

CD38 蛋白抗体及其应用

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体涉及一种能与 CD38 蛋白结合的抗体。

背景技术

CD38 蛋白是可以催化 NAD⁺转化为环状 ADP 核糖 (cADPR, cyclic ADP-ribose) 并将 cADPR 水解成 ADP 核糖的双功能外切酶。CD38 蛋白是恶性浆细胞上表达的抗原之一，在各种恶性血液病细胞中表达，包括但不限于多发性骨髓瘤细胞、B 细胞慢性淋巴细胞白血病细胞、B 细胞急性淋巴细胞性白血病细胞。

然而，目前已研发的 CD38 抗体识别活性有限，细胞毒性活性有限，且对肿瘤的抑制能力有限，因此亟待开发新的 CD38 抗体以用于新药研发。

发明内容

本申请提供了一种 CD38 抗体及其应用。本申请提供的 CD38 抗体具有下列性质中的一种或多种：1) 能够以较高的亲和力和特异性结合 CD38 蛋白；2) 能够通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒性 ADCC、补体依赖的细胞毒性 CDC 和/或细胞凋亡杀死 CD38⁺细胞；3) 能够杀伤肿瘤细胞和/或抑制肿瘤生长；4) 能够用于预防或治疗肿瘤；5) 能够抑制 CD38 蛋白与 CD38 配体结合。本申请还提供所述 CD38 抗体的制备方法和应用。

一方面，本申请提供了一种抗体或其抗原结合片段，其以 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 值与 CD38 蛋白相结合。

在某些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段能够通过 CD38 蛋白特异性结合而杀伤肿瘤细胞和/或抑制肿瘤生长。

在某些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段能够通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒性 ADCC、补体依赖的细胞毒性 CDC 和/或细胞凋亡杀死 CD38⁺细胞。

在某些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段不结合或基本上不结合 BSA、CD19、TROP2、CD47、AXL 或 Gas6 等不相关抗原。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括 CD38 阳性的肿瘤。在某些实施方式中，所述 CD38 阳性的肿瘤选自以下组：多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。

在某些实施方式中，所述肿瘤选自以下组：非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤细胞包括选自下组的细胞：Raji 细胞、Daudi 细胞、Ramos

细胞和 RPMI8226 细胞。

在某些实施方式中，当所述的抗体或其抗原结合片段与 CD38 蛋白结合时，其结合相应于人 CD38 蛋白第 60 位至第 89 位氨基酸残基中的一个或多个残基（其中，人 CD38 蛋白第 60 位至第 89 位的氨基酸序列如 SEQ ID NO:15 所示）。

在某些实施方式中，所述抗体选自下组：单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

在某些实施方式中，所述抗原结合片段选自下组：Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv 和 ScFv。

在某些实施方式中，所述 CD38 蛋白为人 CD38 蛋白或猴 CD38 蛋白。例如，所述 CD38 蛋白可以不为小鼠 CD38 蛋白，或者可以不为大鼠 CD38 蛋白。

在某些实施方式中，本申请的抗体或其抗原结合片段，其与参比抗体竞争结合所述 CD38 蛋白，其中所述参比抗体包含轻链可变区和重链可变区，所述参比抗体的轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列，所述参比抗体的重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述参比抗体的轻链可变区包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列，且所述参比抗体的重链可变区包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述参比抗体的轻链包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体轻链或其片段包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:20。

在某些实施方式中，所述参比抗体的重链包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体重链或其片段包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:21。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体或其抗原结合片段包含抗体轻链或其片段。在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR1，且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段还包含人恒定区。在某些实施方式中，所述人恒定区包括人 Igκ 恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体轻链或其片段包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列。例如，所述抗体轻链或其片段包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:20。

在某些实施方式中，所述抗体或其抗原结合片段包含抗体重链或其片段。在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段包含重链可变区 VH，且所述重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述抗体重链或其片段还包含人恒定区。在某些实施方式中，人恒定区包括人 IgG 恒定区。在某些实施方式中，所述 IgG 恒定区包含人 IgG1 恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列。例如，所述抗体重链或其片段包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:21。

另一方面，本申请提供了分离的核酸分子，其包含编码本申请所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。

在某些实施方式中，所述的核酸分子中的至少一种经密码子优化。

在某些实施方式中，所述的核酸分子包含一个或多个选自下组的多核苷酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:14。

另一方面，本申请提供了载体，其包含本申请所述的核酸分子。

另一方面，本申请提供了细胞，其包含本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体。

另一方面，本申请提供了制备所述的抗体或其抗原结合片段的方法。所述方法包括在使得所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养本申请所述的细胞。

另一方面，本申请提供了药物组合物，其包含本申请所述的抗体或其抗原结合片段、所述的核酸分子、所述的载体和/或所述的细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。

另一方面，本申请提供了所述的抗体或其抗原结合片段在制备预防或治疗肿瘤的药物中的用途。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括 CD38 阳性的肿瘤。在某些实施方式中，所述 CD38 阳性的肿瘤选自以下组：多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。在某些实施方式中，所述肿瘤选自以下组：非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。

另一方面，本申请提供的所述抗体或其抗原结合片段可用于预防或治疗肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括 CD38 阳性的肿瘤。在某些实施方式中，所述 CD38 阳性的肿瘤选自以下组：多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。在某些实施方式中，所述肿瘤选自以下组：非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。

另一方面，本申请提供了预防或治疗肿瘤的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用本申请所述的抗体或其抗原结合片段、所述的分子核酸、所述的载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括 CD38 阳性的肿瘤。在某些实施方式中，所述 CD38 阳性的肿瘤选自以下组：多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。在某些实施方式中，所述肿瘤选自以下组：非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。

另一方面，本申请提供了抑制 CD38 蛋白与 CD38 配体结合的方法，所述方法包括施用本申请所述的抗体或其抗原结合片段、所述的核酸分子、所述的载体和/或所述的细胞。

在某些实施方式中，所述 CD38 配体包括 CD31。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本公开的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本公开的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本公开的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明书如下：

图 1 显示的是将本申请所述抗体 SG003 构建全抗体表达载体的物理图谱。

图 2 显示的是本申请所述抗体 SG003 与 CD38 蛋白的结合能力。

图 3 显示的是本申请所述抗体 SG003 特异性识别 CD38 蛋白的结果。

图 4A-4D 显示的是本申请所述抗体 SG003 与代表性细胞表面的 CD38 蛋白结合的能力。

图 5A-5D 显示的是本申请所述抗体 SG003 对代表性细胞的 ADCC 活性。

图 6 显示的是本申请所述抗体 SG003 对肿瘤生长的抑制效果。

图 7 显示的是施用本申请所述抗体 SG003 对小鼠生存率的影响。

图 8A-8B 显示的是施用本申请所述抗体 SG003 与不同属来源的 CD38 分子结合能力。

图 9 显示的是施用本申请所述抗体 SG003 进行随机突变后与 CD38 分子的结合能力。

图 10 显示的是表示本申请所述抗体 SG003 结合 CD38 蛋白表位的情况。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

在本申请中，术语“抗体”通常是指一种能够特异性识别和/或中和特定抗原的多肽分子。例如，抗体可包含通过二硫键相互连接的至少两条重（H）链和两条轻（L）链组成的免疫球蛋白，并且包括任何包含其抗原结合部分的分子。术语“抗体”包括单克隆抗体、抗体片段或抗体衍生物，包括但不限于人抗体（全人源抗体）、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体（例如，scFv），以及与抗原结合的抗体片段（例如，Fab、Fab'和（Fab）₂ 片段）。术语“抗体”还包括抗体的所有重组体形式，例如在原核细胞中表达的抗体、未糖基化的抗体以及本文所述的任何与抗原结合的抗体片段及其衍生物。每条重链可由重链可变区（VH）和重链恒定区构成。每条轻链可由轻链可变区（VL）和轻链恒定区构成。VH 和 VL 区可进一步被区分为称为互补决定区（CDR）的高变区，它们散布在称为构架区（FR）的更保守的区域中。每个 VH 和 VL 可由三个 CDR 和四个 FR 区构成，它们从氨基端至羧基端可按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导该免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，所述宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一成分（C1q）。

在本申请中，术语“抗体结合片段”通常是指抗体中发挥特异性结合抗原功能的一个或多个片段。抗体的抗原结合功能可通过抗体的全长片段来实现。抗体的抗原结合功能也可通过以下来实现：包括 Fv、ScFv、dsFv、Fab、Fab'或 F（ab'）₂ 的片段的重链，或者，包括 Fv、ScFv、dsFv、Fab、Fab'或 F（ab'）₂ 的片段的轻链。（1）Fab 片段，即由 VL、VH、CL 和 CH 结构域组成的一价片段；（2）F（ab'）₂ 片段，包含通过铰链区处的二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段；（3）由 VH 和 CH 结构域组成的 Fd 片段；（4）由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；（5）由 VH 结构域组成的 dAb 片段（Ward 等，（1989）Nature 341:

