



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월24일

(11) 등록번호 10-2770962

(24) 등록일자 2025년02월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7026216
- (22) 출원일자(국제) 2019년02월11일
 심사청구일자 2021년12월28일
- (85) 번역문제출일자 2020년09월10일
- (65) 공개번호 10-2020-0120937
- (43) 공개일자 2020년10월22일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2019/074806
- (87) 국제공개번호 WO 2019/154421
 국제공개일자 2019년08월15일
- (30) 우선권주장
 201810144817.4 2018년02월12일 중국(CN)
- (56) 선행기술조사문헌
 KR1020140066259 A*
 KR1020140032963 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 항저우 섬근 바이오테크 코포레이션, 엘티디.
 중국, 310056, 쑤저양, 빈지양 디스트릭트 중국 (쑤저양) 파일렛 프리 트레이드 존 항저우, 창해 스트리트, 넘버 688 빙안 로드, 빌딩 2, 유닛 씨, 1스트 플로어
- (72) 발명자
 엘브이, 밍
 중국, 310051, 쑤저양, 항저우, 빈지양 디스트릭트, 창해 스트리트, 1568 사우스 링 로드, 후안누오 빌딩, 서드, 룸 005
- 당, 샤오란
 중국, 310051, 쑤저양, 항저우, 빈지양 디스트릭트, 창해 스트리트, 1568 사우스 링 로드, 후안누오 빌딩, 서드, 룸 005
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 21 항

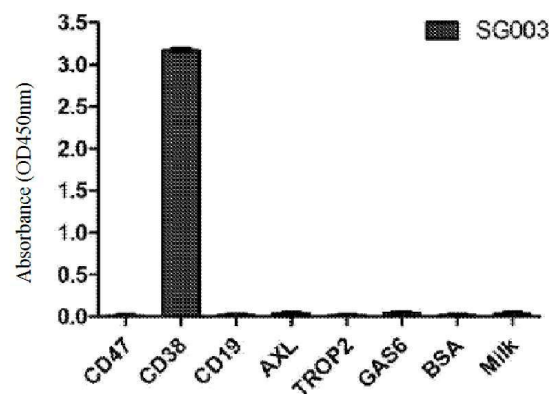
심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 CD38 단백질 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 1×10^{-9} M 이하(below)의 K_D 값에서 CD38 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD38 단백질에 대한 강한 특이적 인식 및 결합 능력을 가지며, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 및/또는 세포예정사(apoptosis)에 의해 CD38⁺ 세포를 사멸시킬 수 있다. 본 발명에 의해 추가로 제공되는 것은 종양의 예방 및 치료에서의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

미아오, 시웨이

중국, 310051, 찰저양, 항저우, 빈지양
디스트릭트, 창허 스트리트, 1568 사우스 링 로드,
후안누오 빌딩, 서드, 룸 005

탄, 빈

중국, 310051, 찰저양, 항저우, 빈지양
디스트릭트, 창허 스트리트, 1568 사우스 링 로드,
후안누오 빌딩, 서드, 룸 005

왕, 주공

중국, 310051, 찰저양, 항저우, 빈지양
디스트릭트, 창허 스트리트, 1568 사우스 링 로드,
후안누오 빌딩, 서드, 룸 005

명세서

청구범위

청구항 1

CD38 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 항체 경쇄 또는 이의 단편; 및 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 항체 중쇄 또는 이의 단편을 포함하며,

상기 LCDR1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 LCDR2는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하며; 상기 LCDR3은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고,

상기 HCDR1은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하며; 상기 HCDR2는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; 상기 HCDR3은 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 가변영역 VL 및 중쇄 가변영역 VH를 포함하며,

상기 VL은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하며,

상기 경쇄는 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

CD38 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 가변영역 VL의 LCDR1-3 및 중쇄 가변영역 VH의 HCDR1-3을 포함하며,

상기 경쇄는 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 경쇄 및 중쇄는 다음으로 구성된 군에서 선택되는 임의의 아미노산 서열 세트를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

- (1) 경쇄: 서열번호 16, 중쇄: 서열번호 17;
- (2) 경쇄: 서열번호 18, 중쇄: 서열번호 19; 및
- (3) 경쇄: 서열번호 20, 중쇄: 서열번호 21.

청구항 6

CD38 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 가변영역 VL 및 중쇄 가변영역 VH를 포함하며,

상기 경쇄 및 중쇄는 다음으로 구성된 군에서 선택되는 임의의 아미노산 서열 세트를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

- (1) 경쇄: 서열번호 16, 중쇄: 서열번호 17;
- (2) 경쇄: 서열번호 18, 중쇄: 서열번호 19; 및
- (3) 경쇄: 서열번호 20, 중쇄: 서열번호 21.

청구항 7

CD38 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하며,

상기 경쇄 및 중쇄는 다음으로 구성된 군에서 선택되는 임의의 아미노산 서열 세트를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

- (1) 경쇄: 서열번호 16, 중쇄: 서열번호 17;
- (2) 경쇄: 서열번호 18, 중쇄: 서열번호 19; 및
- (3) 경쇄: 서열번호 20, 중쇄: 서열번호 21.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 단일클론 항체, 단일-가닥 항체, 키메라 항체, 인간화 항체(humanized antibody) 및 완전 인간 항체(fully human antibody)를 포함하는 군에서 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, Fv 및 ScFv 단편을 포함하는 군에서 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD38 단백질은 인간 CD38 단백질 또는 원숭이 CD38 단백질인 것을 특징으로 하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 핵산 분자 중 적어도 하나는 코돈 최적화된 핵산 분자.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 12 및 서열번호 14를 포함하는 군에서 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.

청구항 14

제11항에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 15

제11항에 따른 핵산 분자 또는 제14항에 따른 벡터를 포함하는 단리된 세포.

청구항 16

항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에서 제15항에 따른 단리된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 제조방법.

청구항 17

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 종양의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 종양은 CD38 양성 종양을 포함하는 약학 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 CD38 양성 종양은 다발성 골수종(multiple myeloma), 림프종(lymphoma) 및 백혈병(leukemia)을 포함하는 군에서 선택되는 약학 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제11항에 따른 핵산 분자, 제14항에 따른 벡터 및/또는 제15항에 따른 단리된 세포를 투여하는 단계를 포함하는 시험관 내(*in vitro*)에서 CD38 리간드에 대한 CD38 단백질의 결합을 억제하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 CD38 리간드는 CD31을 포함하는 방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 생물의학 분야, 특히 CD38 단백질에 결합할 수 있는 항체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] CD38 단백질은 NAD^+ 에서 사이클릭 ADP-리보오스(cADPR, cyclic ADP-ribose)로의 전환을 촉매하고 cADPR을 ADP 리보오스로 가수분해할 수 있는 두 기능을 가진 엑소뉴클레아제(bifunctional exonuclease)이다. CD38 단백질은 악성 형질세포(plasmacytes)에서 발현되는 항원 중 하나이며, 다발성 골수종세포(myeloma cell), B세포 만성 림프모구 백혈병세포(lymphoblastic leukemia cells) 및 B세포 급성 림프세포 유형 백혈병세포(lymphatic cell type leukemia cells)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 악성 조혈세포(hematopoietic cells)에서 발현된다.

[0003] 그러나 현재 개발된 CD38 항체는 인식 활성이 제한되고 세포독성 활성이 제한되며 종양 억제 능력이 제한되어 있으므로, 신약 개발을 위한 새로운 CD38 항체 개발이 시급하다.

발명의 내용

[0004] 본 출원은 CD38 항체 및 이의 용도를 제공한다. 본 출원에서 제공된 CD38 항체는 다음 특성 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 1) 더 높은 친화성 및 특이성으로 CD38 단백질에 결합할 수 있고; 2) 항체-의존성 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 및/또는 세포예정사(apoptosis)에 의해 CD38^+ 세포를 사멸시킬 수 있으며; 3) 종양세포를 사멸 및 손상시키고 및/또는 종양 성장을 억제할 수 있고; 4) 종양의 예방 또는 치료에 사용할 수 있고; 5) CD38 리간드에 대한 CD38 단백질의 결합을 억제할 수 있다. 본 출원은 추가로 CD38 항체의 제조방법 및 용도를 제공한다.

[0005] 한편, 본 출원은 1×10^{-9} M 또는 미만의 K_D 값으로 CD38 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0006] 일부 실시예에서, 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD38 단백질에 특이적으로 결합함으로써 종양세포를 사멸 및 손상시키고 및/또는 종양 성장을 억제할 수 있다.

[0007] 일부 실시예에서, 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항체-의존성 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 및/또는 세포예정사(apoptosis)에 의해 CD38^+ 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0008] 일부 실시예에서, 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 BSA, CD19, TROP2, CD47, AXL 또는 Gas6 및 기타 관련되지 않은 항원에 결합하지 않거나 실질적으로 결합하지 않는다.

- [0009] 일부 실시예에서, 종양은 CD38 양성 종양을 포함한다. 일부 실시예에서, CD38 양성 종양은 다발성 골수종(multiple myeloma), 림프종(lymphoma) 및 백혈병(leukemia)을 포함하는 군에서 선택된다.
- [0010] 일부 실시예에서, 종양은 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma) 및 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma)을 포함하는 군에서 선택된다.
- [0011] 일부 실시예에서, 종양세포는 Raji 세포, Daudi 세포, Ramos 세포 및 RPMI8226 세포를 포함하는 군에서 선택되는 것들을 포함한다.
- [0012] 일부 실시예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD38 단백질에 결합할 때 인간 CD38 단백질의 60-89의 아미노산 잔기에 상응하는 하나 이상의 잔기에 결합한다(상기 인간 CD38 단백질의 60-89의 아미노산의 아미노산 서열은 서열번호 15에 표시된 바와 같음).
- [0013] 일부 실시예에서, 항체는 단일클론 항체, 단일-가닥 항체, 키메라 항체, 인간화 항체(humanized antibody) 및 완전 인간 항체(fully human antibody)를 포함하는 군에서 선택된다.
- [0014] 일부 실시예에서, 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, Fv 및 ScFv를 포함하는 군에서 선택된다.
- [0015] 일부 실시예에서, CD38 단백질은 인간 CD38 단백질 또는 원숭이 CD38 단백질이다. 예를 들어, CD38 단백질은 마우스 CD38 단백질이 아니거나 랫트 CD38 단백질이 아닐 수 있다.
- [0016] 일부 실시예에서, 본 출원에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD38 단백질에 결합하기 위해 레퍼런스 항체(reference antibody)와 경쟁하고, 상기 레퍼런스 항체는 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함하고, 레퍼런스 항체의 경쇄 가변영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, LCDR1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; LCDR3은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 레퍼런스 항체의 중쇄 가변영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, HCDR1은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; HCDR3은 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0017] 일부 실시예에서, 레퍼런스 항체의 경쇄 가변영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 레퍼런스 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0018] 일부 실시예에서, 레퍼런스 항체의 경쇄는 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 레퍼런스 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 서열번호 11, 서열번호 16, 서열번호 18 및 서열번호 20 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0019] 일부 실시예에서, 레퍼런스 항체의 중쇄는 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 레퍼런스 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 서열번호 13, 서열번호 17, 서열번호 19 및 서열번호 21 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0020] 일부 실시예에서, 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항체의 경쇄 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 LCDR1을 포함하고, LCDR1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 LCDR2를 포함하고, LCDR2는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 LCDR3을 포함하고, LCDR3은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0021] 일부 실시예에서, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 경쇄 가변영역 VL을 포함하고, 상기 경쇄 가변영역 VL은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0022] 일부 실시예에서, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 인간 불변영역을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 불변영역은 인간 Igk 불변영역을 포함한다.
- [0023] 일부 실시예에서, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 서열번호 11, 서열번호 16, 서열번호 18 및 서열번호 20 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0024] 일부 실시예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항체의 중쇄 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 HCDR1을 포함하고, HCDR1은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 HCDR2를 포함하고, HCDR2는 서열번호 5로 표시되는 아미노산

서열을 포함한다. 일부 실시예에서, 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 HCDR3을 포함하고, HCDR3은 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0025] 일부 실시예에서, 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 중쇄 가변영역 VH를 포함하고, 상기 중쇄 가변영역 VH는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0026] 일부 실시예에서, 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 인간 불변영역을 추가로 포함한다. 일부 실시예에서, 인간 불변영역은 인간 IgG 불변영역을 포함한다. 일부 실시예에서, IgG 불변영역은 인간 IgG1 불변영역을 포함한다.

[0027] 일부 실시예에서, 항체의 중쇄는 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 서열번호 13, 서열번호 17, 서열번호 19 및 서열번호 21 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 한편, 본 출원은 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.

[0029] 일부 실시예에서, 상기 핵산 분자 중 적어도 하나는 코돈 최적화된다.

[0030] 일부 실시예에서, 상기 핵산 분자는 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 12 및 서열번호 14를 포함하는 군에서 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0031] 한편, 본 출원은 본 출원의 핵산 분자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0032] 한편, 본 출원은 본 출원의 핵산 분자 또는 본 출원의 벡터를 포함하는 세포를 제공한다.

[0033] 한편, 본 출원은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 제조방법을 제공한다. 상기 방법은 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에서 본 출원의 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0034] 한편, 본 출원은 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 핵산 분자, 벡터 및/또는 세포, 및 선택적으로 제약상 허용가능한 보조제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0035] 한편, 본 출원은 종양의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도를 제공한다.

[0036] 일부 실시예에서, 종양은 CD38 양성 종양을 포함한다. 일부 실시예에서, CD38 양성 종양은 다발성 골수종, 림프종 및 백혈병을 포함하는 군에서 선택된다. 일부 실시예에서, 종양은 비-호지킨 림프종 및 호지킨 림프종을 포함하는 군에서 선택된다.

[0037] 한편, 본 출원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 종양의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0038] 일부 실시예에서, 종양은 CD38 양성 종양을 포함한다. 일부 실시예에서, CD38 양성 종양은 다발성 골수종, 림프종 및 백혈병을 포함하는 군에서 선택된다. 일부 실시예에서, 종양은 비-호지킨 림프종 및 호지킨 림프종을 포함하는 군에서 선택된다.

[0039] 한편, 본 출원은 CD38 리간드에 대한 CD38 단백질의 결합을 억제하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 핵산 분자, 벡터 및/또는 세포를 투여하는 단계를 포함한다.

[0040] 일부 실시예에서, CD38 리간드는 CD31을 포함한다.

[0041] 본 개시내용의 추가 관점 및 이점은 본 개시내용의 예시적인 실시예만이 도시되고 설명되는 다음의 상세한 설명으로부터 당업자에게 쉽게 명백해질 것이다. 본원에서 설명된 개시내용의 실시예들의 수많은 변형들은 개시내용으로부터 벗어나지 않고 당업자에게 이제 생각날 것이다. 따라서, 본 개시내용의 도면 및 설명은 본질적으로 예시적인 것으로 간주되어야 하지만 제한적인 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0042] 본 출원에 기재된 본 발명의 특정한 특징은 첨부된 청구범위에 기재되어 있다. 본 출원의 발명의 특징 및 이점은 예시적인 실시예 및 첨부 도면을 참조함으로써 더 잘 이해될 수 있다. 도면에 대한 간단한 설명은 다음과 같다:

도 1은 본 출원의 항체 SG003을 전체 항체 발현 벡터로 구축한 물리적 지도를 나타낸다.

도 2는 CD38 단백질에 대한 본 출원의 항체 SG003의 결합 능력을 나타낸다.

도 3은 본 출원의 항체 SG003에 의한 CD38 단백질의 특이적인 인식의 결과를 나타낸다.

도 4a-4d는 대표적인 세포의 표면에서 CD38 단백질에 대한 본 출원의 항체 SG003의 결합 능력을 나타낸다.

도 5a-5d는 대표적인 세포에 대한 본 출원의 항체 SG003의 ADCC 활성을 나타낸다.

도 6은 종양 성장에 대한 본 출원의 항체 SG003의 억제 효과를 나타낸다.

도 7은 본 출원의 항체 SG003의 투여가 마우스의 생존율에 미치는 영향을 나타낸다.

도 8a-8b는 상이한 속(genera)으로부터 유래된 CD38 분자에 본 출원의 항체 SG003의 투여의 결합 능력을 나타낸다.

도 9는 CD38 분자에 대한 본 출원의 무작위 돌연변이(random-mutated) 항체 SG003의 결합 능력을 나타낸다.

도 10은 CD38 단백질에 결합하는 본 출원의 항체 SG003의 에피토프 상태(epitope circumstance)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 본 발명의 실시예는 특정 실시예를 통해 아래에서 설명되며, 당업자는 본 명세서의 개시로부터 본 발명의 다른 이점 및 효과를 쉽게 이해할 수 있다.

