



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108699144 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201680047510.1

(22)申请日 2016.08.26

(30)优先权数据

62/211,455 2015.08.28 US

62/212,183 2015.08.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.02.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/048887 2016.08.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/040247 EN 2017.03.09

(83)生物保藏信息

PTA-10664 2010.02.18

(71)申请人 德彪发姆国际有限公司

地址 瑞士洛桑

(72)发明人 尤塔·德克特 丹尼尔·塔瓦雷斯

芮玲云 斯文·洛布里奇

梅格恩·凯莉

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 樊英如 张静

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

权利要求书6页 说明书46页

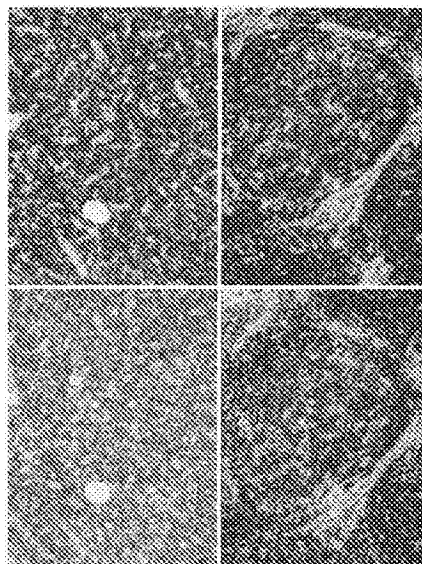
序列表21页 附图9页

(54)发明名称

用于检测CD37的抗体和测定

(57)摘要

本发明总体上涉及结合人CD37的抗体和用于基于CD37的治疗的诊断测定。



1. 一种与包含SEQ ID NO:9的多肽和SEQ ID NO:10的多肽的抗体特异性结合相同CD37表位的抗体或其抗原结合片段。

2. 一种特异性结合CD37的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段竞争性抑制包含SEQ ID NO:9的多肽和SEQ ID NO:10的多肽的抗体与CD37的结合。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段相应地包含SEQ ID NO:3-5的重链可变区(VH)CDR1、CDR2和CDR3序列以及SEQ ID NO:6-8的轻链可变区(VL)CDR1、CDR2和CDR3序列。

4. 一种特异性结合CD37的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段相应地包含SEQ ID NO:3-5的VH CDR1、CDR2和CDR3序列以及SEQ ID NO:6-8的VL CDR1、CDR2和CDR3序列。

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,其中所述抗体或其片段包含多肽序列,所述多肽序列与所述SEQ ID NO:9和10的多肽序列具有至少90%的同一性。

6. 根据权利要求5所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述多肽序列与所述SEQ ID NO:9和10的多肽序列具有至少95%的同一性。

7. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述多肽序列与所述SEQ ID NO:9和10的多肽序列具有至少99%的同一性。

8. 根据权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:9和10的序列的氨基酸的多肽序列。

9. 一种特异性结合CD37的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:9的重链可变区。

10. 一种特异性结合CD37的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:10的重链可变区。

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,其中所述抗体是重组产生的。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是鼠的、非人的、人源化的、嵌合的或人的。

13. 根据权利要求12所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗体是表面重构的。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其是全长抗体。

15. 根据权利要求1-13中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其是抗原结合片段。

16. 根据权利要求15所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、单链Fv或scFv、二硫键连接的Fv、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、IgG Δ CH2、微型抗体、F(ab')₃、四链抗体、三链抗体、双链抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb2、(scFv)₂或scFv-Fc。

17. 根据权利要求15所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含Fab、Fab'、F(ab')₂、单链Fv或scFv、二硫键连接的Fv、胞内抗体、IgG Δ CH2、微型抗体、F(ab')₃、四链抗体、三链抗体、双链抗体、DVD-Ig、mAb2、(scFv)₂或scFv-Fc。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其以约0.5至约10nM的Kd结合人CD37。

19. 根据权利要求1-17中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其以约1.0nM或更佳的Kd结合人CD37。

20. 根据权利要求2-19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其结合包含CD37的氨基酸107-242 (SEQ ID NO:20)的多肽。

21. 根据权利要求2-20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其结合包含CD37的氨基酸107-235 (SEQ ID NO:19)的多肽。

22. 根据权利要求2至21中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其结合SEQ ID NO:15所示的序列。

23. 根据权利要求2至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其结合SEQ ID NO:16所示的序列。

24. 根据权利要求2至23中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其结合SEQ ID NO:17所示的序列。

25. 根据权利要求2-24中任一项的抗体或其抗原结合片段,其结合包含CD37的氨基酸107-242 (SEQ ID NO:20)的多肽,但不结合由CD37的氨基酸138-235组成的多肽。

26. 根据权利要求2-25中任一项的抗体或其抗原结合片段,其结合包含CD37的氨基酸107-235 (SEQ ID NO:19)的多肽,但不结合由CD37的氨基酸138-235组成的多肽。

27. 根据权利要求2-26中任一项的抗体或其抗原结合片段,其结合SEQ ID NO:15的多肽,但不结合SEQ ID NO:18的多肽。

28. 根据权利要求2至27中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其结合SEQ ID NO:16的多肽,但不结合SEQ ID NO:18的多肽。

29. 根据权利要求2-28中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其结合SEQ ID NO:17的多肽,但不结合SEQ ID NO:18的多肽。

30. 根据权利要求2至29中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其结合CD37的氨基酸110-137中的至少一个氨基酸。

31. 根据权利要求18至30中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述结合亲和力通过流式细胞术、Biacore、ELISA或放射免疫测定来测量。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段被能检测地标记。

33. 一种细胞,其产生权利要求1-32中任一项的抗体或其抗原结合片段。

34. 根据权利要求33所述的细胞,其中所述细胞是分离的。

35. 一种制备根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括(a) 培养根据权利要求33或34所述的细胞;和(b) 从所培养的所述细胞中分离所述抗体或其抗原结合片段。

36. 一种组合物,其包含根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和选自由IHC缓冲液、ELISA缓冲液和FACS缓冲液组成的群组中的缓冲液。

37. 一种检测样本中的CD37表达的方法,其包括使所述样本与根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求36所述的组合物接触。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段被能检测地标记。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述标记选自由免疫荧光标记、化学发光标记、

磷光标记、酶标记、放射性标记、抗生物素蛋白/生物素、胶体金颗粒、有色颗粒和磁性颗粒组成的群组。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述标记是酶标记。

41. 根据权利要求37至40中任一项所述的方法,其中通过放射免疫测定、蛋白印迹测定、细胞计量术、免疫荧光测定、酶免疫测定、免疫沉淀测定、化学发光测定或免疫组织化学测定来确定CD37表达。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中通过免疫组织化学(IHC)测定确定CD37表达。

43. 一种使用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂提高癌症治疗的功效的方法,所述方法包括向患有癌症的受试者施用治疗活性剂,其中CD37的增加的表达使用根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求36所述的组合物在来自所述受试者的癌性样本中检测。

44. 一种鉴定可能对包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂有反应的癌症的方法,所述方法包括:

a. 使包含来自所述癌症的细胞的生物样本与根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求36所述的组合物接触;

b. 检测所述抗体或其抗原结合片段与(a)中的所述生物样本中的CD37的结合;

c. 给步骤(b)中的所述结合指定分数,其中所述分数基于与一个或多个参考样本的比较来指定;以及

d. 将步骤(c)中的所述分数与参考组织或细胞的分数进行比较,其中所述癌症CD37水平的分数大于表达正常或低CD37的参考样本的分数或者所述癌症CD37水平的分数等于或大于表达高CD37的参考样本的分数鉴定所述癌症为可能对抗CD37抗体有反应。

45. 一种治疗患有癌症的患者的方法,所述方法包括:

a. 从自所述患者获得的癌性样本中的CD37表达的检测确定CD37表达分数,其中使用根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求36所述的组合物进行所述检测;以及

b. 如果所述分数指示所述患者将受益于施用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂,则向所述患者施用所述治疗活性剂。

46. 一种治疗患有癌症的患者的方法,所述方法包括:

a. 从自所述患者获得的癌性样本中的CD37表达的检测确定CD37表达分数,其中使用根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求36所述的组合物进行所述检测;以及

b. 如果所述分数指示所述患者将受益于施用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂,则指令医疗保健提供者向所述患者施用所述治疗活性剂。

47. 一种治疗患有癌症的患者的方法,所述方法包括:

a. 提交从患有癌症的患者取得的癌性样本以用于从CD37表达的检测确定CD37表达分数,其中使用根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求36所述的组合物进行所述检测;以及

b. 如果所述分数指示所述患者将受益于施用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂,则向所述患者施用所述治疗活性剂。

48. 一种治疗患有癌症的患者的方法,所述方法包括:

a. 检测从所述患者获得的癌性样本中的CD37表达,其中使用根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求36所述的组合物进行所述检测;

b. 确定所述癌性样本的CD37表达分数;以及

c. 如果所述分数指示所述患者将受益于施用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂,则向所述患者施用所述治疗活性剂。

49. 一种鉴定癌症为对用抗CD37活性剂治疗敏感的方法,所述方法包括:

a. 使用根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求36所述的组合物检测来自所述癌症的癌性样本中的CD37表达水平,其中所述检测包括使用相比于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达CD37的癌性样本中的染色强度或染色均匀度的方法;

b. 确定所述癌性样本的CD37染色强度或染色均匀度分数;以及

c. 将在步骤(b)中确定的所述CD37染色强度或染色均匀度分数与通过测量至少一种参考样本中的CD37蛋白表达所确定的相对值进行比较,其中所述至少一种参考样本是对用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂治疗不敏感的组织、细胞或细胞团块样本,并且其中步骤(b)中确定的所述癌性样本的CD37染色强度分数高于所述相对值鉴定所述癌症为对用所述治疗活性剂治疗敏感。

50. 一种鉴定癌症为对用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂治疗敏感的方法,所述方法包括:

a. 使用根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求36所述的组合物检测来自所述癌症的癌性样本中的CD37表达水平,其中所述检测包括使用相比于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达CD37的癌性样本中的染色强度或染色均匀度的方法;

b. 确定所述癌性样本的CD37染色强度或染色均匀度分数;以及

c. 将在步骤(b)中确定的所述CD37染色强度或染色均匀度分数与通过测量至少一种参考样本中的CD37蛋白表达所确定的相对值进行比较,其中所述至少一种参考样本是对用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂治疗敏感的组织、细胞或细胞团块样本,并且其中步骤(b)中确定的所述癌性样本的CD37染色强度分数大于或等于所述相对值鉴定所述癌症为对用所述治疗活性剂治疗敏感。

51. 根据权利要求43-50中任一项所述的方法,其还包括向受试者施用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂,所述癌性样本或生物样本自该受试者获得。

52. 根据权利要求43-51中任一项所述的方法,其中在从所述患者获得的癌性样本或生物样本中检测所述患者的CD37水平。

53. 根据权利要求43-52中任一项的方法,其中所述癌性样本或生物样本是流体浸出物、血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液或脾制备物。

54. 根据权利要求44-53中任一项所述的方法,其中所述检测是通过免疫组织化学(IHC)进行的。

55. 根据权利要求42或54所述的方法,其中所述IHC是校准的IHC,其能区分不同水平的CD37表达。

56. 根据权利要求42、54或55中任一项所述的方法,其中所述IHC对于具有低CD37表达、中等CD37表达或高CD37表达的样本产生一定范围的染色强度。

57. 根据权利要求42或54-56中任一项所述的方法,其中与参考样本相比,所述IHC区分表达CD37的癌性样本或生物样本的染色强度和染色均匀性。

58. 根据权利要求42或54-57中任一项所述的方法,其中所述IHC是手动执行的。

59. 根据权利要求42或54-57中任一项所述的方法,其中所述IHC使用自动化系统来执行。

60. 根据权利要求42或54-59中任一项所述的方法,其中从所述IHC确定CD37分数。

61. 根据权利要求44-53中任一项所述的方法,其中所述检测是通过酶联免疫吸附测定(ELISA)进行的。

62. 根据权利要求44、49或50中任一项所述的方法,其中所述参考样本是阳性参考样本或阴性参考样本。

63. 根据权利要求44、49、50或51中任一项所述的方法,其中所述参考样本包括细胞、细胞团块或组织。

64. 根据权利要求43-63中任一项所述的方法,其中根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段进一步包含选自由免疫荧光标记、化学发光标记、磷光标记、酶、放射性标记、抗生物素蛋白/生物素、胶体金颗粒、有色颗粒和磁性颗粒组成的群组中的检测试剂。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述检测试剂是酶。

66. 根据权利要求43-65中任一项所述的方法,其中所述癌症是CD37阳性癌症。

67. 根据权利要求43-66中任一项所述的方法,其中所述癌症是白血病或淋巴瘤。

68. 根据权利要求43-66中任一项所述的方法,其中所述癌症选自由以下项组成的群组: B细胞淋巴瘤, NHL, 前体B细胞成淋巴细胞性白血病/淋巴瘤和成熟B细胞瘤, B细胞慢性淋巴细胞白血病(CLL)/小淋巴细胞淋巴瘤(SLL), B细胞幼淋巴细胞白血病, 淋巴浆细胞淋巴瘤, 套细胞淋巴瘤(MCL), 滤泡性淋巴瘤(FL), 低级、中级和高级(FL), 皮肤滤泡中心淋巴瘤, 边缘区B细胞淋巴瘤, MALT型边缘区B细胞淋巴瘤、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤和脾型边缘区B细胞淋巴瘤, 毛细胞白血病, 弥漫性大B细胞淋巴瘤, 伯基特淋巴瘤, 浆细胞瘤, 浆细胞骨髓瘤, 移植后淋巴增生性疾病, 瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症, 以及间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。

69. 根据权利要求37-68中任一项所述的方法,其中使用至少一种另外的抗CD37抗体或其抗原结合片段检测所述CD37表达。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中使用两种抗CD37抗体或其抗原结合片段测量所述CD37表达。

71. 根据权利要求69或70所述的方法,其中所述至少一种另外的抗体或其抗原结合片段包含检测试剂。

72. 根据权利要求71所述的方法,其中所述检测试剂是显色检测试剂、荧光检测试剂、酶检测试剂或电化学发光检测试剂。

73. 根据权利要求71或72所述的方法,其中所述检测试剂是辣根过氧化物酶(HRP)。

74. 根据权利要求70-73中任一项所述的方法,其中所述至少一种另外的抗体或其抗原

结合片段结合至固体支持物。

75. 根据权利要求74所述的方法, 其中所述至少一种另外的抗体或其抗原结合片段结合至微量滴定板。

76. 根据权利要求41或61所述的方法, 其中所述ELISA是夹心ELISA。

77. 根据权利要求43-76中任一项所述的方法, 其中所述治疗活性剂包含CD37抗体huCD37-3。

78. 根据权利要求77所述的方法, 其中所述治疗活性剂是包含CD37抗体huCD37-3、美登木素生物碱DM1和不可切割的SMCC接头 (IMG529) 的抗体美登木素生物碱缀合物。

79. 一种联合诊断和药物试剂盒, 其包含用于诊断的根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或根据权利要求36所述的组合物以及用于治疗的包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂。

80. 根据权利要求79所述的联合诊断和药物试剂盒, 其中所述检测抗体能够通过IHC检测CD37表达。

81. 根据权利要求79或80所述的联合诊断和药物试剂盒, 其中所述检测抗体能够通过ELISA检测CD37表达。

82. 根据权利要求79-81中任一项所述的联合诊断和药物试剂盒, 其中所述治疗活性剂中的所述抗CD37抗体与细胞毒素缀合。

83. 一种诊断试剂盒, 其包含根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、用于IHC的试剂和一种或多种标准化参考样本, 其中所述标准化参考样本包含细胞、细胞团块或福尔马林固定石蜡包埋的组织样本, 并且其中所述一个或多个标准化参考样本来自表达非CD37、表达低CD37或表达高CD37的细胞、细胞团块或组织。

用于检测CD37的抗体和测定

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求申请日为2015年8月28日提交的美国临时申请No.62/211,455、2015年8月31日提交的美国临时申请No.62/212,183的优先权利益,其中的每一者均通过引用整体并入本发明。

技术领域

[0002] 本发明的领域总体上涉及用于基于CD37的治疗的诊断测定法和试剂盒以及与人CD37结合的抗体。

背景技术

[0003] 癌症是发达国家中死亡的主导原因之一,仅在美国每年就有超过一百万人被诊断患有癌症并且有500,000例死亡。总的来说,估计超过三分之一的人会在他们的一生中出现某种形式的癌症。

[0004] 白细胞抗原CD37(“CD37”),也称为GP52-40,四跨膜蛋白-26或TSPAN26,是四跨膜蛋白超家族的跨膜蛋白(Maecker等,1997 FASEB J.11:428-442)。它是一种具有四个跨膜结构域的高度糖基化的蛋白,其在前B细胞至外周成熟B细胞阶段过程中在B细胞上表达,但在终末分化为浆细胞时缺乏。(Link等人,1987,J Pathol.152:12-21)。CD37抗原仅微弱表达于T细胞、髓样细胞以及粒细胞(Schwartz-Albiez等人,1988,J.Immunol.,140(3)905-914)。然而,CD37还表达于恶性B细胞,例如那些在非何杰金氏淋巴瘤(NHL)和慢性淋巴系白血病(CLL)中发现的恶性B细胞(Moore等人,1986,J Immunol.137(9):3013-8)。该表达情况表明,CD37表现为B细胞恶性肿瘤的有前景的表达CD37的治疗靶。然而,为了使这些疗法最大限度地有效,有必要能够有灵敏度和特异性地检测CD37的动态范围。

发明内容

[0005] 抗CD37抗体及其抗原结合片段以及检测CD37的方法、诊断CD37介导的疾病和病症(例如癌症)的方法、监测抗CD37疗法的功效的方法和给患者分层的方法。抗CD37抗体及其抗原结合片段是特别有利的,因为它们允许更具体和确定的染色以及没有核背景的染色。CD37抗体及其抗原结合片段可以结合包含CD37的一个或多个氨基酸110-137的表位。CD37抗体及其抗原结合片段还可结合包含CD37的氨基酸107-242(SEQ ID NO:20)的多肽和/或包含CD37的氨基酸107-235(SEQ ID NO:19)的多肽,但是没有结合包含CD37的氨基酸138-235的多肽。

[0006] 在一实施方案中,本发明提供一种抗体或其抗原结合片段与包含SEQ ID NO:9的多肽和SEQ ID NO:10的多肽的抗体特异性结合相同CD37表位。

[0007] 在另一实施方案中,本发明提供一种抗体或其抗原结合片段特异性结合CD37,并且竞争性抑制包含SEQ ID NO:9的多肽和SEQ ID NO:10的多肽的抗体与CD37的结合。

[0008] 在另一实施方案中,本发明提供一种抗体或其抗原结合片段相应地包含SEQ ID

NO:3-5的重链可变区(VH)CDR1、CDR2和CDR3序列以及SEQ ID NO:6-8的轻链可变区(VL)CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0009] 在另一实施方案中,本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段特异性结合CD37,并且所述抗体或其片段相应地包含SEQ ID NO:3-5的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3序列以及SEQ ID NO:6-8的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0010] 在另一实施方案中,本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段包含多肽序列,所述多肽序列与所述SEQ ID NO:9和10的多肽序列具有至少90%的同一性。在另一实施方案中,所述多肽序列与所述SEQ ID NO:9和10的多肽序列具有至少95%的同一性。在另一实施方案中,所述多肽序列与所述SEQ ID NO:9和10的多肽序列具有至少99%的同一性。在另一实施方案中,所述多肽序列包含SEQ ID NO:9和10的序列的氨基酸。

[0011] 在另一实施方案中,本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段特异性结合CD37,其中所述抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:9的重链可变区。

[0012] 在另一实施方案中,本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段特异性结合CD37,其中所述抗体或其片段包含含有SEQ ID NO:10的重链可变区。

[0013] 在另一实施方案中,本发明提供了一种抗体或其抗原结合片段是重组产生的。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是鼠的、非人的、人源化的、嵌合的或人的。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是全长抗体。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是抗原结合片段。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、单链Fv或scFv、二硫键连接的Fv、V-NAR结构域、IgNar、胞内抗体、IgG Δ CH₂、微型抗体、F(ab')₃、四链抗体、三链抗体、双链抗体、单结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb₂、(scFv)₂或scFv-Fc。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含Fab、Fab'、F(ab')₂、单链Fv或scFv、二硫键连接的Fv、胞内抗体、IgG Δ CH₂、微型抗体、F(ab')₃、四链抗体、三链抗体、双链抗体、DVD-Ig、mAb₂、(scFv)₂或scFv-Fc。

[0014] 在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段由细胞产生。在另一实施方案中,所述细胞是分离的。在另一实施方案中,本发明一种制备抗体或其抗原结合片段的方法,其中所述方法包括培养所述细胞;和从所培养的所述细胞中分离所述抗体或其抗原结合片段。

[0015] 在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段以约0.5至约10nM的Kd结合人CD37。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段以约1.0nM或更佳的Kd结合人CD37。

[0016] 在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合包含CD37的氨基酸107-242(SEQ ID NO:20)组成的多肽、基本由CD37的氨基酸107-242(SEQ ID NO:20)组成的多肽或者由CD37的氨基酸107-242(SEQ ID NO:20)组成的多肽。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合包含CD37的氨基酸107-235(SEQ ID NO:19)的多肽、基本由CD37的氨基酸107-235(SEQ ID NO:19)组成的多肽或者由CD37的氨基酸107-235(SEQ ID NO:19)组成的多肽。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合SEQ ID NO:15所示的序列。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合SEQ ID NO:16所示的序列。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合SEQ ID NO:17所示的序列。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合包含CD37的氨基酸107-242(SEQ ID NO:20)的多肽,但不结合由CD37的氨基酸138-235组成的多肽。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结

合包含CD37的氨基酸107-235 (SEQ ID NO:19) 的多肽,但不结合由CD37的氨基酸138-235组成的多肽。

[0017] 在另一实施方案中,本发明提供的抗体或其抗原结合片段结合SEQ ID NO:15的多肽,但不结合SEQ ID NO:18的多肽。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合SEQ ID NO:16的多肽,但不结合SEQ ID NO:18的多肽。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合SEQ ID NO:17的多肽,但不结合SEQ ID NO:18的多肽。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合CD37的氨基酸110-137中的至少一个氨基酸。

[0018] 在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段的结合亲和力通过流式细胞术、Biacore、ELISA或放射免疫测定来测量。

[0019] 在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段被能检测地标记。在另一实施方案中,所述标记选自由免疫荧光标记、化学发光标记、磷光标记、酶标记、放射性标记、抗生物素蛋白/生物素、胶体金颗粒、有色颗粒和磁性颗粒组成的群组。

[0020] 在另一实施方案中,本发明提供了一种组合物,其中所述组合物包含选自由IHC缓冲液、ELISA缓冲液和FACS缓冲液组成的群组中的缓冲液。

[0021] 在另一实施方案中,本发明提供了一种检测样本中的CD37表达的方法,其中所述方法包括使所述样本与本发明提供的抗体或其抗原结合片段或组合物接触。在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段被能检测地标记。在另一实施方案中,所述标记选自由免疫荧光标记、化学发光标记、磷光标记、酶标记、放射性标记、抗生物素蛋白/生物素、胶体金颗粒、有色颗粒和磁性颗粒组成的群组。在另一实施方案中,所述标记是酶标记。

[0022] 在另一实施方案中,通过放射免疫测定、蛋白印迹测定、细胞计量术、免疫荧光测定、酶免疫测定、免疫沉淀测定、化学发光测定或免疫组织化学测定来确定CD37表达。在另一实施方案中,通过免疫组织化学测定来确定CD37表达。

[0023] 在另一实施方案中,本发明提供了一种使用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂提高癌症治疗的功效的方法,其中所述方法包括向患有癌症的受试者施用治疗活性剂,其中CD37的增加的表达使用本发明提供的抗体或其抗原结合片段或组合物在来自所述受试者的癌性样本中检测。

[0024] 在另一实施方案中,提供了一种鉴定可能对包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂有反应的癌症的方法,其中所述方法包括:(a) 使包含来自所述癌症的细胞的生物样本与抗体或其抗原结合片段或组合物接触;(b) 检测所述抗体或其抗原结合片段与(a)中的所述生物样本中的CD37的结合;(c) 给步骤(b)中的所述结合指定分数,其中所述分数基于与一个或多个参考样本的比较来指定;以及(d) 将步骤(c)中的所述分数与参考组织或细胞的分数进行比较,其中所述癌症CD37水平的分数大于表达正常或低CD37的参考样本的所述分数或者所述癌症CD37水平的分数等于或大于表达高CD37的参考样本的所述分数鉴定所述癌症为可能对抗CD37抗体有反应。

[0025] 在另一实施方案中,提供了一种治疗患有癌症的患者的方法,其中所述方法包括:(a) 从自所述患者获得的癌性样本中的CD37表达的检测确定CD37表达分数,其中使用抗体或其抗原结合片段或组合物进行所述检测;以及(b) 如果所述分数指示所述患者将受益于施用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂,则向所述患者施用所述治疗活性剂。

[0026] 在另一实施方案中,提供了一种治疗患有癌症的患者的方法,所述方法包括:(a) 从自所述患者获得的癌性样本中的CD37表达的检测确定CD37表达分数,其中使用抗体或其抗原结合片段或组合物进行所述检测;以及(b) 如果所述分数指示所述患者将受益于施用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂,则指令医疗保健提供者向所述患者施用所述治疗活性剂。

[0027] 在另一实施方案中,提供了一种治疗患有癌症的患者的方法,所述方法包括:(a) 提交从患有癌症的患者取得的癌性样本以用于从CD37表达的检测确定CD37表达分数,其中使用抗体或其抗原结合片段或组合物进行所述检测;以及(b) 如果所述分数指示所述患者将受益于施用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂,则向所述患者施用所述治疗活性剂。

[0028] 在另一实施方案中,提供了一种治疗患有癌症的患者的方法,所述方法包括:(a) 检测从所述患者获得的癌性样本中的CD37表达,其中使用抗体或其抗原结合片段或组合物进行所述检测;(b) 确定所述癌性样本的CD37表达分数;以及(c) 如果所述分数指示所述患者将受益于施用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂,则向所述患者施用所述治疗活性剂。

[0029] 在另一实施方案中,提供了一种鉴定癌症为对用抗CD37活性剂治疗敏感的方法,所述方法包括:(a) 使用抗体或其抗原结合片段或组合物检测来自所述癌症的癌性样本中的CD37表达水平,其中所述检测包括使用相比于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达CD37的癌性样本中的染色强度或染色均匀度的方法;(b) 确定所述癌性样本的CD37染色强度或染色均匀度分数;以及(c) 将在步骤(b)中确定的所述CD37染色强度或染色均匀度分数与通过测量至少一种参考样本中的CD37蛋白表达所确定的相对值进行比较,其中所述至少一种参考样本是对用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂治疗不敏感的组织、细胞或细胞团块样本,并且其中步骤(b)中确定的所述癌性样本的CD37染色强度分数高于所述相对值鉴定所述癌症为对用所述治疗活性剂治疗敏感。

