



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0025514
(43) 공개일자 2025년02월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7004706 (분할)
- (22) 출원일자(국제) 2021년06월08일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2020-7000247
원출원일자(국제) 2018년06월08일
심사청구일자 2021년06월07일
- (85) 번역문제출일자 2025년02월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2018/065239
- (87) 국제공개번호 WO 2018/224683
국제공개일자 2018년12월13일
- (30) 우선권주장
62/517,150 2017년06월08일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
블랙 벨트 테라퓨틱스 리미티드
영국, 에스퀴1 2에프엑스 스티베나지 헬트포드샤 이어, 건넬스 우드 로드, 악셀러레이터 빌딩, 스티베나지 바이오사이언스 카탈리스트
- (72) 발명자
머치어스, 파스칼
영국, 에스퀴1 2에프엑스 스티베나지 헬트포드샤 이어, 건넬스 우드 로드, 스티베나지 바이오사이언스 카탈리스트, 터스크 테라퓨틱스 리미티드 내 구비어, 앤
영국, 에스퀴1 2에프엑스 스티베나지 헬트포드샤 이어, 건넬스 우드 로드, 스티베나지 바이오사이언스 카탈리스트, 터스크 테라퓨틱스 리미티드 내 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
최은선

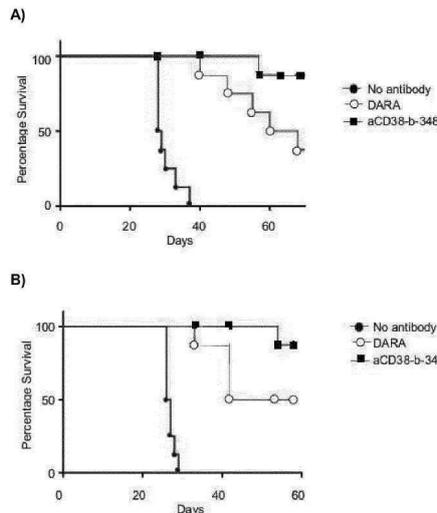
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 CD38 조정 항체

(57) 요약

본 개시는 인간 CD38에 결합하는 항체에서 발견되는 항체 서열을 제공한다. 특히, 본 개시는 항-인간 CD38 항체의 서열을 제공한다. 이러한 서열을 포함하는 항체 및 그의 항원-결합 부분은 제약 제조 및 개발에 적합한 특징을 나타내고, 의학적 방법 및 조성물에 유용할 수 있는, 특히 암 치료에 유용할 수 있는 완전 인간 항체 (예를 들어, 완전 인간 모노클로날 항체 또는 항원-결합 단편)로서 제공될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A61P 35/02 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/734 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)

(72) 발명자

모울더, 케빈

영국, 에스취1 2에프엑스 스티베나지 헐트포드샤이어, 건넬스 우드 로드, 스티베나지 바이오사이언스 카탈리스트, 터스크 테라퓨틱스 리미티드 내

아이슬러, 니나

영국, 에스취1 2에프엑스 스티베나지 헐트포드샤이어, 건넬스 우드 로드, 스티베나지 바이오사이언스 카탈리스트, 터스크 테라퓨틱스 리미티드 내

살리무, 조세핀

영국, 에스취1 2에프엑스 스티베나지 헐트포드샤이어, 건넬스 우드 로드, 스티베나지 바이오사이언스 카탈리스트, 터스크 테라퓨틱스 리미티드 내

플로스토, 시몬

영국, 에스취1 2에프엑스 스티베나지 헐트포드샤이어, 건넬스 우드 로드, 스티베나지 바이오사이언스 카탈리스트, 터스크 테라퓨틱스 리미티드 내

고예네체아 코르조, 비트리즈

영국, 에스취1 2에프엑스 스티베나지 헐트포드샤이어, 건넬스 우드 로드, 스티베나지 바이오사이언스 카탈리스트, 터스크 테라퓨틱스 리미티드 내

바루아, 헤만타

미국, 03766 뉴햄프셔, 레바논, 루센트 드라이브 7, 아디맘, 엘엘씨 내

프린즈, 비안카

미국, 03766 뉴햄프셔, 레바논, 루센트 드라이브 7, 아디맘, 엘엘씨 내

(30) 우선권주장

| | | |
|------------|-------------|--------|
| 62/517,149 | 2017년06월08일 | 미국(US) |
| 62/517,734 | 2017년06월09일 | 미국(US) |
| 62/517,740 | 2017년06월09일 | 미국(US) |
| 62/517,165 | 2017년06월09일 | 미국(US) |
| 62/517,164 | 2017년06월09일 | 미국(US) |
| 62/517,745 | 2017년06월09일 | 미국(US) |
| 62/517,753 | 2017년06월09일 | 미국(US) |
| 62/582,681 | 2017년11월07일 | 미국(US) |
| 62/582,666 | 2017년11월07일 | 미국(US) |
| 62/582,653 | 2017년11월07일 | 미국(US) |
| 62/582,676 | 2017년11월07일 | 미국(US) |

명세서

청구범위

청구항 1

인간 CD38의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 여기서 상기 에피토프가 서열번호 9의 아미노산 65-79에 포함된 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 에피토프가 서열번호 9의 아미노산 65-79를 포함하는 것인 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항 또는 2항에 있어서, 모노클로날 항체, 도메인 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 단일쇄 가변 단편 (scFv), scFv-Fc 단편, 단일쇄 항체 (scAb), 아프타머 또는 나노바디인, 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항 또는 2항에 있어서, 토끼, 마우스, 키메라, 인간화 또는 완전 인간 항원-결합 항체인, 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 5

제1항 또는 2항에 있어서, 항체가 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 이소타입 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항 또는 2항에 있어서, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 또는 치료제 또는 진단제를 추가로 포함하는 면역접합체에 포함되는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항 또는 2항에 있어서, 인간 CD38의 세포의 도메인에 결합하는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 8

제1항 또는 2항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 9

제8항의 핵산 분자를 포함하는 핵산 벡터.

청구항 10

제9항의 핵산 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 11

제10항의 숙주 세포를 배양하여, 제1항 또는 2항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 생성 방법.

청구항 12

제1항 또는 2항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 제약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 암의 치료에서 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 암은 고형 종양인 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 암은 혈액암인 조성물.

청구항 17

제1항 또는 2항의 항체를 제공하고, 항체가 친화성 성숙을 겪게 하는 것을 포함하며, 여기서 생성된 항-CD38 항체가 어미 항체보다 CD38에 대한 더 큰 친화성을 갖는 것인, 항-CD38 항체의 제조 방법.

청구항 18

제17항의 방법에 따라 제조된 항체를 제공하고, 항체를 적어도 하나 이상의 제약학적으로 허용가능한 부형제로 공동-제제화하는 것을 포함하는, 제약 조성물의 제조 방법.

청구항 19

컨테이너에 제12항의 조성물을 포함하는 키트.

발명의 설명

배경 기술

- [0001] CD38은 효소적 활성화, 특히 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드로부터 시클릭 아데노신 디포스페이트 리보스 (cADPR)를 생성하는 중요한 ADP-리보실 시클라제로서 효소적 활성을 갖는 유형 II 막 수용체 당단백질이다. 여러가지 세포의 자극이 cADPR 생성을 유도할 수 있다. cADPR은 많은 세포 기능, 예컨대 세포 증식, 분화, 접착, 및 신호 도입에 관여되는 세포내 칼슘 비축의 동원에 중요하다. CD38은 초기에 백혈구 활성화 마커로서 확인되었으나, 세포 신호전달 및 세포 항상성 활성화가 부여된, 외부효소 및 수용체로서 이중 역할을 한다. CD38은 악성종양, 예컨대 만성 림프구성 백혈병, 골수종 및 난소 암종을 포함하는 다양한 인간 질병과 관련되어 있다 (Quarona V, et al., 2013; Wei W, et al., 2014).
- [0002] CD38은 이펙터 세포, 예컨대 T 및 B 림프구 및 NK 세포, 뿐만 아니라 면역억제성 세포, 예컨대 조절성 T 및 B 세포, 골수 유래 억제성 세포 (MDSC) 또는 종양 관련 대식세포를 포함하는, 면역학적 반응에 관여되는 많은 유형의 세포 (간단히 면역 세포라고 언급함)의 표면 상에서 발견된다 (Chevrier S et al. 2017). 예를 들어, 폐암 환자에서, 항-PD-1 치료는 PD-1을 발현하는 T 세포의 증식을 유도하였으며, 상기 세포는 높은 수준의 CD38을 발현하였다 (Kamphorst AO et al., 2017). 면역 세포의 생물학적 활성을 위한, 특히 생리적 및 병리적 상태에서서의 면역 반응의 조절을 위한 cADPR- 및 CD38-매개성 Ca²⁺ 신호전달의 중요성은 문헌 (Morandi F et al., 2015; Rah SY et al., 2015)에 기재되어 있다.
- [0003] CD38은 모든 질병 단계에서의 다발성 골수종 환자 및 불량한 예후를 갖는 CLL 환자에서 암 세포에 의해 고도로 발현된다. 다양한 CD38-표적화 요법은 주로 CD38 길항제 또는 억제제로서 작용하는 화합물들을 제조함으로써 개발되었다 (de Weers M et al., 2011; van de Donk NW et al., 2016; Horenstein AL et al., 2017). CD38 효능제(agonist)로서 작용하는 항-CD38 모노클로날 항체 (예컨대, IB4라고 지칭되는 것)는 또한 다른 활성화 중에서 칼슘 이온의 동원, CD38 웨딩, NK 세포-매개성 세포독성, 사이토카인 분비 (특히 인터루킨 6 및 인터페론 감마), 및 인간 T 림프구의 증식을 유도하는 것으로 특징화되었고, 면역독소를 생성하도록 변형되었다 (Malavasi F et al., 2008; Hara-Yokoyama M et al., 2008; Frasca L et al, 2006; Karakasheva T et al., 2015). 면역 세포에 대한 이러한 양성 효과는 Ca²⁺ 동원의 유도, CD38 효소적 활성의 억제, 및/또는 세포내 신호전달 경로의 활성화와 관련될 수 있다.
- [0004] 모노클로날 항체는 CD38-발현 종양 세포의 표적화된 직접적 사멸을 위해 개발되었으며, 병원에서 유망한 결과를

나타내었다. 그러나, 이러한 항-CD38 항체의 활성은 CD38이 암 세포의 표면 상에 고도로 발현된 종양으로 제한될 수 있다. 고형 종양에서, CD38의 발현은 종양 세포 상에서 일반적으로 더 적거나 또는 부재하고, 종양 침윤성 면역 세포 (이펙터 및 억제성 둘 모두)와 관련될 수 있다. 따라서, 표적화된 세포 사멸 또는 활성화, 및 제약 개발과의 적합성과 함께 상이한 구성요소들의 조합으로부터 기인하는 특성, 예컨대 CD38-특이적 효능제 특성 또는 조정 특성을 나타내고, 암의 치료를 위해, 특히 고형암의 치료를 위해 사용될 수 있는, 항-CD38 항체에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 요약
- [0007] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 신규 CD38 조정 항체 작용제를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제는 CD38, 특히 인간 CD38에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편이고, 많은 실시양태에서, 인간 CD38 세포의 도메인 내의 부위에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편이다.
- [0008] 몇몇 실시양태에서, 제공되는 항체 또는 항원-결합 단편은 CD38의 하나 이상의 특징을 조정한다. 즉, 몇몇 실시양태에서, CD38의 수준 및/또는 활성, 및/또는 그의 하나 이상의 하류 효과는 제공되는 항체가 부재할 때와 비교하여 제공되는 항체가 존재할 때 검출가능하게 변경된다. 대안으로 또는 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, 제공되는 항체가 존재할 때 CD38의 수준 및/또는 활성, 및/또는 그의 하나 이상의 하류 효과는, 참고 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 공지된 바람직한 속성; 예를 들어, CD38의 하나 이상의 특징을 작동시키는 공지된 능력을 갖는 참고 항-CD38 항체, 예컨대 IB-4)가 존재할 때 견줄만한 조건 하에 관찰되는 것과 견줄만하거나 또는 그보다 더 크다.
- [0009] 많은 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편)가 존재할 때, CD38의 하나 이상의 특징이 향상된다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편)의 존재는 증가된 면역 세포 활성화 및/또는 증식과 상관관계가 있다. 그러므로, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제는 본원에서 종종 "효능제(agonist)"라고 지칭된다. 그러나, 당업자는 본 개시의 교시가 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 특정 작용 메커니즘에 의해 제한되지 않는다는 것을 이해할 것이다. 제공되는 항체의 관련 구조적 및/또는 기능적 특징은 본원에 기재되어 있으며 자명하다.
- [0010] 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, CD38 항체 또는 항원-결합 단편)는 예를 들어, 특정 면역 이펙터 세포 (예를 들어, NK 세포 및/또는 T 세포)에 대한 효과를 특징으로 할 수 있다. 대안으로 또는 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, CD38 항체 또는 항원-결합 단편)는 예를 들어, 면역억제성 세포에 대한 효과를 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제는 면역 이펙터 세포, 예컨대 NK 세포 및 T 세포와 관련된 활성화 특성, 및 CD38을 고도로 발현하는 세포, 예컨대 면역억제성 세포에 대한 세포독성 특성을 나타낸다. 대안으로 또는 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제는 인간 CD38 세포의 도메인 내의 특이적 에피토프로의 결합과 관련되고/거나, 특히 제약적 사용 및/또는 제조를 용이하게 하는 하나 이상의 특징을 특징으로 한다.
- [0011] 제공되는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)), 이를 포함하는 조성물, 및/또는 이를 위한 용도를 포함하는 제공되는 기술은 의학에서 유용하다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 제공되는 기술은 암 치료 및/또는 예방에서 유용하다.
- [0012] 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제는 aCD38-b-348의 서열을 갖는 항체, 및 보다 일반적으로 하나 이상의 항원-결합 단편 또는 그의 부분이거나 또는 이를 포함하는 항체 또는 작용제, 예를 들어 가변 중쇄 상보성 결정 영역 3으로서 aCD38-b-348-HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 3)을 포함하고/거나, 몇몇 실시양태에서, aCD38-b-348 HCDR1 (서열번호 1) 및 HCDR2 (서열번호 2) 서열 중 하나 또는 양자 모두를 포함하고/거나, 인간 CD38 세포의 도메인으로의 결합에 대해 aCD38-b-348과 경쟁하는 항체 또는 작용제에 의해 예시된다. 몇몇 실시양태에서, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 10^{-8} M 범위 이하 (10^{-9} M 범위)의 Kd로 인

간 CD38에 결합하며, 바람직하게는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 10^{-8} M 내지 10^{-11} M 범위의 Kd로 인간 CD38에 결합한다. 몇몇 실시양태에서, Kd는 10^{-8} M 내지 10^{-11} M이다. 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 결합 친화성을 평가하기 위한 Kd는 표면 플라즈몬 공명 (SPR), 예컨대 비아코어(Biacore) 분석 또는 포르테 바이오 옥텟 시스템스(Forte Bio Octet Systems)를 이용하는 분석을 포함하는 표준 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0013] 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편)는 aCD38-b-348에 의해 결합되는 인간 CD38 상의 에피토프에 결합한다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 제공되는 CD38 조정 항체 작용제는 인간 CD38 세포의 도메인에 결합할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제는 CD38의 에피토프, 특히 aCD38-b-ep로서 확인된 에피토프에 결합할 수 있다 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 또는 달리 당업계에 공지된 하나 이상의 검정을 이용하여 평가되는 경우). 몇몇 실시양태에서, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 10^{-8} M 범위의 Kd 값으로 인간 및 시노물구스 원숭이 CD38 (예를 들어, 인간 및 시노물구스 원숭이 CD38 상의 세포의 에피토프)에 결합할 수 있으며, 그의 항원-결합 단편은 10^{-8} M 내지 10^{-11} M 범위의 Kd로 인간 CD38에 결합한다.

[0014] 몇몇 실시양태에서, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 돌연변이체 인간 CD38 (비-돌연변이체 인간 CD38 (서열번호 9)과 비교하여)에 결합하며, 여기서 돌연변이체 인간 CD38에서, 위치 274의 세린 잔기는 페닐알라닌으로 치환된다.

[0015] 몇몇 실시양태에서, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 돌연변이체 인간 CD38 (비-돌연변이체 인간 CD38 (서열번호 9)과 비교하여)에 결합하며, 여기서 돌연변이체 인간 CD38에서, 위치 202의 아스파르테이트 잔기는 글리신 잔기로 치환된다.

[0016] 몇몇 실시양태에서, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 돌연변이체 인간 CD38 (비-돌연변이체 인간 CD38 (서열번호 9)과 비교하여)에 결합하며, 여기서 돌연변이체 인간 CD38에서, 위치 274의 세린 잔기는 페닐알라닌으로 치환되고, 위치 202의 아스파르테이트 잔기는 글리신 잔기로 치환된다.

[0017] 다른 것들 중에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 특히 유용한 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편) (예를 들어, 특정 구조적 및/또는 기능적 특징, 예컨대 인간 CD38 (예를 들어, 그의 세포의 에피토프)로의 특이적 결합, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDR 서열 요소의 포함 (및 특히 임의로 HCDR1 및/또는 HCDR2 요소와 조합하여, HCDR3 서열 요소의 포함), 본원에 기재된 바와 같은 세포 활성화 활성, 본원에 기재된 바와 같은 세포독성 활성 (예를 들어, 그의 표면 상에 상대적으로 높은 수준의 CD38을 갖는 면역 조절성 세포와 관련하여), 및 이들의 조합을 특징으로 하는 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편)를 확인하고/거나 특징화하는데 이용될 수 있는 절차 (도 1)를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 특히 유용한 항-CD38 항체는 다수의 이러한 특징을 특징으로 한다. 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 항체는 CD38 조정 항체 작용제로서 특징화될 수 있다.

[0018] 그러므로, 본원에 예시된 바와 같이, aCD38-b-348 서열 (특히 aCD38-b-348-HCDR3 (서열번호 3) 및/또는 aCD38-b-348-LCDR3 (서열번호 7))을 포함하는 특정 항체 및/또는 항원-결합 단편은 이러한 바람직한 구조적 및/또는 기능적 특징을 특징으로 하고; 이러한 항체 및/또는 그의 항원-결합 단편은 본원에서 CD38 조정 항체 작용제라고 지칭될 수 있다. 추가적으로, 본 개시에 따라, aCD38-b-348과 경쟁하는 항체 및 그의 항원-결합 단편이 특히 유용한 항체일 수 있고; 이러한 항체 및/또는 그의 항원-결합 단편은 또한 본원에서 CD38 조정 항체 작용제라고 지칭될 수 있다.

[0019] 본원에 기재된 항체 (및/또는 그의 항원-결합 단편)는 의학에서 (예를 들어, 치료에서 및/또는 예방에서, 예를 들어 암의 치료에서), 및/또는 인간 CD38 세포의 도메인 내의 에피토프, 예컨대 aCD38-b-ep로서 확인되는 에피토프의 표적화를 필요로 하거나 또는 이를 수반하는 방법과 관련하여 사용하기에 특히 유용할 수 있다. 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 가장 적절한 이소타입, 특히 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 이소타입 항체로 이루어진 군으로부터의 인간 이소타입, 보다 특히 인간 IgG1을 제시하도록 제조될 수 있다.

[0020] 한 측면에서, 본 발명은 aCD38-b-348-HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 3) 및 이를 포함하는 폴리펩티드, 예를 들어 가변 중쇄 상보성 결정 영역 3으로서 aCD38-b-348-HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 3)을 포함하는 항체 또는 항원-결합 단편을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 항체 또는 항원-결합 단편은 추가 aCD38-b-348 아미노산 서열 요소, 예컨대

- [0021] a) 가변 중쇄 상보성 결정 영역 1로서 aCD38-b-348-HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 1); 및/또는
- [0022] b) 가변 중쇄 상보성 결정 영역 2로서 aCD38-b-348-HCDR2 아미노산 서열 (서열번호 2)
- [0023] 을 포함하는 것을 추가로 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 몇몇 실시양태에서, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 추가로 올바른 순서로, 항체 프레임 서열, 예컨대 aCD38-b-348-HCDR123 아미노산 서열 (서열번호 4)에 포함된 서열에 의해 특이적으로 분리된, 특히 그의 결합 및 기능적 특성을 올바르게 발휘하기 위해, 상기 정의된 가변 중쇄 상보성 결정 영역 (즉, aCD38-b-348 아미노산 서열 요소)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 제공되는 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 aCD38-b-348-HCDR123 아미노산 서열 (서열번호 4, 또는 그의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열) 및 임의로
- [0025] a) 가변 경쇄 상보성 결정 영역 1로서 aCD38-b-348-LCDR1 아미노산 서열 (서열번호 5);
- [0026] b) 가변 경쇄 상보성 결정 영역 2로서 aCD38-b-348-LCDR2 아미노산 서열 (서열번호 6); 및
- [0027] c) 가변 경쇄 상보성 결정 영역 3으로서 aCD38-b-348-LCDR3 아미노산 서열 (서열번호 7)
- [0028] 을 포함할 수 있다.
- [0029] 그러므로, 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 aCD38-b-348-HCDR123 아미노산 서열 (서열번호 4)을 포함하는 가변 중쇄를 포함하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 바람직하게는, 이러한 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 실시예에 기재된 바와 같이 aCD38-b-348-LCDR123 아미노산 서열 (서열번호 8)을 포함하는 가변 경쇄를 추가로 포함한다.
- [0030] 몇몇 실시양태에서, aCD38-b-348의 가변 중쇄 서열은 서열:
- QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSSL
KSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDMWGQGTMTVTVSS (SEQ ID
NO: 14)
- [0031] 을 포함하고, aCD38-b-348의 가변 경쇄 서열은 서열:
- EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG
SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDGNVYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 19).
- [0032] 을 포함한다.
- [0033] 본 발명은 또한 HCDR3으로서 aCD38-b-348-HCDR3의 서열을 포함하고, aCD38-b-348-LCDR3, aCD38-b-348-m1-LCDR3, aCD38-b-348-m2-LCDR3, aCD38-b-348-m3-LCDR3 및 aCD38-b-348-m4-LCDR3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0034] 본 발명은 또한 HCDR1로서 aCD38-b-348-HCDR1의 서열, HCDR2로서 aCD38-b-348-HCDR2의 서열, HCDR3으로서 aCD38-b-348-HCDR3의 서열, LCDR1로서 aCD38-b-348-LCDR1의 서열, LCDR2로서 aCD38-b-348-LCDR2의 서열을 포함하고, aCD38-b-348-LCDR3, aCD38-b-348-m1-LCDR3, aCD38-b-348-m2-LCDR3, aCD38-b-348-m3-LCDR3 및 aCD38-b-348-m4-LCDR3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 LCDR3을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0035] 본 발명은 또한 가변 중쇄 영역으로서 aCD38-b-348-HCDR123의 서열을 포함하고, aCD38-b-348-LCDR123, aCD38-b-348-m1-LCDR123, aCD38-b-348-m2-LCDR123, aCD38-b-348-m3-LCDR123 및 aCD38-b-348-m4-LCDR123으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 가변 경쇄 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0036] 본 발명은 또한 가변 중쇄 영역으로서 aCD38-b-348-VH의 서열을 포함하고, aCD38-b-348-VL, aCD38-b-348-m1-VL, aCD38-b-348-m2-VL, aCD38-b-348-m3-VL 및 aCD38-b-348-m4-VL로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 가변 경쇄 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0037] 본 발명은 또한 참고 서열, 예컨대 CDR 서열 또는 aCD38-b-348의 중쇄 또는 경쇄 가변 서열에 대한 특정 동일성 %를 갖는 변이체 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 이러한 항체 및 그의 항원-결합 단편은 또한 본원에서 CD38 조정 항체 작용제라고 지칭될 수 있다.

- [0040] 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 14에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 14에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 14에 대해 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함한다.
- [0041] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 19에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 19에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 19에 대해 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다.
- [0042] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 14에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열 및 서열번호 19에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 14에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열 및 서열번호 19에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 14에 대해 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열 및 서열번호 19에 대해 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열 및 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다.
- [0043] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 4에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 4에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 4에 대해 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열을 포함한다.
- [0044] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 8에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 8에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 8에 대해 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다.
- [0045] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 4에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열 및 서열번호 8에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 4에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열 및 서열번호 8에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 4에 대해 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열 및 서열번호 8에 대해 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 서열 및 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄 서열을 포함한다.
- [0046] 이러한 변이체 항체 및 그의 항원-결합 단편은 aCD38-b-348에 대한 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 서열을 갖는 항체 및 그의 항원-결합 단편에 대해 기재된 바와 같은 동일한 (또는 실질적으로 동일한) 기능적 및 약리적 특성을 보유하거나 또는 나타낼 수 있다.
- [0047] 더욱이, aCD38-b-348 아미노산 서열은 또한 상기 정의된 aCD38-b-348 아미노산 서열 요소와 관련하여 치환수에 의해 정의되는 항체 서열을 지칭한다. 예를 들어, 이러한 서열은 가변 중쇄 상보성 결정 영역 3 (HCDR3)으로서

aCD38-b-348-HCDR3 (서열번호 3) 내에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 서열을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, aCD38-b-348 아미노산 서열은 또한 가변 중쇄 상보성 결정 영역 1, 2 및 3 (HCDR1, HCDR2 및 HCDR3)으로서 aCD38-b-348-HCDR1, aCD38-b-348-HCDR2, 및 aCD38-b-348-HCDR3 내에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 서열, 및 보다 바람직하게는 aCD38-b-348-HCDR123 (서열번호 4) 내에 또는 서열번호 14 내에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 서열을 포함하는 항체 서열을 지칭한다. 몇몇 실시양태에서, aCD38-b-348 아미노산 서열은 또한 가변 중쇄 서열로서 가변 중쇄 서열의 프레임워크 영역 내에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 서열을 포함하는 항체 서열을 지칭한다. 이러한 aCD38-b-348 아미노산 서열 요소 및 이러한 치환을 제시하는 항체는 aCD38-b-348, 및 일반적으로 CD38 조정 항체 작용제의 결합 및/또는 기능적 특성을 여전히 나타낼 수 있다.

[0048] 이러한 aCD38-b-348 아미노산 서열은 또한 가변 경쇄 상보성 결정 영역 3 (LCDR3)으로서 aCD38-b-348-LCDR3 (서열번호 7) 내에 1, 2, 3 또는 4개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 서열을 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, aCD38-b-348 아미노산 서열은 또한 가변 경쇄 상보성 결정 영역 1, 2 및 3 (LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)으로서 aCD38-b-348-LCDR1, aCD38-b-348-LCDR2, 및 aCD38-b-348-LCDR3 내에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 서열, 및 보다 바람직하게는 aCD38-b-348-LCDR123 (서열번호 8) 내에 또는 서열번호 19 내에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 서열을 포함하는 항체 서열을 지칭한다. 몇몇 실시양태에서, aCD38-b-348 아미노산 서열은 또한 가변 경쇄 서열로서 가변 경쇄 서열의 프레임워크 영역 내에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 서열을 포함하는 항체 서열을 지칭한다. 이러한 aCD38-b-348 아미노산 서열 요소 및 이러한 치환을 제시하는 항체는 aCD38-b-348, 및 일반적으로 CD38 조정 항체 작용제의 결합 및/또는 기능적 특성을 여전히 나타낼 수 있다.

[0049] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명은

[0050] a. aCD38-b-348의 가변 중쇄 영역 서열 (또는 그의 변이체, 예컨대 그의 친화성 성숙 변이체) 또는 aCD38-b-348의 가변 중쇄 영역 서열과 비교하여 5개 이하의 아미노산 치환을 갖는 가변 중쇄 영역 서열 (또는 그의 변이체, 예컨대 그의 친화성 성숙 변이체); 및/또는

[0051] b. aCD38-b-348의 가변 경쇄 영역 서열 (또는 그의 변이체, 예컨대 그의 친화성 성숙 변이체) 또는 aCD38-b-348의 가변 경쇄 영역 서열과 비교하여 5개 이하의 아미노산 치환을 갖는 가변 경쇄 영역 서열 (또는 그의 변이체, 예컨대 그의 친화성 성숙 변이체)

[0052] 을 포함하는 항-CD38 항체 작용제 (즉, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 본원에 기재된 바와 같은 그의 변이체, 예컨대 DG 모티프를 제거하도록 돌연변이유발된 변이체)를 제공한다.

[0053] 아미노산 치환을 혼입할 수 있는 aCD38-b-348 중쇄는 서열번호 4 및 14를 포함한다. 아미노산 치환을 혼입할 수 있는 aCD38-b-348 경쇄는 서열번호 8, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 및 23을 포함한다.

[0054] 아미노산 치환은 바람직하게는 항체의 기능적 특성에 역효과를 미치지 않거나, 또는 실질적으로 역효과를 미치지 않는다. 따라서, 치환은 보존적 아미노산 치환으로 간주될 수 있다. 바람직하게는, 아미노산 치환이 일어나는 경우, 아미노산 치환은 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 총 길이가 변하지 않을 정도인 1:1의 비율로 일어난다.

[0055] 본 발명은 또한 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서 항체의 경쇄 또는 중쇄 내의 DG 모티프는 예를 들어 아스파르테이트 이성질체화에 대한 감수성을 감소시키도록 변경될 수 있고/거나, 항체의 경쇄 또는 중쇄 내의 임의의 메티오닌은 예를 들어 메티오닌 산화를 감소시키도록 변경될 수 있다. 예를 들어, DG 모티프는 모티프 내의 아미노산 중 하나 또는 양자 모두를 상이한 아미노산으로 치환하도록 변경될 수 있다. 예를 들어, 이러한 모티프는 EG, DQ 또는 DA로 돌연변이유발될 수 있다. 메티오닌 잔기는 상이한 아미노산, 예를 들어 류신 또는 페닐알라닌으로 대체되도록 변경될 수 있다.

[0056] 따라서, 몇몇 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 그의 단편은 DG 모티프, 특히 CDR 영역에 나타나는 DG 모티프를 제거하거나 또는 변형하도록, 당업계에서 표준과 같이 아스파르테이트 이성질체화에 대한 감수성을 감소시키도록 돌연변이유발될 수 있다. 이 방법으로 변형된 이러한 항체는 최종 서열에 도달하기 전에 추가 변형 (예를 들어, 친화성 성숙)을 겪는 것을 필요로 한다.

[0057] 본 발명의 한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 항체의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열 (예를 들어, aCD38-b-348의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열), 또는 본원에 개시된 바와 같은 임의의 항체의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 (예를

들어, aCD38-b-348의 가변 중쇄 및 가변 경쇄)를 가지나, CDR (존재한다면) 내의 적어도 1개의 DG 모티프가 상이한 모티프로 변화된 것인 지정된 서열과는 상이한 변이체 항체가 제공된다. 개시된 변이체는 aCD38-b-348에 대해 기재된 바와 같이 사용되고 제제화될 수 있다.

[0058] 예를 들어, aCD38-b-348은 그의 LCDR3 서열에 DG 모티프를 함유한다. 몇몇 실시양태에서, DG 모티프의 아스파르테이트는 상이한 아미노산으로 변화될 수 있고/거나, DG 모티프의 글리신은 상이한 아미노산으로 변화될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 예를 들어, aCD38-b-348일 수 있거나, 또는 이로부터 유래될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 변이체 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 표 5에 제공된 바와 같은 VL CDR3 서열 (표지된 aCD38-b-348-m1, aCD38-b-348-m2, aCD38-b-348-m3 및 aCD38-b-348-m4)을 갖는다. 예를 들어, 변이체 LCDR3 서열 (예를 들어, aCD38-b-348-m1 변이체 LCDR3 서열, aCD38-b-348-m2 변이체 LCDR3 서열, aCD38-b-348-m3 변이체 LCDR3 서열 또는 aCD38-b-348-m4 변이체 LCDR3 서열)은 aCD38-b-348의 LCDR1 및/또는 LCDR2 서열을 포함하는 항체로 혼입될 수 있다. 한 실시양태에서, 변이체 LCDR3 서열 (예를 들어, aCD38-b-348-m1 변이체 LCDR3 서열, aCD38-b-348-m2 변이체 LCDR3 서열, aCD38-b-348-m3 변이체 LCDR3 서열 또는 aCD38-b-348-m4 변이체 LCDR3 서열)은 aCD38-b-348의 LCDR1, LCDR2, HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열을 포함하는 항체로 혼입될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 변이체 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 aCD38-b-348의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 포함할 수 있으나, DG 모티프를 제거하도록 돌연변이유발된 LCDR3 서열을 갖는다 (예를 들어, aCD38-b-348-m1-LCDR3, aCD38-b-348-m2-LCDR3, aCD38-b-348-m3-LCDR3 또는 aCD38-b-348-m4-LCDR3이 대신 LCDR3으로서 존재할 수 있음). 변이체 항-CD38 항체는 어미 aCD38-b-348의 임의의 및 가능하게는 모든 결합 및 기능적 특성을 갖는 추가 항체를 제공한다. 개시된 변이체는 aCD38-b-348에 대해 기재된 바와 같이 사용되고 제제화될 수 있다.

[0059] 따라서, 변이체 항체 aCD38-b-348-m1은 서열:

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLK
SRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDMWGQGMVTVSS (SEQ ID
 NO: 14)

[0060] 을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열:
 [0061]

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
SGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQEQEANVYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15).

[0062] 을 포함하는 변이체 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
 [0063]

[0064] 변이체 항체 aCD38-b-348-m2는 서열:

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLK
SRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDMWGQGMVTVSS (SEQ ID
 NO: 14).

[0065] 을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열:
 [0066]

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
SGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDSNVYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 16).

[0067] 을 포함하는 변이체 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
 [0068]

[0069] 변이체 항체 aCD38-b-348-m3은 서열:

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLK
SRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDMWGQGMVTVSS (SEQ ID
 NO: 14)

[0070]

- [0071] 을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열:
 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SCR~~ASQSV~~RSS~~YLAWYQQKPGQAP~~RLLI~~YGASSRATGIPDRFSGS
 GSGTDF~~TLTIS~~RLEPEDFAVYYCQ~~QDANVY~~TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 17).
- [0072] 을 포함하는 변이체 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0073] 변이체 항체 aCD38-b-348-m4는 서열:
 QLQLQESGPGLVK~~PSETLS~~LTCTVSGGSISSDYWG~~WIRQ~~PPGKGLEWIG~~SIYY~~SGSTYYNPSLK
 SRVTISV~~DTSKN~~QFSLKLSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDMWGQ~~TMV~~TVSS (SEQ ID
 NO: 14)
- [0075] 을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열:
 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SCR~~ASQSV~~RSS~~YLAWYQQKPGQAP~~RLLI~~YGASSRATGIPDRFSGS
 GSGTDF~~TLTIS~~RLEPEDFAVYYCQ~~QEGNVY~~TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 18).
- [0077] 을 포함하는 변이체 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0078] 본 발명은 또한 친화성 성숙 항체, 예를 들어 본원에 개시된 임의의 항체로부터 유래되는 친화성 성숙 변이체를 제공한다. 한 실시양태에서, 친화성 성숙 항체는 변경된 DG 모티프 및/또는 NG 모티프를 갖고/거나 임의의 메티오닌 잔기를 제거하거나 돌연변이유발되도록 변경된 친화성 성숙 항체이다. 개시된 친화성 성숙 변이체는 aCD38-b-348에 대해 기재된 바와 같이 사용되고 제제화될 수 있다.
- [0080] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 항체 (예를 들어, aCD38-b-348 또는 항원-결합 단편 또는 그의 변이체)를 제공하고, 항체가 친화성 성숙을 겪게 하는 것을 포함하는 항-CD38 항체의 제조 방법을 제공하며, 여기서 생성된 항체는 어미 항체보다 더 큰 친화성으로 CD38에 결합한다. 바람직하게는 생성된 항체는, 예를 들어 Kd에 의해 측정되는 바와 같이 어미 항체가 CD38에 결합하는 것보다 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 보다 바람직하게는 적어도 50% 더 큰 친화성으로 CD38에 결합한다. 친화성의 측정 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 하기 실시예에 기재되어 있다. 이러한 방법에 의해 생성된 친화성 성숙 항체는 다른 항-CD38 항체 작용제에 대해 본원에 기재된 바와 같이 제제화되고 사용될 수 있다.
- [0081] 친화성 성숙은 당업자에게 공지된 임의의 적합한 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 시험관내 항체 디스플레이 시스템은 높은 친화성을 갖는 특이적 항체의 생성을 위해 광범위하게 사용된다. 이들 시스템에서, 표현형 (즉, 항체 단편)은 항체의 서열의 직접적 결정을 허용하도록 유전자형 (즉, 항체 유전자)에 커플링된다. 결합체의 후속 선택을 가능하게 하는 항체 레퍼토리의 디스플레이를 달성하기 위해 여러 시스템이 개발되었으며, 선택의 엄격성을 증가시키는 것은 더욱 더 높은 친화성 변이체의 선택을 가능하게 한다. 항체 단편은 효모, 리보솜, 파지 디스플레이 입자에서 또는 DNA로의 직접적 커플링에 의해 발현될 수 있다.
- [0082] 현재 항체 친화성 성숙 방법은 두 가지 돌연변이유발 카테고리인 추계학(stochastic) 및 비-추계학(non-stochastic)에 속한다. 오류-유발(error-prone) 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR), 돌연변이유발유전자 세균 균주, 및 포화 돌연변이유발이 추계학 돌연변이유발 방법의 전형적인 예이다. 비-추계학 기술은 종종 알라닌-스캐닝 또는 부위-지정 돌연변이유발을 이용하여 특이적 변이체의 제한된 수집을 생성한다. 또한, 어미 항체의 서플링된 변이체를 수득하는 서플링 접근법이 또한 항체 친화성을 추가로 개선시키기 위해 이용될 수 있다.
- [0083] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 친화성 성숙의 방법은 추계학 돌연변이유발 (예를 들어, 오류-유발(error-prone) 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR), 돌연변이유발유전자 세균 균주, 또는 포화 돌연변이유발), 비-추계학 돌연변이유발 (예를 들어, 알라닌-스캐닝 또는 부위-지정 돌연변이유발), 서플링 (예를 들어, DNA 서플링, 연쇄 서플링 또는 CDR 서플링) 및 변형을 도입하기 위한 CRISPR-Cas9 시스템의 사용으로 이루어진 균으로부터 선택된다.
- [0084] 친화성 성숙 방법은 예를 들어, 문헌 [Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(24):8466-71], [Steinwand et al., MAbs, 2014, 6(1):204-18], 뿐만 아니라 [Handbook of Therapeutic Antibodies, Wiley, 2014, Chapter 6, Antibody Affinity (pages 115-140)]에 기재되어 있다.