544-546)；(6) 分离的互补决定区(CDR)和(7)可任选地通过接头连接的两个或以上分离的 CDR 的组合。此外，还可包括由 VL 和 VH 配对形成的一价单链分子 Fv(scFv)(参见 Bird 等(1988) Science 242: 423-426；以及 Huston 等(1988) Proc.Natl.Acad.Sci. 85: 5879-5883)。所述“抗原结合部分”还可包括免疫球蛋白融合蛋白，所述融合蛋白包含选自以下的结合结构域：(1)与免疫球蛋白铰链区多肽融合的结合结构域多肽；(2)与铰链区融合的免疫球蛋白重链 CH2 恒定区；和(3)与 CH2 恒定区融合的免疫球蛋白重链 CH3 恒定区。

在本申请中，术语“CD38 蛋白”和“CD38 抗原”在本文中可互换使用，并且包括 CD38 的任何变体，同种型和物种同系物，其由细胞天然表达或在用 CD38 基因转染的细胞上表达。在本申请中，CD38 可以为人类 CD38，其在 GenBank 中的登录号为 BAA18966.1。在本申请中，CD38 可以为猴 CD38，例如猕猴 CD38，其在 GenBank 中的登录号为 AAT36330.1。本申请所述的 CD38 蛋白也可被称为 ADP 核糖基环化酶 1，cADPr 水解酶 1，Cd38-rs1，环状 ADP-核糖水解酶 1，I-19 或 NIM-R5 抗原。“CD38⁺细胞”通常可以指表达 CD38 蛋白的细胞。也可称之为 CD38 阳性细胞。“CD38⁻细胞”通常可以指基本上不表达 CD38 蛋白的细胞。

在本申请中，术语“CD31 蛋白”通常是指在血小板表面，培养的内皮细胞间连接处和骨髓细胞系中发现的 130-140 kDa 大小的跨膜糖蛋白，又称血小板-内皮细胞粘附分子(Platelet endothelial cell adhesion molecule-1，PECAM-1/CD31)。在本申请中，所述 CD31 可以为人类 CD31，其在 GenBank 中的登录号为 NP_000433.4。CD31 可作为 CD38 的配体，在血栓形成和血管生成中发挥作用。

在本申请中，术语“ADCC”是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)，通常是指是指具有杀伤活性的细胞通过其表面表达的 Fc 受体(FcR)识别包被于靶抗原上的 Fc 段。借助所述 ADCC，免疫系统的效应细胞主动溶解其膜表面抗原已被特异性抗体结合的靶细胞。

在本申请中，术语“CDC”是补体依赖型细胞毒性(complement dependent cytotoxicity, CDC)，通常是指补体参与的细胞毒作用。即通过特异性抗体与细胞膜表面相应抗原结合，形成复合物而激活补体经典途径，所形成的攻膜复合物对靶细胞发挥裂解效应。

在本申请中，术语“癌症”通常是指或描述哺乳动物的生理状况，其典型特征在于细胞增殖或存活失调。癌症的例子包括但不限于癌，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤和白血病以及淋巴瘤恶性肿瘤。例如，可以为淋巴瘤。

在本申请中，术语“淋巴瘤”通常是指一种淋巴系统的恶性肿瘤。淋巴瘤的发生是由于淋巴结细胞或淋巴细胞开始无法控制地繁殖，并产生具有异常能力，可以侵入整个身体其他

组织的癌细胞。淋巴瘤有多种亚型，其中两种主要的类型为霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。在本申请中，术语“霍奇金淋巴瘤”（Hodgkin's lymphoma, HL）通常是指一种由淋巴细胞类白细胞产生的一种淋巴瘤。在本申请中，术语“非霍奇金淋巴瘤”（Non-Hodgkin lymphoma, NHL）通常是指除了霍奇金淋巴瘤外其他类型的淋巴瘤。

在本申请中，术语“白血病”通常是指一种造血系统恶性增殖性疾病，通常指因白血病细胞大量增殖、累积所引起的一类疾病。克隆性白血病细胞因为增殖失控、分化障碍、凋亡受阻等机制在骨髓和其他造血组织中大量增殖累积，并浸润其他非造血组织和器官，同时抑制正常造血功能。临床可见不同程度的贫血、出血、感染发热以及肝、脾、淋巴结肿大和骨骼疼痛。

在本申请中，术语“多发性骨髓瘤”（Multiple myeloma, MM）通常是指一种浆细胞不正常增生致使侵犯骨髓的一种恶性肿瘤。多发性骨髓瘤导致癌细胞在骨髓中聚集，使得健康的血细胞被排除。癌细胞产生可导致并发症的异常蛋白质而不是正常的抗体。

在本申请中，术语“Raji 细胞”通常是指能产生 Epstein-Barr 病毒株的连续的人类细胞系。病毒将转化脐带淋巴细胞并且在 Raji 细胞中诱导早期抗原。Raji 细胞被广泛用作转染宿主，也被用于了解造血细胞和其他细胞恶性肿瘤。此外，因为其具有和表达某些补体成分的几种受体以及免疫球蛋白 G 的 Fc 受体，因而还被用于检测免疫复合物。

在本申请中，术语“Daudi 细胞”通常是指来源于 Burkitt 淋巴瘤的细胞系。尽管 Daudi 细胞存在胞内 I 类重链，但其表面无 I 类人类白血球抗原（human leukocyte antigen, HLA）分子表达，这是因为其编码 $\beta 2$ -微球蛋白（ $\beta 2m$ ）的基因存在缺陷，导致该蛋白质缺乏可翻译的 mRNA。

在本申请中，术语“Ramos 细胞”通常是指一种 Burkitt 淋巴瘤的细胞系。该细胞不带有 Epstein-Barr 病毒株，会分泌 IgM。

在本申请中，术语“RPMI8226 细胞”通常是指一种人多发性骨髓瘤的细胞系。

在本申请中，术语“ K_D ”可与“KD”互换使用，通常是指特定的抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，单位为 M（mol/L）。KD 可通过物质 AB 和其解离得到的物质 A 和物质 B 的浓度来计算： $KD = c(A) * c(B) / c(AB)$ 。由该公式可知，KD 值越大，说明解离越多，代表物质 A、B 之间的亲和力越弱；反之，KD 值越小，说明解离越少，代表物质 A、B 之间的亲和力越强。

在本申请中，术语“单克隆抗体”通常是指一群基本同源的抗体的抗体，即包含该群的所有抗体除了可能的以微量存在的天然发生的突变之外是相同的。单克隆抗体是高度特异性

的，直接针对单个抗原性位点。例如，所述单克隆抗体可以通过杂交瘤技术制备或者通过使用重组 DNA 方法在细菌、真核动物或植物细胞中产生单克隆抗体也可以得自噬菌体抗体文库，使用例如 Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) 和 Marks et al., *Mol.Biol.*, 222:581-597 (1991) 所述的技术进行。

在本申请中，术语“单链抗体”(scFv)通常是指通常是指是由抗体重链可变区和轻链可变区通过短肽连接子(linker)连接而成的分子。

在本申请中，术语“嵌合抗体”通常是指这样的抗体，其中每个重链或轻链氨基酸序列的一部分与来自特定物种的抗体中相应氨基酸序列同源，或者属于特定的类别，而该链的其余区段则与另一物种中的相应序列同源。例如，轻链和重链的可变区均来自一个动物物种(如小鼠、大鼠等)的抗体的可变区，而恒定部分则与来自另一物种(如人)的抗体序列同源。例如，为获得嵌合抗体，可利用非人源的 B 细胞或杂交瘤细胞产生可变区，而与其组合的恒定区则来自人。所述可变区具有易于制备的优点，并且其特异性不受与其组合的恒定区的来源的影响。同时，由于嵌合抗体的恒定区可来源于人类，因此嵌合在注射时抗体引发免疫应答的可能性会低于使用恒定区为非人来源的抗体。

在本申请中，术语“人源化抗体”通常是指一种嵌合抗体，其含有较少的来自非人免疫球蛋白的序列，从而降低异种抗体引入到人类中时的免疫原性，同时保持抗体的完全抗原结合亲和力和特异性。例如，可以使用 CDR 移植(Jones et al., *Nature* 321:522 (1986))及其变体；包括“重塑”(reshaping)，(Verhoeven, et al., 1988 *Science* 239:1534-1536; Riechmann, et al., 1988 *Nature* 332:323-337; Tempest, et al., *Bio/Technol* 1991 9:266-271)，“高度加成”(hyperchimerization)，(Queen, et al., 1989 *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10029-10033; Co, et al., 1991 *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2869-2873; Co, et al., 1992 *J Immunol* 148:1149-1154)和“贴面”(veneering)，(Mark, et al., “Derivation of therapeutically active humanized and veneered anti-CD18 antibodies.” In: Metcalf B W, Dalton B J, eds. *Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential*. New York: Plenum Press, 1994: 291-312)、表面重建(美国专利 US5639641)等技术手段，对非人源的结合域进行人源化。如果其他区域，例如铰链区和恒定区结构域也源自非人来源，则这些区域也可以被人源化。

在本申请中，术语“表位”通常是指抗原决定簇，即指分子中被免疫系统识别(例如被抗体识别)的部分。例如，表位可以是免疫系统识别的抗原上不连续的三维位点。表位通常由分子的化学活性表面基团(例如氨基酸或糖侧链)组成，并通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位根据结构，可分为构象表位和非构象表位(线性表位)。表位