[0030] 在另一实施方案中,一种鉴定癌症为对用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂治疗敏感的方法包括:(a) 使用抗体或其抗原结合片段或组合物检测来自所述癌症的癌性样本中的CD37表达水平,其中所述检测包括使用相比于一种或多种参考样本中的染色强度或染色均匀度来区分表达CD37的癌性样本中的染色强度或染色均匀度的方法;(b) 确定所述癌性样本的CD37染色强度或染色均匀度分数;以及(c) 将在步骤(b)中确定的所述CD37染色强度或染色均匀度分数与通过测量至少一种参考样本中的CD37蛋白表达所确定的相对值进行比较,其中所述至少一种参考样本是对用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂治疗敏感的组织、细胞或细胞团块样本,并且其中步骤(b)中确定的所述癌性样本的CD37染色强度分数大于或等于所述相对值鉴定所述癌症为对用所述治疗活性剂治疗敏感。

[0031] 在另一实施方案中,所述方法还包括向受试者施用包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂,所述癌性样本或生物样本自该受试者获得。在另一实施方案中,在从所述患者获得的癌性样本或生物样本中检测所述患者的CD37水平。在另一实施方案中,所述癌性样本或生物样本是流体浸出物、血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液或脾制备物。在另一实施方案中,所述检测是通过免疫组织化学(IHC)进行的。在另一实施方案中,所述IHC是校

准的IHC,其能区分不同水平的CD37表达。在另一实施方案中,所述IHC对于具有低CD37表达、中等CD37表达或高CD37表达的样本产生一定范围的染色强度。在另一实施方案中,与参考样本相比,所述IHC区分表达CD37的癌性样本或生物样本的染色强度和染色均匀性。在另一实施方案中,所述IHC是手动执行的。在另一实施方案中,所述IHC使用自动化系统来执行。在另一实施方案中,从所述IHC确定CD37分数。在另一实施方案中,所述检测是通过酶联免疫吸附测定(ELISA)进行的。在另一实施方案中,所述参考样本是阳性参考样本或阴性参考样本。在另一实施方案中,所述参考样本包括细胞、细胞团块或组织。

[0032] 在另一实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段进一步包含选自免疫荧光标记、化学发光标记、磷光标记、酶、放射性标记、抗生物素蛋白/生物素、胶体金颗粒、有色颗粒和磁性颗粒组成的群组中的检测试剂。在另一实施方案中,所述检测试剂是酶。

[0033] 在另一实施方案中,所述癌症是CD37阳性癌症。在另一实施方案中,所述癌症是白血病或淋巴瘤。在另一实施方案中,所述癌症选自以下项组成的群组: B细胞淋巴瘤, NHL, 前体B细胞成淋巴细胞性白血病/淋巴瘤和成熟B细胞瘤, B细胞慢性淋巴细胞白血病 (CLL) / 小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL), B细胞幼淋巴细胞白血病, 淋巴浆细胞淋巴瘤, 套细胞淋巴瘤 (MCL), 滤泡性淋巴瘤 (FL), 低级、中级和高级 (FL), 皮肤滤泡中心淋巴瘤, 边缘区B细胞淋巴瘤, MALT型边缘区B细胞淋巴瘤、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤和脾型边缘区B细胞淋巴瘤, 毛细细胞白血病, 弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL), 伯基特淋巴瘤 (Burkitt's lymphoma), 浆细胞瘤, 浆细胞骨髓瘤, 移植后淋巴增生性疾病, 瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症, 以及间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL)。在另一实施方案中,所述CD37阳性癌症是弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤 (FL) 或套细胞淋巴瘤。

[0034] 在另一实施方案中,使用至少一种另外的抗CD37抗体或其抗原结合片段检测所述CD37表达。在另一实施方案中,使用两种抗CD37抗体或其抗原结合片段测量所述CD37表达。在另一实施方案中,所述至少一种另外的抗体或其抗原结合片段包含检测试剂。在另一实施方案中,所述检测试剂是显色检测试剂、荧光检测试剂、酶检测试剂或电化学发光检测试剂。在另一实施方案中,所述检测试剂是辣根过氧化物酶 (HRP)。

[0035] 在另一实施方案中,所述至少一种另外的抗体或其抗原结合片段结合至固体支持物。在另一实施方案中,所述至少一种另外的抗体或其抗原结合片段结合至微量滴定板。

[0036] 在另一实施方案中,所述ELISA是夹心ELISA。

[0037] 在另一实施方案中,所述治疗活性剂包含CD37抗体huCD37-3。在另一实施方案中,所述治疗活性剂是包含CD37抗体huCD37-3、美登木素生物碱DM1和不可切割的SMCC接头 (IMGN529) 的抗体美登木素生物碱缀合物。

[0038] 在另一实施方案中,提供了一种联合诊断和药物试剂盒,其中,所述试剂盒包含用于诊断的本发明所提供的抗体或其抗原结合片段或组合物以及用于治疗包含抗CD37抗体或其抗原结合片段的治疗活性剂。

[0039] 在另一实施方案中,所述检测抗体能够通过IHC检测CD37表达。在另一实施方案中,所述检测抗体能够通过ELISA检测CD37表达。

[0040] 在另一实施方案中,所述治疗活性剂中的所述抗CD37抗体与细胞毒素缀合。

[0041] 在另一实施方案中,本发明提供的一种诊断试剂盒包含本发明提供的抗体或其抗原结合片段、用于IHC的试剂和一种或多种标准化参考样本,其中所述标准化参考样本包

含细胞、细胞团块或福尔马林固定石蜡包埋的组织样本,并且其中所述一个或多个标准化参考样本来自表达非CD37、表达低CD37或表达高CD37的细胞、细胞团块或组织。

附图说明

[0042] 图1A和1B提供了用hCD37-LEL(大胞外环)蛋白(SEQ ID NO:15)使小鼠免疫而产生的抗体的ELISA筛选结果,所述蛋白含有与His-tag融合的人CD37的氨基酸107至242。图1A显示了在天然条件和非天然条件下,来自杂交瘤克隆1B11的上清液与多种形式的CD37抗原、hCD37-LEL、hCD37-Fc-LAGA(LAGA指Fc突变G236A和P238A)、SEQ ID NO:17,其含有与人IgG1 Fc-结构域融合的人CD37的氨基酸107至235)、和hCD37-ECD-Fc(额外细胞结构域,SEQ ID NO:16,其含有与鼠IgG2a Fc-结构域融合的人CD37的氨基酸107至235)。图1B显示来自两个杂交瘤亚克隆1B11-2和1B11-20的上清液在天然条件和变性条件下与hCD37-Fc-LAGA和hCD37-LEL结合。

[0043] 图2显示,与参考抗CD37抗体NCL-CD37(克隆CT1,Leica Biosystems)相比,抗体1B11-2与天然hCD37-Fc-LAGA和hCD37-LEL蛋白二者结合的亲和力大大提高。

[0044] 图3显示与NCL-CD37相比,抗体1B11-2与变性的hCD37-LEL蛋白的亲和力大大提高。

[0045] 图4显示抗体1B11-2没有与截短的hCD37-ECD-S2-Fc蛋白结合(S2是指CD37的大胞外结构域的第二片段,其含有氨基酸138至176(SEQ ID NO:18),而NCL-CD37保留与该CD37蛋白的结合。

[0046] 图5显示了用NCL-CD37小鼠mAb(左)或CD37 1B11-2小鼠mAb(右)染色的人正常扁桃体的免疫组织化学图像。箭头分别指示生发中心、套区(均为CD37阳性)和分子间区(CD37阴性)。黑色箭头表示生发中心;灰色箭头表示套区(两者均为CD37阳性);空心箭头表示滤泡间区(其是CD37阴性)。使用NCL-CD37抗体,在生发中心和套区都存在核染色。使用1B11-2抗体不存在核染色。

[0047] 图6显示了使用NCL-CD37小鼠单克隆抗体(mAb)(左小图)或1B11-2小鼠mAb(右小图)的人正常小肠(上小图)和人正常胰腺(下小图)的免疫组织化学图像。左小图中的箭头表示在使用NCL-CD37小鼠mAb获得的潘氏细胞(上小图,用黑色箭头表示)和胰岛细胞(下小图,用空心箭头表示)中的细胞质红斑。右小图中的箭头表明,使用1B11-2抗体在相应位置没有观察到这种染色。

[0048] 图7显示了用NCL-CD37小鼠mAb(左小图)或1B11-2小鼠mAb(右小图)染色的弥漫性大B细胞淋巴瘤患者组织(上小图)和滤泡淋巴瘤患者组织(下小图)的免疫组织化学图像。使用1B11-2小鼠mAb,在两种癌症类型中都可以看到更强烈、更清晰的染色。

[0049] 图8显示了将1B11-2小鼠单克隆抗体与可商购的小鼠单克隆抗CD37抗体(Leica)进行比较的、与CD37细胞外结构域(ECD)抗原的Fc融合物的变性SDS PAGE蛋白印迹(Western blot)。以千道尔顿(kD)为单位的分子量标记在右侧显示为主要数据并作为示意图。

[0050] 图9显示由1B11-2小鼠单克隆抗体检测到的与CD37细胞外结构域(ECD)抗原的Fc融合物的天然PAGE蛋白印迹。

具体实施方案

[0051] 本公开提供了检测人CD37的方法。这些方法使得能够鉴定以CD37的表达为特征的癌症,以便提高用抗CD37治疗剂治疗的功效。这些检测方法可用于患者分层、监测或确定治疗功效,或确定癌症对抗CD37治疗反应的可能性。这些检测方法可以检测到临床相关的CD37的动态范围。还公开了可用于CD37检测方法(例如CD37的免疫组织化学(IHC))中的新的CD37结合多肽,例如抗体及其抗原结合片段。本文提供的CD37结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)使得能在无核背景下更具体和清晰地染色。CD37结合剂结合包含CD37的一个或多个氨基酸110-137的表位。CD37结合剂还结合包含CD37的氨基酸107-242(SEQ ID NO: 20)的多肽或包含CD37的氨基酸107-235(SEQ ID NO:19)的多肽,但不结合由CD37的氨基酸138-235组成的多肽。还提供相关多肽和多核苷酸、包含所述CD37结合剂的组合物以及制备CD37结合剂的方法。

I. 定义

[0052] 为了促进对于本发明的理解,下文定义了一些术语和用语。

[0053] 除非另有指明,否则本文使用的术语“CD37”是指任何天然CD37多肽。CD37也被称为GP52-40、白细胞抗原CD37以及四跨膜蛋白-26。术语“CD37”包括“全长”、未加工的CD37多肽以及产生于细胞中的加工的任何形式的CD37。该术语还包括CD37的天然存在的变体,例如剪接变体、等位基因变体和亚型。本发明描述的CD37多肽可分离自多种来源,例如来自生物样本或来自其他来源,或者通过重组或合成方法制备。

[0054] 术语CD37的“增加的表达”或“过度表达”是指含有升高的CD37的表达水平的样本。与阴性或低度参考对照相比或与相同组织或细胞类型的健康或未患病样本相比,CD37可以被增加或被过表达。这种增加的表达或过表达可以例如通过突变、基因扩增、增加的转录、增加的翻译或增加的蛋白稳定性而引起。

[0055] 在一个实例中,CD37表达可通过免疫组织化学(IHC)来测量并且通过与展示确定分数的校准的对照进行比较来给出染色强度分数或染色均匀度分数(例如,如果强度与3级校准的对照可比,则将3的强度分数给予测试样本,或者如果强度与2级校准的对照可比,则将2的强度给予测试样本)。异质或均质的染色均匀度也指示CD37表达增加。染色强度和染色均匀度分数可单独或组合(例如,2均质、2异质、3均质、3异质等)使用。在另一个实例中,CD37表达的增加可通过检测相对于对照值(例如,在来自未患有癌症或患有CD37值未升高的癌症的受试者的生物样本、组织或细胞中的表达水平)至少2倍、至少3倍或至少5倍增加来测定。在另一个实例中,CD37表达被给予H分数。H分数使用本文提供的计算将染色强度分数与均匀性分数相组合。在另一个实例中,通过确定具有至少特定染色水平的细胞的百分比来测量CD37表达(例如,至少25%的细胞具有至少为2的分数或至少75%的细胞具有至少为2的分数)。

[0056] “参考样本”可用于关联并比较以本发明的方法从测试样本中获得的结果。参考样本可为细胞(例如,细胞系、细胞团块)或组织。“参考样本”中的CD37水平可以是CD37的绝对量或相对量、量的范围、最小和/或最大量、平均量和/或中位量。本发明提供的诊断方法涉及测试样本中的CD37表达水平与“参考值”之间的比较。在一些实施方案中,所述参考值是参考样本中的CD37的表达水平。参考值可以是预先确定的值并且还可从与测试样本同时进

行测试的参考样本(例如对照生物样本或参考样本)来确定。参考值可为单一截止值,如中位值或平均值或值的范围,如置信区间。可以为个体的不同亚组确立参考值,所述个体如易患癌症的个体、患有早期或晚期癌症的个体、男性和/或女性个体、或者经受癌症治疗的个体。阴性参考样本或值和阳性参考样本或值的实例在本文描述。

[0057] 在一些实施方案中,参考样本是来自健康组织的样本,具体地说不受癌症影响的相应组织或不受过度表达CD37的癌症影响的相应组织。这些类型的参考样本被称为阴性对照样本或参考样本。在其他实施方案中,所述参考样本是来自表达CD37的肿瘤的样本。这些类型的参考样本被称为阳性对照。阳性对照样本还可用作与CD37表达水平相关的所述类型(异质对均质)、染色强度的程度(0、1、2、3)、H分数和/或具有至少特定染色水平的细胞百分比的比较指标。阳性对照比较样本还被称为校准的参考样本。低或非CD37参考在本文的实施例中描述了,并且还包括脾的红髓(例如单核细胞和红细胞)、T细胞和人扁桃体的滤泡间区域。CD37表达参考在本文的实施例中描述了,并且还包括脾的红髓(例如B淋巴细胞和脾的边缘区)、人扁桃体的生发中心和人扁桃体的套区。对于细胞系,示例性的非表达子包括300-19个细胞,并且表达子包括Daudi、Ramos、Namalwa和RL非霍奇金淋巴瘤B细胞。另一个高CD37阳性参考是用CD37(例如,如美国公开申请No. 2015/0093397和PCT公开W02013/149171中所述的300.19/CD37,其各自通过引用并入本文)稳定或瞬时转染的细胞系。用于特定癌症的适当阳性和阴性参考CD37水平可通过测量一个或多个适当受试者中的CD37的水平来确定,并且可针对受试者的特定群体来定制这类参考水平(例如,参考水平可以是年龄相匹配的,以使得可在来自一定年龄的受试者的样本中的CD37水平与一定年龄组中关于特殊疾病状态、表型或其缺乏的参考水平之间作出比较)。

[0058] 如本文所使用的,“免疫组织化学”是指用于分析例如细胞或组织的组织化学和免疫学方法。因此,术语“免疫组织化学”、“免疫细胞化学”以及“免疫化学”可互换使用。

[0059] 在具体实施方案中,本发明的“样本”或“生物样本”来源于生物,如来自真核生物体。在一些实施方案中,所述样本是人样本,但是在本发明的实践中也可使用动物样本。用于在本发明中使用的样本的非限制性来源示例包括例如实体组织、活检抽吸物、流体浸出物、血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液、皮肤的外部切片、呼吸道、肠道和泌尿生殖道、泪液、唾液、乳汁、肿瘤、器官、细胞培养物和/或细胞培养物成分。“癌性样本”是包含癌性细胞的样本。本文提供的方法可用于实体组织样本中,其中可用材料的量小。本文提供的方法可用于检查CD37的表达方面或样本的状态,包括但不限于:比较细胞或组织的不同类型以及检测或确定疾病或异常的存在和/或类型。

[0060] 出于本文的目的,组织样本的“切片”是指组织样本的单一部分或单一片,例如从组织样本切下的组织薄片或细胞。应了解,根据本发明可取得组织样本的多个切片并对其进行分析。在一些情况下,所选择的组织部分或切片包含同源细胞群体。在其他情况下,所选择的部分包括组织的区域,例如作为非限制性实例的管腔。例如,所选择的部分可例如像一个细胞或两个细胞那样小,或者可以代表成千上万个细胞。在大多数情况下,细胞的收集是重要的,并且虽然已经描述了本发明用于在细胞组分的检测中使用,但所述方法还可用于检测生物体的非细胞组分(例如作为非限制性实例的在血液中的可溶性组分)。

[0061] 如本文所使用的,术语“捕获试剂”是指能够结合且捕获样本中的靶分子的试剂,以使得在适合条件下捕获试剂-靶分子复合物可与样本的剩余部分分离。在一个实施方

案中,捕获试剂是固定的。在一个实施方案中,夹心免疫测定中的捕获试剂是针对靶抗原的抗体或其抗原结合片段或不同抗体或其抗原结合片段的混合物。

[0062] 如本文所使用的,术语“可检测的”抗体或其抗原结合片段是指能够通过由检测装置放大的标记直接检测或通过例如经标记的另一种抗体或其抗原结合片段间接检测的抗体或其抗原结合片段。对于直接标记,所述抗体或其抗原结合片段通常偶联至可通过一些装置检测的部分。在一个实施方案中,可检测的抗体或其抗原结合片段是生物素化的抗体或其抗原结合片段。

[0063] 如本文所使用的,术语“检测装置”是指用于检测可检测抗体或其抗原结合片段的存在部分或技术并且包括放大固定的标记(如捕获到微量滴定板上的标记)的检测试剂。在一个实施方案中,检测装置是荧光检测试剂,如抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素。

[0064] 通常,“夹心ELISA”采用以下步骤:(1)将微量滴定板涂覆捕获抗体或其抗原结合片段;(2)添加样本,并且存在的任何抗原结合捕获抗体或其抗原结合片段;(3)检测抗体或其抗原结合片段被添加并且结合抗原;(4)酶联第二抗体或其抗原结合片段被添加并且结合检测抗体或其抗原结合片段;以及(5)添加底物并且将其通过酶转化成可检测形式。

[0065] 词语“标记”当在本文使用时是指直接地或间接地与抗体偶联以便产生“标记的”抗体的可检测化合物或组合物。所述标记本身是可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记),或者在酶标记的情况下,可催化可检测的底物化合物或组合物的化学变化。

[0066] 所谓“关联(correlate)”或“关联(correlating)”意指以任何方式对第一次分析的性能和/或结果与第二次分析的性能和/或结果进行比较。例如,可将第一次分析的结果用于执行第二次分析、和/或可将第一次分析的结果用于确定是否应该进行第二次分析、和/或可将第一次分析的结果与第二次分析的结果进行比较。在一个实施方案中,增加的CD37表达与CD37靶向性抗癌治疗的增加的效力可能性相关联。

[0067] 术语“抗体”意指经由免疫球蛋白分子可变区内部的至少一个抗原识别位点识别并且特异性地结合至靶标的免疫球蛋白分子,所述靶标如蛋白、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或前述物质的组合。如本文所使用的,术语“抗体”包括完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、多特异性抗体如由至少两个完整的抗体生成的双特异性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的融合蛋白以及任何其它经修饰的免疫球蛋白分子,只要抗体呈现所需生物活性即可。抗体可以是以下五种主要类别的免疫球蛋白中的任一种:IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM或其亚类(同种型)(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1以及IgA2),其分别基于其称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 以及 μ 的重链恒定结构域的特性。不同类别的免疫球蛋白具有不同的及公认的亚单位结构以及三维构型。抗体可以是裸的或缀合至其它分子如毒素、放射性同位素等。

[0068] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分。“抗原结合片段”是指结合抗原的完整抗体的一部分。抗原结合片段可以包含完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂以及Fv片段,线性抗体、和单链抗体。涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”内的结合片段的实例包括(但不限于):(i)Fab片段,其为由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段(例如,由木瓜蛋白酶消化的抗体产生三个片段:两个抗原结合Fab片段和不会结合抗原的一个Fc片段);(ii)F(ab')₂片段,其为包含由在铰链区的二硫桥键连接的两个Fab片段的二价片段(例如,由胃蛋白酶消化的抗体产生两个片段:二价抗原结合F

(ab')₂片段和不会结合抗原的pFc'片段)及其相关F(ab')₂单价单位;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段(即,重链的包括于Fab中的所述部分);(iv)由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,以及相关二硫键连接的Fv;以及(v)由VH结构域组成的dAb(结构域抗体)或sdAb(单结构域抗体)片段(Ward等,Nature 341:544-546,1989)。

[0069] 在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是非天然存在的抗体。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是从天然组分中纯化的。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是重组产生的。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是由杂交瘤产生的。

[0070] “阻断”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或降低其所结合的抗原(如CD37)的生物活性的抗体。在某一实施方案中,阻断抗体或拮抗剂抗体大体上或完全抑制抗原的生物活性。理想地,生物活性降低了10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或甚至100%。

[0071] 术语“抗CD37抗体”或“结合CD37的抗体”是指能够以足够的亲和力结合CD37的抗体以使得抗体适用作靶向CD37时的诊断剂和/或治疗剂。抗CD37抗体结合至不相关的非CD37蛋白的程度小于抗体结合至CD37的如例如通过放射免疫测定(RIA)所测得的约10%。在某些实施方案中,结合至CD37的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(K_d)。抗CD37抗体的实例在本技术领域中公知的,并且例如在美国公开申请No 2011/0256153,其通过引用并入本发明。

[0072] “单克隆”抗体是指在单个抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合中涉及到的均质性抗体或抗原结合片段群。这与多克隆抗体形成对比,多克隆抗体通常包括针对不同抗原决定簇的不同抗体。术语“单克隆”抗体或其抗原结合片段涵盖完整及全长单克隆抗体以及抗体片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白以及任何其它包含抗原识别位点的经修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆”抗体或其抗原结合片段是指通过任何多种方式制备的此类抗体或其抗原结合片段,包括但不限于通过杂交瘤、噬菌体筛选、重组表达和转基因动物制备的此类抗体。

[0073] 术语“人源化”抗体或其抗原结合片段是指作为含有最少的非人(例如鼠)序列的特定免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段的非人(例如鼠)抗体形式或其抗原结合片段形式。通常,人源化抗体或其抗原结合片段是来自互补决定区(CDR)的残基被来自具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(例如小鼠、大鼠、兔子、仓鼠)的CDR的残基替换的人免疫球蛋白(Jones等,1986,Nature,321:522-525;Riechmann等,1988,Nature,332:323-327;Verhoeyen等,1988,Science,239:1534-1536)。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被来自具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种的抗体或片段中的相应残基替换。人源化抗体或其抗原结合片段可在Fv框架区中和/或被替换的非人残基内进一步通过另外残基的替换而修饰,以改善或优化抗体或其抗原结合片段的特异性、亲和力和/或能力。一般来讲,人源化抗体或其抗原结合片段将包含至少一个,通常两个或三个可变结构域的基本上全部,所述可变结构域含有对应于非人免疫球蛋白的CDR区的全部或基本上全部,而FR区的全部或基本上全部则为人免疫球蛋白共有序列(consensus sequence)的那些FR区。人源化抗体或其抗原结合片段还可以包含通常为人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至少一部分。用于生成人源化抗体的方法的实例在美国专利5,225,539或5,639,641中有描述。

[0074] 本文中的术语“第一”抗体或其抗原结合片段是指特异性地结合样本中的靶蛋白

抗原的抗体或其抗原结合片段。第一抗体或其抗原结合片段通常是免疫组织化学程序中使用的第一个抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中,所述第一抗体或其抗原结合片段是在免疫组织化学程序中使用的唯一抗体或其抗原结合片段。本文中的术语“第二”抗体或其抗原结合片段是指特异性地结合第一抗体或其抗原结合片段、从而在第一抗体或其抗原结合片段与后续试剂(如果有的话)之间形成桥的抗体或其抗原结合片段。第二抗体或其抗原结合片段通常是免疫组织化学程序中使用的第二个抗体或其抗原结合片段。本文中的术语“第三”抗体或其抗原结合片段是指特异性地结合第二抗体或其抗原结合片段、从而在第二抗体或其抗原结合片段与后续试剂(如果有的话)之间形成桥的抗体或其抗原结合片段。

[0075] 抗体或其抗原结合片段的“可变区”是指单独的或组合的抗体轻链可变区或抗体重链可变区。重链和轻链的可变区均由通过三个互补决定区(CDR)(也称为高变区)连接的四个框架区(FR)组成。每条链中的CDR通过FR近距离保持在一起,并与来自另一条链的CDR一起有助于形成抗体的抗原结合位点。至少有两种技术用于确定CDR:(1)基于跨物种序列变异性的方法(即,Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,(第5版,1991,National Institutes of Health,Bethesda Md.));以及(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-lazikani等(1997)J.Molec.Biol.273:927-948))。此外,这两种方法的组合在本领域中有时用于确定CDR。

[0076] Kabat编号系统通常用在提及可变结构域(大约轻链的第1-107位残基和重链的第1-113位残基)中的残基时(例如,Kabat等,Sequences of Immunological Interest.,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。

[0077] 如Kabat中的氨基酸位置编号是指用于抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统,见于:Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)。使用该编号系统,实际的线性氨基酸序列可含有与可变结构域的FR或CDR的缩短或插入相对应的更少的或另外的氨基酸。例如,重链可变结构域可以包括在H2的第52位残基后的单个氨基酸插入(根据Kabat的第52a位残基)以及在重链FR第82位残基后的插入残基(例如,根据Kabat的第82a、82b和82c位残基等)。对于给定的抗体,可通过在抗体序列同源性区域与“标准”Kabat编号序列进行比对而确定残基的Kabat编号。相反,Chothia则是指结构环的位置(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。Chothia CDR-H1环的末端在使用Kabat编号惯例进行编号时在H32与H34之间根据环的长度而变化(这是因为Kabat编号方案将插入置于H35A和H35B处;如果35A和35B均不存在,则环在第32位结束;如果仅存在35A,则环在第33位结束;如果35A和35B均存在,则环在第34位结束)。AbM高变区代表了Kabat CDR与Chothia结构环之间的折中,并被Oxford Molecular's AbM抗体建模软件使用。

环	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (Kabat 编号)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Chothia 编号)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0078] 术语“人”抗体或其抗原结合片段意指由人产生的抗体或其抗原结合片段或使用本领域已知的任何技术制备的具有与人产生的抗体或其抗原结合片段相对应的氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段。对人抗体或其抗原结合片段的这种定义包括完整的或全长的抗体、其片段。

[0079] 术语“嵌合”抗体或其抗原结合片段是指其中的氨基酸序列衍生自两个或更多个物种的抗体或其抗原结合片段。通常，轻链和重链两者的可变区都对应于具有所需特异性、亲和力和能力的衍生自一个哺乳动物物种(例如小鼠、大鼠、兔子等)的抗体或其抗原结合片段的可变区，而恒定区则与衍生自另一物种(通常为人)的抗体或其抗原结合片段中的序列同源，以避免在该物种中引发免疫反应。

[0080] 术语“表位”或“抗原决定簇”在本文可互换使用，并指能够被特定抗体或其抗原结合片段识别和特异性结合的抗原部分。当抗原为多肽时，表位既可由连续氨基酸形成，也可由通过蛋白的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在蛋白变性时得以保持，而由三级折叠形成的表位在蛋白变性时通常会失去。表位通常包括至少3个，更通常至少5个或8-10个呈独特的空间构象的氨基酸。