[0044] 본 출원에서, 용어 "항체(antibody)"는 일반적으로 특정 항원을 특이적으로 인식 및/또는 중화 할 수 있는 펩티드를 의미한다. 예를 들어, 항체는 디설파이드 결합에 의해 서로 연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)로 구성된 면역글로불린을 포함할 수 있으며, 이의 항원-결합 단편을 포함하는 임의의 분자를 포함할 수 있다. 용어 "항체"는 인간 항체(완전 인간 항체), 인간화 항체, 키메라 항체, 단일-가닥 항체(예: scFv) 및 항체의 항원-결합 단편(예: Fab, Fab' 및 (Fab)₂ 단편)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 단일클론 항체, 항체의 단편 또는 항체 유도체를 포함한다. 용어 "항체"는 항체의 모든 재조합 형태, 예를 들어 원핵세포에서 발현된 항체, 비글리코실화된 항체 및 본 출원의 항체의 임의의 항원-결합 단편 및 이의 유도체를 추가로 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변영역(VH) 및 중쇄 불변영역으로 구성될 수 있다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변영역(VL) 및 경쇄 불변영역으로 구성될 수 있다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FRs)으로 알려진 보다 보존된 영역 사이에 분산된 초가변영역(상보적 결정영역(CDRs)으로 알려짐)으로 더 나눌 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR과 4개의 FR로 구성될 수 있으며, 아미노 말단에서 카르복시 말단까지 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4의 순서로 배열될 수 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변영역은 면역계의 복수의 세포(예: 이펙터세포(effect cells)) 및 고전적인 보체 시스템의 제1성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0045] 본 출원에서, 용어 "항체-결합 단편(antibody-binding fragment)"은 일반적으로 항원에 특이적으로 결합하는 역할을 하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원 결합 기능은 항체의 전장(full-length) 단편에 의해 구현될 수 있다. 항체의 항원 결합 기능은 또한 다음에 의해 구현될 수 있다: Fv, ScFv, dsFv, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂의 단편을 포함하는 중쇄, 또는 Fv, ScFv, dsFv, Fab, Fab' 또는 F(ab')₂의 단편을 포함하는 경쇄. (1) Fab 단편, 즉 VL, VH, CL 및 CH 도메인을 포함하는 1가 단편; (2) F(ab')₂ 단편, 힌지 영역에서 이황화결합에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편; (3) VH 및 CH 도메인을 포함하는 Fd 단편; (4) 항체의 한 팔(arm)에 VL 및 VH 도메인을 포함하는 Fv 단편; (5) VH 도메인을 포함하는 dAb 단편(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546); (6) 분리된 상보적 결정영역(CDR); 및 (7) 링커에 의해 선택적으로 연결된 둘 이상의 분리된 CDR의 조합. 또한, VL과 VH가 쌍을 이루어 형성되는 1가 단일-가닥 분자 Fv(scFv)가 추가로 포함될 수 있다(Bird et al., (1988) Science 242: 423-426; 및 Huston et al., (1988) Proc.Natl.Acad.Sci. 85: 5879-5883 참조). "항원 결합 모이어티(antigen binding moiety)"는 (1) 면역글로불린 힌지 영역 펩티드와 융합된 결합 도메인 펩티드; (2) 힌지 영역과 융합된 면역글로불린 중쇄 CH2 불변영역; 및 (3) CH2 불변영역과 융합된 면역글로불린 중쇄 CH3 불변영역을 포함하는 군에서 선택되는 결합 도메인을 포함하는 면역글로불린 융합 단백질을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 본 출원에서, 용어 "CD38 단백질(CD38 protein)" 및 "CD38 항원(CD38 antigen)"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 세포에서 자연적으로 발현되거나 CD38 유전자로 형질감염된 세포에서 발현되는 CD38의 임의의 변이체, 이소타입 및 종 상동체(species homolog)를 포함한다. 본 출원에서, CD38은 GenBank에서 BAA18966.1의 등록번호

호(accession number)를 가진 인간 CD38일 수 있다. 본 출원에서, CD38은 GenBank에서 AAT36330.1의 등록번호를 가진 Macaque CD38과 같은 원숭이 CD38일 수 있다. 본 출원의 CD38 단백질은 ADP 리보실사이클라제 1(ADP ribosyl cyclase 1), cADPr 하이드롤라제 1(cADPr hydrolase 1), Cd38-rs1, 사이클릭 ADP-리보오스 하이드롤라제 1(cyclic ADP-ribose hydrolase 1), I-19 또는 NIM-R5 항원으로도 알려져 있을 수 있다. "CD38⁺ 세포(CD38⁺ cell)"는 CD38 단백질을 발현하는 세포를 일반적으로 의미한다. 이것은 또한 CD38 양성세포로도 알려져 있다. "CD38⁻ 세포(CD38⁻ cell)"는 CD38 단백질을 실질적으로 발현하지 않는 세포를 일반적으로 의미한다.

[0047] 본 출원에서, 용어 "CD31 단백질(CD31 protein)"은 혈소판 표면, 배양된 내피세포의 조인트(joint) 및 골수세포주에서 발견되는 130-140 kDa의 막관통 당단백질을 일반적으로 의미하며, 혈소판 내피세포 접착 분자-1(PECAM-1/CD31)로도 알려져 있다. 본 출원에서 CD31은 GenBank에서 NP_000433.4의 등록번호를 가진 인간 CD31일 수 있다. CD31은 혈전증(thrombosis) 및 혈관신생에서 역할을 하는 CD38의 리간드로 사용될 수 있다.

[0048] 본 출원에서, 용어 "ADCC"는 항체-의존성 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)로, 사멸 활성을 가진 세포가 그의 표면에 발현된 Fc 수용체(FcR)를 통해 표적 항원에 코팅된 Fc 세그먼트를 인식함을 일반적으로 의미한다. ADCC의 도움으로 면역계의 이펙터세포는 막 표면 항원이 특정 항체에 의해 결합된 표적세포를 적극적으로 용해시킨다.

[0049] 본 출원에서, 용어 "CDC"는 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC)이며, 보체가 관여하는 세포독성 효과를 일반적으로 지칭한다. 즉, 특정 항체는 세포막 표면의 해당 항원에 결합하여 복합체를 형성하고 고전적인 보체 경로를 활성화시킨다. 형성된 막 공격 복합체는 표적세포에 용해 효과를 생성한다.

[0050] 본 출원에서, 용어 "암(cancer)"은 일반적으로 포유동물의 생리학적 상태를 나타내거나 설명하며, 이는 전형적으로 세포 증식 또는 생존의 조절장애(dysregulation)를 특징으로 할 수 있다. 암의 예는 암종(carcinoma), 림프종, 모세포종, 육종(sarcoma) 및 백혈병뿐만 아니라 림프성 악성종양을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어 암은 림프종일 수 있다.

[0051] 본 출원에서, 용어 "림프종(lymphoma)"은 일반적으로 림프계의 악성종양을 지칭한다. 림프종의 발생은 림프절 세포 또는 림프 세포의 통제되지 않은 증식과 신체 전체의 다른 조직을 침범할 수 있는 비정상적인 능력을 가진 암 세포의 생성으로 인해 발생한다. 림프종에는 많은 아형이 있으며, 두 가지 주요 유형은 호지킨 림프종과 비호지킨 림프종이다. 본 출원에서, 용어 "호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma)"(HL)은 일반적으로 백혈구의 림프구에 의해 생성되는 림프종의 부류를 지칭한다. 본 출원에서, 용어 "비호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma)"(NHL)은 일반적으로 호지킨 림프종을 제외한 다른 부류의 림프종을 지칭한다.

[0052] 본 출원에서, 용어 "백혈병(leukemia)"은 일반적으로 백혈병 세포의 대량 증식 및 축적에 의해 야기되는 질병의 부류를 일반적으로 지칭하는 조혈 계(hematopoietic system)의 악성 증식성 질환을 지칭한다. 클론성 백혈병 세포는 통제되지 않은 증식, 분화 이상, 세포예정사 억제 또는 유사한 기전으로 인해 골수 및 기타 조혈 조직에서 크게 증식 및 축적되며, 다른 비 조혈 조직 및 기관에 침투하는 한편 정상적인 조혈 기능을 억제한다. 다음은 임상적으로 발견될 수 있다: 다양한 정도의 빈혈, 출혈, 감염에 의한 열, 간, 비장 및 림프선의 비대, 및 뼈 통증.

[0053] 본 출원에서, 용어 "다발성 골수종(multiple myeloma)"(MM)은 일반적으로 형질세포의 비정상적인 증식으로 인해 골수를 침입하는 악성종양을 의미한다. 다발성 골수종은 암세포가 골수에 축적되어 건강한 혈액 세포가 배제되게 한다. 암세포는 정상적인 항체 대신 합병증을 유발할 수 있는 비정상적인 단백질을 생성한다.

[0054] 본 출원에서, 용어 "라지 세포(Raji cell)"는 일반적으로 Epstein-Barr 바이러스 균주를 생산할 수 있는 연속적인 인간세포주를 의미한다. 이 바이러스는 제대(umbilical cord) 림프구를 변형시키고 Raji 세포에서 조기 항원을 유도한다. Raji 세포는 형질감염 숙주로 널리 사용되며, 조혈세포 및 기타 세포의 악성종양을 이해하는 데에도 사용된다. 더욱이 Raji 세포는 면역글로불린 단백질 G의 Fc 수용체뿐만 아니라 특정 보체 성분을 발현하는 여러 수용체를 가지고 있고 발현하기 때문에, 면역 복합체 검출에도 사용된다.

[0055] 본 출원에서, 용어 "다우디 세포(Daudi cell)"는 일반적으로 버킷 림프종에서 유래된 세포주를 지칭한다. Daudi 세포는 세포 내 Class I 중쇄를 가지고 있지만, Class I 인간 백혈구 항원(HLA) 분자는 그의 표면에 발현되지 않는다. 이는 β 2-microsphere 단백질(β 2m)을 암호화하는 유전자에 결함이 있어서 단백질에 번역 가능한 mRNA가 없기 때문이다.

[0056] 본 출원에서, 용어 "라모스 세포(Ramos cell)"는 일반적으로 버킷 림프종 세포주를 지칭한다. 세포는 Epstein-

Barr 바이러스 균주를 보유하지 않으며 IgM을 분비한다.

- [0057] 본 출원에서, 용어 "RPMI8226 세포(RPMI8226 cell)"는 일반적으로 인간 다발성 골수종 세포주를 지칭한다.
- [0058] 본 출원에서, 용어 " K_D "는 " K_D "와 상호교환적으로 사용되며, 일반적으로 M(mol/L)에서 특정 항체-항원 상호작용에 대한 해리 평형상수를 지칭한다. K_D 는 물질 AB와 그로부터 해리된 물질 A와 B의 농도를 기반으로 계산될 수 있다: $K_D = c(A) * c(B)/c(AB)$. 이 공식을 통해 K_D 값이 클수록 물질 A와 B 사이의 해리가 많이 되고 친화력이 약하다는 것을 알 수 있고; 반대로 K_D 값이 작을수록 해리가 적게 되고 물질 A와 B 사이의 친화력이 강하다.
- [0059] 본 출원에서, 용어 "단일클론 항체(monoclonal antibody)"는 실질적으로 상동인 항체의 집단을 일반적으로 의미하는데, 즉, 이 집단의 다양한 항체는 미량으로 존재할 수 있는 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 단일클론 항체는 매우 특이적이며 단일 항원 부위를 직접 표적으로 한다. 예를 들어, 단일클론 항체는 하이브리도마 기술에 의해 제조될 수 있거나, 박테리아, 진핵생물 또는 식물세포(plant cells)에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 단일클론 항체를 생산하는 것이 가능하다. 또한, 단일클론 항체는 예를 들어 Clackson et al., Nature, 352:624- 628 (1991) and Marks et al., Mol. Biol., 222:581-597 (1991)에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리에서 획득할 수 있다.
- [0060] 본 출원에서, 용어 "단일-가닥 항체(single-strand antibody)"(scFv)는 일반적으로 올리고펩티드 링커를 통해 항체 중쇄 가변영역을 경쇄 가변영역에 연결하여 형성된 분자를 의미한다.
- [0061] 본 출원에서, 용어 "키메라 항체(chimeric antibody)"는 일반적으로 각각의 중쇄 또는 경쇄 아미노산 서열의 일부가 특정 종의 항체에서 상응하는 아미노산 서열에 상동하거나, 특정 범주에 속하거나, 나머지 사슬은 다른 종의 상응하는 서열과 상동하는 항체를 의미한다. 예를 들어, 경쇄 및 중쇄의 가변영역은 모두 동물 종(예: 마우스, 랫트 등)의 가변영역에서 유래된 반면, 불변영역은 다른 종(예: 인간)의 항체 서열과 상동이다. 예를 들어, 키메라 항체를 획득하기 위해, 가변영역은 비-인간-유래 B세포 또는 하이브리도마 세포를 사용하여 생성할 수 있으며, 이에 결합된 불변영역은 인간으로부터 유래된다. 가변영역은 생산이 용이하다는 장점이 있으며, 결합된 불변영역의 공급원에 의해 특이성이 영향을 받지 않는다. 동시에, 키메라 항체의 불변영역은 인간 유래일 수 있기 때문에, 항체가 주사시 면역반응을 유발할 가능성이 불변영역이 비-인간 공급원으로부터 유래된 항체보다 낮다.
- [0062] 본 출원에서, 용어 "인간화 항체(humanized antibody)"는 일반적으로 비-인간 면역글로불린 단백질에서 유래된 서열을 적게 함유하여 이종 항체가 인간에게 도입될 때 면역원성을 감소시키고 항체의 완전한 항원 결합 친화성 및 특이성 유지하는 키메라 항체를 지칭한다. 예를 들어, CDR 이식(Jones et al., Nature 321:522 (1986)) 및 그 변형이 사용될 수 있다; "재형성(reshaping)"(Verhoeven, et al., 1988 Science 239:1534-1536; Riechmann, et al., 1988 Nature 332:323-337; Tempest, et al., Bio/Technol 1991 9:266-271), "과키머화(hyperchimerization)"(Queen, et al., 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:10029-10033; Co, et al., 1991 Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873; Co, et al., 1992 J Immunol 148:1149- 1154) 및 "Veneering"(Mark, et al., "Derivation of therapeutically active humanized and veneered anti-CD18 antibodies." In: Metcalf BW, Dalton BJ, eds. Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential. New York: Plenum Press, 1994: 291-312), 표면 재구성(US 5639641) 및 비-인간 공급원으로부터 결합 도메인을 인간화하기 위한 기타 기술적 수단을 포함한다. 힌지 영역 및 불변영역 도메인과 같은 다른 영역도 비-인간 공급원으로부터 유래된 경우, 이러한 영역도 인간화 될 수 있다.
- [0063] 본 출원에서, 용어 "에피토프(epitope)"는 일반적으로 항원 결정기, 즉 면역계(예: 항체에 의함)에 의해 인식되는 분자의 모이어티를 지칭한다. 예를 들어, 에피토프는 면역계에 의해 인식되는 항원에서 불연속적인 3차원 부위일 수 있다. 에피토프는 일반적으로 화학적으로 활성인 분자 표면 그룹(예: 아미노산 또는 당 측쇄)으로 구성되며 일반적으로 특정 전하 특성뿐만 아니라 특정 3차원 구조적 특성을 가지고 있다. 에피토프는 구조에 따라 구조적(conformational) 에피토프와 비-구조적 에피토프(선형 에피토프)로 나눌 수 있다. 에피토프는 연속적인 잔기로 구성될 수 있거나, 항원 중합체의 접힘으로 인해 인접하게 되는 별개의 잔기에 의해 형성될 수 있다.
- [0064] 본 출원에서, 용어 "IgG"는 일반적으로 면역글로불린 G를 지칭한다. IgG는 인간 면역글로불린 중 하나이며, IgA, IgM, IgD 및 IgE를 추가로 포함한다. IgG 분자에서 γ 사슬의 항원성 차이에 따라 인간 IgG에는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4의 4개의 하위 유형이 있다. IgG는 면역에서 중요한 역할을 한다. 본 출원에서, 용어 "IgG1"은 일반적으로 Fc 수용체와 높은 친화성을 갖는 IgG의 비율이 가장 높은 하위 유형을 지칭한다.
- [0065] 본 출원에서, 용어 "핵산 분자(nucleic acid molecule)"는 일반적으로 자연 환경으로부터 분리되거나 인공적으

로 합성될 수 있는 임의의 길이를 갖는 단리된 뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드 또는 이의 유사체를 지칭한다.

[0066] 본 출원에서, 용어 "벡터(vector)"는 일반적으로 적합한 숙주에서 자가 복제할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터는 삽입된 핵산 분자를 세포로 및/또는 세포간에 전달할 수 있다. 벡터는 주로 DNA 또는 RNA를 세포에 삽입하는 데 사용되며, 주로 DNA 또는 RNA를 복사하는 데 사용되며, 주로 DNA 또는 RNA의 전사 및/또는 번역의 발현에 사용되는 것들을 포함할 수 있다. 벡터는 적합한 세포에 도입될 때 펩티드로 전사되고 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 일반적으로 벡터는 벡터를 포함하는 적절한 세포를 배양하여 바람직한 발현 생성물을 생산할 수 있다.