可以由连续的残基构成，或者由被抗原聚合物的折叠造成邻近的不连续残基形成。

在本申请中，术语“IgG”通常是指免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G)。IgG 是人的免疫球蛋白之一，其他还有 IgA、IgM、IgD 和 IgE。根据 IgG 分子中的 γ 链抗原性差异，人 IgG 有四个亚型：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。IgG 在免疫中发挥重要的作用。在本申请中，术语“IgG1”通常是指 IgG 中占比最高的一类亚型，与 Fc 受体有较高亲和性。

在本申请中，术语“核酸分子”通常是指从其天然环境中分离的或人工合成的任何长度的分离形式的核苷酸、脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。

在本申请中，术语“载体”通常是指能够在合适的宿主中自我复制的核酸分子。所述载体可将插入的核酸分子转移到细胞中和/或细胞之间。所述载体可包括主要用于将 DNA 或 RNA 插入细胞中的载体、主要用于复制 DNA 或 RNA 的载体，以及主要用于 DNA 或 RNA 的转录和/或翻译的表达的载体。所述载体可以是当引入合适的细胞时能够转录并翻译成多肽的多核苷酸。通常，通过培养包含所述载体的合适的细胞，所述载体可以产生期望的表达产物。

在本申请中，术语“细胞”通常是指可以或已经含有包括本申请所述的核酸分子的质粒或载体，或者能够表达本申请所述的抗体或其抗原结合片段的个体细胞，细胞系或细胞培养物。所述细胞可以包括单个细胞的子代。由于天然的，意外的或故意的突变，子代细胞与原始亲本细胞在形态上或在基因组上可能不一定完全相同，但能够表达本申请所述的抗体或其抗原结合片段即可。所述细胞可以通过使用本申请所述的载体体外转染细胞而得到。所述细胞可以是原核细胞（例如大肠杆菌），也可以是真核细胞（例如酵母细胞，例如 COS 细胞，中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞，HeLa 细胞，HEK293 细胞，COS-1 细胞，NS0 细胞或骨髓瘤细胞）。在一些实施方案中，所述细胞是哺乳动物细胞。例如，所述哺乳动物细胞可以是 CHO-K1 细胞。在本申请中，术语“重组细胞”通常指在其中引入了重组表达载体的细胞。所述重组细胞不仅包括某种特定的细胞，还包括这些细胞的后代。

在本申请中，术语“蛋白 A”和“ProA”在本文中可互换使用，并且包括从其天然来源回收的蛋白 A，合成产生的蛋白 A（例如通过肽合成或通过重组技术），以及保留蛋白质结合能力的变体。所述蛋白质 A 可以从 Repligen，Pharmacia 和 Fermatech 购买。蛋白质 A 通常固定在固相载体材料上。术语“ProA”还指亲和层析树脂或含有与其共价连接的蛋白 A 的色谱固体支持基质的柱。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10% 的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、

6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10% 的范围内变动。

在本申请中，术语“包括”通常是指包含、总括、含有或包涵的含义。在某些情况下，也表示“为”、“由……组成”的含义。

抗体、其抗体结合片段或变体

在一个方面，本申请提供了一种抗体或其抗原结合片段或变体，其以 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 以下（例如，所述 K_D 的值不高于约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、不高于约 $9 \times 10^{-10} \text{M}$ 、不高于约 $8 \times 10^{-10} \text{M}$ 、不高于约 $7 \times 10^{-10} \text{M}$ 、不高于约 $6 \times 10^{-10} \text{M}$ 、不高于约 $5 \times 10^{-10} \text{M}$ 、不高于约 $4 \times 10^{-10} \text{M}$ 、不高于约 $3 \times 10^{-10} \text{M}$ 、不高于约 $2 \times 10^{-10} \text{M}$ 、不高于 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 或不高于约 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 或以下）的 K_D 值与 CD38 蛋白相结合。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段，可通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒性 ADCC、补体依赖的细胞毒性 CDC 和/或细胞凋亡杀死 CD38⁺ 细胞。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段或变体，可通过与 CD38 蛋白特异性结合而杀伤肿瘤细胞和/或抑制肿瘤生长。例如，所述肿瘤可以包括 CD38 阳性的肿瘤。如，所述 CD38 阳性的肿瘤可以选自以下组：多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。又例如，所述肿瘤选自以下组：非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。所述肿瘤细胞可以选自以下组：Raji 细胞、Daudi 细胞、Ramos 细胞和 RPMI8226 细胞。在本申请中，所述抗体或其抗原结合片段可以杀伤多发性骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤细胞或抑制多发性骨髓瘤、淋巴瘤、白血病、非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤生长。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段，当与 CD38 蛋白结合时，其可以结合相应于人 CD38 蛋白第 60 位至第 89 位的氨基酸残基中的一个或多个残基。例如，人 CD38 蛋白第 60 位至第 89 位的氨基酸残基可以如 SEQ ID NO:15 所示。

在本申请中，所述抗体或其抗原结合片段还可能结合相应于人 CD38 蛋白第 90 位至第 119 位的氨基酸残基，相应于人 CD38 蛋白第 150 位至第 159 位的氨基酸残基，或者，相应于人 CD38 蛋白第 180 位至第 189 位的氨基酸残基。

在本申请中，所述抗体或其抗原结合片段可基本上不结合相应于人 CD38 蛋白第 170 位至第 179 位的氨基酸残基，或者，不可结合相应于人 CD38 蛋白第 291 位至第 300 位的氨基酸残基。

本申请所述的抗体可以为单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和/或全人源抗体。本申请所述抗体的抗原结合片段可以为 Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv 和/或 ScFv 片段。

本申请所述的 CD38 蛋白可为人 CD38 蛋白或猴 CD38 蛋白。例如，所述的 CD38 蛋白可

以不为小鼠 CD38 蛋白，或者可以不为大鼠 CD38 蛋白。在某些实施方式中，本申请所述的抗体或其抗原结合片段基本上不结合小鼠 CD38 蛋白或大鼠 CD38 蛋白。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段，可以与参比抗体竞争结合所述 CD38 蛋白。所述参比抗体可以包含轻链可变区和重链可变区。例如，所述参比抗体的轻链可变区可包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列，所述参比抗体的重链可变区可包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的轻链可变区的氨基酸序列可以包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列，且所述参比抗体的重链可变区的氨基酸序列可以包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述参比抗体的轻链可包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列；例如，所述参比抗体的轻链可包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:20。所述参比抗体的重链可包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列；例如，所述参比抗体的重链可包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:21

例如，所述参比抗体的轻链可包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列，且所述参比抗体的重链可包含 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体的轻链可包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列，且所述参比抗体的重链可包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体的轻链可包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列，且所述参比抗体的重链可包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列。例如，所述参比抗体的轻链可包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，且所述参比抗体的重链可包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段可包含抗体轻链或其片段。

例如，所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR1，且所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR2，且所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。所述抗体轻链或其片段可包含 LCDR3，且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。

本申请所述抗体的轻链或其片段可包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 可包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述抗体轻链或其片段可包括 Igκ 恒定区,例如可包含人 Igκ 恒定区。

在本申请中,所述抗体轻链或其片段可包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列:

EIVMTQSPASLSASLGQRAX²⁰ISCRASX²⁷SVSX³¹SAX³⁴SYVHWYQQKSGQPPKLLIYL
ASX⁵⁷X⁵⁸X⁵⁹SGVPARFSGSGSGTDFLTITHPVESEDVATYYCHHSRX⁹⁷X⁹⁸PX¹⁰⁰X¹⁰¹FGSGTKL
EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:22)。

其中, X²⁰=T 或 S; X²⁷=S 或 N; X³¹=S 或 T; X³⁴=F 或 Y; X⁵⁷=N 和 D; X⁵⁸=L 或 I; X⁵⁹=E 或 Q; X⁹⁷=E 或 Q; X⁹⁸=L 或 V; X¹⁰⁰=F 或 S; X¹⁰¹=T 或 S。

在一些实施方式中,与 SEQ ID NO:11 所示抗体的轻链相比,所述抗体轻链或其片段至少包含在选自以下任一组的氨基酸取代:

- (a) 在 X²⁰、X²⁷、X³⁴、X⁵⁸、X⁵⁹、X⁹⁷ 和/或 X¹⁰⁰ 处的氨基酸取代;
- (b) 在 X³⁴、X⁵⁷、X⁵⁹、X¹⁰⁰ 和/或 X¹⁰¹ 处的氨基酸取代; 和
- (c) 在 X²⁷、X³¹ 和/或 X⁹⁸ 处的氨基酸取代。

在一些实施方式中,与 SEQ ID NO:11 所示抗体的轻链相比,所述抗体轻链或其片段至少包含在 X²⁰、X²⁷、X³⁴、X⁵⁸、X⁵⁹、X⁹⁷ 和/或 X¹⁰⁰ 处的氨基酸取代,其中, X²⁰ 处的氨基酸可被取代为 T 或 S; X²⁷ 处的氨基酸可被取代为 S 或 N; X³⁴ 处的氨基酸可被取代为 F 或 Y; X⁵⁸ 处的氨基酸可被取代为 L 或 I; X⁵⁹ 处的氨基酸可被取代为 E 或 Q; X⁹⁷ 处的氨基酸可被取代为 E 或 Q; X¹⁰⁰ 处的氨基酸可被取代为 F 或 S。