[0081] “结合亲和力”通常是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合伴侣(例如抗原)之间的非共价相互作用的总强度。除非另外指明，否则如本文所用的“结合亲和力”是指反映结合对(例如抗体和抗原)成员之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其伴侣Y的亲和力通常可由解离常数(Kd)表示。亲和力可通过本领域已知的常见方法(包括本文所述的那些方法)进行测量。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并倾向于容易解离，而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并倾向于保持结合更长的时间。测量结合亲和力的多种方法在本领域中是已知的，它们中的任何一种均可用于本发明的目的。具体的示例性实施方案在下文描述。

[0082] “或更佳的”当在本文用于指代结合亲和力时是指分子与其结合伴侣之间更强的结合。“或更佳的”当在本文用于指代更强的结合时，由更小的Kd数值表示。例如，对于具有“0.6nM或更佳的”抗原亲和力的抗体，该抗体的抗原亲和力<0.6nM，即0.59nM、0.58nM、0.57nM等或小于0.6nM的任何值。

[0083] 如本文所用的短语“基本上相似”或“基本上相同”是指两个数值(通常一个与本发明的抗体相关，而另一个则与参考/比较抗体相关)之间足够高的相似程度，使得本领域的技术人员将认识到两个值之间的差异在所述值(例如，Kd值)度量的生物学特性的背景下有

很小或没有生物学和/或统计学显著性。所述两个值之间的差异与参考/比较抗体的值成函数关系,为小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%或小于约10%。

[0084] “分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是指并不存在于自然界中的形式的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括经过纯化一定程度上已不再呈自然界中所见形式的那些多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。在一些实施方案中,分离的抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物为基本上纯的。

[0085] 如本文所使用的,“基本上纯的”是指至少50%纯(即,不含污染物)、至少90%纯、至少95%纯、至少98%纯或至少99%纯的物质。

[0086] 如本文所用的术语“免疫缀合物”或“缀合物”是指连接到细胞结合剂(即,抗CD37抗体或其抗原结合片段)的化合物或其衍生物,并由以下通式定义:C-L-A,其中C=细胞毒素,L=接头以及A=细胞抗原结合或抗CD37抗体或其抗原结合片段。免疫缀合物也可由反向顺序的通式:A-L-C定义。

[0087] “接头”是能够将化合物(通常为药物,诸如美登木素)以稳定的共价方式连接到细胞结合剂(诸如抗CD37抗体或其片段)的任何化学部分。在化合物或抗体保持活性的条件下,接头可容易受例如二硫键裂解的影响或基本上耐受酸诱导的裂解、光诱导的裂解、肽酶诱导的裂解、酯酶诱导的裂解以及二硫键裂解。合适的接头是本领域公知的并且包括,例如,二硫基、硫醚基、酸不稳定性基团、光不稳定性基团、肽酶不稳定性基团以及酯酶不稳定性基团。接头还包括如本文所描述的和本领域已知的带电荷的接头及其亲水形式。

[0088] 术语“癌”和“癌的”是指或描述其中细胞群具有未调节的细胞生长的特性的哺乳动物中的生理状况。癌的实例包括但不限于癌(carcinoma)、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤以及白血病。“癌症”或“致瘤性”疾病的更具体的实例包括:B细胞淋巴瘤,包括NHL,前体B细胞成淋巴细胞性白血病/淋巴瘤和成熟B细胞瘤,如B细胞慢性淋巴细胞白血病(CLL)/小淋巴细胞淋巴瘤(SLL),B细胞幼淋巴细胞白血病,淋巴浆细胞淋巴瘤,套细胞淋巴瘤(MCL),滤泡性淋巴瘤(FL),包括低级、中级和高级FL,皮肤滤泡中心淋巴瘤,边缘区B细胞淋巴瘤(MALT型、淋巴结和脾型),毛细胞白血病,弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL),伯基特淋巴瘤(BL),浆细胞瘤,浆细胞骨髓瘤,移植后淋巴增生性疾病和间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)。在一些实施方案中,癌症是白血病或淋巴瘤。

[0089] “肿瘤(Tumor)”和“赘生物(neoplasm)”是指由过度细胞生长或增殖所引起的任何组织块,是良性的(非癌的)或恶性的(癌的),包括癌前病变。

[0090] 术语“癌细胞”、“肿瘤细胞”和语法等效物是指衍生自肿瘤或癌前病变的总细胞群,包括非致瘤性细胞(构成肿瘤细胞群的大部分)和致瘤性干细胞(癌干细胞)两者。如本文所使用的,术语“肿瘤细胞”在仅指缺乏更新和分化能力的那些肿瘤细胞时将通过术语“非致瘤性”加以修饰,以将那些肿瘤细胞与癌干细胞区分。

[0091] 术语“受试者”是指将为特定治疗的接受者的任何动物(例如哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类、啮齿类等等。一般来讲,术语“受试者”和“患者”在涉及人受试者时在本文可互换使用。

[0092] “化学治疗剂”是一种可用于治疗癌的化学化合物,不管其作用机制是什么。化学治疗剂的类型包括但不限于,烷化剂、抗代谢物、纺锤体毒素植物生物碱、细胞毒素/抗肿瘤

抗生素、拓扑异构酶抑制剂、抗体、光敏剂和激酶抑制剂。化学治疗剂包括用于“靶向治疗”和常规化疗的化合物。

[0093] 与一种或多种另外的治疗剂“组合”施用包括同时(并行)施用和以任何顺序连续施用。

[0094] 术语“药物制剂”是指这样的制备物,其所呈现的形式使得活性成分的生物活性能发挥效果,并且其不含对将要施用该制剂的受试者具有无法接受毒性的另外组分。这样的制剂可以为无菌的。

[0095] 如本文所公开的抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物的“有效量”是足以实现具体指定的目的的量。“有效量”可通过经验确定以及在涉及指定的目的时以常规方式确定。

[0096] 术语“治疗有效量”是指有效“治疗”受试者或哺乳动物中的疾病或病症的抗体或其抗原结合片段或其它药物的量。就癌症而言,治疗有效量的药物可以减少癌细胞的数量;减小肿瘤尺寸;抑制(即,在一定程度上减慢并在某个实施方案中停止)癌细胞对周围器官的浸润;抑制(即,在一定程度上减慢并在某个实施方案中停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状;和/或导致有利的反应,诸如延长的无进展生存期(PFS)、无病生存期(DFS)或总生存期(OS)、完全应答(CR)、部分应答(PR),或在一些情况下,稳定的疾病(SD)、进行性疾病(PD)的减少、减少进展的时间(TTP)、或其任何组合。参见本文中“治疗”的定义。就药物可防止癌细胞生长和/或杀伤现有癌细胞的程度而言,药物可以是细胞抑制性的和/或细胞毒性的。在某些实施方案中,增加的CD37水平的鉴定允许施用减少量的CD37靶向性治疗剂,以实现与更高剂量所见到的相同的治疗效果。“预防有效量”是指在必要的剂量下和时间段内有效实现所需预防结果的量。通常但非必要地,由于预防剂量在疾病之前或疾病的早期阶段用于受试者,因此预防有效量将低于治疗有效量。

[0097] 术语“有利地反应”通常是指在受试者中引起有益的状态。关于癌症治疗,该术语是指在受试者身上提供治疗效果。在癌症中的积极治疗效果可以按多种方式测量(参见W.A.Weber, J.Nucl.Med. 50:1S-10S (2009))。例如,肿瘤生长抑制、分子标记物表达、血清标记物表达以及分子成像技术均可用于评定抗癌治疗剂的疗效。关于肿瘤生长抑制,根据NCI标准, $T/C \leq 42\%$ 是抗肿瘤活性的最低水平。 $T/C < 10\%$ 被认为是高抗肿瘤活性水平,其中 $T/C(\%) = \text{治疗组的中值肿瘤体积} / \text{对照组的中值肿瘤体积} \times 100$ 。有利的应答可例如通过延长的无进展生存期(PFS)、无病生存期(DFS)或总生存期(OS)、完全应答(CR)、部分应答(PR)或在一些情况下稳定的疾病(SD)、进行性疾病(PD)的减少、减少的进展时间(TTP)或其任何组合来评定。

[0098] PFS、DFS和OS可以通过由美国国家癌症研究所(National Cancer Institute)和批准新药的美国食品药品监督管理局(U.S.Food and Drug Administration)设立的标准来测量。参见Johnson等,(2003) J.Clin.Oncol. 21(7):1404-1411。

[0099] “无进展生存期”(PFS)是指从招募到疾病进展或死亡的时间。对于NHL患者,可以使用“国际协调项目的恶性淋巴瘤修订的响应标准(the International Harmonization Project's Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma)”(Cheson et al, J Clin Oncol. 25:579-86 (2007),其全部内容通过引用并入本文中)提供的标准来测量PFS。对于CLL患者,可以使用“国立癌症研究所(NCI) CLL响应标准国际研讨会(the National

Cancer Institute (NCI) International Workshop on CLL Response Criteria)”(Hallek et al, Blood, 111:5446-56 (2008), 其通过引用并入本文整体)中提供的标准来测量PFS。对霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤患者,可使用卢加诺(Lugano)分类标准(Cheson et al, J Clin Oncol. 32:3059-68 (2014))来测量PFS。一般来讲,无进展生存期是指其中患者保持活着而无癌症恶化的情形。

[0100] “肿瘤进展时间”(TTP)被定义为从招募到疾病进展的时间。对于NHL患者,可以使用“国际协调项目的恶性淋巴瘤修订的响应标准(the International Harmonization Project's Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma)”(Cheson et al, J Clin Oncol. 25:579-86 (2007), 其全部内容通过引用并入本文)中提供的标准来测量TTP。对于CLL患者,可以使用“国立癌症研究所(NCI)CLL响应标准国际研讨会(the National Cancer Institute (NCI) International Workshop on CLL Response Criteria)”(Hallek et al, Blood, 111:5446-56 (2008), 其通过引用并入本文整体)中提供的标准来测量TTP。对霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤患者,可使用卢加诺(Lugano)分类标准(Cheson et al, J Clin Oncol. 32:3059-68 (2014))来测量TTP。

[0101] “完全应答”或“完全缓解”或“CR”指示响应于治疗,肿瘤或癌症的所有迹象消失。这并不总是意味着癌症已被治愈。

[0102] “部分应答”或“PR”是指响应于治疗,一个或多个肿瘤或病变的尺寸或体积减小,或癌症在体内的程度减轻。

[0103] “稳定的疾病”是指不进展也不复发的疾病。在稳定的疾病中,既不存在足够的肿瘤缩小以符合部分应答也不存在足够的肿瘤增大以符合进行性疾病。

[0104] “进行性疾病”是指又一个新病变或肿瘤出现和/或现有的非靶标病变明确进展。进行性疾病还可以指从治疗开始以来肿瘤生长超过20%,这是由于肿块增大或肿瘤的扩散导致的。

[0105] “无病生存期”(DFS)是指患者保持无病的治疗期间和之后的时间长度。

[0106] “总生存期”(OS)是指从患者招募到死亡或在最后得知活着的日期时的时间。OS包括与首次接触试验的或未治疗个体或患者相比的预期寿命的延长。总生存期是指其中患者例如从诊断或治疗之时起保持活着持续限定的时间段,诸如一年、五年等的情形。

[0107] 诸如“治疗(treating/treatment/to treat)”或“缓解(alleviating/to alleviate)”之类的术语是指治愈、减缓、减轻所诊断的病理病状或病症的症状和/或阻止其进展的治疗性措施。因此,需要治疗的那些包括已诊断患有或疑似患有所述病症的那些。在某些实施方案中,如果患者显示出以下一个或多个方面,则受试者根据本发明的方法针对癌症得到了成功的“治疗”:癌细胞数量减少或完全不存在癌细胞;肿瘤尺寸减小;癌细胞向周围器官的浸润(包括例如癌扩散到软组织和骨骼中)受到抑制或不存在;肿瘤转移受到抑制或不存在;肿瘤生长受到抑制或不存在;与特定癌症相关的一种或多种症状减轻;发病率和死亡率降低;生活质量改善;肿瘤的致肿瘤性、致肿瘤频率或致肿瘤能力降低;肿瘤中癌干细胞的数量或频率降低;致肿瘤细胞向非致瘤状态分化;延长的无进展生存期(PFS)、无病生存期(DFS)或总生存期(OS)、完全应答(CR)、部分应答(PR)、稳定的疾病(SD)、进行性疾病(PD)的减少、减少的进展时间(TTP)或其任何组合。

[0108] 预防性或防止措施是指防止和/或减缓所靶向的病理病状或病症的发展的治疗措

施。因此,需要预防性或防止措施的那些包括易患所述病症的那些和其中待预防所述病症的那些。

[0109] 如本文所使用,术语“医疗保健提供者”是指直接与活受试者(例如,人患者)相互作用和向其施用的个体或机构。医疗保健提供者的非限制性实例包括医生、护士、技术人员、治疗学家、药剂师、顾问、可选的医学从业者、医疗机构、医生办公室、医院、急诊室、诊所、紧急护理中心、可选的医学诊所/机构以及任何其他提供以下服务的实体:一般和/或专门的治疗、评定、维持、疗法、药物治疗和/或涉及所有或任何部分的患者的健康状态的建议,包括但不限于一般医疗、专门医疗、手术和/或任何其他类型的治疗、评定、维持、疗法、药物治疗和/或建议。

[0110] 在一些方面中,医疗保健提供者可施用或指示另一个医疗保健提供者施用疗法以治疗癌症。疗法的“施用”如本文所述包括向受试者开出疗法以及将所述疗法递送、施加或给予至受试者。医疗保健提供者可实施或指示另一个医疗保健提供者或患者进行以下行为:获得样本;处理样本;递交样本;接收样本;转移样本;分析或测量样本;定量样本;提供在分析/测量/定量样本之后所获得的结果;接收在分析/测量/定量样本之后所获得的结果;比较/计分在分析/测量/定量一个或多个样本之后所获得的结果;提供来自一个或多个样本的比较/得分;获得来自一个或多个样本的比较/得分;施用疗法或治疗剂(例如,CD37结合剂);开始施用疗法;终止施用疗法;继续施用疗法;暂时中断施用疗法;增加施用的治疗剂的量;减少施用的治疗剂的量;继续施用一定量的治疗剂;增加施用治疗剂的频率;减少施用治疗剂的频率;维持治疗剂的相同给药频率;通过至少另一种疗法或治疗剂替代一种疗法或治疗剂;将一种疗法或治疗剂与至少另一种疗法或额外的治疗剂组合。这些行为可通过医疗保健提供者自动使用计算机实施的方法(例如,经由网络服务或独立计算机系统)来进行。

[0111] 如本文可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指具有任何长度的核苷酸的聚合物,并且包括DNA和RNA。所述核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物、或可通过DNA或RNA聚合酶并入至聚合物中的任何基质。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸,如甲基化的核苷酸和它们的类似物。如果存在,可在聚合物的组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可被非核苷酸组分间断。多核苷酸可在聚合之后进行进一步修饰,如通过与标记组分偶联。其他类型的修饰包括,例如,“加帽(cap)”、用类似物取代一种或多种天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰,诸如例如,具有不带电荷的键合(例如,膦酸甲酯、磷酸三酯、磷酸酰胺酯(phosphoamidate)、氨基甲酸酯(cabamate),等)和具有带电荷的键合(例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯,等)的那些、含有侧基部分(例如像,蛋白(例如,核酸酶、毒素、抗体、信号肽、聚-L-赖氨酸,等))的那些、具有嵌入剂(例如,吡啶、补骨脂素等)的那些、含有螯合剂(例如,金属、放射性金属、硼、氧化金属,等)的那些、含有烷化剂(alkylator)的那些、具有经修饰的键合(例如, α 端基异构核酸,等等)的那些、以及一种或多种多核苷酸的未修饰形式。此外,通常存在于糖类中的任何羟基可被(例如)膦酸酯基、磷酸酯基置换、被标准保护基保护或被活化以提供与另外核苷酸的另外键合,或可与固体支持物偶联。 $5'$ 和 $3'$ 末端OH可被磷酸化或被胺或具有1至20个碳原子的有机封端基团部分而取代。其他羟基还可衍生化成标准保护基。多核苷酸还可含有本领域中通常已知的类似形式的核糖或脱氧核糖,包括例如 $2'-O$ -甲基-、 $2'-O$ -烯丙基、 $2'$ -氟

或2'-叠氨基-核糖、碳环糖类似物、 α -端基异构糖、差向异构糖类(如阿拉伯糖、木糖或来苏糖)、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、无环类似物以及无碱基核苷类似物如甲基核苷。一个或多个磷酸二酯键合可被可选的连接基置换。这些可选的连接基包括但不限于,其中磷酸酯被P(O)S(“硫代磷酰胺酯(thioate)”)、P(S)S(“二硫代磷酰胺酯(dithioate)”)、(O)NR₂(“酰胺化物(amidate)”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲缩醛(formacetal)”)置换的实施方案,其中每个R或R'独立地是H或任选含有醚(--O--)键合的取代的或未取代的烷基(1-20个C)、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基(araldyl)。多核苷酸中并非所有的键合都需要一致。前文描述适用于本文所提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0112] 术语“载体”意指能够在宿主细胞中递送且表达一种或多种目标基因或序列的构建体。载体的实例包括,但不限于,病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子凝缩剂相关的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体以及某些真核细胞(如生产者细胞)。

[0113] 术语“多肽”、“肽”以及“蛋白”在本文可互换使用,以指具有任何长度的氨基酸的聚合物。所述聚合物可以是直链的或支链的,它可包含经修饰的氨基酸,并且它可被非氨基酸间断。所述术语还涵盖已经天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化,或任何其他操作或修饰,如与标记组分偶联。在所述定义内还包括,例如,含有氨基酸的一种或多种类似物(包括,例如,非天然氨基酸,等)的多肽、以及本领域已知的其他修饰。应了解,因为本发明的多肽是基于抗体,所以在某些实施方案中,所述多肽可作为单链或缔合的链而存在。在一些实施方案中,多肽、肽或蛋白是非天然存在的。在一些实施方案中,多肽、肽或蛋白是从其他天然存在的组分纯化的。在一些实施方案中,多肽、肽或蛋白是重组产生的。

[0114] 在两个或更多个核酸或多肽背景下的术语“同一的”或百分比“同一性”是指在不考虑作为序列同一性一部分的任何保守氨基酸替代的情况下进行最大对应性比较和比对(必要时引入空位)时,相同的或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列。百分比同一性可使用序列比较软件或算法或通过目测而测量。可用于获得氨基酸或核苷酸序列比对的多种算法和软件在本领域中是已知的。序列比对算法的一个这样的非限制性实例是在Karlin等,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.,87:2264-2268中所述的算法,如在Karlin等,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.,90:5873-5877中所改进,并且并入NBLAST和XBLAST程序(Altschul等,1991,Nucleic Acids Res.,25:3389-3402)中。在某些实施方案中,可如Altschul等,1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402所述使用Gapped BLAST、BLAST-2、WU-BLAST-2(Altschul等,1996,Methods in Enzymology,266:460-480)、ALIGN、ALIGN-2(Genentech,South San Francisco,California)或Megalign(DNASTAR)是另外的可用于比对序列的公开可用的软件程序。在某些实施方案中,两个核苷酸序列之间的百分比同一性用GCG软件中的GAP程序测定(例如,使用NWSgapdna.CMP矩阵以及40、50、60、70或90的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重)。在某些替代实施方案中,可将结合了Needleman和Wunsch的算法(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))的GCG软件包中的GAP程序用于确定两个氨基酸序列之间的百分比同一性(例如,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵以及16、14、12、10、8、6或4的空位权重和1、2、3、4、5的长度权重)。替代地,在某些实施方案中,核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性用Myers和Miller的算法测定(CABIOS,4:11-

17 (1989))。例如,百分比同一性可使用ALIGN程序(2.0版)并使用具有残基表的PAM120、12的空位长度罚分和4的空位罚分来测定。特定比对软件采用的最大比对的适当参数可通过本领域的技术人员确定。在某些实施方案中,使用比对软件的默认参数。在某些实施方案中,将第一氨基酸序列与第二序列氨基酸的百分比同一性“X”计算为 $100 \times (Y/Z)$,其中Y为在第一和第二序列的比对(如通过目测或特定的序列比对软件进行比对)中评分为相同匹配的氨基酸残基数,而Z为第二序列中的总残基数。如果第一序列的长度长于第二序列,则第一序列比第二序列的百分比同一性将大于第二序列比第一序列的百分比同一性。

[0115] 作为非限制性实例,可在某些实施方案中使用Bestfit程序(Wisconsin序列分析软件包,Unix第8版,Genetics Computer Group,University Research Park,575 Science Drive,Madison,WI 53711)确定任何特定的多核苷酸是否与参考序列具有某一百分比序列同一性(例如,至少80%同一性、至少85%同一性、至少90%同一性,以及在一些实施方案中,至少95%、96%、97%、98%或99%同一性)。Bestfit使用Smith和Waterman,Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)的局部同源性算法,以找到两个序列之间同源性的最佳片段。当使用Bestfit或任何其它序列比对程序来确定具体的序列是否例如根据本发明与参照序列具有95%同一性时,设定参数以使得同一性百分比是对全长参照核苷酸序列计算的并且允许同源性中的缺口不超过参考序列中总核苷酸数目的5%。

[0116] 在一些实施方案中,当按照最大对应来比较和比对时,本发明的两个核酸或多肽大体上同一,意味着它们具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、并且在一些实施方案中,至少95%、96%、97%、98%、99%核苷酸或氨基酸残基同一性,如使用序列比较算法或通过目测检查来测量。在某些实施方案中,同一性存在于长度为至少约10个、约20个、约40-60个残基或其间的任何整数值的序列区域上,或超过60-80个残基的区域、至少约90-100个残基上,或序列在所比较的全长序列上大体上同一,例如像核苷酸序列的编码区。

[0117] “保守氨基酸替代”是其中一个氨基酸残基用具有类似侧链的另一氨基酸残基来替换的取代。具有类似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义,包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,将苯丙氨酸取代为酪氨酸是保守取代。在某些实施方案中,在本发明的多肽和抗体序列中的保守取代不消除含有氨基酸序列的多肽或抗体结合至抗原,即多肽或抗体所结合至的CD37。鉴别不排除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守取代的方法在本领域中是众所周知的(参见,例如Brummell等人,Biochem. 32:1180-1187 (1993);Kobayashi等人Protein Eng. 12(10): 879-884 (1999);以及Burks等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417 (1997))。

[0118] 如本公开及权利要求书中所用,除非上下文中另外清楚地指出,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述”包括复数形式。

[0119] 应当理解,当实施方案在本文中用语言“包含”来描述时,也提供依据“由...组成”和/或“基本上由...组成”来描述的其它类似实施方案。

[0120] 如在短语如“A和/或B”中所用的术语“和/或”在本文中意图包括“A和B”、“A或B”、

“A”以及“B”。同样地,如在短语如“A、B和/或C”中所用的术语“和/或”意图包括以下实施方案中的每一个:A、B及C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

II. CD37结合剂

[0121] 本发明提供特异性地结合人CD37的药剂。这些药剂在本文被称为“CD37结合剂”。在某些实施方案中,CD37结合剂是抗体、其抗原结合片段、免疫缀合物或多肽。人CD37的全长氨基酸序列在本领域是已知的并且在本文中如由SEQ ID NO:1所表示来相应提供。

[0122] 人CD37:

MSAQESCLSLIKYFLFVFNLFVGLGSLIFCFGIWILIDKTSFVSFVGLAFVPLQIWSKVLAI SGIFTMGIAL
LGCVGALKELRCLLGLYFGMLLLLFATQITLGLILISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETA A EESWDYVQFQL
RCCGWHPQDWFQVLILRNGSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHADICAVPAESHIYR
EGCAQGLQKWLHNNLISIVGICLGVGLLELGFMTLSIFLCRNLDHVYNRLARYR (SEQ ID NO:1)

[0123] 人CD37核酸序列:

atgtcagcccaggagagctgcctcagcctcaatcaagtaacttctcttctggttttcaacctcttcttcttctgctcc
tcggcagcctgatcttctgcttccgcatctggatcctcattgacaagaccagcttcgtgtcctttgtgggcttgccc
ttcgtgctctgcagatctggtccaaagtccctggccatctcaggaatcttcaccatgggcatgcccctctgggttg
tgtgggggcccctcaaggagctccgctgcctcctgggctgtat tttgggatgctgctgctcctgtttgccacacaga
tcacctgggaatcctcactcctccactcagcgggcccagctggagcgaagcttgccgggacgtcgtagagaaaaccatc
caaaagtacggcaccaacccccgaggagaccgcccggaggagagctgggactatgtgcagttccagctgcgctgctg
cggctggcactaccgcaggactggttccaagtccctcactcctgagaggtaacgggtcggaggcgcaccgcgtgcct
gctcctgctacaacttgctggcgaccaacgactccacaatcc tagataagtgatcttgcctcagctcagcaggctt
ggacacctggcgcggtccagacacagtgcagacatctgcgctgtccctgcagagagccacatctaccgcgagggtg
cgcgcagggcccctcagaagtggctgcacaacaacctatttccatagtgggcatttgccctgggctcgccctactcg
agctcgggttcatgacgctctcgatattcctgtgcagaaacctggaccacgtctacaaccggctcgctcgataccgt
(SEQ ID NO:2)

[0124] 因此,在一些实施方案中,CD37结合剂可特异性结合SEQ ID NO:1的表位或与由SEQ ID NO:2编码的多肽的表位结合。

[0125] CD37结合剂还包括具有下文提供的1B11-2抗体的序列的CD37结合剂。

muCD37-1B11-2 VH-CDR1

GYFMN (SEQ ID NO:3)

muCD37-1B11-2 VH-CDR2 (Kabat)

RINPYNGDTFYNQKFKG (SEQ ID NO:4)

muCD37-1B11-2 VH-CDR2 (AbM)

RINPYNGDTF (SEQ ID NO:34)

muCD37-1B11-2 VH-CDR3

RGIVASSRFFDV (SEQ ID NO:5)

muCD37-1B11-2 VL-CDR1

KASQGSNDVD (SEQ ID NO:6)

muCD37-1B11-2 VL-CDR2

YASNRYT (SEQ ID NO:7)

muCD37-1B11-2 VL-CDR3

CHQDYTSPT (SEQ ID NO:8)

muCD37-1B11-2重链可变区 (VH)

EVQLLQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMNWVIQSHGKGLEWIGRINPYNGDTFYNQKFKGKATLTVD
KSSTTAHMELLSLTSEDSAVYYCGSRGIVASSRFFDVWGAGTSVIVSS (SEQ ID NO:9)

muCD37-1B11-2轻链可变区 (VL)

SIVMTQTPKFLLSAGDRVITITCKASQGVSNVDWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTF
SISTVQAEDLAVYFCHQDYTSPTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:10)

muCD37-1B11-2全长重链 (HC)

EVQLLQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMNWVIQSHGKGLEWIGRINPYNGDTFYNQKFKGKATLTVD
KSSTTAHMELLSLTSEDSAVYYCGSRGIVASSRFFDVWGAGTSVIVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLV
KGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLESDLYTLSSSVTPSSRPSETVTCNVAHPASSTKVDDKIVPRDCGCKP
CICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITLTPKVTVCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELP
IMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWN
GQPAENYKNTQPI MNTNGSYFVYSKLVNQQSNWEAGNTFTCSVLHEGLNHHTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO:11)

muCD37-1B11-2全长轻链

SIVMTQTPKFLLSAGDRVITITCKASQGVSNVDWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTF
SISTVQAEDLAVYFCHQDYTSPTFGGGTKLEIKRADAAPT VSIFFPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKID
GSERQNGVLNSWTDQDSKDYSSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:12)