[0067] 본 출원에서, 용어 "세포(cell)"는 일반적으로 본 출원의 핵산 분자를 포함하는 플라스미드 또는 벡터를 포함하거나 포함할 수 있거나 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 발현할 수 있는 개별 세포, 세포주 또는 세포 배양물을 지칭한다. 세포는 단일 세포의 자손을 포함할 수 있다. 자연적, 우발적 또는 고의적 돌연변이로 인해, 자손 세포가 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 발현할 수 있는 한, 자손 세포는 형태학(morphology) 또는 계능에서 원래 모세포와 완전히 동일하지 않을 수 있다. 세포는 본 출원의 벡터로 시험관 내 세포를 형질감염시킴으로써 획득될 수 있다. 세포는 원핵세포(예: E. coli)이거나 진핵세포(예: 효모세포, COS 세포, Chinese hamster ovary (CHO)세포, HeLa세포, HEK293세포, COS-1세포, NS0세포 또는 골수종세포)일 수도 있다. 일부 실시예에서, 세포는 포유류세포이다. 예를 들어, 포유류세포는 CHO-K1세포일 수 있다. 본 출원에서, 용어 "재조합 세포(recombinant cell)"는 일반적으로 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 의미한다. 재조합 세포는 구체적인 특정 세포를 포함할 뿐만 아니라 이들 세포의 자손도 포함한다.

[0068] 본 출원에서, 용어 "단백질 A(protein A)" 및 "ProA"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 천연 공급원으로부터 회수된 단백질 A, 합성(예: 펩티드 합성 또는 재조합 기술에 의함)에 의해 생성된 단백질 A, 및 단백질의 결합 능력을 유지하는 변이체를 포함한다. 단백질 A는 Repligen, Pharmacia 및 Fermatech에서 구입할 수 있다. 단백질 A는 일반적으로 고체상 지지체 재료에 고정된다. 용어 "ProA"는 또한 친화성 크로마토그래피 수지의 칼럼 또는 그에 공유결합된 단백질 A를 갖는 크로마토그래피 고체 지지체 매트릭스를 지칭한다.

[0069] 본 출원에서, 용어 "약(about)"은 일반적으로 특정 값의 0.5% - 10% 이내의 변동, 예를 들어, 특정된 숫자의 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7%, 7.5%, 8%, 8.5%, 9%, 9.5%, 또는 10% 이내의 변동을 의미한다.

[0070] 본 출원에서, 용어 "포함하다/포함하는(comprise/comprising)"은 일반적으로 포함하는(comprising), 포괄하는(including), 함유하는(containing) 또는 내포하는(encompassing) 것을 의미한다. 일부 경우에, 상기 용어는 "있다/있다(is/are)" 또는 "구성된다(be composed of)"를 의미하기도 한다.

[0071] **항체, 이의 항체-결합 단편 또는 변이체**

[0072] 일 관점에서, 본 출원은 1×10^{-9} M 또는 미만의 K_D 값(예: 약 1×10^{-9} M 이하, 약 9×10^{-10} M 이하, 약 8×10^{-10} M 이하, 약 7×10^{-10} M 이하, 약 6×10^{-10} M 이하, 약 5×10^{-10} M 이하, 약 4×10^{-10} M 이하, 약 3×10^{-10} M 이하, 약 2×10^{-10} M 이하, 1×10^{-10} M 이하 또는 약 1×10^{-11} M 이하 또는 미만의 K_D 값)에서 CD38 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 이의 변이체를 제공한다.

[0073] 본 출원에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 보체-의존성 세포독성(CDC) 및/또는 세포예정사(apoptosis)를 통해 $CD38^+$ 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0074] 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 변이체는 CD38 단백질에 특이적으로 결합함으로써 종양세포를 사멸 및 손상시키고 및/또는 종양 성장을 억제할 수 있다. 예를 들어, 종양은 CD38 양성 종양을 포함할 수 있다. 예를 들어, CD38 양성 종양은 다발성 골수종, 림프종 및 백혈병을 포함하는 군에서 선택될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어, 종양은 비호지킨 림프종 및 호지킨 림프종을 포함하는 군에서 선택된다. 종양세포는 Raji 세포, Daudi 세포, Ramos 세포 및 RPMI8226 세포를 포함하는 군에서 선택될 수 있다. 본 출원에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 다발성 골수종, 림프종, 백혈병, 비호지킨 림프종 및 호지킨 림프종 세포를 사멸 및 손상시키거나 다발성 골수종, 림프종, 백혈병, 비호지킨 림프종 및 호지킨 림프종의 성장을 억제할 수 있다.

[0075] 본 출원에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 C38 단백질에 결합할 때 인간 CD38 단백질의 60-89의 아미노산 잔기에 상응하는 하나 이상의 잔기에 결합할 수 있다. 예를 들어, 인간 CD38 단백질의 60-89의 아미노산 잔기는

서열번호 15에 표시된 바와 같다.

- [0076] 본 출원에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 또한 인간 CD38 단백질의 90-119의 아미노산 잔기에 상응, 인간 CD38 단백질의 150-159의 아미노산 잔기에 상응, 또는 인간 CD38 단백질의 180-189의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에 결합할 수 있다.
- [0077] 본 출원에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 CD38 단백질의 170-179의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에 실질적으로 결합하지 않거나 인간 CD38 단백질의 291-300의 아미노산 잔기에 상응하는 아미노산 잔기에 결합하지 않을 수 있다.
- [0078] 본 출원의 항체는 단일클론 항체, 단일-가닥 항체, 키메라 항체, 인간화 항체 및/또는 완전 인간 항체일 수 있다. 본 출원의 항체의 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, Fv 및/또는 ScFv 단편일 수 있다.
- [0079] 본 출원의 CD38 단백질은 인간 CD38 단백질 또는 원숭이 CD38 단백질일 수 있다. 예를 들어, CD38 단백질은 마우스 CD38 단백질이 아닐 수 있거나 랫트 CD38 단백질이 아닐 수 있다. 일부 실시예에서, 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 마우스 CD38 단백질 또는 랫트 CD38 단백질에 실질적으로 결합하지 않는다.
- [0080] 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD38 단백질에 결합하기 위해 레퍼런스 항체와 경쟁할 수 있다. 레퍼런스 항체는 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 레퍼런스 항체의 경쇄 가변영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함할 수 있고, LCDR1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; LCDR2는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; LCDR3은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 레퍼런스 항체의 중쇄 가변영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함할 수 있고, HCDR1은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; HCDR2는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; HCDR3은 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0081] 본 출원에서, 레퍼런스 항체의 경쇄 가변영역의 아미노산 서열은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 레퍼런스 항체의 중쇄 가변영역의 아미노산 서열은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0082] 본 출원에서, 레퍼런스 항체의 경쇄는 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 예를 들어, 레퍼런스 항체의 경쇄는 서열번호 11, 서열번호 16, 서열번호 18 및 서열번호 20 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 레퍼런스 항체의 중쇄는 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 예를 들어, 레퍼런스 항체의 중쇄는 서열번호 13, 서열번호 17, 서열번호 19 및 서열번호 21 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0083] 예를 들어, 레퍼런스 항체의 경쇄는 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 레퍼런스 항체의 중쇄는 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 레퍼런스 항체의 경쇄는 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 레퍼런스 항체의 중쇄는 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 레퍼런스 항체의 경쇄는 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 레퍼런스 항체의 중쇄는 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 레퍼런스 항체의 경쇄는 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 레퍼런스 항체의 중쇄는 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0084] 본 출원에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항체의 경쇄 또는 이의 단편을 포함할 수 있다.
- [0085] 예를 들어, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 LCDR1을 포함할 수 있고, LCDR1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 LCDR2를 포함할 수 있고, LCDR2는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 LCDR3을 포함할 수 있고, LCDR3은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0086] 본 출원의 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 경쇄 가변영역 VL을 포함할 수 있고, 상기 경쇄 가변영역 VL은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0087] 본 출원에서, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 Igκ 불변영역을 추가로 포함할 수 있고, 예를 들어, 인간 불변영역은 인간 Igκ 불변영역을 포함할 수 있다.
- [0088] 본 출원에서, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0089] EIVMTQSPASLSASLGQRAX²⁰ISCRASX²⁷SVSX³¹SAX³⁴SYVHWYQQKSGQPPKLLIYLASX⁵⁷X⁵⁸X⁵⁹SGVPARFSGSGSGTDFTLTITHPVESEDVATYYCH

HSRX^{97,98} X^{100,101} FGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(서열번호 22), 여기서 X²⁰=T 또는 S; X²⁷=S 또는 N; X³¹=S 또는 T; X³⁴=F 또는 Y;
X⁵⁷=N 및 D; X⁵⁸=L 또는 I; X⁵⁹=E 또는 Q; X⁹⁷=E 또는 Q; X⁹⁸=L 또는 V; X¹⁰⁰=F 또는 S; X¹⁰¹=T 또는 S.

[0090] 일부 실시예에서, 서열번호 11에 표시된 항체의 경쇄와 비교하여, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 적어도 다음을 포함하는 군에서 선택되는 아미노산 치환을 포함한다:

[0091] (a) X²⁰, X²⁷, X³⁴, X⁵⁸, X⁵⁹, X⁹⁷ 및/또는 X¹⁰⁰에서 아미노산 치환(들);

[0092] (b) X³⁴, X⁵⁷, X⁵⁹, X¹⁰⁰ 및/또는 X¹⁰¹에서 아미노산 치환(들); 및

[0093] (c) X²⁷, X³¹ 및/또는 X⁹⁸에서 아미노산 치환(들).

[0094] 일부 실시예에서, 서열번호 11에 표시된 항체의 경쇄와 비교하여, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 적어도 X²⁰, X²⁷, X³⁴, X⁵⁸, X⁵⁹, X⁹⁷ 및/또는 X¹⁰⁰에서 아미노산 치환(들)을 포함하고, 여기서, X²⁰의 아미노산은 T 또는 S로 치환될 수 있고; X²⁷의 아미노산은 S 또는 N으로 치환될 수 있고; X³⁴의 아미노산은 F 또는 Y로 치환될 수 있고; X⁵⁸의 아미노산은 L 또는 I로 치환될 수 있고; X⁵⁹의 아미노산은 E 또는 Q로 치환될 수 있고; X⁹⁷의 아미노산은 E 또는 Q로 치환될 수 있고; X¹⁰⁰의 아미노산은 F 또는 S로 치환될 수 있다.

[0095] 일부 실시예에서, 서열번호 11에 표시된 항체의 경쇄와 비교하여, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 적어도 X³⁴, X⁵⁷, X⁵⁹, X¹⁰⁰ 및/또는 X¹⁰¹에서 아미노산 치환(들)을 포함하고, 여기서, X³⁴의 아미노산은 F 또는 Y로 치환될 수 있고; X⁵⁷의 아미노산은 N 또는 D로 치환될 수 있고; X⁵⁹의 아미노산은 E 또는 Q로 치환될 수 있고; X¹⁰⁰의 아미노산은 F 또는 S로 치환될 수 있고; X¹⁰¹의 아미노산은 T 또는 S로 치환될 수 있다.

[0096] 일부 실시예에서, 서열번호 11에 표시된 항체의 경쇄와 비교하여, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 적어도 X²⁷, X³¹ 및/또는 X⁹⁸에서 아미노산 치환(들)을 포함하고, 여기서, X²⁷의 아미노산은 S 또는 N으로 치환될 수 있고; X³¹의 아미노산은 S 또는 T로 치환될 수 있고; X⁹⁸의 아미노산은 L 또는 V로 치환될 수 있다.

[0097] 예를 들어, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 서열번호 11, 서열번호 16, 서열번호 18 및 서열번호 20 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0098] 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 항체의 중쇄 또는 이의 단편을 포함할 수 있다.

[0099] 본 출원에서, 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 HCDR1을 포함할 수 있고, HCDR1은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 HCDR2를 포함할 수 있고, HCDR2는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 예를 들어, 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 HCDR3을 포함할 수 있고, HCDR3은 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0100] 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 중쇄 가변영역 VH를 포함할 수 있고, 상기 중쇄 가변영역 VH는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0101] 본 출원에서, 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 인간 불변영역을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 불변영역은 인간 IgG 불변영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, IgG 불변영역은 인간 IgG1 불변영역을 포함할 수 있다.

[0102] 본 출원에서, 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0103] QVQLLESGLVQPGGSLKLSCVASGX^{27,28} X³³ FSLYX³³ MNWVRQAPGKGLEWIGKIX^{52,54} PX^{57,58,59,61} SSX⁶⁴ X⁶⁴ YX⁶⁴ PSX⁶⁴ KDKFFISRDNANTLYLQMTKVRSE
DTALYYCARLX^{100,102,103} IX^{106,107} X^{106,107} YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(서열번호 23), 여기서 X²⁷=F 또는 Y;

X^{28} =D 또는 N; X^{33} =W 또는 Y; X^{52} =N, Q 또는 S; X^{54} =D, E 또는 N; X^{57} =T 또는 S; X^{58} =I 또는 L; X^{59} =N 또는 Q; X^{61} =T 또는 S; X^{64} =L 또는 V; X^{100} =W 또는 Y; X^{102} =A 또는 G; X^{103} =T 또는 S; X^{106} =F 또는 Y; X^{107} =D 또는 N.

[0104] 일부 실시예에서, 서열번호 13에 표시된 항체의 경쇄와 비교하여, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 적어도 다음을 포함하는 군에서 선택되는 아미노산 치환(들)을 포함한다:

[0105] (a) X^{27} , X^{28} , X^{33} , X^{52} , X^{54} , X^{59} , X^{102} 및/또는 X^{103} 에서 아미노산 치환(들);

[0106] (b) X^{52} , X^{54} , X^{61} , X^{100} 및/또는 X^{103} 에서 아미노산 치환(들); 및

[0107] (c) X^{52} , X^{57} , X^{58} , X^{64} , X^{106} 및/또는 X^{107} 에서 아미노산 치환(들).

[0108] 일부 실시예에서, 서열번호 13에 표시된 항체의 경쇄와 비교하여, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 적어도 X^{27} , X^{28} , X^{33} , X^{52} , X^{54} , X^{59} , X^{102} 및/또는 X^{103} 에서 아미노산 치환(들)을 포함하고, 여기서, X^{27} 의 아미노산은 F 또는 Y로 치환될 수 있고; X^{28} 의 아미노산은 D 또는 N으로 치환될 수 있고; X^{33} 의 아미노산은 W 또는 Y로 치환될 수 있고; X^{52} 의 아미노산은 N 또는 Q로 치환될 수 있고; X^{54} 의 아미노산은 D 또는 E로 치환될 수 있고; X^{59} 의 아미노산은 N 또는 Q로 치환될 수 있고; X^{102} 의 아미노산은 A 또는 G로 치환될 수 있고, X^{103} 의 아미노산은 T 또는 S로 치환될 수 있다

[0109] 일부 실시예에서, 서열번호 13에 표시된 항체의 경쇄와 비교하여, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 적어도 X^{52} , X^{54} , X^{61} , X^{100} 및/또는 X^{103} 에서 아미노산 치환(들)을 포함하고, 여기서, X^{52} 의 아미노산은 N 또는 S로 치환될 수 있고; X^{54} 의 아미노산은 D 또는 N으로 치환될 수 있고; X^{61} 의 아미노산은 T 또는 S로 치환될 수 있고; X^{100} 의 아미노산은 W 또는 Y로 치환될 수 있고; X^{103} 의 아미노산은 T 또는 S로 치환될 수 있다.

[0110] 일부 실시예에서, 서열번호 13에 표시된 항체의 경쇄와 비교하여, 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 적어도 X^{52} , X^{57} , X^{58} , X^{64} , X^{106} 및/또는 X^{107} 에서 아미노산 치환(들)을 포함하고, 여기서, X^{52} 의 아미노산은 N 또는 S로 치환될 수 있고; X^{57} 의 아미노산은 T 또는 S로 치환될 수 있고; X^{58} 의 아미노산은 I 또는 L로 치환될 수 있고; X^{64} 의 아미노산은 L 또는 V로 치환될 수 있고; X^{106} 의 아미노산은 F 또는 Y로 치환될 수 있고; X^{107} 의 아미노산은 D 또는 N으로 치환될 수 있다.