在一些实施方式中,与 SEQ ID NO:11 所示抗体的轻链相比,所述抗体轻链或其片段至少包含在 X³⁴、X⁵⁷、X⁵⁹、X¹⁰⁰ 和/或 X¹⁰¹ 处的氨基酸取代,其中, X³⁴ 处的氨基酸可被取代为 F 或 Y; X⁵⁷ 处的氨基酸可被取代为 N 或 D; X⁵⁹ 处的氨基酸可被取代为 E 或 Q; X¹⁰⁰ 处的氨基酸可被取代为 F 或 S; X¹⁰¹ 处的氨基酸可被取代为 T 或 S。

在一些实施方式中,与 SEQ ID NO:11 所示抗体的轻链相比,所述抗体轻链或其片段至少包含在 X²⁷、X³¹ 和/或 X⁹⁸ 处的氨基酸取代,其中, X²⁷ 处的氨基酸可被取代为 S 或 N; X³¹ 处的氨基酸可被取代为 S 或 T; X⁹⁸ 处的氨基酸可被取代为 L 或 V。

例如,所述抗体轻链或其片段可包含下述任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:20。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段可包含抗体重链或其片段。

在本申请中,所述抗体重链或其片段可包含 HCDR1,且所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。所述抗体重链或其片段可包含 HCDR2,且所述 HCDR2 可包含 SEQ ID

NO:5 所示的氨基酸序列。又例如,所述抗体重链或其片段可包含 HCDR3,且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。

所述抗体重链或其片段可包含重链可变区 VH,且所述重链可变区 VH 可包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。

在本申请中,所述抗体重链或其片段还包含人恒定区。例如,所述人恒定区可包括人 IgG 恒定区。例如,所述 IgG 恒定区可包含人 IgG1 恒定区。

在本申请中,所述抗体重链或其片段可包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列:

QVQLLES G GGLVQP G GSLK LSCV ASGX²⁷X²⁸FSLYX³³MNWVRQAPGKGLEWIGKIX⁵²PX⁵⁴SSX⁵⁷X⁵⁸X⁵⁹YX⁶¹PSX⁶⁴KDKFFISRDNAKNTLYLQMTKVRSEDTALYYCARLX¹⁰⁰IX¹⁰²X¹⁰³GGX¹⁰⁶X¹⁰⁷YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:23)。其中, X²⁷=F 或 Y; X²⁸=D 或 N; X³³=W 或 Y; X⁵²=N、Q 或 S; X⁵⁴=D、E 或 N; X⁵⁷=T 或 S; X⁵⁸=I 或 L; X⁵⁹=N 或 Q; X⁶¹=T 或 S; X⁶⁴=L 或 V; X¹⁰⁰=W 或 Y; X¹⁰²=A 或 G; X¹⁰³=T 或 S; X¹⁰⁶=F 或 Y; X¹⁰⁷=D 或 N。

在一些实施方式中,与 SEQ ID NO:13 所示抗体的轻链相比,所述抗体轻链或其片段至少包含在选自以下任一组的氨基酸取代:

- (a) 在 X²⁷、X²⁸、X³³、X⁵²、X⁵⁴、X⁵⁹、X¹⁰² 和/或 X¹⁰³ 处的氨基酸取代;
- (b) 在 X⁵²、X⁵⁴、X⁶¹、X¹⁰⁰ 和/或 X¹⁰³ 处的氨基酸取代; 和
- (c) 在 X⁵²、X⁵⁷、X⁵⁸、X⁶⁴、X¹⁰⁶ 和/或 X¹⁰⁷ 的氨基酸取代。

在一些实施方式中,与 SEQ ID NO:13 所示抗体的轻链相比,所述抗体轻链或其片段至少包含在 X²⁷、X²⁸、X³³、X⁵²、X⁵⁴、X⁵⁹、X¹⁰² 和/或 X¹⁰³ 处的氨基酸取代,其中,X²⁷ 处的氨基酸可被取代为 F 或 Y; X²⁸ 处的氨基酸可被取代为 D 或 N; X³³ 处的氨基酸可被取代为 W 或 Y; X⁵² 处的氨基酸可被取代为 N 或 Q; X⁵⁴ 处的氨基酸可被取代为 D 或 E; X⁵⁹ 处的氨基酸可被取代为 N 或 Q; X¹⁰² 处的氨基酸可被取代为 A 或 G; X¹⁰³ 处的氨基酸可被取代为 T 或 S。

在一些实施方式中,与 SEQ ID NO:13 所示抗体的轻链相比,所述抗体轻链或其片段至少包含在 X⁵²、X⁵⁴、X⁶¹、X¹⁰⁰ 和/或 X¹⁰³ 处的氨基酸取代,其中,X⁵² 处的氨基酸可被取代为

N 或 S；X⁵⁴ 处的氨基酸可被取代为 D 或 N；X⁶¹ 处的氨基酸可被取代为 T 或 S；X¹⁰⁰ 处的氨基酸可被取代为 W 或 Y；X¹⁰³ 处的氨基酸可被取代为 T 或 S。

在一些实施方式中，与 SEQ ID NO:13 所示抗体的轻链相比，所述抗体轻链或其片段至少包含在 X⁵²、X⁵⁷、X⁵⁸、X⁶⁴、X¹⁰⁶ 和/或 X¹⁰⁷ 处的氨基酸取代，其中，X⁵² 处的氨基酸可被取代为 N 或 S；X⁵⁷ 处的氨基酸可被取代为 T 或 S；X⁵⁸ 处的氨基酸可被取代为 I 或 L；X⁶⁴ 处的氨基酸可被取代为 L 或 V；X¹⁰⁶ 处的氨基酸可被取代为 F 或 Y；X¹⁰⁷ 处的氨基酸可被取代为 D 或 N。

在某些实施方式中，所述抗体重链可包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:21。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体或其抗原结合片段中 LCDR1 可包括 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或其变体；LCDR2 可包括 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列或其变体；LCDR3 可包括 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或其变体；且 HCDR1 可包括 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或其变体；HCDR2 可包括 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列或其变体；HCDR3 可包括 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列或其变体。例如，该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 SG003 或与其具有相同的 LCDR1-3 及 HCDR1-3 的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体或其抗原结合片段的轻链可包含轻链可变区，所述轻链可变区可包括 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或其变体；且其中重链可包含重链可变区，所述重链可变区可包括 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或其变体。例如，该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 SG003 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，本申请所述的抗体或其抗原结合片段可包含轻链和重链，所述轻链可包括 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列且所述重链可包括如 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列。例如，该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 SG003 或与其具有相同的轻链及重链氨基酸序列。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体可以为 SG003。抗体 SG003 的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别包含 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2 和 SEQ ID NO. 3 所示的氨基酸序列；VL 可包含 SEQ ID NO. 7 所示的氨基酸序列；HCDR1、LCDR2 和 LCDR3 可分别包含 SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5 和 SEQ ID NO. 6 所示的氨基酸序列；VH 可包含 SEQ ID NO. 8 所示的氨基酸序列；轻链可包含 SEQ ID NO. 11 所示的氨基酸序列；重链可包含 SEQ ID NO. 13 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体或其抗原结合片段与参比抗体竞争结合 CD38 蛋白（例，人 CD38 蛋白或猴 CD38 蛋白）。所述参比抗体可包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3 和

HCDR1、HCDR2、HCDR3，且其 LCDR1 可包括 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列；LCDR2 可包括 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列；LCDR3 可包括 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列；其 HCDR1 可包括 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列；HCDR2 可包括 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列；HCDR3 可包括 SEQ ID NO :6 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述参比抗体可包括抗体 SG003 或与其具有相同的 LCDR1、LCDR2、LCDR3 和 HCDR1、HCDR2、HCDR3 的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链可变区和重链可变区，所述轻链可变区可包括 SEQ ID NO :7 所示的氨基酸序列；且所述重链可变区可包括 SEQ ID NO :8 所示的氨基酸序列。例如，该抗体或其抗原结合片段可包括抗体 SG003 或与其具有相同的轻链可变区及重链可变区的抗体。在某些实施方式中，所述参比抗体可包含轻链和重链，所述轻链可包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列且所述重链可包含 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列。例，该参比抗体或其抗原结合片段可包括抗体 SG003 或与其具有相同的轻链及重链。

本申请所述的抗体或其抗原结合片段或，还可以在其轻链和/或重链的氨基酸序列中包含一个或多个随机突变（例，一个或多个、一个或数个氨基酸取代）。例，所述抗体或其抗原结合片段可在其轻链可变区的框架区 L-FR1~L-FR4 的一个或多个位点包含一个或多个随机突变（例，一个或多个，一个或数个氨基酸取代），和/或在其重链可变区的框架区 H-FR1~H-FR4 的一个或多个位点包含一个或多个随机突变（例，一个或多个，一个或数个氨基酸取代）。例，发生随机突变后，所述的抗体或其抗原结合片段的轻链可包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:20；和/或，所述的抗体或其抗原结合片段或的重链可包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:21。发生随机突变后的 CD38 抗体或其抗原结合片段，仍具有特异性结合人 CD38 蛋白和猴 CD38 蛋白的能力。

