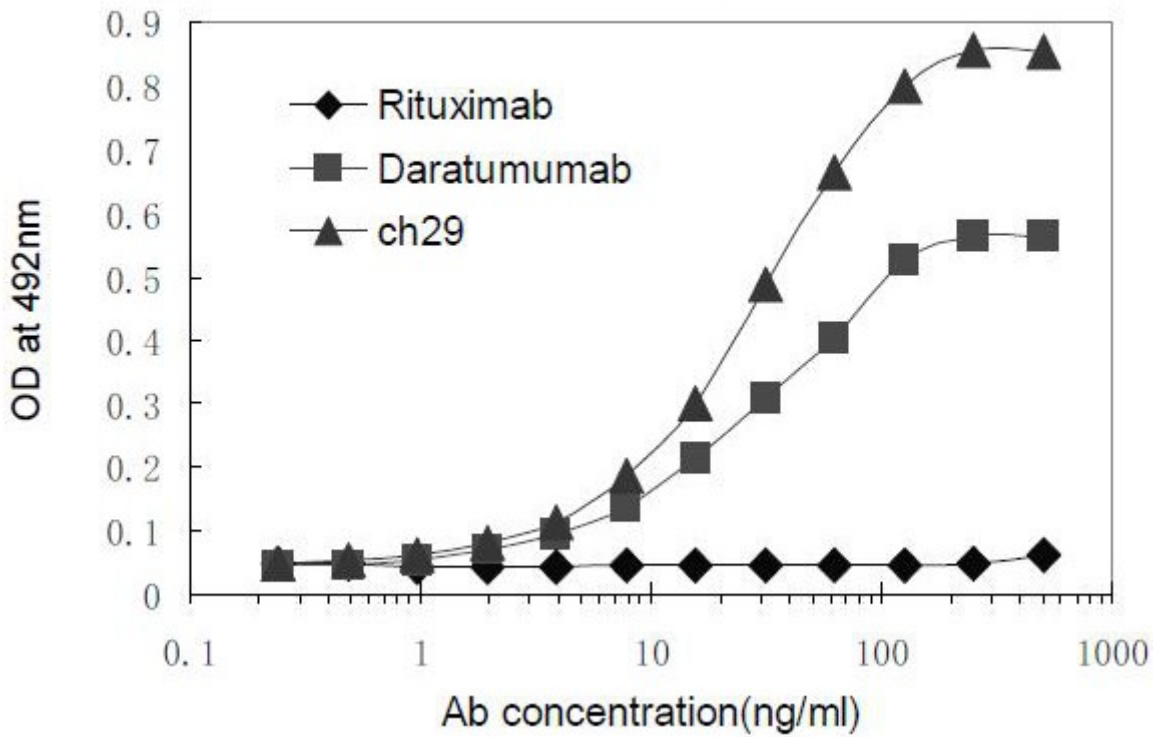


图12A

B: Binding to cynomolgus CD38 protein