- [0085] 몇몇 실시양태에서, 상기 방법 (즉, 친화성 성숙에 의해 항체를 생성시키는 방법)에 따라 제조된 항체를 제공하고, 항체를 적어도 하나 이상의 제약학적으로 허용가능한 부형제로 공동-제제화하는 것을 포함하는, 제약 조성물의 제조 방법이 제공된다. 제약 조성물의 제조에서 사용되는 항체는 aCD38-b-348의 친화성 성숙 변이체일 수 있다. 이러한 방법에 의해 제조된 제약 조성물은 다른 항-CD38 항체 작용제에 대해 본원에 기재된 바와 같이 본 발명의 치료 방법에서 사용될 수 있다.
- [0086] 본원에 기재된 바와 같은 제공되는 항체 및/또는 그의 항원-결합 단편 (예를 들어, 하나 이상의 aCD38-b-348 아미노산 서열 요소, 예컨대 aCD38-b-348-HCDR3 또는 aCD38-b-348-HCDR123을 포함할 수 있고/거나, 인간 CD38 및 비-인간 영장류 CD38, 예를 들어 시노몰구스 원숭이 CD38 등으로의 결합에 대해 aCD38-b-348과 경쟁할 수 있는 CD38 조정 항체 작용제)은 임의의 다양한 포맷으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 적절한 포맷은 모노클로날 항체, 도메인 항체, 단일쇄 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, 단일쇄 가변 단편 (scFv), scFv-Fc 단편, 단일쇄 항체 (scAb), 아프타머 또는 나노바디일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (및 특히 모노클로날 항체)은 토끼, 마우스, 키메라, 인간화 또는 완전 인간 항체 또는 그의 항원-결합 단편일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG, IgA, IgE, 또는 IgM 이소타입 (바람직하게는 인간 이소타입)의 항체 또는 그의 항원-결합 단편일 수 있으며, 이는 주어진 용도에 가장 적절할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG 이소타입, 보다 특히 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소타입 (바람직하게는 인간 IgG1)이다. 몇몇 실시양태에서, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (예를 들어, 추가 결합 및/또는 기능적 모이어티를 CD38 조정 항체 작용제, 예컨대 aCD38-b-348 아미노산 서열, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 회합하는 것이 바람직한 경우, 다중특이적 결합 작용제의 일부로서 제공됨)은 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 또는 당업계에서 이용가능할 수 있는 다른 다중특이적 포맷에 포함될 수 있다.
- [0087] 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제는 CD38-결합 실체 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편) 및 접합된 페이로드, 예컨대 치료제 또는 진단제를 포함한다. 많은 이러한 실시양태에서, 작용제는 "면역접합체"로 간주되고/거나 "면역접합체"라고 지칭된다. 특이적 면역접합체, 예컨대 항체-약물을 생성하기 위해 사용될 수 있는 기술 및 화합물의 예는 문헌 (Beck A et al., 2017)에 개시되어 있고, 여러 공지된 항-CD38 항체에 이용가능한 것으로 기재되어 있다 (WO2016166304).
- [0088] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 확인하는 aCD38-b-348 아미노산 서열을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 서열은 인간 CD38의 세포의 도메인 내의 에피토프 (예컨대, aCD38-b-ep), 및 임의로 또한 단리된 단백질로서 또는 CD38을 발현하는 세포 (예컨대, 면역 세포 또는 세포주, 예를 들어 라지 세포)의 표면 상에 시노몰구스 원숭이 및/또는 뮤린(murine) CD38의 대응 에피토프에 결합하는, 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 확인한다.
- [0089] 본 발명은 또한 본 발명의 CD38 조정 항체 작용제에 의해 결합되는 동일한 (또는 유사한) 에피토프에 결합하는 CD38 조정 항체 작용제를 제공한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, (aCD38-b-348 (또는 그의 변이체))로서 동일한 (또는 유사한) 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다.
- [0090] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 인간 CD38의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-CD38 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서 상기 에피토프는 서열번호 9의 아미노산 65-79에 포함되는 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함한다 (즉, aCD38-b-ep). 바람직하게는, 상기 에피토프는 적어도 4개의 아미노산을 포함하며, 여기서 상기 에피토프는 서열번호 9의 아미노산 65-79에 포함된 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 바람직하게는, 상기 에피토프는 적어도 5개의 아미노산, 적어도 6개의 아미노산, 적어도 7개의 아미노산, 적어도 8개의 아미노산, 적어도 9개의 아미노산, 적어도 10개의 아미노산, 적어도 11개의 아미노산, 적어도 12개의 아미노산, 적어도 13개의 아미노산, 또는 적어도 14개 또는 그 이상의 아미노산을 포함하며, 여기서 상기 에피토프는 서열번호 9의 아미노산 65-79에 포함된 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 상기 에피토프는 선형 또는 입체형태형, 즉 불연속형일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 CD38의 에피토프에 특이적으로 결합하며, 여기서 상기 에피토프는 서열번호 9의 아미노산 65-79에 포함된 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 또는 적어도 14개 또는 그 이상의 아미노산 잔기를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 항원-결합 단편은 서열번호 9의 아미노산 65-79를 포함하는 에피토프에 결합한다.
- [0091] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 동일한 에피토프, 특히 aCD38-b-ep (단백질 서열 ARCVKYTEIHPEMRH; 유니프롯 (UniProt) 서열 P28907, 서열번호 9 내의 아미노산 65-79)로서 실시예에서 확인된 에피토프에 대해 경쟁하여,

단리된 단백질로서 및 인간 CD38을 발현하는 세포의 표면 상에 인간 CD38 세포의 도메인에 결합하는 것을 가능하게 하는, aCD38-b-348 아미노산 서열을 포함하고/거나, 하나 이상의 aCD38-b-348 아미노산 서열 요소 (예를 들어, aCD38-b-348-HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 3)을 포함하고/거나, aCD38-b-348과 경쟁함)을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 견줄만한 결합 특징을 나타내는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 스크리닝 및/또는 특징화하기 위한 절차를 제공한다.

[0092] 더욱이, 본 발명은 또한 하나 이상의 aCD38-b-348 아미노산 서열 요소를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 견줄만한 기능적 특징을 나타내는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 스크리닝하기 위한 절차를 제공하며, 여기서 이러한 특징은 세포 활성화 및 세포독성 활성화, 및 CD38 조정 항체 작용제로서의 작용이다. 이들 범위에서, 후보 항체는 실시예에 기재된 검정 (도 1 참조), 또는 시험관내/생체의 검정, 세포-기반 검정, 및/또는 동물 모델에서 평가시 임의의 이러한 특징 (그러나, 가능하게는 이러한 특징 모두)의 존재를 확립하기 위한 당업계에 공지된 다른 검정에서 시험될 수 있다.

[0093] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 CD38 조정 항체 작용제. 예컨대 aCD38-b-348 아미노산 서열을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 제공된 핵산 분자는 코돈-최적화 핵산 서열을 함유할 수 있고/거나, 예를 들어 세균, 효모, 곤충, 어류, 무린, 원숭이, 또는 인간 세포와 같은 숙주 세포에서의 발현을 위한 적절한 핵산 벡터 내의 발현 카세트에 포함될 수 있다.

[0094] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, aCD38-b-348 아미노산 서열을 포함함)의 하나 이상의 특성, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 특성을 갖는, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편)를 발현하는 이종 핵산 분자 (예를 들어, DNA 벡터)를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, aCD38-b-348 아미노산 서열을 포함함)의 하나 이상의 특성, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 특성을 갖는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편)의 제조 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 방법은 핵산 (예를 들어, 숙주 세포에 포함될 수 있고/거나 벡터를 통해 숙주 세포에 전달될 수 있는 이종 핵산)을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 숙주 세포 (및/또는 이종 핵산 서열)는, CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편)가 숙주 세포로부터 분비되도록 (예를 들어, 세포 배양 상등액으로부터 단리될 수 있도록), 및/또는 세포 표면 상에 노출되도록 (예를 들어, 이러한 aCD38-b-348 아미노산 서열 및 서열 요소가 T 세포 상에 모노클로날 항체의 특이성을 그래프팅하는 인공 T 세포 수용체에서와 같이 이러한 세포의 문맥 내에서 또는 이와 함께 사용되도록 의도되는 경우) 배열되고 구축된다.

[0095] 몇몇 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 비-푸코실화될 수 있다. 항체 글리코실화가 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체, 재조합 항체, 및/또는 달리 유전자조작된 또는 단리된 항체)의 활성, 약물동태학 및 약력학에 영향을 줄 수 있고, Fc-융합 단백질 및 특정 기술이 원하는 글리코실화 프로파일을 갖는 항체를 획득하기 위해 활용될 수 있다는 것은 익히 공지되어 있다 (Liu L, 2015). 본 발명에 따라 사용하기 위한 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항-CD38 항체 (예를 들어, CD38 조정 항체 작용제일 수 있거나 또는 CD38 조정 항체 작용제로서 기재될 수 있는 항체를 포함함))의 세포독성을 지지하는 이펙터 기능은 항체 푸코실화 수준을 감소시키는 방법을 이용하여 향상될 수 있다. 이러한 특성을 나타내는 특이적 aCD38-b-348 서열 요소를 포함하는 항체는 예를 들어, 푸코실화 능력을 갖지 않거나 감소된 푸코실화 능력을 갖는 항체를 생성할 수 있는 세포주를 유전자 조작하는 기술을 이용하여 aCD38-b-348 서열을 발현시킴으로써 (이들 중 몇몇은 포텔리전트(Potelligent) (론자(Lonza)) GlyMAXX (프로비오젠(ProBiogen))와 같이 상업적으로 이용가능함), 또는 제조 방법을 조작함으로써, 예를 들어 삼투압농도의 제어 및/또는 효소 억제제의 사용에 의해 생성될 수 있다 (또한, 예를 들어 EP2480671에 기재된 방법 참조).

[0096] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 바람직한 특성을 갖는 제공되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (예를 들어, 본원에서 CD38 조정 항체 작용제라고 지칭되는 항체에 대해 기재된 바와 같이, 구체적으로 예를 들어, aCD38-b-348 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 그의 변이체를 포함함)을 포함하는 조성물 (예를 들어, 제약 조성물)을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 제공되는 조성물은 의학적 용도, 예컨대 치료적, 진단적 또는 예방적 용도를 위해 의도되고/거나, 의학적 용도, 예컨대 치료적, 진단적 또는 예방적 용도로 사용된다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 제공된 조성물은 제약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함할 수 있고/거나, 암의 치료에서 사용하기 위한 것일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 제약 조성물은 당업계에 공지된 바와 같은 하나 이상의 담체, 부형제, 염, 완충제 등으로 제제화될 수 있다. 당업자는 주어지는 방법 및/또는 투여 부위, 예를 들어 비경구 (예를 들어, 피하, 근육내, 또는 정맥내 주사), 점막, 종양내, 종양주위, 경구, 또는 국소 투여를 위한 방법 및/또는 투여 부위에 특히 바람직하고/거나 유용할 수 있는 제제화 기

술을 포함하는 여러 가지 제제화 기술을 알고 이를 용이하게 이용할 수 있을 것이다. 많은 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 부분)를 포함하는 제공된 제약 조성물은 비경구 전달 (예를 들어, 주사 및/또는 주입에 의한 비경구 전달)을 위한 것으로 제제화된다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 제공된 제약 조성물은 예를 들어, 사전충전형(pre-loaded) 주사기 또는 바이알 포맷으로 제공될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 제공된 제약 조성물은 예를 들어, 건조 (예를 들어, 동결건조된) 형태로 제공되고/거나 사용될 수 있고; 대안으로, 몇몇 실시양태에서, 이러한 제공된 제약 조성물은 액체 형태로 (예를 들어, 용액, 현탁액, 분산액, 에멀전 등으로서), 겔 형태 등으로 제공되고/거나 사용될 수 있다.

[0097] 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 암, 예컨대 B 세포 악성종양, 림프종 (호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, 골수종), 골수증식성 질환, 고형 종양 (예컨대, 유방 암종, 편평 세포 암종, 결장암, 두경부암, 폐암, 비뇨생식암, 직장암, 위암, 육종, 흑색종, 식도암, 간암, 고환암, 자궁경부암, 비만세포종, 혈관종, 눈암, 후두암, 구강암, 중피종, 피부암, 직장암, 인후암, 방광암, 유방암, 자궁암, 전립선 암, 폐암, 췌장암, 신장암, 위암, 비소세포 폐암, 및 난소암)의 치료에서의 및/또는 상기 치료를 위한 의약의 제조에서의, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편) (예를 들어, aCD38-b-348 아미노산 서열 요소를 포함함), 및/또는 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기 암은 또한 특이적 종양-관련 마커 및 항원, 예컨대 CD20, HER2, PD-1, PD-L1, SLAMF7, CD47, CD137, CD134, TIM3, CD25, GITR, CD38, EGFR 등, 또는 고도 현미부수체 불안정성 (MSI-H) 또는 불일치 복구 결핍 (dMMR)이라고 지칭되는 바이오마커를 갖는 것으로 확인된 암의 존재를 기반으로 정의될 수 있다. 더욱이, 이러한 조건은 또한 상기 암의 전암성, 비-침습성 상태, 예컨대 원위치발생암, 무증상 골수종, 의미미결정 단세포군 감마글로불린병증, 자궁경부 상피내 신생물, MALTomas/GALTomes 및 다양한 림프구증식성 질환을 정의하는 경우에 고려될 수 있다. 바람직하게는 몇몇 실시양태에서, 치료될 대상체는 고형 종양을 갖는다. 한 실시양태에서, 대상체는 혈액암을 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 CD38 양성 종양을 갖는다.

[0098] 그러므로, 몇몇 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 제공되는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편) (예를 들어, aCD38-b-348 아미노산 서열을 포함함)를 포함하는 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 암의 치료 방법을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 제공되는 방법은 대상체에게 하나 이상의 추가 작용제 또는 요법을 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다 (즉, 대상체가 병용 요법을 받도록). 몇몇 실시양태에서, 이러한 하나 이상의 추가 작용제 또는 요법은 항암 약물 (예를 들어, 화학요법제), 방사선요법 (신체에 외부적으로 방사선 조사를 적용함으로써 또는 방사선-접합된 화합물을 투여함으로써), 항-종양 항원 또는 마커 항체 (예를 들어, CD4, CD25, CA125, PSMA, c-MET, VEGF, CD137, VEGFR2, CD20, HER2, HER3, SLAMF7, CD326, CAIX, CD40, CD47, 또는 EGF 수용체인 항원 또는 마커), 관문 억제제 또는 면역조정 항체 (예를 들어, PD-1, PD-L1, TIM3, CD25, GITR, CD134, CD134L, CD137L, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, B7RP1, LAG3, ICOS, TIM3, GAL9, CD28, AP2M1, SHP-2, OX-40 등을 표적화하는 항체), 백신, 아주반트, 사용 표준 프로토콜(standard-of-use protocol), 암 세포를 표적화하거나 또는 암 세포에 대한 면역 반응을 자극하는 하나 이상의 다른 화합물, 또는 임의의 이들의 조합일 수 있거나, 또는 이를 포함할 수 있다. 특정 구체적인 실시양태에서, 이러한 하나 이상의 추가 작용제 또는 요법이 항체이거나 또는 항체를 포함하는 경우, 문헌에 나열된 것들 및 가능하게는 주어지는 암에 적용된 것들 중에서 이러한 항체의 포맷 및/또는 이러한 항체에 의해 표적화된 항원이 선택될 수 있다 (Sliwkowski M & Mellman I, 2013; Redman JM et al., 2015; Kijanka M et al., 2015).

[0099] 추가로, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 제공되는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편) (예를 들어, aCD38-b-348 아미노산 서열을 포함함) 또는 이러한 단리된 항체 또는 항원-결합 단편의 투여, 저장, 또는 다른 용도를 가능하게 하는 관련 조성물을 함유하는, 여러 가지 키트 또는 제조 용품을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 제공된 키트는 이러한 조성물을 임의로 하나 이상의 제조 용품, 희석제, 시약, 고체상, 및/또는 키트의 올바른 사용에 관한 지침서와 함께 포함하는 용기, 주사기, 바이알, 또는 다른 컨테이너를 포함한다.

[0100] 몇몇 실시양태에서, 특정 용도, 예컨대 의학적 용도를 위한, 및 특히 암 치료를 위한, 본원에 기재된 바와 같은 특정 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편) (예를 들어, aCD38-b-348 아미노산 서열을 포함함)의 확인, 특징화, 및/또는 검증은 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 검정 또는 시스템을 이용함으로써 수행될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 확인, 특징화, 및/또는 검증은, 예를 들어 상이한 실험 설정 및/또는 선택된 패널 (예를 들어, 암-유래 세포주)을 이용하는, 하나 이상의 세포-기반 검정에

서의 활성의 분석을 수반할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 특정 바람직한 CD38 조정 항체 작용제 활성화와 관련된 제안된 면역학적 메커니즘이 구체적으로 제공되는 경우, 바람직한 확인, 특정화, 및/또는 검증은, 암이 유도된 또는 암 세포가 이종이식편으로서 또는 동계/동종이계 암-유래 세포로서 이식된 동물 모델에서 생성되는 관련 데이터의 수집을 수반할 수 있다. 대안으로 또는 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, 모델 시스템 내에서 인간 면역 세포에 대한 CD38 조정 항체 작용제의 활성의 평가를 가능하게 하도록, 인간 세포, 예컨대 PBMC (즉, 인간화 PBMC 마우스 모델) 또는 CD34+ 조혈모세포 (즉, CD34+ 인간화 마우스)의 이동을 수반하는 동물 모델이 사용될 수 있다.

[0101] 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편) (예를 들어, aCD38-b-348 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 달리 CD38 조정 항체 작용제로서 본원에 기재된 작용제의 구조적 및/또는 기능적 특징을 포함함)의 관련 서열은 제약적 및/또는 기술적 이유로 보다 적절한 또는 바람직한 항체 프레임의 문맥에서 클로닝되고/거나 발현될 수 있다. 예를 들어, 이러한 서열 (가능하게는 코돈-최적화 VH 및 VL 코딩 서열로서)은 인간 IgG1 불변 영역 (hIgG1)과 함께 클로닝되고, 적절한 항체 발현 벡터 및 세포주 (예컨대, CHO-유래 세포주, 예를 들어 CHO-S)를 사용하여 발현될 수 있다. 몇몇 특정 실시양태에서, 인간 IgG1 포맷 항체에서의 제공되는 항체 서열의 발현 및 분비는, 세포 용균물에서의 감소된 조건 및 상등액에서의 비-감소된 조건에서의 형질감염 후 분석될 수 있으며, 이는 항체를 정제하기 위해 이후 사용될 것이다 (친화성 크로마토그래피, 겔 여과, 및/또는 다른 적절한 기술에 의해). 인간 IgG1 포맷의 제공된 항-CD38 항체 서열 (예를 들어, CD38 조정 항체 작용제-hIgG1)의 결합 및/또는 다른 기능적 특성은 예를 들어 하기 실시예에 기재된 하나 이상의 검정을 이용하여 분석될 수 있다. 예를 들어, 이러한 hIgG1-포맷 제공된 항체는 예를 들어, 유동 세포분석법을 이용하여 인간 및 시노물구스 PBMC로의 결합에 대해 평가될 수 있다. 대안으로 또는 추가적으로, 특이적 면역 세포 집단으로의 결합은 예를 들어, 특이적 면역 세포 집단에 대한 하나 이상의 특이적 마커, 예컨대 NK 세포에 대한 CD3, CD45, CD56 및 CD159 (NKG2A), CD14 (단핵구에 대한), CD19 (B 세포에 대한), 및/또는 CD4 / CD8 (T 세포에 대한)을 사용할 수 있는 유동 세포분석법을 이용하여 평가될 수 있다.

[0102] 더욱이, 건강한 인간 공여자 및/또는 환자로부터 단리된 인간 원발성 종양 세포 및/또는 면역 세포에 대한 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편) (예를 들어, aCD38-b-348 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 달리 CD38 조정 항체 작용제, 예컨대 CD38 조정 항체 작용제-hIgG1로서 본원에 기재된 작용제의 구조적 및/또는 기능적 특징을 포함함)의 효과가 평가될 수 있다. 개별 면역 세포 집단에 대한 잠재적인 효과를 더 자세히 조사하기 위해, 이러한 CD38 조정 항체 작용제는 PBMC 및/또는 종양 (및/또는 장기, 예컨대 림프절)로부터 단리된 세포, 및/또는 정제된 인간 CD8 및 CD4 T 세포, Treg 세포, MDSC 세포, 수지상 세포, 대식세포 및 단핵구, 호중구, NK 세포 및 다른 세포 유형을 처리하는데 사용될 수 있다. 잠재적인 리드아웃은 사이토카인 방출, 종양 세포 사멸, 세포 증식, 및/또는 활성화, 세포사멸 (apoptosis), 항원-특이적 및/또는 동종이계 반응, 또는 임의의 이들의 조합을 포함한다. 대안으로 또는 추가적으로, 마우스 또는 비-인간 영장류가 처리될 수 있고, 유동 세포분석법의 이용 또는 동물로부터의 다양한 장기 및/또는 세포의 단리 후 세포 상태가 뒤따를 수 있다.

[0103] 대안으로 또는 추가적으로, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편) (예를 들어, aCD38-b-348 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 달리 CD38 조정 항체 작용제, 예컨대 CD38 조정 항체 작용제-hIgG1로서 본원에 기재된 작용제의 구조적 및/또는 기능적 특징을 포함함)의 하나 이상의 특성은, CD38을 발현하는 세포 (예를 들어, NK 세포 또는 T-세포)에 대한 이러한 CD38 조정 항체 작용제의 효과; CD38 효소적 활성화, CD38 유도된 Ca²⁺ 수준 및 단백질 인산화, CD38 웨딩 및/또는 내재화, 세포내 경로 (예를 들어, NFκB 경로)의 CD38-유도성 활성화, 및/또는 CD31 및 다른 수용체 단백질 (예를 들어, CD16, TCR, BCR 등)과의 상호작용을 연구함으로써 단독으로 또는 조합으로 평가될 수 있다. CD38 하류 활성화에서 후자 프로세스의 관여는 또한 이들 프로세스의 특정 억제제를 사용하여 평가될 수 있다. 그 후, aCD38 조정 항체 작용제-hIgG1 항체가 시노물구스 원숭이에게 투여되는 경우, 이들 세포 효과가 생체내에서 뒤따를 수 있다.

[0104] 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 항체 (및 본원에 기재된 바와 같은 그의 변이체, 예컨대 DG 모티프를 제거하도록 돌연변이유발된 변이체)는 유리한 활성 프로파일을 가질 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (및 그의 변이체)은

[0105] - CD38+ 표적 세포에 대한 항체-의존성 세포-매개성 세포독성 (ADCC) 활성을 나타내고/거나;

[0106] - 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 나타내고/거나;

- [0107] - 항체-의존성 세포 식작용 (ADCP)을 나타내고/거나;
- [0108] - 면역 이펙터 세포 활성화를 유도할 수 있다.
- [0109] 바람직하게는, aCD38-b-348 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 동일한 조건 또는 실질적으로 동일한 조건 하에 다라투무맙과 비교하여 CD38+ 표적 세포에 대한 감소된 CDC 활성을 나타낸다.
- [0110] 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 항체-의존성 세포-매개성 세포독성 (ADCC) 활성은 실시예에 기재된 바와 같은 검정을 이용하여, 예를 들어 표적 세포로서 CD38+ 다우디(Daudi) 세포 및 이펙터 세포로서 인간 PBMC 세포를 사용하여 시험관내에서 결정될 수 있으며, 여기서 표적 세포 대 이펙터 세포의 비율은 약 50 대 1 내지 약 25 대 1이다.
- [0111] CD38+ 표적 세포에 대한 보체 의존성 세포독성 (CDC) 활성은 실시예에 기재된 바와 같은 검정을 사용하여, 예를 들어 10% 보체의 존재 하에 CD38+ 다우디 및/또는 라지(Raji) 세포를 사용하여 시험관내에서 결정될 수 있다. CDC 활성은 표적 세포를 인간 보체의 존재 하에 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 증가하는 농도의 항체로 처리함으로써 결정될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, CDC 활성은 10% 보체의 존재 하에 CD38+ 세포, 즉 CD38+ 다우디 세포의 최대 세포 용균율 백분율을 측정함으로써 결정될 수 있다. 주어지는 항체에 대한 최대 용균율은 실험마다 달라질 수 있다. 따라서, 예를 들어 EC50 값을 포함하는 CDC 활성, 및/또는 참고 항체 (예컨대, 다라투무맙)와 비교하여 최대 용균율 % 및/또는 EC50의 배수 차이를 측정하기 위한 다른 매트릭스를 고려하는 것이 도움이 된다. 따라서, 다라투무맙과 비교하여 더 적은 CDC 활성의 결정은 다라투무맙의 값과 비교한 최대 용균율 %, EC50, 및/또는 배수 변화와 관련된 것일 수 있다.
- [0112] 본 발명의 한 바람직한 실시양태에서, CD38 조정 항체 작용제는
- [0113] a) 다라투무맙보다 적어도 0.5배 더 높은 (또는 보다 바람직하게는 적어도 1배 더 높은) EC50으로; 또는
- [0114] b) 다라투무맙에 의해 나타나는 최대 용균율 %의 절반 이하인, 10% 보체의 존재 하에 라지(Raji) 및/또는 다우디(Daudi) 세포에서 측정되는 바와 같은 최대 용균율 %로
- [0115] CDC를 나타낼 수 있다.
- [0116] 물론, 다라투무맙의 CDC는 비교를 위해 동일한 조건 또는 실질적으로 동일한 조건에서 결정된다. CDC 활성은 약 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 항체 농도를 사용하여 결정될 수 있다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 세포의 최대 용균율을 결정할 때, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 필요에 따라 사용될 수 있으나, 최대 세포 용균율은 더 적은 항체 농도에서 발생할 수 있으므로, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도가 항상 요구되는 것은 아니다.
- [0117] 몇몇 실시양태에서, 다라투무맙과 비교하여 CDC 활성의 감소는, 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 EC50가 동일한 조건 또는 실질적으로 동일한 조건 하에 다라투무맙의 EC50보다 적어도 약 0.5배 더 큰 (즉, 적어도 약 1.5 곱절 더 큰), 또는 바람직하게는 적어도 약 1배 더 큰 (즉, 적어도 약 2 곱절 더 큰) 정도이다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 EC50는 10% 보체의 존재 하에 다우디 세포 및/또는 라지 세포에 대한 다라투무맙의 EC50보다 적어도 약 0.5배 더 크거나, 또는 바람직하게는 약 1배 더 크다.
- [0118] 몇몇 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 CD38+ 다우디 및/또는 라지 세포에 대해 적어도 약 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EC50으로 CDC를 유도한다 (그리고, 임의로 CDC에 의해 이러한 CD38+을 발현하는 세포의 60% 미만의 용균율을 초래한다). 몇몇 실시양태에서, 항체 또는 그의 단편은 CD38+ 다우디 및/또는 라지 세포에 대해 적어도 약 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 적어도 약 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 또는 적어도 약 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 EC50으로 CDC를 유도한다 (그리고, 임의로 약 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 항체 농도에서 CDC에 의해 이러한 CD38+을 발현하는 세포의 60% 미만의 용균율을 초래한다).
- [0119] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 CD38-발현 세포에 대한 항체-의존성 세포 식작용 (ADCP)을 나타낼 수 있다. ADCP 활성은 Fc γ R1Ia를 발현하는 이펙터 세포로서 주르카트 (Jurkat) 세포에서 Fc γ R1Ia 결합을 측정하는 리포터 세포 검정에 의해 결정될 수 있다. 이펙터 세포는 또한 NFAT-유도성 루시페라제를 발현한다. 상기 검정에서 표적 세포는 CD38을 발현하는 라지 세포일 수 있다. NFAT 신호전달은 상기 활성을 결정하기 위해 측정될 수 있다.
- [0120] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 시험관내 생성되는 T reg 세포에 대한 ADCP를 유도할 수 있다. 이는 실시예에 논의된 바와 같이 측정될 수 있다.
- [0121] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 동일한 조건 또는 실질적으

로 동일한 조건 하에 다라투무맙과 비교하여 더 큰 양으로 T 세포 활성화를 유도할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, T 세포 활성화는 luc_리포터 주르카트 세포에서 NFAT 신호전달을 측정함으로써 결정될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, luc_리포터 주르카트 세포에서 측정되는 바와 같이 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 의해 유도되는 NFAT 신호전달은 동일한 조건 또는 실질적으로 동일한 조건 하에 측정되는 다라투무맙의 NFAT 신호전달보다 적어도 약 10% 더 높다. 몇몇 실시양태에서, NFAT 신호전달은 동일한 조건 또는 실질적으로 동일한 조건 하에 측정되는 다라투무맙의 NFAT 신호전달보다 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30% 더 높다.

- [0122] 주르카트 세포에서의 NFAT luc_리포터 검정에서, NFAT 신호전달은 상대 발광 단위 (RLU)로 가용성 CD3 모노클로날 항체의 존재 하에 측정될 수 있다. CD3 모노클로날 항체는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 존재할 수 있고, 주르카트 세포는 약 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 내지 약 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (예를 들어, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 농도에서 항-CD38 항체로 자극될 수 있다. 이러한 검정을 이용하여, 오직 CD3만의 자극의 RLU가 기준선으로 사용되는 경우, NFAT 신호전달은 동일한 조건 또는 실질적으로 동일한 조건 하에 측정되는 다라투무맙의 NFAT 신호전달보다 적어도 약 30% 더 높을 수 있다.
- [0123] T 세포 활성화는 T 세포 증식의 증가, 및/또는 사이토카인 분비의 증가를 추가로 특징으로 할 수 있으며, 여기서 사이토카인은 IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-10 및 GM-CSF로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0124] T 세포 증식은 실시예에서와 같이, 예를 들어 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항체 농도에서 72시간 인큐베이션 후 및 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 항-CD3 항체의 존재 하에 결정되는 바와 같이 측정될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 미처리 세포와 비교하여 적어도 약 20% 만큼 CD4+ 및/또는 CD8+ 세포의 T 세포 증식을 증가시킨다. 몇몇 실시양태에서, T 세포 증식은 미처리 세포와 비교하여 적어도 약 25% 만큼, 적어도 약 30% 만큼, 적어도 약 35% 만큼, 또는 적어도 약 40% 만큼 증가한다.
- [0125] 바람직하게는 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 동일한 조건 또는 실질적으로 동일한 조건 (예를 들어, 72시간 동안 동일한 항체 농도에서 인큐베이션)에서 인간 IgG1로 처리된 세포와 비교하여 적어도 약 0.5배 (즉, 적어도 1.5 곱절 만큼 많이) 또는 적어도 1배 (즉, 적어도 2 곱절 만큼 많이) 또는 적어도 2배 (즉, 적어도 3 곱절 만큼 많이) 또는 적어도 3배 (즉, 적어도 4 곱절 만큼 많이) 만큼 CD4+ 및/또는 CD8+ 세포에서 T 세포 증식을 증가시킨다.
- [0126] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 동일한 조건 또는 실질적으로 동일한 조건 하에 다라투무맙에 의해 유도되는 양보다 더 큰 양으로 CD4+ 및/또는 CD8+ 세포에서 IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-10 및/또는 GM-CSF로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토카인의 분비를 유도한다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 다라투무맙과 비교하여 GM-CSF의 분비를 증가시킨다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 다라투무맙과 비교하여 IL-2의 분비를 증가시킨다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 다라투무맙과 비교하여 IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-10 및 GM-CSF의 분비를 증가시킨다. 사이토카인 분비는 실시예에서 제공되는 바와 같이, 예를 들어 72시간 인큐베이션 후 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항체 농도에서 결정되는 바와 같이 측정될 수 있다.
- [0127] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 NK 세포 활성화를 유도할 수 있다. NK 세포 활성화는 NK 세포 증식의 증가를 특징으로 할 수 있다. NK 세포 활성화는 대안으로 또는 추가적으로 나타나는 세포내 IFN γ 생성의 증가에 의해 및/또는 탈과립 마커 CD107a의 증가된 발현으로서 결정될 수 있다.
- [0128] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 시클라제 및/또는 NADase 활성화에 영향을 미칠 수 있다. CD38 NADase 활성화에 대한 효과는 실시예의 검정에서와 같이, 예를 들어 주르카트 세포에서 E-NAD⁺의 5'-eAMP로의 전환을 측정함으로써 측정될 수 있다. CD38 시클라제 활성화에 대한 효과는 실시예의 검정에서와 같이, 예를 들어 주르카트 세포에서 NGD⁺의 cGDPR로의 전환을 측정함으로써 측정될 수 있다.
- [0129] 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 CD38 시클라제 활성화에 대한 억제 효과를 갖는다. CD38 시클라제 활성화에 대한 억제 효과는 실시예의 검정에서와 같이, 예를 들어 주르카트 세포에서 NGD⁺의 cGDPR로의 전환을 측정함으로써 측정될 수 있다. CD38 시클라제 활성화에 대한 억제 효과는 주르카트 세포에서 NGD⁺의 cGDPR로의 전환에 의해 측정되는 바와 같이 IgG 비-결합 대조군 항체의 존재 하에 CD38 시클라제 활성화와 비교하여 적어도 10% 더 적은 CD38 활성을 초래할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 동일한 조건 또는 실질적으로 동일한 조건에서 CD38 시클라제 활성화에 대한 다라투무맙의 억제 효과보다 적은 CD38 시클라제에 대한 억제 효과를 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 항-CD38 항체 또는

그의 항원-결합 단편은 주르카트 세포에서 NGD+의 cGDP프로의 전환에 의해 측정되는 바와 같이 IgG 비-결합 대조군 항체의 존재 하에 CD38 시클라제 활성의 약 25% 이상으로 CD38 시클라제 활성을 감소시킨다. 바람직하게는 항체는 IgG 비-결합 대조군 항체의 존재 하에 CD38 시클라제 활성의 약 30% 이상으로, 약 40% 이상으로, 또는 약 50% 이상으로 CD38 시클라제 활성을 감소시킨다. 바람직하게는 항체는 IgG 비-결합 대조군 항체의 존재 하에 CD38 시클라제 활성의 25% 내지 95%, 약 30% 내지 90%, 또는 약 50% 내지 90%로 CD38 시클라제 활성을 감소시킨다. 이는 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 존재 하에 CD38 시클라제 활성이 주르카트 세포에 여전히 존재하나, IgG 비-결합 대조군 항체의 존재 하에서와 비교하여 감소된 양으로 존재한다는 것을 의미한다.

[0130] 다라투무맙은 시클라제 활성을 억제하고 NADase 활성을 자극하는 것으로 나타났다. 이와 대조적으로, 본 발명의 항체는 동일한 조건 또는 실질적으로 동일한 조건에서 CD38 시클라제 활성에 대한 다라투무맙의 억제 효과보다 적은 CD38 시클라제에 대한 억제 효과를 가질 수 있다.

[0131] 이러한 항-CD38 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (또는 그의 변이체)은 CD38+ 표적 세포에 대한 항체-의존성 세포-매개성 세포독성 (ADCC) 활성을 나타내고; 동일한 조건 또는 실질적으로 동일한 조건 하에 다라투무맙과 비교하여 CD38+ 표적 세포에 대한 감소된 CDC 활성을 나타내고 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 측정되는 EC50 값은 다라투무맙의 EC50 값의 적어도 2배일 수 있음); 면역 이펙터 세포 활성화를 유도하고; T 세포 증식을 유도하고; IL-2, IFN γ , TNF α , GM-CSF 및 IL-10을 포함하는 사이토카인 분비의 증가를 유도하고; NK 세포 활성화를 유도한다. 이러한 항체는 또한 CD38 시클라제 활성에 대한 약간의 억제 효과를 나타낼 수 있다.