在某些实施方式中，本申请所述的抗体或其抗原结合片段的轻链可包括 SEQ ID NO :16 所示的氨基酸序列；并且其重链可包括 SEQ ID NO :17 所示的氨基酸序列；或者，本申请所述的抗体或其抗原结合片段的轻链可包括 SEQ ID NO :18 所示的氨基酸序列；并且其重链可包括 SEQ ID NO :19 所示的氨基酸序列；或者，本申请所述的抗体或其抗原结合片段的轻链可包括 SEQ ID NO :20 所示的氨基酸序列；并且其重链可包括 SEQ ID NO :21 所示的氨基酸序列。

在本申请中涉及的蛋白质、多肽和/或氨基酸序列，还应理解为至少包含以下的范围：与该所述蛋白质或多肽具备相同或类似功能的变体或同源物。

在本申请中，所述变体可以为，在所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 CD38

蛋白的抗体或其片段)的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽。例如,所述功能性变体可包含已经通过至少 1 个,例如 1-30 个、1-20 个或 1-10 个,又例如 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的蛋白质或多肽。所述功能性变体可基本上保持改变(例如取代、缺失或添加)之前的所述蛋白质或所述多肽的生物学特性。例如,所述功能性变体可保持改变之前的所述蛋白质或所述多肽的至少 60%, 70%, 80%, 90%, 或 100%的生物学活性(例如抗原结合能力)。例如,所述取代可以为保守取代。

在本申请中,所述同源物可以为,与所述蛋白质和/或所述多肽(例如,特异性结合 CD38 蛋白的抗体或其片段)的氨基酸序列具有至少约 85%(例如,具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的)序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中,所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。可以通过以下方式计算“序列同源性百分比”:将两条待比对的序列在比较窗中进行比较,确定两条序列中存在相同核酸碱基(例如,A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met)的位置的数目以得到匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数(即,窗大小),并且将结果乘以 100,以产生序列同源性百分比。为了确定序列同源性百分数而进行的比对,可以按本领域已知的多种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数,包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定:FASTA 和 BLAST。对 FASTA 算法的描述可以参见 W. R. Pearson 和 D. J. Lipman 的“用于生物学序列比较的改进的工具”,美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci.), 85: 2444-2448, 1988; 和 D. J. Lipman 和 W. R. Pearson 的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”, Science, 227: 1435-1441, 1989。对 BLAST 算法的描述可参见 S. Altschul、W. Gish、W. Miller、E. W. Myers 和 D. Lipman 的“一种基本的局部对比(alignment)搜索工具”,分子生物学杂志, 215: 403-410, 1990。

核酸、载体、细胞和制备方法

在另一个方面,本申请还提供了分离的一种或多种核酸分子。所述一种或多种核酸分子可包含编码本申请所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。例如,所述一种或多种核酸分子

中的多核苷酸可以编码完整的所述抗体或其抗原结合片段，也可以编码其中的一部分（例如，HCDR1-3、LCDR1-3、VL、VH、轻链或重链中的一种或多种）。

本申请所述的核酸分子中的至少一种所述核酸分子可经密码子优化。例如，所述密码子优化的方法包括但不限于：消除稀有密码子、调整 GC 含量、增加 mRNA 的稳定性、调整 mRNA 的二级结构、合理设计接头和调整起始密码子环境。

在某些实施方式中，所述核酸分子可包含一个或多个选自下组的多核苷酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:14。其中，SEQ ID NO:9 可编码本申请所述抗体 SG003 的轻链可变区。SEQ ID NO:10 可编码本申请所述抗体 SG003 的重链可变区。SEQ ID NO:12 可编码本申请所述抗体 SG003 的轻链。SEQ ID NO:14 可编码本申请所述抗体 SG003 的重链。

本申请所述的核酸分子可以为分离的。例如，其可以通过以下方法产生或合成的：(i) 在体外扩增的，例如通过聚合酶链式反应（PCR）扩增产生的，(ii) 通过克隆重组产生的，(iii) 纯化的，例如通过酶切和凝胶电泳分级分离，或者 (iv) 合成的，例如通过化学合成。在某些实施方式中，所述分离的核酸是通过重组 DNA 技术制备的核酸分子。

在本申请中，可以通过本领域已知的多种方法来制备编码所述的抗体或其抗原结合片段的核酸，这些方法包括但不限于，采用限制性片段操作或采用合成性寡核苷酸的重叠延伸 PCR，具体操作可参见 Sambrook 等人，Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989；和 Ausube 等人 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York N.Y., 1993。

在另一个方面，本申请提供了一种或多种载体，其包含本申请所述的一种或多种核酸分子。每种载体中可包含一种或多种所述核酸分子。此外，所述载体中还可包含其他基因，例如允许在适当的细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外，所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。这样的控制元件为本领域技术人员所熟知的，例如，可包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或 mRNA 翻译的其他控制元件等。在某些实施方式中，所述表达控制序列为可调的元件。所述表达控制序列的具体结构可根据物种或细胞类型的功能而变化，但通常包含分别参与转录和翻译起始的 5' 非转录序列和 5' 及 3' 非翻译序列，例如 TATA 盒、加帽序列、CAAT 序列等。例如，5' 非转录表达控制序列可包含启动子区，启动子区可包含用于转录控制功能性连接核酸的启动子序列。所述表达控制序列还可包括增强子序列或上游活化子序列。本申请所述的一种或多种核酸分子可以与所述表达控制元件可操作地连接。

所述载体可以包括，例如质粒、粘粒、病毒、噬菌体或者在例如遗传工程中通常使用的其他载体。例如，所述载体为表达载体。例如，所述表达载体可以为 T-easy。

在另一个方面，本申请提供了细胞，所述细胞可包含本申请所述的一种或多种核酸分子和/或本申请所述的一种或多种载体。在某些实施方式中，每种或每个细胞可包含一个或一种本申请所述的核酸分子或载体。在某些实施方式中，每种或每个细胞可包含多个（例如，2 个或以上）或多种（例如，2 种或以上）本申请所述的核酸分子或载体。例如，可将本申请所述的载体引入所述细胞中，例如真核细胞，如来自植物的细胞、真菌或酵母细胞等。可通过本领域已知的方法将本申请所述的载体引入所述细胞中，例如电穿孔、lipofectine 转染、lipofectamin 转染等。例如，所述细胞可以为 CHO-S。

在另一个方面，本申请提供了制备所述的抗体或其抗原结合片段的方法。所述方法可包括，在使得所述的抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养所述本申请所述的细胞。例如，可通过使用适当的培养基、适当的温度和培养时间等，这些方法是本领域普通技术人员所了解的。

在某些情形中，所述方法还可包括分离和/或纯化所述抗体或其抗原结合片段的步骤。例如，可以采用蛋白 G-琼脂糖或蛋白 A-琼脂糖进行亲和层析，还可通过凝胶电泳和/或高效液相色谱等来纯化和分离本申请所述的抗体或其抗原结合片段。例如，还可以使用 Protein A 亲和纯化。

药物组合物、应用

在另一个方面，本申请提供了一种药物组合物，其可包含本申请所述的抗体、其抗体结合片段或变体，所述的核酸分子，所述的载体，所述的细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。

所述药学上可接受的佐剂可以包括缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂、低分子量多肽、蛋白质、亲水聚合物、氨基酸、糖、螯合剂、反离子、金属复合物和/或非离子表面活性剂等。

在本申请中，所述药物组合物可被配制用于口服给药，静脉内给药，肌肉内给药，在肿瘤部位的原位给药，吸入，直肠给药，阴道给药，经皮给药或通过皮下储存库给药。

所述药物组合物可以用于抑制肿瘤生长。例如，本申请的药物组合物可以抑制或延缓疾病的发展或进展，可以减小肿瘤大小（甚至基本消除肿瘤），和/或可以减轻和/或稳定疾病状态。

本申请所述的药物组合物可以包含治疗有效量的所述抗体或其抗原结合片段。所述治疗有效量是能够预防和/或治疗（至少部分治疗）患有或具有发展风险的受试者中的病症或病症（例如癌症）和/或其任何并发症而所需的剂量。

另一方面，本申请提供了所述的抗体或其抗原结合片段在制备预防或治疗肿瘤的药物中的用途。

另一方面，本申请提供了用于预防或治疗肿瘤的所述的抗体或其抗原结合片段。

另一方面，本申请提供了预防或治疗肿瘤的方法，其包括向有需要的受试者施用本申请所述的抗体或其抗原结合片段、所述的分子核酸、所述的载体、所述的细胞和/或所述的药物组合物。

在本申请中，所述肿瘤可包括 CD38 阳性的肿瘤。例如，所述 CD38 阳性的肿瘤可以选自以下组：多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。