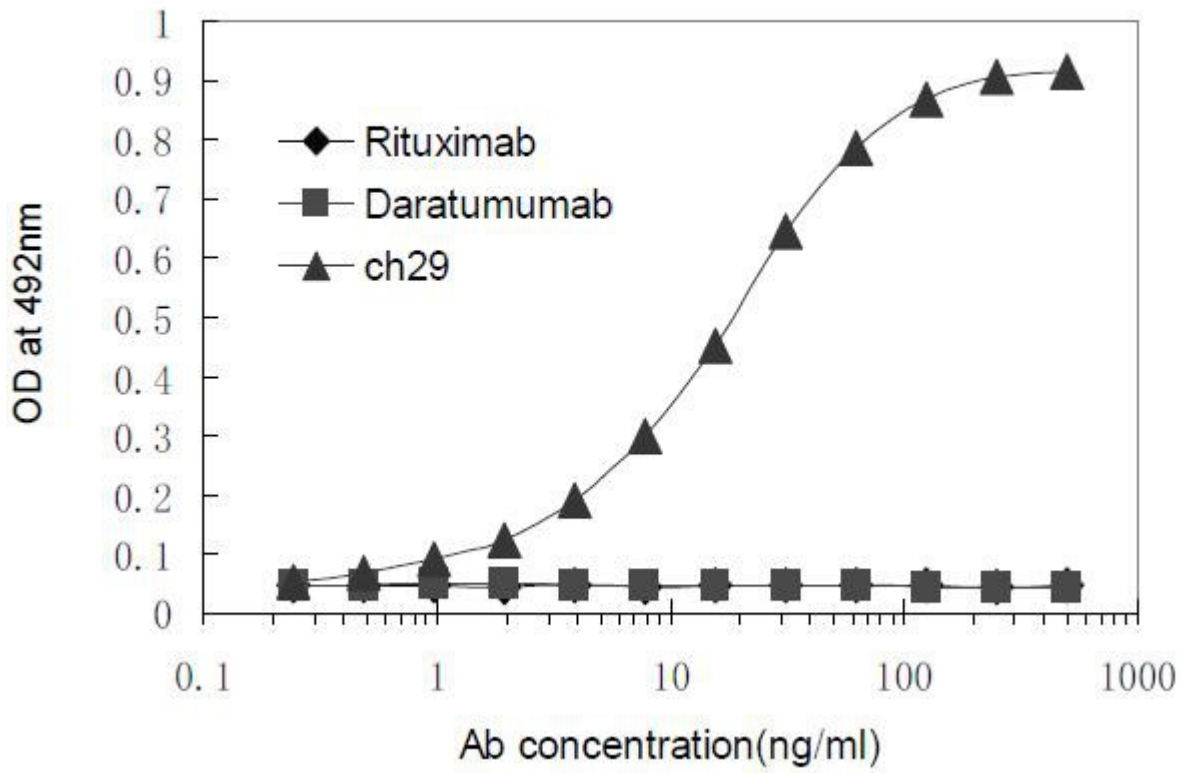


图12B

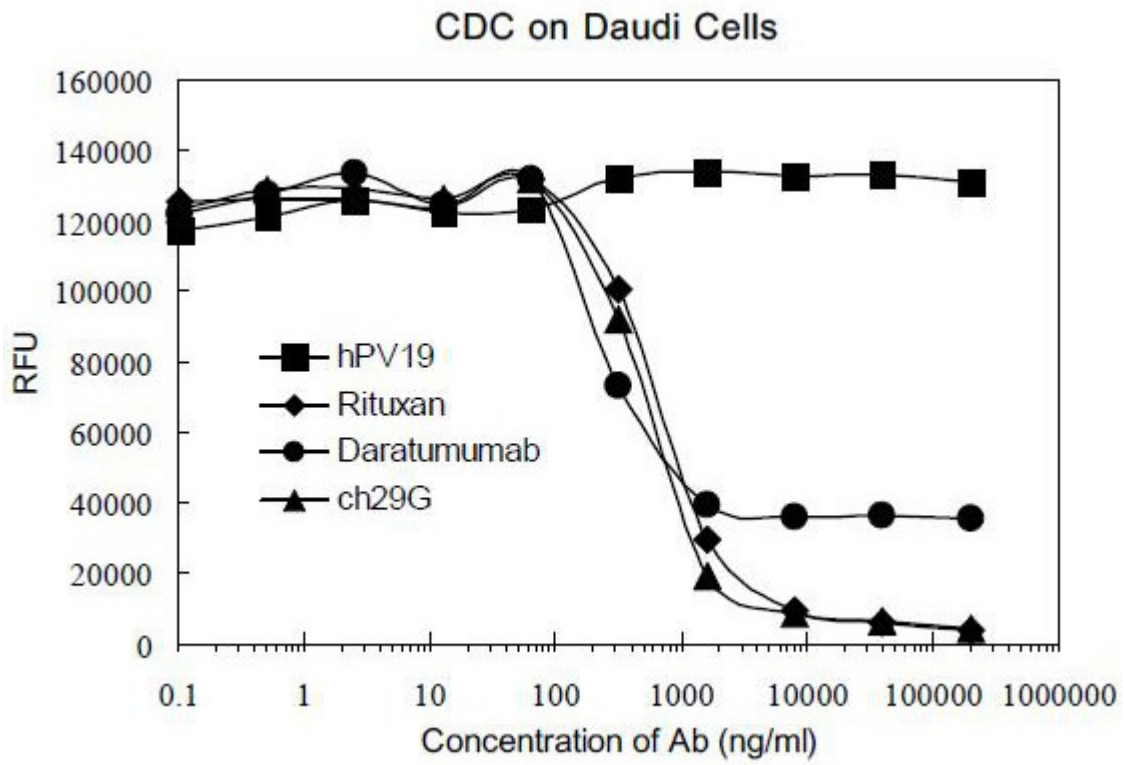


图13A