[0126] CD37结合剂包括包含SEQ ID NO:3-8中提供的1B11-2抗体的六个CDR序列的CD37结合剂(例如,抗体及其抗原结合片段)。

[0127] CD37结合分子可以是包含抗体1B11-2的CDR(即,SEQ ID NO:3-8)的CD37结合剂(例如,抗体及其抗原结合片段),其中每个CDR具有至多四个(即0、1、2、3或4)保守氨基酸取代。CD37结合分子可以是包含抗体1B11-2的CDR(即,SEQ ID NO:3-8)的CD37结合剂(例如,抗体及其抗原结合片段),其具有多达四个(即0、1、2、3或4)保守氨基酸取代。CD37结合分子可以是包含(i) SEQ ID NO:3、4、6和7的CDR,其中每个CDR具有至多四个(即0、1、2、3或4)保守氨基酸取代;以及(ii) SEQ ID NO:5和8的CDR的CD37结合剂(例如,抗体及其抗原结合片段)。CD37结合分子可以是包含(i) SEQ ID NO:3、4、6和7的CDR,其具有至多四个(即0、1、2、3或4)保守氨基酸取代;以及(ii) SEQ ID NO:5和8的CDR的CD37结合剂(例如,抗体及其抗原结合片段)。CD37结合分子可以是包含(i) SEQ ID NO:3、4、和6-8的CDR,其中每个CDR具有至多四个(即0、1、2、3或4)保守氨基酸取代;以及(ii) SEQ ID NO:5的CDR的CD37结合剂(例如,抗体及其抗原结合片段)。CD37结合分子可以是包含(i) SEQ ID NO:3、4、和6-8的CDR,其具有至多四个(即0、1、2、3或4)保守氨基酸取代;以及(ii) SEQ ID NO:5的CDR的CD37结合剂(例如,抗体及其抗原结合片段)。

[0128] 多肽、抗体及其抗原结合片段可包含1B11-2抗体的可变轻链、可变重链或可变轻链和可变重链两者。还提供包括以下的多肽:(a)与SEQ ID NO:9具有至少约90%序列同一性的多肽;和/或(b)与SEQ ID NO:10具有至少约90%序列同一性的多肽。在某些实施方案中,所述多肽是特异性地结合CD37的抗体和/或所述多肽。在某些实施方案中,所述多肽是

特异性地结合CD37的鼠、嵌合或人源化抗体。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:9或10具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:9或10的不同仅在于保守性氨基酸取代。

[0129] 在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:9具有至少95%的同一性的序列的可变重链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:9具有至少96%的同一性的序列的可变重链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:9具有至少97%的同一性的序列的可变重链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:9具有至少98%的同一性的序列的可变重链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:9具有至少99%的同一性的序列的可变重链结构域。在某些实施方案中,所述多肽是特异性地结合CD37的抗体和/或所述多肽。在某些实施方案中,所述多肽是特异性地结合CD37的鼠、嵌合或人源化抗体。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:9具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:9的不同仅在于保守性氨基酸取代。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:9具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:9的不同仅在于CDR外的氨基酸。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:9具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:9的不同仅在于CDR外的保守氨基酸取代。

[0130] 在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:10具有至少95%的同一性的序列的可变轻链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:10具有至少96%的同一性的序列的可变轻链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:10具有至少97%的同一性的序列的可变轻链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:10具有至少98%的同一性的序列的可变轻链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:10具有至少99%的同一性的序列的可变轻链结构域。在某些实施方案中,所述多肽是特异性地结合CD37的抗体和/或所述多肽。在某些实施方案中,所述多肽是特异性地结合CD37的鼠、嵌合或人源化抗体。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:10具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:10的不同仅在于保守性氨基酸取代。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:10具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:10的不同仅在于CDR外的氨基酸。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:10具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:10的不同仅在于CDR外的保守氨基酸取代。

[0131] 在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:9具有至少95%的同一性的序列的可变重链结构域和含有与SEQ ID NO:10具有至少95%的同一性的序列的可变轻链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:9具有至少96%的同一性的序列的可变重链结构域和含有与SEQ ID NO:10具有至少96%的同一性的序列的可变轻链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:9具有至少97%的同一性的序列的可变重链结构域和含有与SEQ ID NO:10具有至少97%的同一性的序列的可变轻链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:9具有至少98%的同一性的序列的可变重链结构域和含有与SEQ ID NO:10具有至少98%的同一性的序列的可变轻链结构域。在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有与SEQ ID NO:9具有至少99%的同一性的序列的可变重链结构域和含有与SEQ ID NO:10具有至少99%的同一性的序列的可变轻链

结构域。在某些实施方案中,所述多肽是特异性地结合CD37的抗体和/或所述多肽。在某些实施方案中,所述多肽是特异性地结合CD37的鼠、嵌合或人源化抗体。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:9和/或10具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:9和/或10的不同仅在于保守性氨基酸取代。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:9和/或10具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:9和/或10的不同仅在于CDR外的氨基酸。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:9和/或10具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:9和/或10的不同仅在于CDR外的保守氨基酸取代。

[0132] 在某些实施方案中,多肽、抗体或其抗原结合片段包含含有以SEQ ID NO:9示出的序列的可变重链结构域和含有以SEQ ID NO:10示出的序列的可变轻链结构域。

[0133] 多肽可以包含本文所述的单个轻链或重链中的一个。抗体和多肽还可以包含轻链及重链两者。抗体1B11-2的轻链及重链序列提供于以SEQ ID NO:11和12中。

[0134] 还提供包括以下各项的多肽:(a)与SEQ ID NO:11具有至少约90%序列同一性的多肽;和/或(b)与SEQ ID NO:12具有至少约90%序列同一性的多肽。在某些实施方案中,多肽包括与SEQ ID NO:11或12具有至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列同一性的多肽。因此,在某些实施方案中,多肽包括(a)与SEQ ID NO:11具有至少约95%序列同一性的多肽,和/或(b)与SEQ ID NO:12具有至少约95%序列同一性的多肽。在某些实施方案中,多肽包括(a)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的多肽;和/或(b)具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的多肽。在某些实施方案中,多肽是特异性地结合CD37的抗体和/或多肽。在某些实施方案中,多肽是特异性地结合CD37的鼠抗体、嵌合抗体或人源化抗体。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:11和/或12具有某一百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:11和/或12的不同仅在于保守氨基酸取代。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:11和/或12具有某一百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:11和/或12的不同仅在于CDR外的氨基酸。在某些实施方案中,与SEQ ID NO:11和/或12具有某一百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:11和/或12的不同仅在于CDR外的保守氨基酸替代。

[0135] 在某些实施方案中,CD37结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)与包含包含以SEQ ID NO:9示出的序列的可变重链和包含以SEQ ID NO:10示出的序列的可变轻链的抗体或其抗原结合片段结合相同的表位。在某些实施方案中,CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)竞争性抑制包含包含以SEQ ID NO:9示出的序列的可变重链和包含以SEQ ID NO:10示出的序列的可变轻链的抗体或其抗原结合片段与CD37结合。在某些实施方案中,CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)竞争性抑制包含包含以SEQ ID NO:9示出的序列的可变重链和包含以SEQ ID NO:10示出的序列的可变轻链的抗体或其抗原结合片段与CD37结合并且与包含包含以SEQ ID NO:9示出的序列的可变重链和包含以SEQ ID NO:10示出的序列的可变轻链的抗体或其抗原结合片段结合的表位重叠的表位。

[0136] 在某些实施方案中,如本文提供的,CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)结合和/或不结合下文的CD37抗原序列。

CD37抗原序列

hCD37-LEL(有下划线的CD37 AA 107-242)

TMELLISTQRAQLERSLRDVEKTIQKYGTNPEETAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLILRGNGSEAH
RVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHIYREGCAQGLQKWLHNNLSFLEQKLISE

EDLNSAVDHHHHHHH (SEQ ID NO:15)

hCD37-ECD-Fc (有下划线的hCD37 AA 107-235)

GPEFLISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI LRNGNSEAH
RVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHIYREGCAQGLQGSEPRGPTIKPCPPCKC
 PAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSAL
 PIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTN
 NGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO:
 16)

hCD37-Fc-LAGA (有下划线的hCD37 AA 107-235)

GPEFLISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI LRNGNSEAH
RVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHIYREGCAQGLQSDKTHTCPPELA
 GAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
 NYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:17)

hCD37-ECD-S2-Fc (有双下划线的hCD37 AA 107-109和 有下划线的AA 138-235)

GPEFLISAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI LRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDS
TILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHIYREGCAQGLQGSEPRGPTIKPCPPCKCP
APNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTH
REDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLP
PEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRV
EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO:18)

hCD37 (AA 107-235)

LISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI LRNGNSEAHRVPC
 SCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHIYREGCAQGLQ (SEQ ID NO:19)

hCD37 (AA 107-242)

LISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI LRNGNSEAHRVPC
 SCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESHIYREGCAQGLQKWLHNNL (SEQ ID NO:20)

hCD37 (AA 107-109和138-235)

LISAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI LRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHL
 ARSRHSADICAVPAESHIYREGCAQGLQ (SEQ ID NO:21)

[0137] 在一些实施方案中,CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)结合CD37的氨基酸
 107-242 (SEQ ID NO:20)。在一些实施方案中,CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)结
 合CD37的氨基酸107-235 (SEQ ID NO:19)。

[0138] 在一些实施方案中,CD37结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)结合在SEQ ID
 NO:15中示出的序列。在一些实施方案中,CD37结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)结合
 在SEQ ID NO:16中示出的序列。在一些实施方案中,CD37结合剂(例如,抗体或其抗原结合
 片段)结合在SEQ ID NO:17中示出的序列。

[0139] 在一些实施方案中,CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)结合CD37的氨基酸
 107-242 (SEQ ID NO:20),但不结合CD37的氨基酸138-235。在一些实施方案中,CD37结合剂

(例如抗体或其抗原结合片段)结合CD37的氨基酸107-235 (SEQ ID NO:19),但不结合CD37的氨基酸138-235。

[0140] 在一些实施方案中,CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)结合SEQ ID NO:15的多肽,但不结合SEQ ID NO:18的多肽。在一些实施方案中,CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)结合SEQ ID NO:16的多肽,但不结合SEQ ID NO:18的多肽。在一些实施方案中,CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)结合SEQ ID NO:17的多肽,但不结合SEQ ID NO:18的多肽。

[0141] 在一些实施方案中,CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)结合包含SEQ ID NO:1的110-137位中的至少一个氨基酸的表位。氨基酸110-137是CD37大细胞外结构域的第一个片段(“S1”)。

[0142] 抗体对抗原的亲合力或亲合力可以使用本领域中众所周知的任何适合的方法以实验方式测定,所述方法例如流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA)、或动力学(例如,BIACORE™分析)。可以容易地采用直接结合测定法以及竞争性结合测定形式。(参见,例如Berzofsky,等人,“Antibody-Antigen Interactions,”Fundamental Immunology,Paul,W.E.编,Raven Press:New York,N.Y.(1984);Kuby,Janis Immunology,W.H.Freeman and Company:New York,N.Y.(1992);以及本文所述的方法。所测量的具体抗体抗原相互作用的亲合力如果在不同条件(例如,盐浓度、pH、温度)下测量的话可以变化。因此,亲合力及其它抗原结合参数(例如,KD或Kd、K_{on}、K_{off})的测量是用抗体和抗原的标准化溶液、及如本领域中已知的标准化缓冲液和如本文所述的缓冲液来进行。

[0143] 一方面,结合测定法可以于在表面上表达CD37抗原的细胞上使用流式细胞术来进行。举例来说,将CD37阳性细胞(如300-19细胞)在100μL FACS缓冲液(补充有2%正常山羊血清的RPMI-1640培养基)中每份样本使用 1×10^5 个细胞与浓度变化的抗CD37抗体来孵育。

[0144] 然后,可以将细胞沉淀,洗涤并且与100μL的FITC缀合的山羊抗小鼠或山羊抗人IgG抗体(如可从例如杰克逊实验室(Jackson Laboratory)获得,6μg/mL在FACS缓冲液中)孵育1小时。然后将细胞再次沉淀,用FACS缓冲液洗涤并且再悬浮于含有1%甲醛的200μL PBS中。样本可以例如使用具有HTS多孔采样器的FACS Calibur流式细胞仪获取并且使用CellQuest Pro(所有都来自BD Biosciences, San Diego, US)来分析。对于每个样本,可以输出针对FL1的平均荧光强度(MFI)并且将其在半对数图中针对抗体浓度来绘制以生成结合曲线。将S形剂量应答曲线拟合结合曲线并且EC50值使用程序如具有默认参数的GraphPad Prism v4(GraphPad软件, San Diego, CA)来计算。EC50值可以用作每个抗体的表观解离常数“K_d”或“K_b”的度量。

[0145] 单克隆抗体可以使用杂交瘤方法,如由Kohler和Milstein(1975) Nature 256:495所述的那些方法来制备。使用杂交瘤方法,将小鼠、仓鼠或其它适当的宿主动物进行免疫以引发淋巴细胞产生将特异性地结合至免疫抗原的抗体。淋巴细胞也可以进行体外免疫。免疫之后,将淋巴细胞分离并使用例如聚乙二醇与适合的骨髓瘤细胞系融合以形成杂交瘤细胞,然后这些细胞可以从未融合的淋巴细胞及骨髓瘤细胞中被选出。如通过例如免疫沉淀、免疫印迹或通过体外结合测定(例如,放射免疫测定(RIA);酶联免疫吸附测定(ELISA))所测定产生特异性地针对所选抗原的单克隆抗体的杂交瘤可以然后使用标准方法(Goding, Monoclonal Antibodies:Principles and Practice, Academic Press, 1986)体外培养繁

殖或者作为腹水肿瘤在动物体内繁殖。单克隆抗体可以随后从培养基中纯化或从腹水中纯化。

[0146] 替代地,单克隆抗体还可以使用如美国专利4,816,567中所述的重组DNA方法来制备。将编码单克隆抗体的多核苷酸如通过RT-PCR,使用特异性地扩增编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸引物从成熟的B细胞或杂交瘤细胞中分离,并且其序列是使用常规程序来测定。然后将所分离的编码重链和轻链的多核苷酸克隆至适合的表达载体中,所述表达载体被转染至不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中,并且单克隆抗体是由宿主细胞生成。而且,所需物种的重组单克隆抗体或其片段可以如所述(McCafferty等人,1990,Nature,348:552-554;Clackson等人,1991,Nature,352:624-628;以及Marks等人,1991,J.Mol.Biol.,222:581-597)从表达所需物种的CDR的噬菌体展示文库中分离。

[0147] 编码单克隆抗体的多核苷酸可以进一步使用DNA重组技术以许多不同的方式被修饰以生成替代的抗体。在一些实施方案中,例如小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定结构域可以:1)取代例如人抗体的那些区域以生成嵌合抗体,或2)取代非免疫球蛋白多肽以生成融合抗体。在一些实施方案中,恒定区是截短的或被除去以生成单克隆抗体的所需抗体片段。可变区的定点或高密度诱变可用于优化单克隆抗体的特异性、亲和力等。

[0148] 在一些实施方案中,针对人CD37的单克隆抗体是人源化抗体。在某些实施方案中,人源化抗体是表面重构的抗体。

[0149] 人抗体可以使用本领域中已知的各种技术直接制备。可以生成体外免疫或从产生针对靶标抗原的抗体的免疫个体分离的永生化的B淋巴细胞(参见,例如Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985);Boemer等人,1991,J.Immunol.,147(1):86-95;以及美国专利5,750,373)。而且,人抗体可以选自噬菌体文库,其中噬菌体文库表达人抗体,如例如Vaughan等人,1996,Nat.Biotech.,14:309-314,Sheets等人,1998,Proc.Nat'l.Acad.Sci.,95:6157-6162,Hoogenboom和Winter,1991,J.Mol.Biol.,227:381,以及Marks等人,1991,J.Mol.Biol.,222:581中所述。用于生成和使用抗体噬菌体文库的技术还描述于美国专利号5,969,108;6,172,197;5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915;6,593,081;6,300,064;6,653,068;6,706,484;及7,264,963;以及Rothe等人,2007,J.Mol.Bio.,doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018(每个文献以引用的方式全部并入)中。亲和力成熟策略及链改组策略(Marks等人,1992,Bio/Technology 10:779-783,全部以引用的方式并入)在本领域中是已知的并且可以被用于生成高亲和力的人抗体。

[0150] 人源化抗体还可以在含有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制备,所述转基因小鼠能够在免疫后在不产生内源免疫球蛋白的情况下产生全套人抗体。这种方法描述于美国专利5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;以及5,661,016中。

[0151] 在某些实施方案中,提供一种抗体片段以例如增加肿瘤穿透。已知用于产生抗体片段的各种技术。传统上,这些片段经由蛋白水解消化完整的抗体而获得(例如Morimoto等人,1993,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117;Brennan等人,1985,Science,229:81)。在某些实施方案中,抗体片段是重组产生的。Fab、Fv以及scFv抗体片段可以全部在大肠杆菌或其它宿主细胞中表达并且由其分泌,由此使得能产生大量

的这些片段。这类抗体片段还可以从以上所论述的抗体噬菌体文库中分离。抗体片段还可以是线性抗体,如例如美国专利5,641,870中所述,并且可以是单特异性或双特异性的。用于产生抗体片段的其它技术对于本领域技术人员来说显而易见。

[0152] 根据本发明,技术可适用于产生对CD37有特异性的单链抗体(参见美国专利号4,946,778)。另外,方法可适用于构建Fab表达文库(Huse,等人,Science 246:1275-1281 (1989))以允许快速并有效鉴别对CD37具有所需特异性的单克隆Fab片段、或其衍生物、片段、类似物或同系物。抗体片段可以通过包括但不限于以下的本领域中的技术产生:(a)通过胃蛋白酶消化抗体分子而产生的F(ab')₂片段;(b)通过还原F(ab')₂片段的二硫桥而生成的Fab片段;(c)通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子而生成的Fab片段;以及(d)Fv片段。

[0153] 出于本发明的目的,应当理解,经修饰的抗体可以包含任何类型的可变区,所述可变区提供抗体与人CD37多肽的缔合。就此而言,可变区可包括或源自于任何类型的哺乳动物。因而,经修饰的抗体的可变区可以是例如人、鼠、非人灵长类动物(例如,食蟹猴、猕猴等)或狼来源的。在一些实施方案中,经修饰的免疫球蛋白的可变区及恒定区两者都是人的。在其它实施方案中,相容的抗体(通常源自非人来源)的可变区可以被工程改造或特别定制以改善分子的结合特性。在这方面,适用于本发明中的可变区可以是人源化的或另外通过包含输入的氨基酸序列而被改变。在一些实施方案中,经修饰的抗体的可变区可以是非人的(例如,鼠),并且经修饰的抗体的恒定区可以是人的。

[0154] 在某些实施方案中,在重链和轻链中的可变结构域是通过至少部分替换一个或多个CDR并且必要时通过部分构架区替换和序列变化来改变。虽然CDR可以源自与构架区所来源的抗体相同类别或甚至亚类的抗体,但可以设想CDR将源自不同类别的抗体并且可能源自不同物种的抗体。不必总是用来自供体可变区的完整CDR替换所有CDR以将一个可变结构域的抗原结合能力转移到另一个。相反,在某些情况下,仅需要将维持抗原结合位点的活性所必需的那些残基转移。

[0155] 本领域技术人员应当理解,不管可变区如何变化,本发明的经修饰的抗体将包括如下抗体(例如,全长抗体或其免疫活性片段),其中一个或多个恒定区结构域的至少一个部分已经缺失或另外改变以便提供所需的生物化学特征。在一些实施方案中,经修饰的抗体的恒定区将包括人恒定区。符合本发明的恒定区的修饰可以包括插入、缺失或取代在一个或多个结构域中的一个或多个氨基酸。也就是说,本文所公开的修饰的抗体可包含对三个重链恒定结构域(CH1、CH2或CH3)和/或轻链恒定结构域(CL)中的一个或多个的改变或修饰。在一些实施方案中,涵盖修饰的恒定区,其中一个或多个结构域部分地或全部缺失。在一些实施方案中,经修饰的抗体将包含结构域缺失的构建体或变体,其中整个CH2结构域已经被除去(Δ CH2构建体)。在一些实施方案中,去除的恒定区结构域将被短的氨基酸间隔区(例如,10个残基)替换以提供一般由缺失的恒定区所赋予的某些分子柔性。

[0156] 在某些实施方案中,恒定区的修饰可用于消除二硫键或寡糖部分,二硫键或寡糖部分由于增强抗原特异性或抗体灵活性而使得能增强定位。可以使用本领域技术人员公知的生物化学或分子工程技术容易地对恒定区进行修饰。

[0157] 应注意,在某些实施方案中,经修饰的抗体可以被工程改造以将CH3结构域直接融合至相应的经修饰的抗体的铰链区。在其它构建体中,在铰链区与修饰的CH2和/或CH3结构

域之间提供肽间隔区可能合乎需要。例如,可以表达相容性构建体,其中CH2结构域已经缺失并且剩余的CH3结构域(修饰或未修饰的)与具有5-20个氨基酸的间隔区的铰链区相连。可添加这类间隔区以例如确保恒定结构域的调控元件保持自由和能接近或者铰链区保持柔性。

[0158] 本发明进一步包括与本文所阐述的嵌合抗体、人源化抗体以及人抗体或其抗体片段基本上同源的变体和等同物。这些可以含有例如保守取代突变,即由类似氨基酸取代一个或多个氨基酸。例如,保守取代是指一个氨基酸被相同一般类别内的另一氨基酸取代,如例如一个酸性氨基酸被另一酸性氨基酸取代、一个碱性氨基酸被另一碱性氨基酸取代或一个中性氨基酸被另一中性氨基酸取代。保守氨基酸取代是本领域中众所周知的。

[0159] 本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽,包括针对人CD37的抗体或其片段。在本领域中公认的是本发明的一些氨基酸序列可以在不显著影响蛋白的结构或功能的情况下变化。因此,本发明进一步包括多肽的变化形式,其显示实质活性或包括针对CD37蛋白的抗体或其片段的区域。这类突变体包括缺失、插入、倒位、重复以及类型取代。

[0160] 本文所述的分离多肽可以通过本领域中已知的任何适合的方法产生。这类方法的范围是从直接蛋白合成方法到构建编码分离多肽序列的DNA序列以及在适合的转化宿主中表达那些序列。在一些实施方案中,DNA序列通过分离或合成编码目标野生型蛋白的DNA序列使用重组技术构建。任选地,所述序列可以通过位点特异性诱变被诱变以提供其功能性类似物。参见,例如Zoeller等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 81:5662-5066(1984)以及美国专利号4,588,585。

[0161] 在一些实施方案中,编码目标多肽的DNA序列将使用寡核苷酸合成仪通过化学合成来构建。这类寡核苷酸可以基于所需多肽的氨基酸序列并且选择那些在其中将产生目标重组多肽的宿主细胞中有利的密码子来设计。标准方法可以应用于合成编码目标分离多肽的分离的多核苷酸序列。例如,完整的氨基酸序列可用于构建反向翻译的基因。此外,可以合成含有编码具体的分离多肽的核苷酸序列的DNA低聚物。例如,可以合成编码所需多肽的部分的若干小寡核苷酸并且然后连接。单个寡核苷酸通常含有用于互补装配的5'或3'突出。

[0162] 一旦装配(通过合成、定点诱变或另一方法),编码具体的目标分离多肽的多核苷酸序列就将被插入表达载体中并且可操作地连接至适于在所需宿主中表达蛋白的表达控制序列。适当的装配可以通过核苷酸测序、限制性图谱以及在适合的宿主中表达生物活性多肽来确认。如本领域中众所周知的,为了在宿主中获得高表达水平的转染基因,所述基因必须可操作地连接至在所选择的表达宿主中起作用的转录及翻译表达控制序列。

[0163] 在某些实施方案中,重组表达载体用于扩增和表达编码针对人CD37的抗体或其片段的DNA。重组表达载体是可复制的DNA构建体,其具有编码抗CD37抗体的多肽链或其片段的合成的或源自cDNA的DNA片段,所述DNA片段与源自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的适合的转录或翻译调控元件可操作地连接。转录单位一般包含具有以下装配物:(1)具有基因表达调控作用的遗传元件,例如转录启动子或增强子,(2)被转录成mRNA并且翻译成蛋白的结构或编码序列,以及(3)适当的转录及翻译起始和终止序列,如下文所详细描述。这类调控元件可以包括操纵子序列来控制转录。另外可以并入通常由复制起点赋予的在宿主中复制的能力以及促进识别转化体的选择基因。DNA区当其在功能上彼此相关时被可操作

地连接。举例来说,信号肽(分泌性前导序列)的DNA可操作地连接至多肽的DNA,如果所述信号肽被表达为参与所述多肽的分泌的前体;启动子可操作地连接至编码序列,如果所述启动子控制序列的转录;或核糖体结合位点可操作地连接至编码序列,如果所述核糖体结合位点被定位成允许翻译。旨在用于酵母表达系统中的结构元件包括能够使翻译的蛋白通过宿主细胞进行细胞外分泌的前导序列。或者,当重组蛋白在无前导或转运序列的情况下表达时,其可以包括N端甲硫氨酸残基。这个残基可以任选地随后从表达的重组蛋白中裂解以提供最终产物。

[0164] 表达控制序列和表达载体的选择将取决于宿主的选择。可以采用广泛多种表达宿主/载体组合。用于真核宿主的有用的表达载体包括例如包含来自SV40、牛乳头状瘤病毒、腺病毒以及巨细胞病毒的表达控制序列的载体。用于细菌宿主的有用的表达载体包括已知的细菌质粒,如来自大肠杆菌的质粒,包括pCR 1、pBR322、pMB9及其衍生物、更宽宿主范围的质粒,如M13及丝状单链DNA噬菌体。

[0165] 用于表达CD37结合多肽或抗体(或用作抗原的CD37蛋白)的适合的宿主细胞包括在适当启动子控制下的原核生物、酵母、昆虫或高级真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如大肠杆菌或杆菌。高级真核细胞包括如下所述的确立的哺乳动物起源的细胞系。还可以采用无细胞翻译系统。供细菌、真菌、酵母以及哺乳动物细胞宿主使用的适当克隆和表达载体是由Pouwels等人(*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985)描述,其相关公开内容特此以引用的方式并入。关于蛋白产生(包括抗体产生)方法的附加信息可见于例如美国专利公布号2008/0187954、美国专利号6,413,746和6,660,501以及国际专利公布号WO 04009823中,每个专利特此以引用的方式全部并入本文。