在某些实施方式中，所述肿瘤选自以下组：非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。

另一方面，本申请提供了抑制 CD38 蛋白与 CD38 配体结合的方法，其包括施用本申请所述的抗体或其抗原结合片段、所述的核酸分子、所述的载体和/或所述的细胞。

在本申请中，所述 CD38 配体可以包括 CD31 蛋白。

在某些实施方式中，所述抑制 CD38 蛋白与 CD38 配体结合的方法为体外或离体方法。

本申请可包括以下的实施方案：

1. 抗体或其抗原结合片段，其以 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 值与 CD38 蛋白相结合。
2. 根据实施方案 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其能够通过 CD38 蛋白特异性结合而杀伤肿瘤细胞和/或抑制肿瘤生长。
3. 根据实施方案 1-2 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其能够通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒性 ADCC、补体依赖的细胞毒性 CDC 和/或细胞凋亡杀死 CD38⁺细胞。
4. 根据实施方案 3 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述肿瘤包括 CD38 阳性的肿瘤。
5. 根据实施方案 4 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述 CD38 阳性的选自以下组：多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。
6. 根据实施方案 3-5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述肿瘤选自以下组：非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。
7. 根据实施方案 3-6 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述肿瘤细胞包括选自下组的细胞：Raji 细胞、Daudi 细胞、Ramos 细胞和 RPMI8226 细胞。
8. 根据实施方案 1-7 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，当其与 CD38 蛋白结合时，其结合相应于人 CD38 蛋白第 60 位至第 89 位氨基酸残基中的一个或多个残基。

9. 根据实施方案 1-8 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体选自下组: 单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。
10. 根据实施方案 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段选自下组: Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv 和 ScFv 片段。
11. 根据实施方案 1-10 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述 CD38 蛋白为人 CD38 蛋白或猴 CD38 蛋白。
12. 根据实施方案 1-11 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其与参比抗体竞争结合所述 CD38 蛋白, 其中所述参比抗体包含轻链可变区和重链可变区, 所述参比抗体的轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列; 所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列, 所述参比抗体的重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列; 所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。
13. 根据实施方案 12 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述参比抗体的轻链可变区包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列且所述参比抗体的重链可变区包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。
14. 根据实施方案 12-13 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述参比抗体的轻链包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列; 且所述参比抗体的重链包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列。
15. 根据实施方案 1-14 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其与参比抗体竞争结合所述 CD38 蛋白, 其中所述参比抗体包含轻链和重链, 其中所述参比抗体的轻链包含下述任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:20; 且所述参比抗体的重链包含下述任一项所示的氨基酸序列: SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:21。
16. 根据实施方案 1-15 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体包含抗体轻链或其片段。
17. 根据实施方案 16 所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体轻链或其片段包含 LCDR1, 且所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。
18. 根据实施方案 16-17 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体轻链或

- 其片段包含 LCDR2，且所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。
19. 根据实施方案 16-18 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体轻链或其片段包含 LCDR3，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。
 20. 根据实施方案 16-19 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体轻链或其片段包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。
 21. 根据实施方案 16-20 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体轻链或其片段还包含人恒定区。
 22. 根据实施方案 21 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述人恒定区包括人 Igκ 恒定区。
 23. 根据实施方案 16-22 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体轻链或其片段包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列。
 24. 根据实施方案 27 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体轻链或其片段包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:20。
 25. 根据实施方案 1-24 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含抗体重链或其片段。
 26. 根据实施方案 25 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体重链或其片段包含 HCDR1，且所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。
 27. 根据实施方案 25-26 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体重链或其片段包含 HCDR2，且所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列。
 28. 根据实施方案 25-27 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体重链或其片段包含 HCDR3，且所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。
 29. 根据实施方案 25-28 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体重链或其片段包含重链可变区 VH，且所述重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。
 30. 根据实施方案 25-29 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体重链或其片段还包含人恒定区。
 31. 根据实施方案 30 所述的抗体或其抗原结合片段，所述人恒定区包括人 IgG 恒定区。
 32. 根据实施方案 31 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述 IgG 恒定区包含人 IgG1

恒定区。

33. 根据实施方案 25-32 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体重链包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列。
34. 根据实施方案 33 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体重链包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:21。
35. 分离的一种或多种核酸分子，其包含编码实施方案 1-34 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。
36. 根据实施方案 35 所述的核酸分子，其中至少一种所述核酸分子经密码子优化。
37. 根据实施方案 35-36 中任一项所述的核酸分子，其中所述核酸分子包含一个或多个选自下组的多核苷酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:14。
38. 载体，其包含实施方案 35-37 中任一项所述的核酸分子。
39. 细胞，其包含实施方案 35-37 中任一项所述的核酸分子或实施方案 38 所述的载体。
40. 制备实施方案 1-34 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括在使得所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养实施方案 39 所述的细胞。
41. 药物组合物，其包含实施方案 1-34 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方案 35-37 中任一项所述的核酸分子、实施方案 38 所述的载体和/或实施方案 39 所述的细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。
42. 实施方案 1-34 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备预防或治疗肿瘤的药物中的用途。
43. 根据实施方案 42 所述的用途，其中所述肿瘤包括 CD38 阳性的肿瘤。
44. 根据实施方案 43 所述的用途，其中所述 CD38 阳性的肿瘤选自以下组：多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。
45. 根据实施方案 42-44 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤选自以下组：非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。
46. 实施方案 1-34 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其用于预防或治疗肿瘤。
47. 根据实施方案 46 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述肿瘤包括 CD38 阳性的肿瘤。
48. 根据实施方案 47 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述 CD38 阳性的肿瘤选自以下组：多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。

49. 根据实施方案 46-48 中任一项所述的用途，其中所述肿瘤选自以下组：非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。
50. 预防或治疗有需要的受试者中的肿瘤的方法，其包括向所述受试者施用实施方案 1-34 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方案 35-37 中任一项所述的分子核酸、实施方案 38 所述的载体、实施方案 39 所述的细胞和/或实施方案 40 所述的药物组合物。
51. 根据实施方案 50 所述的方法，其中所述肿瘤包括 CD38 阳性的肿瘤。
52. 根据实施方案 51 所述的方法，其中所述 CD38 阳性的肿瘤选自以下组：多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。
53. 根据实施方案 50-52 中任一项所述的方法，其中所述肿瘤选自以下组：非霍奇金淋巴瘤和霍奇金淋巴瘤。
54. 抑制 CD38 蛋白与 CD38 配体结合的方法，所述方法包括施用实施方案 1-34 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方案 35-37 中任一项所述的核酸分子、实施方案 38 所述的载体和/或实施方案 39 所述的细胞。
55. 根据实施方案 54 所述的方法，其中所述 CD38 配体包括 CD31。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的产品、方法或系统的工作方式，而并不用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1 杂交瘤抗体制备及基因克隆

小鼠免疫：balb/c 小鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司）经皮下（s.c.）用弗氏佐剂或弗氏不完全佐剂混合 100μg 可溶性 CD38 抗原（购自北京义翘神州生物技术有限公司）免疫 3 次。在第 0 天用弗氏完全佐剂，在第 14 天和第 28 天用弗氏不完全佐剂。将免疫小鼠的脾细胞根据标准方法融合于小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0（ATCC）。

杂交瘤融合：按现有常规杂交瘤融合方法融合小鼠脾脏，HAT 筛选法筛选融合后的杂交瘤细胞（每个孔 10^5 个细胞）。在 12 天后，取上清用 CD38 抗原包被的酶标板进行 ELISA 检测。优选克隆通过有限稀释法进行第二轮亚克隆。获得稳定表达目的抗体的杂交瘤株后进行保种建库。

制备 RNA：使用 RNA 提取试剂盒 TRIzol Reagent（购自 Life technologies）制备 RNA。用反转录试剂盒（购自北京全式金生物技术有限公司）制备编码抗体基因的 cDNA，以 cDNA 为模板做 PCR 扩增抗体可变区基因，克隆 T-easy 载体，将克隆得到的抗体重链和轻链可变区

序列测序，并进一步获得对应的氨基酸序列。

实施例 2 抗体人源化改造及制备

在实施例 1 获得鼠源抗体可变区重、轻链序列的基础上，通过 NCBI 提供的在线序列比对方法 (IgBlast) 与 NCBI 数据库中已有人源抗体序列进行比对，确定潜在的人源化位；进一步通过 SwissModel 搭建鼠源抗体可变区三维结构，确定人源化位点；针对相应的人源化位点，开展人源化改造，获得人源化抗体序列。

将人源化改造后的抗体命名为 SG003，测序结果显示，抗体 SG003 的 LCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 2 和 SEQ ID NO. 3 所示；VL 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 7 所示；经优化密码子，反向翻译获得的编码 VL 的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 9 所示；抗体 SG003 的 HCDR1-3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 5 和 SEQ ID NO. 6 所示；VH 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 8 所示；经优化密码子，反向翻译获得的编码 VH 的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 10 所示。

抗体 SG003 的轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 11 所示；编码其的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 12 所示。抗体 SG003 的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 13 所示；编码其的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 14 所示。

将获得的人源化改造后的抗体可变区基因克隆进含有人 IgG 恒定区基因的真核表达载体 pCMV-163 中，构建全抗体表达载体，其物理图谱如图 1 所示。图 1 中，真核表达载体 pCMV-163 的各个组成成分均为本领域已知的成分，按照所示次序重组而成。

使用 ExpiCHOTM Expression System 试剂盒（购自 Thermo Fisher Scientific），将获得的编码抗体 SG003 的真核表达载体转染至 CHO-S 细胞中进行表达，收集含有目的蛋白的细胞培养上清，利用常规的 Protein A 亲和纯化目标抗体。