[0132] 본 발명은 또한 항체 aCD38-b-348의 변이체 또는 유도체를 포함한다. 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 변이체 또는 유도체 (예를 들어, aCD38-b-348-m1, aCD38-b-348-m2, aCD38-b-348-m3 및 aCD38-b-348-m4)는 이들이 유래하는 항체와 동일한 기능적 프로파일 (즉, 약리적 특성)을 공유할 수 있다. 유사하게, 본 발명은 aCD38-b-348 (또는 그의 변이체)과 CD38로의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 항원-결합 단편을 포함한다. 이러한 경쟁 항체는 aCD38-b-348과 동일한 기능적 프로파일 (즉, 약리적 특성)을 가질 수 있다.

[0133] 제공되는 CD38 조정 항체 작용제 및 인간 CD38 간의 분자 상호작용에 대한 추가 이해를 얻기 위해, CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 한 특정 예를 제공하기 위해, aCD38-b-348-hIgG1 항체) 및 인간 CD38 단백질의 결정 구조가 결정될 수 있다. 제공되는 CD38 조정 항체 작용제 (구체적으로, 예를 들어 aCD38-b-348-hIgG1 항체를 포함함)의 용해성 및/또는 안정성은 용해성 연구, 가속 스트레스 연구, 동결 해동 연구 및 형식적 안정성 연구를 통해 평가될 수 있다. 항체의 응집 다음에, 외관 검사, 크기 배제 크로마토그래피 및 동적 광산란 및 OD_{280/320} 흡광도를 수행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0135] 도 1: 본 발명에 따른 하나 이상의 특성, 구체적으로 특히 관심있는 CD38 조정 항체 작용제의 특징으로서 본원에 기재된 특성을 갖는 효능제 항-CD38 항체로서 aCD38-b-348을 확인하기 위한 스크리닝 절차를 요약한 순서도: 제약학적으로 관련된 표적화된 세포 사멸 (예를 들어, ADCC, ADCP, 및 CDC 검정에서 측정되는 바와 같음), 면역 세포에 대한 효과 (예컨대, 세포 생존성 및/또는 증식, 사이토카인 분비, 및/또는 활성화 마커와 같은 특성을 측정하기 위한, Treg, CD8 및 CD4 T 세포, NK 세포, 수지상 세포, MDSC, 대식세포, 및/또는 단핵구), CD38 효소적 활성 또는 CD38-매개성 신호전달에 대한 효과, CD38을 발현하는 (또는 발현하지 않는) 암 세포에 대한 효과, 응집-유발 서열과 관련된 안정성 문제, 가변 도메인 내의 글리코실화 부위 또는 유리 시스테인의 존재 및/또는 효과 (예를 들어, 인간 IgG1 프레임 내에, Fab, 나노바디, 이중특이적/다중특이적 항체로서, 또는 비-항체 스캐폴드 내에)를 확인하기 위한, 다른 약물 (예를 들어, 중앙 항원을 표적화하는 항체 또는 다른 항암 약물) 및/또는 항체 서열 및 포맷과의 조합.

도 2: 관련 단백질 서열 (A) aCD38-b-348 단백질 서열. 중쇄 (aCD38-b-348-HCDR1 (서열번호 1), aCD38-b-348-HCDR2 (서열번호 2), 및 aCD38-b-348-HCDR3 (서열번호 3)) 및 경쇄 (aCD38-b-348-LCDR1 (서열번호 5), aCD38-b-348-LCDR2 (서열번호 6), 및 aCD38-b-348-LCDR3 (서열번호 7))에 대한 각각의 CDR은 별도로 표시되어 있고, 스크리닝 절차에 의해 초기에 확인된 바와 같은 중쇄 및 경쇄 항체의 프레임 서열 (각각 aCD38-b-348-HCDR123 (서열번호 4) 및 aCD38-b-348-LCDR123 (서열번호 8)) 내에 밑줄로 표시되어 있다. DG 모티프 (이중 밑줄)는 항체의 이성질체화 및 분해를 위한 핫스팟으로서 표시되고 (Sydow J et al. 2014), aCD38-b-348의 임의의 및 가능하게는 모든 결합 및 기능적 특성을 갖는 대안적인 항-CD38 항체를 제공하기 위해 돌연변이 유발될 수 있다. (B) 인간 CD38의 서열 (유니프록트 코드 P28907, (서열번호 9)). 여기서, 상이한 박스는 다라투무맙 에피토프

(DARA는 WO2006099875에서 확인되고 개시된 바와 같이 2개의 인간 CD38 영역에 의해 형성되며, 이는 본원에서 DARAep-a 및 DARAep-b로서 표시됨) 중 하나와 비교하여, 세포질 도메인, 막횡단 도메인, 및 사전에 확인된 바와 같은 aCD38-b-348 주요 에피토프 (aCD38-b-ep)의 세포의 도메인 내 위치를 확인한다.

도 3: 증가하는 항체 농도에서 시노몰구스 원숭이 (A) 또는 인간 기원 (B)의 세포를 사용하고, CD8-양성 또는 CD4-양성 세포에 대한 분석을 한정하고, 인간 IgG1 이소타입 대조군, 다라투무맙 (DARA)과 또는 일차 항체의 부재 하에 비교함으로써, PBMC에서 발현된 CD38에 결합하는 aCD38-b-348의 특징화.

도 4: 임의의 추가 종양 표적화 항체의 투여로부터 독립적으로 세포-기반 모델에서 다라투무맙 (DARA) 또는 음성 대조군 항체 (항-인간 CD3 또는 인간 IgG1 이소타입)와 비교하여 aCD38-b-348의 기능적 특징화. (A) aCD38-b-348은 각각의 그래프에 나타난 바와 같이 TCR-매개성 CD4 및 CD8 T 세포 증식 백분율을 증가시킨다 (IgG1 및 각각의 항-CD38 항체는 10 - 5 - 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 시험되고; 항-CD3은 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 시험됨). (B) aCD38-b-348은 PBMC - MDA-MB-231 공동 배양 (비율 100:1)에서 NK 증식 및 활성화를 증가시킨다. CD56-양성 및 CD56-양성, CD137-양성 NK 세포의 증식 백분율이 각각의 그래프에 표시된다. (C) aCD38-b-348은 TCR-활성화된 CD4/CD8 T 세포에 의한 선택된 사이토카인의 분비를 증가시킨다 (시험된 공여자 5명 중 5명에서 유사한 패턴).

도 5: 세포독성과 관련하여 DARA와 비교하여 aCD38-b-348의 기능적 특징화. (A) aCD38-b-348 및 DARA 둘 모두는 CD38-양성 조절성 T 세포의 식작용을 유도함으로써 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 조절성 T 세포의 사멸을 유도한다. (B) 이러한 직접적 항체-매개성 사멸 효과는 다라투무맙 (DARA)에서와 같이 항체-의존성 세포-매개성 세포독성 (ADCC)을 동반하나, DARA와는 상이하게 보체-의존성 세포독성을 동반하지 않는다 (문헌에 기재된 바와 같이 CDC는 DARA에 대해 특히 유의함). (C) 더욱이, 활성이 항체 교차결합에 의해 저조하게 증가되는 DARA와 비교하면, aCD38-b-348에서는 다우디 세포에서 결정된 바와 같은 표적 세포 사멸이 항체 교차결합에 의해 강하게 유도된다.

도 6: 명시된 일수에 걸쳐 다우디 세포 (A) 및 라모스(Ramos) 세포 (B)의 정맥내 투여를 기반으로 두 가지 암 모델에서 동물 생존율과 관련하여 aCD38-b-348 (10 mg/kg로 투여됨)의 기능적 특징화. aCD38-b-348에 의한 처리는 음성 대조군과 비교하여 뿐만 아니라 다라투무맙 (DARA)과 비교하여 동물 생존율을 증가시킨다.

도 7: 옥텟(Octet) Red 96 기기 상에서 생물층 간섭계법에 의해 측정된, his 태그가 부착된 재조합 인간 CD38로의 항-CD38 항체 aCD38-b-348의 결합을 다라투무맙과 비교하여 나타낸다. 4.2 nM의 rhCD38-his를 Ni NTA 바이오센서에 로딩한 후, 7 nM의 항체를 로딩한 다음, 이를 키네틱스(Kinetics) 완충액에서 해리하도록 하였다.

도 8: 세포독성과 관련하여 DARA와 비교하여 aCD38-b-348의 기능적 특징화. aCD38-b-348은 NFAT 리포트 검정을 이용하여 측정된 바와 같은 ADCP 활성을 나타낸다.

도 9: 효소적 활성과 관련하여 다라투무맙 및 인간 IgG1 이소타입 대조군과 비교하여 aCD38-b-348의 기능적 특징화. aCD38-b-348 및 대조군 항체에 의해 주르카트 세포에서 CD38 시클라제 또는 NADase (가수분해효소) 활성의 억제 또는 활성화가 시험된다. (A) aCD38-b-348 ($p=0.34$) 및 DARA는 시클라제 활성을 감소시킨다. 그러나, aCD38-b-348에 대해 관찰된 적은 억제는 통계적으로 유의하지 않았다. (B) aCD38-b-348 및 DARA는 NADase 활성을 감소시키지 않는다.

도 10: 명시된 일수에 걸쳐 생체내 고형 종양 암 모델에서 동물 생존율과 관련하여 aCD38-b-348 (10 mg/kg로 투여됨)의 특징화. aCD38-b-348에 의한 처리는 음성 대조군과 비교하여 뿐만 아니라 다라투무맙 (DARA)과 비교하여 동물 생존율을 증가시켰다.

도 11: 주르카트 세포에서 NFAT 신호전달 luc_리포터 검정에서 다라투무맙 (DARA) 또는 음성 대조군 항체 (인간 IgG1 이소타입)와 비교하여 aCD38-b-348의 기능적 특징화. 세포가 10 내지 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항체 농도로 자극되는 경우, 및 CD3-유일한 자극의 RLU가 검정의 기준선으로서 사용되는 경우 (CD3-유일한 조건의 RLU를 다른 조건에서 공제함), 항체의 NFAT 신호전달 (상대 발광 단위 (RLU)로서 측정됨)은 다라투무맙의 NFAT 신호전달보다 적어도 30% 더 높다.

도 12: 옥텟 Red 96 기기 상에서 생물층 간섭계법에 의해 측정된, his 태그가 부착된 재조합 인간 CD38로의 aCD38-b-348 (도 12A)의 결합을 다라투무맙 (도 12B)과 비교하여 나타낸다. 4.2 nM의 rhCD38-his를 Ni-NTA 바이오센서에 로딩한 후, 다양한 농도의 항체 (도면에 나타난 바와 같음)를 로딩한 다음, 이를 키네틱스 완충액에서 해리하도록 하였다.

도 13: 10% 보체를 갖는 라지 세포에서 DARA 및 인간 IgG1 이소타입 대조군 항체와 비교하여 aCD38-b-348의 CDC를 나타낸다. aCD38-b-348은 DARA와 비교하여 감소된 CDC를 나타낸다.

도 14: 저용량 항-CD38 항체는 비-인간 영장류에서 T 세포 활성화를 증가시킨다. aCD38-b-348을 0.03 mg/kg의 용량으로 시노몰구스 원숭이에게 투여하였으며, T 세포 활성화를 평가하였다.

도 15: 변이체 aCD38-b-348 항체 A) aCD38-b-348-m1, B) aCD38-b-348-m2, C) aCD38-b-348-m3 및 D) aCD38-b-348-m4의 관련 중쇄 및 경쇄 단백질 서열. 중쇄 및 경쇄에 대한 각각의 CDR은 프레임 서열인 aCD38-b-348-m1에 대한 aCD38-b-348-m1-HCDR123 (서열번호 4) 및 aCD38-b-348-m1-LCDR123 (서열번호 20) 각각 내에, aCD38-b-348-m2에 대한 aCD38-b-348-m2-HCDR123 (서열번호 4) 및 aCD38-b-348-m2-LCDR123 (서열번호 21) 각각 내에, aCD38-b-348-m3에 대한 aCD38-b-348-m3-HCDR123 (서열번호 4) 및 aCD38-b-348-m3-LCDR123 (서열번호 22) 각각 내에, 및 aCD38-b-348-m4에 대한 aCD38-b-348-m4-HCDR123 (서열번호 4) 및 aCD38-b-348-m4-LCDR123 (서열번호 23) 각각 내에 밑줄로 표시되어 있다.

도 16: DARA 및 IgG1 대조군과 비교하여 다우디 세포로의 변이체 서열의 결합. CD38 발현 인간 세포주 (다우디)로의 결합은 20 µg/mL의 항-CD38 일차 항체를 첨가한 후, 반대수 계단 희석한 다음 (7개의 점), 이차 항체로 염색함으로써 시험하였다. aCD38-b-348 변이체는 어미 aCD38-b-348 및 DARA와 유사한 다우디 세포로의 결합을 나타낸다.

도 17: 세포독성과 관련하여 DARA와 비교하여 aCD38-b-348 및 그의 변이체 서열의 기능적 특징화. aCD38-b-348 및 그의 변이체 서열 뿐만 아니라 DARA는 항체-의존성 세포-매개성 세포독성 (ADCC)에 의해 CD38+ 세포주 (다우디)의 사멸을 유도하며, 활성 (EC50 또는 최대 용균율)의 검출가능한 차이는 없었다.

도 18: 명시된 일수에 걸쳐 라지 세포 (A) 및 라모스 세포 (B)의 정맥내 투여를 기반으로 두 가지 암 모델에서 동물 생존율과 관련하여 aCD38-b-348 및 변이체 aCD38-b-348-m2 (모두 10 mg/kg로 투여됨)의 기능적 특징화. aCD38-b-348에 의한 처리는 두 모델 모두에서 음성 대조군과 비교하여 및 DARA와 비교하여 동물 생존율을 증가시킨다. 변이체 aCD38-b-348-m2에 의한 처리는 두 모델 모두에서 음성 대조군과 비교하여 동물 생존율을 증가시킨다.

도 19: 비아코어(Biacore) 2000 상에 his 태그가 부착된 rhCD38에 대한 정제된 항체 (IgG1)의 SPR 기반 분석. A) aCD38-b-348, B) aCD38-b-348-m1, C) aCD38-b-348-m2, D) aCD38-b-348-m3 및 E) aCD38-b-348-m4.

도 20: hIgG1 이소타입, 다라투무맙 및 대조군과 비교하여 aCD38-b-348에 의해 유도되는 불활성화된 또는 IL-2 예비활성화된 인간 NK 세포의 탈과립.

도 21: hIgG1 이소타입 및 다라투무맙과 비교하여 aCD38-b-348에 의해 유도되는 종양 표적 (MDA-MB-231 세포)의 존재 또는 부재 하에 NK 세포의 IFN γ 생성.

도 22: hIgG1 이소타입 및 다라투무맙과 비교하여 aCD38-b-348에 의해 유도되는 MDA-MB-231 종양 세포의 존재 하에 인간 NK 세포의 NK 세포 증식. A) 항체는 10 µg/mL에서 시험되었다. B) 0.4 µg/mL로부터 10 µg/mL까지의 항체의 용량 적정이 시험되었다.

도 23: 옥텟에서의 경쟁 검정. 고정화 rhCD38로의 aCD38-b-348의 결합 후에 제1 항체 다시 (다라투무맙 - 대조군으로서) 또는 제2 Ab (aCD38-b-348)의 결합이 뒤따른다. 비-경쟁자 항체는 다른 항체 (나타냄)의 존재 하에 CD38에 결합할 것이나, 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 경쟁할 것이며, 추가 결합이 관찰되지 않을 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0136] 본원에서 사용되는 용어, 기술적 의미, 및 실시양태의 특정 정의가 하기 제공되며, 이들 중 많은 또는 대부분의 것들은 당업자의 공통 이해를 확인해 준다.

[0137] 투여: 본원에서 사용되는 용어 "투여"는 대상체로의 조성물의 투여를 지칭한다. 동물 대상체 (예를 들어, 인간)로의 투여는 임의의 적절한 경로에 의한 투여일 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 투여는 기관지 (기관지 점적주입에 의한 투여를 포함함), 흡취, 장관, 동맥내, 피내의, 위내, 골수내, 근육내, 비내의, 복강내, 경막내, 정맥내, 심실내, 특정 장기 또는 조직 내 (예를 들어, 간내, 종양내, 종양주위 등), 점막, 비측, 경구, 직장, 피하, 설하, 국소, 기관 (기관내 점적주입에 의한 투여를 포함함), 경피, 질 및 유리체 투여일 수 있다. 투여는 간헐적 투약을 수반할 수 있다. 대안으로, 투여는 적어도 선택된 기간 동안의 연속적 투여 (예를 들어, 관류)를 수반할 수 있다. 당업계에 공지된 바와 같이, 항체 요법은 보편적으로 비경구로, 예를 들

어 정맥내, 피하, 또는 종양내 주사 (예를 들어, 특히 종양 내에 고용량이 바람직한 경우)에 의해 투여된다.

[0138] 작용제: 본원에서 사용되는 용어 "작용제"는 예를 들어, 폴리펩티드, 핵산, 사카라이드, 소분자, 금속, 또는 이들의 조합을 포함하는 임의의 화학적 부류의 화합물 또는 실체를 지칭할 수 있다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 작용제의 특정 실시양태는 소분자, 약물, 호르몬, 항체, 항체 단편, 아프타머, 핵산 (예를 들어, siRNA, shRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임), 펩티드, 펩티드 모방체 등을 포함한다. 작용제는 폴리머일 수 있거나 또는 이를 포함할 수 있다.

[0139] 항체: 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 특정 표적 항원, 예컨대 CD38, 특히 인간 CD38, 및 세포외 인간 CD38로의 특이적 결합을 부여하기에 충분한 정준 이뮤노글로불린 서열 요소를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 당업계에서 공지된 바와 같이, 자연에서 생성되는 바와 같은 무손상 항체는, "Y자 형상" 구조라고 보편적으로 지칭되는 것으로 서로 회합하는, 2개의 동일한 중쇄 폴리펩티드 (각각 약 50 kD) 및 2개의 동일한 경쇄 폴리펩티드 (각각 약 25 kD)로 구성된 대략 150 kD 사량체 작용제이다. 각각의 중쇄는 적어도 4개의 도메인 (각각 약 110 개의 아미노산 길이), 아미노-말단 가변 (VH) 도메인 (Y 구조의 끝 부분에 위치됨), 그 다음에 3개의 불변 도메인: CH1, CH2, 및 카르복시-말단 CH3 (Y의 줄기의 기저에 위치됨)으로 구성된다. "스위치"라고 공지된 짧은 영역은 중쇄 가변 및 불변 영역을 연결한다. "힌지"는 CH2 및 CH3 도메인을 항체의 나머지 부분에 연결한다. 상기 힌지 영역에서의 2개의 디설피드 결합은 무손상 항체에서 2개의 중쇄 폴리펩티드를 서로에 연결한다. 각각의 경쇄는 2개의 도메인 (또 다른 "스위치"에 의해 서로 분리된, 아미노-말단 가변 (VL) 도메인, 그 다음에 카르복시-말단 불변 (CL) 도메인)으로 구성된다. 무손상 항체 사량체는 중쇄 및 경쇄가 단일 디설피드 결합에 의해 서로 연결된, 2개의 중쇄-경쇄 이량체로 구성되고; 2개의 다른 디설피드 결합은 이량체가 서로 연결되어 사량체가 형성되도록 중쇄 힌지 영역을 서로에 연결한다. 자연적으로 생성된 항체는 또한 전형적으로 CH2 도메인 상에 글리코실화되고, 각각의 도메인은 압축된 역평행 베타 배열에 서로에 대해 패킹된 2개의 베타 시트 (예를 들어, 3-, 4-, 또는 5-가닥 시트)로부터 형성된 "이뮤노글로불린 접힘"을 특징으로 하는 구조를 갖는다. 각각의 가변 도메인은 "보체 결정 영역"이라고 공지된 3개의 추가변 루프 (CDR1, CDR2, 및 CDR3; 당업계에서 이해되는 바와 같이, 예를 들어 카바트 번호매김 식에 따라 결정됨) 및 4개의 다소 불변인 "프레임워크" 영역 (FR1, FR2, FR3, 및 FR4)을 함유한다. 천연 항체가 접힌 경우, FR 영역은 도메인을 위한 구조적 프레임워크를 제공하는 베타 시트를 형성하고, 중쇄 및 경쇄 둘 모두로부터의 CDR 루프 영역은 Y 구조의 끝 부분에 위치된 단일 추가변 항원-결합 부위를 생성하도록 삼차원 공간에서 함께 제공된다. 천연 항체의 Fc 영역은 보체 시스템의 요소에 결합하고, 또한 예를 들어 세포독성을 매개하는 이펙터 세포를 포함하는 이펙터 세포 상의 수용체에 결합한다. 당업계에서 공지된 바와 같이, Fc 수용체에 대한 Fc 영역의 친화성 및/또는 다른 결합 속성은 글리코실화 또는 항체의 개발 가능성을 개선시킬 수 있는 다른 변형을 통해 조정될 수 있다 (Jarasch A et al., 2015).

[0140] 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따라 생성되고/거나 사용되는 항체는 이러한 글리코실화로 변형된 또는 유전자조작된 Fc 도메인을 포함하는 글리코실화된 Fc 도메인을 포함한다. 본 발명의 목적을 위해, 특정 실시양태에서, 천연 항체에서 발견되는 바와 같은 충분한 이뮤노글로불린 도메인 서열을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 복합체는, 이러한 폴리펩티드가 자연적으로 생성되거나 (예를 들어, 항원에 대해 반응하는 유기체에 의해 생성됨), 또는 재조합 유전자조작, 화학적 합성, 또는 다른 인공 시스템 또는 방법에 의해 생성되는 것인 "항체"라고 지칭되고/거나 사용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 항체는 폴리클로날 또는 올리고클로날이며, 즉 항체들의 패럴로서 생성되고, 각각의 항체는 단일 항체 서열에 회합되고, 항원 내의 다소간 특유의 에피토프 (예컨대, 상이한 참고 항-CD38 항체에 회합된 인간 CD38 세포외 도메인 내의 상이한 에피토프)에 결합한다.

[0141] 폴리클로날 또는 올리고클로날 항체는 문헌 (Kearns JD et al., 2015)에 기재된 바와 같이 의학적 용도를 위한 단일 제제로 제공될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 항체는 모노클로날이다. 몇몇 실시양태에서, 항체는 마우스, 토끼, 영장류, 또는 인간 항체의 특징인 불변 영역 서열을 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 항체 서열 요소는 당업계에 공지된 바와 같이 인간화, 영장류화, 키메라 등이다. 더욱이, 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 적절한 실시양태에서 (달리 언급되지 않는 한 또는 문맥으로부터 명백하지 않는 한) 대안적인 체에서 항체 구조적 및 기능적 특징을 이용하기 위한, 당업계에 공지되거나 또는 개발된 임의의 구축물 또는 포맷 (예를 들어, 하기 정의된 바와 같은 항원-결합 단편으로서)을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 항체는 무손상 IgG, IgE 및 IgM, 이중특이적 또는 다중특이적 항체 (예를 들어, Zybodies® 등), 단일쇄 가변 도메인 (scFv), 폴리펩티드-Fc 융합체, Fab, 낙타 항체, 중쇄 상어 항체 (IgNAR), 차폐 항체 (예를 들어, Probodyes®), 또는 세포 표면 상에 발현 및 노출을 가능하게 하는 폴리펩티드와의 융합 단백질 (T 세포 상으로 모노클로날 항체의 특이성을 그래프팅하는데 사용되는 인공 T 세포 수용체를 수득하기 위한 구축물 내의 scFv로서)로부터 선택되거나 이에 제한되지 않는 포맷의 항체이다. 몇몇 실시양태에서, 항체는 자연적으로 생성되는 경

우 갖게 되는 공유결합 변형 (예를 들어, 글리칸의 부착)을 갖지 않을 수 있다. 대안으로, 항체는 공유결합 변형 (예를 들어, 글리칸, 페이로드 [예를 들어, 검출가능한 모이어티, 치료적 모이어티, 촉매적 모이어티 등], 또는 다른 펜던트기 [예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 등]의 부착)을 함유할 수 있다.

[0142] 항원: 본원에서 사용되는 용어 "항원"은 면역 반응을 일으키고/거나 T 세포 수용체 (예를 들어, MHC 분자에 의해 제시되는 경우) 및/또는 B 세포 수용체에 결합하는 작용제를 지칭한다. 항원-특이적 항체의 생성을 수반하는 체액성 반응을 일으키는 항원, 또는 CD38 세포외 도메인에 대해 실시예에 나타난 바와 같은 항원은 항체 라이브리리를 스크리닝하고 추가로 특징화되는 후보 항체 서열을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0143] 항원-결합 단편: 본원에서 사용되는 용어 "항원-결합 단편"은 항원-결합 단편 상에 항체에 의해 표적화되는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 부여하기에 충분한, 본원에 기재된 바와 같은 항체의 하나 이상의 부분을 포함하거나 또는 보유하는 작용제를 포괄한다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 상기 용어는 특이적 결합을 부여하기에 충분한 이뮤노글로불린 구조적 요소를 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 복합체를 포괄한다. 예시적인 항원-결합 단편은, 스몰 모듈라 이뮤노파르마슈티칼스 (Small Modular Immunopharmaceuticals, "SMIPs™"), 단일쇄 항체, 나타 항체, 단일 도메인 항체 (예를 들어, 상어 단일 도메인 항체), 단일쇄 또는 탠덤 디아바디 (TandAb®), VHH, 안티칼린(Anticalin)®, 나노바디®, 미니바디, BiTE®, 안키린 반복 단백질 또는 DARPIN®, 아비머(Avimer)®, DART, TCR-유사 항체, 아드넥틴(Adnectin)®, 아필린(Affilin)®, 트랜스-바디(Trans-body)®, 아피바디(Affibody)®, TrimerX®, 미소단백질, 센티린(Centyrin)®, CoVX 바디, 바이시클릭 펩티드, 쿠니츠(Kunitz) 도메인 유래된 항체 구조물, 또는 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 임의의 다른 항체 단편을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 몇몇 실시양태에서, 상기 용어는 다른 단백질 구조, 예컨대 스테이플드 펩티드, 항체-유사 결합 펩티드모방체, 항체-유사 결합 스캐폴드 단백질, 모노바디, 및/또는 다른 비-항체 단백질 스캐폴드 (예를 들어, 문헌 (Vazquez-Lombardi R et al., 2015)에서 검토된 것과 같음)를 포괄한다. 몇몇 실시양태에서, 항원-결합 단편은 아미노산 서열이 상보성 결정 영역 (CDR)으로 당업자에 의해 인식되는 하나 이상의 구조적 요소를 포함하는 것인 폴리펩티드이거나 상기 폴리펩티드를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항원-결합 단편은 아미노산 서열이 본원에 기재된 바와 같은 항-CD38 항체에서 발견되는 것과 실질적으로 동일한 적어도 1개의 참고 CDR (예를 들어, 적어도 1개의 중쇄 CDR 및/또는 적어도 1개의 경쇄 CDR) (예를 들어, aCD38-b-348 아미노산 서열 요소에서), 및 특히 적어도 1개의 중쇄 CDR, 예컨대 HCDR3 (예를 들어, aCD38-b-348-HCDR3 서열)을 포함하는 것인 폴리펩티드이거나 또는 상기 폴리펩티드를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항원-결합 단편은, 아미노산 서열이, 참고 CDR이 유래되는 항체 (예를 들어, aCD38-b-348)의 표적로서의 결합을 유지하면서, 서열이 동일하거나, 또는 이러한 참고 CDR과 관련하여 소수 (예를 들어, 1, 2, 3, 또는 4) 또는 그 이상의 아미노산 변경 (예를 들어, 치환, 첨가, 또는 결실; 많은 경우에, 치환)을 함유하는 적어도 1개의 CDR (예를 들어, 적어도 1개의 중쇄 CDR 및/또는 적어도 1개의 경쇄 CDR)을 포함하는 것인 폴리펩티드이거나 또는 상기 폴리펩티드를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항원-결합 단편은 참고 항체의 중쇄 또는 경쇄로부터 (예를 들어, aCD38-b-348로부터) 3개의 CDR 모두 (또는, 몇몇 실시양태에서, 이와 실질적으로 동일한 서열)를 포함하는 폴리펩티드 또는 그의 복합체이거나, 또는 상기 폴리펩티드 또는 그의 복합체를 포함하고; 몇몇 실시양태에서, 항원-결합 단편은 참고 항체로부터 (예를 들어, aCD38-b-348로부터) 6개의 CDR 모두 (또는, 몇몇 실시양태에서, 이와 실질적으로 동일한 서열)를 포함하는 폴리펩티드 또는 그의 복합체이거나, 또는 상기 폴리펩티드 또는 그의 복합체를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항원-결합 단편은 참고 항체의 (예를 들어, aCD38-b-348의) 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인 (또는, 몇몇 실시양태에서, 이와 실질적으로 동일한 서열)을 포함하는 폴리펩티드 또는 그의 복합체이거나, 또는 상기 폴리펩티드 또는 그의 복합체를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 용어 "항원-결합 단편"은 비-펩티드 및 비-단백질 구조, 예컨대 핵산 아프타머, 예를 들어 RNA 아프타머 및 DNA 아프타머를 포괄한다. 아프타머는 특정 표적, 예컨대 폴리펩티드에 결합하는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, DNA, RNA, 또는 그의 유사체 또는 유도체)이다. 아프타머는 다양한 분자 표적, 예컨대 소분자, 단백질, 핵산, 및 심지어 세포 및 조직에 특이적으로 결합하는 짧은 합성 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이다. 이들 작은 핵산 분자는 단백질 또는 다른 세포 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 이차 및 삼차 구조를 형성할 수 있으며, 본질적으로 항체의 화학적 균등물이다. 아프타머는 고도로 특이적이고, 크기가 상대적으로 작고, 비-면역원성이다. 아프타머는 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment)로서 공지된 바이오패닝 방법으로부터 일반적으로 선택된다 (예를 들어, 문헌 [Ellington et al. Nature. 1990; 346(6287): 818-822]; [Tuerk et al., Science. 1990; 249(4968):505-510]; [Ni et al., Curr Med Chem 2011; 18(27):4206-14] 참조). 임의의 주어지는 표적에 대한 아프타머의 제조 방법은 당업계에 익히 공지되어 있다. 아피머를 포함하는 펩티드 아프타머가 또한 포괄된다. 아피머는 특이적 표적 단백질에 대한 높은 친화성 결합 표면을 제공하는 펩티드 루프를 디스플레이 하도록 유전자조작된 작고 고도로 안정한 단백질이다. 이는 시스타틴의 시스테인 프로

테아제 억제제 패밀리로부터 유래되는 저분자량 12-14 kDa의 단백질이다. 아피머 단백질은 시스타틴 단백질 접힘을 기반으로 하는 안정한 단백질인 스캐폴드로 구성된다. 이는 높은 친화성 및 유사한 특이성을 갖는 상이한 표적 단백질을 항체에 결합시키도록 불규칙화될 수 있는 2개의 펩티드 루프 및 N-말단 서열을 디스플레이 한다. 단백질 스캐폴드 상의 펩티드의 안정화는 펩티드가 취할 수 있는 가능한 입체형태를 구속하여, 이에 의해 유리 펩티드의 라이브리리와 비교하여 결합 친화성 및 특이성을 증가시킨다.

[0144] 서열 동일성 백분율(%): 2개의 서열 간의 "서열 동일성" 백분율(%)은 당업계에서 공지된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 펩티드, 폴리펩티드 또는 항체 서열에 관한 서열 동일성은, 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위해 필요에 따라 서열을 정렬하고 갭을 도입하고, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않은 후, 특정 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율이 라고 정의될 수 있다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 정렬은 당업계의 기술 내에 있는 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2 ((단백질에 대한) 갭핑된 BLAST, 및 BLASTp 포함) (Altschul SF et al (1997)), 또는 FASTA를 이용하여, 디폴트 파라미터를 이용하여 달성될 수 있다.

[0145] 생물학적 샘플. 본원에서 사용되는 용어 "생물학적 샘플" 또는 "샘플"은 전형적으로 본원에 기재된 바와 같이 관심있는 생물학적 공급원 (예를 들어, 조직 또는 유기체 또는 세포 배양물)으로부터 획득되거나 또는 이로부터 유래된 샘플을 지칭한다. 관심있는 공급원은 유기체, 예컨대 동물 또는 인간일 수 있다. 생물학적 샘플은 생물학적 조직 또는 유체를 포함할 수 있다.

[0146] 암: 본원에서 상호교환 가능하게 사용되는 용어 "암", "악성종양", "신생물", "종양(tumor)", "종양(tumour)", 및 "암종"은 상대적으로 비정상적인, 제어되지 않는 및/또는 자율적인 성장을 나타내어, 세포 증식 제어의 유한 손실을 특징으로 하는 이상 성장 표현형을 나타내는 세포를 지칭한다. 일반적으로, 본 출원에서 검출 또는 치료에 대한 관심있는 세포로는 전암성 (예를 들어, 양성), 악성, 전전이성, 전이성, 및 비-전이성 세포를 들 수 있다. 본 개시의 교시는 임의의 및 모든 암과 관련된 것일 수 있다. 그러나 몇몇의 비제한적인 예를 제공하기 위해, 몇몇 실시양태에서, 본 개시의 교시는 하나 이상의 암, 예를 들어 백혈병, 림프종 (호지킨 및 비-호지킨), 골수종 및 골수증식성 질환을 포함하는 조혈암; 육종, 흑색종, 선종, 고형 조직의 암종, 구강, 인후, 후두 및 폐의 편평 세포 암종, 간암, 비노생식암, 예컨대 전립선암, 자궁경부암, 방광암, 자궁암 및 자궁내막암, 및 신장 세포 암종, 골암, 췌장암, 피부암, 피부 또는 안내 흑색종, 내분비계의 암, 갑상선의 암, 부갑상선의 암, 두경부암, 유방암, 위장관암 및 신경계암, 양성 병변, 예컨대 유두종 등에 적용된다. 본 발명의 항체는 CD38+를 발현하는 종양의 치료에서 사용될 수 있다.

[0147] CD38 조정 항체 작용제. 본원에서 사용되는 용어 "CD38 조정 항체 작용제"는 본원에 기재된 바와 같은 특정 특성을 나타내는 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 항체)를 지칭한다. 많은 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 바람직한 CD38 조정 항체 작용제는 면역 이펙터 세포를 자극하고/거나 면역 세포 기능을 변형하고, CD38을 발현하는 세포 (예를 들어, 높은 수준의 CD38을 발현하는 세포), 예컨대 면역억제성 세포 또는 종양 세포 (예를 들어, 각각의 경우에, 그의 표면 상에서 CD38을 발현하는 세포)에 대해 세포독성을 갖거나 그의 식작용을 유도하는 것을 특징으로 한다. 몇몇 실시양태에서, CD38 조정 항체 작용제는 면역 세포 (예를 들어, 면역 세포, 및 특히 CD38을 발현하는 면역 세포와 접촉하는 경우) 및 종양 세포와 관련하여 aCD38-b-348의 것과 상당히 견줄만한 활성 (예를 들어, 수준 및/또는 유형)을 특징으로 한다. 몇몇 실시양태에서, 관련 활성은 ADCP, CDC 부재 하의 ADCC, 직접적 사멸, 특정 CD38-발현 세포 (예를 들어, 고발현 세포)의 고갈, 이펙터 면역 세포 활성화, T 세포의 촉진, B 세포 또는 NK 세포 팽창, 면역 세포 활성화의 조정 (예를 들어, 억제성 대식세포의 염증성 대식세포로의 재분극), T 세포 레퍼토리의 스쿠잉 등 및 이들의 조합이거나, 또는 이를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, CD38 조정 항체 작용제는 그의 존재 또는 수준이 CD38의 수준 및/또는 활성과 상관관계가 있고/거나 CD38 활성의 하나 이상의 특징 또는 특징적인 결과와 상관관계가 있는 실체 또는 모이어티이다. 몇몇 실시양태에서, 증가된 수준 및/또는 활성은 실체(들) 또는 모이어티(들)의 부재 하에 달리 견줄만한 조건 하에 관찰되는 것과 관련하여 평가되거나 또는 결정된다. 대안으로 또는 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, 증가된 수준 및/또는 활성은 참고 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 적절한 참고 항-CD38 항체 (많은 실시양태에서, 이는 CD38 효능제 항체, 예컨대 IB4임))가 존재하는 경우 견줄만한 조건 하에 관찰되는 것과 견줄만하거나 또는 이보다 더 크다. 많은 실시양태에서, 본 개시에 따라 사용하기 위한 CD38 조정 항체 작용제는 직접적으로 또는 간접적으로 CD38에, 전형적으로 그의 세포의 도메인에 결합하는 실체 또는 모이어티이거나 또는 이를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, CD38 조정 항체 작용제는 본원에 예시된 바와 같은 항-CD38 항체, 그의 항원-결합 단편 (예를 들어, 하나 이상의 CDR, 모든 중쇄 CDR, 모든 경쇄 CDR, 모든 CDR, 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 또는

중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 둘 모두를 포함함), 그의 친화성 성숙 변이체 (또는 그의 항원-결합 단편), 또는 임의의 앞서 언급된 것들의 임의의 대안적인 포맷 (예를 들어, 키메라, 인간화, 다중특이적, 대안적인 이소타입 등)이거나, 이를 포함하거나, 또는 이와 CD38로의 결합에 대해 경쟁한다. 대안으로 또는 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제는 인간 CD38 내의 관련 에피토프 (예컨대, aCD38-b-ep로서 확인된 서열)의 스크리닝, 제조, (전임상)임상 시험 및/또는 확인, 및/또는 본원에 개시된 바와 같이 특정 문맥 (예를 들어, 암 요법에 대한)에서 제제화, 투여, 및/또는 효능에 유리한 특징일 수 있는 하나 이상의 특징을 특징으로 할 수 있다.