[0166] 还有利地采用各种哺乳动物或昆虫细胞培养系统来表达重组蛋白。可以进行哺乳动物细胞中重组蛋白的表达,因为这类蛋白一般被正确地折叠、适当地修饰并且完全起作用。适合的哺乳动物宿主细胞系的实例包括由Gluzman所述(*Cell* 23:175, 1981)的猴肾细胞的COS-7系以及能够表达合适载体的其它细胞系,包括例如L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、HeLa以及BHK细胞系。哺乳动物表达载体可以包含非转录元件如复制起点、连接至待表达的基因的适合的启动子及增强子、及其它5'或3'侧翼非转录序列、及5'或3'非翻译序列,如必需的核糖体结合位点、多腺苷酸化位点、剪接供体及受体位点、以及转录终止序列。用于在昆虫细胞中产生异源蛋白的杆状病毒系统是由Luckow和Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988) 综述。

[0167] 由转化的宿主产生的蛋白可以根据任何适合的方法纯化。这类标准方法包括色谱法(例如,离子交换、亲和力以及定大小柱色谱法(sizing column chromatography))、离心、差别溶解性或通过任何其它用于蛋白纯化的标准技术。亲和力标签如六组氨酸、麦芽糖结合结构域、流感包衣序列以及谷胱甘肽-S-转移酶可以连接于蛋白上以允许通过适当的亲和柱来容易地纯化。分离的蛋白还可以使用如蛋白水解、核磁共振以及x-射线晶体学的技术在物理上进行表征。

[0168] 例如,来自将重组蛋白分泌到培养基中的系统的上清液可以使用可商购获得的蛋白浓缩过滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元来首先浓缩。浓缩步骤之后,可将浓缩物施加到适合的纯化基质。或者,可以采用阴离子交换树脂,例如具有悬垂的二乙基

氨基乙基 (DEAE) 基团的基质或底物。基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、右旋糖酐、纤维素或通常用于蛋白纯化中的其它类型。或者,可以采用阳离子交换步骤。适合的阳离子交换剂包括各种不溶性基质,其包含磺丙基或羧甲基基团。最后,可以采用一个或多个采用疏水性RP-HPLC介质(例如,具有悬垂甲基或其它脂族基团的硅胶)的反相高效液相色谱法(RP-HPLC)步骤来进一步纯化CD37结合剂。还可以采用呈各种组合形式的一些或所有前述纯化步骤来提供同源重组蛋白。

[0169] 在细菌培养物中产生的重组蛋白可以例如通过从细胞沉淀中初始提取,然后进行一个或多个浓缩、盐析、水相离子交换或尺寸排阻色谱法步骤来分离。可以采用高效液相色谱法(HPLC)用于最终纯化步骤。在重组蛋白的表达中使用的微生物细胞可以通过包括冻融循环、超声处理、机械破碎或使用细胞溶解剂的任何便利方法来破碎。

[0170] 用于纯化抗体及其它蛋白的本领域中已知的方法还包括例如在美国专利公布号2008/0312425、2008/0177048及2009/0187005中描述的那些,每个专利特此以引用的方式全部并入本文。

III. 多核苷酸

[0171] 在某些实施方案中,本发明包括多核苷酸,所述多核苷酸包括编码特异性地结合人CD37受体的多肽或这类多肽的片段的多核苷酸。例如,本发明提供一种多核苷酸,所述多核苷酸包含编码人CD37的抗体或编码这类抗体的片段的核酸序列。本发明的多核苷酸可以呈RNA形式或DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA以及合成DNA;并且可以是双链或单链的,并且如果是单链,那么可以是编码链或非编码(反义)链。在一些实施方案中,多核苷酸是缺乏一个或多个内源内含子的cDNA或DNA。

[0172] 在某些实施方案中,这里提供的多核苷酸是非天然存在的多核苷酸。在某些实施方案中,这里提供的多核苷酸是重组产生的。在某些实施方案中,多核苷酸是分离的。在某些实施方案中,多核苷酸是大体上纯的。

[0173] 本发明提供一种多核苷酸,其编码包含选自由SEQ ID NO:3-11组成的群组中的序列的多肽。

[0174] 在某些实施方案中,多核苷酸包含编码SEQ ID NO:3-5的多肽的序列。在某些实施方案中,多核苷酸包含编码SEQ ID NO:6-8的多肽的序列。在某些实施方案中,多核苷酸包含编码SEQ ID NO:3-5和SEQ ID NO:6-8的多肽的序列。在某些实施方案中,载体包含编码SEQ ID NO:3-8的多肽的多核苷酸。在某些实施方案中,组合物包含编码SEQ ID NO:3-5的多肽的多核苷酸和编码SEQ ID NO:6-8的多肽的多核苷酸。在某些实施方案中,组合物包含含有编码SEQ ID NO:3-5的多肽的多核苷酸的载体和含有编码SEQ ID NO:6-8的多肽的多核苷酸的载体。

[0175] 在某些实施方案中,组合物包含编码SEQ ID NO:9的多肽的多核苷酸和编码SEQ ID NO:10的多肽的多核苷酸。在某些实施方案中,组合物包含含有编码SEQ ID NO:9的多肽的多核苷酸的载体和含有编码SEQ ID NO:10的多肽的多核苷酸的载体。在某些实施方案中,载体包含编码SEQ ID NO:9的多肽的多核苷酸和编码SEQ ID NO:10的多肽的多核苷酸。

[0176] 本公开还提供了包含选自SEQ ID NO:13和14中提供的序列中的序列的多核苷酸。

muCD37-1B11-2 VH核酸序列

gaggttcaactgctgcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagatatcctgcaaggctt

ctggttactcatttactggctactttatgaactgggtgatacagagccatggaaaggccttgagtggattggacgt
attaatccttacaatgggtgataccttctacaaccagaagttcaagggaaggccacattgactgtagacaaatcctc
taccacagcccacatggagctcctgagcctgacatctgaggactctgccgtctattattgtggatcccgggggatag
tggcttctctaggttcttcgatgtctggggcgcaggacctcggtcatcgtctcctcagccaaaacgacac (SEQ
ID NO:13)

muCD37-1B11-2 VL核酸序列

agtatttgatgaccagactcccaaattctgcttgatcagcaggagacagggttaccataacctgcaagg
ccagtcagggtgtgagtaatgatgtagattgggtaccaacagaagccagggcagtcctctaaactgctgatactat
gcatccaatcgctacactggagtcctgatcgttcaactggcagtgatgggacggatttcaacttcagcatcag
cactgtgcaggctgaagacctggcagtttatttctgtcaccaggattatacctctccgacgttcggtggaggcacca
agctggaaatcaaacgggctgat (SEQ ID NO:14)

[0177] 还提供了与SEQ ID NO:13和14中的任何一个具有至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的序列同一性的多核苷酸。

[0178] 还提供了包含与SEQ ID NO:13具有至少约90%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约90%的同一性的多核苷酸的组合物。还提供了包含与SEQ ID NO:13具有至少约95%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约95%的同一性的多核苷酸的组合物。还提供了包含与SEQ ID NO:13具有至少约96%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约96%的同一性的多核苷酸的组合物。还提供了包含与SEQ ID NO:13具有至少约97%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约97%的同一性的多核苷酸的组合物。还提供了包含与SEQ ID NO:13具有至少约98%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约98%的同一性的多核苷酸的组合物。还提供了包含与SEQ ID NO:13具有至少约99%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约99%的同一性的多核苷酸的组合物。

[0179] 还提供了包含一个或多个含有与SEQ ID NO:13具有至少约90%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约90%的同一性的多核苷酸的载体的组合物。还提供了包含一个或多个含有与SEQ ID NO:13具有至少约95%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约95%的同一性的多核苷酸的载体的组合物。还提供了包含一个或多个含有与SEQ ID NO:13具有至少约96%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约96%的同一性的多核苷酸的载体的组合物。还提供了包含一个或多个含有与SEQ ID NO:13具有至少约97%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约97%的同一性的多核苷酸的载体的组合物。还提供了包含一个或多个含有与SEQ ID NO:13具有至少约98%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约98%的同一性的多核苷酸的载体的组合物。还提供了包含一个或多个含有与SEQ ID NO:13具有至少约99%的同一性的多核苷酸和与SEQ ID NO:14具有至少约99%的同一性的多核苷酸的载体的组合物。

[0180] 还提供了包含一个或多个含有在SEQ ID NO:13中所示出的多核苷酸序列和在SEQ ID NO:14中所示出的多核苷酸序列的载体的组合物。

[0181] 在某些实施方案中,多核苷酸包含融合于与多核苷酸同一阅读框中的成熟多肽的编码序列,所述多核苷酸有助于例如多肽从宿主细胞的表达和分泌(例如,作为分泌序列起作用的前导序列以用于控制多肽从细胞的转运)。具有前导序列的多肽是前蛋白并且可以

具有由宿主细胞所裂解的前导序列以形成成熟形式的多肽。多核苷酸还可以编码原蛋白，其是成熟蛋白加上另外的5'氨基酸残基。具有原序列的成熟蛋白是原蛋白并且是无活性形式的蛋白。一旦原序列被裂解，活性的成熟蛋白就保留。

[0182] 在某些实施方案中，多核苷酸包含融合于与标志物序列同一阅读框中的成熟多肽的编码序列，所述标志物序列允许例如用于纯化编码的多肽。例如，标志物序列在细菌宿主的情况下可以是由pQE-9载体供应的六组氨酸标签以提供对融合至标志物的成熟多肽的纯化，或当使用哺乳动物宿主（例如COS-7细胞）时，标志物序列可以是源自流感血球凝集素蛋白的血球凝集素（HA）标签。

[0183] 本发明进一步涉及编码例如片段、类似物及衍生物的上文所述多核苷酸的变体。

[0184] 多核苷酸变体可以含有在编码区、非编码区或这两者中的改变。在一些实施方案中，多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加或缺失但不改变经编码的多肽的特性或活性的变化。在一些实施方案中，核苷酸变体是通过因遗传密码的简并性所致的沉默取代而产生。多核苷酸变体可以由于多种原因而产生，例如以便优化特定宿主的密码子表达（通过细菌宿主如大肠杆菌将人mRNA中的密码子改变成那些优选的）。

[0185] 还提供包含本文所述的多核苷酸的载体及细胞。

IV. 生物样本

[0186] 生物样本常常用固定剂来固定。通常使用醛固定剂，如福尔马林（甲醛）和戊二醛。使用其他固定技术如醇浸渍（Battifora和Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34: 1095）来固定的组织样本也是合适的。所使用的样本还可包埋在石蜡中。在一个实施方案中，所述样本既用福尔马林固定，又用石蜡包埋（FFPE）。在另一个实施方案中，FFPE块在选择一个或多个部分用于分析之前用苏木精和伊红染色，以便为FFPE核心样本选择特定区域。从这些微粒标本制备组织块的方法已在以前的多种预后因子的IHC研究中使用、和/或对于本领域的技术人员是熟知的（参见，例如，Abbondanzo等, Am J Clin Pathol. 1909 May; 93 (5) : 698-702; Allred等, Arch Surg. 1990 Jan; 125 (1) : 107-13）。

[0187] 简言之，可将任何完整的器官或组织切成相当小的片并在各种固定剂（例如，福尔马林、醇等）中孵育不同的时间段，直到所述组织被“固定”。样本实际上可为从身体中手术移除的任何完整组织。可将样本切成适合装在组织病理学实验室中常规使用的设备上的适度小的片。切割片的尺寸范围通常从几毫米到几厘米。生物样本还可以是流体浸出物、血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液和或脾制备物。

V. CD37表达与治疗功效的相关性

[0188] 美国公开申请号2011/0256153提供了抗CD37免疫缀合物，其全部内容通过引用并入本文。在某些实施方案中，抗CD37免疫缀合物是IMGN529。IMGN529含有huCD37-3抗体（包含由SEQ ID NO: 22-27代表的CDR、SEQ ID NO: 28的VH和SEQ ID NO: 29的VL）、SMCC接头和DM1美登木素生物碱。下文提供了huCD37-3抗体的序列。

huCD37-3 VH-CDR1: TSGVS (SEQ ID NO: 22)

huCD37-3 VH-CDR2: VIWGDGSTN (SEQ ID NO: 23)

huCD37-3 VH-CDR3: GGYS LAH (SEQ ID NO: 24)

huCD37-3 VL-CDR1: RASENIRS NLA (SEQ ID NO: 25)

huCD37-3 VL-CDR2: VATNLAD (SEQ ID NO: 26)

huCD37-3 VL-CDR3:QH YWGTTWT (SEQ ID NO:27)

huCD37-3 VH v.1.0:

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHPSLKSRLSIKKDH
SKSQVFLKLNLSLAADTATYYCAKGGYSLAHWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:28)

huCD37-3 VH v.1.1:

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSSLKSRLSIKKDH
SKSQVFLKLNLSLAADTATYYCAKGGYSLAHWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:32)

huCD37-3 VL:

DIQMTQSPSSLSVSVGERVTITCRASENIRSNLAWYQQKPKGKSPKLLVNVATNLADGVPSRFSGSGSGTDYSL
KINSLQPEDFGTYTCQHYWGTTWTFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:29)

huCD37-3重链 (HC) v.1.0:

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHPSLKSRLSIKKDH
SKSQVFLKLNLSLAADTATYYCAKGGYSLAHWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:30)

huCD37-3重链 (HC) v.1.1:

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSSLKSRLSIKKDH
SKSQVFLKLNLSLAADTATYYCAKGGYSLAHWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:33)

huCD37-3轻链 (LC) :

DIQMTQSPSSLSVSVGERVTITCRASENIRSNLAWYQQKPKGKSPKLLVNVATNLADGVPSRFSGSGSGTDYSL
KINSLQPEDFGTYTCQHYWGTTWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
31)

[0189] 在某些实施方案中,免疫缀合物可以含有从ATCC保藏号PTA-10664的杂交瘤产生的CD37抗体或其抗原结合片段,所述杂交瘤于2010年2月18日保藏于位于10801 University Boulevard,Manassas, Virginia 20110的美国典型菌种保藏中心(ATCC)。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含由PTA-10664的杂交瘤产生的抗体的VH-CDRs和VL-CDRS。

[0190] IMG529目前处于治疗白血病和淋巴瘤的临床研发中。在美国申请号14/710,354 (公开号2015/0343077)和Stathis等人的“Preliminary Findings from a phase I, multi-center, open-label study of the anti-CD37 antibody-drug conjugate (ADC), IMG529, in adult patients with relapsed or refractory non-Hodgkin Lymphoma (NHL),” Abstract Number 8526, ASCO Annual Meeting (2014)中提供了施用IMG529的方

法,每一者均通过引用并入本文。

[0191] 在某些实施方案中,本发明提供一种用于鉴定由于在受试者中升高的CD37表达水平而可能对CD37靶向性疗法有利地反应的受试者的方法,具体地使用本文提供的可例如在IHC中检测CD37表达水平的动态范围的抗体及其抗原结合片段。

[0192] 使用异种移植模型对患者样本和与体内功效的相关性进行的评价证明了表达分析用于选择更可能对治疗有反应的受试者的能力。IHC提供肿瘤细胞上的CD37表达的分數:0(无表达)至3(或3+)(非常高水平的表达)。CD37表达得分为1、2或3(或2或3)的样本在CD37免疫缀合物的临床相关剂量下对CD37靶向性抗癌疗法具有增加的反应可能性(参见例如,WO 2013/149171,其以引用的方式整体并入本文)。因此,鉴定具有升高的CD37分数的个体将帮助鉴定可能对临床相关剂量有反应的那些个体。此外,CD37的更均匀水平的表达提供与治疗益处的更好相关性。因此,均质染色均匀度或增加的染色与异质染色均匀度的组合可表明增加的CD37表达。例如,大于2异质的分数可用作用CD37治疗剂治疗的患者选择标准。另外,患者选择标准可以基于样品中被发现以反映染色强度(例如1、2或3)和均质性(例如,异质性或同质的(见表3))的特异性水平表达膜CD37的细胞的百分比。例如,可以将样品表征为具有例如至少25%的细胞针对CD37染色的阳性为至少2或更大,或者至少75%的细胞针对CD37染色的阳性为2或更大。在另一个实例中,可以将样品表征为具有例如至少25%的细胞针对CD37染色的阳性为至少3或更大,或者至少75%的细胞针对CD37染色的阳性为3。在另一个实例中,CD37表达被赋予H分数。另外,CD37的(通过免疫组织化学的)免疫学检测可以使用H分数进行评分。H分数使用本文提供的计算将染色强度分数与均匀性分数相结合。如下面更详细描述, H分数可以在1至300的范围内。

[0193] CD37表达分析还可以用于鉴定其中降低水平的CD37靶向性抗癌疗法(“低剂量疗法”)可有效引起抗肿瘤反应的患者。如本领域已了解的,化合物通常以实现所需治疗反应的最小剂量来施用。这对于引起临床的并且常常是不期望有的副作用的治疗剂是特别重要的。识别具有升高的CD37表达水平的那些受试者的能力允许CD37靶向性治疗剂的剂量的潜在的最小化,从而减少可能的副作用,同时维持治疗功效。

VI. 免疫检测方法

[0194] 在某些实施方案中,可将CD37结合剂(例如抗体及其抗原结合片段)用于免疫检测方法中以鉴定具有增加的CD37表达或过表达的样品和/或受试者。免疫检测方法包括例如免疫组织化学(IHC)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白印迹(Western blot)、流式细胞术和荧光激活细胞分选(FACS)等。

[0195] 通常,免疫检测方法包括获得怀疑包含CD37的样品,并使样品与第一CD37结合剂(例如抗CD37抗体或其抗原结合片段)在有效的条件下接触以使得能形成免疫复合物。

[0196] 在抗原检测方面,所分析的生物样本可以是其中希望检测CD37的任何样本,如流体浸出物、血液、血浆、血清、脊髓液、淋巴液、组织切片或试样、均化的组织提取物、活检抽吸物、细胞、含CD37组合物的分离和/或纯化形式、或任何生物流体。在一些实施方案中,使用血液、血浆或淋巴样本或提取物。

[0197] 使所选择的生物样本与所述CD37结合剂(例如,抗CD37抗体或其抗原结合片断)在有效条件下接触足够允许免疫复合物(初次免疫复合物)形成的一段时间一般是这样一件事:将所述CD37结合剂(例如,抗CD37抗体或其抗原结合片断)添加到样本中,并且孵育所述

混合物足够长的一段时间以便所述CD37结合剂(例如,抗CD37抗体或其抗原结合片断)与所存在的任何CD37形成免疫复合物(即与所存在的任何CD37结合)。这段时间之后,通常会洗涤样本,如组织切片或流体浸出物、ELISA板、或蛋白印迹,以除去任何非特异性结合的CD37结合剂(例如,抗CD37抗体或其抗原结合片断),从而仅仅允许检测特异性结合在初次免疫复合物内的那些CD37结合剂(例如,抗CD37抗体或其抗原结合片断)。

[0198] 一般而言,免疫复合物形成的检测在本领域是众所周知的并且可通过应用多种方法来实现。在所述检测中采用的CD37结合剂(例如,抗CD37抗体或其抗原结合片断)本身可以连接可检测的标记,其中然后应简单地检测这个标记,从而使得能测定组合物中的初次免疫复合物的量。或者,结合在初次免疫复合物内的第一CD37结合剂(例如,抗CD37抗体或其抗原结合片断)可通过具有对所述第一CD37结合剂(例如,抗CD37抗体或其抗原结合片断)的结合亲和力的第二结合剂(例如,抗体或其抗原结合片断)来检测。在这些情况下,所述第二结合剂可以连接可检测的标记。当所述第二结合剂自身是抗体或其抗原结合片段时,它可以被称为“第二”抗体或其抗原结合片段。使所述初次免疫复合物与标记的第二结合剂在有效条件下相接触且持续足够允许第二免疫复合物形成的一段时间。然后通常洗涤所述第二免疫复合物以除去任何非特异性结合的标记的第二结合剂,然后检测在第二免疫复合物中的其余标记。

[0199] 另外的方法包括通过两步方法检测初级免疫复合物。如本文所述,使用具有对所述第一CD37结合剂(例如,抗CD37抗体或其抗原结合片断)的结合亲和力的第二结合剂(例如,抗体或其抗原结合片断)来形成第二免疫复合物。洗涤之后,使所述第二免疫复合物与具有对第二结合剂(例如,抗体或其抗原结合片断)的结合亲和力的第三结合剂再次在有效条件下接触足够允许免疫复合物(第三免疫复合物)形成的一段时间。使第三结合剂连接可检测的标记,从而允许检测因此形成的第三免疫复合物。如果需要,这个系统可提供信号放大。

[0200] 在另一个实施方案中,生物素化的CD37结合剂(例如,抗CD37抗体或其抗原结合片断)用于检测CD37,并且然后将第二结合剂(例如,抗体或其抗原结合片断)用于检测生物素。在所述方法中,待测试的样本首先在包含生物素化的CD37结合剂(例如,抗CD37抗体或其抗原结合片断)的溶液中孵育。如果存在CD37,则该结合剂中的一部分结合所述CD37以形成生物素化的CD37结合剂-CD37复合物。然后通过用抗生素(或抗生物素蛋白)、生物素化DNA和/或互补的生物素化DNA的连续溶液中孵育来扩增复合物,其中每个步骤将另外的生物素位点添加到抗体/抗原复合物中。重复扩增步骤直到实现合适水平的扩增,在此时,在包含结合生物素的第二结合剂(例如,抗体或其抗原结合片断)的溶液中孵育所述样本。该第二结合剂例如用酶来标记,所述酶可以通过使用发色团底物的组织酶学来用于检测抗体/抗原复合物的存在。在适合扩增的情况下,可产生肉眼可见的缀合物。

[0201] 在一个实施方案中,免疫组织化学(IHC)用于免疫检测。使用IHC,检测样本中的CD37可通过用探针(例如抗CD37抗体或其抗原结合片断)靶向样本来实现。所述探针可直接或间接地连接至可检测的标记或可通过直接或间接地连接至可检测的标记的另一种探针来检测。

[0202] 在一些实施方案中,IHC可区分不同的蛋白表达水平,例如,校准的IHC。在一些实施方案中,所述IHC可区分具有低CD37表达、中等CD37表达或高CD37表达的样本的染色强

度。

[0203] 在一个实施方案中,针对强度和均匀度二者(染色细胞百分比-仅细胞膜)来对CD37的免疫学检测(通过免疫组织化学)评分。CD37表达强度的比较标尺的相关性为0-阴性、0-1-很弱、1-弱、1-2-弱至中等、2-中等、2-3-中等至强、3-强-非常强。定量地,分数0代表未观察到染色或者在不到10%的肿瘤细胞中观察到膜染色。分数1或1+代表在超过10%的肿瘤细胞中检测到模糊/几乎不可察觉的膜染色。细胞仅仅在其膜的部分中被染色。分数1和1+可交换使用。对于分数2,在超过10%的肿瘤细胞中观察到弱至中等完全膜染色。最后,分数3代表在超过10%的肿瘤细胞中观察到中等至强的完全膜染色。具有0分或1分的CD37表达的那些样本可被表征为不具有升高的CD37表达,而具有2分或3分的那些样本可被表征为过度表达或具有升高的CD37。在另一个实施方案中,使用本文提供的抗体、其抗原结合片段或多肽,具有0分CD37表达的那些样本可被表征为不具有升高的CD37表达,具有1分的那些样本可被表征为具有增加的CD37表达,并且具有2或3分的那些样本可被表征为过度表达或具有升高的CD37。

[0204] 在某些实施方案中,从受试者获得的样品中的至少为2的分数鉴定受试者为用抗-CD37治疗方案(例如,IMG529)治疗的候选者。在某些实施方案中,从受试者获得的样品中至少为3的分数鉴定受试者为用抗-CD37治疗方案(例如,IMG529)治疗的候选者。

[0205] 过度表达CD37的样本还可通过对应于每孔表达的CD37分子的拷贝数或每孔结合的抗体(ABC)的数目的免疫组织化学分数进行评定,并且可通过生物化学方法测定。

[0206] CD37均匀度(细胞膜染色百分比)的比较标尺如下:阴性=0%;病灶性=<25%;异质性(异质)=25%-75%以及均质性(均质)=>75%。

[0207] 在某些实施方案中,从受试者获得的样品中至少为2异质的分数鉴定受试者为用抗-CD37治疗方案(例如,IMG529)治疗的候选者。在某些实施方案中,从受试者获得的样品中至少为2均质的分数鉴定受试者为用抗-CD37治疗方案(例如,IMG529)治疗的候选者。在某些实施方案中,从受试者获得的样品中至少为3异质的分数鉴定受试者为用抗-CD37治疗方案(例如,IMG529)治疗的候选者。在某些实施方案中,从受试者获得的样品中至少为3均质的分数鉴定受试者为用抗-CD37治疗方案(例如,IMG529)治疗的候选者。

[0208] 在一个实施方案中,CD37(通过免疫组织化学)的免疫检测是使用H分数计分的。H分数将染色强度分数(例如,0至3的分数,其中0代表无染色,并且3代表强染色)与针对膜染色为阳性的细胞的百分比(即均匀度)组合。可如下计算H分数:

H分数 = [0*(强度为0的细胞染色的百分比)] + [1*(强度为1的细胞染色的百分比)] + [2*(强度为2的细胞染色的百分比)] + [3*(强度为3的细胞染色的百分比)]。因此,H分数可在0(无细胞膜染色)至300(强度为3的所有细胞膜染色)的范围内。

[0209] 举例而言,患有癌症的受试者的H分数可以如下:

$$\text{H分数} = (75\% \text{强度}0) + (0\% \text{强度}1) + (0\% \text{强度}2) + (25\% \text{强度}3) = 75; \text{或}$$

$$\text{H分数} = (0\% \text{强度}0) + (75\% \text{强度}1) + (0\% \text{强度}2) + (25\% \text{强度}3) = 150.$$

在另一个实例中,患有癌症的受试者的H分数可以如下:

$$\text{H分数} = (75\% \text{强度}0) + (0\% \text{强度}1) + (25\% \text{强度}2) + (0\% \text{强度}3) = 50; \text{或} \text{H分数} = (0\% \text{强度}0) + (75\% \text{强度}1) + (25\% \text{强度}2) + (0\% \text{强度}3) = 125.$$

[0210] 在一个实施方案中,CD37(通过免疫组织化学)的免疫检测是使用跨样本的阳性和

强度百分比计分的。在此实施方案中,用抗CD37治疗方案治疗的选择基于样本中被发现在反映染色强度(例如,1、2或3)和均匀度(例如,异质或均质(参见表11))两者的指定水平下表达膜CD37的细胞的百分比。例如,对于在3下具有至少25%(即,25%-75%或>75%)的CD37阳性细胞染色的样本可被表征为“3异质”和“3均质”,或一起为“在3下至少25%阳性”。

[0211] IHC可手动进行或使用自动系统(例如,使用自动染色器)进行。可对来自血液、血浆、血清或淋巴液等的细胞、细胞团块、组织、制剂进行IHC。在一些实施方案中,样本是固定的样本。在一些实施方案中,样本是石蜡包埋的样本。在一些实施方案中,样本是福尔马林固定的且石蜡包埋的样本。

