



공개특허 10-2024-0150522



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0150522
(43) 공개일자 2024년10월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7032639(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2016년06월24일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2018-7001612
원출원일자(국제) 2016년06월24일
심사청구일자 2021년06월23일
- (85) 번역문제출일자 2024년09월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/039165
- (87) 국제공개번호 WO 2016/210223
국제공개일자 2016년12월29일
- (30) 우선권주장
62/184,018 2015년06월24일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
아센 바이오테크 인코포레이티드
미국 펜실베이니아주 19044 호샴 럿지뷰 드라이브
800/850
- (72) 발명자
아흐마디 타햄탄
미국 19477 펜실베이니아주 스프링 하우스 매킨
로드 1400
카스네우프 티네케
네덜란드 1081 에이치브이 암스테르담 드 벨레란
1117 룸 피케이.엑스. 076 브이유 유니버시티 매
디칼 센터 디파트먼트 오브 헤마톨로지
(뒷면에 계속)

- (74) 대리인
특허법인한성

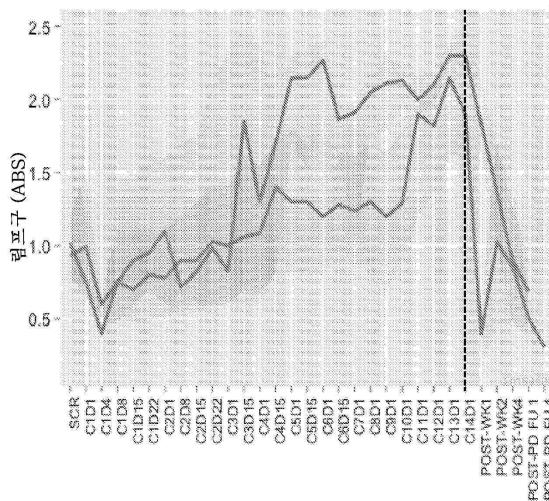
전체 청구항 수 : 총 32 항

- (54) 발명의 명칭 CD38과 특이적으로 결합하는 항체에 의한 고형 종양의 면역 조절 및 치료

(57) 요약

본 발명은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체에 의해 고형 종양을 갖는 환자를 면역 조절 및 치료하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/54 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)

(72) 발명자

로크포어스트 헨크 엠.

네덜란드 1081 에이치브이 암스테르담 드 벨레란
 1117 룸 피케이.엑스. 076 브이유 유니버시티 메디
 칼 센터 디파트먼트 오브 헤마톨로지

무티스 투나

네덜란드 1081 에이치브이 암스테르담 드 벨레란
 1117 룸 피케이.엑스. 076 브이유 유니버시티 메디
 칼 센터 디파트먼트 오브 헤마톨로지

새서 에이미

미국 18901 웨슬베이니아주 도일스타운 유니온 스
 트리트 119

(30) 우선권주장

62/249,546	2015년11월02일	미국(US)
62/250,566	2015년11월04일	미국(US)
62/263,307	2015년12월04일	미국(US)
62/331,489	2016년05월04일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

면역 억제 세포의 활성을 억제하기 위한 약제로서,
CD38에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하고, 상기 항체는 IgG1 동종형이며,

상기 항체는 다음을 포함하는 약제:

- 각각 서열번호 6, 7 및 8의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2, HCDR3, 및
- 각각 서열번호 9, 10 및 11의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2, LCDR3.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체가 암을 갖는 환자의 면역 억제 세포의 활성을 억제하는 것인, 약제.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 암은 고형 종양인, 약제.

청구항 4

제3항에 있어서, 고형 종양이 흑색종, 폐암, 편평 비소세포 폐암(NSCLC), 비편평 NSCLC, 결직장암, 전립선암, 거세-저항성(castration-resistant) 전립선암, 위암(stomach cancer), 난소암, 위암(gastric cancer), 간암, 췌장암, 갑상선암, 두경부의 편평 세포 암종, 식도 또는 위장관의 암종, 유방암, 나팔관암, 뇌암, 요도암, 비뇨생식기암, 자궁내막증, 자궁경부암 또는 상기 암의 전이성 병변인, 약제.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 면역 억제 세포는 조절성 T 세포(Treg)인, 약제.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 Treg는 $CD3^+ CD4^+ CD25^+ CD127^{\text{dim}}$ T 세포인, 약제.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 Treg는 CD38을 발현하는, 약제.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 Treg 기능은 상기 Treg의 사멸에 의해 억제되는, 약제.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 Treg의 사멸은 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC)에 의해 매개되는, 약제.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 면역 억제 세포는 골수계-유래 억제 세포(MDSC)인, 약제.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 MDSC는 $CD11b^+ HLADR^- CD14^- CD33^+ CD15^+$ 세포인, 약제.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 $CD11b^+HLADR^-CD14^-CD33^+CD15^+$ 세포는 CD38을 발현하는, 약제.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 MDSC 기능은 상기 MDSC의 사멸에 의해 억제되는, 약제.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 MDSC의 사멸은 ADCC에 의해 매개되는, 약제.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 면역 억제 세포는 조절성 B 세포(Breg)인, 약제.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 Breg는 $CD19^+CD24^+CD38^+$ 세포인, 약제.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 Breg 기능은 상기 Breg의 사멸에 의해 억제되는, 약제.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 Breg의 사멸은 ADCC에 의해 매개되는, 약제.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 면역 억제 세포는 골수 또는 말초 혈액 중에 존재하는, 약제.