[0111] 일부 실시예에서, 항체의 중쇄는 서열번호 13, 서열번호 17, 서열번호 19 및 서열번호 21 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0112] 일부 실시예에서, 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편에서, LCDR1은 서열번호 1에 표시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있고; LCDR2는 서열번호 2에 표시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있고; LCDR3은 서열번호 3에 표시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있고; HCDR1은 서열번호 4에 표시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있고; HCDR2는 서열번호 5에 표시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있고;

[0113] HCDR3은 서열번호 6에 표시된 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 SG003 항체 또는 그와 동일한 LCDR1-3 및 HCDR1-3을 갖는 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 본 출원의 항체의 경쇄 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 가변영역을 포함할 수 있고, 중쇄 가변영역을 포함할 수 있고, 중쇄 가변영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 SG003 항체 또는 그와 동일한 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 갖는 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함할 수 있고, 경쇄는 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 중쇄는 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 SG003 항체 또는 그와 동일한 경쇄 및 중쇄를 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0114] 일부 실시예에서, 본 출원의 항체는 SG003일 수 있다. SG003 항체의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호

1, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; VL은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있으며; HCDR1, LCDR2 및 LCDR3은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; VH는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 경쇄는 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 중쇄는 서열번호 13로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0115] 일부 실시예에서, 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD38 단백질(예: 인간 CD38 단백질 또는 원숭이 CD38 단백질)에 결합하기 위해 레퍼런스 항체와 경쟁한다. 레퍼런스 항체는 LCDR1, LCDR2, LCDR3 및 HCDR1, HCDR2, HCDR3을 포함할 수 있고, LCDR1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; LCDR2는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; LCDR3은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; HCDR1은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; HCDR2는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; HCDR3은 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 레퍼런스 항체는 SG003 항체 또는 그와 동일한 LCDR1, LCDR2, LCDR3 및 HCDR1, HCDR2, HCDR3을 갖는 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 레퍼런스 항체는 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함할 수 있고, 경쇄 가변영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 중쇄 가변영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 SG003 항체 또는 그와 동일한 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 갖는 항체를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 레퍼런스 항체는 경쇄 및 중쇄를 포함할 수 있고, 경쇄는 서열번호 11로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 중쇄는 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 레퍼런스 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 SG003 항체 또는 그와 동일한 경쇄 및 중쇄를 갖는 항체를 포함할 수 있다.

[0116] 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이의 경쇄 및/또는 중쇄의 아미노산 서열에 하나 이상의 무작위 돌연변이(예: 하나 이상, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환)를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 가변영역의 프레임 영역 L-FR1 ~ L-FR4의 하나 이상의 부위에서, 하나 이상의 무작위 돌연변이(예: 하나 이상, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환)를 포함할 수 있고 및/또는 중쇄 가변영역의 프레임 영역 H-FR1 ~ H-FR4의 하나 이상의 부위에서, 하나 이상의 무작위 돌연변이(예: 하나 이상, 하나 또는 여러 개의 아미노산 치환)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 무작위 돌연변이시, 항체의 경쇄 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16, 서열번호 18 및 서열번호 20 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 및/또는 항체의 중쇄 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 17, 서열번호 19 및 서열번호 21 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 무작위로 돌연변이된 CD38 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 여전히 인간 CD38 단백질 및 원숭이 CD38 단백질에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는다.

[0117] 일부 실시예에서, 본 출원의 항체의 경쇄 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 16으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 중쇄는 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 대안적으로, 본 출원의 항체의 경쇄 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 중쇄는 서열번호 19로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 대안적으로, 본 출원의 항체의 경쇄 또는 이의 항원-결합 단편은 서열번호 20으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있고; 중쇄는 서열번호 21로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0118] 본 출원에 포함된 단백질, 펩티드 및/또는 아미노산 서열은 또한 다음 범위를 포함하는 것으로 이해되어야 한다: 단백질 또는 펩티드와 동일하거나 유사한 기능을 갖는 변이체 또는 상동체.

[0119] 본 출원에서, 변이체는 단백질 및/또는 펩티드(예: CD38 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편)의 아미노산 서열에 대해 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가에 의해 수득된 단백질 또는 펩티드일 수 있다. 예를 들어, 기능적 변이체는 적어도 하나, 예를 들어, 1-30, 1-20 또는 1-10, 또는 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산의 치환, 결실 및/또는 첨가에 의한 아미노산 변형을 갖는 단백질 또는 펩티드를 포함할 수 있다. 기능적 변이체는 기본적으로 변형(예: 치환, 결실 또는 첨가) 전 단백질 또는 펩티드의 생물학적 활성을 유지할 수 있다. 예를 들어, 기능적 변이체는 기존 단백질 또는 펩티드의 생물학적 활성(예: 항원 결합 능력)의 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%를 유지할 수 있다. 예를 들어, 치환은 보존적 치환(conservative substitution)일 수 있다.

[0120] 본 출원에서, 상동체는 단백질 및/또는 펩티드의 아미노산 서열(예: CD38 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편)과 적어도 약 85%(예: 적어도 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 이상)의 서열 상동성을 갖는 단백질 또는 펩티드일 수 있다.

- [0121] 본 출원에서, 상동성(homology)은 일반적으로 둘 이상의 서열 사이의 유사성(similarity), 비슷함(analogy) 또는 연관성을 의미한다. "서열 상동성 백분율"은 다음과 같이 계산할 수 있다: 정렬할 두 서열을 비교 창에서 비교하여 일치하는 위치의 갯수를 얻기 위해 두 개의 서열에서 동일한 핵산 염기(예: A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기(예: Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)를 가진 위치의 갯수를 결정한다. 일치하는 위치의 갯수를 비교 창의 총 위치의 갯수(즉, 창 크기)로 나누고 결과에 100을 곱하여 서열 상동성 백분율을 생성한다. 서열 상동성 백분율을 결정하기 위한 정렬은 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하는 것과 같이 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 수행될 수 있다. 당업자는 비교되는 전장 서열 범위 내에서 또는 표적 서열 영역 내에서 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하는, 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 상동성은 FASTA 및 BLAST 방법에 의해 결정될 수도 있다. FASTA 알고리즘에 대한 설명은 W. R. Pearson and D. J. Lipman's "Improved Tools for Biological Sequence Comparison", Proceedings of the National Academy of Sciences (Proc. Natl. Acad. Sci.), 85: 2444-2448, 1988; and D. J. Lipman and W. R. Pearson's "Fast and Sensitive Protein Mass Similarity Search", Science, 227: 1435-1441, 1989을 참조할 수 있다. BLAST 알고리즘에 대한 설명은 S. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. Lipman, "A Basic Local Alignment Search Tool", Journal of Molecular Biology, 215: 403-410, 1990을 참조할 수 있다.
- [0122] **핵산, 벡터, 세포, 및 제조방법**
- [0123] 또 다른 관점에서, 본 출원은 하나 이상의 단리된 핵산 분자를 추가로 제공한다. 하나 이상의 핵산 분자는 본 출원에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 핵산 분자의 폴리뉴클레오타이드는 전체 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화할 수 있으며, 또한 이의 일부(예: 하나 이상의 HCDR1-3, LCDR1-3, VL, VH, 경쇄 또는 중쇄)를 암호화할 수 있다.
- [0124] 본 출원의 핵산 분자 중 적어도 하나의 핵산 분자는 코돈 최적화될 수 있다. 예를 들어, 코돈 최적화 방법은 희귀 코돈 제거, GC 함량 조정, mRNA의 안정성 증가, mRNA의 2차 구조 조정, 합리적 링커 설계 및 스타트 코돈 환경 조정을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0125] 일부 실시예에서, 핵산 분자는 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 12 및 서열번호 14를 포함하는 군에서 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 여기서 서열번호 9는 본 출원의 SG003 항체의 경쇄 가변영역을 암호화할 수 있다. 서열번호 10은 본 출원의 SG003 항체의 중쇄 가변영역을 암호화할 수 있다. 서열번호 12는 본 출원의 SG003 항체의 경쇄를 암호화할 수 있다. 서열번호 14는 본 출원의 SG003 항체의 중쇄를 암호화할 수 있다.
- [0126] 본 출원의 핵산 분자는 단리될 수 있다. 예를 들어, 핵산 분자는 다음과 같은 방법에 의해 생산 또는 합성될 수 있다: (i) 핵산 분자는 증합효소연쇄반응(PCR) 증폭에 의해 생산되는 것과 같이 시험관 내에서 증폭될 수 있고, (ii) 핵산 분자는 클로닝 및 재조합에 의해 생산될 수 있고, (iii) 핵산 분자는 정제될 수 있으며, 예를 들어 소화 및 겔 전기 영동 분획에 의해 분리될 수 있고, 또는 (iv) 핵산 분자는 화학적 합성에 의해 합성될 수 있다. 일부 실시예에서, 단리된 핵산은 재조합 DNA 기술에 의해 제조된 핵산 분자이다.
- [0127] 본 출원에서 항체를 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 핵산은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 제조될 수 있다. 이들 방법은 제한적인 단편 조작 또는 합성 올리고뉴클레오타이드를 사용한 중첩 연장 PCR을 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 자세한 내용은 다음을 참조할 수 있다: Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; and Ausube et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York N.Y., 1993.
- [0128] 또 다른 관점에서, 본 출원은 본 출원의 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 하나 이상의 벡터를 제공한다. 각 벡터는 하나 이상의 핵산 분자를 포함할 수 있다. 더욱이, 벡터는 적절한 세포 및 적절한 조건 하에서 벡터를 선택할 수 있게 하는 표지 유전자와 같은 다른 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 더욱이, 벡터는 암호화 영역이 적절한 숙주에서 적절하게 발현되도록 하는 발현 조절 요소를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 조절 요소는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어 조절 요소는 프로모터, 리보솜 결합 부위, 인핸서 및 유전자 전사 또는 mRNA 번역을 조정하는 다른 조절 요소 등을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 발현 조절 서열은 조정 가능한 요소이다. 발현 조절 서열의 특정 구조는 종 또는 세포 유형의 기능에 따라 다를 수 있지만 일반적으로 TATA 박스, 캡핑 서열(capping sequence), CAAT 서열 등과 같은 전사 및 번역 개시에 관여하는 5' 비-전사 서열 및 5'

및 3' 비-번역 서열을 포함한다. 예를 들어, 5' 비-전사 발현 조절 서열은 프로모터 영역을 포함할 수 있고, 프로모터 영역은 기능적 연결 핵산을 전사적으로 조절하기 위한 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 발현 조절 서열은 또한 인핸서 서열 또는 업스트림 활성화제 서열을 포함할 수 있다. 본 출원의 하나 이상의 핵산 분자는 발현 조절 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0129] 벡터는, 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 바이러스, 박테리오파지 또는 예를 들어 유전 공학에 일반적으로 사용되는 다른 벡터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 발현 벡터이다. 예를 들어, 발현 벡터는 T-easy일 수 있다.

[0130] 또 다른 관점에서, 본 출원은 본 출원의 하나 이상의 핵산 분자 및/또는 본 출원의 하나 이상의 벡터를 포함할 수 있는 세포를 제공한다. 일부 실시예에서, 각각의 또는 각 종류의 세포는 본 출원의 하나 또는 하나의 종류의 핵산 분자 또는 벡터를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 각각의 또는 각 종류의 세포는 본 출원의 하나 초과(예: 2 이상) 또는 하나 초과(예: 2 이상의 종류)의 핵산 분자 또는 벡터를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 벡터는 식물 유래 세포, 진균 또는 효모 세포 등과 같은 진핵세포와 같은 세포 내로 도입될 수 있다. 본 출원의 벡터는 전기천공법, 리포펙틴 형질감염, 리포펙타민 형질감염 등과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 세포는 CHO-S일 수 있다.

[0131] 또 다른 관점에서, 본 출원은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 발현할 수 있는 조건 하에서 본 출원의 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 적절한 배양 배지, 적절한 온도 및 배양 시간 등을 사용하는 것이 가능합니다. 이러한 방법은 당업자에게 알려져 있다.

[0132] 일부 경우에서, 상기 방법은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 분리 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질을 G-아가로스 또는 단백질을 A-아가로스는 친화성 크로마토그래피에 사용될 수 있고, 겔 항체 및/또는 고성능 액체 크로마토그래피 등은 또한 본 출원의 항체 또는 항원-결합 단편을 정제하고 분리하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 단백질 A 친화성 정제도 사용할 수 있다.

[0133] 약학 조성물, 용도

[0134] 또 다른 관점에서, 본 출원은 본 출원의 항체, 항체-결합 단편 또는 이의 변이체, 핵산 분자, 벡터 또는 세포, 및 선택적으로 제약상 허용가능한 보조제를 포함할 수 있는 약학 조성물을 제공한다.

[0135] 제약상 허용가능한 보조제는 완충제, 항산화제, 보존제, 저분자량 펩티드, 단백질, 친수성 중합체, 아미노산, 당, 킬레이트제, 반대이온, 금속착물 및/또는 비이온성 계면활성제 등을 포함할 수 있다.

[0136] 본 출원에서, 약학 조성물은 경구 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 종양 부위에서의 원위치(in situ) 투여, 흡입, 직장 투여, 질 투여, 경피 투여 또는 피하 저장소를 통한 투여를 위해 제형화될 수 있다.

[0137] 약학 조성물은 종양 성장을 억제하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 약학 조성물은 질병의 발달 또는 진행을 억제 또는 완화하고, 종양 크기를 감소(또는 심지어 기본적으로 종양을 제거)하고, 및/또는 질병 상태를 감소 및/또는 안정화시킬 수 있다.

[0138] 본 출원의 약학 조성물은 치료적 유효량의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 치료적 유효량은 질병 또는 질환이 발병하거나 발병 위험이 있는 대상체에서 질병 또는 질환(예: 암) 및/또는 임의의 합병증을 예방 및/또는 치료(적어도 부분적으로 치료)하는 데 필요한 용량일 수 있다.

[0139] 한편, 본 출원은 종양의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도를 제공한다.

[0140] 한편, 본 출원은 종양의 예방 또는 치료용 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0141] 한편, 본 출원은 종양을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 본 출원의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 분자 핵산, 벡터, 세포 및/또는 약학 조성물을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0142] 본 출원에서, 종양은 CD38 양성 종양을 포함할 수 있다. 예를 들어, CD38 양성 종양은 다발성 골수종, 림프종 및 백혈병을 포함하는 군에서 선택될 수 있다.

[0143] 일부 실시예에서, 종양은 비-호지킨 림프종 및 호지킨 림프종을 포함하는 군에서 선택된다.

[0144] 한편, 본 출원은 CD38 리간드에 대한 CD38 단백질의 결합을 억제하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 출원의

항체 또는 이의 항원-결합 단편, 핵산 분자, 벡터 및/또는 세포를 투여하는 단계를 포함한다.

- [0145] 본 출원에서 CD38 리간드는 CD31 단백질을 포함할 수 있다.
- [0146] 일부 실시예에서, CD38 리간드에 대한 CD38 단백질의 결합을 억제하는 방법은 시험관 내 또는 생체 외 방법이다.
- [0147] 본 출원은 다음과 같은 실시예를 포함할 수 있다:
- [0148] 1. 1×10^{-9} M 또는 미만의 K_D 값으로 CD38 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0149] 2. 제1실시예에 있어서, CD38 단백질에 특이적으로 결합함으로써 종양세포를 사멸 및 손상시키고 및/또는 종양 성장을 억제할 수 있는 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0150] 3. 제1실시예 또는 제2실시예에서, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), 보체-의존성 세포독성(complement-dependent cytotoxicity, CDC) 및/또는 세포예정사(apoptosis)에 의해 CD38⁺ 세포를 사멸시킬 수 있는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0151] 4. 제3실시예에서, 상기 종양은 CD38 양성 종양을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0152] 5. 제4실시예에서, 상기 CD38 양성 종양은 다발성 골수종, 림프종 및 백혈병을 포함하는 군에서 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0153] 6. 제3 내지 제5 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 종양은 비-호지킨 림프종 및 호지킨 림프종을 포함하는 군에서 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0154] 7. 제3 내지 제6 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 종양세포는 Raji 세포, Daudi 세포, Ramos 세포 및 RPMI8226 세포를 포함하는 군에서 선택되는 것들을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0155] 8. 제1 내지 제7 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD38 단백질에 결합할 때 인간 CD38 단백질의 60-89의 아미노산 잔기에 상응하는 하나 이상의 잔기에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0156] 9. 제1 내지 제8 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체는 단일클론 항체, 단일-가닥 항체, 키메라 항체, 인간화 항체(humanized antibody) 및 완전 인간 항체(fully human antibody)를 포함하는 군에서 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0157] 10. 제1 내지 제9 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, Fv 및 ScFv 단편을 포함하는 군에서 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0158] 11. 제1 내지 제10 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 CD38 단백질은 인간 CD38 단백질 또는 원숭이 CD38 단백질인 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0159] 12. 제1 내지 제11 실시예 중 어느 한 실시예에서, CD38 단백질에 결합하기 위해 레퍼런스 항체(reference antibody)와 경쟁하고, 상기 레퍼런스 항체는 경쇄 가변영역 및 중쇄 가변영역을 포함하고, 레퍼런스 항체의 경쇄 가변영역은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, LCDR1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 레퍼런스 항체의 중쇄 가변영역은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, HCDR1은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고; HCDR3은 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0160] 13. 제12실시예에서, 상기 레퍼런스 항체의 경쇄 가변영역은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 레퍼런스 항체의 중쇄 가변영역은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0161] 14. 제12실시예 또는 제13실시예에서, 상기 레퍼런스 항체의 경쇄는 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 레퍼런스 항체의 중쇄는 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0162] 15. 제1 내지 제14 실시예 중 어느 한 실시예에서, CD38 단백질에 결합하기 위해 레퍼런스 항체(reference

antibody)와 경쟁하고, 상기 레퍼런스 항체는 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 레퍼런스 항체의 경쇄는 서열번호 11, 서열번호 16, 서열번호 18 및 서열번호 20 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하고, 레퍼런스 항체의 중쇄는 서열번호 13, 서열번호 17, 서열번호 19 및 서열번호 21 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