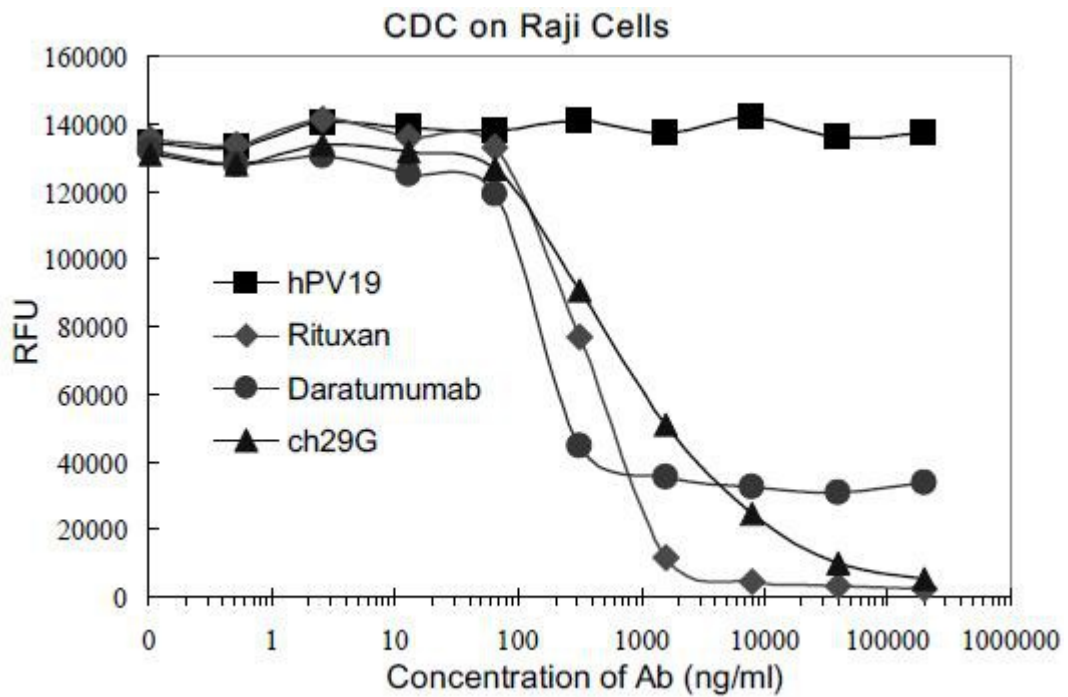


图13B

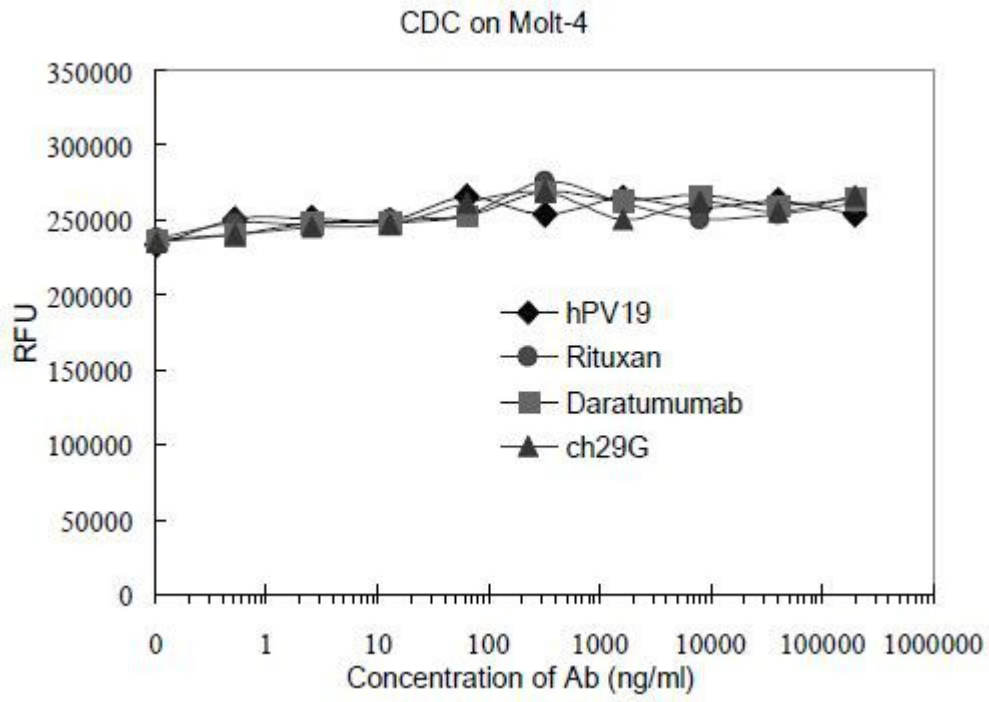


图13C