청구항 20

환자의 면역 반응을 항상시키기 위한 약제로서, CD38에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하고, 상기 항체는 IgG1 동종형이며,

상기 항체는 다음을 포함하는 것인 약제:

- a) 각각 서열번호 6, 7 및 8의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2, HCDR3, 및
- b) 각각 서열번호 9, 10 및 11의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2, LCDR3.

청구항 21

제20항에 있어서, 환자가 암을 갖는, 약제.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 암은 고형 종양인, 약제.

청구항 23

제22항에 있어서, 고형 종양이 흑색종, 폐암, 편평 비소세포 폐암(NSCLC), 비편평 NSCLC, 결직장암, 전립선암, 거세-저항성(castration-resistant) 전립선암, 위암(stomach cancer), 난소암, 위암(gastric cancer), 간암, 췌장암, 갑상선암, 두경부의 편평 세포 암종, 식도 또는 위장관의 암종, 유방암, 나팔관암, 뇌암, 요도암, 비뇨생식기암, 자궁내막증, 자궁경부암 또는 상기 암의 전이성 병변인, 약제.

청구항 24

제20항에 있어서, 상기 CD38에 특이적으로 결합하는 항체는 면역 억제 세포의 기능을 억제하는, 약제.

청구항 25

제20항에 있어서, 상기 면역 반응은 이펙터 T 세포(Teff) 반응인, 약제.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 Teff 반응은 CD4⁺ T 세포 또는 CD8⁺ T 세포에 의해 매개되는, 약제.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 Teff 반응은 상기 CD8⁺ T 세포에 의해 매개되는, 약제.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 Teff 반응은 상기 CD8⁺ T 세포의 수의 증가, 증가된 CD8⁺ T 세포 증식, 증가된 T 세포 클론 증폭, 증가된 CD8⁺ 기억 세포 형성, 증가된 항원-의존성 항체 생성, 증가된 사이토카인 생성, 증가된 케모 카인 생성 또는 증가된 인터류킨 생성인, 약제.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열 번호 5의 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는, 약제.

청구항 30

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 서열 번호 12의 중쇄 및 서열 번호 13의 경쇄를 포함하는, 약제.

청구항 31

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 정맥 투여를 위해 제형화되는 것인, 약제.

청구항 32

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 히알루로니다제를 더 포함하고 피하 투여를 위해 제형화되는 것인, 약제.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체에 의한 고형 종양의 면역 조절 및 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

면역 시스템은 동시자극성(costimulatory) 및 동시억제성(co-inhibitory) 리간드 및 수용체의 네트워크에 의해 엄격하게 제어된다. 이러한 분자들은 T 세포 활성화를 위하여 2차 신호를 제공하고, 자신에 대한 면역을 제한하면서 감염 및 종양에 대한 면역 반응을 최대화하도록 양의 신호 및 음의 신호의 균형잡힌 네트워크를 제공한다(문헌[Wang et al., (Epub Mar. 7, 2011) *J Exp Med* 208(3):577-92]; 문헌[Lepenies et al., (2008) *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8:279-288]).

[0003]

T 세포에서 동시억제성 경로를 표적화하여 항종양 면역 반응을 촉진시키는, 고형 종양을 치료하기 위한 면역 관문 요법(immune checkpoint therapy)은 항-CTLA-4 및 항-PD-1 항체 YERVOY®(이필리무맙), KEYTRUDA®(펨브롤리주맙) 및 OPDIVO®(니볼루맙)의 승인으로 암 환자의 임상 케어에서 진보되어 왔다. 항-PD-1/PD-L1 항체가 다수의 고형 종양을 갖는 환자에서 임상 반응을 촉진시키는 것으로 입증되어 있지만, 반응률은 여전히 매우 낮아서, 사전치료된 환자에서 약 15% 내지 20%이다(문헌[Swaika et al., (2015) *Mol Immunol* doi: 10.1016/j.molimm.2015.02.009]).