- [0163] 16. 제1 내지 제15 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체는 항체의 경쇄 또는 이의 단편을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0164] 17. 제16실시예에서, 상기 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 LCDR1을 포함하고, LCDR1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0165] 18. 제16실시예 또는 제17실시예에서, 상기 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 LCDR2를 포함하고, LCDR2는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0166] 19. 제16 내지 제18 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 LCDR3을 포함하고, LCDR3은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0167] 20. 제16 내지 제19 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 경쇄 가변영역 VL을 포함하고, 경쇄 가변영역 VL은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0168] 21. 제16 내지 제20 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 인간 불변영역을 추가로 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0169] 22. 제21실시예에서, 상기 불변영역은 인간 Igκ 불변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0170] 23. 제16 내지 제22 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 서열번호 22로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0171] 24. 제27실시예에서, 상기 항체의 경쇄 또는 이의 단편은 서열번호 11, 서열번호 16, 서열번호 18 및 서열번호 20 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0172] 25. 제1 내지 제24 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체는 항체의 중쇄 또는 이의 단편을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0173] 26. 제25실시예에서, 상기 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 HCDR1을 포함하고, HCDR1은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0174] 27. 제25실시예 또는 제26실시예에서, 상기 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 HCDR2를 포함하고, HCDR2는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0175] 28. 제25 내지 제27 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 HCDR3을 포함하고, HCDR3은 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0176] 29. 제25 내지 제28 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 중쇄 가변영역 VH를 포함하고, 중쇄 가변영역 VH는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0177] 30. 제25 내지 제29 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 인간 불변영역을 추가로 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0178] 31. 제30실시예에서, 상기 인간 불변영역은 인간 IgG 불변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0179] 32. 제31실시예에서, 상기 IgG 불변영역은 인간 IgG1 불변영역을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0180] 33. 제25 내지 제32 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 항체의 중쇄는 서열번호 23으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0181] 34. 제33실시예에서, 상기 항체의 중쇄 또는 이의 단편은 서열번호 13, 서열번호 17, 서열번호 19 및 서열번호 21 중 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0182] 35. 제1 내지 제34 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 암호화하는 폴리뉴

클레오티드를 포함하는 하나 이상의 단리된 핵산 분자.

- [0183] 36. 제35실시예에서, 상기 핵산 분자 중 적어도 하나는 코돈 최적화된 핵산 분자.
- [0184] 37. 제35 또는 제36 실시예에서, 상기 핵산 분자는 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 12 및 서열번호 14를 포함하는 군에서 선택되는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자.
- [0185] 38. 제35 내지 제37 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터.
- [0186] 39. 제35 내지 제37 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 핵산 분자 또는 제38실시예에 따른 벡터를 포함하는 세포.
- [0187] 40. 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현을 허용하는 조건 하에서 제39실시예에 따른 세포를 배양하는 단계를 포함하는 제1 내지 제34 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 제조방법.
- [0188] 41. 제1 내지 제34 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제35 내지 제37 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 핵산 분자, 제38실시예에 따른 벡터 또는 제39실시예에 따른 세포, 및 선택적으로 제약상 허용가능한 보조제를 포함하는 약학 조성물.
- [0189] 42. 종양의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서 제1 내지 제34 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도.
- [0190] 43. 제42실시예에 있어서, 상기 종양은 CD38 양성 종양을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도.
- [0191] 44. 제43실시예에 있어서, 상기 CD38 양성 종양은 다발성 골수종(multiple myeloma), 림프종(lymphoma) 및 백혈병(leukemia)을 포함하는 군에서 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도.
- [0192] 45. 제42 내지 제44 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 종양은 비-호지킨 림프종 및 호지킨 림프종을 포함하는 군에서 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도.
- [0193] 46. 종양의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 제1 내지 제34 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0194] 47. 제46실시예에서, 상기 종양은 CD38 양성 종양을 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0195] 48. 제47실시예에서, 상기 CD38 양성 종양은 다발성 골수종, 림프종 및 백혈병을 포함하는 군에서 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편.
- [0196] 49. 제46 내지 제48 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 종양은 비-호지킨 림프종 및 호지킨 림프종을 포함하는 군에서 선택되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 용도.
- [0197] 50. 제1 내지 제34 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제35 내지 제37 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 핵산 분자, 제38실시예에 따른 벡터, 제39실시예에 따른 세포 및/또는 제40실시예에 따른 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 이를 필요로 하는 대상체에서 종양을 예방 또는 치료하는 방법.
- [0198] 51. 제50실시예에서, 상기 종양은 CD38 양성 종양을 포함하는 방법.
- [0199] 52. 제51실시예에서, 상기 CD38 양성 종양은 다발성 골수종, 림프종 및 백혈병을 포함하는 군에서 선택되는 방법.
- [0200] 53. 제50 내지 제52 실시예 중 어느 한 실시예에서, 상기 종양은 비-호지킨 림프종 및 호지킨 림프종을 포함하는 군에서 선택되는 방법.
- [0201] 54. 제1 내지 제34 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제35 내지 제37 실시예 중 어느 하나의 실시예에 따른 핵산 분자, 제38실시예에 따른 벡터 및/또는 제39실시예에 따른 세포를 투여하는 단계를 포함하는 CD38 리간드에 대한 CD38 단백질의 결합을 억제하는 방법.
- [0202] 55. 제54실시예에서, 상기 CD38 리간드는 CD31을 포함하는 방법.
- [0203] 다음의 실험예는 이론에 얽매이지 않고, 본 출원의 제품, 방법 또는 시스템의 작동 모드를 설명하기 위한 것일 뿐, 본 출원의 발명의 범위를 제한하려는 것은 아니다.

- [0204] **실험예**
- [0205] **실험예 1: 하이브리도마 항체의 제조 및 유전자 클로닝**
- [0206] 마우스의 면역화: balb/c 마우스(Beijing Vital River Labs Animal Technology Co., Ltd.에서 구입)를 100 µg의 가용성 CD38 항원(Beijing Yiqiao Shenzhou Biotechnology Co., Ltd.에서 구입)과 혼합된 Freund의 보조제 또는 Freund의 불완전 보조제로 3회 피하(sc) 면역화했다. 0일 째에, Freund의 완전 보조제가 사용되었으며, 14일과 28일에는 Freund의 불완전 보조제가 사용되었다. 면역화된 마우스의 비장 세포를 표준 방법에 따라 마우스 골수종 세포 SP2/0(ATCC)에 융합시켰다.
- [0207] 하이브리도마 융합: 마우스 비장은 기존의 하이브리도마 융합법에 따라 융합되었고, 융합된 하이브리도마세포(웰당 10^5 cells)는 HAT 스크리닝 방법에 따라 스크리닝되었다. 12일 후, CD38 항원으로 코팅된 마이크로플레이트를 사용하여 상등액을 ELISA 분석에 적용하였다. 바람직한 클론은 희석 분석을 제한하여 2차 서브클로닝을 받는다. 목적 항체를 안정적으로 발현하는 수득된 하이브리도마 균주를 종자 보존 및 라이브러리 구축에 적용하였다.
- [0208] RNA 제조: RNA는 RNA 추출 키트 TRIzol Reagent(Life Technologies에서 구매)를 사용하여 제조되었다. 항체 유전자를 암호화하는 cDNA를 제조하기 위해 역전사 키트(Beijing Quanshijin Biotechnology Co., Ltd.에서 구입)를 사용하고, cDNA를 항체 가변영역 유전자의 PCR 증폭을 위한 주형으로서 사용했다. T-easy 벡터를 클로닝하고, 클로닝 후 얻은 중쇄 및 경쇄 가변영역 서열을 시퀀싱하여 해당 아미노산 서열을 추가로 수득하였다.
- [0209] **실험예 2: 항체의 인간화 및 제조**
- [0210] 실험예 1에서 얻은 무린 항체 가변영역의 중쇄 및 경쇄 서열을 NCBI에서 제공하는 온라인 서열 정렬 방법(IgBlast)을 통해 NCBI 데이터베이스의 기존 인간 항체 서열과 서열 정렬하여 잠재적인 인간화 부위를 결정하였다. 또한, 인간화 부위를 결정하기 위해 SwissModel을 통해 무린 항체 가변영역의 3차원 구조를 구축했다. 상응하는 인간화 부위에 대해 인간화를 수행하여 인간화 항체 서열을 수득하였다.
- [0211] 인간화 항체는 SG003으로 명명되었고, 시퀀싱 결과는 SG003 항체의 LCDR1-3의 아미노산 서열이 각각 서열번호 1, 서열번호 2 및 서열번호 3에 표시된 것으로 나타났다; VL의 아미노산 서열은 서열번호 7에 표시되어 있으며; 코돈 최적화 및 역 번역에 의해 얻어진 VL을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 9에 표시되어 있다; SG003 항체의 HCDR1-3의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6에 표시되어 있으며; VH의 아미노산 서열은 서열번호 8에 표시되어 있으며; 코돈 최적화 및 역 번역에 의해 얻어진 VH를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 10에 표시되어 있다.
- [0212] SG003 항체의 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 11에 표시되어 있고; 이를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 12에 표시되어 있다. SG003 항체의 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 13에 표시되어 있고; 이를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 14에 표시되어 있다.
- [0213] 수득된 인간화 항체 가변영역 유전자를 인간 IgG 불변 영역 유전자를 포함하는 진핵 발현 벡터 pCMV-163에 클로닝하여 도 1에 나타난 바와 같은 물리적 맵을 갖는 완전한 항체 발현 벡터를 구축하였다. 도 1에서, 진핵 발현 벡터 pCMV-163의 다양한 구성은 당업계에 공지되어 있으며 나타난 순서대로 재조합된다.
- [0214] ExpiCHOTM Expression System 키트(Thermo Fisher Scientific에서 구입)를 사용하여 SG003 항체를 암호화하는 수득된 진핵 발현 벡터를 발현을 위해 CHO-S 세포에 형질감염시키고, 목적 단백질을 포함하는 세포 배양 상등액을 수집했다. 표적 항체는 통상적인 단백질 A 친화성 정제를 사용하여 정제되었다.
- [0215] **실험예3: 표적 항원에 대한 인간화 항체의 결합**
- [0216] ELISA 플레이트를 1 µg/ml의 CD38-His 융합 단백질을 함유하는 PBS 용액으로 4℃에서 밤새 코팅했다. 이어서 플레이트를 0.01% Tween-20 (PBST)을 함유하는 PBS 용액으로 세척하였다. 10% 소 태아 혈청을 PBST에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 차단했다. 그 다음, 상이한 농도의 SG003 항체 및 대조군 항체 다라투무맙(Daratumumab, DARZALEX)을 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 세척한 후, 겨자무과산화효소 표지 염소 항-인간 IgG HRP 2차 항체(Thermo Fisher Scientific에서 구입)를 첨가하고 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 플레이트를 PBST로 (5회) 세척하고, 잔여 액체 방울을 흡수성 종이에서 가능한 한 제거하였다. 100 µl의 TMB(eBioscience에서 구입)를 각 웰에 첨가하고 1-5분 동안 어두운 곳에서 실온($20 \pm 5^\circ\text{C}$)에 두었다. 100 µl의 2N H₂SO₄ 정지 용액(stop solution)을 각 웰에 첨가하여 기질 반응을 쉼시켰다. OD값은 마이크로플레이트 리더

로 450nm에서 판독되었고, 표적 항원 CD38-His에 대한 항체의 결합 능력이 분석되었다. 결과는 SG003 항체가 대조군 항체인 Daratumumab보다 더 강한 결합 활성을 보였으며, 그 결과는 도 2에 나타나있다. 도 2에서 EC50 값은 35.1 ± 10.5 ng/mL인 반면, Daratumumab 항체의 EC50 값은 150.9 ± 105.8 ng/mL 이다.

[0217] 실험예 4: 인간화 항체의 친화성 결정

[0218] 항체 친화성은 BIACORE Biomacromolecule Interaction Apparatus (GE)에 의해 분석되었다. 항 인간 IgG-Fab 항체(Abcam에서 구입)를 칩에 연결하고, 항 인간 IgG 항체를 사용하여 SG003 항체를 포획했다. 항체의 농도는 1 μ g/mL로 설정되었으며, 주입 시간은 60-150초 였고; CD38 항원은 이동상으로 사용되었고; 6개의 농도 구배 (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100nM)가 사용되었으며, 결합 시간은 120초 였고; 해리 시간은 1200초 였고; 10mM 글리신-염산 완충액 (pH 2.1)을 재생을 위해 60초 동안 사용했다. 결과는 SG003 항체 친화성이 표 1에 나타난 바와 같음을 보여준다.

표 1

SG003 항체의 친화성

항체	결합상수(Association Constant) (10^6 1/Ms)	해리상수(Dissociation Constant) (10^{-4} 1/s)	상대적 친화성 (Relative Affinity) (10^{-10} M)
SG003	2.86 ± 0.00	9.18 ± 0.01	3.21 ± 0.01

[0220] 실험예 5: 표적 항원에 대한 인간화 항체의 특이적 인식

[0221] ELISA 스트립을 4℃에서 밤새 1mg / ml로 코팅하기 위해 우유 (Beijing Bomed Biotechnology Co., Ltd.), BSA (BOVOGEN), CD19 (Beijing Yiqiao Shenzhou Biotechnology Co., Ltd.), TROP2 (Beijing Yiqiao Shenzhou Biotechnology Co., Ltd.), CD47 (Beijing Magpel Biotech Technology Co., Ltd.), CD38 (Beijing Yiqiao Shenzhou Biotechnology Co., Ltd.), Gas6 (R&D) 및 AXL (ACRO Biosystems)와 같은 다양한 단백질이 각각 사용되었다. PBST로 세척한 후 10% 소 태아 혈청을 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 차단하였다. SG003 항체를 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 세척한 후, 겨자무과산화효소-표지 염소 항-인간 IgG HRP 2차 항체 (ThermoFisher Scientific에서 구입)를 첨가하고 실온에서 30분 동안 반응시켰다. PBST로 (5회) 플레이트를 세척한 후, 잔여 액체 방울을 흡수성 종이에서 가능한 한 제거하였다. 100ml TMB (eBioscience)를 각 웰에 첨가하고 1-5분 동안 어두운 곳에서 실온 (20 ± 5 °C)에 두었다. 2N H₂SO₄ 정지 용액 100ml를 각 웰에 첨가하여 기질 반응을 켜고, OD 값을 마이크로플레이트 리더로 450nm에서 판독하여 항체-단백질 결합 능력을 분석했다.

[0222] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3의 결과는 SG003 항체가 표적 항원 CD38을 특이적으로 인식할 수 있지만, 우유, BSA, CD19, TROP2, CD47, AXL, Gas6 및 다른 단백질과의 결합 반응은 뚜렷하지 않음을 보여준다.

[0223] 실험예 6: 세포 표면에서 항원에 대한 인간화 항체의 결합

[0224] 유동 분석 기술을 사용하여 Raji 세포, Daudi 세포, Ramos 세포 및 RPMI8226 세포의 표면에서 SG003 항체 및 대조군 항체 Daratumumab에 대한 CD38 단백질의 결합을 탐색했다. 대수 생장기(logarithmic growth phase) 세포를 수집하고 5×10^6 cells/mL 의 세포 밀도로 조정하고 얼음에서 미리 냉각했다. SG003 항체 및 대조군 항체 Daratumumab은 2 % FBS를 함유하는 사전 냉각된 생리 식염수로 다른 농도로 희석되었다. 100 μ L의 세포를 채취하고, 동일한 부피의 희석된 항체를 4 °C에서 30 분 동안 어둠 속에서 반응을 위해 첨가했다. 반응 완료 후, 세포를 2 회 세척하였다. 세포를 희석된 PE Mouse Anti-Human IgG 2차 항체(BD Pharmingen에서 구입) 100 μ L에 재현탁하고 어둠 속에서 30분 동안 4 °C에서 반응시켰다. 반응 종료 후, 2 % FBS를 함유한 사전 냉각된 식염수로 2 회 세척하였다. 세포를 400 μ L의 1 % 파라포름알데히드에 재현탁시켰다. 유세포 분석법(BD Calibur)을 사용하여 세포 표면 항원에 대한 항체의 결합 능력을 분석했다.