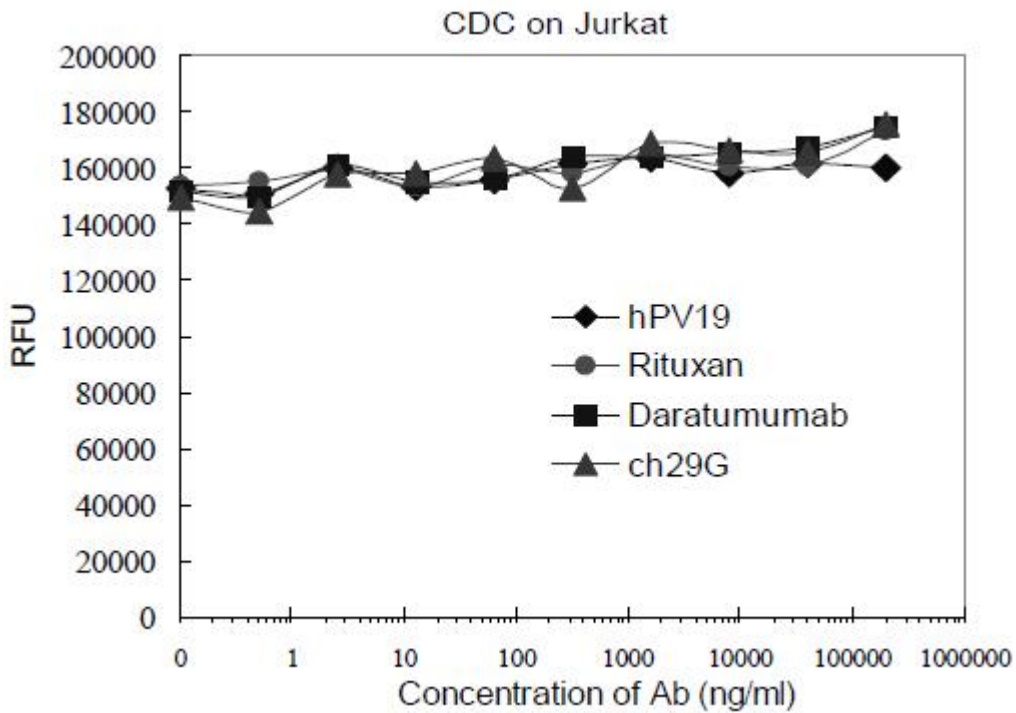


图13D

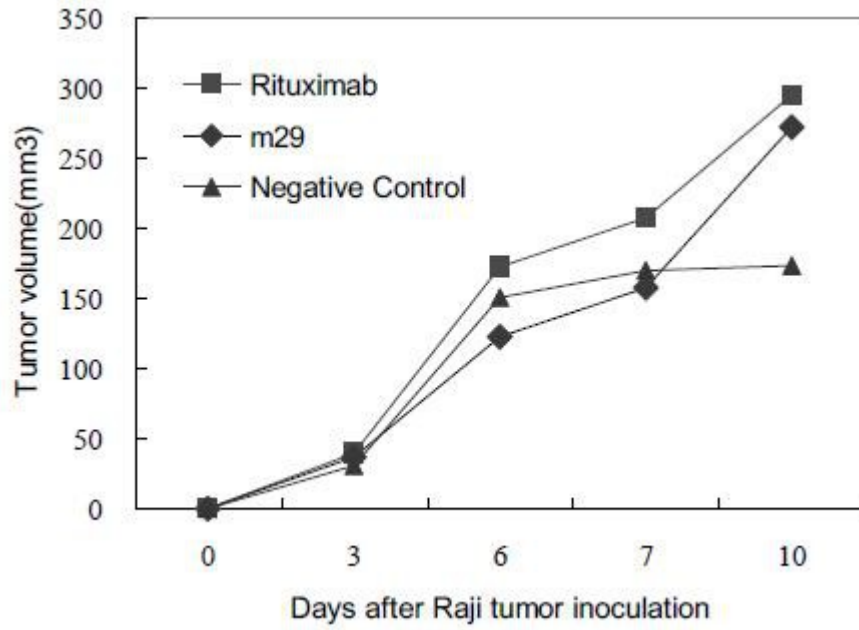


图14A