[0004]

천연 살해 세포(NK), 수지상 세포(DC) 및 이펙터 T 세포가 강력한 항종양 반응을 구동시킬 수 있지만, 종양 세포는 종종 면역억제 미세환경을 유도하여, 골수계-유래 억제 세포(MDSC), 조절성 T-세포(Treg) 또는 조절성 B-세포(Breg)와 같은 면역 세포의 면역억제 집단의 발생을 유리하게 하며, 이는 종양 면역 관용 및 암 환자 및 실

험 종양 모델에서의 면역요법 계획(immunotherapy regimen)의 실패에 기여한다.

[0005] 따라서, 종양에 대해 적응 면역 반응을 유도하거나 면역억제 면역 세포를 표적화하는 새로운 암 면역요법의 개발에 대한 필요성이 남아 있다.

발명의 내용

[0006] 본 방법은 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0007] 본 방법은 또한 조절성 T-세포(Treg) 매개 질병을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 조절성 T-세포(Treg) 매개 질병의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0008] 본 방법은 또한 골수계-유래 억제 세포(MDSC) 매개 질병을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 골수계-유래 억제 세포(MDSC) 매개 질병의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0009] 본 방법은 또한 조절성 B-세포(Breg) 매개 질병을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 조절성 B-세포(Breg) 매개 질병의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0010] 본 발명은 또한 조절성 T-세포(Treg)의 활성을 억제하는 방법을 제공하며, 본 방법은 Treg를 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0011] 본 발명은 또한 골수계-유래 억제 세포(MDSC)의 활성을 억제하는 방법을 제공하며, 본 방법은 MDSC를 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0012] 본 발명은 또한 조절성 B-세포(Breg)의 활성을 억제하는 방법을 제공하며, 본 방법은 Breg를 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0013] 본 발명은 또한 환자에서 면역 반응을 향상시키는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0014] 본 방법은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 환자에게 투여함으로써 환자에서 Treg 세포의 수를 감소시키는 단계를 포함한다.

[0015] 본 방법은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 환자에게 투여함으로써 환자에서 골수계-유래 억제 세포(MDSC)의 수를 감소시키는 단계를 포함한다.

[0016] 본 발명은 또한 면역 억제 세포의 활성을 억제하는 방법을 제공하며, 본 방법은 면역 억제 세포를 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0017] 본 방법은 또한 바이러스성 감염을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 바이러스성 감염의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 림프구의 중위값이 시간 경과에 따라 8 mg/kg(위쪽 선) 또는 16 mg/kg(아래쪽 선) 용량의 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 반응하는 환자에서 증가되었고, 림프구 수가 치료 종료 후에 기저선으로 복귀되었음을 나타낸다. 연구: SIRIUS. X-축은 치료 사이클 및 각각의 치료 사이클에서의 투여의 일수로서 표현된 시간을 나타낸다(C1D1: 사이클 1, 일수 1; C1D4; 사이클 1, 일수 4 등). SCR: 기저선; EOT: 치료 종료; WK: 주수; POST-WK: 지시된 주수에서의 치료후; post-PD FU: 진행 후 추적. 회색 음영으로 강조된 영역들은 반응자들의 각각의 방문에 대하여 데이터 포인트들에 대한 25 내지 27% 사분 범위(Interquartile Range)(IQR)를 나타낸다.

도 2는 DARZALEX™(다라투무맙)로 치료된 환자들에서 각각의 개별 환자에 대한 말초 혈액 중의 CD3⁺ T 세포의 기저선에 대한 절대 카운트의 퍼센트(%) 변화(담회색 선들)를 나타낸다. 연구: SIRIUS (MMY2002). X-축은 치료 사이클 및 각각의 치료 사이클에서의 투여의 일수로서 표현된 시간을 나타낸다(C1D1: 사이클 1, 일수 1; C1D4; 사이클 1, 일수 4 등). WK: 주수; POST-WK: 지시된 주수에서의 치료후; POST-PD FU: 진행 후 추적. 흑

색 선은 모든 환자들에 대한 중위 % 변화를 나타낸다.

도 3은 DARZALEX™(다라투무맙)로 치료된 환자들에서 각각의 개별 환자에 대한 말초 혈액 중의 CD4⁺ T 세포의 기저선에 대한 절대 카운트의 퍼센트(%) 변화(담회색 선들)를 나타낸다. 연구: SIRIUS. X-축은 치료 사이클 및 각각의 치료 사이클에서의 투여의 일수로서 표현된 시간을 나타낸다(C1D1: 사이클 1, 일수 1; C1D4: 사이클 1, 일수 4 등). WK: 주수; POST-TMT: 치료후. 회색 선은 모든 환자들에 대한 중위 % 변화를 나타낸다.