[0212] 在一个实施方案中,酶联免疫吸附测定(ELISA)用于免疫学检测。ELISA的基本方法学在本技术领域是公知的。参见例如Lequin R, "Enzyme immunoassay (EIA) /enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)," *Clin.Chem.* 51:2415-2418 (2005), 其通过引用整体并入本文。在一示例性的ELISA中,将CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)固定于显示蛋白亲和力的选定表面,例如聚苯乙烯微量滴定板中的孔。然后,将含有或怀疑含有CD37的测试样品(例如临床样品)添加到孔中。在结合并洗涤以除去非特异性结合的免疫复合物后,可以检测结合的CD37。通常通过加入特异于CD37的第二抗体或其抗原结合片段来实现检测,其连接至可检测标记。这种类型的ELISA是“夹心ELISA”。检测还可以通过以下方式来实现:加入第二抗体或其抗原结合片段,随后加入对第二抗体或其抗原结合片段具有结合亲和力的第三抗体或其抗原结合片段,其中第三抗体或其抗原结合片段连接至可检测标记。通过校准至标准曲线,颜色形成可以以分光光度法监测并与CD37的浓度相关联。在另一示例性ELISA中,测试样品被固定在孔表面上,然后与CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)接触。在结合并洗涤以除去非特异性结合的免疫复合物后,检测结合的CD37。当最初的CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)与可检测标记连接时,可以直接检测免疫复合物。此外,可以使用对第一结合具有结合亲和力的第二结合剂检测免疫复合物,其中第二结合剂连接至可检测标记。其中测试样品被固定的另一种ELISA涉及在检测中使用竞争。在该ELISA中,将标记的CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)加入到孔中,使其与CD37结合,并通过其标记进行检测。然后通过将样品与标记的CD37结合剂(例如,抗体或其抗原结合片段)在对经涂布的孔孵育之前或期间混合来测定样品中的CD37的量。样品中CD37的存在起到减少可用于结合孔的CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)的量并因此降低最终的信号的作用。

[0213] 在一实施方案中,蛋白印迹用于免疫学检测。对于蛋白印迹,从细胞样品中提取蛋白并进行电泳(例如SDS-PAGE)并印迹到膜(例如硝化纤维素或PVDF)上。然后使膜与CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)接触,所述CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)可以直接标记或进一步经受第二标记的结合剂作用。检测可以是例如通过放射自显影、比色反应或化学发光。该方法使得通过在电泳期间指示丙烯酰胺凝胶中的迁移距离的在膜上的相对位置能定量底物量并确定其特性(identity)。

[0214] 在一个实施方案中,流式细胞术用于免疫检测。因此,例如,可使用流式细胞术评估每细胞结合的抗体(ABC)的数目。每细胞结合的抗CD37抗体的高数目可指示高CD37表达水平和易感于用抗CD37抗体或其免疫缀合物治疗的高可能性。

[0215] 在一个实施方案中,FACS用于免疫学检测。FACS分析能够检测细胞膜上的CD37。简

而言之,将CD37结合剂(例如抗体或其抗原结合片段)连接至荧光团,并借助于细胞分选机器进行检测,所述细胞分选机器在细胞通过光束时读取从每个细胞发射的光的波长。该方法可以同时使用两种或更多种抗体。

VII. 检测试剂

[0216] 本文提供的CD37结合剂可以连接至少一种试剂以形成检测缀合物。另外,本文提供的CD37结合剂可以通过与至少一种试剂连接以形成检测缀合物的检测试剂进行检测。检测分子和部分在本领域中是公知的。为了增加抗体分子作为诊断剂的功效,常规的是连接或共价结合或复合至少一个所需的分子或部分。这种分子或部分可为但不限于至少一个报道分子。报道分子被定义为可使用测定来检测的任何部分。已经与抗体偶联的报道分子的非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、发光分子、光亲和分子、有色粒子和/或配体,如生物素。

[0217] 涵盖在本发明中的抗体或抗原结合片段检测缀合物包括体外使用的那些,其中所述抗体或片段连接至第二结合配体和/或与显色底物接触时将产生有色产物的酶(酶标签)。本文提供的CD37抗体及其抗原结合片段特别适用于缀合物方法,因为例如它们能够检测CD37的动态范围。合适的酶的实例包括脲酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶和/或葡萄糖氧化酶。在一些实施方案中,第二结合配体是生物素和/或抗生物素蛋白以及抗生物素蛋白链菌素化合物。

[0218] 在酶的情况下,显色和测量的颜色量将是存在的CD37的量的直接测量结果。如果HRP是标记,则可以使用底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),例如在450nm吸光度下检测颜色。或者,其它用于HRP的发色底物如3,3'-二氨基联苯胺(DAB)或2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)。底物如TMB、DAB和ABTS可以用于例如使用ELISA的免疫检测方法中。

[0219] 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)是对于如HRP的酶而言产生在醇和其他有机溶剂中高度不可溶的棕色最终产物的底物。DAB的氧化还引起聚合,从而引起与四氧化钨反应的能力并因此增加其染色强度和电子密度。在用于使聚合的DAB的光密度增强的若干金属和方法中,氯化金与硫化银组合似乎是最成功的。

[0220] 3-氨基-9-乙基咪唑(AEC)是如HRP之类的酶的底物,并且在氧化后形成为醇可溶性的玫瑰红色最终产物。因此,用AEC处理的试样一定不能浸入醇或醇溶液中(例如,哈里斯氏(Harris)苏木精)。相反,应该使用水性复染剂和封固剂。

[0221] 4-氯-1-萘酚(CN)是如HRP之类的酶的底物并且作为蓝色最终产物而沉淀。因为CN在醇和其他有机溶剂中是可溶的,所以试样一定不能脱水、不能暴露在醇复染剂中、也不能用含有有机溶剂的封固剂以载玻片覆盖。与DAB不同,CN倾向于从沉淀位点扩散。

[0222] 对-亚苯基二胺二盐酸盐/邻苯二酚(Hanker-Yates试剂)是如HRP之类的酶的底物,其得到在醇和其他有机溶剂中不可溶的蓝-黑色反应产物。与聚合的DAB一样,这种反应产物可以被钨酸着色(osmicated)。在免疫过氧化物酶技术中使用Hanker-Yates试剂已经实现了不同结果。

[0223] 可以使用化学发光底物,如ECL。诸如ECL之类的底物可以用于例如使用蛋白印迹的免疫检测方法中。

[0224] 预期用作结合剂(例如抗体)缀合物的示例性荧光标记包括例如Alexa 350、Alexa

430、Alexa 488、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、Dylight 488、异硫氰酸荧光素 (FITC)、绿色荧光蛋白 (GFP)、HEX、6-JOE、俄勒冈绿 (Oregon Green) 488、俄勒冈绿500、俄勒冈绿514、太平洋蓝 (Pacific Blue)、藻红蛋白、REG、罗丹明绿、罗丹明红、四甲基罗丹明 (TMR) 肾造影剂 (Renographin)、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明、德克萨斯红 (Texas Red) 以及这些标记的衍生物 (即, 用异硫氰酸酯修饰的卤化类似物或用于缀合的其他接头等)。示例性放射性标记是氚。

[0225] 含有叠氮基团的分子还可通过由低强度紫外线所产生的反应性氮宾中间体而用于与蛋白形成共价键 (Potter&Haley, 1983)。具体来说, 嘌呤核苷酸的2-和8-叠氮基类似物已用作定点光探针来识别在细胞粗提物中的核苷酸结合蛋白 (Owens&Haley, 1987; Atherton等, 1985)。所述2-和8-叠氮基核苷酸还已用于绘制纯化蛋白的核苷酸结合结构域的图谱 (Khatoun等, 1989; King等, 1989; 以及Dholakia等, 1989) 并且可用作抗体结合剂。

[0226] 在本发明的其他实施方案中, 用核素 (如氚) 放射性标记CD37结合剂 (例如抗体及其抗原结合片段) 或第二结合剂。在另外的实施方案中, 采用纳米金粒子 (如约0.5nm至40nm的尺寸) 和/或量子点 (Hayward, Calif.)。

[0227] 在一些实施方案中, 使用Optiview DAB IHC检测试剂 (Ventanna目录#760-700) 检测CD37。

[0228] 在一些实施方案中, 使用BenchMark Ultra染色系统检测CD37。

[0229] 在一些实施方案中, 使用Optiview DAB IHC检测试剂 (Ventanna目录#760-700) 并使用BenchMark Ultra染色系统检测CD37。

XII. 组合物和试剂盒

[0230] 本发明还提供用于在如本文所公开的方法的实践中使用的组合物和试剂盒。这类试剂盒可包括容器, 每个容器具有在所述方法中使用的一种或多种不同试剂 (通常呈浓缩形式), 所述试剂包括例如一种或多种CD37结合剂 (例如抗体或其抗原结合片段)、缓冲液、和/或用于检测CD37以支持本发明的实践的试剂和仪器。该试剂盒可以进一步包含与CD37结合剂结合的第二结合剂和任选的与第二结合剂结合的第三结合剂。CD37结合剂、第二结合剂或第三结合剂可以与检测试剂结合, 或者试剂盒可以包含用于将检测试剂偶联至CD37结合剂、第二结合剂或第三结合剂的试剂。通常还将包括描述本发明的配体检测方法中的试剂盒组件的或关于其使用的一组说明的标签或指示物, 其中所述说明可与包装说明书和/或试剂盒或其组件的包装关联。

[0231] 在某些实施方案中, 试剂盒包含结合CD37的第一抗体或抗原结合片段、结合第一抗体或抗原结合片段的第二抗体或抗原结合片段、结合第二抗体或抗原结合片段的第三抗体或抗原结合片段, 其中第三抗体或抗原结合片段与检测试剂 (例如酶标签) 连接、任选的用于检测试剂的底物 (例如TMB、DAB或ABTS) 以及任选的CD37蛋白或含有CD37的细胞样品 (例如, 石蜡包埋的样品)。试剂盒可进一步包含用于治疗癌症的治疗剂, 例如抗CD37免疫缀合物。

[0232] 在一个实施方案中, CD37结合剂是1B11-2或其抗原结合片段。在一个实施方案中, CD37结合剂是与1B11-2结合相同CD37表位的抗体或抗原结合片段。在一个实施方案中, CD37结合剂是包含1B11-2的六个CDR的抗体或抗原结合片段。在一个实施方案中, CD37结合

剂是包含1B11-2的VH和VL的抗体或抗原结合片段。

[0233] 在一个实施方案中,包括以下浓度的CD37特异性抗体或其抗原结合片段:约0.1至约20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约0.1至约15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约0.1至约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约0.5至约20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约0.5至约15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约0.5至约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约1至约20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约1至约15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约1至约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约2至约20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约2至约15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或约2至约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在另一个实施方案中,包括以下浓度的CD37特异性抗体或其抗原结合片段:约1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在另一个实施方案中,包括浓度为约2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CD37特异性抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方案中,包括浓度为约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CD37特异性抗体或其抗原结合片段。

[0234] 在另一个实施方案中,包括呈浓缩溶液的抗体或其抗原结合片段,具有稀释说明以实现约1至约20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约1至约15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约1至约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约2至约20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约2至约15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或约2至约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最终浓度。在另一个实施方案中,包括呈浓缩溶液的抗体或其抗原结合片段,具有稀释说明以实现约1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最终浓度。在另一个实施方案中,包括呈浓缩溶液的抗体或其抗原结合片段,具有稀释说明以实现约2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最终浓度。在另一个实施方案中,包括呈浓缩溶液的抗体或其抗原结合片段,具有稀释说明以实现约2.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最终浓度。在另一个实施方案中,包括呈浓缩溶液的抗体或其抗原结合片段,具有稀释说明以实现约4.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最终浓度。在另一个实施方案中,包括呈浓缩溶液的抗体或其抗原结合片段,具有稀释说明以实现约8.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最终浓度。在另一个实施方案中,包括呈浓缩溶液的抗体或其抗原结合片段,具有稀释说明以实现约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最终浓度。所述试剂盒还可包括用于CD37表达的检测和评分的说明书。试剂盒还可包括对照或参考样本。对照或参考样本的非限制性实例包括来源于正常(正常对照)样本或肿瘤(阳性对照)样本的细胞团块或组织培养细胞系。示例性细胞系包括用表达CD37的表达载体稳定或瞬时转染的细胞系。另外的实例包括在实施例中描述的细胞团块和组织样本。阳性细胞系包括Daudi细胞(高表达)、Ramos细胞(中等表达)和Namalwa细胞(中等至低表达)。由于生发中心和套区呈现高表达,而滤泡间区显示没有表达,因而人扁桃体既作为阳性对照组也作为阴性对照组织,而且滤泡间区没有表现。在一些实施方案中,对照或参考样品是石蜡包埋的样品。

[0235] 在一些实施方案中,试剂盒是包括以下基本要素的包装组合:(a)包含针对人CD37的单克隆抗体的捕获试剂;以及(b)检测试剂,其也可包含CD37单克隆抗体,但也可包含结合CD37的可检测的(标记的或未标记的)抗体。这些基本要素在本文定义。

[0236] 在一个实施方案中,所述试剂盒还包括用于捕获试剂的固体支持物,其可被作为单独的要素提供或于其上已固定捕获试剂。因此,试剂盒中的捕获抗体可被固定在固体支持物上,或它们可被固定在与试剂盒一起包括或与试剂盒分开提供的这种支持物上。

[0237] 在一个实施方案中,所述捕获试剂涂覆在微量滴定板上。所述检测试剂可以是直接检测的经标记的抗体或通过针对在不同物种中产生的未标记抗体的经标记的抗体进行检测的未标记的抗体。在标记是酶的情况下,所述试剂盒将通常包括酶所需的底物和辅助因子,并且在标记是荧光团的情况下,所述试剂盒将通常包括提供可检测的发色团的染料前体。当检测试剂是未标记时,所述试剂盒还可包括用于可检测的抗体的检测方式,如针对未标记的抗体的标记的抗体,例如呈荧光检测形式。在标记是酶的情况下,所述试剂盒将通

常包括酶所需的底物和辅助因子,在标记是荧光团的情况下,所述试剂盒将通常包括提供可检测的发色团的染料前体,并且在标记是生物素的情况下,所述试剂盒将通常包括抗生物素蛋白,如抗生物素蛋白、抗生物素链菌素或缀合至HRP或具有MUG的 β -半乳糖苷酶的抗生物素链菌素。

[0238] 在一个实施方案中,捕获试剂是CD37抗体1B11-2,或包含抗体1B11-2的序列的抗体。在一个实施方案中,检测试剂是CD37抗体1B11-2,或包含抗体1B11-2的序列的抗体。在另一个实施方案中,检测试剂CD37抗体1B11-2或包含抗体1B11-2的序列的抗体被生物素化。

[0239] 在另一实施方案中,所述试剂盒进一步包含选自由以下组成的组的检测试剂:酶、荧光团、放射性标记以及发光团。在另一实施方案中,所述检测试剂选自由以下组成的组:生物素、地高辛、荧光素、氘以及罗丹明。

[0240] 所述试剂盒通常还可含有用于进行测定的说明书,和/或作为抗原标准品的CD37蛋白或其片段(例如,CD37细胞外结构域或CD37细胞外结构域和GPI键联结构域的全部或一部分)以及其他添加剂,如稳定剂、洗涤和孵育缓冲剂等。在一个实施方案中,所述CD37抗原标准品是在本文的实施例中描述的CD37-蛋白。所述试剂盒还可包括用于CD37表达的检测和评分的说明书。

[0241] 所述试剂盒的组件可以以预定比率提供,其中各种试剂的相对量合适地改变以提供使测定的灵敏度基本上最大化的试剂的溶液的浓度。具体地说,所述试剂可提供为干燥粉末,通常是冻干的,包括赋形剂,其在溶解时将提供用于与待测试的样本组合的具有适当浓度的试剂溶液。

[0242] 还提供包含本文所述的抗体或抗原结合片段的组合物。在一个实施方案中,组合物包含本文所述的抗CD37抗体或抗原结合片段以及缓冲剂,例如可用于检测测定如ELISA、IHC或FACS中的缓冲剂。此类缓冲剂是本领域的普通技术人员已知的且包括稀释剂。举例而言,IHC缓冲剂可包含例如酪蛋白血清或白蛋白(如牛血清、山羊血清或BSA)、Tween或Triton、PBS和/或叠氮化钠或其任何组合。IHC缓冲剂也在本文提供并且是本领域的普通技术人员已知的。ELISA缓冲剂也在本文中提供并且是本领域的普通技术人员已知的。ELISA缓冲剂可包含例如血清或白蛋白(如牛血清、山羊血清或BSA)、脱脂奶粉、酪蛋白和/或明胶或其任何组合。举例而言,在本文(例如在工作实施例中)提供某些FACS缓冲剂。FACS缓冲剂还可包含例如血清或白蛋白(如牛血清、山羊血清或BSA)和/或叠氮化钠。FACS缓冲剂还可包含PBS、EDTA和/或DNA酶或其任何组合。

[0243] 本公开的实施方案可进一步通过参考以下非限制性实施例来限定,所述实施例详细描述了本公开的某些抗体的制备和用于使用本公开的抗体的方法。对于本领域技术人员将清楚的是:可在不背离本公开的范围的情况下实践对材料与方法的许多修改。

IX. 实施例

[0244] 应理解,本文所描述的实施例和实施方案仅是出于说明的目的,并且根据其进行的各种修改或变化将建议给本领域技术人员并且包括在本申请的精神和范围内。

实施例1:产生CD37杂交瘤

[0245] 适用于免疫组织化学(IHC)染色(本发明的抗体)的产生抗人CD37单克隆抗体的杂交瘤选自约4,800个杂交瘤。所述杂交瘤通过用在大肠杆菌中产生的重组CD37抗原hCD37-

LEL对野生型Balb/c小鼠进行免疫来产生。该抗原包含CD37的氨基酸107至242,在3'末端添加6xHis标签以便于纯化(SEQ ID NO:15)。用CD37重组蛋白进行的免疫通过皮下注射在完全弗氏佐剂(CFA)或用于加强的不完全弗氏佐剂(Sigma)或Magic小鼠佐剂(Creative Diagnostics)中乳化的蛋白来进行。通常,将小鼠在接受最终加强之前免疫五次(每次间隔两周),所述最终加强是在融合之前三天通过腹膜内注射免疫原进行的。

[0246] 使用来源于免疫的野生型Balb/c小鼠的脾细胞和鼠骨髓瘤P3X63Ag8.653细胞(P3细胞)进行了总计5次独立的融合。使用ECM200电融合机器(BTX Harvard Apparatus)根据标准方案进行细胞融合。每次融合产生超过1,000个杂交瘤。

[0247] 筛选由这些杂交瘤产生的抗体,并使用不同重组形式的CD37抗原通过ELISA进行确认。hCD37-LEL包含人CD37的氨基酸107至242,其中在3'末端添加6xHis标签以促进纯化(SEQ ID NO:15),并在大肠杆菌中生产。hCD37-Fc-LAGA包含人CD37的氨基酸107至235,其中在3'末端添加人IgG1 Fc-结构域以促进纯化(SEQ ID NO:17),并在HEK-293T细胞中产生。hCD37-ECD-Fc包含人CD37的氨基酸107至235,其中在3'末端添加鼠IgG2a Fc-结构域以促进纯化(SEQ ID NO:16),并在HEK-293T细胞中产生。

[0248] 对于天然条件,将重组蛋白直接稀释到50mM碳酸氢钠包被缓冲液(Sigma-Aldrich)中。对于变性条件,将重组蛋白在1%SDS和50mM DTT中于65°C孵育30分钟,随后在室温下用100mM碘乙酰胺孵育30分钟,然后稀释到50mM碳酸氢钠包被缓冲液中。每种重组蛋白通过在4°C孵育过夜以约25-100ng/孔的量被固定在微量滴定板上。

[0249] 将平板用补充有0.05%Tween-20的PBS洗涤一次,并用补充有1%牛血清白蛋白(BSA)的PBS阻断。用补充有0.05%Tween-20的PBS洗涤平板三次,并将杂交瘤上清液加到平板上。将平板在室温下孵育1小时,如上清洗3次,并在室温下用HRP标记的山羊抗鼠二抗(Jackson ImmunoResearch,按1:5,000稀释)孵育1小时。如上洗涤平板三次,通过加入HRP-底物TMB(Bio-FX)检测结合的HRP-缀合的抗体。将平板孵育约10分钟,然后用终止液(Bio-FX)停止显色。在多板阅读器中测量每个平板在450nm处的吸光度。来自克隆1B11的杂交瘤上清液产生了天然和变性条件下的强阳性ELISA信号(参见图1A)并被选择用于亚克隆。从克隆1B11获得两个亚克隆:1B11-2和1B11-20。来自两个亚克隆的杂交瘤上清液对天然和变性条件均产生强阳性ELISA信号(参见图1B),选择克隆1B11-2用于进一步分析。

实施例2:通过ELISA表征抗CD37抗体

[0250] 使用标准蛋白-A色谱纯化来自1B11-2的抗体。使用由Leica Biosystems销售的抗CD37抗体(产品编号NCL-CD37)进行比较。使用作为抗原的重组CD37蛋白通过ELISA检查抗CD37抗体的结合。使用如上所述的天然或变性条件,将每种重组蛋白以约25-100ng/孔在碳酸氢钠包被缓冲液(Sigma-Aldrich)中的微量滴定板上固定化。将平板用补充有0.05%Tween-20的PBS洗涤一次,并用补充有1%牛血清白蛋白(BSA)的PBS阻断。用补充有0.05%Tween-20的PBS洗涤平板三次,并将纯化的抗体加到平板上。将平板在室温下孵育1小时,如上清洗3次,并在室温下用HRP标记的山羊抗鼠二抗(Jackson ImmunoResearch,按1:5,000稀释)孵育1小时。如上洗涤平板三次,通过加入HRP-底物TMB(Bio-FX)检测结合的HRP-缀合的抗体。将平板孵育约10分钟,然后用终止液(Bio-FX)停止显色。在多板阅读器中测量每个平板在450nm处的吸光度。图2显示了针对天然hCD37-Fc-LAGA和hCD37-LEL的结合的代表性结果。与NCL-CD37相比,抗体1B11-2与两种天然CD37蛋白的亲合力均大大提高。对于与变性

的hCD37-LEL蛋白结合的结果如图3所示。与NCL-CD37相比,抗体1B11-2与变性的hCD37-LEL蛋白结合的亲和力提高。

实施例3. 抗原表位表征

[0251] 如上所述,在天然条件下用重组CD37蛋白hCD37-ECD-S2-Fc作为抗原通过ELISA进一步检测抗CD37抗体的结合。(S2是指CD37的大胞外结构域的第二片段,其含有氨基酸138至176)。代表性的结果显示在图4中。hCD37-ECD-S2-Fc包含人CD37的氨基酸107-109和138-235,在3'末端添加鼠IgG2a Fc-结构域以促进纯化(SEQ ID NO:18),并且在HEK-293T细胞中产生。抗体1B11-2不与hCD37-ECD-S2-Fc结合,而NCL-CD37保留与该CD37蛋白片段的结合。用蛋白印迹分析可以看到类似的结果。

实施例4. 抗CD37抗体的免疫组织化学评估

FFPE CD37 IHC

[0252] 分析来自克隆1B11-2的纯化的抗体,并通过IHC与Leica(徕卡)的NCL-CD37小鼠单克隆抗体进行比较。使用Leica Bond RX自动染色器和表1中列出的试剂和条件进行分析。

表1. IHC试剂和测定条件

步骤	行为/试剂(供应商)	时间
烘烤	温度: 60°C	30 分钟
脱蜡	Bond 脱蜡溶液(Leica) 100%试剂级乙醇(Arantik)	固定
抗原修复	Bond 表位修复 1 (基于柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0))	20 分钟
内源性过氧化物酶阻断	过氧化物(Leica)	5 分钟
测试品	通过在 Leica 抗体稀释剂中稀释制备的不同浓度的	15 分钟
	ImmunoGen, Inc.生产的抗体	
检测	Post Primary Regent (Leica)	8 分钟
	聚合物(Leica)	8 分钟
	混合的 DAB (Leica)	10 分钟
复染色	苏木精(Leica)	5 分钟

[0253] 将含有福尔马林固定石蜡包埋的(FFPE)细胞、正常组织、弥漫性大B细胞淋巴瘤患者肿瘤活组织、滤泡淋巴瘤患者肿瘤活组织和慢性淋巴细胞性白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤患者肿瘤活组织的载玻片在60°C下烘烤且使用Bond脱蜡溶液和100%乙醇进行脱蜡。使用Bond表位修复2(基于柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0))进行热诱导的表位修复持续20分钟且用过氧化物阻断内源性过氧化物酶持续5分钟。将载玻片与不同浓度的ImmunoGen, Inc.生产的1B11-2抗体、Leica/Novocastra NCL-CD37抗体(克隆CT1)抗体或Leica/NovocastramuIgG1对照抗体一起孵育15分钟。通过用Leica Bond Refine检测系统孵育来检测结合的抗体。在施加抗体之后,将载玻片与Post Primary Reagent(兔抗小鼠IgG)一起孵育8分钟,与聚合物(山羊抗兔聚合物)一起孵育8分钟并且与DAB(3,3-二氨基联苯胺四盐酸盐)一起孵育10分钟。这样产生褐色颜色信号。将载玻片用苏木精复染色5分钟。

[0254] 如以下所概述,FFPE正常脾脏和扁桃体组织样本来源于从Mercy Health Systems

和Ardais Corporationas获得的人组织块。FFPE细胞样本来源于由DSMZ (德国微生物和细胞培养物保藏中心) 提供的Daudi和Ramos细胞系, 并且Namalwa细胞系由美国典型菌种保藏中心(American Tissue Culture Collection) 提供。含有样本切片的载玻片使用设定在5 μ m的切片机从FFPE块制备并且固定在带正电荷的载玻片上。在染色之前, 使这些载玻片空气干燥过夜。人正常组织阵列购自Pantomics, 而非霍奇金淋巴瘤组织微阵列购自TriStar Technology Group LLC。

表2. FFPE测试样本

人组织类型	商业来源
正常脾脏(2)	Mercy Health Systems
正常扁桃体(3)	Mercy Health Systems(2) 和 Ardais Corporation (1)
正常组织微阵列	Pantomics
非霍奇金淋巴瘤组织微阵列	TriStar Technology Group LLC

[0255] 相对于对照IgG染色(非特异性), 对CD37染色强度和分布模式进行评分, 并将1B11-2染色与用Leica的NCL-CD37小鼠单克隆抗体观察到的染色相比较。将强度在0至3的标尺上评分, 其中0=无染色, 1=弱染色, 2=中等染色, 以及3=强染色。将染色的均匀度评分为阴性(无细胞展示阳性染色)、局灶性(<25%的细胞染色)、异质(25%-75%的细胞染色)以及均质(>75%的细胞染色)。在下文中描述了染色强度和评分标尺。由委员会认证的病理学家对所有染色进行评价。

表3. 染色强度和均匀度

强度(膜染色的量)		均匀度(阳性细胞的百分比)	
0	阴性	0	阴性
1	弱	局灶性	<25%
2	中等	异质(hetero)	25-75%
3	强	均质(homo)	>75%