实施例 3 人源化抗体结合靶抗原

用含有 1 μ g/ml CD38-His 融合蛋白的 PBS 溶液在 4 $^{\circ}$ C 包被 ELISA 板过夜。该板随后用含有 0.01% 吐温-20 的 PBS 溶液 (PBST) 洗涤，向 PBST 加入 10% 的胎牛血清在 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时，然后加入不同浓度的 SG003 抗体、对照抗体 Daratumumab (达雷木单抗, DARZALEX)，在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时。用 PBST 洗涤后，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 二抗 (Goat Anti human IgG HRP，购自 Thermo Fisher Scientific)，在 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。然后用 PBST 重复洗板 5 遍，在吸水纸上尽量拍干残留液滴，向每孔加入 100 μ l TMB (购自 eBioscience)，在室温 (20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C) 避光放置 1-5min。向每孔加入 100 μ l 2N H₂SO₄ 终止液终止底物反应，用酶标仪

在 450 nm 处读取 OD 值，分析抗体与靶抗原 CD38-His 结合能力。结果显示，SG003 抗体与对照抗体 Daratumumab 相比，显示出更强的结合活性，结果如图 2 所示。图 2 中，EC50 值为 $35.1 \pm 10.5 \text{ ng/mL}$ ，Daratumumab 抗体的 EC50 值为 $150.9 \pm 105.8 \text{ ng/mL}$ 。

实施例 4 人源化抗体亲和力测定

采用 BIACORE 生物大分子相互作用仪（GE 公司）分析抗体亲和力。在芯片上偶联抗人 IgG-Fab 抗体（购自 Abcam），利用抗人 IgG 抗体捕获 SG003 抗体，抗体浓度定为 $1 \mu\text{g/mL}$ ，进样时间为 60-150 秒；以抗原 CD38 为流动相，使用 6 个浓度梯度（3.125、6.25、12.5、25、50、100 nM），结合时间为 120 秒；解离时间为 1200 秒；使用 10 mM 甘氨酸-盐酸缓冲液（pH2.1）进行再生，时间为 60 秒。结果显示 SG003 抗体亲和力如表 1 所示。

表 1 SG003 抗体亲和力

抗体	结合常数 (10^6 1/Ms)	解离常数 (10^{-4} 1/s)	相对亲和力 (10^{-10} M)
SG003	2.86 ± 0.00	9.18 ± 0.01	3.21 ± 0.01

实施例 5 人源化抗体特异性识别靶抗原

将牛奶（北京博迈德生物技术有限公司）、BSA（BOVOGEN）、CD19（北京义翘神州生物技术有限公司）、TROP2（北京义翘神州生物技术有限公司）、CD47（北京麦格珀尔生物科技有限公司）、CD38（北京义翘神州生物技术有限公司）、Gas6（R&D）等各蛋白以及 AXL（ACRO Biosystems）分别包被 ELISA 板条， 1 mg/mL ， 4°C 过夜；PBST 洗涤后，加入 10% 的胎牛血清， 37°C 封闭 1 小时；加入 SG003 抗体， 37°C 反应 1 小时；PBST 洗涤后，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 二抗（Goat Anti human IgG HRP，Thermo Fisher Scientific），室温反应 30 分钟；PBST 重复洗板 5 遍，在吸水纸上尽量拍干残留液滴；每孔加入 100 μl TMB（eBioscience），室温（ $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ）避光放置 1-5 min；每孔加入 100 μl 2N H_2SO_4 终止液终止底物反应，酶标仪 450 nm 处读取 OD 值，分析抗体与蛋白结合能力。

结果如图 3 所示，图 3 的结果显示，SG003 抗体均能特异性识别靶抗原 CD38，但与牛奶、BSA、CD19、TROP2、CD47、AXL、Gas6 等蛋白均无显著的结合反应。

实施例 6 人源化抗体与细胞表面抗原的结合

利用流式分析技术检测 Raji 细胞、Daudi 细胞、Ramos 细胞和 RPMI8226 细胞表面 CD38

蛋白与 SG003 抗体及对照抗体 Daratumumab 的结合。收集对数生长期细胞，调整细胞密度到 5×10^6 个细胞/mL，在冰上预冷。用含 2%FBS 预冷的生理盐水将 SG003 抗体、对照抗体 Daratumumab 稀释成不同浓度。取 100 μ L 细胞，加入等体积所述稀释抗体，于 4 $^{\circ}$ C 避光反应 30min。反应结束后，洗涤细胞两次。用稀释后的 PE 标记小鼠抗人 IgG 二抗(PE Mouse Anti-Human IgG, 购自 BD Pharmingen) 100 μ L 重悬细胞，4 $^{\circ}$ C 避光反应 30min。反应结束后，用 2%FBS 预冷的生理盐水洗涤细胞两次。用 400 μ L 1%多聚甲醛重悬细胞。用流式细胞仪(BD Calibur)分析抗体与细胞表面抗原的结合能力。

结果显示，SG003 抗体能特异性识别 Raji 细胞、Daudi 细胞、Ramos 细胞和 RPMI8226 细胞表面 CD38，该识别活性明显高于对照抗体 Daratumumab 且呈剂量依赖性，其中与 Raji 细胞结合(图 4A)的 EC50 值 SG003 为 34.4ng/mL，Daratumumab 为 49.3ng/mL。与 Daudi 细胞结合(图 4B)的 EC50 值 SG003 为 36.7ng/mL，Daratumumab 为 50.9ng/mL。与 Ramos 细胞结合(图 4C)的 EC50 值 SG003 为 81.5ng/mL，Daratumumab 为 95.1ng/mL。与 RPMI8226 细胞结合(图 4D)的 EC50 值 SG003 为 140.3ng/mL，Daratumumab 为 176.5ng/mL。

实施例 7 人源化抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性

首先将实验所需靶细胞(Raji 细胞、Daudi 细胞、Ramos 细胞和 RPMI8226 细胞)调整密度至 2×10^5 个细胞/mL 重悬在 ADCC 缓冲液(无酚红 MEM 培养液+1%FBS)中，并加入 96 孔板(50 μ L/孔)。随后向每孔中加入 100 μ L 不同浓度的 SG003 抗体，混匀后在 37 $^{\circ}$ C，含 5%CO₂ 的培养箱中孵育 30min。再将实验所需效应细胞 NK92MI-CD16a(购自华博生物)调整密度至 1.2×10^6 cell/mL，加入有靶细胞的孔中，使得靶细胞:效应细胞=1:6。混匀后在 37 $^{\circ}$ C，含 5%CO₂ 的培养箱中孵育 4-6h 后，移除 96 孔板内部分原液(100 μ L/孔)，加入 LDH 检测试剂盒(Cytotoxicity Detection Kit, 购自 Roche)中 LDH 反应混合物(100 μ L/孔)，于 37 $^{\circ}$ C 反应 10min。再加入终止液(50 μ L/孔)，轻微混匀。用酶标仪在 492nm 时读取 OD 值，同时以 650nm 处的 OD 值为背景值。实验中同时设置如下对照组，其中对照 1 为 ADCC 缓冲液，对照 2 为靶细胞+ADCC 缓冲液，对照 3 为靶细胞+裂解液+ADCC 缓冲液，对照 4 为靶细胞+效应细胞+ADCC 缓冲液。特异性杀伤率%=((实验组-对照 4) / (对照 3-对照 2)) $\times$ 100%。量效曲线采用 GraphPad Prism Version 5 进行数据分析。

结果显示，使用 Raji 靶细胞和 NK92MI-CD16a 效应细胞检测时，SG003 抗体显示了非常有效的 ADCC 活性(参见图 5A)，EC50 值 SG003 为 6.97ng/mL，Daratumumab 为 17.0ng/mL。Daudi 作为靶细胞时，EC50 值 SG003 为 0.72ng/mL，Daratumumab 为 4.6ng/mL(参见图 5B)。同时 SG003 抗体还显示出对 Ramos 细胞有效的 ADCC 活性(参见图 5C)，EC50 值 SG003

为 $0.69 \pm 0.007 \text{ ng/mL}$ ，Daratumumab 为 3.01 ng/mL 。SG003 抗体还显示出对 RPMI8226 细胞有效的 ADCC 活性(参见图 5D)，EC50 值 SG003 为 1.46 ng/mL ，Daratumumab 为 4.94 ng/mL 。

实施例 8 人源化抗体体内抑制肿瘤活性

通过向 CB17 SCID 小鼠接种 Raji-Luc 细胞建立肿瘤模型，来评价 SG003 抗体抑制肿瘤活性的效果。

选择雌性，5~8 周龄的 CB17 SCID 小鼠（购自北京百奥赛图基因生物技术有限公司）进行试验。Raji-Luc 细胞为北京百奥赛图基因生物技术有限公司在 Raji 细胞的基础上，转入荧光素报告基因后获得的稳定细胞系。复苏培养至所需数量后，收集对数期生长细胞悬浮至 5×10^6 个/ 0.2 mL 浓度，以 0.2 mL/只 的数量通过尾静脉接种到 CB17 SCID 小鼠，接种后于第 0 天、第 7 天用小动物成像仪观察肿瘤生长情况及体重，并于第 7 天挑选肿瘤成像信号适中的 18 只小鼠入组，随机分组分配到 3 个组中，每组 6 只。然后开始对动物进行给药，设生理盐水对照组、阳性对照组（Daratumumab，购自强生公司）以及实验组（SG003），给药剂量为 $200 \mu\text{g/kg}$ ，两周给药一次，共给药 2 次，观察小鼠体重、肿瘤生长情况以及小鼠生存率。