도 4는 DARZALEX™(다라투무맙)로 치료된 환자들에서 각각의 개별 환자에 대한 말초 혈액 중의 CD8⁺ T 세포의 기저선에 대한 절대 카운트의 퍼센트(%) 변화(담회색 선들)를 나타낸다. 연구: SIRIUS. X-축은 치료 사이클 및 각각의 치료 사이클에서의 투여의 일수로서 표현된 시간을 나타낸다(C1D1: 사이클 1, 일수 1; C1D4: 사이클 1, 일수 4 등). WK: 주수; Pre-PD FU: 진행 전 추적. Post-PD FU: 진행 후 추적. 회색 선은 모든 환자들에 대한 중위 % 변화를 나타낸다.

도 5는 골수 흡인물 중의 (림프구 수의 백분율로서 측정된) CD45⁺CD3⁺ 세포의 수가 용량 8 mg/kg 또는 16 mg/kg에서 시간 경과에 따라 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 동안 증가되었음을 나타낸다. 이 그래프는 표시된 바와 같이 반응자들 및 무반응자들 둘 모두를 포함한다. 연구: SIRIUS. X-축은 치료 사이클 및 각각의 치료 사이클에서의 투여의 일수로서 표현된 시간을 나타낸다(C2D22: 사이클 2, 일수 22 등). SCR: 기저선; Post-PD FU1: 진행 후 추적. 회색 음영으로 강조된 영역들은, 각각 8 mg/kg으로 투여된 무반응자들, 16 mg/kg으로 투여된 반응자들, 또는 16 mg/kg으로 투여된 무반응자들의 각각의 방문에 대하여 데이터 포인터들에 대한 25 내지 27% 사분 범위(IQR)를 나타낸다. NR: 무반응자; R: 반응자.

도 6은 골수 흡인물 중의 (림프구 수의 백분율로서 측정된) CD45⁺CD3⁺CD8⁺ 세포의 수가 용량 8 mg/kg 또는 16 mg/kg에서 시간 경과에 따라 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 동안 증가되었음을 나타낸다. 이 그래프는 표시된 바와 같이 반응자들 및 무반응자들 둘 모두를 포함한다. 연구: SIRIUS. X-축은 치료 사이클 및 각각의 치료 사이클에서의 투여의 일수로서 표현된 시간을 나타낸다(C2D22: 사이클 2, 일수 22 등). SCR: 기저선; Post-PD FU1: 진행 후 추적. 회색 음영으로 강조된 영역들은, 각각 8 mg/kg으로 투여된 무반응자들, 16 mg/kg으로 투여된 반응자들, 또는 16 mg/kg으로 투여된 무반응자들의 각각의 방문에 대하여 데이터 포인터들에 대한 25 내지 27% 사분 범위(IQR)를 나타낸다. NR: 무반응자; R: 반응자.

도 7a는 모든 치료된 환자들의 중위값으로서 표현되는 말초 혈액 중의 CD8⁺/Treg 및 CD8⁺/CD4⁺ 세포의 비가 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 동안 시간 경과에 따라 증가하였음을 나타낸다. 시점: C1D1: 사이클 1 일수 1; C3D1: 사이클 3 일수 1; C4D1: 사이클 4 일수 1. 연구: SIRIUS. SRC: 기저선.

도 7b는 모든 치료된 환자들의 중위값으로서 표현되는 골수 흡인물 중의 CD8⁺/Treg 세포의 비가 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 동안 시간 경과에 따라 증가하였음을 나타낸다. 시점: C1D1: 사이클 1 일수; C3D1: 사이클 3 일수 1; C4D1: 사이클 4 일수 1. 연구: SIRIUS.