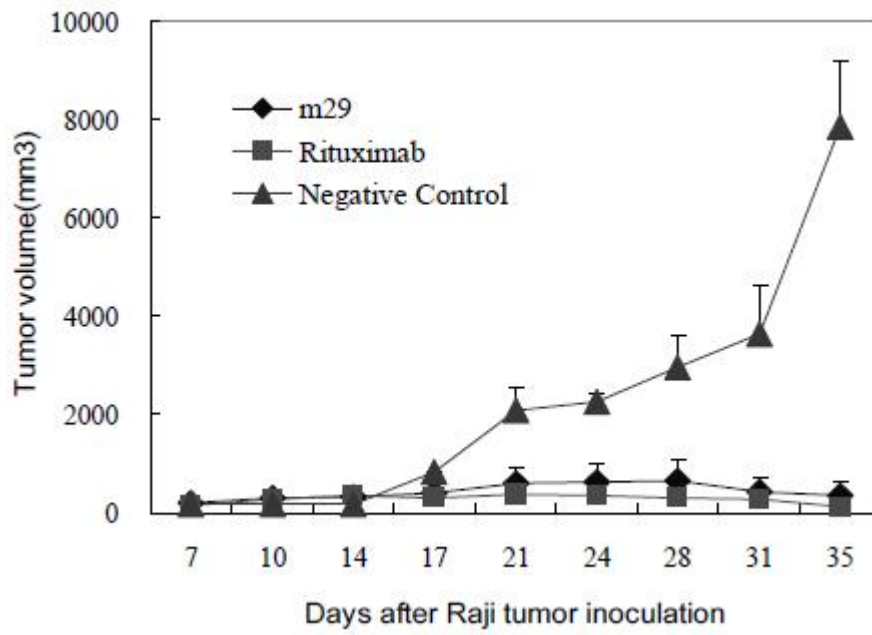


图14B

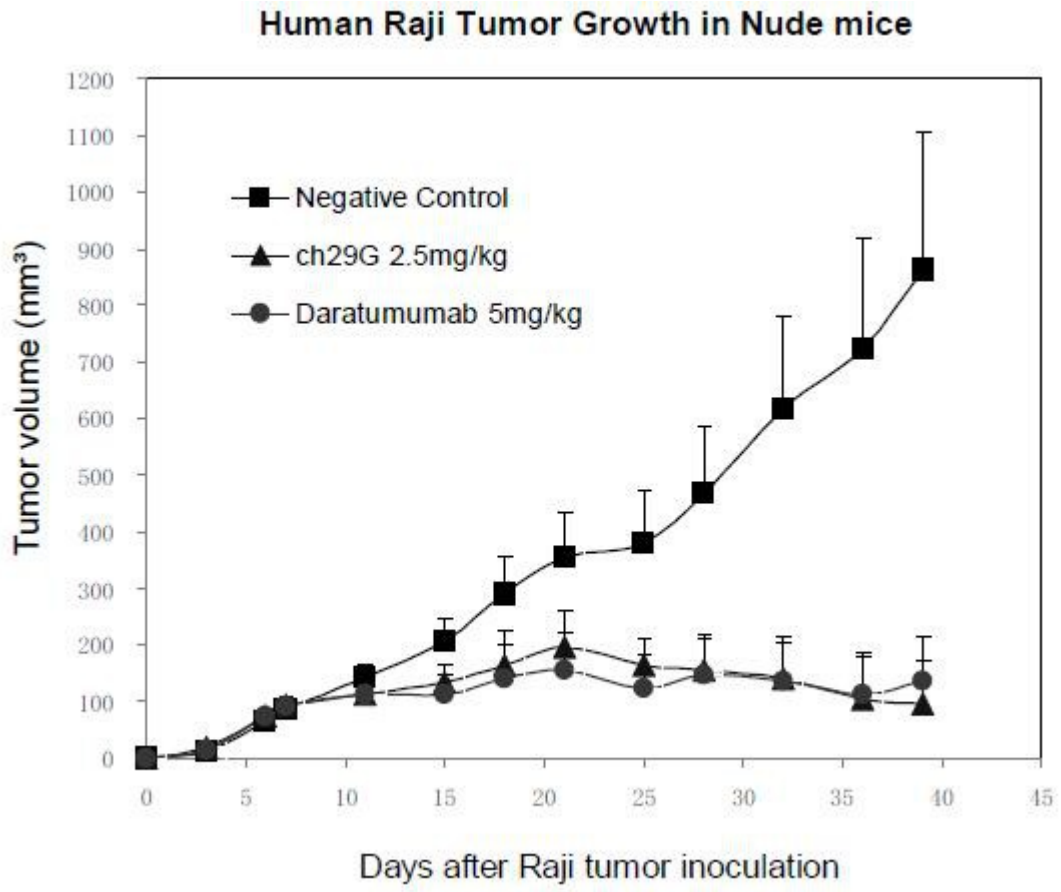


图15