[0225] 결과는 SG003 항체가 Raji 세포, Daudi 세포, Ramos 세포 및 RPMI8226 세포의 표면에서 CD38을 특이적으로 인식할 수 있음을 보여준다. 이러한 인식 활성은 용량 의존적으로 대조군 항체 Daratumumab보다 유의하게 높으며, Raji 세포와 결합된 SG003의 EC50 값(도 4a)은 34.4 ng/mL, Daratumumab은 49.3 ng/mL였다. Daudi 세포(도 4b)와 결합된 SG003의 EC50 값은 36.7 ng/mL이고 Daratumumab은 50.9 ng/mL였다. Ramos 세포(도 4c)와 결합된 SG003의 EC50 값은 81.5 ng/mL이고 Daratumumab은 95.1 ng/mL였다. RPMI8226 세포(도 4d)와 결합된 SG003의

EC50 값은 140.3 ng/mL이고 Daratumumab은 176.5 ng/mL였다.

[0226] **실험예 7: 인간화 항체의 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)**

[0227] 먼저, 실험에 필요한 표적세포(Raji 세포, Daudi 세포, Ramos 세포 및 RPMI8226 세포)를 2×10^5 cells/mL의 밀도로 조정하고, ADCC 버퍼(phenol red-free MEM medium + 1% FBS)에 재현탁하고, 96 웰 플레이트(50 μ L/well)에 첨가하였다. 그런 다음, 각 웰에 100 μ L의 서로 다른 농도의 SG003 항체를 첨가하고 균일하게 혼합하고 5% CO₂가 포함된 배양기에서 30분 동안 37°C에서 배양했다. 그런 다음 필요한 이펙터세포 NK92MI-CD16a (Huabo Bio에서 구입)를 1.2×10^6 cell/mL의 밀도로 조정하고 이펙터세포에 대한 표적세포의 비율이 1:6이 되도록 표적세포가 있는 웰에 첨가하였다. 혼합 후, 5% CO₂가 포함된 배양기에서 37°C에서 4 ~ 6시간 동안 배양한 다음 96-웰 플레이트에있는 저장 용액(100 μ L/well)의 일부를 제거하고 LDH 검출 키트(Roche에서 구입한 세포독성 검출 키트)의 LDH 반응 혼합물(100 μ L/well)을 각 웰에 첨가했다. 혼합물을 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 그런 다음, 정지 용액(50 μ L/well)을 첨가하고 부드럽게 혼합했다. OD 값은 마이크로플레이트 리더로 492nm에서 읽었으며 650nm에서 OD 값을 배경값으로 사용했다. 실험에서 다음 대조군도 설정했다: 여기서, 대조군 1은 ADCC 완충액이고, 대조군 2는 표적세포 + ADCC 완충액이고, 대조군 3은 표적세포 + 용해물 + ADCC 완충액이고, 대조군 4는 표적세포 + 이펙터세포 + ADCC 완충액이었다. 특정 사멸율(killing rate) % = ((실험군-대조군 4)/(대조군 3- 대조군 2)) x 100%. 용량-효과 곡선은 GraphPad Prism 버전 5에 의한 데이터 분석에 적용되었다.

[0228] 결과는 Raji 표적세포 및 NK92MI-CD16a 이펙터세포로 실험하였을 때 SG003 항체가 매우 효과적인 ADCC 활성을 보였으며(도 5a 참조), SG003의 EC50 값은 6.97 ng/mL이고 Daratumumab은 17.0 ng/mL 이었다. Daudi가 표적세포로 사용될 때, SG003의 EC50 값은 0.72 ng/mL이고, Daratumumab은 4.6 ng/mL였다(도 5b 참조). 동시에, SG003 항체는 또한 Ramos 세포에서 효과적인 ADCC 활성을 나타냈다(도 5c 참조). SG003의 EC50 값은 0.69 ± 0.007 ng/mL이고 Daratumumab은 3.01 ng/mL이다. SG003 항체는 또한 RPMI8226 세포에 대해 효과적인 ADCC 활성을 보였으며(도 5d 참조), SG003의 EC50 값은 1.46 ng/mL이고 Daratumumab은 4.94 ng/mL이다.

[0229] **실험예 8: 종양 활성화에 대한 인간화 항체의 생체 내 억제**

[0230] 종양 활성 억제에 있어서 SG003 항체의 효과를 평가하기 위해, CB17 SCID 마우스에 Raji-Luc 세포를 접종함으로써 종양 모델을 확립하였다.

[0231] 실험을 위해 암컷, 생후 5-8 주 CB17 SCID 마우스(Beijing Biocytogen Co., Ltd.에서 구입)를 선택했다. Raji-Luc 세포는 루시페린 리porter 유전자로 형질전환된 Raji 세포를 기반으로 Beijing Biocytogen Co., Ltd.에서 얻은 안정적인 세포주이다. 소생 및 필요한 수로 배양한 후, 대수기(logarithmic phase) 성장 세포를 수집하고 5×10^6 cells/0.2mL의 농도로 현탁시켰다. CB17 SCID 마우스는 0.2 mL/mouse의 양으로 꼬리 정맥을 통해 접종되었다. 접종 후, 마우스를 0 일 및 7 일에 종양 성장 및 체중에 대해 작은 동물 영상기(animal imager)로 관찰하였다. 7 일째에 중간 종양 영상 신호를 갖는 18 마리의 마우스를 선택하고, 각 그룹당 6 마리를 3개의 그룹에 무작위로 할당하였다. 그런 다음 동물이 투여되기 시작했다. 식염수 대조군, 양성 대조군(Daratumumab, Johnson & Johnson에서 구입) 및 실험군(SG003)을 설정하고, 용량은 200 μ g/kg으로 2주에 1회, 총 2회였다. 다음으로 마우스의 체중, 종양 성장 및 생존율을 관찰했다.

[0232] 결과는 Daratumumab 및 SG003 항체가 실험 동물에 의해 견딜 수 있음을 보여준다. 각 그룹에 투여된 동물은 용매 대조군에 비해 현저한 종양 성장 억제 효과를 나타냈다(도 6 참조). 첫 번째 투여 후 7 일째에, Daratumumab 및 SG003 항체 처리군의 평균 형광 강도는 각각 (평균 3.92×10^7 , 표준 오차 4.04×10^6), (평균 3.19×10^7 , 표준 오차: 9.32×10^6)이었고, 대조군의 평균 종양 형광 강도(평균 3.04×10^8 , 표준 오차 4.29×10^7)보다 상당히 낮았다.

[0233] 그 후 동물 생존율을 더 관찰하였다. 대조군의 종양 생존 시간은 그룹화 후 12일, Daratumumab은 21일, SG003 군은 28일이었다. SG003 그룹은 Daratumumab 그룹보다 우수하다(도 7 참조).

[0234] **실험예 9: 키메라 항체의 종 인식 특이성**

[0235] 인간(Human), 마우스(Mouse), 랫트(Rat), 개잡이(cynomolgus)원숭이(Cynomolgus) 등의 다른 종의 CD38 세포 외 단백질(Beijing Yiqiao Shenzhou Biotechnology Co., Ltd.)을 각각 사용하여 ELISA 스트립을 4°C에서 1mg/ml로 밤새 코팅했다. PBST로 세척 후, 10% 소 태아 혈청을 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 차단하였다. 검사 대상 SG003 항체 및 대조군 항체 Daratumumab을 각각 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 세척한 후,

겨자무과산화효소 표지 염소 항-인간 IgG HRP 2차 항체(Thermo Fisher Scientific에서 구입)를 첨가하고 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 플레이트를 PBST로 (5회) 세척하고 잔여 액체 방울을 흡수성 종이에서 가능한 한 제거하였다. 100ml의 TMB(eBioscience에서 구입)를 각 웰에 첨가하고 1-5분 동안 어두운 곳에서 실온(20± 5℃)에 두었다. 100ml의 2N H₂SO₄ 정지 용액을 각 웰에 첨가하여 기질 반응을 켜고, OD 값을 마이크로플레이트로 450nm에서 판독하여 다른 종의 CD38 단백질에 대한 항체의 결합 능력을 분석하였다.

[0236] 결과는 SG003 항체가 인간 및 게잡이(cynomolgus) 원숭이의 CD38 단백질 분자를 인식할 수 있지만, 마우스 및 래트의 CD38 단백질 분자와 결합 반응이 없음을 보여주며, 결과는 도 8a에 나타나 있다.

[0237] 대조군 항체 Daratumumab은 인간 CD38 단백질 분자만 인식하고 마우스, 래트 및 게잡이(cynomolgus) 원숭이의 CD38 단백질 분자와 결합 반응이 없다. 결과는 도 8b에 나타나 있다.

[0238] 실험예 10: 돌연변이 후 인간화 항체의 생물학적 활성 유지

[0239] 유전 공학 기술의 도움으로 SG003 항체 가변영역 서열을 무작위로 돌연변이시켜서 새로운 항체 가변영역 서열을 얻고, 새로운 항체 경쇄 및 중쇄 서열을 추가로 얻을 수 있다. 예를 들어, SG003 항체를 기반으로 무작위 돌연변이 후 얻은 항체의 경우, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 16일 수 있고, 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 17일 수 있고; 또는 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 18일 수 있고, 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 19일 수 있고; 대안적으로, 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 20일 수 있고 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 21일 수 있다. 변이 후 경쇄 및 중쇄의 상기의 조합을 포함하는 항체는 순서대로 SG003M1-3으로 명명된다(예를 들어, SG003M1 항체의 경쇄 아미노산 서열은 서열번호 16이고, 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 17임).

[0240] 실험예 2의 방법을 참조하여 새로운 항체를 제조하고, 실험예 4의 방법을 참조하여 항체 활성을 평가하였다. 무작위 돌연변이 항체 SG003M1-3은 CD38 항원을 인식할 수 있다(도 9 참조). SG003M1의 EC₅₀ 값은 15.72 ng/mL, SG003M2의 EC₅₀ 값은 27.75 ng/mL, SG003M3의 EC₅₀ 값은 6.10 ng/mL인 것으로 확인되었다. SG003M1을 무작위로 선택하고 표 2에 나타난대로 친화성 결과를 결정한다.

표 2

[0241] SG003 돌연변이의 친화성 분석

항체	결합상수 (Association Constant) (10 ⁶ 1/Ms)	해리상수 (Dissociation Constant) (10 ⁻⁴ 1/s)	친화성 (10 ⁻¹⁰ M)
SG003M1	2.66 ± 0.01	6.36 ± 0.05	2.39 ± 0.03

[0242] 실험예 11: 인간화 항체의 에피토프 확인(Verification)

[0243] CD38 항원을 인식한 항체 SG003의 에피토프를 분석하기 위해 에피토프-매핑 방법을 사용하였다. CD38 항원 돌연변이체(표 3, 변이된 아미노산이 모두 알라닌임)는 알라닌 치환법으로 설계되었으며, CD38 야생형 및 다양한 돌연변이 유전자는 중합효소연쇄반응(PCR) 및 중첩 연장(overlap) 및 기타 분자생물학 기술을 통해 획득되었다. 아가로스 겔 전기영동으로 분리 및 회수한 후, 항체 또는 돌연변이체를 HindIII 및 NheI 제한효소로 분해하고, pEGFP-N1 벡터로 클로닝했다. 정확한 시퀀싱 후, HighGene Transfection Kit(ABclonal)를 사용하여 키트 설명서에 기재된 방법에 따라 CD38 야생형 또는 돌연변이 유전자를 포함하는 벡터를 293T 세포 내로 형질감염하였다. 형질감염 후 48시간 후에, 트립신 분해로 세포를 수집하여 단일-세포 현탁액을 제조하였다. 표적세포 및 SG003 항체는 4℃의 일정한 온도에서 30분 동안 10 µg/ml의 작동 농도에서 배양되었다. 이후, GAH-IgG Fc PE(Invitrogen, Cat: 12-4998-82)를 첨가하고 4℃의 항온에서 30분 동안 배양하고, 유세포분석법(flow cytometry)으로 FITC 및 PE 채널의 형광 강도를 측정하였으며, 여기서 FITC 형광 강도는 CD38 분자 및 돌연변이체의 발현 수준을 나타내고, PE 형광 강도는 SG003 항체 결합 항원의 강도를 나타낸다.

[0244] 도 10의 유세포분석 결과는 SG003 항체가 돌연변이체 21, 22 및 23에 결합하지 않음을 보여주며, 이는 CD38 단백질의 60-89의 아미노산 영역이 SG003 항체에 의해 인식되는 주요 에피토프임을 시사한다.

표 3

[0245]

CD38 단백질의 돌연변이체 및 돌연변이 부위

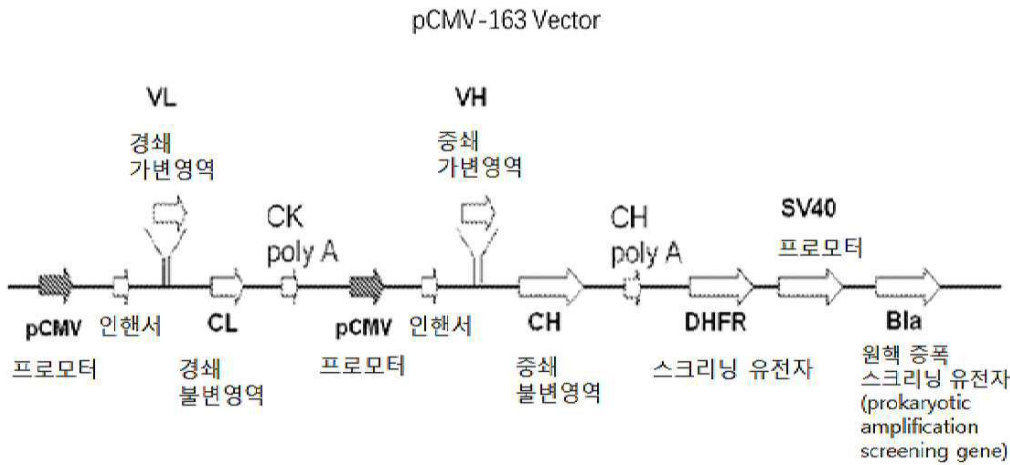
이름(Name)	돌연변이 부위 (Mutation Site)
CD38 Wild Type	N/A
CD38M4	291-300
CD38M5	281-290
CD38M6	256-266
CD38M7	247-255
CD38M8	210-219
CD38M9	200-209
CD38M10	190-199
CD38M11	180-189
CD38M12	170-179
CD38M13	160-169
CD38M14	150-159
CD38M15	140-149
CD38M16	130-139
CD38M17	120-129
CD38M18	110-119
CD38M19	100-109
CD38M20	90-99
CD38M21	80-89
CD38M22	70-79
CD38M23	60-69
CD38M24	50-59
CD38M25	43-49

[0246]

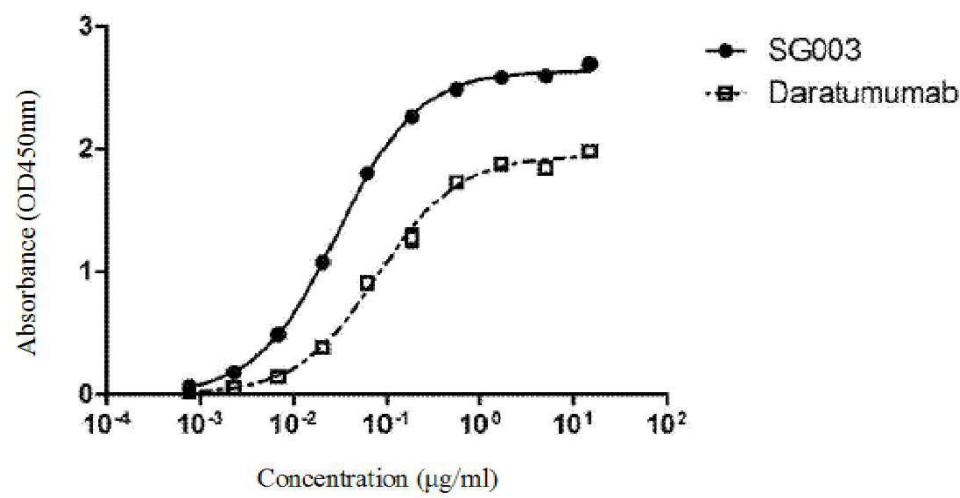
전술한 상세한 설명은 설명 및 예시로서 제공되며, 첨부된 청구범위의 범위를 제한하려는 의도가 아니다. 본 명세서에 열거된 실시예의 많은 변형은 당업자에게 자명하며, 첨부된 청구범위 및 그 균등물의 범위 내에 있다.