도 8a는, 특정 클론 세포들의 % 풍부도 변화(change in abundance)(CIA)를 사용하여 측정될 때, 반응자들이 무반응자들에 비하여 증가된 CD8⁺ T-세포 클론성을 가졌음을 나타낸다. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 8b는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 전 vs. 치료 후의 개별 환자들에서의 CD8⁺ T-세포 클론성의 배수 변화를 나타낸다. 반응자들은 별 모양으로 표시되어 있다. 클론성은 특정 클론 세포들의 배수 풍부도 변화(CIA)로서 측정하였다. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 8c는, CIA(풍부도 변화)를 사용하여 측정될 때, 반응자들(그룹 A)은 무반응자들(그룹 B)에 비하여 TCR 래퍼토리에 있어서 더 큰 총 증폭을 가졌음을 나타낸다. P=0.037. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 8d는 각각의 증폭된 T 세포 클론에 대한 반응자들 및 무반응자들에서의 절대 풍부도 변화(CIA)의 합계를 나타낸다. P=0.035: 반응자들(그룹 A)과 무반응자들(그룹 B) 사이. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 8e는 반응자들(그룹 A) 및 무반응자들(그룹 B)에서의 단일 T-세포 클론의 최대 CIA를 나타낸다. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 8f는, 최대 % CIA를 사용하여 측정될 때, 반응자들(그룹 A)은 무반응자들(그룹 B)에 비하여 단일 클론의 더 큰 최대 증폭을 가졌음을 나타낸다. P=0.0477. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 9a는 DARZALEX™(다라투무맙)에 대한 무반응자들(NR, 흑색 정사각형들) 및 적어도 최소한의 반응을 갖는 환자들(MR, 백색 정사각형들)에서 기저선에서의, 또는 2주째, 4주째 또는 8주째의 치료에서의, 또는 재발 후의 말초 혈액 중의 CD8⁺ 나이브(*naïve*) 세포의 백분율(%)을 나타낸다. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.
**p=1.82 × 10⁻⁴.

도 9b는 DARZALEX™(다라투무맙)에 대한 무반응자들(NR, 흑색 정사각형들) 및 적어도 최소한의 반응을 갖는 환자들(MR, 백색 정사각형들)에서 기저선에서의, 또는 2주째, 4주째 또는 8주째의 치료에서의, 또는 재발 후의 말초 혈액 중의 CD8⁺ 중추 기억 세포(Tem)의 백분율(%)을 나타낸다. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.
*p=4.88x10⁻².

도 9c는 기저선에서의, 또는 치료 주수 1, 4 또는 8에서의, 또는 재발 후의 말초 혈액 중의 HLA 클래스 I 제한 CD8⁺ T 세포의 백분율 증가를 나타낸다. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 9d는 기저선에서 또는 치료 중에 CD38이 말초 혈액 중의 CD8⁺ 나이브 T 세포 및 CD8⁺ 중추 기억 세포(Tem)에서 낮은 수준으로 발현됨을 나타낸다. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트. MFI: 평균 형광 세기.

도 10a는 다발성 골수종 환자들에서 기저선에서의 CD3⁺ CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} Treg의 빈도(상단 히스토그램, P4 세포 집단) 및 그 Treg 집단 내의 CD38⁺ Treg의 빈도(하단 히스토그램, P5 세포 집단)를 나타내는 FACS 분석의 히스토그램을 나타낸다. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 10b는 다발성 골수종 환자들에서 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 후의 CD3⁺ CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} Treg의 빈도(상단 히스토그램, P4 세포 집단) 및 그 Treg 집단 내의 CD38⁺ Treg의 빈도(하단 히스토그램, P5 세포 집단)를 나타내는 FACS 분석의 히스토그램을 나타낸다. DARZALEX™(다라투무맙) 치료는 CD38⁺ Treg를 고갈시켰다. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 10c는 DARZALEX™(다라투무맙)로 치료된 환자들에서 기저선에서의, 또는 1주째, 4주째, 8주째, 재발 후의 또는 6개월째의 치료 종료(EOT) 시점에서의 CD38^{high} CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} Treg의 빈도를 나타낸다. CD38^{high} Treg 빈도가 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 의해 감소되었고 EOT에서 기전선으로 복귀되었다. Y-축: CD3⁺ T-세포로부터의 CD38^{high} CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} Treg의 %. 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 10d는 반응자들 및 무반응자들에서 기저선에서의, 치료 1주째, 4주째 및 8주째에서의 CD8⁺/Treg 세포 비를 나타낸다. CD8⁺/Treg 세포 비는 치료 주수 8에서 무반응자들 대비 반응자들에서 유의하게 더 높았다 (p=0.00955). 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 10e는 이펙터 세포 증식이 CD38⁻ Treg 또는 음성 대조군에 비하여 CD38⁺ Treg의 존재 하에서 더 효율적으로 억제됨을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차를 나타낸다. 별표(*)는 유의한 변화를 나타낸다. 다수의 건강한 공여자들로부터 샘플을 얻었다. 카르복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE)의 희석을 통해 세포 증식을 평가하였다.

도 11은 골수계-유래 억제 세포(MDSC)들이 다수의 골수종 환자들에 존재하고(상단 그래프, 박스로 표시된 세포들), 이를 세포의 약 절반이 CD38을 발현하였음(중간 그래프, 박스로 표시된 세포들)을 나타낸다. CD38high MDSC 집단은 DARZALEX™(다라투무맙)의 1회 주입으로 치료된 환자에서 고갈되었다(하단 그래프, 박스로 표시된 세포들). 연구: GEN501 17명 환자 하위세트.