纯化的1B11-2抗体针对FFPE CD37 IHC的验证

[0256] 将在Leica抗体稀释液(含有0.35%ProClin™ 950的Tris缓冲盐水、表面活性剂和蛋白稳定剂)中稀释为8.4 μ g/mL、4.2 μ g/mL和2.1 μ g/mL的来自克隆1B11-2的纯化的抗体用于染色CD37阳性对照样品(人正常扁桃体、Daudi细胞、Ramos细胞和Namalwa细胞)。评估该抗体的通过可接受的膜染色所测得的CD37特异性和在CD37阳性样品中特异性。还将该克隆与使用相同CD37阳性人组织和细胞在Leica抗体稀释液中稀释至4.2 μ g/mL的NCL-CD37小鼠mAb(克隆CT1)进行比较。Leica的NCL-CD37抗体在每种CD37阳性细胞团块中产生可接受的膜染色, 并且在扁桃体的生发中心和套区(均为CD37阳性)中产生可接受的膜染色以及一些低水平的核背景, 并且在扁桃体的滤泡间区(CD37为阴性)没有染色。1B11-2在CD37阳性样品中显示出可接受的膜染色, 并具有良好的特异性, 以及具有完全缺乏核背景染色的附加优点(参见图5, 1B11-2与Leica的NCL-CD37小鼠mAb比较的图像)。1B11-2产生与用Leica的NCL-CD37小鼠单克隆抗体观察到的模式相似的模式膜染色; 然而, 这种膜染色比

Leica的NCL-CD37抗体产生的膜染色更具特异性并且被更清晰地限定。值得注意的是,1B11-2在扁桃体的滤泡间区(CD37表达阴性)中不产生染色,从而表明特异性增强。对于1B11-2,通过实验确定合适的4.2 μ g/mL的染色浓度。

[0257] 在Leica抗体稀释剂中以4.2 μ g/mL稀释的1B11-2也用于染色人正常组织阵列(购自Pantomics)和人扁桃体和脾组织以评估特异性。再次将1B11-2与在Leica抗体稀释剂中4.2 μ g/mL稀释的Leica的NCL-CD37小鼠单克隆抗体在相同的正常扁桃体和脾组织以及人正常组织阵列上进行比较。在大多数正常组织(不包括扁桃体和脾脏)中,Leica的NCL-CD37小鼠单克隆抗体仅在散在的淋巴细胞中呈现染色,而其余组织则为阴性。在小肠潘氏细胞和胰腺胰岛细胞中观察到一些细胞质背景红斑(见图6)。Leica的NCL-CD37抗体确实在人正常扁桃体的生发中心和套区以及人类正常脾组织的边缘区域产生了可接受的膜染色,但具有一些低水平的核背景。在使用Leica的NCL-CD37抗体的情况下,在扁桃体的滤泡间区或脾脏的红髓中不存在染色。1B11-2在人正常扁桃体的生发中心和套区以及人正常脾组织的边缘区显示出可接受的膜染色,并且在其余的正常组织中仅有散在的淋巴细胞染色,完全没有背景染色(参见图6)。在扁桃体的滤泡间区或脾脏的红髓中也没有染色。这些结果表明1B11-2在染色灵敏度、特异性和降低的背景方面是有利的,所有这些对于高质量性能和IHC测定的分析都是至关重要的。

实施例5. 使用人肿瘤样品的1B11-2 CD37抗体的IHC评估

[0258] 使用1B11-2抗体通过IHC评估代表弥漫性大B细胞淋巴瘤(n=52)、滤泡淋巴瘤(n=20)和慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤(n=8)的人肿瘤样品(全部包括在从TriStar Technology Group LLC购买的非霍奇金淋巴瘤组织微阵列中)的CD37表达。下表4总结了CD37染色的强度和评分分布。图7显示了用1B11-2抗体将弥漫性大B细胞淋巴瘤和滤泡淋巴瘤组织染色的实例。这些结果证明1B11-2作为更具特异性和敏感性的抗体用于IHC测定以评估非霍奇金淋巴瘤患者组织中的CD37表达的优点。

表4:分数分布(%阳性):

肿瘤类型:	弥漫性大B细胞淋巴瘤 n=52	滤泡间淋巴瘤 n=20	慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤 n=8
阳性(任何强度):	96%	95%	100%
\geq 强度水平 2, 其中至少 25 % 肿瘤细胞被染色的:	58%	35%	50%
\geq 强度水平 3, 其中至少 25 % 肿瘤细胞染色:	60%	100%	100%

[0259] 使用非霍奇金淋巴瘤组织微阵列(TMA)(购自TriStar Technology Group LLC)比较1B11-2抗体和NCL-CD37小鼠单克隆(Leica)抗体。在IHC测定(CD37测定)中使用NCL-CD37抗体,27%的弥漫性大B细胞淋巴瘤样品(52份中的14份),85%的滤泡性淋巴瘤样品(20份中的17份)和37%的慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤样品(8份中的3份)得分最高(至少25%的肿瘤细胞的染色强度水平为3,表5)。相反,上述IHC测定中的1B11-2抗体在

Leica Bond Rx自动载片染色机上使用Leica Bond细胞检测试剂盒,产生了具有增加的灵敏度和特异性的染色,其中59%的弥漫性大B细胞淋巴瘤样品(52份中的31份)、95%的滤泡淋巴瘤样品(20份中的19份)和100%的慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞淋巴瘤样品(8份中的8份)产生染色,得分最高(至少25%的肿瘤细胞的染色强度强度为3,表5)。1B11-2抗体也能够三份弥漫性大B细胞淋巴瘤样品中检测到低水平的CD37表达,而Leica的NCL-CD37抗体不能检测到这种低水平的表达。这些结果表明1B11-2在染色敏感性和特异性方面是有利的,并且产生更动态的CD37染色范围。

表5:非霍奇金淋巴瘤TMA中的CD37存在率比较。

得分	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (n=52)		滤泡间淋巴瘤(n=20)		慢性淋巴细胞白血病/小 淋巴细胞淋巴瘤(n=8)	
	NCL-CD37	1B11-2	NCL-CD37	1B11-2	NCL-CD37	1B11-2
阳性(任何强度)	47 (90%)	50 (96%)	19 (95%)	19 (95%)	8 (100%)	8 (100%)
≥强度水平 1 , 其中 至少 25 % 肿瘤细胞 染色:	26 (50%)	11 (21%)	0	0	0	0
≥强度水平 2 , 其中 至少 25 % 肿瘤细胞 染色:	33 (63%)	30 (58%)	12 (60%)	7 (35%)	7 (88%)	4 (50%)
≥强度水平 3 , 其中 至少 25 % 肿瘤细胞 染色:	14 (27%)	31 (60%)	17 (85%)	19 (95%)	3 (38%)	8 (100%)

示例6. 结构域绘图

通过变性SDS PAGE蛋白印迹进行结构域绘图

[0260] 在变性SDS PAGE中测试识别Fc融合的CD37-ECD的不同制备物的能力,随后对1B11-2进行蛋白印迹法(左图),与市售抗CD37抗体(Leica;右图)直接比较。通过在含有70mMβ-巯基乙醇的Laemmli缓冲液中于100°C孵育10分钟使Fc融合的CD37-ECD制备物变性,并通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后电泳转移至PVDF膜上。在含有0.1% Tween-20 (TBST)的Tris缓冲盐水中的5%脱脂牛奶在室温下封闭膜1小时。施加一抗过夜,随后用缀合于辣根过氧化物酶的抗鼠F(ab)₂在室温下检测1小时。按照标准程序使用增强的化学发光检测来显影印迹。结果在图8中显示。虽然Leica抗体识别所有三种Fc-CD37 ECD制备物,但是本发明的1B11-2抗体仅识别hCD37-ECD-Fc和hCD37-Fc-LAGA,而不识别hCD37-ECD-S2-fc。hCD37-ECD-S2-Fc构建体缺失CD37 ECD的S1片段(氨基酸110-137)。因此,氨基酸110-137的区域对于由1B11-2进行的表位识别是关键的,但是对于由Leica抗体进行的表位识别不是关键的。

通过天然PAGE蛋白印迹进行结构域绘图

[0261] 在天然PAGE中测试识别Fc融合的CD37-ECD的不同制备物的能力,随后对1B11-2进行蛋白印迹法(左图)。在NativePage样品缓冲液中加入Fc融合的CD37-ECD制备物,并通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后电泳转移至PVDF膜上或用考马斯亮蓝染色凝胶。在含有

0.1% Tween-20 (TBST) 的 Tris 缓冲盐水中的 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 PVDF 膜 1 小时。施加一抗过夜, 随后用缀合于辣根过氧化物酶的二抗鼠 F(ab)₂ 在室温下检测 1 小时。按照标准程序使用增强的化学发光检测来显影印迹。结果在图 9 中显示。与来自变性 SDS PAGE (图 8) 和 ELISA 实验 (参见图 4) 的数据一致, 本发明的 1B11-2 抗体仅识别 hCD37-ECD-Fc 和 hCD37-Fc-LAGA, 而不识别 hCD37-ECD-S2-fc。这些数据表明 CD37ECD 的 S1 片段 (氨基酸 110-137) 或其部分对于由 1B11-2 进行的表位识别是关键的 (图 9 的左图)。考马斯亮蓝染色剂 (图 9 的右图) 证明 hCD37-ECD-S2-Fc 蛋白以足够的量存在以供由 1B11-2 进行的检测。

实施例 7. 抗人 CD37 抗体的 VL 和 VH 区的克隆和测序

[0262] 使用 RNeasy 试剂盒 (QIAGEN) 根据制造商的方案从上述的抗人 CD37 杂交瘤 1B11-2 的 5×10^6 个细胞制备总细胞 RNA。随后使用 SuperScript III cDNA 合成试剂盒 (Invitrogen) 从总 RNA 合成第一链 cDNA。

[0263] 用于扩增源自杂交瘤细胞的抗体可变区 cDNA 的 PCR 程序是基于 Wang 等 ((2000) J Immunol Methods. 233:167-77) 和 Co 等 ((1992) J Immunol. 148:1149-54) 中所描述的方法。分别在 5' 端上通过简并引物并且在 3' 端上通过鼠 κ 或 IgG1 恒定区特异性引物扩增可变轻链 (VL) 和可变重链 (VH) 序列。然后在 1% 低熔点琼脂糖凝胶上运行 PCR 反应, 接着切除 300 至 400bp 扩增子条带, 随后使用 Zymo DNA 微型柱纯化所述扩增子条带。将纯化的扩增子送至 Beckman Coulter Genomics 以用于利用 PCR 反应的相同 5' 和 3' 引物进行测序以便产生来自两个方向的可变区 cDNA 序列。

[0264] 因为用于克隆 VL 和 VH cDNA 序列的简并引物改变 5' 端, 所以需要另外的测序努力来验证完整可变区 cDNA 序列。将初步序列输入 NCBI IgBlast 网站 (www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/) 的搜索查询以鉴定抗体序列所源自的鼠种系序列。然后设计 PCR 引物以与鼠抗体的种系连接的前导序列退火, 使得这一新的 PCR 反应将产生未被 PCR 引物改变的完整可变区 cDNA 序列。所述 PCR 反应、条带纯化和测序如上所述进行。

[0265] 针对抗 CD37 抗体获得的可变区 cDNA 序列与种系恒定区序列组合以获得全长抗体 cDNA 序列。然后从 cDNA 序列的翻译计算重链和轻链的分子量并且将其与通过纯化的鼠抗 CD37 抗体的 LC/MS 分析获得的分子量进行比较。观察到的鼠 1B11-2 轻链和重链的分子量与预期值相匹配, 从而证实 cDNA 序列是正确的。

[0266] VH 和 VL CDR 序列分别在表 1 和 2 中提供。VH 和 VL 序列分别在表 3 和 4 中提供。全长重链和轻链序列分别在表 5 和 6 中提供。表 8 中提供了 VH 和 VL 的多核苷酸序列。

[0267] 出于所有的目的, 本文所引用的所有出版物、专利、专利申请、互联网网站以及登录号/数据库序列 (包括多核苷酸与多肽序列二者) 以引用的方式在此整体并入本文, 其引用的程度犹如每个单个出版物、专利、专利申请、互联网网站或登录号/数据库序列被明确地和单独地指出以引用的方式如此并入。

序列表

<110> 德彪发姆国际有限公司(DEBIOPHARM INTERNATIONAL, S. A.)

<120> 用于检测CD37的抗体和测定

<130> 2921.075PC02

<150> 62/212,183

<151> 2015-08-31

<150> 62/211,455

<151> 2015-08-28

<160> 34

<170> PatentIn 版 3.5

<210> 1

<211> 281

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

Met Ser Ala Gln Glu Ser Cys Leu Ser Leu Ile Lys Tyr Phe Leu Phe
1 5 10 15

Val Phe Asn Leu Phe Phe Phe Val Leu Gly Ser Leu Ile Phe Cys Phe
20 25 30

Gly Ile Trp Ile Leu Ile Asp Lys Thr Ser Phe Val Ser Phe Val Gly
35 40 45

[0001] Leu Ala Phe Val Pro Leu Gln Ile Trp Ser Lys Val Leu Ala Ile Ser
50 55 60

Gly Ile Phe Thr Met Gly Ile Ala Leu Leu Gly Cys Val Gly Ala Leu
65 70 75 80

Lys Glu Leu Arg Cys Leu Leu Gly Leu Tyr Phe Gly Met Leu Leu Leu
85 90 95

Leu Phe Ala Thr Gln Ile Thr Leu Gly Ile Leu Ile Ser Thr Gln Arg
100 105 110

Ala Gln Leu Glu Arg Ser Leu Arg Asp Val Val Glu Lys Thr Ile Gln
115 120 125

Lys Tyr Gly Thr Asn Pro Glu Glu Thr Ala Ala Glu Glu Ser Trp Asp
130 135 140

Tyr Val Gln Phe Gln Leu Arg Cys Cys Gly Trp His Tyr Pro Gln Asp
145 150 155 160

Trp Phe Gln Val Leu Ile Leu Arg Gly Asn Gly Ser Glu Ala His Arg
165 170 175

Val Pro Cys Ser Cys Tyr Asn Leu Ser Ala Thr Asn Asp Ser Thr Ile
180 185 190

Leu Asp Lys Val Ile Leu Pro Gln Leu Ser Arg Leu Gly His Leu Ala
195 200 205

Arg Ser Arg His Ser Ala Asp Ile Cys Ala Val Pro Ala Glu Ser His
 210 215 220

Ile Tyr Arg Glu Gly Cys Ala Gln Gly Leu Gln Lys Trp Leu His Asn
 225 230 235 240

Asn Leu Ile Ser Ile Val Gly Ile Cys Leu Gly Val Gly Leu Leu Glu
 245 250 255

Leu Gly Phe Met Thr Leu Ser Ile Phe Leu Cys Arg Asn Leu Asp His
 260 265 270

Val Tyr Asn Arg Leu Ala Arg Tyr Arg
 275 280

<210> 2
 <211> 843
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)

[0002]

<400> 2
 atgtcagccc aggagagctg ctcagcctc atcaagtact tcctcttctgt tttcaacctc 60
 ttcttctctg tcctcggcag cctgatcttc tgcttcggca tctggatcct cattgacaag 120
 accagcttcg tgccttttgt gggcttggcc ttcgtgcctc tgcagatctg gtccaaagtc 180
 ctggccatct caggaatctt caccatgggc atcgccctcc tgggttgtgt gggggcctc 240
 aaggagctcc gctgcctcct ggcctgtat tttgggatgc tgctgctcct gtttgccaca 300
 cagatcaccc tgggaatcct catctccact cagcgggccc agctggagcg aagcttgagg 360
 gacgtcgtag agaaaaccat ccaaaagtac ggcaccaacc ccgaggagac cgcggccgag 420
 gagagctggg actatgtgca gttccagctg cgctgctgcg gctggcacta cccgcaggac 480
 tggttccaag tcctcatcct gagaggtaac ggtcggagg cgcaccgcgt gccttctcct 540
 tgctacaact tgcggcgcac caacgactcc acaatcctag ataagtgat cttgccccag 600
 ctcagcagcg ttggacacct ggcgcggctc agacacagtg cagacatctg cgctgtcctc 660
 gcagagagcc acatctaccg cgagggtgc gcgcagggcc tccagaagtg gctgcacaac 720
 aaccttattt ceatagtggg catttgctg ggcgtcggcc tactcgagct cgggttcatt 780
 acgctctcga tattctctgt cagaaacctg gaccacgtct acaaccgctc cgtctgatac 840
 cgt 843

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> muCD37-1B11-2 VH-CDR1

<400> 3

Gly Tyr Phe Met Asn
 1 5

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> muCD37-1B11-2 VH-CDR2 (Kabat)
 <400> 4
 Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> muCD37-1B11-2 VH -CDR3

<400> 5

Arg Gly Ile Val Ala Ser Ser Arg Phe Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> muCD37-1B11-2 VL-CDR1

<400> 6

[0003] Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp Val Asp
 1 5 10

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> muCD37-1B11-2 VL-CDR2

<400> 7

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> muCD37-1B11-2 VL-CDR3

<400> 8

Cys His Gln Asp Tyr Thr Ser Pro Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> muCD37-1B11-2重链可变区 (VH) (muCD37-1B11-2 heavy chain variable region (VH))

<400> 9

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

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

Phe Met Asn Trp Val Ile Gln Ser His Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Gly Ser Arg Gly Ile Val Ala Ser Ser Arg Phe Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser
115 120

[0004]

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> muCD37-1B11-2轻链可变区 (muCD37-1B11-2 light chain variable region)

<400> 10

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 444

<212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> muCD37-1B11-2 全长重链 (muCD37-1B11-2 full length heavy chain)
 <400> 11

Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Val Ile Gln Ser His Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala His
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Ser Arg Gly Ile Val Ala Ser Ser Arg Phe Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 [0005] Ala Gly Thr Ser Val Ile Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 115 120 125
 Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
 130 135 140
 Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 195 200 205
 Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 210 215 220
 Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 290 295 300

Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 305 310 315 320

Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 325 330 335

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

Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
 355 360 365

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser
 385 390 395 400

Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 405 410 415

Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 420 425 430

His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 12
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> muCD37-1B11-2全长轻链 (muCD37-1B11-2 full length light chain)

<400> 12

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Gly Val Ser Asn Asp
 20 25 30

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

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

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

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

[0006]

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro
 100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
 115 120 125

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

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
 145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
 180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 13
 <211> 376
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0007]

<220>
 <223> muCD37-1B11-2 VH

<400> 13
 gaggttcaac tgctgcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcttgcaagg cttctggtta ctcatttact ggctacttta tgaactgggt gatacagagc 120
 catggaaagg gccttgagtg gattggacgt attaatcctt acaatggtga taccttctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctctac cacagcccac 240
 atggagctcc tgagcctgac atctgaggac tctgccgtct attattgtgg atcccggggg 300
 atagtggctt cctctaggtt cttcgatgtc tggggcgcag ggacctcggg catcgtctcc 360
 tcagccaaaa cgacac 376

<210> 14
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> muCD37-1B11-2 VL

<400> 14
 agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgtat cagcaggaga cagggttacc 60
 ataacctgca aggccagtca ggggtgtgagt aatgatgtag attggtacca acagaagcca 120
 gggcagtcct ctaaactgct gatatactat gcatccaatc gctacactgg agtccctgat 180
 cgcttcactg gcagtgata tgggacggat ttcactttca gcatcagcac tgtcaggct 240
 gaagacctgg cagtttattt ctgtcaccag gattatacct ctccgacgtt cgggtggaggc 300

accaagctgg aatcaaacg ggctgat 327

<210> 15
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> hCD37-LEL

<400> 15

Thr Met Glu Leu Leu Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gln Leu Glu Arg Ser
 1 5 10 15

Leu Arg Asp Val Val Glu Lys Thr Ile Gln Lys Tyr Gly Thr Asn Pro
 20 25 30

Glu Glu Thr Ala Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val Gln Phe Gln Leu
 35 40 45

Arg Cys Cys Gly Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe Gln Val Leu Ile
 50 55 60

Leu Arg Gly Asn Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro Cys Ser Cys Tyr
 65 70 75 80

Asn Leu Ser Ala Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp Lys Val Ile Leu
 85 90 95

[0008]

Pro Gln Leu Ser Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser Arg His Ser Ala
 100 105 110

Asp Ile Cys Ala Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr Arg Glu Gly Cys
 115 120 125

Ala Gln Gly Leu Gln Lys Trp Leu His Asn Asn Leu Ser Phe Leu Glu
 130 135 140

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His
 145 150 155 160

His His His His

<210> 16
 <211> 368
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> hCD37-ECD-Fc

<400> 16

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

Leu Arg Asp Val Val Glu Lys Thr Ile Gln Lys Tyr Gly Thr Asn Pro
 20 25 30

Glu Glu Thr Ala Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val Gln Phe Gln Leu
 35 40 45
 Arg Cys Cys Gly Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe Gln Val Leu Ile
 50 55 60
 Leu Arg Gly Asn Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro Cys Ser Cys Tyr
 65 70 75 80
 Asn Leu Ser Ala Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp Lys Val Ile Leu
 85 90 95
 Pro Gln Leu Ser Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser Arg His Ser Ala
 100 105 110
 Asp Ile Cys Ala Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr Arg Glu Gly Cys
 115 120 125
 Ala Gln Gly Leu Gln Gly Ser Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
 130 135 140
 Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 145 150 155 160
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 165 170 175
 [0009] Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 180 185 190
 Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 195 200 205
 Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
 210 215 220
 Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 225 230 235 240
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
 245 250 255
 Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
 260 265 270
 Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
 275 280 285
 Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
 290 295 300
 Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
 305 310 315 320
 Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
 325 330 335

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
 340 345 350

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 355 360 365

<210> 17
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> hCD37-Fc-LAGA

<400> 17

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

Leu Arg Asp Val Val Glu Lys Thr Ile Gln Lys Tyr Gly Thr Asn Pro
 20 25 30

Glu Glu Thr Ala Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val Gln Phe Gln Leu
 35 40 45

Arg Cys Cys Gly Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe Gln Val Leu Ile
 50 55 60

Leu Arg Gly Asn Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro Cys Ser Cys Tyr
 65 70 75 80

[0010] Asn Leu Ser Ala Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp Lys Val Ile Leu
 85 90 95

Pro Gln Leu Ser Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser Arg His Ser Ala
 100 105 110

Asp Ile Cys Ala Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr Arg Glu Gly Cys
 115 120 125

Ala Gln Gly Leu Gln Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 130 135 140

Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 145 150 155 160

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 165 170 175

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 180 185 190

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 195 200 205

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 210 215 220

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 225 230 235 240

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 245 250 255
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 260 265 270
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 275 280 285
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 290 295 300
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 305 310 315 320
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 325 330 335
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 340 345 350
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 355 360
 <210> 18
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> hCD37-ECD-S2-Fc
 <400> 18
 Gly Pro Glu Phe Leu Ile Ser Ala Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val
 1 5 10 15
 Gln Phe Gln Leu Arg Cys Cys Gly Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe
 20 25 30
 Gln Val Leu Ile Leu Arg Gly Asn Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro
 35 40 45
 Cys Ser Cys Tyr Asn Leu Ser Ala Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp
 50 55 60
 Lys Val Ile Leu Pro Gln Leu Ser Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser
 65 70 75 80
 Arg His Ser Ala Asp Ile Cys Ala Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr
 85 90 95
 Arg Glu Gly Cys Ala Gln Gly Leu Gln Gly Ser Glu Pro Arg Gly Pro
 100 105 110
 Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu
 115 120 125

[0011]

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu
 130 135 140

Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 145 150 155 160

Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu
 165 170 175

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr
 180 185 190

Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser
 195 200 205

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro
 210 215 220

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln
 225 230 235 240

Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val
 245 250 255

Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val
 260 265 270

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu
 275 280 285

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg
 290 295 300

Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val
 305 310 315 320

Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg
 325 330 335

Thr Pro Gly Lys
 340

[0012]

<210> 19
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> hCD37

<400> 19

Leu Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gln Leu Glu Arg Ser Leu Arg Asp Val
 1 5 10 15

Val Glu Lys Thr Ile Gln Lys Tyr Gly Thr Asn Pro Glu Glu Thr Ala
 20 25 30

Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val Gln Phe Gln Leu Arg Cys Cys Gly
 35 40 45

Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe Gln Val Leu Ile Leu Arg Gly Asn
 50 55 60

Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro Cys Ser Cys Tyr Asn Leu Ser Ala
 65 70 75 80

Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp Lys Val Ile Leu Pro Gln Leu Ser
 85 90 95

Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser Arg His Ser Ala Asp Ile Cys Ala
 100 105 110

Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr Arg Glu Gly Cys Ala Gln Gly Leu
 115 120 125

Gln

<210> 20
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> hCD37

<400> 20

Leu Ile Ser Thr Gln Arg Ala Gln Leu Glu Arg Ser Leu Arg Asp Val
 1 5 10 15

[0013]

Val Glu Lys Thr Ile Gln Lys Tyr Gly Thr Asn Pro Glu Glu Thr Ala
 20 25 30

Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val Gln Phe Gln Leu Arg Cys Cys Gly
 35 40 45

Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe Gln Val Leu Ile Leu Arg Gly Asn
 50 55 60

Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro Cys Ser Cys Tyr Asn Leu Ser Ala
 65 70 75 80

Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp Lys Val Ile Leu Pro Gln Leu Ser
 85 90 95

Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser Arg His Ser Ala Asp Ile Cys Ala
 100 105 110

Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr Arg Glu Gly Cys Ala Gln Gly Leu
 115 120 125

Gln Lys Trp Leu His Asn Asn Leu
 130 135

<210> 21
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> hCD37
 <400> 21
 Leu Ile Ser Ala Ala Glu Glu Ser Trp Asp Tyr Val Gln Phe Gln Leu
 1 5 10 15
 Arg Cys Cys Gly Trp His Tyr Pro Gln Asp Trp Phe Gln Val Leu Ile
 20 25 30
 Leu Arg Gly Asn Gly Ser Glu Ala His Arg Val Pro Cys Ser Cys Tyr
 35 40 45
 Asn Leu Ser Ala Thr Asn Asp Ser Thr Ile Leu Asp Lys Val Ile Leu
 50 55 60
 Pro Gln Leu Ser Arg Leu Gly His Leu Ala Arg Ser Arg His Ser Ala
 65 70 75 80
 Asp Ile Cys Ala Val Pro Ala Glu Ser His Ile Tyr Arg Glu Gly Cys
 85 90 95
 Ala Gln Gly Leu Gln
 100

<210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 [0014] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> huCD37-3 VH-CDR1
 <400> 22
 Thr Ser Gly Val Ser
 1 5

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> huCD37-3 VH-CDR2
 <400> 23
 Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn
 1 5

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> huCD37-3 VH-CDR3
 <400> 24
 Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His
 1 5

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

 <220>
 <223> huCD37-3 VL-CDR1

 <400> 25

 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Arg Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

 <220>
 <223> huCD37-3 VL-CDR2

 <400> 26

 Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp
 1 5

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

 <220>
 <223> huCD37-3 VL-CDR3

[0015]

<400> 27

 Gln His Tyr Trp Gly Thr Thr Trp Thr
 1 5

<210> 28
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <223> huCD37-3 VH v. 1.0

<400> 28

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huCD37-3 VL

<400> 29

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Arg Ser Asn
20 25 30

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

Asn Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

[0016]

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Trp Gly Thr Thr Trp
85 90 95

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

<210> 30
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huCD37-3 重链 (HC) v. 1.0 (huCD37-3 Heavy Chain (HC) v. 1.0)

<400> 30

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 [0017] Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 31

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> huCD37-3 轻链 (huCD37-3 Light Chain)

<400> 31

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

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Arg Ser Asn
20 25 30

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

[0018]