도면

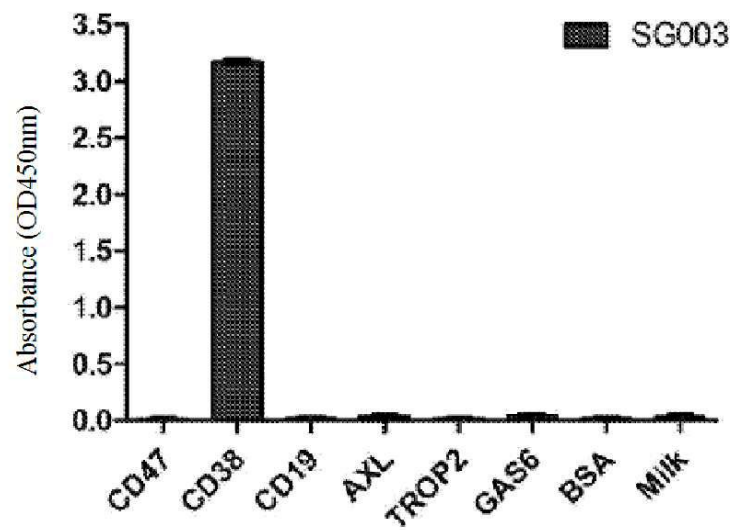
도면1



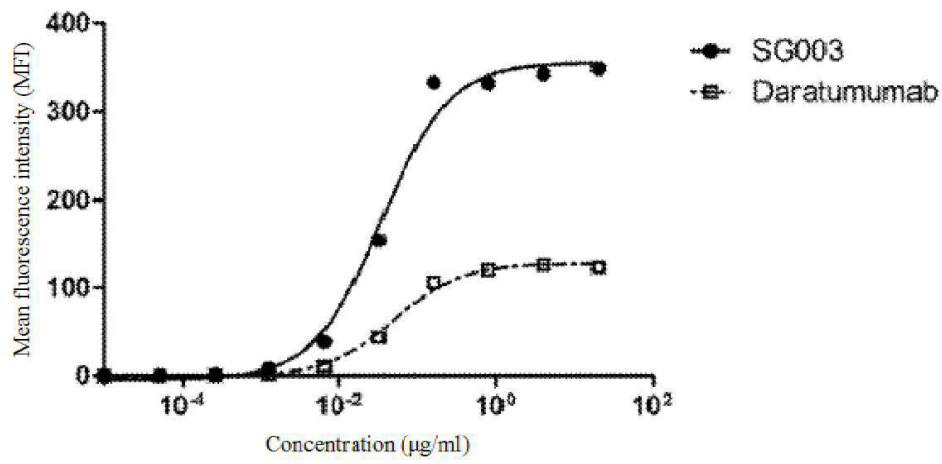
도면2



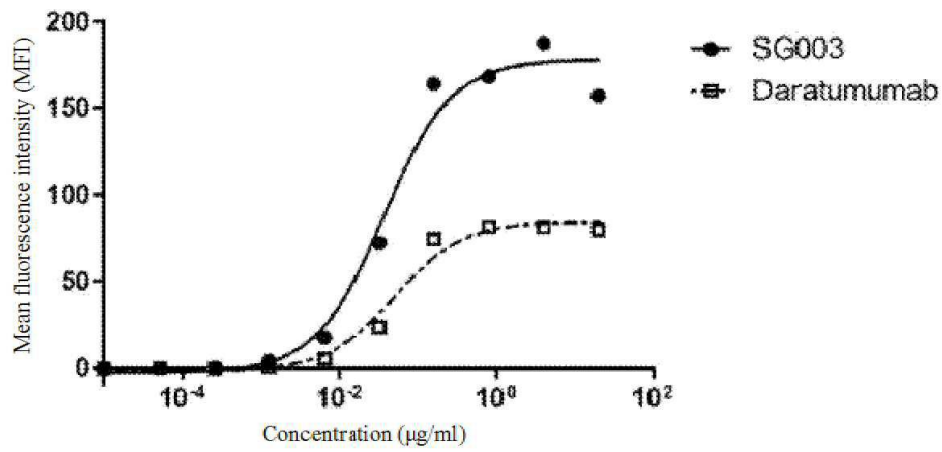
도면3



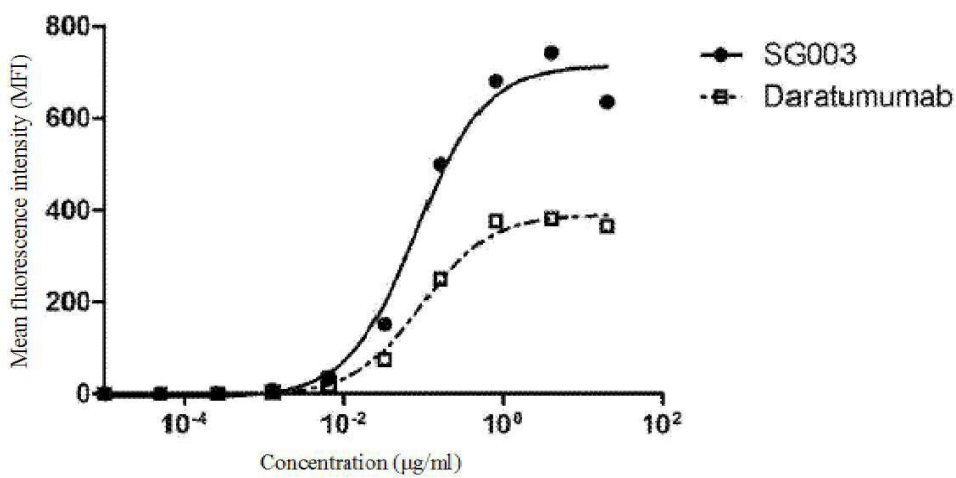
도면4a



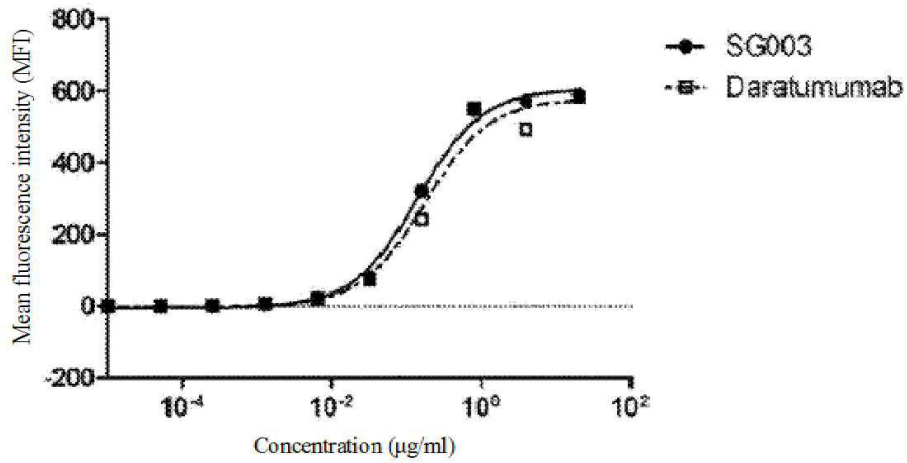
도면4b



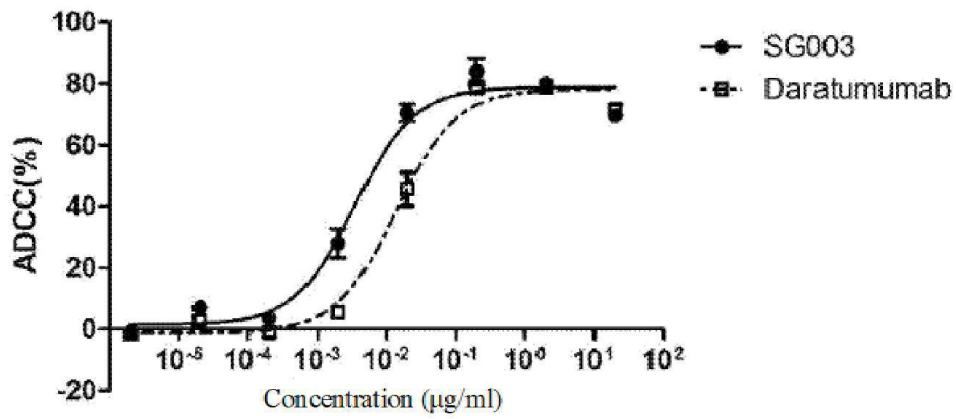
도면4c



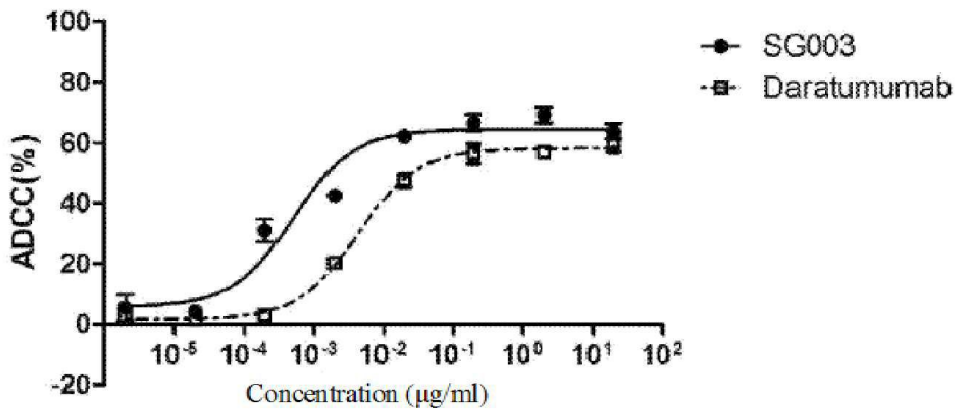
도면4d



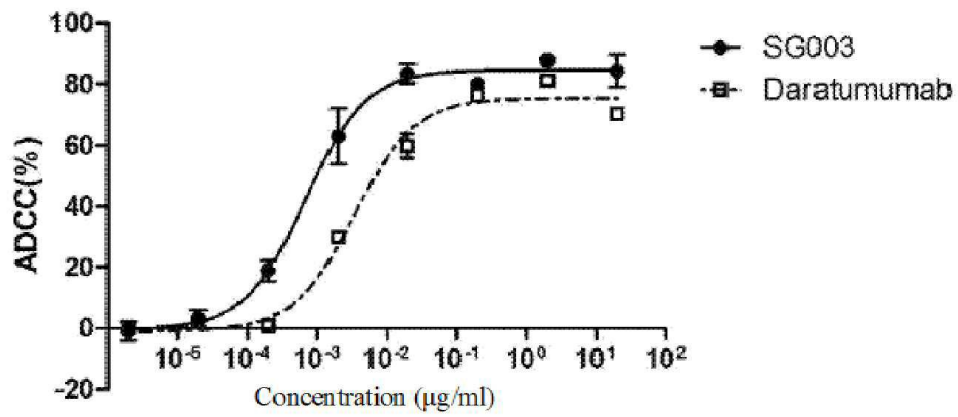
도면5a



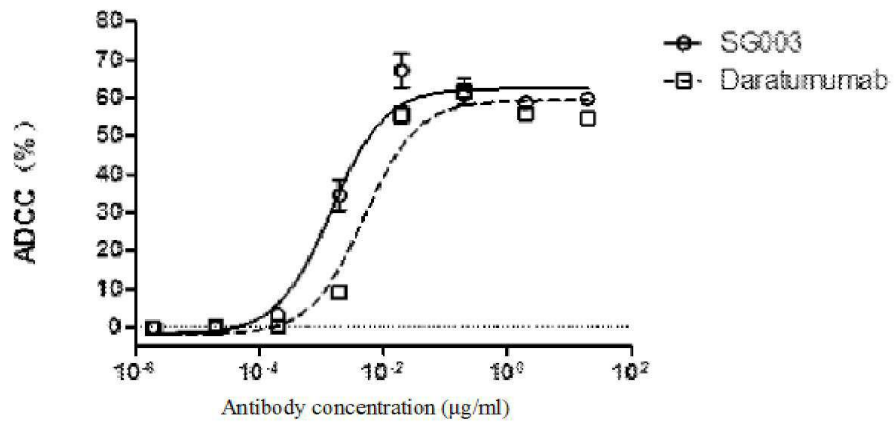
도면5b



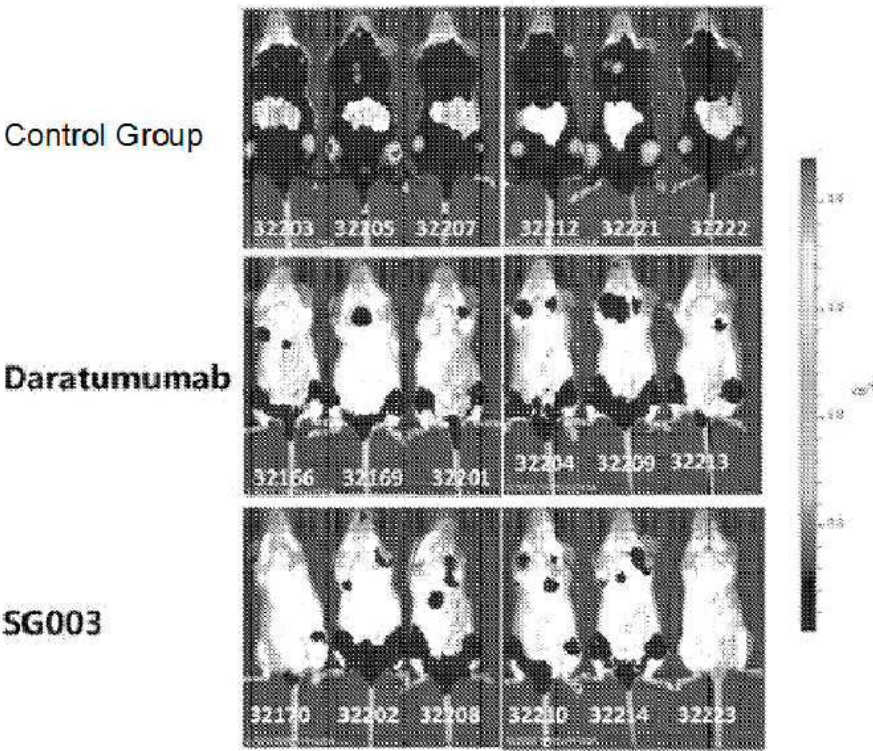
도면5c



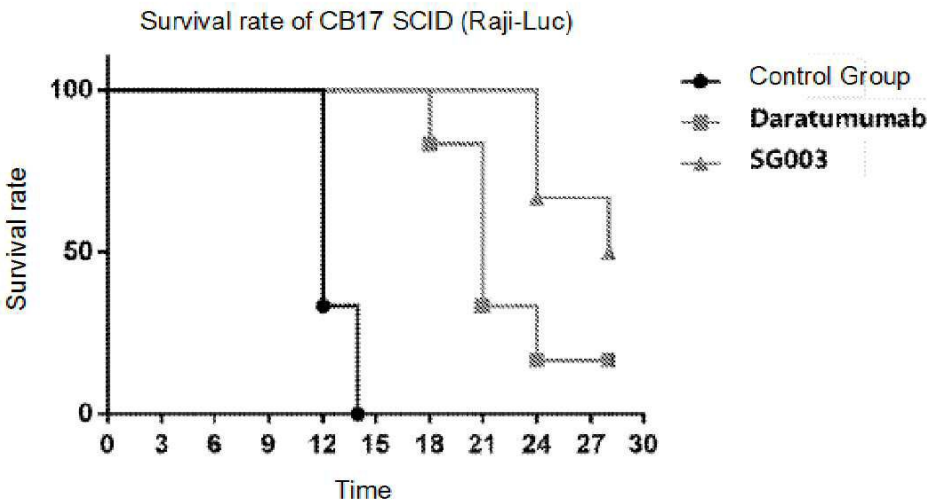
도면5d



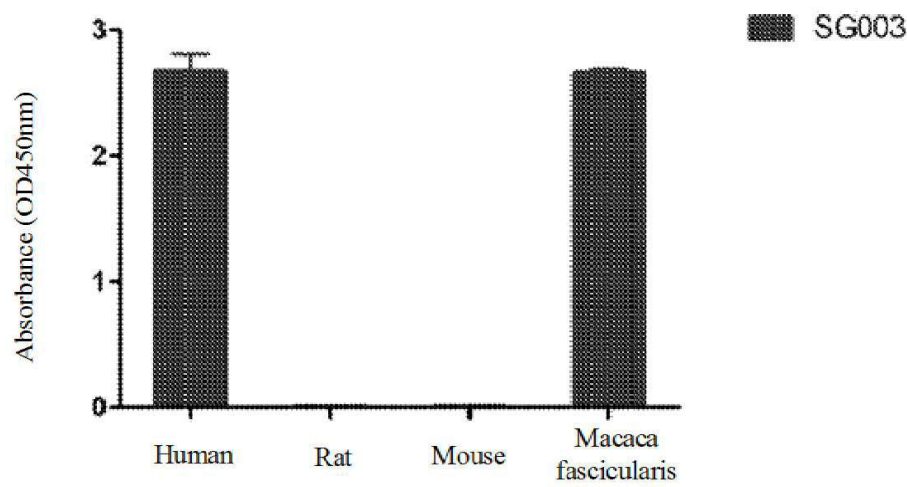
도면6



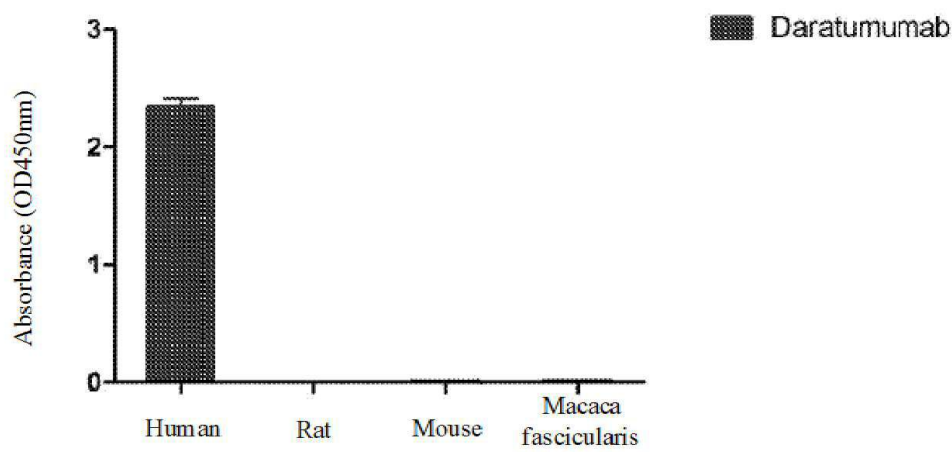
도면7



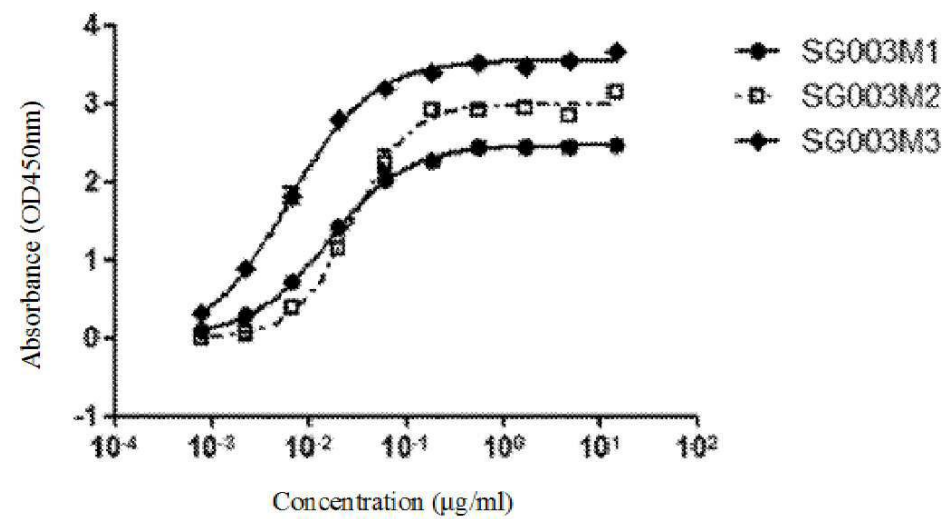
도면8a



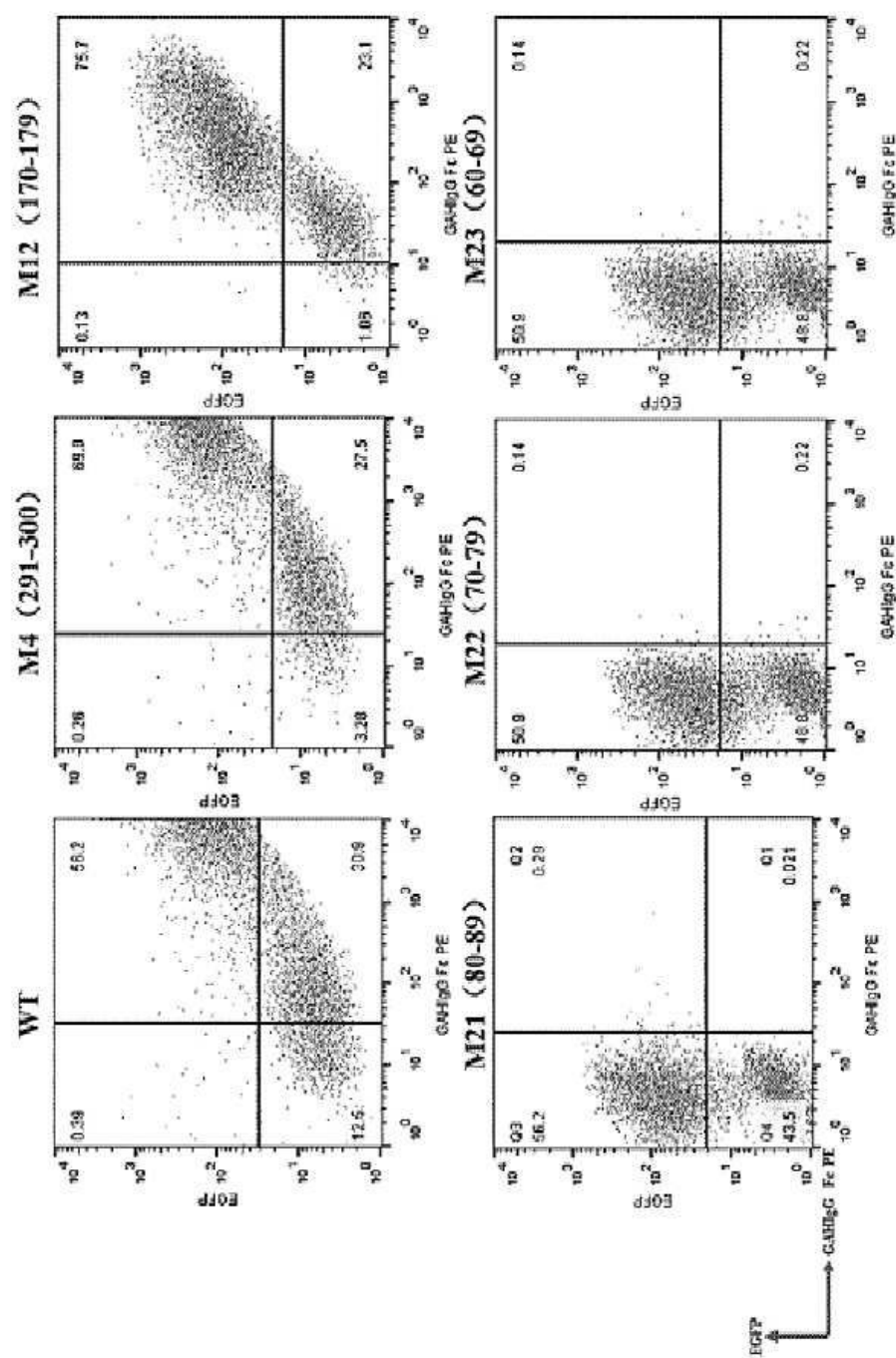
도면8b



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> HANGZHOU SUMGEN BIOTECH CO., LTD.; SUMGEN MAB (BEIJING) BIOTECH CO., LTD.
- <120> CD38 PROTEIN ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF
- <130> 0070-PA-008KR
- <160> 23
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LCDR1
 <400> 1
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Ala Phe Ser Tyr Val His
 1 5 10 15

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2
 <400> 2
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3
 <400> 3
 His His Ser Arg Glu Leu Pro Phe Thr
 1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR1
 <400> 4
 Leu Tyr Trp Met Asn
 1 5

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR2

<400> 5

Lys Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HCDR3

<400> 6

Leu Trp Ile Ala Thr Gly Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL

<400> 7

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Ala Phe Ser Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Ser Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Arg

85 90 95
 Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH

<400> 8

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Leu Tyr
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Lys Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Lys Phe Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Trp Ile Ala Thr Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon optimized VL nucleotide

<400> 9

gagatcgtga tgaccagag ccctgccagc ctgagcgcca gcctgggcca gagggccacc 60
 atcagctgca gggccagcag cagcgtgagc agcagcgcc ttagctacgt gcaactgtac 120

cagcagaaga gcggccagcc tcctaagctg ctgatctacc tggccagcaa cctggagagc 180

ggcgtgcctg ccaggttcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatccac 240

cctgtggaga gcgaggacgt ggccacctac tactgccacc acagcagga getgccttc 300

accttcggca gcggcaccaa gctggagatc aag 333

<210> 10

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon optimized VH nucleotide

<400> 10

caggtgcagc tgctggagag cggcggcggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgaagctg 60

agctgcgtgg ccagcggtt cgacttcagc ctgtactgga tgaactgggt gaggcaggcc 120

cctggcaagg gcctggagtg gatcggaag atcaacctg acagcagcac catcaactac 180

accctagcc tgaaggacaa gttcttcac agcagggaca acgccaagaa caccctgtac 240

ctgcagatga ccaaggtgag gagcgaggac accgccctgt actactgcgc caggctgtgg 300

atgccaccg gcggcttcga ctactggggc cagggcacca ccctgaccgt gagcagc 357

<210> 11

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SG003 light chain

<400> 11

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Ala Phe Ser Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Ser Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Arg

85 90 95
 Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 12

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SG003 light chain nucleotide

<400> 12

gagatcgtga tgaccacagag ccctgccagc ctgagcgcca gcctgggcca gagggccacc 60
 atcagctgca gggccagcag cagcgtgagc agcagcgct tcagctacgt gcactggtac 120
 cagcagaaga gcggccagcc tcctaagctg ctgatctacc tggccagcaa cctggagagc 180
 ggcgctgcctg ccaggttcag cggcagcggc agcggcaccg acttcaccct gaccatccac 240
 cctgtggaga gcgaggacgt ggccacctac tactgccacc acagcaggga gctgcctttc 300
 accttcggca gcggcaccaa gctggagatc aagcgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 360
 atcttccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 540
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 600
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttag 657

<210> 13

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SG003 heavy chain

<400> 13

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1	5	10	15
Ser	Leu	Lys	Leu
Ser	Cys	Val	Ala
Ser	Gly	Phe	Asp
Phe	Ser	Leu	Tyr
20	25	30	
Trp	Met	Asn	Trp
Val	Arg	Gln	Ala
Pro	Gly	Lys	Gly
Leu	Glu	Trp	Ile
35	40	45	
Gly	Lys	Ile	Asn
Pro	Asp	Ser	Ser
Thr	Ile	Asn	Tyr
Thr	Pro	Ser	Leu
50	55	60	
Lys	Asp	Lys	Phe
Phe	Ile	Ser	Arg
Asp	Asn	Ala	Lys
Asn	Thr	Leu	Tyr

65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Thr
Lys	Val	Arg	Ser
Glu	Asp	Thr	Ala
Leu	Tyr	Tyr	Cys
85	90	95	
Ala	Arg	Leu	Trp
Ile	Ala	Thr	Gly
Gly	Phe	Asp	Tyr
Trp	Gly	Gln	Gly
100	105	110	
Thr	Thr	Leu	Thr
Val	Ser	Ser	Ala
Ser	Thr	Lys	Gly
Pro	Ser	Val	Phe
115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro
Ser	Ser	Lys	Ser
Thr	Ser	Gly	Gly
Thr	Ala	Ala	Leu

130	135	140
Gly	Cys	Leu
Val	Lys	Asp
Tyr	Phe	Pro
Glu	Pro	Val
Thr	Val	Ser
Trp		
145	150	155
Asn	Ser	Gly
Ala	Leu	Thr
Ser	Gly	Val
His	Thr	Phe
Pro	Ala	Val
Leu		
165	170	175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445
Lys		
<210> 14		
<211> 1350		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> SG003 heavy chain nucleotide		
<400> 14		
caggtgcagc tgctggagag cggcggcggc ctggtgcagc ctggcggcag cctgaagctg	60	
agctgcgtgg ccagcggctt cgacttcagc ctgtactgga tgaactgggt gaggcaggcc	120	
cctggcaagg gcctggagtg gatcggcaag atcaacctg acagcagcac catcaactac	180	
acccttagcc tgaaggacaa gttcttcac agcagggaca acgccaagaa caccctgtac	240	
ctgcagatga ccaaggtgag gagcaggac accgccctgt actactgcgc caggctgtgg	300	
atgccaccg gcggcttcga ctactggggc cagggcacca ccctgaccgt gagcagcgt	360	
agcaccaagg gcccacgtgt cttccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc	420	
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480	
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga	540	
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600	
atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa	660	
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720	
tcagtcttcc ttttcccccc aaacccaag gacacctca tgatctccg gaccttgag	780	
gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccccg aggtcaagtt caactggtac	840	
gtggacggcg tggaggtgca taatccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900	