[0148] 병용 요법: 본원에서 사용되는 용어 "병용 요법"은 대상체가 2개 이상의 치료 계획 (예를 들어, 2개 이상의 치료제)에 동시에 노출되는 상황을 지칭한다. 몇몇 실시양태에서, 2개 이상의 작용제는 동시에 투여될 수 있다. 대안으로, 이러한 작용제는 순차적으로 투여될 수 있고; 달리, 이러한 작용제는 중복되는 투약 계획으로 투여된다.

[0149] 견줄만한: 본원에서 사용되는 용어 "견줄만한"은 이들 간에 (예를 들어, 수준 및/또는 활성에 의해) 비교를 가능하게 하여, 관찰되는 상이성 또는 유사성을 기반으로 결론을 타당하게 이끌어낼 수 있도록, 서로 동일하지 않을 수 있으나 충분히 유사한 2개 이상의 작용제, 실체, 상황, 효과, 조건 세트 등을 지칭한다. 이러한 견줄만한 조건 세트, 효과, 환경, 개체, 또는 집단은 다수의 실질적으로 동일한 특징 및 1개 또는 소수의 다양한 특징을 특징으로 한다. 당업자는 견줄만한 것으로 고려되는 2개 이상의 이러한 작용제, 실체, 상황, 조건 세트, 효과, 또는 집단 등에 대한 임의의 주어지는 환경에서 동일성 정도가 요구된다는 것을 맥락에서 이해할 것이다.

[0150] 포함하는: 하나 이상의 지명된 요소 또는 단계를 "포함하는" 것으로 본원에 기재된 조성물 또는 방법은 개방형 (open-ended)이며, 이는 지명된 요소 또는 단계가 필수적이거나, 조성물 또는 방법의 범위 내에 다른 요소 또는 단계가 추가될 수 있다는 것을 의미한다. 또한, 하나 이상의 지명된 요소 또는 단계를 "포함하는" (또는 "포함하다")라고 기재된 임의의 조성물 또는 방법이 또한 동일한 지명된 요소 또는 단계로 "필수적으로 구성되는" (또는 "필수적으로 구성되다") 대응하는 더 한정된 조성물 또는 방법을 기술하며, 이는 조성물 또는 방법이 지명된 필수적인 요소 또는 단계를 포함하고, 또한 조성물 또는 방법의 기본적인 및 신규 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 추가 요소 또는 단계를 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

[0151] 다라투무맙: 본원에서 사용되는 용어 "다라투무맙"은 W02006/099875에 공개된 바와 같은 VH 및 VL 서열을 갖고 인간 IgG1 모노클로날 항체인 항체를 포함한다. 예를 들어, 하기 제공된 바와 같은 서열을 포함하는 가변 중쇄 및 경쇄 서열을 갖는다:

[0152] 중쇄:

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGGTTYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGEVFDYWGQGLTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK
PSNTKVDKRVKPKSCKDTHHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24)
```

[0153]

경쇄