도 12는 CD38high MDSC(CD11b⁺HLADR⁻CD14⁻CD33⁺CD15⁺)의 수가 기저선에 비하여 DARZALEX™(다라투무맙)로 1주, 4주 또는 8주 치료 후의 환자들에서 감소되고 치료 종료(EOT) 후 기저선 가까이 복귀되었음을 나타낸다. 재발된 환자들은 여전히 감소된 CD38high MDSC를 보여주었다. 흑색 정사각형들: 무반응자들; 백색 정사각형들: DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 대해 적어도 최소한의 반응을 갖는 환자들. 수직선은 각각의 그룹에서의 중위 값을 나타낸다. 환자 2, 4, 15, 16 및 17은 높은 초기 CD38high MDSC 집단을 보여주었다. 연구: GEN501 17명

환자 하위세트.

도 13은 최고의 CD38high MDSC를 갖는 환자들(환자 2, 4, 15, 16 및 17)이 최고의 무진행 생존율(PFS)을 가졌음을 나타낸다. 이들 환자는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 대해 부분 반응(PR) 또는 최소한의 반응(MR)을 가졌다. SD : 안정된 질병; PD : 진행성 질병. X-축은 각각의 개별 넘버링된 환자에 대한 PFS를 나타낸다.

도 14는 MDSC가 DARZALEX™(다라투무맙)-유도 ADCC에 대해 감수성임을 나타낸다. 다우디(Daudi) 세포를 이 검정에서의 표적 세포에 대한 양성 대조군으로서 사용하였다. % 세포 용해율을 측정하였다.

도 15a는 CD38⁺ Breg가 DARZALEX™(다라투무맙)로 치료된 환자들에서 치료 주수 1, 주수 4 및 주수 8에서 고갈되었음을 나타낸다.

도 15b는 CD38⁺ Breg가 자극 시에 IL-10을 분비함을 나타낸다.

도 16a는 VGPR을 갖는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료된 환자로부터의 PBMC에서 기저선에서의 그리고 치료 동안 표시된 시점들에서의 CMV, EBV 및 인플루엔자 바이러스 특이적(CEF) IFN-γ 생성을 통해 측정된 항-바이러스 반응을 나타낸다. OD: 광학 밀도. 백색 막대: 음성 대조군; 흑색 막대: CEF 첨가; 파선 막대: 동종이계 PBMC 단독. 별표(*)는 통계학적으로 유의한 변화를 나타낸다. Pre 4, 8, 10 = 치료 주수 4, 8 또는 10.

도 16b는 CR을 갖는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료된 환자로부터의 PBMC에서 기저선에서의 그리고 치료 동안 표시된 시점들에서의 CMV, EBV 및 인플루엔자 바이러스 특이적(CEF) IFN-γ 생성을 통해 측정된 항-바이러스 반응을 나타낸다. OD: 광학 밀도. 백색 막대: 음성 대조군; 흑색 막대: CEF 첨가; 파선 막대: 동종이계 PBMC 단독. 별표(*)는 통계학적으로 유의한 변화를 나타낸다. Pre 4, 8, 10 = 치료 주수 4, 8 또는 10.

도 16c는 PD를 갖는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료된 환자로부터의 PBMC에서 기저선에서의 그리고 치료 동안 표시된 시점들에서의 CMV, EBV 및 인플루엔자 바이러스 특이적(CEF) IFN-γ 생성을 통해 측정된 항-바이러스 반응을 나타낸다. OD: 광학 밀도. 백색 막대: 음성 대조군; 흑색 막대: CEF 첨가; 파선 막대: 동종이계 PBMC 단독. ns: 유의하지 않음. Pre 4, 8 = 치료 주수 4 또는 8.

도 16d는 MR을 갖는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료된 환자로부터의 PBMC에서 기저선에서의 그리고 치료 동안 표시된 시점들에서의 CMV, EBV 및 인플루엔자 바이러스 특이적(CEF) IFN-γ 생성을 통해 측정된 항-바이러스 반응을 나타낸다. OD: 광학 밀도. 백색 막대: 음성 대조군; 흑색 막대: CEF 첨가; 파선 막대: 동종이계 PBMC 단독. ns: 유의하지 않음. Pre 4, 8 = 치료 주수 4 또는 8.

도 16e는 VGPR을 갖는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료된 환자로부터의 기저선에서의 그리고 치료 동안 표시된 시점들에서의 PBMC 중의 증식성 바이러스-반응성 T 세포의 백분율(%)을 나타낸다. 백색 막대: 음성 대조군; 흑색 막대: CEF 첨가. 별표(*)는 통계학적으로 유의한 변화를 나타낸다. Pre 4, 8, 10 = 치료 주수 4, 8 또는 10.