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960	
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa	1020	
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccg ggatgagctg	1080	
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggt tctatcccag cgacatgcc	1140	
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag acaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1200	

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1350

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Pro Glu Thr Val Leu Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro

1 5 10 15

Glu Met Arg His Val Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe

20 25 30

<210> 16

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated light chain 1

<400> 16

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Asn Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Ala Tyr Ser Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Ile Gln Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Ser Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Arg

85 90 95

Gln Leu Pro Ser Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 17

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated heavy chain 1

<400> 17

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ser Leu Tyr
20 25 30
Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Lys Ile Gln Pro Glu Ser Ser Thr Ile Gln Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Asp Lys Phe Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Met Thr Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Trp Ile Gly Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 18
 <211> 218
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Mutated light chain 2
 <400> 18

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ala Tyr Ser Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asp Leu Gln Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ser Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Arg

85 90 95
 Glu Leu Pro Tyr Ser Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215
 <210> 19
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mutated heavy chain 2
 <400> 19

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Leu Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Lys Ile Ser Pro Asn Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ser Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Lys Phe Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

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

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 20

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated light chain 3

<400> 20

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

	50							55							60						
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	His						
65				70				75				80									
Pro	Val	Glu	Ser	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	His	Ser	Arg						
				85					90					95							
Glu	Val	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg						
			100					105					110								
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln						
		115					120					125									

Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
130				135				140							
Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
145				150				155				160			
Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
				165				170				175			
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
180				185				190							

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 21

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated heavy chain 3

<400> 21

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Leu Tyr

20 25 30

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

275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445
 Lys

<210> 22

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain formula

<220><221> X20

<222> (20)..(20)

<223> X20=T or S

<220><221

> X27

<222> (27)..(27)
 <223> X27=S or N
 <220><221> X31
 <222> (31)..(31)
 <223> X31=S or T
 <220><221> X34
 <222> (34)..(34)
 <223> X34=F or Y
 <220><221> X57
 <222> (57)..(57)
 <223> X57=N or D
 <220><221> X58
 <222> (58)..(58)
 <223> X58=L or I
 <220><221> X59
 <222> (59)..(59)
 <223> X59=E or Q
 <220><221> X97
 <222> (97)..(97)
 <223> X97=E or Q
 <220><221> X98
 <222> (98)..(98)
 <223> X98=L or V
 <220><221> X100
 <222> (100)..(100)
 <223> X100=F or S

<220><221> X101
 <222> (101)..(101)
 <223> X101=T or S
 <400> 22

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Xaa Ile Ser Cys Arg Ala Ser Xaa Ser Val Ser Xaa Ser
 20 25 30

Ala Xaa Ser Tyr Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Xaa Xaa Xaa Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Ser Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys His His Ser Arg
85 90 95
Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 23
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Heavy chain formula
<220><221> X27
<222> (27)..(27)
<223> X27=F or Y

<220><221> X28

<222> (28)..(28)

<223> X28=D or N

<220><221> X33

<222> (33)..(33)

<223> X33=W or Y

<220><221> X52

<222> (52)..(52)

<223> X52=N, Q or S

<220><221> X54

<222> (54)..(54)

<223> X54=D, E or N

<220><221> X57

<222> (57)..(57)

<223> 57=T or S

<220><221> X58

<222> (58)..(58)

<223> X58=I or L

<220><221> X59

<222> (59)..(59)

<223> X59=N or Q

<220><221> X61

<222> (61)..(61)

<223> X61=T or S

<220><221> X64

<222> (64)..(64)

<223> X64=L or V

<220><221> X100

<222> (100)..(100)

<223> X100=W or Y

<220><221> X102

<222> (102)..(102)

<223> X102=A or G

<220><221> X103

<222> (103)..(103)

<223> X103=T or S

<220><221> X106

<222> (106)..(106)

<223> X106=F or Y

<220><221> X107

<222> (107)..(107)

<223> X107=D or N

<400> 2

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Xaa Xaa Phe Ser Leu Tyr

20 25 30

Xaa Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Lys Ile Xaa Pro Xaa Ser Ser Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Pro Ser Xaa

50 55 60

Lys Asp Lys Phe Phe Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Xaa Ile Xaa Xaa Gly Gly Xaa Xaa Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

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

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

	420		425		430	
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
			Gln	Lys	Ser	Leu
					Ser	Leu
					Ser	Pro
						Gly
	435		440		445	
Lys						