```
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTD
FTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC (SEQ ID NO: 25)
```

[0155]

[0156] 투여형: 본원에서 사용되는 용어 "투여형"은 대상체에게 투여하기 위한 활성제 (예를 들어, 치료제 또는 진단제)의 물리적으로 구분된 단위를 지칭한다. 각각의 단위는 사전결정된 양의 활성제를 함유한다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 양은 관련 집단에게 투여시 원하는 또는 유익한 성과와 상관관계가 있는 것으로 결정된 투약 계획에 따라(즉, 치료적 투약 계획으로) 투여하기에 적절한 단위 투여량 양 (또는 그의 전체 분획)이다. 당업자는 특정 대상체에게 투여되는 치료 조성물 또는 치료제의 총량이 한명 이상의 주치의에 의해 결정되고 다중 투여형의 투여를 수반할 수 있다는 것을 이해한다.

[0157] 투약 계획: 본원에서 사용되는 용어 "투약 계획"은 대상체에게 개별적으로 투여되는, 전형적으로 시간 기간에 의해 분리되는 단위 용량들(전형적으로 1개 초과)의 한 세트를 지칭한다. 몇몇 실시양태에서, 주어지는 치료제

는 추천되는 투약 계획을 가지며, 이는 하나 이상의 용량을 수반할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 투약 계획은 각각이 동일한 길이의 시간 기간에 의해 서로 분리되는 것인 다수의 용량을 포함하다. 대안으로, 투약 계획은 다수의 용량, 및 개별 용량을 분리하는 적어도 2개의 상이한 시간 기간을 포함하다. 몇몇 실시양태에서, 투약 계획 내의 모든 용량은 동일한 단위 용량 양이다. 대안으로, 투약 계획 내의 상이한 용량은 상이한 양이다. 몇몇 실시양태에서, 투약 계획은 제1 용량 양의 제1 용량, 이어서 제1 용량 양과 상이한 제2 용량 양의 하나 이상의 추가 용량을 포함하다. 투약 계획은 제1 용량 양의 제1 용량, 이어서 제1 용량 양과 동일한 제2 용량 양의 하나 이상의 추가 용량을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 투약 계획은 관련 집단에 걸쳐 투여시 원하는 또는 유익한 성과와 상관관계가 있다 (즉, 치료적 투약 계획임).

[0158] 에피토프: 본원에서 사용되는 용어 "에피토프"는 항체 또는 항원-결합 단편에 의해 결합되는 항원의 부분을 지칭한다. 항원이 폴리펩티드인 몇몇 실시양태에서, 항원이 관련 입체형태인 경우, 에피토프는 항원에서 공유결합으로 인접하지는 않으나 삼차원 공간에서 서로 가까운 항원의 부분으로 구성된 입체형태이다. 예를 들어, CD38의 경우, 입체형태형 에피토프는 CD38 세포의 도메인에서 인접하지 않은 아미노산 잔기로 구성된 것이고; 선형 에피토프는 CD38 세포의 도메인에서 인접한 아미노산 잔기로 구성된 것이다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따라 사용되는 에피토프는 본원에서 제공되는 CD38 조정 항체 작용제에 의해 결합되는 것을 참고로 하여 제공된다 (예를 들어, aCD38-b-348에 의해 및 aCD38-b-ep로서 정의되는 바와 같이). aCD38-b-348에 대한 에피토프의 정확한 서열 및/또는 특히 아미노산 잔기를 결정하는 수단은 문헌 및 실시예에 공지되어 있으며, 말단절단형(truncated), 및/또는 돌연변이유발된(mutagenized) (예를 들어, 알라닌 스캐닝 또는 다른 부위-지정 돌연변이유발에 의해) 상이한 종으로부터의 CD38 서열에 결합하는 항원 서열로부터 펩티드와 경쟁, 파지 디스플레이-기반 스크리닝, 또는 (공)결정학 기술을 포함한다.

[0159] 환자: 본원에서 사용되는 용어 "환자" 또는 "대상체"는 제공된 조성물이 예를 들어, 실험적, 진단적, 예방적, 미용적 및/또는 치료적 목적을 위해 투여되거나 또는 투여될 수 있는 임의의 유기체를 지칭한다. 전형적인 환자로써 동물 (예를 들어, 포유동물, 예컨대 마우스, 래트, 토끼, 비-인간 영장류, 및/또는 인간)을 들 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 환자는 인간이다. 몇몇 실시양태에서, 환자는 하나 이상의 질환 또는 병태를 앓고 있거나 또는 이에 걸리기 쉽다. 환자는 질환 또는 병태의 하나 이상의 증상을 나타낼 수 있거나, 또는 하나 이상의 질환 또는 병태 (예컨대, 암, 또는 하나 이상의 종양의 존재)로 진단될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 환자는 이러한 질병, 질환 또는 병태를 진단하고/거나 이를 치료하기 위한 특정 요법을 투여받고 있거나 또는 이를 투여 받은 적이 있다.

[0160] 제약학적으로 허용가능한: 본원에 개시된 바와 같은 조성물을 제제화하는데 사용되는 담체, 희석제 또는 부형제에 적용되는, 본원에서 사용되는 용어 "제약학적으로 허용가능한"은 담체, 희석제 또는 부형제가 조성물의 다른 성분과 적합성이 있고 그의 수용자에게 유해하지 않아야 한다는 것을 의미한다.

[0161] 제약 조성물: 본원에서 사용되는 용어 "제약 조성물"은 활성제가 하나 이상의 제약학적으로 허용가능한 담체와 함께 제제화된 조성물을 지칭한다. 몇몇 실시양태에서, 활성제는 관련 집단에게 투여시 사전결정된 치료적 효과 달성의 통계적으로 유의한 개연성을 나타내는 치료 계획에서 투여하기에 적절한 단위 용량 양으로 존재한다. 제약 조성물은 하기를 위해 채택된 형태를 포함하는 고체 또는 액체 형태로 투여를 위해 제제화될 수 있다: 경구 투여를 위해 채택된 형태, 예를 들어 물약제(drench) (수성 또는 비수성 용액 또는 현탁액), 정제, 예를 들어 협착, 설하, 및 전신 흡수를 위해 표적화된 정제, 불루스, 산제, 과립제, 혀에 적용하기 위한 페이스트제; 멸균 용액 또는 현탁액, 또는 지속 방출 제형으로서 비경구 투여, 예를 들어 피하, 근육내, 정맥내, 종양내, 또는 경막외 주사에 의한 투여를 위해 채택된 형태; 국소 적용을 위해 채택된 형태, 예를 들어 크림제, 연고제 또는 제어 방출 패치, 또는 피부, 폐 또는 구강에 적용되는 분무제; 질내로, 직장내로, 설하로, 안구로, 경피로, 비측으로, 폐로 및 다른 점막 표면으로.

[0162] 고형 종양: 본원에서 사용되는 용어 "고형 종양"은 통상적으로 낭포 또는 액체 구역을 함유하지 않는 조직의 비정상적인 덩어리를 지칭한다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 고형 종양의 상이한 유형은 이를 형성하는 세포의 유형에 대해 지명된다. 고형 종양의 예는 육종 (조직, 예컨대 해면골, 연골, 지방, 근육, 혈관성, 조혈성 또는 섬유성 결합 조직에서 간엽 기원의 형질전환된 세포로부터 발생하는 암을 포함함), 암종 (상피 세포로부터 발생하는 종양을 포함함), 흑색종, 림프종, 종피종, 신경모세포종, 망막모세포종 등이다. 고형 종양을 수반하는 암으로는 제한 없이, 뇌암, 폐암, 위암, 십이지장암, 식도암, 유방암, 결장직장암, 신장암, 방광암, 신장암, 췌장암, 전립선암, 난소암, 흑색종, 구강암, 육종, 눈암, 갑상선암, 요도암, 질암, 경부암, 림프종 등을 들 수 있다.

- [0163] 치료 유효량: 본원에서 사용되는 용어 "치료 유효량"은 치료적 투약 계획에 따라 질병 및/또는 병태를 앓고 있거나 또는 이에 걸리기 쉬운 집단에게 투여시 이러한 질병 및/또는 병태를 치료하기에 충분한 양 (예를 들어, 작용제 또는 제약 조성물의 양)을 의미한다. 치료 유효량은 질병, 질환 및/또는 병태의 하나 이상의 증상의 발병을 및/또는 중증도를 감소시키고/거나, 이의 발생을 안정화시키고/거나 지연시키는 양이다. 당업자는 "치료 유효량"이 사실은 특정 대상체에서 달성되는 성공적인 치료를 요구하지 않는다는 것을 이해할 것이다.
- [0164] 치료: 본원에서 사용되는 용어 "치료" (또한, "치료하다" 또는 "치료하는")는 하나 이상의 증상을 부분적으로 또는 완전히 경감시키고/거나, 호전시키고/거나, 완화시키고/거나, 억제하고/거나, 이의 발생을 지연시키고/거나, 이의 중증도를 감소시키고/거나, 이의 발병을 감소시키는 물질 (예를 들어, aCD38-b-348에 의해 예시되는 바와 같은 제공되는 CD38 조정 항체 작용제, 또는 임의의 다른 작용제)의 임의의 투여를 지칭한다. 몇몇 실시양태에서, 치료는 CD38 조정 항체 작용제, 예컨대 aCD38-b-348 (예를 들어, 정맥내, 종양내 또는 종양주위 주사용으로 사용하기 위한, 제약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및/또는 아췌반트를 임의로 포함하는 주사가능한 수성 조성물로서)의 직접적 투여, 또는 대상체 (예를 들어, 마커의 발현의 존재 또는 부재를 기반으로 하는 선택으로 또는 선택 없이, 혈액, 조직, 또는 종양)로부터 세포를 수득하고, 상기 세포를 CD38 조정 항체 작용제, 예컨대 aCD38-b-348와 생체외에서 접촉시키고, 대상체에게 이러한 세포를 투여하는 것 (마커의 발현의 존재 또는 부재를 기반으로 하는 선택으로 또는 선택 없이)을 포함하는 계획을 이용하는 투여를 수반할 수 있다.
- [0165] 투약 및 투여. 본 발명에 따라 사용하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제 (예를 들어, 항-CD38 또는 그의 항원-결합 단편, 예를 들어 aCD38-b-348-HCDR3 아미노산 서열을 포함함)를 포함하는 제약 조성물은 당업자에게 공지된 및/또는 이용가능한 임의의 여러 가지 기법 및/또는 기술을 이용하여 저장 및/또는 전달을 위해 제조될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제는 예를 들어, 관련 적응증에 대해, 규제 기관, 예컨대 미국식품의약국 (FDA) 및/또는 유럽 의약청 (EMA)에 의해 승인된 투약 계획에 따라 투여된다. 몇몇 실시양태에서, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제는 예를 들어, 관련 적응증에 대해, 규제 기관, 예컨대 미국식품의약국 (FDA) 및/또는 유럽 의약청 (EMA)에 의해 승인된 투약 계획에 따라 그 자체 투여될 수 있는 하나 이상의 다른 작용제 또는 요법과 조합하여 투여된다. 몇몇 실시양태에서, 그러나, 제공되는 CD38 조정 항체 작용제의 사용은 CD38 조정 항체 작용제 요법과 조합하여 사용되는 승인된 작용제 또는 요법의 감소된 투약 (예를 들어, 하나 이상의 용량, 더 작은 수의 용량, 및/또는 감소된 용량 빈도로 더 적은 양의 활성)을 허용할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 투약 및/또는 투여는 또한 투여되는 다른 약물, 환자 상태, 및/또는 CD38 조정 항체 작용제의 포맷 (예를 들어, 면역접합체, 나노바디 또는 이중특이적 항체로서 변형됨)에 적응될 수 있다.
- [0166] 더욱이, 몇몇 실시양태에서, 특정 세포 유형, 특정 종양 또는 그의 유형, 또는 특정 환자 집단 (예를 들어, 유전자 마커를 보유하는)에 대한 CD38의 시기 선택 및/또는 역치 발현 수준을 기반으로 투약 계획을 맞추고, 특히 순차적 투약 계획을 설계하는 것이 바람직할 수 있다. 몇몇 이러한 실시양태에서, 치료적 투약 계획은 요법 이전 및/또는 요법 동안 하나 이상의 유도가능한 마커 또는 다른 기준의 발현을 평가하는 검출 방법과 조합되거나, 이를 고려하여 적응될 수 있다.
- [0167] 몇몇 실시양태에서, 본 발명에 따른 투약 및 투여는 임의의 또는 다양한 형태의 하나 이상의 생리적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제와 조합된, 원하는 정도의 순도를 갖는 활성제를 사용한다. 이들은 예를 들어, 액체, 반고체 및 고체 투여형, 예컨대 액체 용액 (예를 들어, 주사가능한 및 주입가능한 용액), 분산액 또는 현탁액, 정제, 환제, 산제, 리포솜 및 좌제를 포함한다. 바람직한 형태는 의도되는 투여 방식 및/또는 치료적 적용에 따라 좌우될 수 있으며, 전형적으로 주사가능한 또는 주입가능한 용액의 형태, 예컨대 항체로 인간 대상체를 치료하기 위해 사용되는 것과 유사한 조성물이다.
- [0168] 몇몇 실시양태에서, 성분(들)은 급속 방출 및/또는 분해로부터 작용제(들)를 보호하는 담체로, 예컨대 이식물, 경피 패치 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제형으로 제조될 수 있다. 생분해성 생체적합성 폴리머, 예컨대 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 일반적으로, 각각의 활성제는 우수 의료 실무와 일관하여 및 관련 작용제(들) (예를 들어, 작용제, 예컨대 항체)에 적절한 제약 조성물 및 투약 계획을 사용하여 치료 유효량으로 제제화되고 투약되고 투여된다. 활성제를 함유하는 제약 조성물은 경구, 점막, 흡입에 의한, 국소, 협측, 비측, 직장, 또는 비경구 (예를 들어, 정맥내, 주입, 종양내, 림프절내, 피하, 복강내, 근육내, 피내, 경피, 또는 대상체의 조직의 물리적 파괴를 수반하는 다른 종류의 투여, 및 이러한 파괴를 통한 제약 조성물의 투여) 투여를 제한 없이 포함하는 당업계에 공지된 임의의 적절한 방법에 의해 투여될 수 있다.

- [0169] 몇몇 실시양태에서, 특정 활성제를 위한 투약 계획은, 예를 들어 대상체에서 관심있는 하나 이상의 조직 또는 유체에서 특정 원하는 약물동태학 프로파일 또는 다른 노출 패턴을 달성하기 위해 간헐적 또는 연속적 (예를 들어, 관류 또는 저속 방출 시스템에 의한) 투여를 수반할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 조합하여 투여되는 상이한 작용제들은 상이한 전달 경로를 통해 및/또는 상이한 스케줄에 따라 투여될 수 있다. 대안으로 또는 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, 제1 활성제의 하나 이상의 용량은 하나 이상의 다른 활성제와 실질적으로 동시에, 몇몇 실시양태에서, 공통 경로를 통해 및/또는 단일 조성물의 일부로서 투여된다.
- [0170] 주어지는 치료 계획을 위한 경로 및/또는 투약 스케줄의 최적화시 고려되는 인자는 예를 들어, 치료될 특정 암 (예를 들어, 유형, 단계, 위치 등), 대상체의 임상 상태 (예를 들어, 나이, 전반적 건강, 체중 등), 작용제의 전달 부위, 작용제의 성질 (예를 들어, 항체 또는 다른 단백질-기반 화합물), 작용제의 투여 방식 및/또는 투여 경로, 병용 요법의 존재 또는 부재, 및 의사에게 공지된 다른 인자를 포함할 수 있다.
- [0171] 당업자는 예를 들어, 특정 전달 경로가 용량 양에 영향을 줄 수 있고/거나, 요구되는 용량 양이 전달 경로에 영향을 줄 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 특정 부위 또는 위치 (예를 들어, 조직 또는 장기) 내의 작용제의 특히 높은 농도가 관심있는 경우에, 집중적인 전달 (예를 들어, 종양내 전달)이 바람직하고/거나 유용할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 특정 제약 조성물 및/또는 사용되는 투약 계획의 하나 이상의 특징은 시간에 걸쳐 (예를 들어, 임의의 개별 용량에서의 활성제의 증가하는 또는 감소하는 양, 용량 사이의 증가하는 또는 감소하는 시간 간격 등), 예를 들어 원하는 치료적 효과 또는 반응 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제의 기능적 특징과 관련된 치료적 또는 생물학적 반응)을 최적화하기 위해 변형될 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 따른 활성제의 유형, 양, 및 투약 빈도는 관련 작용제(들)가 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여되는 경우 적용되는 안전성 및 효능 요구사항에 의해 좌우된다. 일반적으로, 투약의 이러한 특징은 요법 부재시 관찰되는 것과 비교하여 특정한 및 전형적으로 검출가능한 치료적 반응을 제공하도록 선택된다. 본 발명의 맥락에서, 예시적인 바람직한 치료적 반응은 종양 성장, 종양 크기, 전이, 종양과 관련된 하나 이상의 증상 및 부작용의 억제 및/또는 감소, 뿐만 아니라 암 세포의 세포자멸의 증가, 하나 이상의 세포 마커 또는 순환하는 마커의 치료학적으로 관련된 감소 또는 증가 등을 수반할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 기준은 문헌에 개시된 임의의 여러 가지 면역학적, 세포학적 및 다른 방법에 의해 용이하게 평가될 수 있다. 예를 들어, CD38 조정 항체 작용제의 치료 유효량 (단독으로 또는 추가 작용제와 조합하여)은 실시예에 기재된 바와 같이 암 세포의 사멸을 향상시키기에 충분하도록 결정될 수 있다.
- [0172] 활성제로서 CD38 조정 항체 작용제 또는 이러한 작용제를 포함하는 조성물의 치료 유효량은 당업계에서 이용가능한 기술을 이용하여, 예를 들어 하나 이상의 인자, 예컨대 치료될 질병 또는 병태, 질병의 단계, 치료될 포유동물의 나이 및 건강 및 신체 상태, 질병의 중증도, 투여될 특정 화합물 등을 고려하여 용이하게 결정될 수 있다.
- [0173] 몇몇 실시양태에서, 치료 유효량은 적어도 약 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중, 적어도 약 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중; 적어도 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중, 적어도 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중, 적어도 약 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중, 적어도 약 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중 또는 그 이상 (예를 들어, 약 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중)일 수 있는 활성제의 효과적인 용량 (및/또는 단위 용량)이다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 가이드라인이 활성제의 분자량에 대해 적용될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 투여량은 또한 증가하는 용량으로 aCD38-b-348-HCDR3 아미노산 서열을 포함하는 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 투여와 관련하여, 투여 경로, 치료 주기, 또는 그 결과로서 최대 내약 용량 및 용량 제한 독성 (존재한다면)을 결정하는데 사용될 수 있는 용량 에스컬레이션 프로토콜에 따라 다양할 수 있다.
- [0174] 치료적 조성물은 전형적으로 멸균되어야 하고, 제조 및 저장의 조건 하에 안정해야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 분산액, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 규칙 구조로서 제제화될 수 있다. 멸균 주사 가능한 용액은 적절한 용매에서 요구되는 양의 항체를 상기 열거된 성분 중 하나 또는 성분들의 조합과 혼입한 다음 여과 멸균화함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본적인 분산액 배지 및 상기 열거된 것으로부터의 다른 요구되는 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사 가능한 용액을 제조하기 위한 산제의 경우, 바람직한 제조 방법은 사전에 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분과 임의의 추가 원하는 성분의 분말을 수득하는 진공 건조 및 동결 건조이다. 용액의 적절한 유통성은 예를 들어, 코팅의 이용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 유발될 수 있다.
- [0175] 각각의 작용제의 제형은 바람직하게는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있는 바와 같이 멸균되고,

그 후 볼루스 투여 또는 연속적 투여에 적합한 형태로 포장 또는 판매되어야 한다. 주사가능한 제형은 단위 투여형, 예컨대 앰플 또는 보존제를 함유하는 다중 용량 컨테이너로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제형은 본원에서 논의된 바와 같은 현탁액, 용액, 유성 또는 수성 비히클 중 에멀전, 페이스트제, 및 이식가능한 지속 방출 또는 생분해성 제형을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 멸균 주사가능한 제형은 무독성 비경구로 허용가능한 희석제 또는 용매, 예컨대 물 또는 1,3-부탄디올을 사용하여 제조될 수 있다. 다른 비경구로 투여가능한 유용한 제형은 활성 성분을 미세결정질 형태로, 리포솜 제제로, 또는 생분해성 폴리머 시스템의 구성요소로서 포함하는 제형을 포함한다. 지속 방출 또는 이식을 위한 조성물은 제약학적으로 허용가능한 고분자 또는 소수성 재료, 예컨대 에멀전, 이온 교환 수지, 조금 녹는 폴리머 또는 염을 포함할 수 있다.

[0176] 본 발명에 따라 사용하기 위한 각각의 제약 조성물은 사용되는 투여량 및 농도에서 대상체에게 무독성인, 제약학적으로 허용가능한 분산제, 습윤제, 현탁화제, 등장화제, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 담체, 부형제, 염, 또는 안정화제를 포함할 수 있다. 이러한 추가 제약학적으로 허용가능한 화합물의 불완전한 목록은 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 약리학적으로 허용가능한 음이온을 함유하는 염 (예컨대, 아세테이트, 벤조에이트, 비카르보네이트, 비술페이트, 이소티오네이트, 락테이트, 락토비오네이트, 라우레이트, 말레이트, 말레에이트, 살리실레이트, 스테아레이트, 수바세테이트, 숙시네이트, 탄네이트, 타르트레이트, 테오클레이트, 토실레이트, 트리에트요오다이드, 및 발레레이트 염); 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 염화나트륨; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민; 친수성 폴리머, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이팅제, 예컨대 EDTA; 당류, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대 이온, 예컨대 나트륨; 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.

[0177] 몇몇 실시양태에서, 2개 이상의 활성제가 본 발명에 따라 사용되는 경우, 이러한 작용제는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 하나의 작용제의 투여는 구체적으로 또 다른 작용제의 투여와 관련하여 시간을 맞춘다. 몇몇 실시양태에서, 조합하여 투여되는 작용제에 대한 원하는 상대 투약 계획은 경험적으로, 예를 들어 생체외, 생체내 및/또는 시험관내 모델을 사용하여 평가되거나 또는 결정될 수 있고; 몇몇 실시양태에서, 이러한 평가 또는 경험적 결정은 생체내에서, 특정 환자 또는 환자 집단에서 수행된다 (예를 들어, 상관관계가 있도록).

[0178] 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 실행에서 사용되는 하나 이상의 활성제는 적어도 2개의 주기를 포함하는 간헐적 투약 계획에 따라 투여된다. 2개 이상의 작용제가 조합하여 및 이러한 간헐적 주기 계획에 의해 각각 투여되는 경우, 상이한 작용제의 개별 용량은 서로 맞물리게 될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 제2 작용제의 하나 이상의 용량은 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제의 용량의 일정한 시간 기간 후에 투여된다. 몇몇 실시양태에서, 제2 작용제의 각각의 용량은 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제의 용량의 일정한 시간 기간 후에 투여된다. 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제는 또한 1주, 2주, 4주 또는 그 이상에 걸쳐 하나 이상의 치료 주기 내에 동일한 경로에 의한 후속 투여, 뿐만 아니라 교대 투여 경로, 예컨대 피하 (또는 근육내) 투여 및 종양내 투여를 수반하는 계획으로 투여될 수 있으며, 환자 반응에 따라 동일한 계획으로 이러한 주기를 반복한다 (또는 투여 사이의 간격의 연장). 또한, 몇몇 실시양태에서, 후속 정밀한 계획 (예를 들어, 용량의 개수, 용량의 간격 (예를 들어, 서로에 대한 또는 또 다른 사건, 예컨대 또 다른 요법의 투여에 대한), 용량의 양 등)은 하나 이상의 다른 주기와 비교하여 하나 이상의 주기에 대해 상이할 수 있다.

[0179] 본원에 기재된 바와 같은 임의의 투여 경로, 투여량, 및/또는 계획을 이용함으로써, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제는 예를 들어, 생검, 혈액 샘플, 및/또는 다른 임상적 기준을 이용하여 환자에서 측정되는 하나 이상의 기준을 고려하여 확인되고/거나 특정화되고/거나 검증될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 종양 크기 및/또는 전이의 직접적 평가 이외에 또는 대안으로서, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제의 치료적 효능은 하나 이상의 상이한 일반적인 기준이 평가되는 방법으로 결정될 수 있다: 암 세포에 대한 직접적 세포독성 (암 세포의 세포자멸 및 괴사), 종양 침윤성 면역 세포 (예컨대, CD4-양성 및/또는 CD8-양성 종양 침윤성 T 세포)의 증가, 혈액에서 순환하는 면역 세포 (총 집단 또는 림프구, NK 세포, 단핵구, 수지상 세포, 대식세포, B 세포 등의 특정 하위집단)의 증가, 및/또는 반응하는 환자 또는 반응하지 않는 환자에서 오직 치료전

대 치료후 나타나는 약간의 차등 발현 (RNA 서열분석, 질량 유동 세포분석법, 및/또는 다른 질량 서열분석 접근법에 의해 결정되는 바와 같음). 대안으로 또는 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, 이러한 확인, 특정화, 및/또는 검증은 하나 이상의 특정 단백질 또는 단백질 세트의 mRNA 및/또는 단백질 발현의 스크리닝에 의한 분자 수준에서의 후속 조치를 수반할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 하나 이상의 이러한 기술은 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제에 대한 반응을 평가하기 위한 관련 정보, 예를 들어 종양 내에(또는 가까이) 및/또는 혈액에서 순환하는 특정 세포 집단에 대한 마커 및/또는 조직 분포와 관련될 수 있는 정보의 확인을 가능하게 할 수 있다.

[0180] 이러한 접근법 및 면역-생물학적 데이터는 하나 이상의 효능 및/또는 안전성 파라미터 또는 특징의 결정을 가능하게 할 뿐만 아니라, 몇몇 실시양태에서, 단독으로 및/또는 추가 치료적 이점을 제공할 수 있는 다른 약물, 케어 표준(standard-of-care) 프로토콜, 또는 면역요법과 조합하여, 특정 용량, 경로 또는 투약 계획, 예를 들어 주어지는 적응증에 대한 하나 이상의 임상 시험에서 사용될 수 있는 특정 용량, 경로 또는 투약 계획을 선택하는 원리를 제공할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 일련의 추가 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제는 이러한 제형에 의한 치료전 또는 치료후 환자의 세포 또는 조직 (예컨대, 종양, 혈액 샘플, 또는 혈액 분획)에서 하나 이상의 유전자에 대한 RNA 및/또는 단백질 수준에서의 발현의 조합된 존재 (및/또는 부재)를 결정한 후, 질병 (예컨대, 암)을 앓고 있는 환자의 치료 방법 또는 질병 (예컨대, 암)의 예방 방법에서 사용된다. 따라서, 이러한 방법은 치료 유효량의 바람직한 CD38 조정 항체 작용제와 관련된 하나 이상의 바이오마커, 또는 추가 복합체 유전자 발현 시그니처 (또는 세포 집단 분포), 대상체가 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제에 의한 치료 후 항종양 또는 항-감염 반응을 가질 수 있다는 것을 예측하는 치료학적으로 관련된 바이오마커(들), 또는 대상체가 CD38 조정 항체 작용제에 의한 치료 후 화합물에 의한 치료에 반응할 수 있다는 것을 예측하는 치료학적으로 관련된 바이오마커(들)를 정의하는 것을 가능하게 할 수 있다.