Asn Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Trp Gly Thr Thr Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 32
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huCD37-3 VH v. 1.1

<400> 32

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

[0019]

Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> huCD37-3重链(HC) v. 1.1(huCD37-3 Heavy Chain (HC) v. 1.1)

<400> 33

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

Thr Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Ser
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asn Tyr His Ser Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Lys Lys Asp His Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Gly Gly Tyr Ser Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 115 120 125
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 [0020] Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

[0021] His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> muCD37-1B11-2 VH-CDR2 (AbM)

<400> 34

Arg Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe
1 5 10

抗体	浓度	hCD37-Fc-LAGA		hCD37-ECD-Fc		hCD37-LEL	
		天然的	变性的	天然的	变性的	天然的	变性的
1B11	上清液	3.0	3.1	3.0	3.1	3.0	1.7
Leica NCL-CD37	10 µg/mL	2.8	3.2	2.7	3.1	3.0	2.8
	5 µg/mL	2.6	3.1	2.4	3.1	3.0	2.0
	2.5 µg/mL	2.4	3.1	2.2	3.1	3.0	1.8

图1A

抗体	浓度	hCD37-Fc-LAGA		hCD37-LEL	
		天然的	变性的 还原的	天然的	变性的 还原的
1B11-2	上清液	3.3	3.3	3.2	3.3
1B11-20	上清液	3.2	3.2	3.2	3.2
Leica NCL- CD37	10 µg/mL	2.9	3.3	2.7	3.3
	5 µg/mL	2.5	3.2	2.4	3.2
	2.5 µg/mL	2.1	3.2	2.0	3.2

图1B

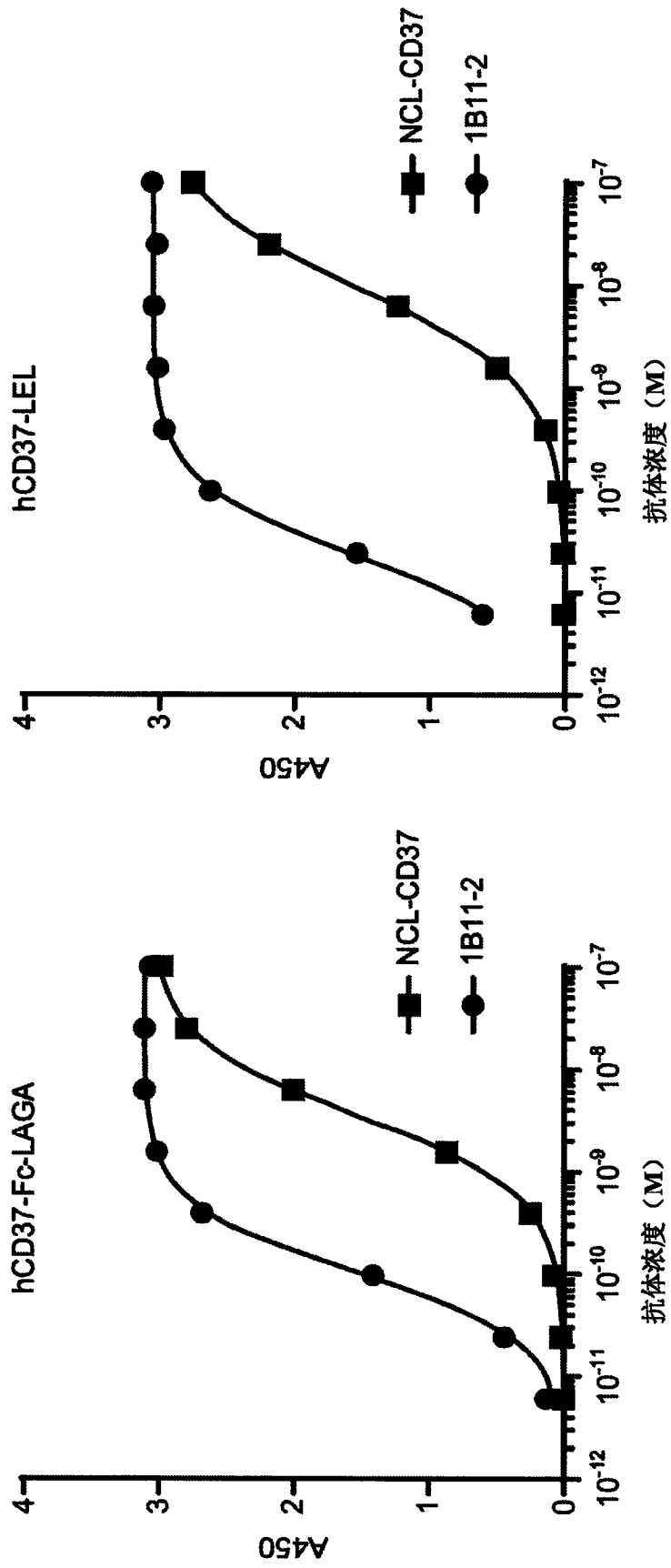


图2

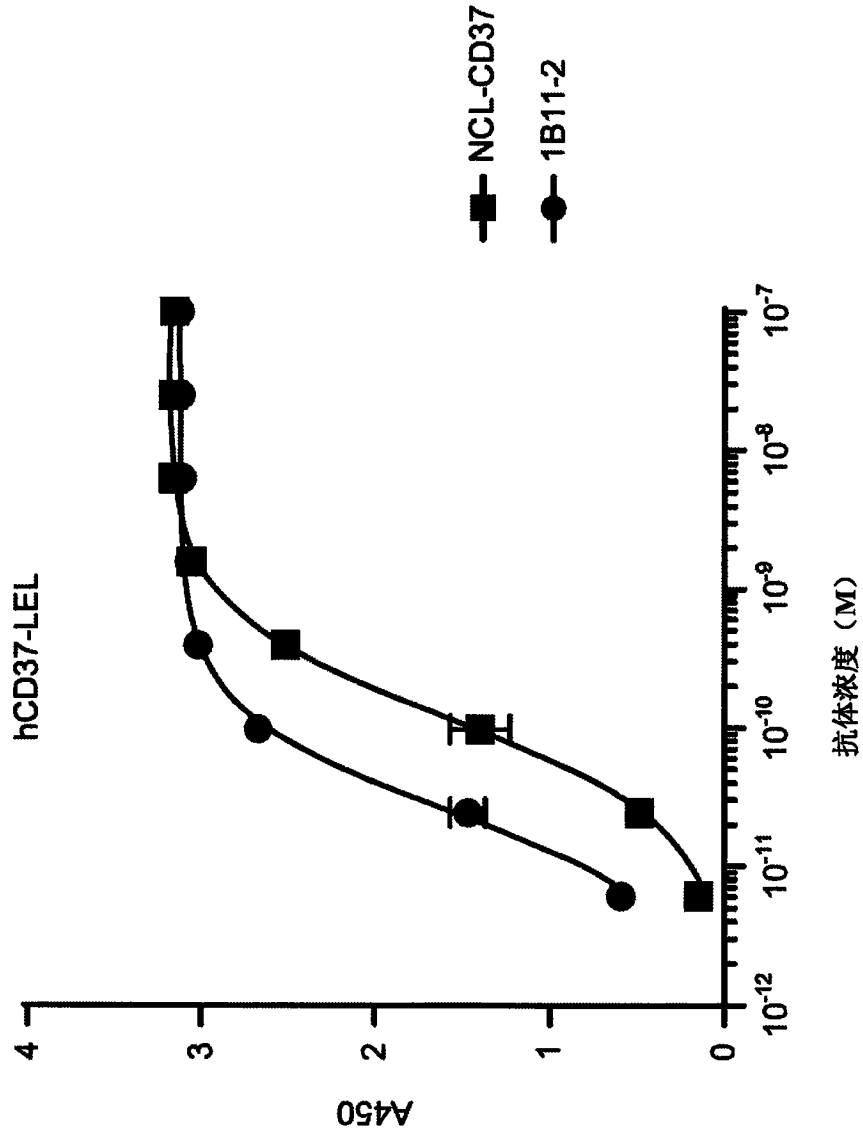


图3

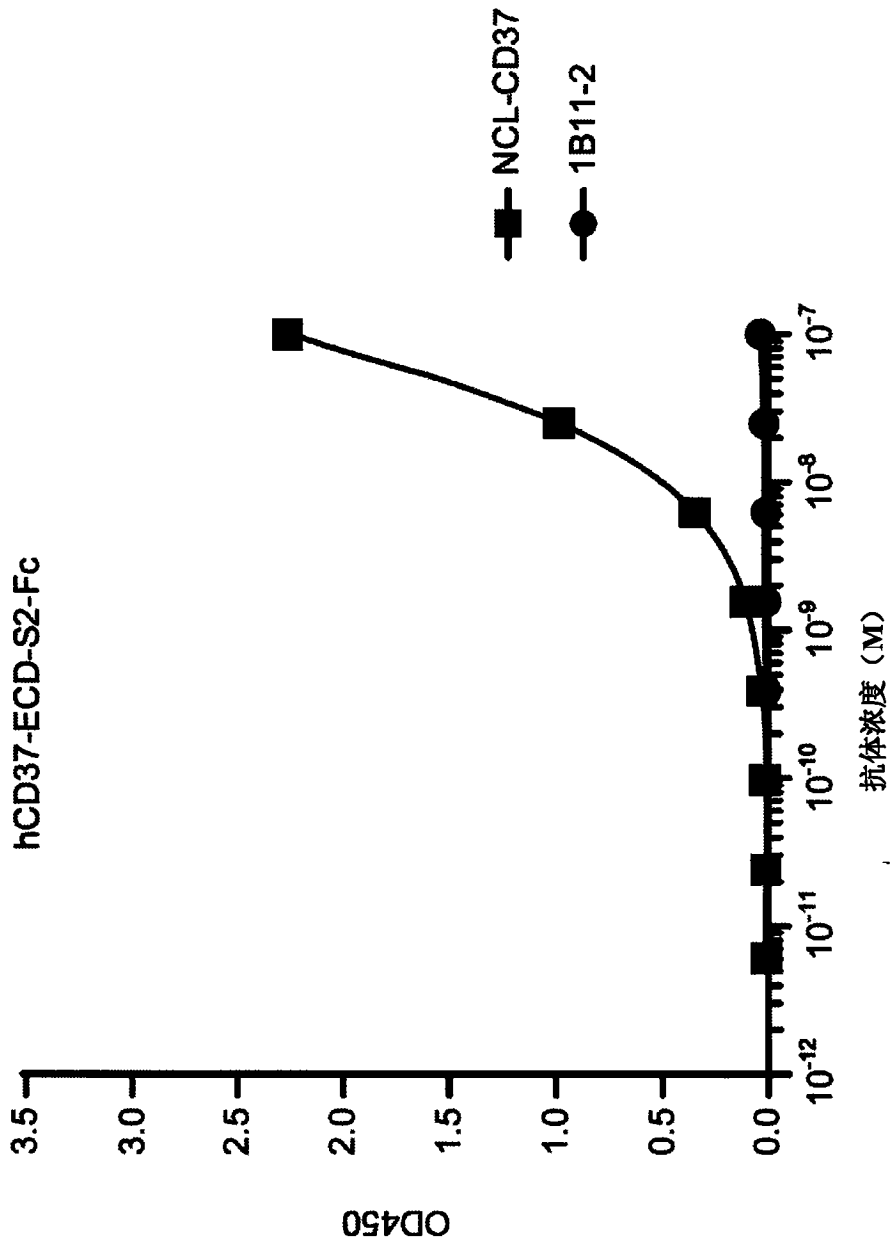


图4

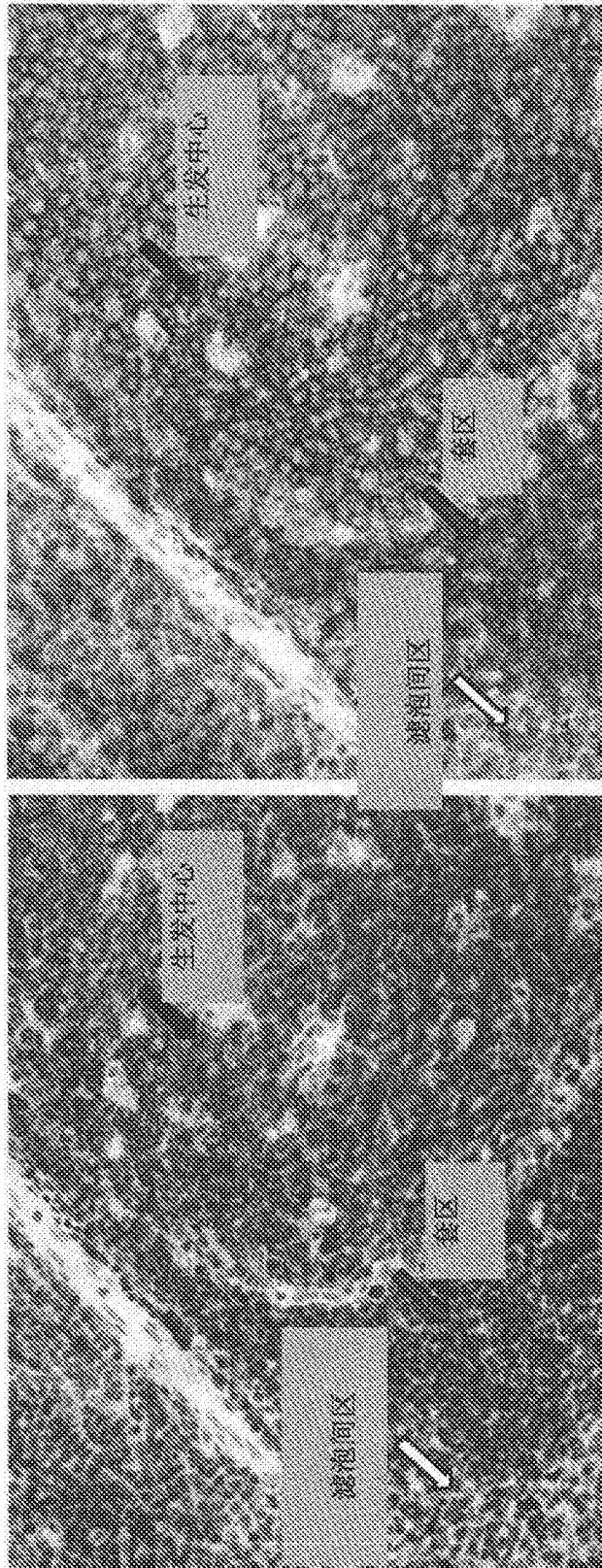


图5

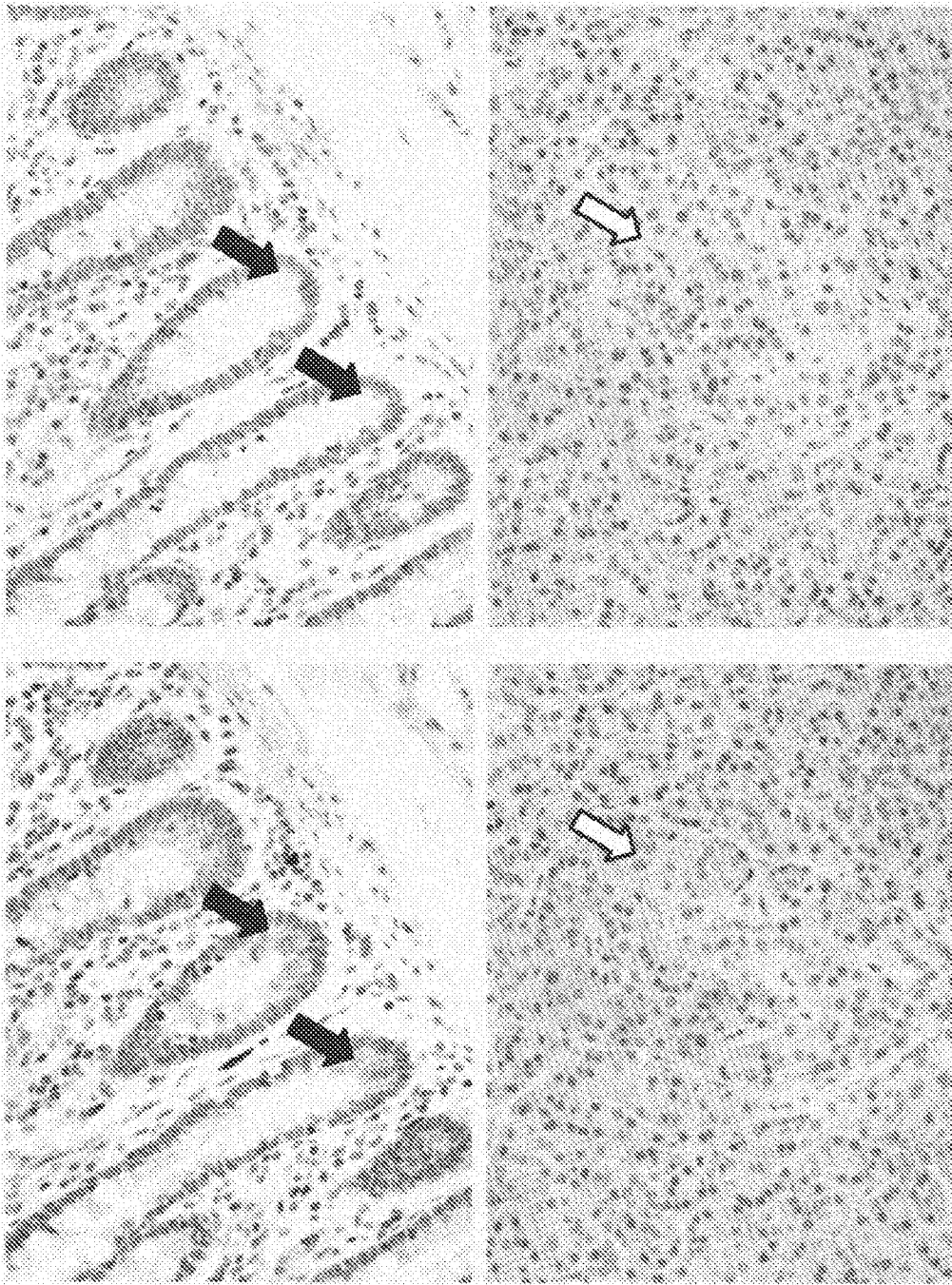


图6

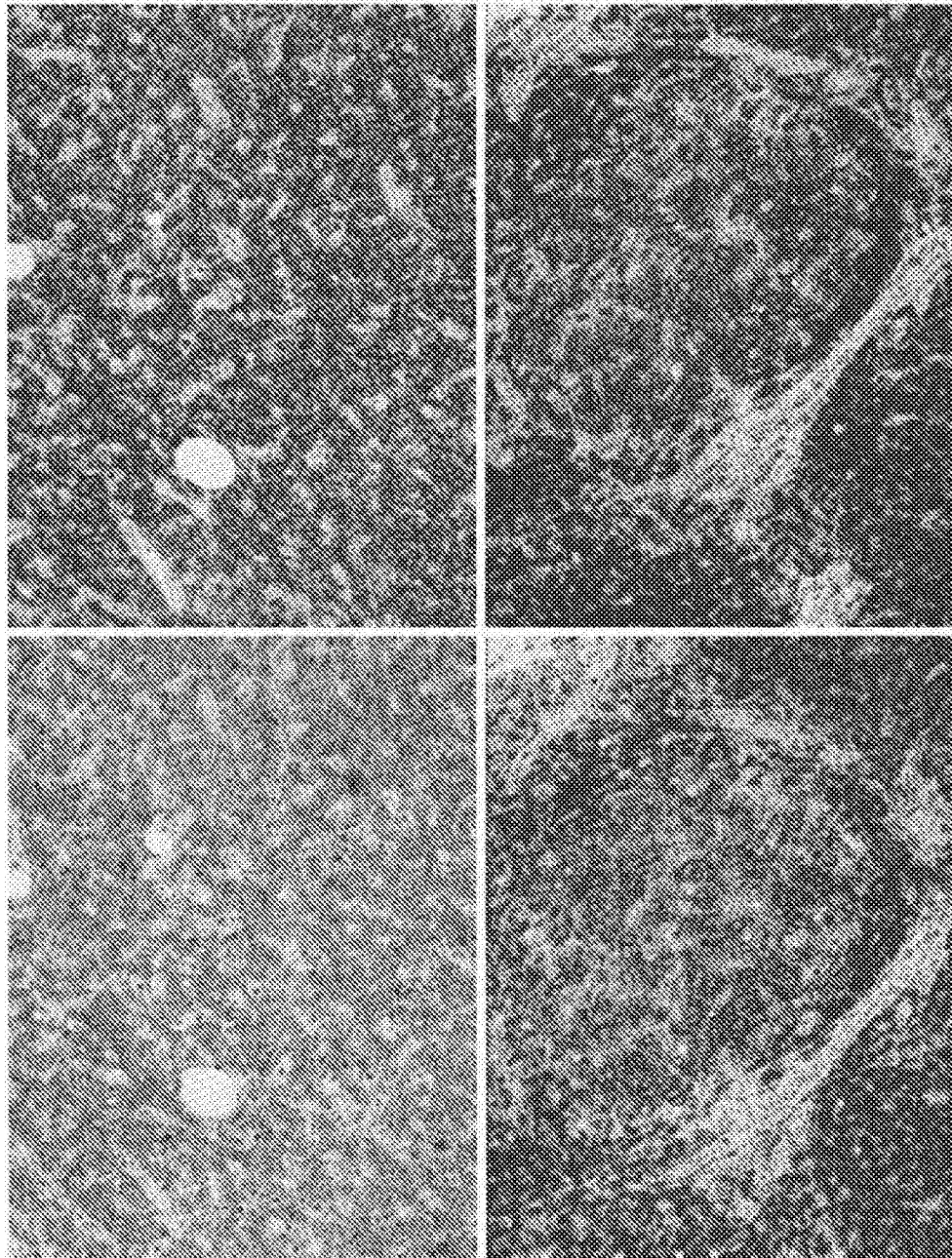


图7

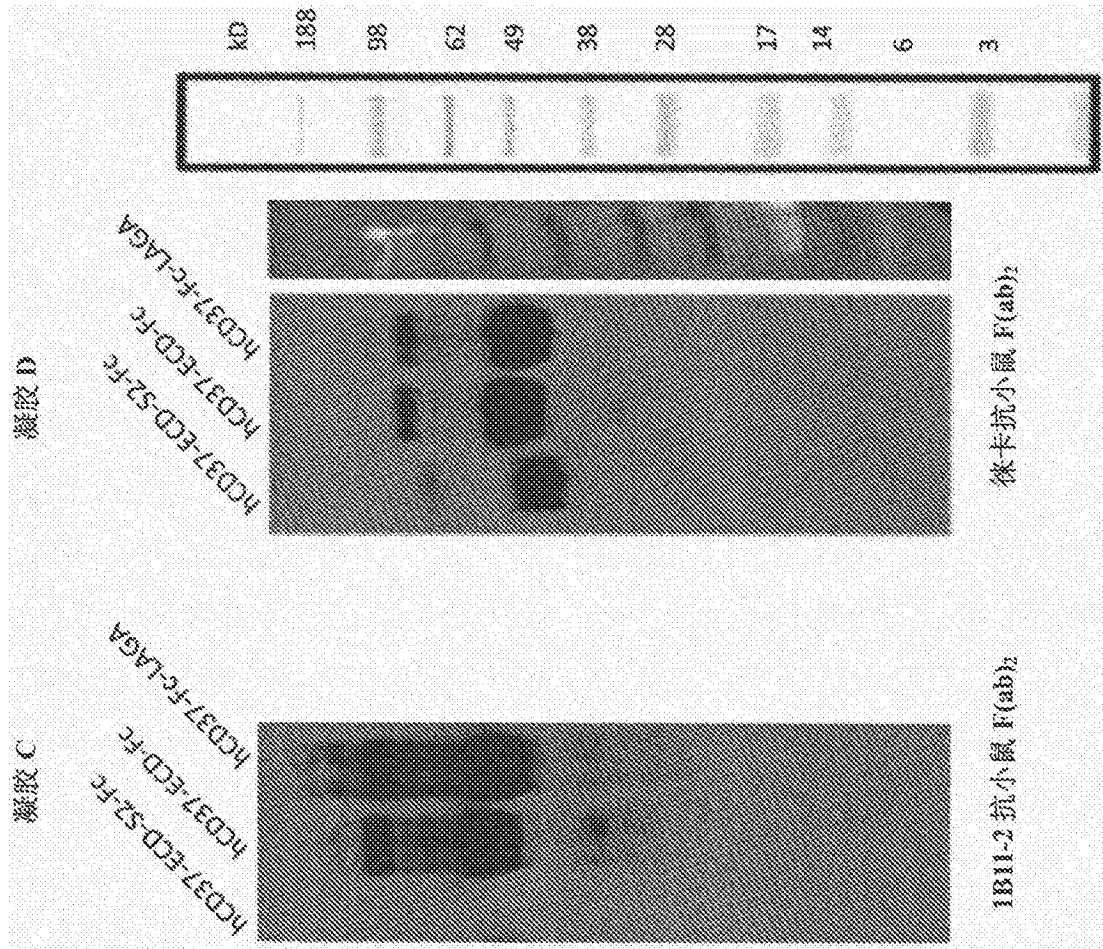


图8

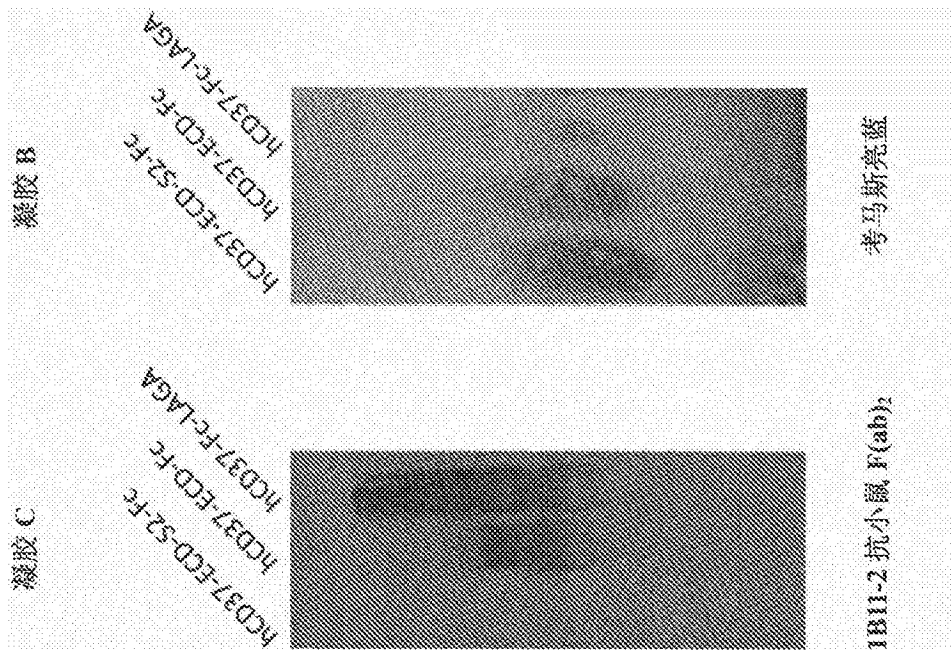


图9