도 16f는 CR을 갖는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료된 환자로부터의 기저선에서의 그리고 치료 동안 표시된 시점들에서의 PBMC 중의 증식성 바이러스-반응성 T 세포의 백분율(%)을 나타낸다. 백색 막대: 음성 대조군; 흑색 막대: CEF 첨가. 별표(*)는 통계학적으로 유의한 변화를 나타낸다. Pre 4, 8, 10 = 치료 주수 4, 8 또는 10.

도 17a는 건강한 공여자로부터의 천연 살해 세포(NK), 단핵구, B 세포 및 T 세포 상에서의 CD38 발현 수준을 나타내는 FACS 분석의 히스토그램을 나타낸다.

도 17b는 다발성 골수종 환자로부터의 형질 세포, 천연 살해 세포(NK), 단핵구, B 세포 및 T 세포 상에서의 CD38 발현 수준을 나타내는 FACS 분석의 히스토그램을 나타낸다.

도 17c는 재발성 및 불응성 다발성 골수종 환자들로부터의 CD38+ Treg, Breg, NK, B 세포 및 T 세포 중의 CD38의 평균 형광 세기(MFI)의 비교를 나타낸다. CD38은 CD38+ Treg, Breg 및 NK 세포에 비하여 B 세포 및 T 세포에서 더 낮은 수준으로 발현되었다.

도 18은 PD-L1 단백질이 시간 경과에 따라 반응자들(R)로부터의 PBMC 샘플에서는 하향조절되고, 무반응자들(NR)에서는 상향조절됨을 나타낸다. SD: 안정된 질병. C1D1: 사이클 1 일수 1; C3D1, 사이클 3, 일수 1. Y-축은 log2 단백질 농도 값을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 문맥이 명확하게 달리

지시하지 않으면, 복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "세포"에 대한 언급은 2개 이상의 세포의 조합 등을 포함한다.

[0020] "CD38"은 인간 CD38 단백질(동의어: ADP-리보실 사이클라제 1, cADPr 하이드롤라제 1, 고리형 ADP-리보스 하이드롤라제 1)을 지칭한다. 인간 CD38은 GenBank 수탁 번호 NP_001766에 그리고 서열 번호 1에 나타낸 아미노산 서열을 갖는다. CD38은 사이토졸 도메인을 나타내는 아미노산 잔기 1-21, 막관통 도메인을 나타내는 아미노산 잔기 22-42, 및 CD38의 세포외 도메인을 나타내는 잔기 43-300을 갖는 단회 통과 II형 막 단백질인 것으로 잘 알려져 있다.

[0021] 서열 번호 1

```
MANCEFSPVSGDKPCCRRLSRRQLCLGVSILVLILVVVLAVVVPRWRQQWSPGT
TKRFPETVLARCVKYTEIHPPEMRHVDCQSVDKAFISKHPCNITEEDYQPLM
KLGTQTVPCKNILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTWCGEFN
TSKINYQSCPDRWKDCSNNPVSFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDK
NSTFGSVEVHNQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIQFSC
KNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI
```

[0022]

[0023] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "항체"는 광의를 의미하며, 뮤린, 인간, 인간화 및 키메라 단일클론 항체를 포함한 단일클론 항체, 항체 단편, 이중특이성 또는 다중특이성 항체, 이량체성, 사량체성, 또는 다량체성 항체, 단일쇄 항체, 도메인 항체를 포함하는 면역글로불린 분자, 및 필요한 특이성의 항원 결합 부위를 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성을 포함한다.

[0024] 면역글로불린은 중쇄 불변 도메인 아미노산 서열에 따라, 5개의 주요 분류, 즉 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 정해질 수 있다. IgA 및 IgG는 동종형(isotype) IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 추가로 하위-분류된다. 임의의 척추동물 종의 항체 경쇄는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 명확하게 별개의 2개의 유형, 즉 카파(κ) 및 람다(λ) 중 하나로 정해질 수 있다.