[0181] 대안으로 또는 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 특정 CD38 조정 항체 작용제의 투약 및 투여는 인간 암 및/또는 다른 인간 조직에서의 CD38 발현을 고려하여, 예를 들어 다양한 암, 조직 및/또는 환자에서 간질 및/또는 면역 서브세트에서의 CD38 분포에 대한 데이터를 수집함으로써 사전에 확립되고/거나 사후에 평가될 수 있다. 이러한 데이터는 다양한 면역 및 비-면역 하위집단에서의 CD38 발현 간의 관계 및/또는 세포 침윤물 측정치 및/또는 암 세포 또는 면역 세포의 서브세트와 관련된 암-관련 마커 (예컨대, Foxp3 및 PD-1/PD-L1)와의 그의 관계를 확인하기 위해, 흔한 암 유형 및/또는 조직 (중추 신경계, 식도, 위, 간, 결장, 직장, 폐, 방광, 심장, 신장, 갑상선, 췌장, 자궁, 피부, 유방, 난소, 전립선 및 고환)에 걸쳐 통상적인 기술 (예컨대, 유동 세포분석법, 질량 세포분석법, 면역조직화학 또는 mRNA 발현 라이브러리)을 이용함으로써 생성될 수 있다. CD38 발현은 종양 조직 (예컨대, NK 세포 및 다른 이펙터 또는 조절성 면역 세포)에서 면역 서브세트에 국한될 수 있고 (또는 국한되지 않을 수 있고), CD38 발현 및 면역 관문 억제제 간의 상관관계는 양성인 경우 결정될 수 있으며, 이는 이러한 면역 관문 억제제를 표적화하는 화합물과 조합하여 CD38 조정 항체 작용제의 적절한 사용을 제안한다.

[0182] 제조 용품 및 키트. 본 발명의 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제는 별도의 제조 용품으로 제공된다. 본 발명의 몇몇 실시양태에서, CD38 조정 항체 작용제를 함유하는 제조 용품은 라벨을 갖는 컨테이너 안에 제공되거나 이와 함께 제공된다. 적합한 컨테이너로는 예를 들어, 병, 바이알, 주사기, 및 테스트 튜브를 들 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 컨테이너는 임의의 또는 여러 가지 재료, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 컨테이너는 특정 질병, 질환 또는 병태, 또는 그의 단계 또는 유형을 치료하는데 효과적인 조성물을 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 컨테이너는 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 컨테이너는 피하 주사 바늘에 의해 뚫릴 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제를 포함하는 조성물은 고무 마개 및 알루미늄 밀봉부를 갖는 투명 유리 바이알에 포장된다. 컨테이너 상의 라벨 또는 컨테이너와 연관된 라벨은 조성물이 선택 병태를 치료하기 위해 사용된다는 것을 나타낸다.

[0183] 몇몇 실시양태에서, 제조 용품은 제약학적으로 허용가능한 완충액, 예컨대 인산염-완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 별도의 컨테이너를 추가로 포함할 수 있고/거나, 다른 완충액, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 사용 지침서를 갖는 패키지 삽입 설명서를 포함하는, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 제조 용품은 적절한 희석제 및 완충제로 0.1 mg/mL, 1 mg/mL, 10 mg/mL의 최종 농도로 또는 더 높은 농도로 제제화된, 총 2 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 50 mg, 또는 그 이상을 함유하는 멸균 수용액으로서의 정맥내 제형 내에 각각의 작용제 또는 작용제들을 제공하는 것을 가능하게 할 수 있다.

- [0184] 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 CD38 조정 항체 작용제는 키트가 제공된 또는 제공되지 않은 임의의 적절한 수용액으로 재구성되는 동결건조 형태의 부품 키트(kits-of-parts) 내에, 또는 임의의 적절한 제약 담체를 사용하는 다른 유형의 투여량 단위 내에 제공될 수 있다. CD38 조정 항체 작용제의 하나 이상의 단위 투여형은 팩 또는 분배기 장치에 제공될 수 있다. 이러한 팩 또는 장치는 예를 들어, 금속 또는 플라스틱 호일, 예컨대 블리스터 팩을 포함할 수 있다. 이러한 부품 키트를 올바르게 사용하기 위해, 이는 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 암의 치료에서의 사용 지침서를 갖는 패키지 삽입 설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- [0185] 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 제조 용품 또는 키트와 관련된 지침서는 제조 용품 및/또는 키트 내의 작용제, 제형 및 다른 재료의 올바른 사용 및/또는 이의 가능한 효과의 모니터링에 대해 알려주는데 사용될 수 있는 라벨, 진단, 간행물, 녹화물, 도표, 또는 임의의 다른 수단의 형태일 수 있다. 지침서는 제조 용품 및/또는 키트와 함께 제공될 수 있다.
- [0186] 실시예
- [0187] 실시예 1: CD38에 결합하는 항체의 시험관내 생성
- [0188] 재료 & 방법
- [0189] CD38 항원 제조. 인간, 시노몰구스 원숭이(Cyno), 및 뮤린 CD38 단백질의 재조합 히스티딘-태그가 부착된 세포외 도메인을 사노 바이오로지칼 인크.(Sino Biological Inc.)로부터 구매하였다. EZ-Link 술포-NHS-바이오티닐화 키트 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific), Cat #21425)를 사용하여 단백질 시약 바이오티닐화를 수행하였다. CD38 항원을 약 1 mg/mL로 농축시키고, 완충액을 PBS로 교환한 다음, 1:7.5 몰비 바이오티닐화 시약 (EZ-Link 술포-NHS-바이오티닐화 키트, 써모 사이언티픽, Cat #21425)을 첨가하였다. 혼합물을 4°C에서 밤새 유지시킨 후, 또 다른 완충액을 교환하여, 상기 용액에서 유리 바이오틴을 제거하였다. 표지된 단백질의 스트렙타비딘 센서 결합을 통해 바이오티닐화를 확인하였다.
- [0190] 항-CD38 항체의 단리를 위한 라이브러리 정보수득 및 선택 방법. 앞서 기재된 바와 같은 모노클로날 항체를 발현하는 효모 세포주의 고처리량 스크리닝 및 선택을 위해, 각각 약 109개의 다양성의 미감염 인간 합성 효모 라이브러리 8개를 설계하고 생성하고 번식시켰다 (Xu Y et al., 2013; W02009036379; W02010105256; W02012009568). 단량체 인간 CD38-기반 선택을 위한 8개의 미감염 라이브러리를 사용하여 8개의 평행 선택을 수행하였다.
- [0191] 첫 번째 2개의 선택 라운드를 위해, 밀텐이(Miltenyi) MACs 시스템을 이용하는 자성 비드 분류 기술을 본질적으로 기재된 바와 같이 수행하였다 (Siegel et al., 2004). 간단히, 효모 세포 (약 10¹⁰ 개 세포/라이브러리)를 15분 동안 실온에서 0.1% BSA를 갖는 FACS 세척 완충액 PBS에서 3 ml의 100 nM 바이오티닐화된 단량체 인간 CD38 항원과 함께 인큐베이션하였다. 50 ml의 빙냉 세척 완충액으로 1회 세척한 후, 세포 펠렛을 40 mL의 세척 완충액에서 재현탁시키고, 500 μl의 스트렙타비딘 마이크로비드 (밀텐이 바이오텍(Miltenyi Biotec), 독일, Cat # 130-048-101)를 효모 세포에 첨가하고, 15분 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 다음, 효모 세포를 펠렛화하고, 5 mL의 세척 완충액에서 재현탁시키고, MACS LS 컬럼 (밀텐이 바이오텍, 독일, Cat. No. 130-042-401) 상에 로딩하였다. 5 mL를 로딩한 후, 컬럼을 3 ml의 FACS 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 컬럼을 자기장으로부터 제거하고, 효모 세포를 5 mL의 성장 배지로 용출시킨 후, 밤새 성장시켰다.
- [0192] 2개의 MACS 라운드 다음에, 유동 세포분석법 (FACS)을 이용하여 5개의 분류 라운드를 수행하였다. 첫 번째 FACS 선택 라운드를 위해, 대략 4×10⁷ 개 효모 세포를 펠렛화하고, 세척 완충액으로 3회 세척하고, 100 nM의 각각의 바이오티닐화된 단량체 인간, 뮤린 및 시노몰구스 CD38 항원과 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그 후, 효모 세포를 2회 세척하고, 1:100 희석된 염소 항-인간 F(ab')₂ 카파-FITC (써던 바이오텍(Southern Biotech), USA; Cat. No. 2062-02) 및 1:500 희석된 스트렙타비딘-알렉사 플루오르 633(Alexa Fluor 633) (라이프 테크놀로지스(Life Technologies), USA; Cat. No. S21375), 또는 1:50 희석된 엑스트라비딘-피코에리트린 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), USA; Cat. No. E4011), 이차 시약으로 15분 동안 4°C에서 염색하였다. 빙냉 세척 완충액으로 2회 세척한 후, 세포 펠렛을 0.4 mL의 세척 완충액에서 재현탁시키고, 스트레이너-캡핑된 분류 튜브로 이동시켰다. FACS ARIA 분류기 (비디 바이오사이언시스(BD Biosciences))를 이용하여 분류를 수행하고, CD38 결합만을 선택하도록 분류 게이트를 결정하였다. 제1 FACS 라운드로부터의 뮤린- 및 Cyno- 선택된 집단을 2개의 풀로 합하였다. 그 후, 시약 다중특이적 결합제를 감소시키는 제2 FACS 라운드에서 교차-반응성 결합제를 확인하기 위해, 이들 풀을 인간 CD38 결합에 대해 분류하였다 (Xu Y et al., 2013). 제4 FACS 라운드

는 항원으로서 100 nM 바이오티닐화된 단량체 CD38을 사용하는 양성 선택으로 주로 구성되었다. 선택된 클론의 샘플을 플레이팅하고 서열분석하였다.

[0193] 미감염 선택에서 확인된 클론의 친화성 성숙. 4개의 추가 선택 라운드를 위해 사용된 경쇄 다양화 라이브러리를 제조하기 위해, 제4 FACS 분류 선택 라운드 출력으로부터의 중쇄를 사용하였다. 제1 선택 라운드는 항원으로서 100 nM 바이오티닐화된 단량체 인간 CD38 또는 항원으로서 200 nM 바이오티닐화된 단량체 뮤린 CD38과 결합된 밀텐이 MACs 비드를 수반하였다. MACs 비드 선택 다음에, 3개의 FACS 분류 라운드를 수행하였다. 제1 FACS 라운드는 100 nM 또는 10 nM의 인간 CD38 또는 200 nM의 뮤린 CD38을 수반하였다. 상기 기재된 제2 FACS 라운드와 동시에, 75-100 nM의 경쟁자 IgG로 경쟁 선택을 수행하였다. 선택 라운드 후, 플레이팅 전에 1 또는 10 nM의 인간 CD38에 의한 제3 양성 분류를 수행하였다. IgG의 서열분석을 위해 각각의 FACS 선택 라운드로부터 개별 콜로니를 골랐다.

[0194] IgG 및 Fab 생성 & 정제. 효모 클론을 포화까지 성장시킨 후, 48시간 동안 30°C에서 진탕하면서 유도시켰다. 유도 후, 효모 세포를 펠렛화하고, 정제를 위해 상등액을 수확하였다. 단백질 A 컬럼을 이용하여 IgG를 정제하고, 아세트산, pH 2.0으로 용출시켰다. 과과인 소화에 의해 Fab 단편을 생성시키고, 캡처선택트 (CaptureSelect) IgG-CH1 친화성 매트릭스 (라이프 테크놀로지스; Cat. No. 1943200250) 상에서 정제하였다.

[0195] 항-CD38 항체의 친화성 측정. 포르테 바이오(Forte Bio)에 의해 CD38 항체의 K_D 를 측정함으로써 CD38 항체에 대한 친화성을 결정하였다. 문헌 (Estep P et al., 2013)에 기재된 바와 같이 IgG를 AHQ 센서 상으로 온라인 로딩함으로써 포르테 바이오 친화성 측정을 수행하였다. 간단히, 센서를 검정 완충액에서 30분 동안 오프라인 평형화시킨 후, 기준선 확립을 위해 60초 동안 온라인 모니터링하였다. 아비드 결합 측정을 위해, 로딩된 IgG를 갖는 센서를 3분 동안 200 nM의 인간, 시노몰구스 또는 뮤린 CD38에 노출시킨 후, 오프-레이트 측정을 위해 3분 동안 검정 완충액으로 이동시켰다. 바이오티닐화된 CD38 단량체를 SA 센서 상에 로딩한 후, 200 nM 항체에 노출시킴으로써 1가 결합 측정을 수득하였다. 포르테 바이오에 의해 제공된 데이터 분석 소프트웨어의 1:1 결합 모델을 이용하여 동역학 데이터를 적합화하였다. 참고 효능제 항-CD38 항체에 대해 이러한 검정에서 확립된 K_D 값은 아래와 같다: IB4의 경우, 인간 CD38에 대한 0.9×10^{-8} M, 및 IB4의 경우 시노몰구스 CD38로의 결합 없음.

[0196] 항-CD38 항체의 결합력 측정: Ni-NTA 센서를 검정 완충액에서 30분 동안 오프라인 평형화시킨 후, 기준선 확립을 위해 60초 동안 온라인 모니터링하였다. 이를 4.2 nM 항원 (his 태그가 부착된 재조합 인간 CD38)으로 50분 동안 로딩한 후, 세척을 위해 0.5분 동안 이를 검정 완충액으로 이동시키고, 기준선 결정을 위해 1분 동안 검정 완충액으로 이동시켰다. 그 후, 항체를 상이한 농도 (도 7 및 12에 기재된 바와 같이)에서 50분 동안 회합시켰다. 그 후, 오프-레이트 측정을 위해 30분 동안 검정 완충액으로 이를 이동시켰다. 포르테 바이오에 의해 제공된 데이터 분석 소프트웨어에서 1:1 결합 모델을 이용하여 동역학 데이터를 적합화하였다.

[0197] 대안으로, 25°C의 주변 실험 온도를 갖는 CM-5 센서 칩을 이용하여 비아코어(Biacore) 2000에서 SPR에 의해 항-CD38 인간 항체의 KD 를 측정함으로써, 항-CD38 인간 항체에 대한 친화성을 결정하였다. 10분에 걸쳐 12,000 내지 14,000의 RU에 분석 완충액 (pH 7.4, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% Tween 20)에서 모든 유도 세포에 걸쳐 항-인간 항체를 초기에 고정화시켰다. 이어서, 리간드 (항체 시험 용품)를 54 내지 208 RU의 포화 수준으로 로딩하였다. 그 후, 2배 희석으로부터 3200 nM에서 출발하여 0.78 nM의 최저 농도로 6분 동안 분석물질 (his 태그가 부착된 재조합 인간 CD38)을 분석 완충액에서 회합시켰다. 분석 완충액에서 10분에 걸쳐 해리를 수행하였다. 샘플 농도 간의 재생 단계를 3 M $MgCl_2$ 에서 0.5분 동안 3회 수행하였다. 공정에 걸쳐 25 μ l/min의 유속을 유지하였다. 참고 공제로 비아코어(Biacore)에 의해 제공된 분석 소프트웨어 상에서 대역 적합을 이용하여 동역학 데이터를 적합화하였다.

[0198] 에피토프 비닝(Binning): 표준 샌드위치 비닝 검정을 이용하여 포르테 바이오 옥텟 Red384 시스템 (팔 포르테 바이오 코퍼레이션(Pall Forte Bio Corp.), USA) 상에서 항체의 에피토프 비닝을 수행하였다. 항-인간 CD38 항체를 AHQ 센서 및 센서 상의 비점령 Fc-결합 부위 상에 로딩하고, 비-관련 인간 IgG1 항체로 차단하였다. 센서를 100 nM 표적 항원에, 이어서 제2 항-CD38 항체인 참고 모노클로날 효능제 마우스 항-인간 CD38 항체 (IB4, 친절하게는 이탈리아 토리노 대학교의 F. Malavasi 교수에 의해 제공됨)에 노출시켰다. 포르테 바이오 데이터 분석 소프트웨어 7.0을 이용하여 데이터를 가공하였다. 항원 회합 후 제2 항체에 의한 추가 결합은 비점령 에피토프를 나타내는 반면, 결합 없음은 에피토프 차단을 나타내었다.

[0199] CD38-발현 세포로의 항-CD38 항체의 결합. 정제된 시노몰구스 T 세포로의 결합을 분석함으로써 후보 대상을 평

가하였다. 이 목적을 위해, 시노물구스 팬 T 세포를 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 aCD38-b-348 또는 DARA로 염색한 다음, 얼음 위에서 30분 동안 반대수 계단 희석법 (7개의 점)으로 희석시켰다. 세척에 의해 결합되지 않은 일차 항체를 제거한 다음, 이차 항체 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 얼음 위에서 30분 염색하였다. 모든 샘플을 적절한 CD3, CD4 및 CD8 교차-반응성 항체로 3별로 염색하였다. 유동 세포분석법에 의해 샘플을 측정하였다. 데이터 분석을 위해, 샘플 획득 동안 FSC vs SSC 파라미터를 이용하여 살아있는 세포를 게이팅하였다. 염색된 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 XY 차트 상에 플로팅하여, 농도의 로그에 대한 MFI의 그래프를 그리고, 비-선형 회귀 곡선으로 데이터 적합화하여, 상기 곡선으로부터 EC50을 계산하였다.

[0200] 대안으로, 인간 PBMC에서 결합을 평가하였다. 이 목적을 위해, 3명의 인간 공여자로부터의 전체 혈액으로부터 PBMC를 제조하고, 1 μM , 200 nM, 40 nM, 8 nM, 1.6 nM, 320 pM, 64 pM, 13 pM 및 2.5 pM의 최종 농도의 aCD38-b-348 또는 DARA로 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 세척하고, AF488 이차 항체로 표지하였다. 그 후, 세포를 추가 표면 염색 항체: 항-CD3 PE-Cy7, 항-CD4 APC 및 항-CD8 BV451로 인큐베이션하였다. BD FACSDiva 소프트웨어 (비디 바이오사이언시스) 상에서 작동하는 8-색상 (3개의 레이저) BD FACSCanto II 세포분석기를 이용하여 샘플 획득을 수행하였다. FCS Express (v3.0) 소프트웨어 (드노보(DeNovo) 소프트웨어)를 이용하여 분석후 프로세싱을 수행하였다. 상이한 세포 집단 및 중간값 형광 강도 (MFI) 데이터의 상대 비율 (%)을 소수 자리 두자리로 보고하였다.

[0201] 포유동물 세포에서 발현된 인간 IgG1로서 aCD38-b-348의 재클로닝, 생성 및 특징화. 항체에 대한 코돈 최적화된 VH 및 VL 코딩 서열의 합성을 게네비즈(Genewiz)에 의해 수행하였다. 인간 IgG1 중쇄 및 카파 경쇄 불변 영역 (각각 P01857 및 P01834)을 함유하는 항체 발현 벡터 (이코사겐(Icosagen), EST)로 가변 영역의 cDNA를 클로닝하였다. 전장 중쇄 및 경쇄 cDNA를 최종 벡터에서 서열분석에 의해 확인한 후, 재조합 단백질, 항체의 생성을 위한 적절한 벡터 및 CHO-기반 세포 (CHOEBNALT85)를 사용하는 안정적인 에피솜 발현 시스템인 QMCF 기술 (이코사겐)을 이용하여 이를 발현시키기 위해 재클로닝하고, 항체 생성을 위해 CHOEBNALT85 세포를 1 μg 의 발현 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간에, 플라스미드를 함유하는 세포 집단을 선택하기 위해 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 G418을 첨가하였다. 생성을 위해, 온도를 30 $^{\circ}\text{C}$ 로 이동시키고, 배양물에 추가적으로 영양을 공급하였다. 생성의 말미에, 배양 상등액을 원심분리 (1000 g, 30분, 및 15 $^{\circ}\text{C}$)에 의해 투명하게 하였다. PMSF를 첨가하고, 상등액을 가공하거나 정제까지 동결시켰다. hIgG1 항체를 MabSelect SuRe 친화성 크로마토그래피에 의해 정제한 다음, 25 mM NaOAc pH 5.5; 50 mM NaCl 또는 PBS로 Superdex 200 겔 여과하였다. 재조합 토끼 CD38 (65003-T08H-20; 사이노 바이올로지칼) 및 재조합 래트 CD38: (80229-R08H-20; 사이노 바이올로지칼)을 사용하여, 재조합 인간 CD38에 대한 친화성, 뮤린, 래트, 토끼 및 시노물구스 CD38에 대한 교차-반응성, 및 에피토프 비닝 대 선택된 CD38 결합 항체에 대해, CHOEBNALT85 세포에서 생성된 인간 IgG1 항체를 특징화하였다.

[0202] aCD38-b-348 에피토프 맵핑. 고체상 Fmoc 합성을 이용하여, 인간 CD38 서열 (유니프록 기록 번호 P28907)을 나타내는, 선형, 단일 루프, β -턴 모방체, 디술퍼드 브릿지 모방체, 불연속형 디술퍼드 브릿지, 불연속형 에피토프 모방체 펩티드의 여러 세트를 합성하였다 (펩스칸 비브이(Pepscan BV), 네덜란드; Timmermann P et al., 2007; Langedijk JP et al., 2011). 각각의 합성된 펩티드로의 항체의 결합을 펩스칸-기반 ELISA (펩스칸, 네덜란드)에서 시험하였다. 펩티드 어레이를 일차 항체 용액으로 인큐베이션하였다 (밤새 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서). 세척 후, 펩티드 어레이를 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 적절한 항체 피옥시다제 접합체 (2010-05; 써던 바이오텍)의 1/1000 희석물로 인큐베이션하였다. 세척 후, 피옥시다제 기질 2,2'-아지노-디-3-에틸벤즈티아졸린 술포네이트 (ABTS) 및 20 $\mu\text{l}/\text{mL}$ 의 3% H2O2를 첨가하였다. 1시간 후, 발색 현상을 측정하였다. 전하 결합 소자 (CCD) - 카메라 및 화학 처리 시스템으로 발색 현상을 정량하였다. 표준 96-웰 플레이트 ELISA-판독기와 유사하게, CCD 카메라로부터 얻은 값은 0 내지 3000 mAU의 범위이었다. 합성된 펩티드의 품질을 확인하기 위해, 양성 및 음성 대조군 펩티드의 별도의 세트를 병렬적으로 합성하고, 관련없는 대조군 항체로 스크리닝하였다.

[0203] 에피토프를 확인하기 위해 알라닌 스캐닝을 수행하였다. mAb의 에피토프를 추가로 특징화하기 위해 샷건 돌연변이유발을 기반으로 하는 인테그럴 몰레큘라(Integral Molecular)의 에피토프 맵핑 플랫폼을 이용하여 알라닌 스캐닝을 수행하였다. 전장 CD38 단백질에 대한 코딩 영역을 성공적으로 코돈-최적화하고 합성하고 포유동물 고발현 벡터로 서브클로닝하였다. 그 후, 이러한 어미 구축물을 서열 확인하고, 면역검출에 의해 포유동물 세포 발현에 대해 검증하였다. 전매 벡터로 클로닝되고 HEK-293T 세포에서 발현된 야생형 CD38을 사용하여, 고처리량 유동 세포분석법을 이용하는 aCD38-b-348 (mAb 및 Fab)의 결합 및 스크리닝을 위한 조건을 최적화하였다.

[0204] 항체의 에피토프를 맵핑하기 위해, CD38의 알라닌-스캔 라이브러리를 구축하였다. 그 후, 항체 (mAb 및 Fab)를 각각의 개별 CD38 변이체로의 결합에 대해 스크리닝하였으며, 이는 시험 mAb 결합에 중요한 CD38 접촉 잔기의

확인을 가능하게 하였다.

[0205] 항-인간 CD38 Ab 경쟁 검정: 표준 순차적 결합 검정을 이용하여 포르테 바이오 옥텟 Red96 시스템 (팔 포르테 바이오 코포레이션, USA) 상에서 항체 경쟁을 수행하였다. 0.625 µg/mL의 his 태그가 부착된 재조합 인간 CD38을 300초 동안 Ni-NTA 바이오센서 상으로 로딩하였다. 15초 동안 세척 및 키네틱스 완충액 상에서 60초 동안 기준선 단계 후, 센서를 600초 동안 66.6 nM의 제1 항체 (다라투무맙), 이어서 제2 항-CD38 항체 (다라투무맙 (대조군) 또는 aCD38-b-348) (또한, 600초 동안 66.6 nM에서)에 노출하였다. 포르테 바이오 데이터 분석 소프트웨어 9.0를 이용하여 데이터를 가공하였다. 제2 항체에 의한 추가 결합은 비점령 에피토프를 나타내는 반면 (에피토프에 대한 경쟁 없음), 결합 없음은 에피토프에 대한 에피토프 차단 (경쟁)을 나타내었다.

[0206] 결과

[0207] 재료 & 방법에 기재된 바와 같은 효모-기반 항체 프레젠테이션 라이브러리를 사용하여, 재조합 인간 CD38 세포 외 단백질 서열 (rhCD38)에 결합하는 모노클로날 항체 (mAb)를 단리하였다. 이들 항체를 서열분석하고, 효모 세포에서 고유한 클론을 생성하였다 (Barnard GC et al., 2010). 고유한 항체 서열을 발현하는 각각의 효모 클론에 대한 세포 배양 상등액을 rhCD38 결합에 대해 스크리닝하였다.

[0208] 선택된 항체에 대한 KD 값 (친화성 및 결합력 측정에 대한) 및 교차 비닝 분석은 표 1A에 제공된다.

[0209] [표 1A]

| 항체 | 에피토프 교차-비닝 군 | 친화성 | | | 결합력 | |
|-------------|--------------|--|------|--|--|------|
| | | K _D 인간 CD38-HIS 1가 (M) (옥텟) | 이소타입 | K _D 인간 CD38-HIS 1가 (M) (비아코어) | K _D 인간 CD38-HIS 1가 (M) (옥텟) | 이소타입 |
| aCD38-b-348 | B | 8.81E-09 | IgG1 | 2.00E-09 | 1.77E-10 | IgG1 |
| aCD38-b-348 | B | 9.24E-09 | IgG4 | - | - | - |
| 다라투무맙 | F | 8.28E-08 | IgG1 | - | 1.80E-10 | IgG1 |

[0210]

[0211] 옥텟 및 비아코어(Biacore)에 의해 측정되고 다라투무맙과 비교된, 재조합 1가 인간 CD38로의 항-CD38 항체의 결합은 도 7, 12 및 19A에 나타낸다.

[0212] 에피토프 맵핑 및 알라닌 스캐닝에 의한 확인의 결과는 표 1B에 나타낸다.

[0213] [표 1B]

| 항체 | 알라닌 스캐닝 | 펩스캔 |
|-------------|---------|---|
| aCD38-b-348 | R78 | ⁶⁵ ARCVKYTEIHPEMRH ₇₉ |

[0214]

[0215] rhCD38로의 결합, 서열 고유성 및 발현 수준을 기반으로, mAb의 패널을 확인하였다. 이들 항체를 재조합 시노물구스 원숭이 및 마우스 CD38 세포의 도메인 단백질 서열로의 결합에 대해 추가로 특징화하였다. 또한, 에피토프 비닝을 수행하여, 확인된 항체가 참고 효능제 항-CD38 항체 IB4의 것과 중복되는 에피토프에 결합하는가를 결정하였다 (Ausiello CM et al., 2000; Ferrero E et al., 2004). 10⁻⁸ M 내지 10⁻¹⁰ M로 포함된, 1가 rhCD38 및/또는 재조합 시노물구스 CD38 세포의 단백질 서열에 대한 IgG 결합 값을 나타내는 클론을 특징화하였다. 또한, 참고 효능제 항-CD38 항체 IB4 (또는 상업적으로 이용가능한 다라투무맙, DARA)과 경쟁하거나 경제하지 않는 것으로 각각의 항체를 특징화하였다. 선택된 항체는 표 1에 나타낸 바와 같이 상이한 교차 비닝 군에 속하였다. 시노물구스 팬 T 세포 (도 3A) 및 인간 PBMC (도 3B)로의 결합의 수준에서 항체 클론을 또한 평가하고 확인하였다.

[0216] 최종적으로, 응집 및 비-특이적 상호작용을 유발하는 항체 서열을 제거하기 위해, 초기-단계 항체 개발을 위한 고처리량 스크리닝을 가능하게 하는 접근법인 친화성-포획 자기-상호작용 나노입자 분광법 (AC-SINS) 및 다중특이적 시약 (PSR) 검정에서 항체를 스크리닝하였다 (Liu Y et al., 2014). 항체 중 어느 것도 후자 검정에서 양성을 기록하지 않았고, 이와 같이 패널로부터 제거되지 않았다.

[0217] 상기 기재된 바와 같이 서열분석되고 특징화된 선택된 대상 중에서, 클론 aCD38-b-348은 인간 CD38 결합에 대해