结果显示，Daratumumab 以及 SG003 抗体均可为实验动物所耐受。各组给药动物和溶剂对照组比较有明显肿瘤生长抑制效果（参见图 6），第一次给药后第七天，Daratumumab 以及 SG003 抗体治疗组的平均荧光强度分别为（平均 $3.92\text{E}+07$ ，标准误 $4.04\text{E}+06$ ）、（平均 $3.19\text{E}+07$ ，标准误： $9.32\text{E}+06$ ），显著低于对照组平均肿瘤荧光强度为（平均 $3.04\text{E}+08$ ，标准误 $4.29\text{E}+07$ ）。

然后，进一步观察动物生存率，对照组的中位生存时间为分组后 12 天，Daratumumab 为 21 天，而 SG003 组为 28 天。SG003 组优效于 Daratumumab 组（参见图 7）。

实施例 9 嵌合抗体种属识别特异性

将人（Human）、小鼠（Mouse）、大鼠（Rat）、食蟹猴（Cynomolgus）等不同种属的 CD38 胞外段蛋白（北京义翘神州生物技术有限公司）分别包被 ELISA 板条， 1 mg/mL ， 4°C 过夜；PBST 洗涤后，加入 10% 的胎牛血清，于 37°C 封闭 1 小时；分别加入待测 SG003 抗体、对照抗体 Daratumumab， 37°C 反应 1 小时；PBST 洗涤后，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 二抗（Goat Anti human IgG HRP，购自 Thermo Fisher Scientific），室温反应 30 分钟；PBST 重复洗板 5 遍，在吸水纸上尽量拍干残留液滴；每孔加入 100 mL TMB（购自 eBioscience），室温（ $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ）避光放置 1-5min；每孔加入 100 mL 2 N H_2SO_4 终止液终止底物反应，用酶标仪在 450 nm 处读取 OD 值，分析抗体与不同种属 CD38 蛋白的结合能力。

结果显示, SG003 抗体能识别人和食蟹猴的 CD38 蛋白分子, 但与小鼠和大鼠的 CD38 蛋白分子无结合反应; 结果如图 8A 所示。

而对照抗体 Daratumumab 只识别人 CD38 蛋白分子, 与小鼠、大鼠及食蟹猴的 CD38 蛋白分子均无结合反应。结果如图 8B 所示。

实施例 10 人源化抗体突变后保持生物学活性

借助基因工程技术, 可以对 SG003 抗体可变区序列进行随机突变, 获得新的抗体可变区序列, 并进一步获得新的抗体轻链和重链序列。例如, 在 SG003 抗体基础上进行随机突变后获得的抗体, 其轻链氨基酸序列可为 SEQ ID NO:16, 且重链氨基酸序列可为 SEQ ID NO:17; 或者, 其轻链氨基酸序列可为 SEQ ID NO:18, 且重链氨基酸序列可为 SEQ ID NO:19; 或者, 其轻链氨基酸序列可为 SEQ ID NO:20, 且重链氨基酸序列可为 SEQ ID NO:21。将分别包含上述突变后轻链和重链的組合的抗体依次命名为 SG003M1-3 (例如, SG003M1 抗体的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:16, 且重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:17)。

参考实施例 2 的方法制备新抗体, 参考实施例 4 的方法评价抗体活性。随机突变后的抗体 SG003M1-3 可以识别 CD38 抗原(参见图 9)。经测定, SG003M1 的 EC50 值为 15.72ng/mL、SG003M2 的 EC50 值为 27.75ng/mL、SG003M3 的 EC50 值为 6.10ng/mL。随机选择 SG003M1, 测定亲和力结果如表 2 所示。

表 2 SG003 突变体亲和力分析

抗体	结合常数 (10^6 1/Ms)	解离常数 (10^{-4} 1/s)	亲和力 (10^{-10} M)
SG003M1	2.66±0.01	6.36±0.05	2.39±0.03

实施例 11 人源化抗体的表位验证

利用 Epitope-mapping 方法分析抗体 SG003 识别 CD38 抗原的表位。利用丙氨酸替代法设计 CD38 抗原突变体(表 3, 其中突变后的氨基酸均为丙氨酸), 通过聚合酶链式反应(PCR)及重叠延伸(overlap)等分子生物学技术获得 CD38 野生型及多种突变体基因, 琼脂糖凝胶电泳分离回收后, 使用 HindIII 与 NheI 限制性内切酶进行酶切, 克隆入 pEGFP-N1 载体。测序正确后, 使用 HighGene 转染试剂盒(ABclonal), 根据试剂盒说明书所述方法将含有 CD38 野生型或突变体基因的载体转染 293T 细胞。转染 48 小时后, 胰酶消化收取细胞, 制备单细

胞悬液；将目的细胞与抗体 SG003 以 10 μ g/ml 的工作浓度进行 4℃恒温孵育 30min，之后使用 GAH-IgG Fc PE（Invitrogen，Cat：12-4998-82）进行 4℃恒温孵育 30min，流式检测 FITC 和 PE 两个通道的荧光强度，其中 FITC 荧光强度代表 CD38 分子及其突变体表达水平，PE 荧光强度代表 SG003 抗体结合抗原的强弱。

图 10 的流式结果显示，抗体 SG003 与突变体 21、22、23 不结合，这个结果暗示着 CD38 蛋白的第 60-89 位氨基酸区域为抗体 SG003 识别的主要表位。

表 3 CD38 蛋白突变体和突变位点

名称	突变位点
CD38 野生型	无
CD38M4	291-300
CD38M5	281-290
CD38M6	256-266
CD38M7	247-255
CD38M8	210-219
CD38M9	200-209
CD38M10	190-199
CD38M11	180-189
CD38M12	170-179
CD38M13	160-169
CD38M14	150-159
CD38M15	140-149
CD38M16	130-139
CD38M17	120-129
CD38M18	110-119
CD38M19	100-109
CD38M20	90-99
CD38M21	80-89
CD38M22	70-79
CD38M23	60-69
CD38M24	50-59
CD38M25	43-49

前述详细说明是以解释和举例的方式提供的，并非要限制所附权利要求的范围。目前本文所列举的实施方式的多种变化对本领域普通技术人员来说是显而易见的，且保留在所附的权利要求和其等同方案的范围内。

权 利 要 求 书

1. 抗体或其抗原结合片段，其以 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_D 值与 CD38 蛋白相结合。
2. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，当其与 CD38 蛋白结合时，其结合相应于人 CD38 蛋白第 60 位至第 89 位的氨基酸残基中的一个或多个残基。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体选自下组：单克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段选自下组：Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、Fv 和 ScFv 片段。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述 CD38 蛋白为人 CD38 蛋白或猴 CD38 蛋白。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其与参比抗体竞争结合所述 CD38 蛋白，其中所述参比抗体包含轻链可变区和重链可变区，所述参比抗体的轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列，所述参比抗体的重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含抗体轻链或其片段，所述抗体轻链或其片段包含 LCDR1-3，包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列；所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列；所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 7 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体轻链或其片段包含轻链可变区 VL，且所述轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 7-8 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体轻链或其片段包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列。
10. 根据权利要求 9 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体轻链或其片段包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:20。
11. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体包含抗体重链或其片段，所述抗体重链或其片段包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1

- 包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列；所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列；所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列。
12. 根据权利要求 11 所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体重链或其片段包含重链可变区 VH，且所述重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。
 13. 根据权利要求 11-12 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体重链包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列。
 14. 根据权利要求 13 所述的抗体或其抗原结合片段，其中，所述抗体重链包含下述任一项所示的氨基酸序列：SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:21。
 15. 分离的核酸分子，其包含编码权利要求 1-14 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸。
 16. 根据权利要求 15 所述的核酸分子，其中至少一种所述核酸分子经密码子优化。
 17. 根据权利要求 15-16 中任一项所述的核酸分子，其中所述核酸分子包含一个或多个选自下组的多核苷酸序列：SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:14。
 18. 载体，其包含权利要求 15-17 中任一项所述的核酸分子。
 19. 细胞，其包含权利要求 15-17 中任一项所述的核酸分子或权利要求 18 所述的载体。
 20. 制备权利要求 1-14 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括在使得所述抗体或其抗原结合片段表达的条件下，培养权利要求 19 所述的细胞。
 21. 药物组合物，其包含权利要求 1-14 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 15-17 中任一项所述的核酸分子、权利要求 18 所述的载体和/或权利要求 19 所述的细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。
 22. 权利要求 1-14 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备预防或治疗肿瘤的药物中的用途。
 23. 根据权利要求 22 所述的用途，其中所述肿瘤包括 CD38 阳性的肿瘤。
 24. 根据权利要求 23 所述的用途，其中所述 CD38 阳性的肿瘤选自下组：多发性骨髓瘤、淋巴瘤和白血病。
 25. 抑制 CD38 蛋白与 CD38 配体结合的方法，所述方法包括施用权利要求 1-14 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 15-17 中任一项所述的核酸分子、权利要求 18 所述的载体和/或权利要求 19 所述的细胞。

26. 根据权利要求 25 所述的方法，其中所述 CD38 配体包括 CD31。