IB4와도 경쟁하지 않고 다라투무맙과도 경쟁하지 않는 신규 상보성 결정 영역 (CDR; 도 2A)을 제시하는 항체이다. 사실상, 펩스캔 기술을 이용하여 수행한 에피토프 맵핑 연구는 aCD38-b-348이 다라투무맙에 대해 공개된 영역 (아미노산 233-246 및 267-280을 함유하는 2개의 베타-가닥; 도 2B) 또는 다른 항-인간 CD38 항체에 대해 보고된 영역 (WO2015123687의 표 2 참조)과는 완전히 다른 영역에서 인간 CD38에 결합하고, 10^{-9} M 범위의 Kd 값으로 인간 및 시노물구스 CD38 세포의 단백질 서열에 결합한다는 것을 나타내었다. 알라닌 스캐닝은 aCD38-b-348에 대한 에피토프 영역 및 특히 인간 CD38의 아미노산 잔기 78이 결합에 관여된다는 것을 확인하였다. 항체 경쟁 검정은 다라투무맙이 동일한 에피토프에 대해 aCD38-b-348과 경쟁하지 않는다는 것을 나타내었다 (도 23).

[0218] 그러므로, aCD38-b-348 서열 (도 2A)은 CD38에 특이적으로 결합하는 항체를 확인하고, CD38 조정 항체 작용제를 정의하는 기능적 특징과 관련된 효능제 활성을, 상기 용어가 본원에서 사용되는 바와 같이, 세포-기반 검정 또는 동물 모델에 의해 기능적으로 평가할 수 있었다. aCD38-b-348-LCDR3의 분석은 항체 특성의 일부에 영향을 미칠 수 있는 제조 동안 변형을 위한 잠재적인 표적을 나타내는 DG (Asp-Gly) 모티프의 존재를 나타내었다. 이 범위에서, 하나 또는 양자 모두의 잔기가 치환되고, 모든 이러한 돌연변이체 중에서 오직 제한된 수의 잔기가 치환된 aCD38-b-348-기반 항체 라이브러리는, 예를 들어 다우디 세포의 표면 상에서 발현된 바와 같이 인간 CD38로의 결합을 유지하였다 (실시예 2 참조). 이 방식으로, 대응하는 aCD38-b-348-기반 항체 변이체는 CD38 조정 항체 작용제의 완전한 특성을 유지하는 것으로 또는 CD38 결합 특성을 단순히 갖는 것으로 시험할 수 있었다. 실시예에 개시된 검정을 이용하여 이들 변이체의 추가 검증을 추구할 수 있었다.

[0219] 실시예 2: CD38 조정 항체 작용제를 검증하기 위한 세포-기반 모델

[0220] 재료 & 방법

[0221] 시험관내 T 세포 활성화 검정: 사전에 동결된 일차 인간 팬 T 세포 (스텝셀 테크놀로지스(Stemcell Technologies))를 eFluor450 형광 염료 (라이프 테크놀로지스)로 표지하였고, 10% FBS (시그마(Sigma)), 2 mM L-글루타민 (라이프 테크놀로지스) 및 10,000 U/mL Pen-Strep (시그마)을 함유하는 RPMI 1640 (라이프 테크놀로지스)에서 항-CD3 항체 (0.1 μ g/mL 코팅 농도, 클론 OKT3, 이바이오사이언시스(eBiosciences))로 예비코팅되고 10, 5 및 2.5 μ g/mL의 농도로 항-CD38 조정 항체로 코팅된 96-웰 플레이트에서 72시간 동안 웰 당 0.15×10^6 개 세포를 인큐베이션하였다. T 세포 증식의 판독을 유동 세포분석기 상에서의 획득에 의해 수행하였으며, 이는 생존성 염료 (쑤비 엔아이알, 바이오레전드(BioLegend))로 표지된 죽은 세포를 제외시키고, 플루오로크롬 표지된 항체 (CD8-FITC 클론 HIT8a 이바이오사이언시스, CD25-PE 클론 M- A251 바이오레전드, CD4-BV510 클론 RPA-T4 바이오레전드, CD38-PE-Cy7 클론 HB_7, 이바이오사이언시스, CD137-APC 클론 4B4-1 바이오레전드)로 염색하여 표면 마커를 식별하였다. 메소 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery) MSD 플랫폼을 이용하여, 상등액에서의 사이토카인 분석을 수행하였으며, 제조자의 지침서 (Multiplex 검정 키트, 메소 스케일 디스커버리; 도면에서 별표는 적합화 곡선 범위보다 위의 값을 나타냄)에 따라 IFN γ , IL2, IL10, TNF α , 및 GM-CSF의 발현을 결정하였다.

[0222] NFAT 신호전달 검정에 의한 시험관내 T 세포 활성화: 루시페라제 리포터 시스템 (비피에스 바이오사이언스(BPS Bioscience))으로 안정하게 형질감염된 주르카트 세포를 CD38 (또는 대조군 IgG)에 대한 상이한 농도의 mAb (0.2, 1, 5, 10, 20, 40 μ g/mL)와 4°C에서 20분 동안 PBS (GIBCO)에서 인큐베이션한 후, 세포를 펠렛화하고, PBS 상등액을 제거하고, 1 μ g/mL 가용성 CD3 mAb의 존재 하에 40 μ g/mL F(Ab')₂-단편 교차결합 Ab (잭슨 면역리서치(Jackson ImmunoResearch))가 보충된 냉각 성장 배지 (RPMI (ATCC) + 10% FBS (시그마))에서 세포를 재현탁시켰다. 교차결합 후 10분에, 항체를 첨가하고, 세포를 37°C 인큐베이션으로 이동시켰다. 37°C 인큐베이션 개시 후 6 내지 24시간에, 세포를 용균시키고, 제조자 지침서 (비피에스 바이오사이언스 윈스텝 루시페라제 검정 키트)에 따라 특정 루시페라제 기질의 가수분해로부터 발광 방출에 의해 루시페라제 활성을 측정하였다. NFAT 신호전달을 상대 발광 단위 (RLU)로서 측정하였다.

[0223] 시험관내 NK 세포 활성화 검정. 인간 PBMC를 셀 트레이스(Cell Trace) 바이올렛 증식 염료 (라이프 테크놀로지스)로 표지하고, 5일 동안 100:1의 비율의 MDA-MB-231 세포의 존재 하에 배양하였다 (배양 배지 IMDM, 라이프 테크놀로지스, 열-불활성화된 10% 인간 혈청, 시그마, 10,000 U/mL Pen-Strep, 시그마). 항-CD38 항체를 첨가하거나, 대조군 세포를 미처리로 방치하였다. 형광 염료의 희석에 의해 정량된 증식에 대한 판독을 FACS 분석에 의해 수행하였다. 세포를 플루오로크롬 접합된 항체로 표지하고, 죽은 세포 (쑤비 엔아이알(Zombie NIR) 염료, 바이오레전드)를 제외시킴으로써 NK 세포를 게이팅하고, CD45+ 조혈 세포 (CD45-PE-Cy7, 바이오레전드) 상에서 게이팅하고, CD3 음성 CD56 양성 세포 (CD56-BV711 클론 HI30 바이오레전드; CD3-BV510 클론 OKT3 바이오

레전드) 상에서 추가로 게이팅하였다.

[0224] 시험관내 ADCP 검정. 표적 세포로서 시험관내 분화된 Treg 및 이펙터 세포로서 단핵구-유래 대식세포를 사용하여 항-인간 CD38 항체의 특징화를 위해 항체-의존성 세포-매개성 식작용 (ADCP)을 수행하였다. 상이한 이펙터 대 표적 비율을 평가하였다. 표적 세포는 1×10^4 개 세포/웰로 첨가한 반면, 이펙터 세포는 (1×10^4 , 2.5×10^4 , 5×10^4 또는 1×10^5 개 세포/웰)로 첨가하였다. 3개의 농도 ($1 \mu\text{g/mL}$; $10 \mu\text{g/mL}$ 및 $50 \mu\text{g/mL}$)에서 항-인간 CD38 항체를 평가하였다. 다음 프로토콜을 이용하여 검정을 수행하였다: PBMC를 백혈구 추상체로부터 피콜(Ficoll) 기울기 원심분리에 의해 분리하였다. CD14 마이크로비드 (CDK006, 밀텐이 바이오텍)를 이용하여 CD14+ 세포를 분리하였다. 10% FBS (시그마), 2 mM L-글루타민 (라이프 테크놀로지스) 및 10,000 U/mL Pen-Strep (시그마)을 함유하는 RPMI 1640 (라이프 테크놀로지스)에서 50 ng/mL M-CSF의 존재 하에 단핵구를 7일 동안 배양하고, M-CSF를 함유하는 신선한 배지를 4일 후 첨가하였다. 인간 Treg 세포 분화 키트 (130-050-201, R&D Systems)를 이용하여 조절성 T 세포 (Treg)를 분리하였다. 이들 세포를 5일 동안 37°C 5% CO₂ 가습 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 7번째 날에, 대식세포 및 eFluor450 표지된 (이바이오사이언시스) Treg를 CD38 또는 대조군 항체의 존재 하에 상기 기재된 비율로 밤새 공동배양하였다. Treg 표지 (eFluor450 염료)에 대해 양성인 CD14+ 세포 (CD14-PE-Cy7 클론 MfP9 비디 바이오사이언시스로 염색됨) 상에 게이팅하는 유동 세포분석법에 의해 Treg의 식작용을 결정하였다.

[0225] 시험관내 ADCP 리포터 검정: 프로메가(Promega) 바이오에세이(Bioassay) 코어 키트 G9901을 사용하였다. 96 웰 백색 폴리스티렌 플레이트 (코스타(Costar) Cat# 3917)를 이용하여 웰 당 25 μl 배지에서 5000개 라지 세포/표적 웰의 웰을 플레이트하였다. 시험 항체를 별도의 플레이트에서 1:3 계단 희석하였다. 25 μl 의 계단 희석된 항체를 세포에 첨가하였다. 50000개 세포/웰의 이펙터 세포를 플레이트에 첨가하였다 (25 μl /웰). 플레이트를 37°C에서 20시간 동안 밤새 인큐베이션하였다. 그 다음날, 플레이트를 인큐베이터로부터 제거하고, 실온에서 20분 동안 유지시켰다. 60 μl 의 Bio-Glo 루시페라제 검정 기질을 각각의 웰에 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션하였다. 글로맥스(GloMax) 다중 검출 시스템을 이용하여 발광을 판독하였다. 세포 배양물 배지: RPMI + 4% Low IgG 혈청.

[0226] 시험관내 ADCC 검정: 이펙터 세포의 공급원으로서 인간 PBMC와 표적 세포로서 다우디 (CD38 양성) 인간 세포주를 사용하여 항-인간 CD38 항체의 특징화를 위해, 항체-의존성 세포-매개성 세포독성 검정 (ADCC 검정)을 수행하였다. 37°C 5% CO₂에서 4시간 동안 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 최고 농도, 이어서 로그 계단 희석법 (7개의 점)으로 3별로 평가되는 시험 용품 (항-CD38 일차 항체 또는 대조군으로서 리투시맵)으로 50 대 1 또는 25 대 1에서 이펙터 대 표적 비율을 평가하였다. PBMC를 IL-2로 프라임링하고, 공동 배양 검정 동안 IL-2가 존재하였다. 시험관내 배양 전에, 표적 세포주를 1 μM 칼세인 AM으로 표지하고, 2.5 mM 프로베네시드와 인큐베이션하였다. 용균된 세포는 로딩된 칼세인을 상등액으로 방출시켰으며, 이는 형광 측정을 가능하게 하였다. 엑셀 및 그래프패드(GraphPad) 소프트웨어 분석에 의해 칼세인 AM 방출을 분석하여, 정규화에 의해 용량 반응 곡선을 생성하였으며, 여기서, 1% 사포닌 처리 값은 최대 용균율을 결정하는데 사용하였다. 표적 세포 용균율 백분율을 XY 차트 상에 플로팅하여, 농도의 로그에 대한 정규화된 칼세인 AM 방출 백분율의 그래프를 그리고, 비-선형 회귀 곡선으로 데이터 적합화하여, 상기 곡선으로부터 EC50을 계산하였다.

[0227] 시험관내 CDC 검정: 세포를 시험 용품 (항-CD38 일차 항체 또는 대조군으로서 리투시맵)으로 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 최고 농도, 이어서 로그 계단 희석법 (7개의 점)으로 10% 정상 인간 혈청 보체의 최종 농도로 3별로 처리함으로써, CD38을 발현하는 인간 세포주 (다우디)에 대한 CDC 활성을 시험하였다. 샘플을 3시간 동안 37°C 5% CO₂에서 배양하였다. 배양 조건에 따라, 세포를 세척하고, 유동 세포분석법 분석 전에 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 최종 농도에서 프로피디움 요오다이드 (PI)를 갖는 1x PBS에서 재현탁시켰다. 샘플 획득 동안 유동 세포분석법에 의해 총 세포를 시험하였다. PI 양성 세포의 백분율을 XY 차트 상에 플로팅하여, 농도의 로그에 대한 PI 백분율의 그래프를 그리고, 비-선형 회귀 곡선으로 데이터 적합화하여, 상기 곡선으로부터 EC50을 계산하였다.

[0228] 직접적 세포 사멸 검정. 세포를 시험 용품 (항-CD38 일차 항체) 또는 대조군으로서 리투시맵으로 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 최고 농도, 이어서 로그 계단 희석법 (7개의 점)으로 3별로 처리함으로써, CD38을 발현하는 인간 세포주 (다우디)에 대한 직접적 전세포사멸(proapoptotic) 활성을 시험하였다. 세포를 시험 용품 (항-CD38 일차 항체 또는 대조군으로서 리투시맵)으로 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 최고 농도, 이어서 로그 계단 희석법 (7개의 점)으로 3별로, 이어서 5 $\mu\text{g/mL}$ 토기 항-인간 Fc γ F(ab')₂ (이차 항체)로 처리함으로써, Fc γ 수용체-매개성 교차결합 활성에 의한 세포 사멸을 시험하였다. 샘플을 24시간 동안 37°C 5% CO₂에서 배양하였다. 배양 조건에 따라, 세포를 세척하고,

아넥신 V 결합 완충액 및 7-AAD에 재현탁시켜, 유동 세포분석법 분석에 의해 세포 사멸을 시험하였다. 샘플 획득 동안 유동 세포분석법에 의해 총 세포를 시험하였다. 후기 세포자멸(late apoptotic) 세포의 백분율을 XY 차트 상에 플로팅하여, 농도의 로그에 대한 아넥신 V-양성 및 7-AAD-양성 세포 백분율의 그래프를 그리고, 비선형 회귀 곡선으로 데이터 적합화하여, 상기 곡선으로부터 EC50을 계산하였다.

[0229] 세포 표면 상의 CD38의 효소적 활성화 (시클라제 및 NADase/가수분해효소 활성화): NGD+ (시그마) 및 E-NAD+ (시그마)의 그의 각각의 형광 생성물: cGDPR (NDG+로부터 시클릭 생성물) 및 5'-eAMP (E-NAD+의 가수분해 생성물)로의 CD38-의존성 전환을 모니터링함으로써, 다우디 세포 및 주르카트 세포의 세포 표면 상에서 CD38의 시클라제 활성화 및 NADase 활성화 둘 모두를 측정하였다. 150,000개 다우디 세포를 20분 동안 얼음 위에서 75 µl의 PBS (써모 피셔(Thermo Fisher))에서 10 µg/mL 항체와 인큐베이션하였으며; 20분 후, 75 µl의 효소적 반응 완충액 (또는 대조군 완충액)을 첨가하고, 다우디 세포의 경우 45분 동안 및 주르카트 세포의 경우 60분 동안 37°C에서 세포를 인큐베이션하였다. 효소적 반응 완충액은 20 mM 울트라퓨어(UltraPure) Tris-HCl 완충액 (써모 피셔), pH 7.5의 PBS (써모 피셔) 및 200 µM의 NGD+ 또는 E-NAD+를 포함하였다. 37°C에서 인큐베이션 후, 550 x g에서 원심분리에 의해 세포를 펠렛화하고, 몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices) 스펙트라맥스(SpectraMax) 미니 맥스(MiniMax) 300 플레이트 판독기 (여기 파장 300 및 방사 파장 410)에서 형광 측정을 위해 100 µl의 상등액을 사용하였다.

[0230] 통계. 곡선 적합화를 수행하고 EC50 값 및 최대 활성을 결정하기 위해 프리즘(Prism) 소프트웨어 (그래프패드)를 이용하였다.

[0231] 결과

[0232] ADCC 및 CDC 검정으로부터의 EC50 값 및 용균을 백분율 결과는 동일한 실험에서 다라투무맙에 대한 결과와 비교하여 표 2, 3 및 4에 나타낸다.

표 2

표적 다우디 세포에 대한 ADCC 데이터:

| 항체 | 실험 | EC50 ug/ml | 최대 용균율 % | EC50 ug/ml DARA | 최대 용균율 DARA |
|-------------|----|------------|----------|-----------------|-------------|
| aCD38-b-348 | 6 | 0.00032 | 60 | 0.00194 | 45 |
| aCD38-b-348 | 7 | 0.0008 | 39 | 0.00317 | 31 |
| aCD38-b-348 | 8 | 0.00042 | 50 | - | - |

[0233]

표 3

CDC 데이터 - 10% 보체, 표적 다우디 세포:

| 항체 | 실험 | EC50 ug/ml | 최대 용균율 % | EC50 ug/ml DARA | 최대 용균율 DARA |
|-------------|----|------------|----------|-----------------|-------------|
| aCD38-b-348 | 15 | 0.17 | 97.1 | 0.05 | 97.8 |
| aCD38-b-348 | 16 | 0.34 | 87.8 | 0.13 | 96.8 |
| aCD38-b-348 | 17 | 0.26 | 89.9 | 0.13 | 96.8 |

[0234]

표 4

CDC 데이터 - 10% 보체, 표적 라지 세포:

| 항체 | EC50 ug/ml | 최대 용균율 % | EC50 ug/ml DARA | 최대 용균율 DARA |
|------------------|------------|----------|-----------------|-------------|
| aCD38-b-348 | 0.3 | 41.7 | 0.04 | 54.7 |
| aCD38-b-348 (반복) | 0.17 | 44.4 | 0.04 | 41.7 |

[0235]

[0236]

실시에 1에서 특징화된 다른 항체와 같이 aCD38-b-348 후보 항체를 면역 세포와 관련하여 추가로 평가하였다. 제1 실험 시리즈에서, aCD38-b-348은 인간 및 시노물구스 T 세포로의 용량 의존성 결합을 나타내었다 (도 3A 및 B). T 세포를 사용하여 시험시, 예를 들어 이러한 세포를 배양하기 위한 플레이트를 코팅하기 위해 aCD38-b-348을 사용시, aCD38-b-348은 항-CD38 자극의 존재 하에 인간 T 세포 활성화화를 강하게 증가시킨 반면, 참고 항-CD38 항체 (DARA)는 더 약한 효능제 활성을 나타내었다 (도 4A). aCD38-b-348을 용액에서 시험시, 이 항체는 유방암 세포주와 공동 배양된 인간 일차 NK 세포의 증식 및 활성화를 유도하였다 (도 4B). aCD38-b-348의 효능제 활성은 DARA와 비교시 aCD38-b-348에 의해 촉발된 인간 T 세포에 의한 더 강한 전염증성 사이토카인 분비에 의해 추가로 강조되었다 (도 4C). aCD38-b-348의 킬러 활성은 CD38 발현 표적 세포 (도 5A), 예를 들어 조절성 T 세포의 대식세포 매개성 식작용의 유도를 통해 발휘된 것으로 나타났다. 이 효과는 DARA와 견줄만하였다. 또한, aCD38-b-348 및 DARA는 ADCC 검정에서 견줄만한 활성을 나타내었으나, 오직 후자만이 CDC 활성을 나타내었다 (도 5B). aCD38-b-348에 의해 촉발된 감소된 CDC 효과는 감소된 주입 부위 반응으로 인해 증가된 안전성을 갖는 항-CD38 항체를 제공하였다. DARA 및 aCD38-b-348은 또한 인간 PBMC에 의한 CD38을 발현하는 종양 세포 (다우디)의 사멸에서 견줄만한 활성을 나타내었으나, 오직 aCD38-b-348의 활성이 항체 교차결합에 의해 향상된 것으로 나타났다 (도 5C). aCD38-b-348은 또한 리포터 세포 검정에서 다라투무맙과 비교하여 증가된 ADCP를 갖는 것으로 나타났다 (도 8).

[0237]

시험관내 사멸 활성 이외에, aCD38-b-348은 주르카트 세포 검정에서 CD38의 시클라제 활성을 약간 감소시킨 반면 (도 9A), DARA는 시클라제 활성을 강하게 억제시키는 것으로 나타났다. aCD38-b-348은 주르카트 세포 검정에서 CD38의 NADase (NAD⁺ 가수분해효소) 활성에 대한 효과를 나타내지 않은 반면, DARA는 활성을 증가시켰다 (도 9B).

[0238]

결론적으로, aCD38-b-348은 상이한 실험 설정에서 면역 세포와 관련하여 CD38 조정 항체 작용제의 활성을 나타내는 예시적인 항-CD38 항체로서 특징화되었다.

[0239]

본원에서 제공되는 변이체 항체 상에서 동일한 검정을 수행할 수 있었다 (즉, 변경된 DG 모티프를 갖는 aCD38-a-348의 변이체).

[0240]

실시에 3: 동물 모델에서 CD38 조정 항체 작용제의 검증

[0241]

재료 & 방법

[0242]

림프종 세포-기반 모델. 10% 소태아 혈청 + 1 mM Na 피루베이트 + 4.5 g/L 글루코스 + 10 mM HEPES가 보충된 2 mM L-글루타민을 함유하는 RPMI 1640에서 다우디 및 라모스 인간 버키트 림프종 세포를 배양하였다. 건강한 암컷 cb17 SCID 마우스를 찰스 리버(Charles River)로부터 얻었다. 동물의 미정맥으로 200 μ l의 RPMI 1640 중 5×10^5 개 다우디 세포 또는 10^6 개 라모스 세포의 정맥내 주사에 의해 종양을 유도하였다. γ -공급원 (1.44 Gy / 마우스, 60Co, 바이오맵(BioMep), 프랑크 브레타니에르)에 의한 전신 방사선 조사 후 24 내지 72시간에 세포 주사를 수행하였다. 마우스를 체중에 의해 처리 군으로, 군 당 8마리의 마우스로 무작위로 추출하였다. 군 1로부터의 동물들은 연속 3주 동안 (TWx3) 1주 2회 5 ml/kg로 비히클의 정맥내 주사를 투여받았다. 군 2로부터의 동물들은 연속 3주 동안 (TWx3) 1주 2회 10 mg/kg/inj.로 DARA의 정맥내 주사를 투여받았다. 군 3로부터의 동물들은 연속 3주 동안 (TWx3) 1주 2회 10 mg/kg/inj.로 aCD38-b-348의 정맥내 주사를 투여받았다. 최대 8주 후에 마우스를 희생시켰다.

[0243]

고형 종양 모델

[0244]

암컷 CB.17 SCID 마우스에게 측복부에 피하로 0% 매트릭셀 중 1×10^7 개 라모스 종양 세포를 주사하였다 (군 당

n=10). 종양이 100-130 mm³ 크기에 도달시 3주 동안 1주 2회 처리를 개시하였다. 다라투무맙 및 비히클 대조군과 비교하여 항체 aCD38-b-348로 10 mg/kg으로 정맥내로 마우스를 처리하였다. 종양 부피가 2000 mm³에 도달하거나 처리 개시 후 43일에 도달하면 (어느 것이든 먼저 도달하면) 마우스를 희생시켰다.

- [0245] 결과
- [0246] aCD38-b-348의 치료적 특성을 인간 암에 대한 동물 모델에서, 특히 면역약화된 마우스를 사용하여 시험할 수 있으며, 여기서 인간 종양 세포의 사멸과 관련하여 CD38 조정 항체 작용제의 특성을 더 적절하게 평가할 수 있었다. aCD38-b-348은 2개의 상이한 유형의 인간 림프종 세포를 정맥내로 주사받은 마우스의 생존율을 증가시키는 현저한 효력을 나타내었으며, 이는 다라투무맙 (DARA)보다 우수한 효과이다 (도 6).
- [0247] aCD38-b-348은 다라투무맙과 비교하여 피하로 주사된 라모스 세포에 대해 향상된 항-종양 활성을 나타내었다 (도 10).
- [0248] 동물 생존율, 뿐만 아니라 동시발생 면역학적 효과에 관한 이들 특성은, 문헌 (Morton JJ et al. 2016; Holzapfel BM et al., 2015)에 기재된 바와 같이 고품 종양이 피하로 성장된 인간 암 세포주 또는 인간 원발성 암 세포의 주사를 기반으로 하는 인간 종양 (특히 고체 암)에 대한 다른 생체내 모델에서 및 환자로부터 직접적으로 단리된 종양 샘플의 사용을 기반으로 하는 생체의 모델에서 추가로 조사할 수 있으며, 상기 환자로부터 종양 세포 및 면역 세포를 단리하고, 세포 활성화, 증식, 사이토카인 생성 및/또는 세포 사멸에 의해 측정되는 바와 같이 항-CD38 항체에 대한 반응에 대해 시험관내에서 시험하였다. 가능하게는 aCD38-b-348을 상이한 용량으로 및/또는 다른 항암제 (예컨대, 키나제 또는 다른 효소의 억제제, 항체, 방사선요법/화학요법, 아췌반트, 또는 백신)와 조합하여 투여함으로써, 추가 특징, 예컨대 선택된 조직 또는 생물학적 재료에서 압스코팔 효과 또는 유전자 발현의 변화를 평가할 수 있었다.
- [0249] 실시예 4: 저용량 항-CD38 항체는 비-인간 영장류에서 T 세포 활성화를 증가시킨다.
- [0250] 비-인간 영장류 (시노몰구스 원숭이)를 1번째 날 및 8번째 날에 0.03 mg/kg aCD38-b-348로 i.v. 처리하였다. 제1 용량 전, 뿐만 아니라 제2 용량 후 24시간 및 5일에 말초 T 세포 빈도 및 활성화 마커 (CD69, CD137 및 HLA-DR)를 분석하였다. T 세포는 투약 후 증가된 활성화의 징후를 나타내었으며, CD4 T 세포 상의 CD69 및 CD137, 및 CD8 T 세포 상의 HLA-DR의 상승조절에 의해 가장 현저히 나타내었다. 면역 활성화-관련된 유해한 반응이 관찰되지 않았다. 그 결과는 도 14A 내지 F에 나타난다.
- [0251] 실시예 5: aCD38-b-348의 변이체의 생성
- [0252] 아스파르테이트 이성질체화를 방지하기 위해, VL CDR3 DG 서열에 대한 잠재적인 치환의 라이브러리를 생성하였다. DG 모티프를 제거하기 위해 aCD38-b-348에 대한 2개의 효모 라이브러리를 생성하였다. 제1 라이브러리는 아스파르테이트 및 글리신 둘 모두 주위에 축퇴 프라이머 NNKNNK를 기반으로 하였다. 이 라이브러리는 400의 다양성을 가졌다. 제2 라이브러리는 아스파르테이트 상에 집중적인 축퇴 프라이머 NNK를 기반으로 하는 반면, 글리신을 보존하였고, 20의 다양성을 가졌다. 이들 라이브러리는 10 nM의 인간 CD38 단량체에 대한 단일 라운드에서 분류하였으며, PSR-음성 분류를 수행하였다. 각각의 계통으로부터의 96개를 상기와 같이 서열분석, 생성 및 특징화하였다. 추가적으로, NNKNNK 라이브러리로부터 총 5개의 96-웰 플레이트를 골랐으며, 옥텟에서 rhCD38로의 결합에 대해 스크리닝하였다. 제한된 치환수가 허용되었으며, 최선의 친화성을 나타내는 변이체를 선택하였고, 변이체를 옥텟에서 rhCD38로의 결합에 대해 시험하였다. 포유동물 생성을 위해 최선의 친화성을 나타내는 변이체를 선택하였고, 상기 실시예 2에 기재된 바와 같은 검정을 이용하여 추가로 특징화하였다.
- [0253] 변이체의 기능적 특징화: 10% 소태아 혈청 + 1 mM Na 피루베이트 + 4.5 g/L 글루코스 + 10 mM HEPES가 보충된 2 mM L-글루타민을 함유하는 RPMI 1640에서 림프종 세포-기반 모델 라지 및 라모스 인간 버킷 림프종 세포를 배양하였다. 건강한 암컷 cb17 SCID 마우스를 찰스 리버로부터 얻었다. 동물의 미정맥으로 200 μl의 RPMI 1640 중 5x10⁵개 라지 세포 또는 10⁶개 라모스 세포의 정맥내 주사에 의해 종양을 유도하였다. γ-공급원 (1.44 Gy / 마우스, 60Co, 바이오맵, 프랑크 브레테니에르)에 의한 전신 방사선 조사 후 24 내지 72시간에, 세포 주사를 수행하였다. 마우스를 체중에 의해 처리 군으로, 군 당 10마리의 마우스로 무작위로 추출하였다. 군 1로부터의 동물들은 연속 3주 동안 (TWx3) 1주 2회 5 ml/kg로 비히클의 정맥내 주사를 투여받았다. 군 2로부터의 동물들은 연속 3주 동안 (TWx3) 1주 2회 10 mg/kg/inj.로 DARA의 정맥내 주사를 투여받았다. 군 3으로부터의 동물들은 연속 3주 동안 (TWx3) 1주 2회 10 mg/kg/inj.로 aCD38-b-348의 정맥내 주사를 투여받았다. 군 4로부터의 동물들은 연속 3주 동안 (TWx3) 1주 2회 10 mg/kg/inj.로 aCD38-b-348-m2의 정맥내 주사를 투여받았다. 도

면에 표시된 시간에 마우스를 희생시켰다.

[0254] 결과

[0255] 변이체 항체의 VH 및 VL 쇄의 CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3 서열은 도 15에 나타난다 (aCD38-b-348-m1에 대한 서열 번호 4 및 서열번호 20, aCD38-b-348-m2에 대한 서열번호 4 및 서열번호 21, aCD38-b-348-m3에 대한 서열번호 4 및 서열번호 22, aCD38-b-348-m4에 대한 서열번호 4 및 서열번호 23). 다우디 세포 결합 실험은 CD38로의 변이체 항체의 결합이 어미 클론 및 다라투무맙과 견줄만하다는 것을 확인하였다 (표 5 및 도 16 및 도 19 참조).

표 5

| 항체 | LCDR3 서열 | 옥텟 친화성 K _D (M) | 비아코어 친화성 K _D (M) | EC50 ug/ml | Max MFI |
|----------------|------------------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------|---------|
| aCD38-b-348 | QQDGNVYT (서열번호: 7) | 5.79E-09 | 2.0E-9 | 0.341 | 2324 |
| aCD38-b-348-m1 | QQEANVYT (서열번호: 10) | 2.47E-08 | 6.30E-08 | 0.485 | 1612 |
| aCD38-b-348-m2 | QQDSNVYT (서열번호: 11) | 3.99E-08 | 6.80E-09 | 0.499 | 2221 |
| aCD38-b-348-m3 | QQDANVYT (서열번호: 12) | 5.51E-08 | 2.80E-08 | 0.558 | 2098 |
| aCD38-b-348-m4 | QQEGNVYT (서열번호: 13) | 7.01E-08 | 2.70E-08 | 0.299 | 2020 |
| 다라투무맙 | - | - | | 0.945 | 2495 |

[0256]

[0257] 변이체는 어미 클론 및 다라투무맙과 견줄만한 ADCC 활성을 나타내었다 (도 17). 변이체는 ADCC 활성에 대해 어미 균주보다 더 적은 EC50 μg/mL를 가졌으나, 견줄만한 최대 용균율을 가졌다 (표 6).

표 6

ADCC 표적 용균율:

| 항체 | EC50ug/ml | 최대 용균율 % |
|----------------|-----------|----------|
| aCD38-b-348 | 0.0059 | 44 |
| aCD38-b-348-m1 | 0.0028 | 38 |
| aCD38-b-348-m2 | 0.0025 | 44 |
| aCD38-b-348-m3 | 0.0043 | 39 |
| aCD38-b-348-m4 | 0.0014 | 38 |
| 다라투무맙 | 0.0025 | 58 |
| IgG1 이소타입 | NA | 0 |

[0258]

[0259] DTT 감소 및 요오도아세트아미드 알킬화를 통해 펩티드 맵핑 샘플을 제조하고, 트립신을 사용하여 소화시키고, LC-UV-MS 시스템 상에서 분석하였다. 이성질체화된 및 비-이성질체화된 펩티드의 수준을 결정하였으며, 이성질체화된 펩티드 %는 표 7에 나타난다.

표 7

| 항체 | 이소타입 | % isoD |
|----------------|------|--------|
| aCD38-b-348 | IgG4 | 13.0% |
| aCD38-b-348 | IgG1 | 15.5% |
| aCD38-b-348-m2 | IgG1 | 0.0% |
| aCD38-b-348-m3 | IgG1 | 0.0% |

[0260]

[0261]

인간 암에 대한 동물 모델에서, 특히 면역약화된 마우스를 사용하여 aCD38-b-348 및 그의 변이체 aCD38-b-348-m2의 치료적 특성을 시험할 수 있으며, 여기서 인간 종양 세포의 사멸과 관련하여 CD38 조정 항체 작용제의 특성을 더 적절하게 평가할 수 있었다. aCD38-b-348 변이체인 aCD38-b-348-m2는 두 모델 모두 (라지 및 라모스)에서 2개의 상이한 유형의 인간 림프종 세포로 정맥내로 주사된 마우스의 생존율을 증가시키는 현저한 효력을 나타내었다 (도 18).

[0262]

실시예 6: NK 세포에서 aCD38-b-348의 분석

[0263]

NK 세포 탈과립:

[0264]

건강한 지원자의 연락으로부터 단리된 NK 세포를 10% FCS를 함유하는 RPMI1640 배지 중 2×10^6 개 세포/mL의 500 U/mL IL-2로 2일 동안 자극하거나, 사전 IL-2 자극 없이 신선하게 단리하여 사용하였다. 기능적 검정을 위해, 1 내지 1.5×10^6 개 NK 세포를 DMEM 완전 배지에 재현탁시키고, 96-웰 플레이트의 20개 웰에 웰 당 100 μ l의 세포 현탁액을 접종하였다. 염색되지 않은/자극되지 않은 대조군 조건을 제외하고, CD107a 항체를 함유하는 배지 20 μ l (배지 140 μ l에 사전-혼합된 항체 14 μ l)를 모든 웰에 첨가하였다. 시험 항체 aCD38-b-348, 다라투무맙, 및 인간 IgG1 이소타입 대조군을 10 μ g/mL으로 첨가하였다. 양성 대조군을 위해, PMA (50 ng/mL) 및 이오노마이신 (1 mg/mL)을 함유하는 배지 50 μ l를 양성 대조군 웰에 첨가하고, 또한 음성 대조군 조건을 위해 배지만을 첨가하였다. 세포를 37°C 5% CO₂에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 10 μ l의 골지스탑(GolgiStop)을 각각의 웰에 첨가하고, 세포를 추가 4시간 동안 인큐베이션하였다. 판독을 위해, 세포를 수확하고, FACS 튜브로 이동시키고, FACS 완충액으로 2회 세척하고, 항-CD56-BV-570로 표지하고, 죽은 세포 마커에 근적외선을 조사하였다. 인큐베이션 20분 후 세포를 세척하고, 신선한 완충액에 재현탁시키고, 유동 세포분석기 상에서 작동시켰다.

[0265]

NK 세포 IFN γ 생성:

[0266]

건강한 지원자의 연락으로부터 단리된 NK 세포를 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지에서 500 U/mL IL-2로 48시간 동안 자극하였다. 세포를 수확하고, PBS로 2회 세척하고, DMEM 완전 배지에서 1×10^6 개 세포/mL로 재현탁시켰다. 96-웰 플레이트에서 웰 당 100 μ l의 세포 현탁액을 접종하였다. 20 μ l의 배지를 모든 샘플, 또는 배지만을 함유하는 대조군 (음성 대조군), 또는 aCD38-b-348, 다라투무맙 또는 이소타입 대조군에 첨가하여, 각각의 시험 웰 중 10 mg/mL의 최종 농도에 도달시켰다. 양성 대조군은 PMA/이오노마이신을 함유하였다. MDA-MB-231 종양 세포 (100,000개 세포/웰) 및 NK 세포 (상기와 같음)의 공동 배양물을 함유하는 웰에 대하여 동일한 조건을 설정하였다. 골지플러그(GolgiPlug) 및 골지스탑(GolgiStop)을 모든 웰 (10 μ l)에 첨가하였다. 37°C, 5% CO₂에서 6시간 동안 세포를 인큐베이션하였다. 판독을 위해, 세포를 수확하고, 세척하고, FACS 튜브로 이동시키고, 항-CD56-FITC 및 아쿠아 데드(Aqua Dead) 세포 마커로 20분 동안 염색하였다. FACS 완충액으로 세척한 후, 세포를 고정 완충액으로 20분 동안 고정시키고, 투과화시키고, 30분 동안 항-IFN γ -APC로 염색하였다. 유동 세포 분석기에서 판독을 위해 세포를 세척하고 재현탁시켰다.

[0267]

NK 세포 증식:

[0268]

건강한 지원자의 연락으로부터 단리된 NK 세포를 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지에서 500 U/mL IL-2로 48시간 동안 자극하였다. NK 세포를 수확하고, 세척하고, CFSE 증식 염료로 표지하였다. 8×10^6 개 세포를 팔콘 튜브에서 1 ml의 PBS에 재현탁시켰다. 110 μ l의 PBS를 수평으로 유지된 튜브의 측면에 한 방울씩 첨가하고, 0.2 μ l의

CFSE를 PBS 드랍에 첨가하였다. 세포 현탁액 및 CFSE 용액을 혼합하기 위해 튜브를 진탕시키고, 20분 동안 37 °C 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 5 ml의 DMEM 배지를 첨가하고, 세포를 5분 동안 추가로 인큐베이션하고, 스피린 다운하고, 세척하고, 완전 배지에서 1x10⁶개 세포/mL로 재현탁시켰다. 96-웰 플레이트에서 웰 당 100 μl의 세포 현탁액을 접종하였다. MDA-MB-231 세포를 웰 당 80 μl의 배지에서 50:1 비율로 첨가하였다. aCD38-b-348, 다라투무맙, 또는 IgG1 이소타입 대조군을 함유하는 20 μl의 배지를 첨가하여, 0.4, 2, 또는 10 μg/mL의 최종 농도를 얻었다. 세포를 6일 동안 인큐베이션하고, 증식을 유동 세포분석법에 의해 평가하였으며, NK 세포 집단에서 증식 염료 CFSE의 희석을 관찰하였다.

[0269] 결과

[0270] 가용성 aCD38-b-348 또는 다라투무맙 (10 μg/mL)은 비활성화된 또는 IL2 예비활성화된 인간 NK 세포의 탈과립을 증가시켰다 (도 20). 가용성 aCD38-b-348 또는 다라투무맙 (10 μg/mL)은 종양 표적 (MDA-MB-231 세포)의 존재 또는 부재 하에 NK 세포의 IFN γ 생성을 증가시켰다 (도 21). 가용성 aCD38-b-348은 MDA-MB-231 종양 세포의 존재 하에 대조군과 비교하여 인간 NK 세포의 증식을 증가시켰으나, 다라투무맙은 증가시키지 않았다 (도 22).

[0271] 결과는 가용성 aCD38-b-348 항체가 탈과립, IFN γ-생성 및 증식에 의해 정의되는 일차 인간 NK 세포의 시험관내 강한 활성화를 유도한다는 것을 나타내었다. 이들 효과를 위해 NK 세포의 추가 자극이 필요하지 않았다. 다라투무맙은 유사한 NK 세포 탈과립 및 IFN γ-생성을 유도하였으나, NK 세포 증식을 유도하지 않았다.

[0272] 실시예 7: 돌연변이체 CD38로의 항체 결합

[0273] 재료 및 방법: 인간 CD38의 2개의 돌연변이체 버전을 구축하였다. 제1 버전에서, 위치 202에서 D를 G로 돌연변이 유발되게 하고 (D202G), 제2 버전에서, 위치 274에서 S를 F로 돌연변이 유발되게 하였다 (S274F).

[0274] 각각의 돌연변이 유발된 CD38 단백질로의 aCD38-b-348의 결합을 평가하고, 다라투무맙과 비교하였다.

[0275] 결과

표 8

| 항체 | 결합 반응성 (% WT) | |
|-------------------|---------------|--------------|
| | 돌연변이 - D202G | 돌연변이 - S274F |
| aCD38-b348 Fab HS | 66.8 (12) | 106.1 (9) |
| 다라투무맙 | 39.9 (8) | 6.8 (6) |

[0276]

[0277] 표 8에 제공된 바와 같은 결과는 aCD38-b-348의 결합이 돌연변이 D202G 또는 돌연변이 S274F의 인간 CD38로의 도입에 의해 영향받지 않았다는 것을 나타내었다. 이는 다라투무맙과 비교하였으며, 여기서 항체 결합은 돌연변이 S274F의 도입에 의해 영향받았으나, 돌연변이 D202G의 인간 CD38로의 도입에 의해 영향받지 않았다. 이들 결과는 aCD38-b-348이 다라투무맙보다 상이한 에피토프에 결합한다는 것을 확인하였다.

[0278] 본 출원에 포함된 서열의 요약이 하기 제공된다:

| 서열번호 | 항체 서열의 기재 | 또한 아래로서 지칭됨 |
|------|---|---|
| 1 | aCD38-b-348 가변 중쇄 CDR1 | CD38-b-348-HCDR1 |
| 2 | aCD38-b-348 가변 중쇄 CDR2 | aCD38-b-348-HCDR2 |
| 3 | aCD38-b-348 가변 중쇄 CDR3 | aCD38-b-348-HCDR3 |
| 4 | aCD38-b-348 가변 중쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 2, 3 | aCD38-b-348-HCDR123 aCD38-b-348-m1-HCDR123 aCD38-b-348-m2-HCDR123 aCD38-b-348-m3-HCDR123 aCD38-b-348-m4-HCDR123 |
| 5 | aCD38-b-348 가변 경쇄 CDR1 | aCD38-b-348-LCDR1 |
| 6 | aCD38-b-348 가변 경쇄 CDR2 | aCD38-b-348-LCDR2 |
| 7 | aCD38-b-348 가변 경쇄 CDR3 | aCD38-b-348-LCDR3 |

[0279]

| | | |
|----|--|--|
| 8 | aCD38-b-348 가변 경쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 2, 3 | aCD38-b-348-LCDR123 |
| 9 | 인간 CD38 | 유니프룻 서열 P28907 |
| 10 | aCD38-b-348-m1 가변 경쇄 CDR3 | aCD38-b-348-m1 – LCDR3 |
| 11 | aCD38-b-348-m2 가변 경쇄 CDR3 | aCD38-b-348-m2 – LCDR3 |
| 12 | aCD38-b-348-m3 가변 경쇄 CDR3 | aCD38-b-348-m3 – LCDR3 |
| 13 | aCD38-b-348-m4 가변 경쇄 CDR3 | aCD38-b-348-m4 – LCDR3 |
| 14 | aCD38-b-348 가변 중쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 1, 2, 3, 4 | aCD38-b-348-VH aCD38-b-348-m1-VH aCD38-b-348-m2-VH aCD38-b-348-m3-VH aCD38-b-348-m4-VH |
| 15 | aCD38-b-348-m1 가변 경쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 1, 2, 3, 4 | aCD38-b-348-m1-VL |
| 16 | aCD38-b-348-m2 가변 경쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 1, 2, 3, 4 | aCD38-b-348-m2-VL |
| 17 | aCD38-b-348-m3 가변 경쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 1, 2, 3, 4 | aCD38-b-348-m3-VL |
| 18 | aCD38-b-348-m4 가변 경쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 1, 2, 3, 4 | aCD38-b-348-m4-VL |
| 19 | aCD38-b-348 가변 경쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 1, 2, 3, 4 | aCD38-b-348-VL |
| 20 | aCD38-b-348-m1 가변 경쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 2, 3 | aCD38-b-348-m1-LCDR123 |
| 21 | aCD38-b-348-m2 가변 경쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 2, 3 | aCD38-b-348-m2-LCDR123 |
| 22 | aCD38-b-348-m3 가변 경쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 2, 3 | aCD38-b-348-m3-LCDR123 |
| 23 | aCD38-b-348-m4 가변 경쇄 CDR 1, 2, 3 및 FR 2, 3 | aCD38-b-348-m4-LCDR123 |
| 24 | 다라투무맙 가변 중쇄 | |
| 25 | 다라투무맙 가변 경쇄 | |

[0280]

[0281] 균등물 및 범위

[0282] 당업자는 본 발명이 본원에 포함된 실시예 또는 특정 실시양태의 다른 기재에 의해 한정되는 것이 아니라 첨부된 청구항에 의해 한정된다는 것을 이해할 것이다.

[0283] 유사하게, 단수형 "a", "an", 및 "the"는 달리 명백하게 언급되지 않는 한 문맥에서 복수 대상물을 포함한다.

[0284] 상기 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 당업계의 통상의 기술자에 의해 보편적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사한 또는 균등한 임의의 방법 및 재료가 또한 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있다. 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양물, 분자 생물학, 면역학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학과 관련하여 사용되는 명명법 및 이의 기

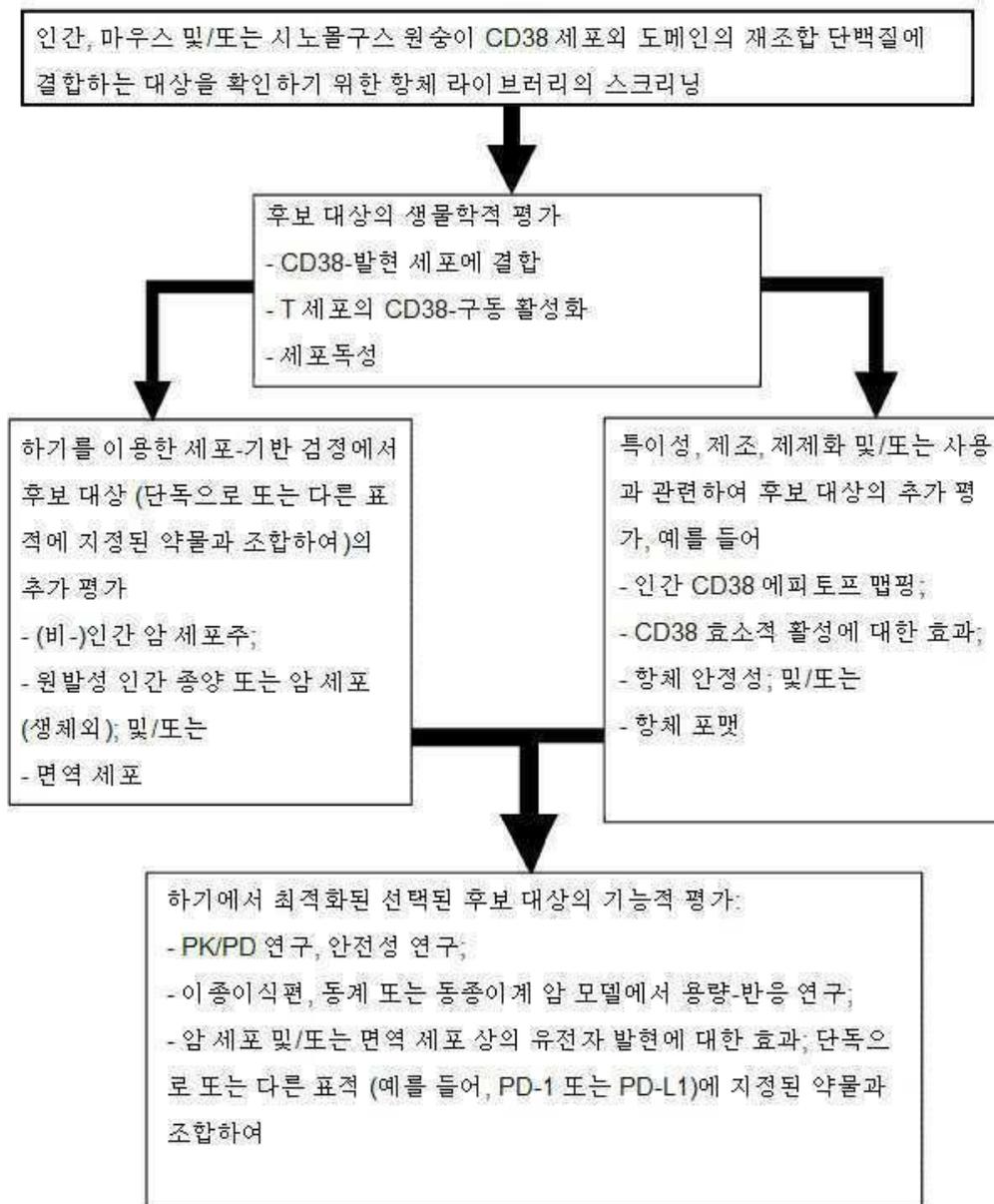
술은 당업계에 익히 공지되고 당업계에서 보편적으로 사용하거나 또는 제조자의 설명서에 따라 사용되는 것이다.

- [0285] 본원에 언급된 모든 간행물은 간행물에 인용된 방법 및/또는 재료과 관련하여 방법 및/또는 재료를 개시하고 기재하는데 본원에 참고로 도입된다.
- [0286] 참고문헌
- [0287] Ausiello CM et al., 2000. *Tissue Antigens*. 56:539-47.
- [0288] Barnard GC et al., 2010. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 37:961-71.
- [0289] Beck A et al., 2017. *Nat Rev Drug Discov*. 16:315-337.
- [0290] Chevrier S et al. 2017. *Cell*. 169:736-749.
- [0291] de Weers M et al., 2011. *J Immunol*. 186:1840-8.
- [0292] Estep P et al., 2013 *MAbs*. 5:270-8.
- [0293] Ferrero E et al., 2004. *BMC Immunol*. 5:21.
- [0294] Frasca L et al, 2006. *Blood* 107: 2392-2399.
- [0295] Hara-Yokoyama M et al., 2008. *Int Immunopharmacol*. 8:59-70.
- [0296] Holzapfel BM et al., 2015. *Stem Cells*. 33:1696-704.
- [0297] Horenstein AL et al., 2017. *Hum Antibodies*. 25:75-85.
- [0298] Jarasch A et al., 2015. *J Pharm Sci*. 104:1885-1898.
- [0299] Kamphorst AO et al., 2017. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114:4993-4998.
- [0300] Karakasheva T et al., 2015. *Cancer Res* 75: 4074-85.
- [0301] Kearns JD et al., 2015. *Mol Cancer Ther*. 14:1625-36.
- [0302] Kijanka M et al., 2015. *Nanomedicine*. 10:161-174.
- [0303] Langedijk JP et al., 2011. *Analytical Biochemistry*. 417:149-155.
- [0304] Liu L, 2015. *J Pharm Sci*. 104:1866-84.
- [0305] Liu Y et al., 2014. *MAbs*. 6:483-92.
- [0306] Malavasi F et al., 2008. *Physiol Rev*. 88: 841-86.
- [0307] Morandi F et al., 2015. *J Immunol*. 195:965-72.
- [0308] Morton JJ et al. 2016. *Cancer Res*. 76:6153-6158.
- [0309] Quarona V et al., 2013. *Cytometry B Clin Cytom*. 84:207-17.
- [0310] Rah SY et al., 2015. *Sci Rep*. 5:9482.
- [0311] Redman JM et al., 2015. *Mol Immunol*. 67: 28-45.
- [0312] Siegel RW et al., 2004. *J Immunol Methods*. 286:141-53.
- [0313] Sliwkowski M & Mellman I, 2013. *Science*. 341:1192-8.
- [0314] Sydow J et al. 2014. *PLoS One*. 9:e100736.
- [0315] Timmermann P et al., 2007, *J. Mol. Recognit.*, 20, 283-99.
- [0316] van de Donk NW et al., 2016. *Immunol Rev*. 270: 95-112.
- [0317] Vazquez-Lombardi R et al., 2015. *Drug Discov Today*. 20:1271-83.

[0318] Xu Y et al., 2013. Protein Eng Des Sel. 26:663-70
 [0319] Wei W et al., 2014. World J Biol Chem. 5: 58-67
 [0320] Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(24):8466-71.
 [0321] Steinwand et al., MAbs, 2014, 6(1):204-18.
 [0322] Ellington et al. Nature. 1990; 346(6287): 818-822.
 [0323] Tuerk et al., Science. 1990; 249(4968):505-510.
 [0324] Ni et al., Curr Med Che 2011; 18(27):4206-14.

도면

도면1



도면2

A)

CD38-b-348-HCDR1 **aCD38-b-348-HCDR2** **aCD38-b-348-HCDR3**
 GSISSSDYWWG SIYSGSTYYNPSLKS ARGQYSSGWYAYPFDM

aCD38-b-348-HCDR123

GSISSSDYWWGWIRQPPGKGLEWIGSIYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK
 LSSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDM

aCD38-b-348-LCDR1 **aCD38-b-348-LCDR2** **aCD38-b-348-LCDR3**
 RASQSVRSSYLA GASSRAT QQDGNVYT

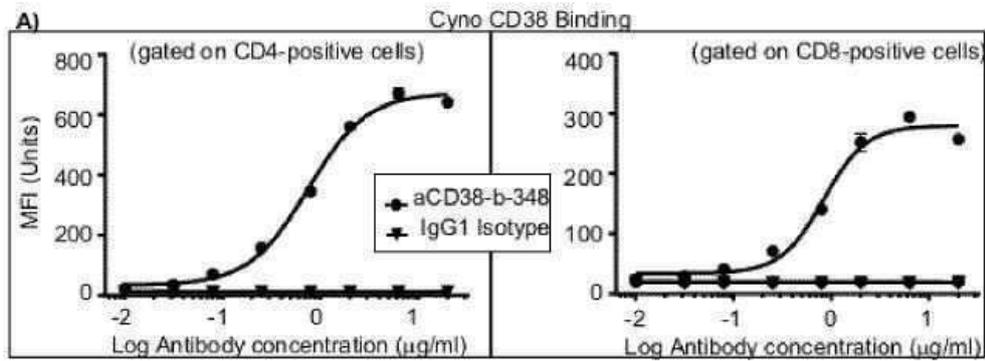
aCD38-b-348-LCDR123

RASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRL
 EPEDFAVYYCQQDGNVYT

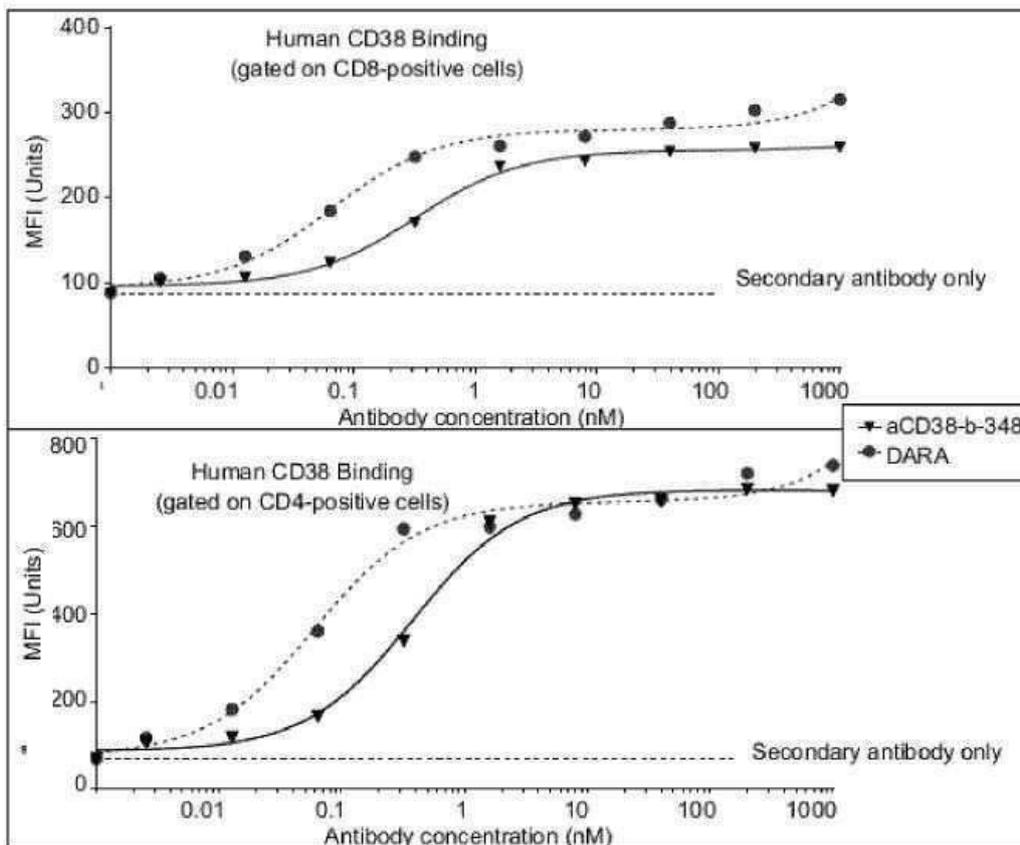
B)

| Cytoplasmatic | | Transmembrane | | |
|---------------|-------------|---------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| MANCEFSPVS | GDKPCCRLSR | RAQQLCLGVSI | LVLILVVVLA | VVVPRWRQQW |
| 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| SGPGTTKRFP | ETVIAKRCVKY | TEIHPEMRHV | DCQSVWDAFK | GAFISKHPCN |
| 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| ITEEDYQPLM | KLGTQTVPCN | KILLWSRIKD | LAHQFTQVQR | DMFTLEDTLL |
| 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| GYLADDLTWC | GEFNFSKINY | QSCPDRKDC | SNNPVSVEFK | TVSRRFAEAA |
| 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
| CDVVHVMLNG | SRSKIFDKNS | TFGSVEVHNL | QPEKVQTLA | WVIHGGREDS |
| 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| RDLCQDPTIK | ELESIIISKRN | IQFSCKNIYR | PDKFLQCVKN | PEDSSCTSEI |

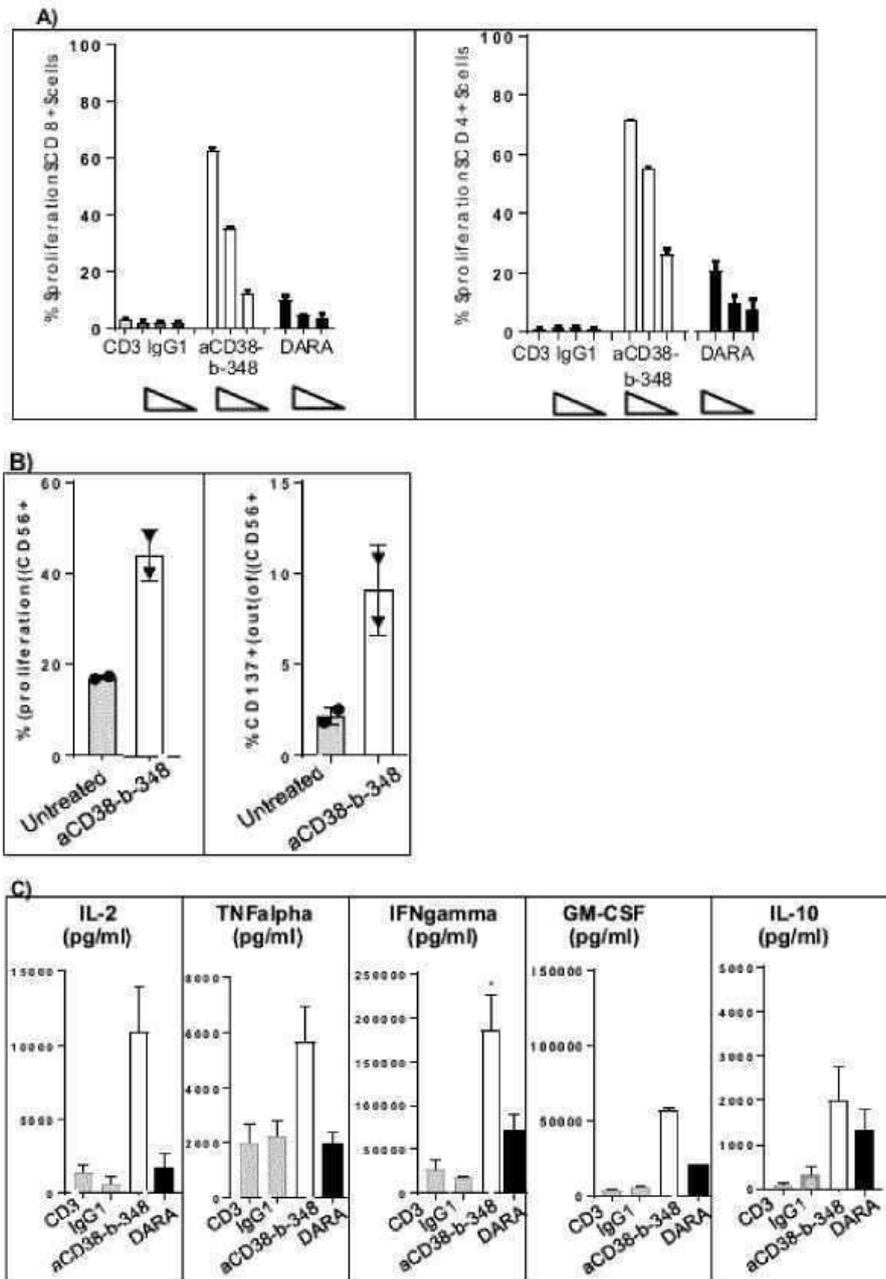
도면3



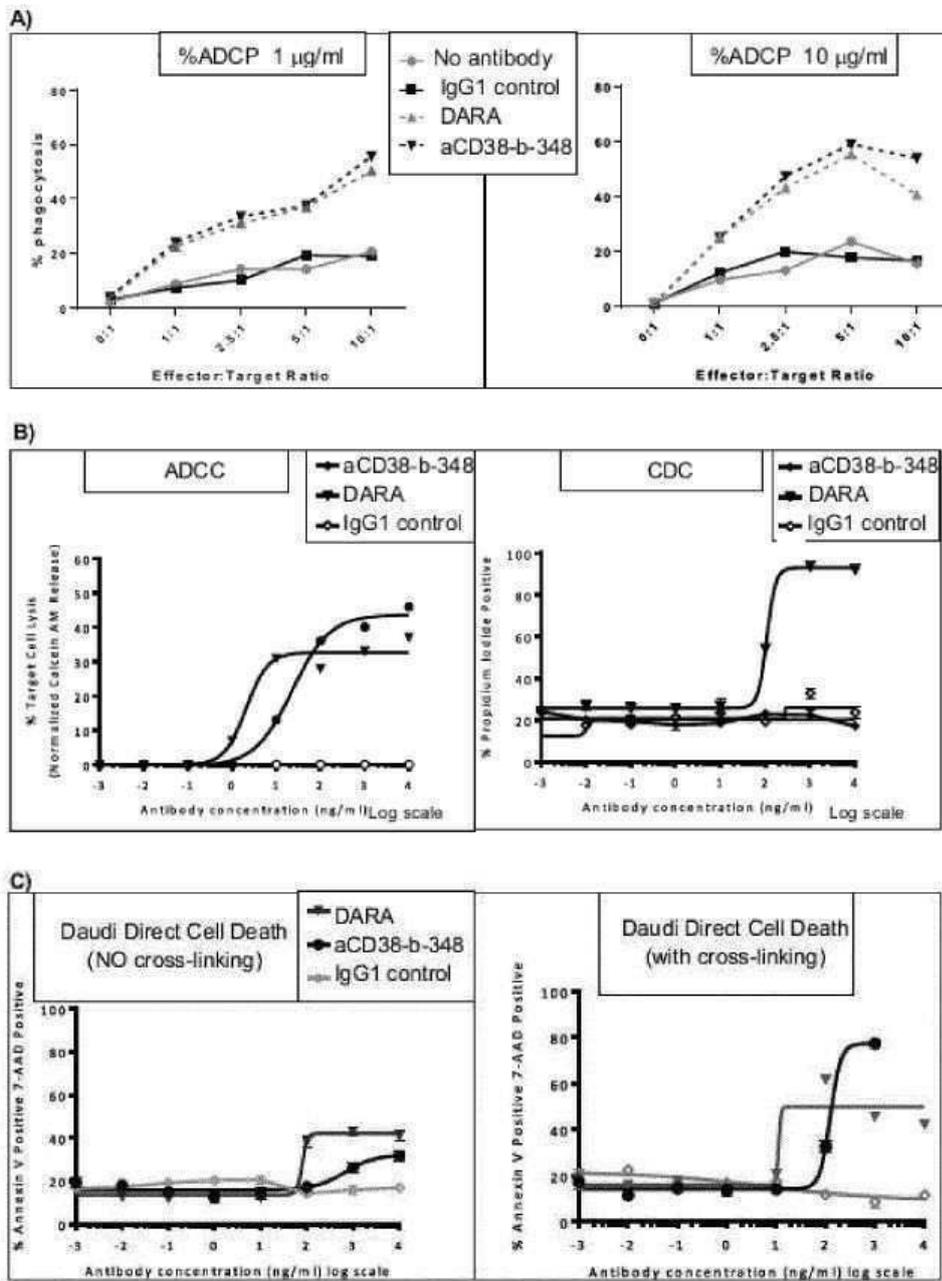
B)



도면4

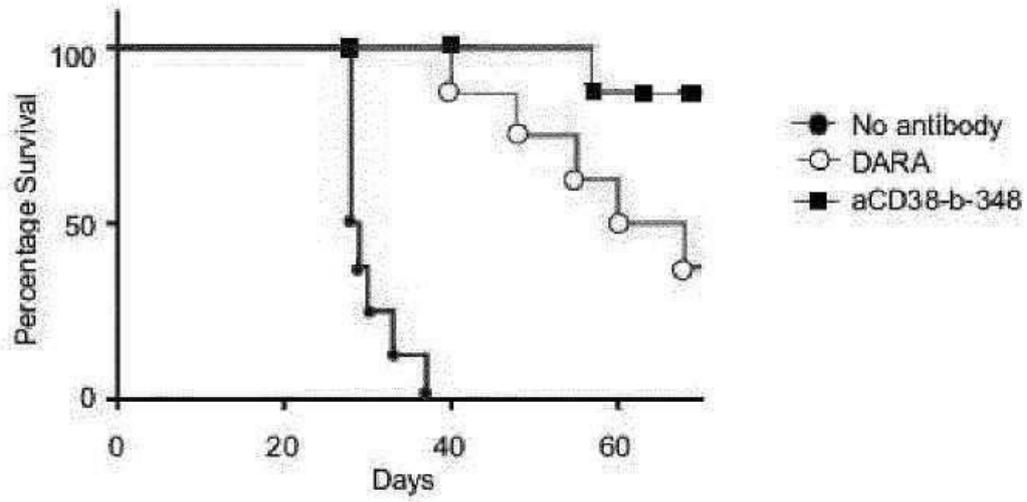


도면5

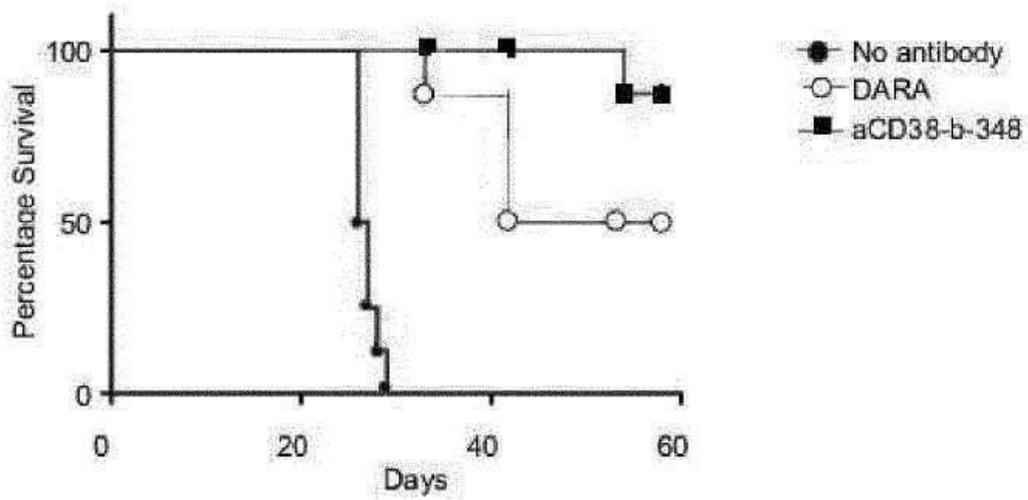


도면6

A)

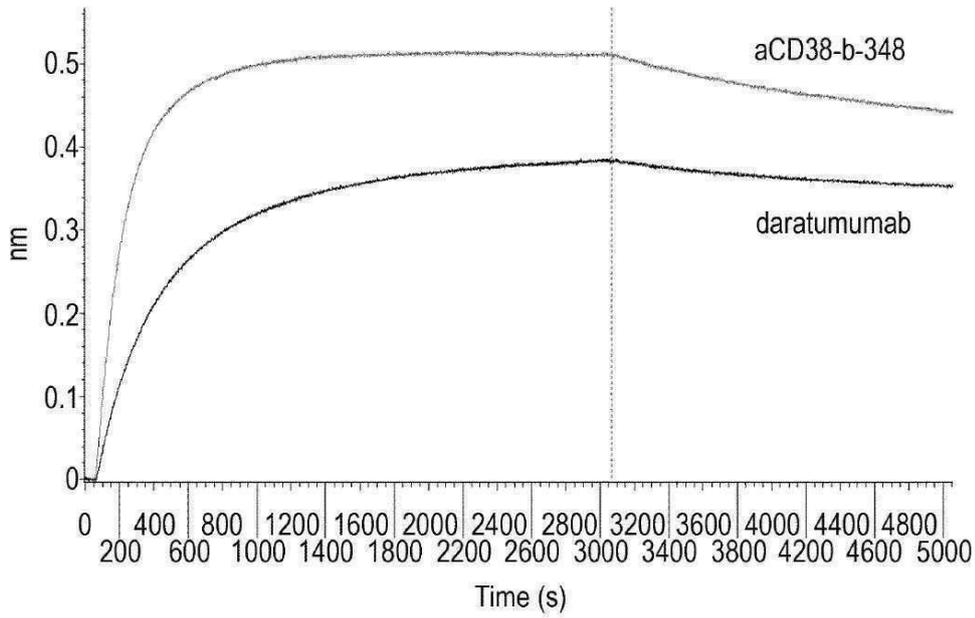


B)



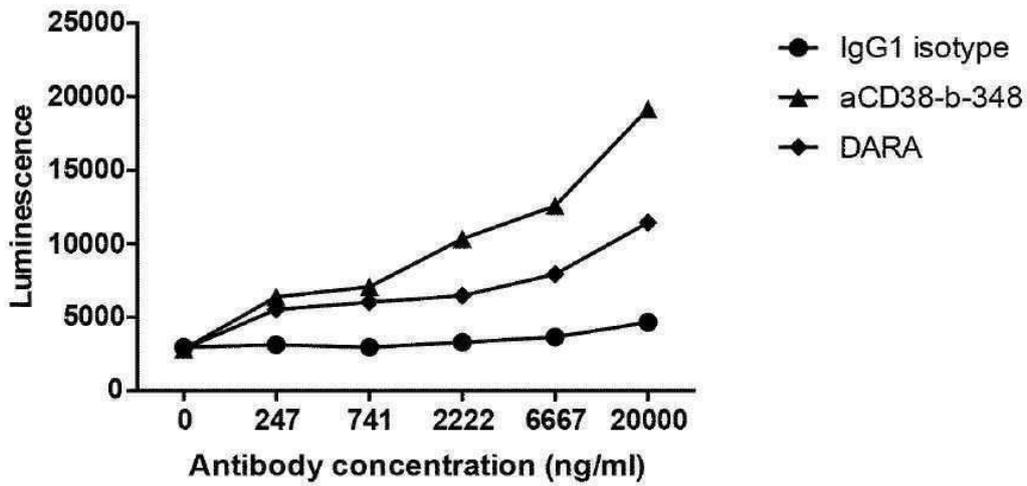
도면7

Biolayer interferometry binding analysis of purified aCD38-b-348 (IgG1) to rhCD38-his tag on the Octet Red 96 instrument



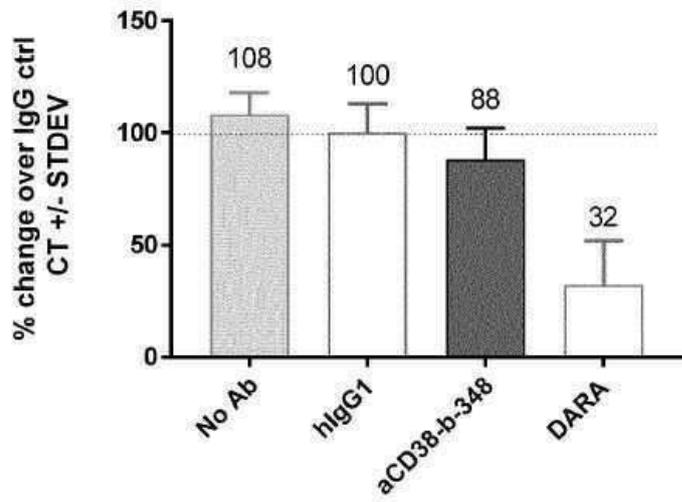
도면8

ADCP reporter assay

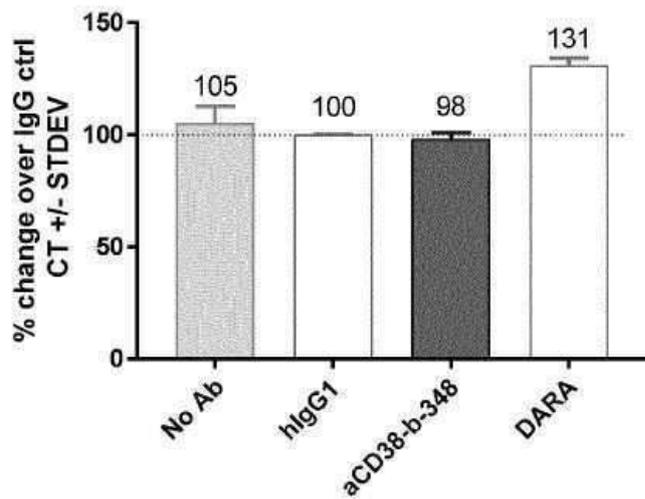


도면9

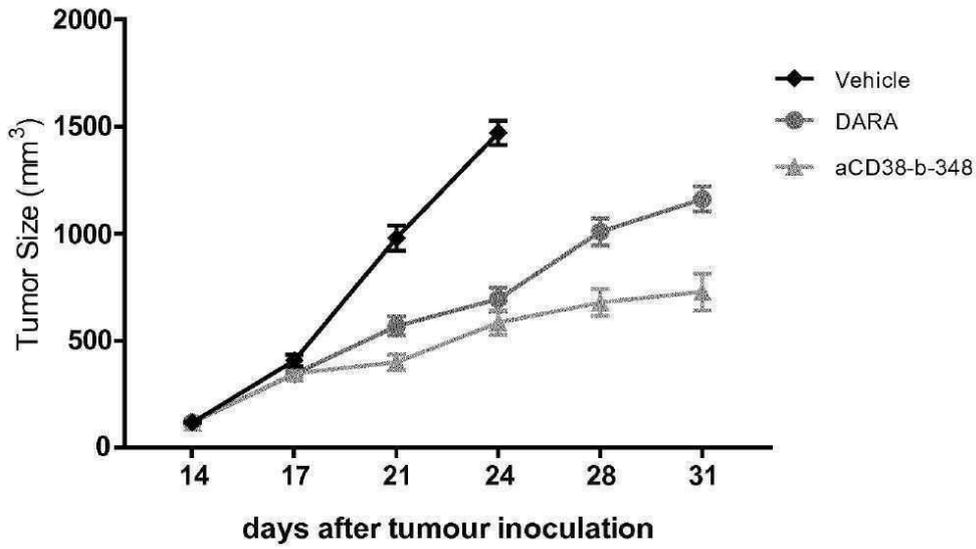
A)



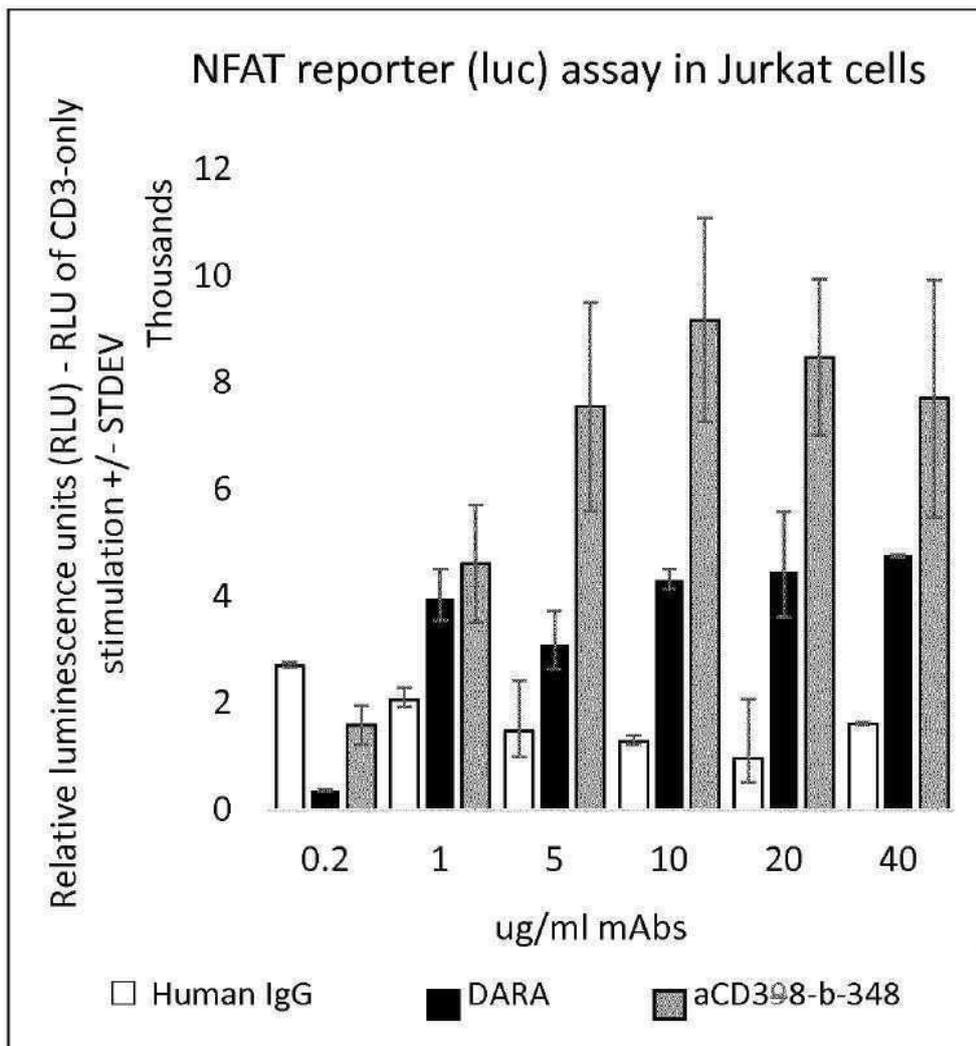
B)



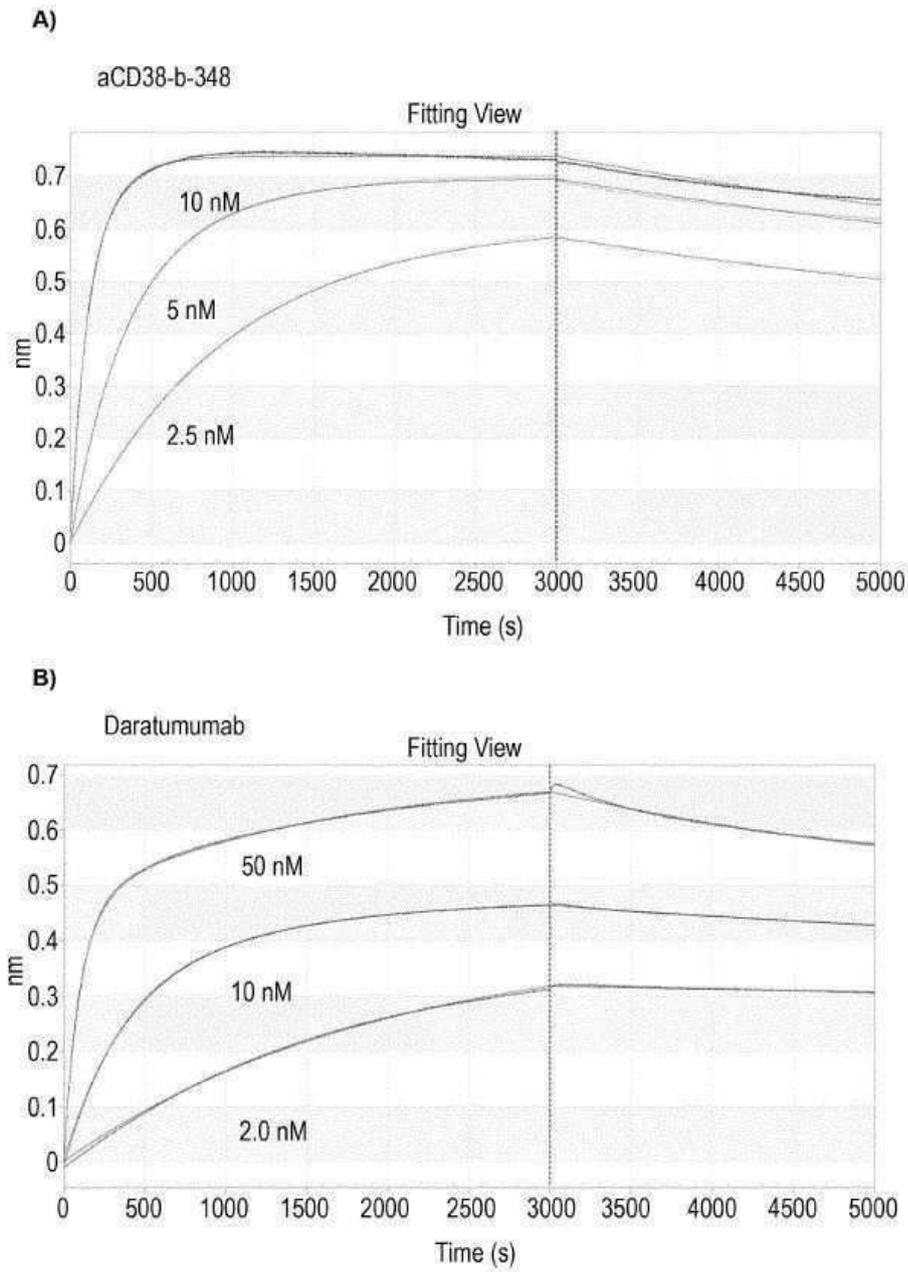
도면10



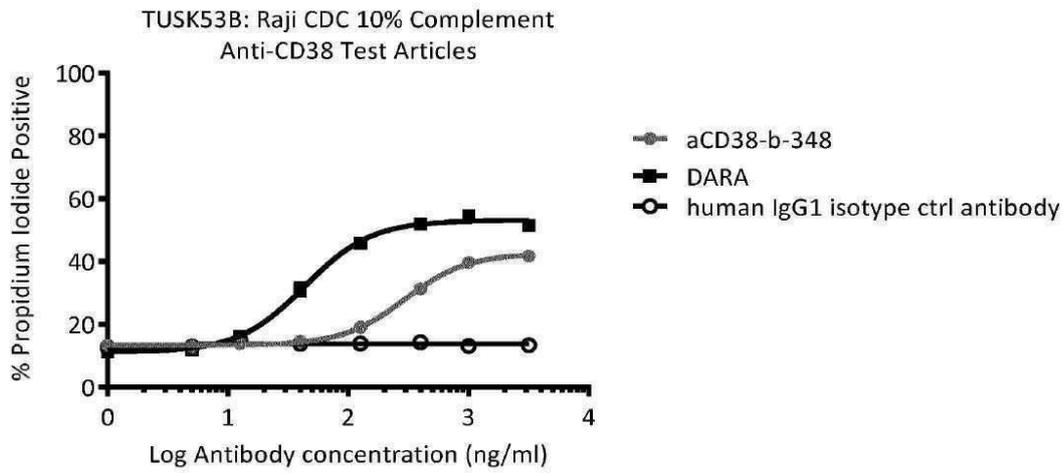
도면11



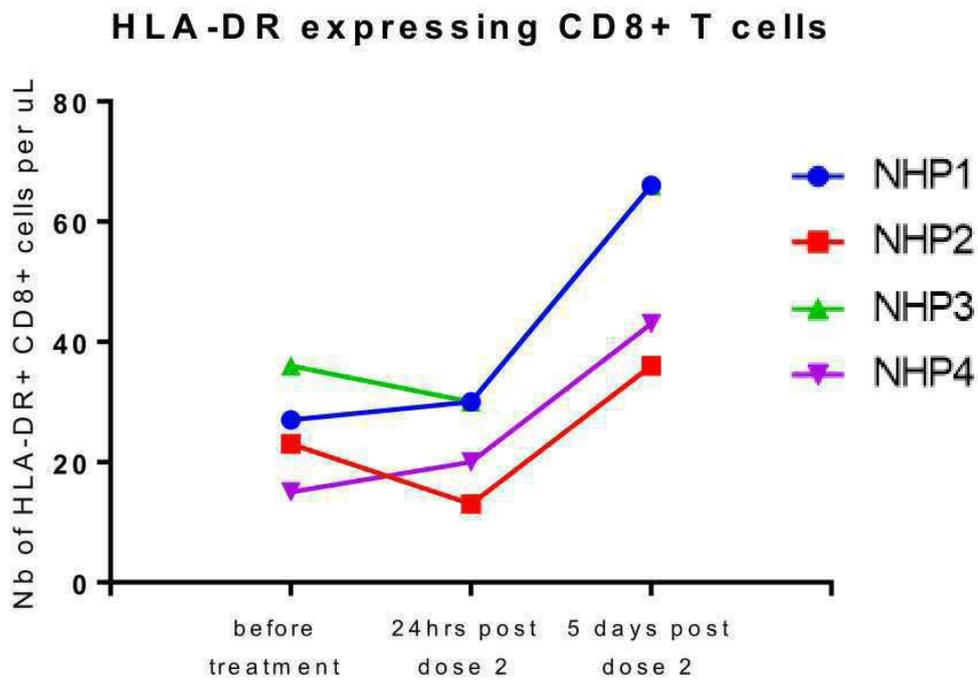
도면12



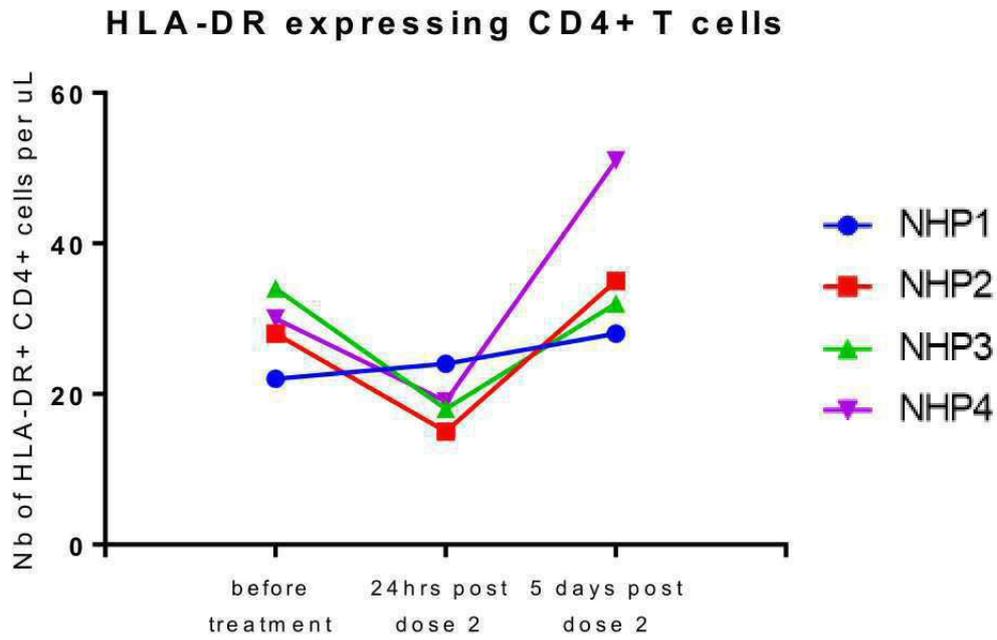
도면13



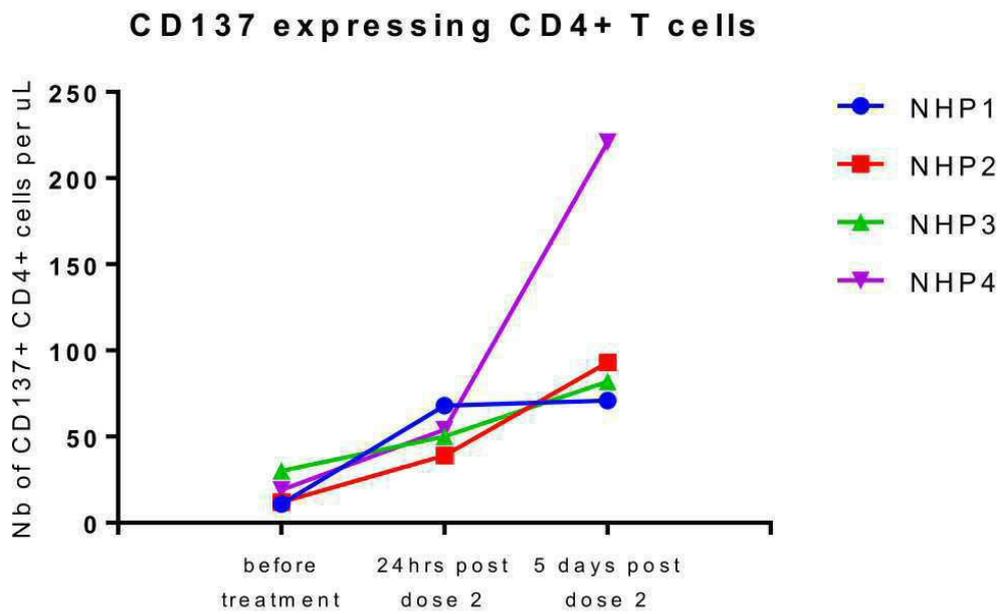
도면14a



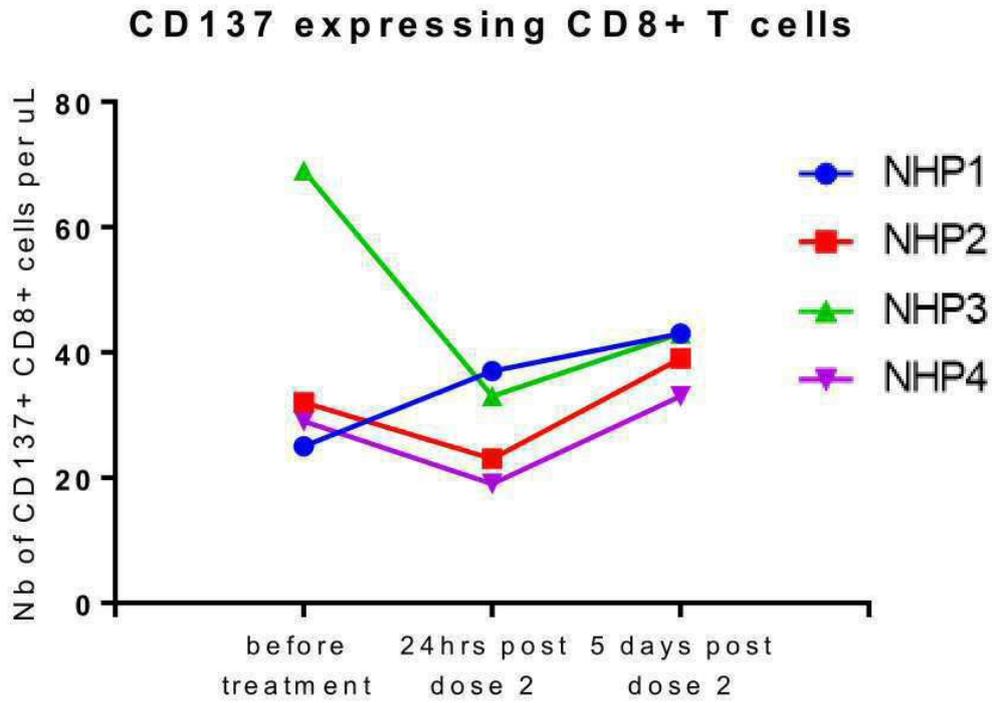
도면14b



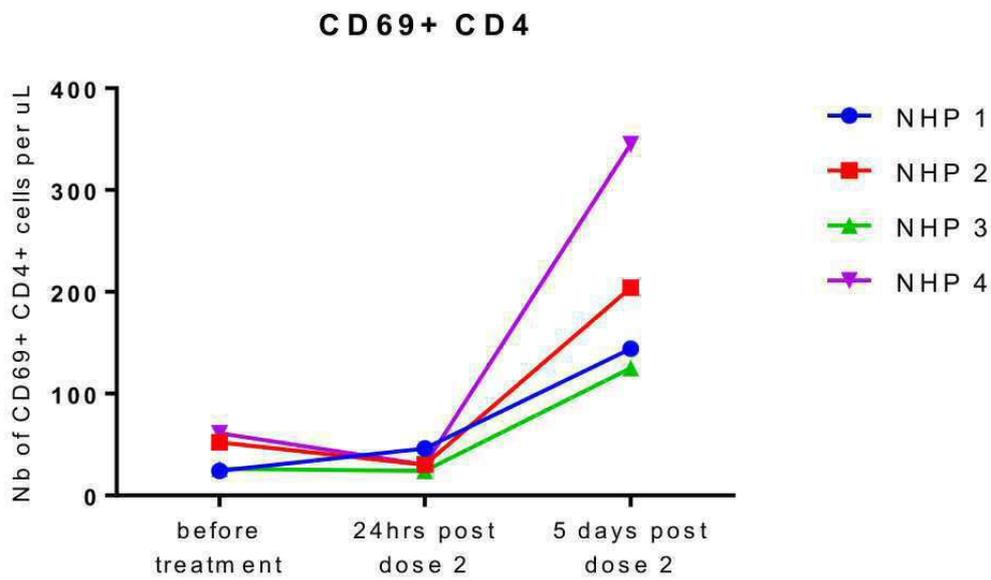
도면14c



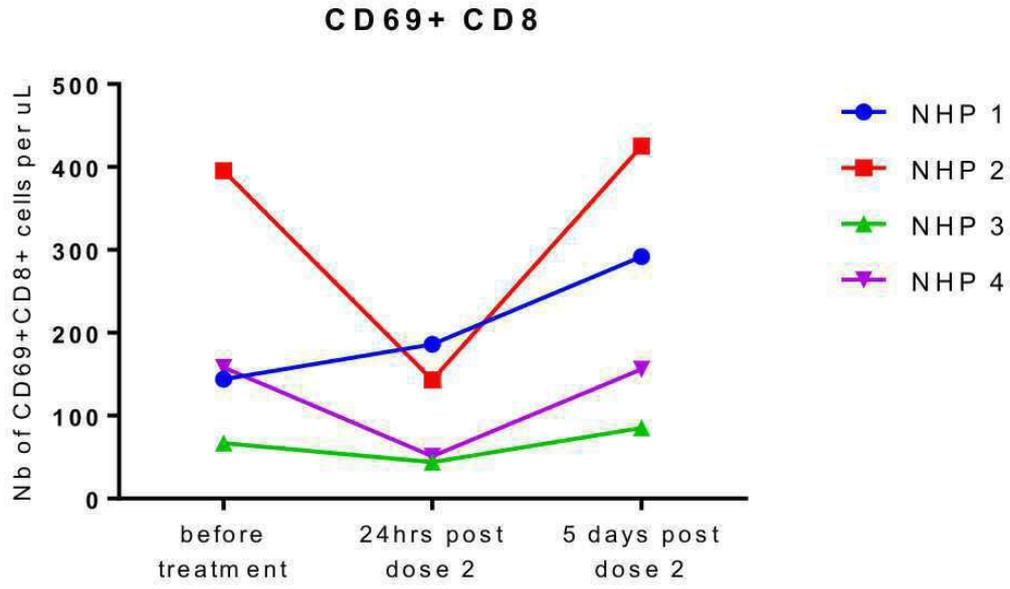
도면14d



도면14e



도면14f



도면15

A)

aCD38-b-348-m1-HCDR123:

GSISSSDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS
LKLSSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDM

aCD38-b-348-m1-LCDR123:

RASQSVRSSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS
RLEPEDFAVYYCQQEANVYT

B)

aCD38-b-348-m2-HCDR123:

GSISSSDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS
LKLSSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDM

aCD38-b-348-m2-LCDR123:

RASQSVRSSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS
RLEPEDFAVYYCQQDSNVYT

C)

aCD38-b-348-m3-HCDR123:

GSISSSDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS
LKLSSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDM

aCD38-b-348-m3-LCDR123:

RASQSVRSSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS
RLEPEDFAVYYCQQDANVYT

D)

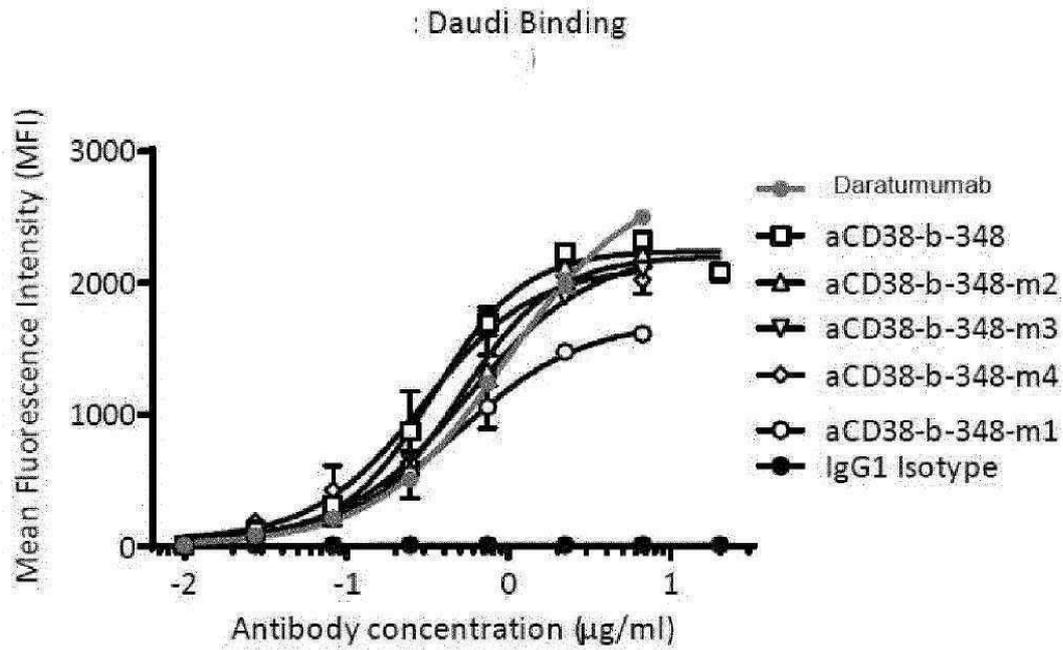
aCD38-b-348-m4-HCDR123:

GSISSSDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFS
LKLSSVTAADTAVYYCARGQYSSGWYAYPFDM

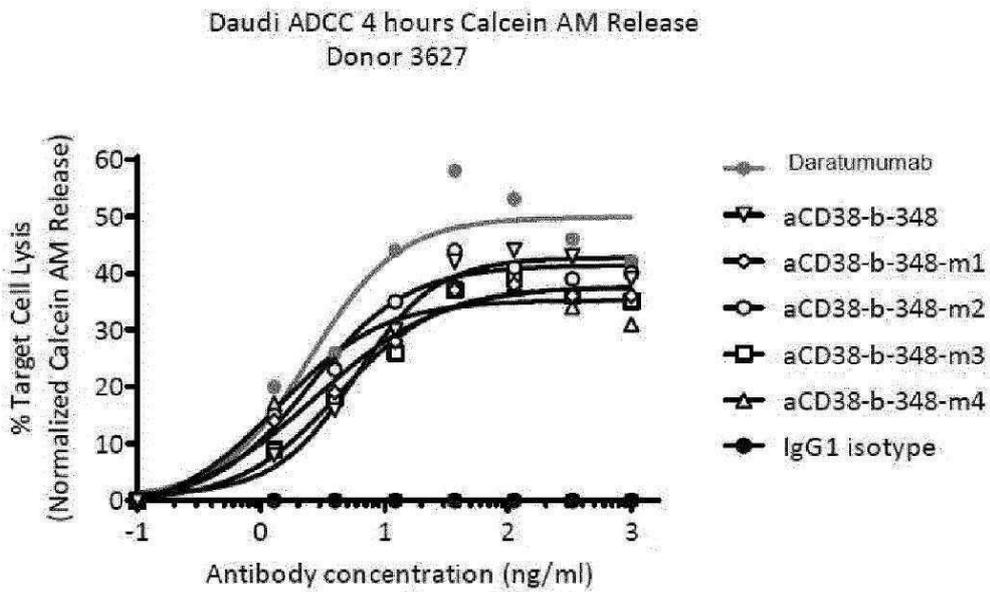
aCD38-b-348-m4-LCDR123:

RASQSVRSSLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS
RLEPEDFAVYYCQQEGNVYT

도면16

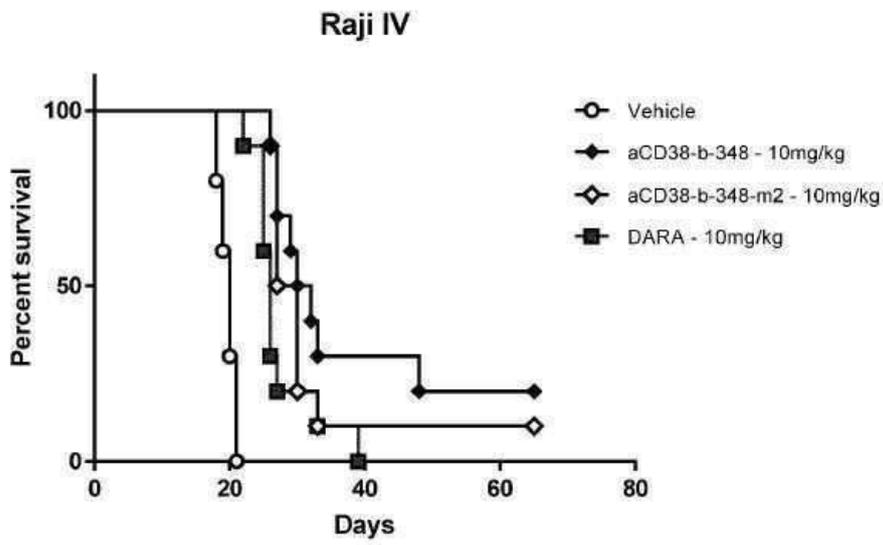


도면17

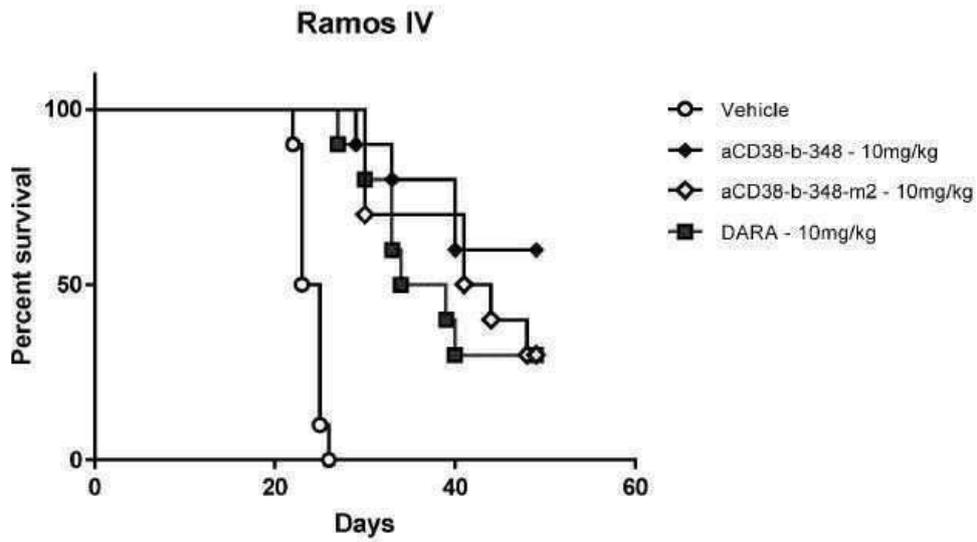


도면18

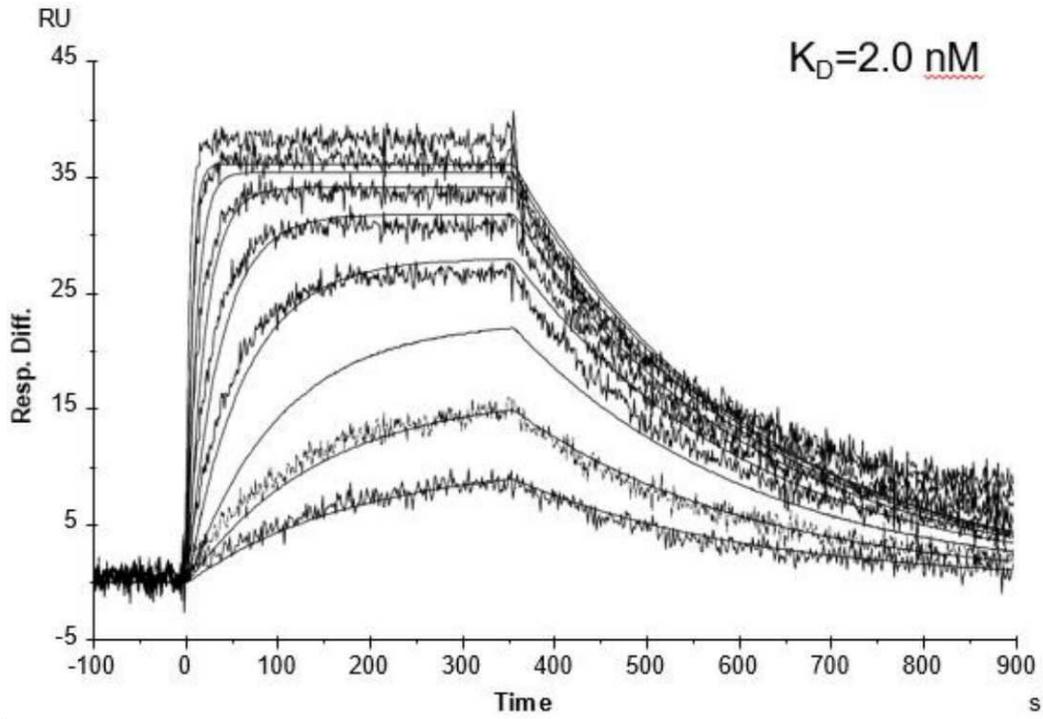
A)



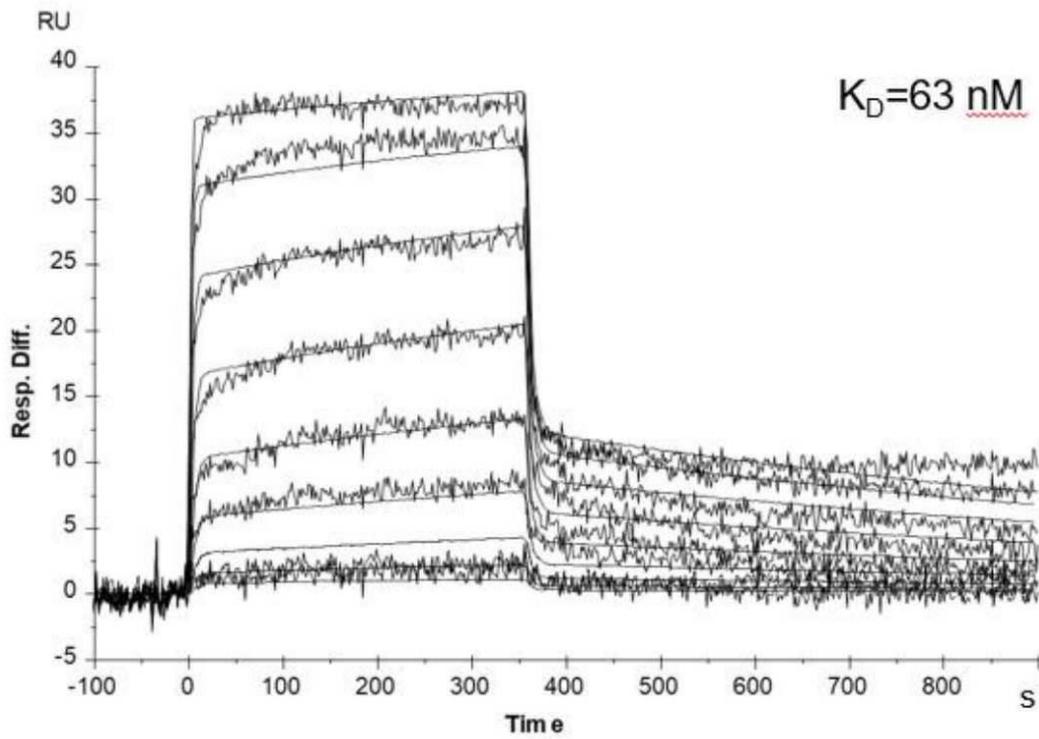
B)



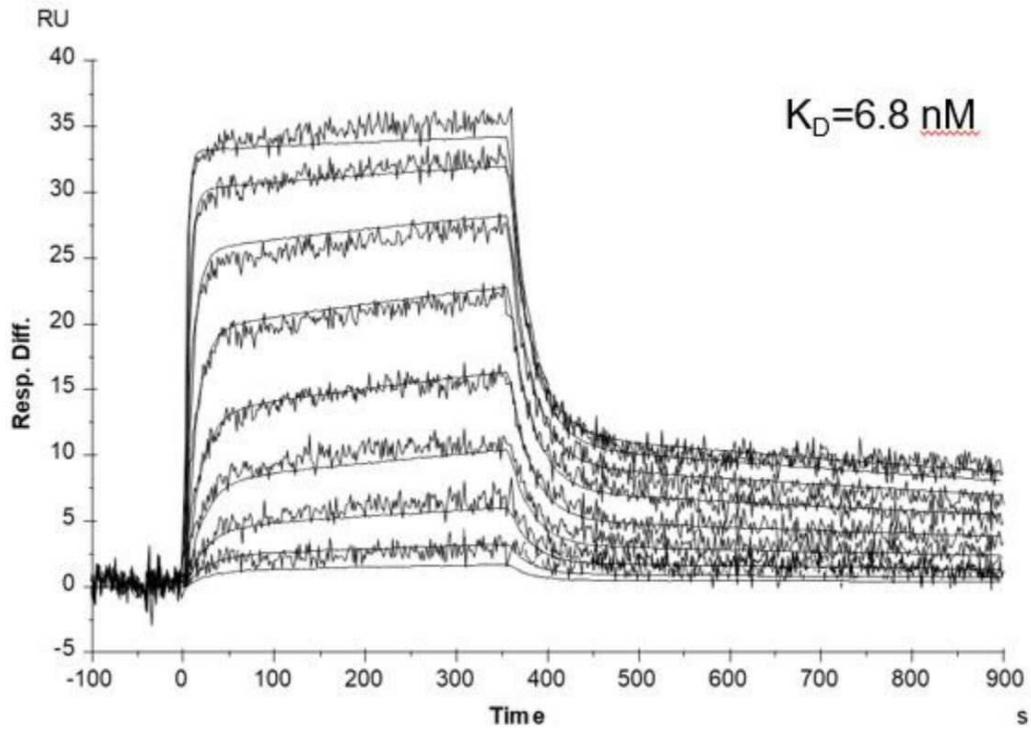
도면19a



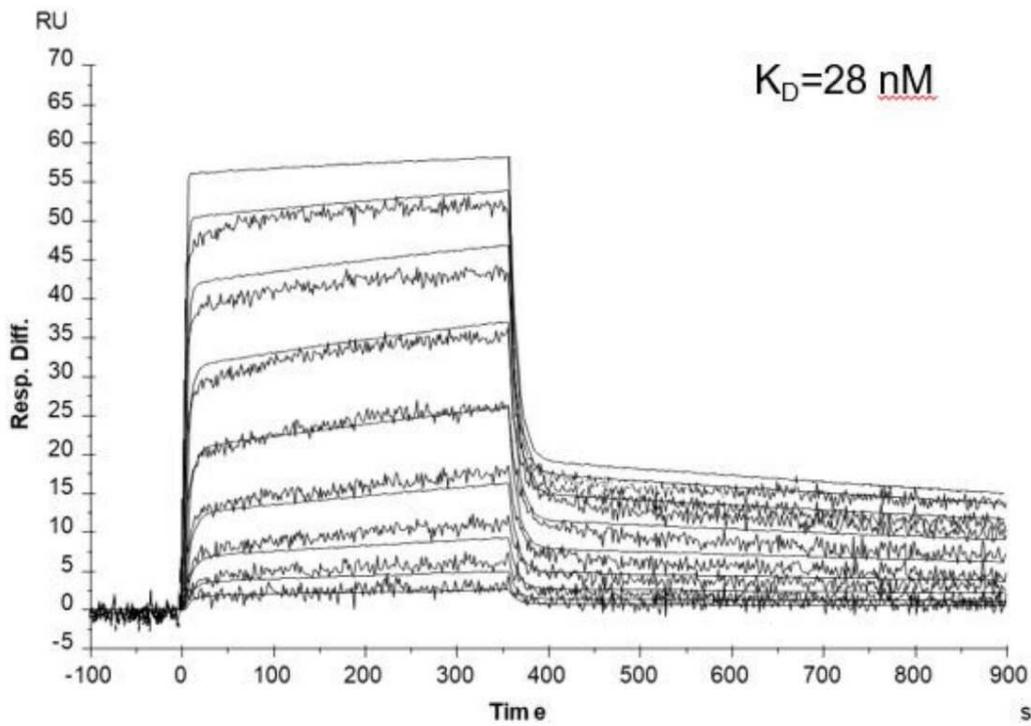
도면19b



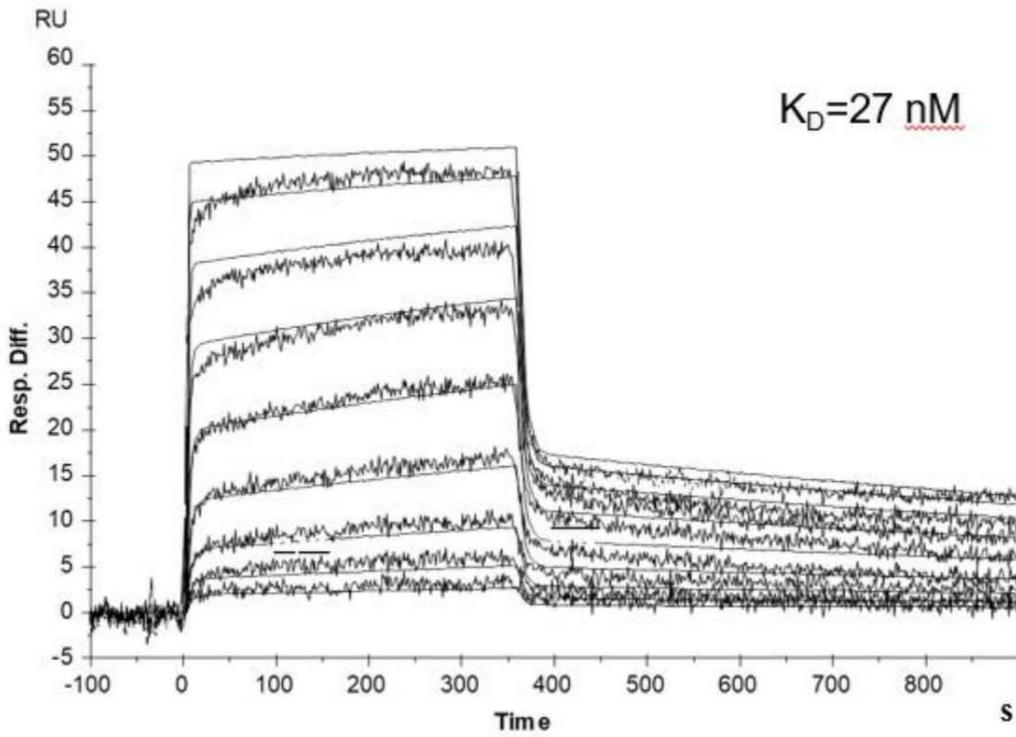
도면19c



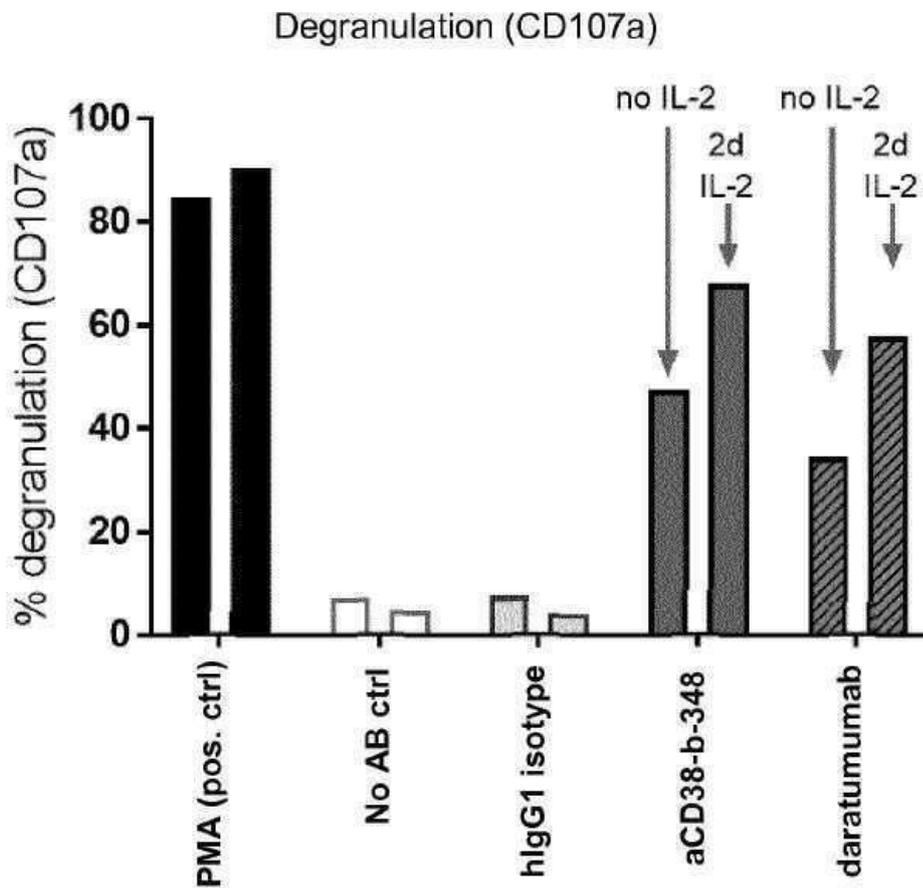
도면19d



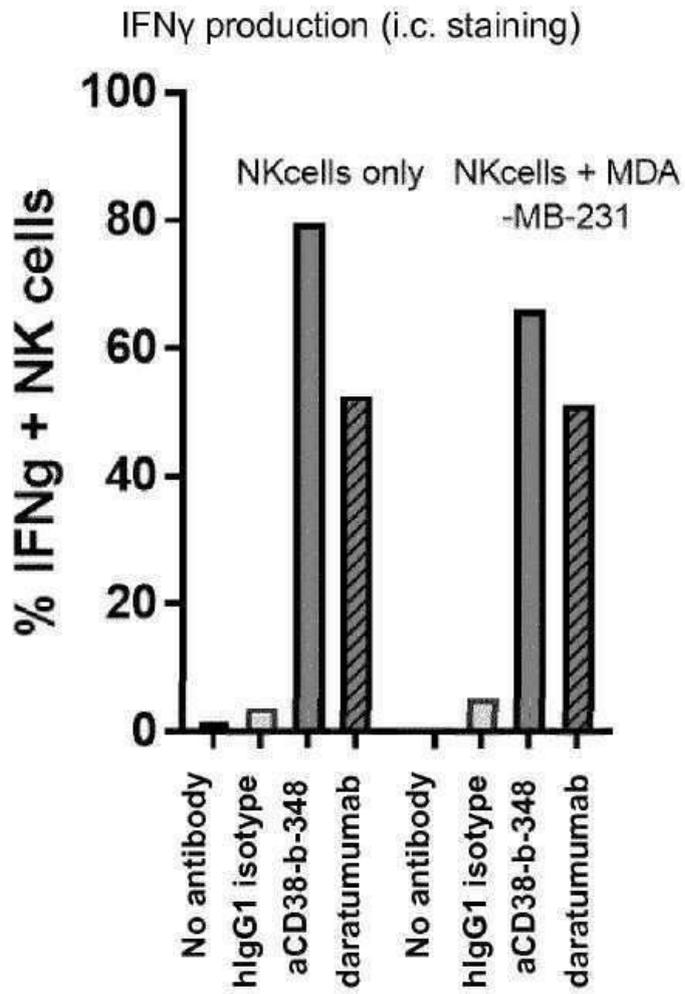
도면19e



도면20

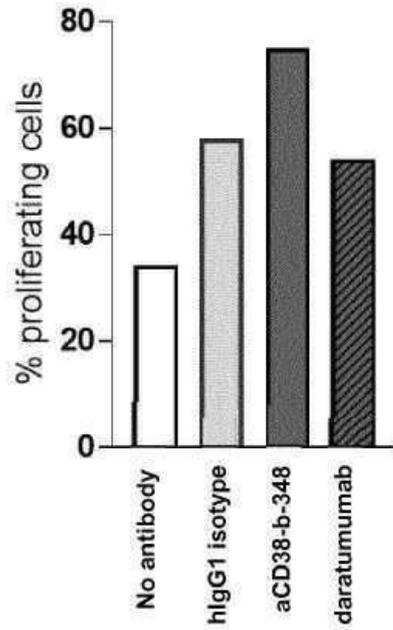


도면21

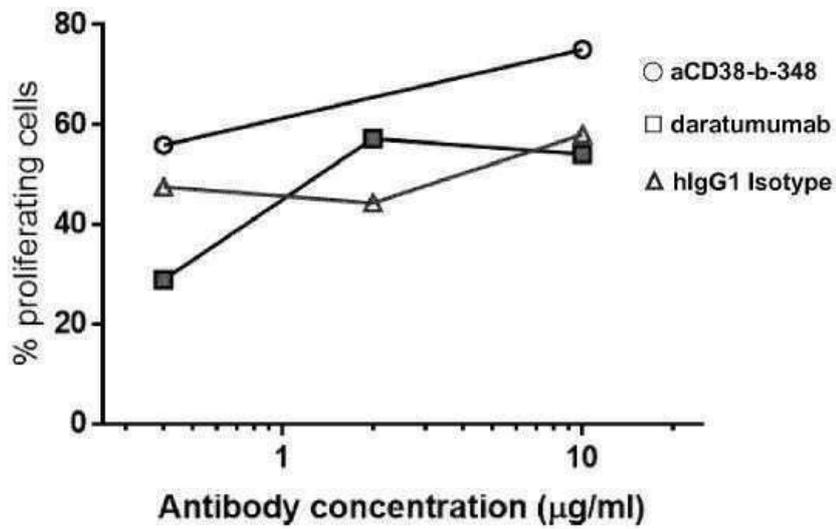


도면22

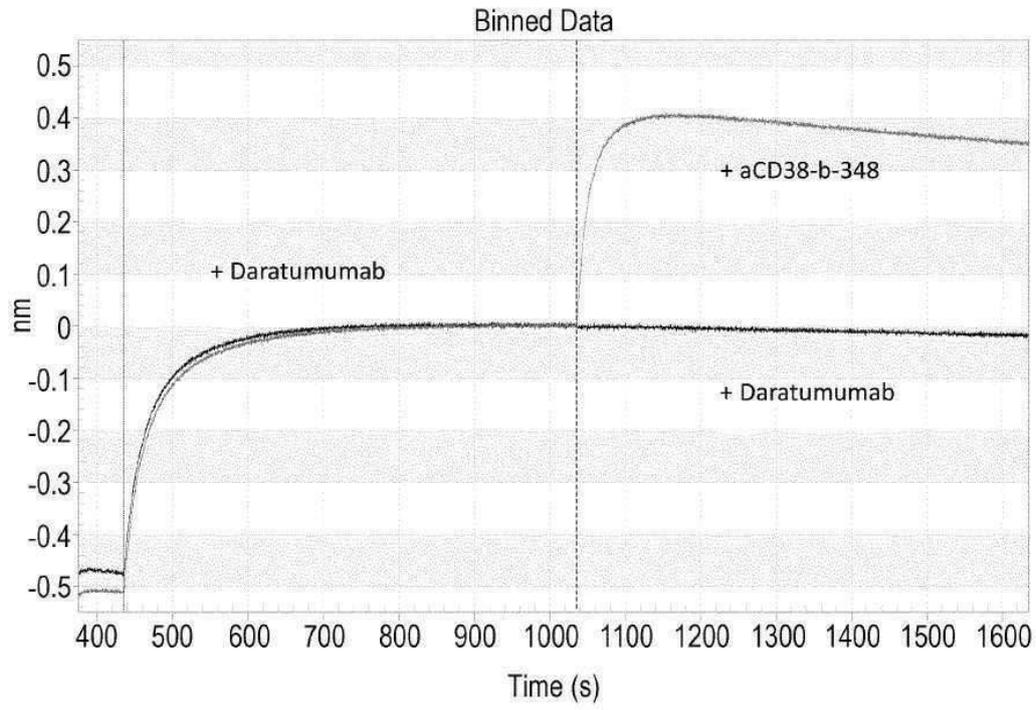
A)



B)



도면23



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.