[0025] "항체 단편"은 중쇄 및/또는 경쇄 항원 결합 부위, 예컨대 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR) 1, 2 및 3, 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR) 1, 2 및 3, 중쇄 가변 영역(VH), 또는 경쇄 가변 영역(VL)을 보유하는 면역글로불린 분자의 일부분을 지칭한다. 항체 단편은 VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; 헌지(hinge) 영역에서 이황화물 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab)₂ 단편; VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; 항체의 단일 아암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; 도메인 항체(dAb) 단편(문헌[Ward *et al.*, Nature 341:544-6, 1989]) - 이는 VH 도메인으로 이루어짐 - 을 포함한다. VH 및 VL 도메인은 조작되고(engineered) 합성 링커를 통해 함께 연결되어 다양한 유형의 단일쇄 항체 설계를 형성할 수 있으며, 여기서 VH/VL 도메인은 VH 및 VL 도메인이 별도의 단일쇄 항체 작제물에 의해 발현되는 경우에 분자내에서, 또는 분자간에 쌍을 이루어서 1가 항원 결합 부위, 예컨대 단일쇄 Fv(scFv) 또는 이중항체(diabody)를 형성하며, 이는, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 WO1998/44001호, WO1998/01649호, WO1994/13804호, 및 WO1992/01047호에 기재되어 있다. 이들 항체 단편은 당업자에게 잘 알려진 기법을 사용하여 얻어지며, 이들 단편은 전장(full length) 항체와 동일한 방식으로 유용성을 위해 스크리닝된다.

[0026] "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체들이 실질적으로 없는 항체 또는 항체 단편을 지칭한다 (예를 들어, CD38과 특이적으로 결합하는 단리된 항체에는 인간 CD38 이외의 항원과 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 그러나, CD38과 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 항원들, 예컨대 인간 CD38의 오르토상동체(orthologue), 예컨대 마카카 파시큘라리스(*Macaca fascicularis*)(사이노몰거스(*cynomolgus*)) CD38과의 교차-반응성을 가질 수 있다. 이중특이성 항체의 경우에, 이중특이성 항체는 2개의 관심 항원과 특이적으로 결합하고, 2개의 관심 항원 이외의 항원과 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다. 게다가, 단리된 항체에는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. "단리된 항체"는 더 높은 순도로 단리된 항체, 예컨대 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 순도인 항체를 포함한다.

[0027] "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다" 또는 "결합한다"는 항체가 항원 또는 항원 내의 에피토프(epitope)에 대해 다른 항원들에 대한 친화성보다 더 큰 친화성으로 결합하는 것을 지칭한다. 전형적으로, 항체는 약

1×10^{-8} M 이하, 예를 들어 약 1×10^{-9} M 이하, 약 1×10^{-10} M 이하, 약 1×10^{-11} M 이하, 또는 약 1×10^{-12} M 이하의 평형 해리 상수(K_D)로 항원 또는 항원 내의 에피토프에 결합하며, 이때 전형적으로 K_D 는 비특이적 항원(예를 들어, BSA, 카세인)에 결합하기 위한 그의 K_D 보다 적어도 100배 더 적다. 해리 상수는 표준 절차를 사용하여 측정될 수 있다. 그러나, 항원 또는 항원 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체는 다른 관련 항원들과의, 예를 들어 다른 종(상동체), 예컨대 인간 또는 원숭이, 예를 들어 마카카 파시콜라리스(사이노몰거스, 사이노(cyno)), 판 트로글로디테스(*Pan troglodytes*)(침팬지, 침프(chimp)) 또는 칼리트릭스 자쿠스(*Callithrix jacchus*)(코먼 마모셋(common marmoset), 마모셋)로부터의 동일한 항원과의 교차-반응성을 가질 수 있다. 단일 특이성 항체는 하나의 항원 또는 하나의 에피토프와 특이적으로 결합하지만, 이중특이성 항체는 2개의 별개의 항원 또는 2개의 별개의 에피토프와 특이적으로 결합한다.

[0028] 항체 가변 영역은 3개의 "항원 결합 부위"가 개재된 "프레임워크" 영역으로 이루어진다. 항원 결합 부위는 하기의 다양한 용어를 사용하여 정의된다: 상보성 결정 영역(CDR)은 VH에 3개(HCDR1, HCDR2, HCDR3), 그리고 VL에 3개(LCDR1, LCDR2, LCDR3) 존재하며, 서열 가변성에 기초하고(문헌[Wu and Kabat (1970) *J Exp Med* 132:211-50]; 문헌[Kabat et al Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991]), "초가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는 VH에 3개(H1, H2, H3), 그리고 VL에 3개(L1, L2, L3) 존재하며, 초티아 및 레스크(Chothia and Lesk)에 의해 정의된 바와 같이 구조에서 초가변성인 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다(문헌[Chothia and Lesk (1987) *Mol Biol* 196:901-17]). 다른 용어는 "IMGT-CDR"(문헌[Lefranc et al., (2003) *Dev Comparat ImmunoI* 27:55-77]) 및 "특이성 결정 잔기 용법(Specificity Determining Residue Usage)"(SDRU)(문헌[Almagro (2004) *Mol Recognit* 17:132-43])을 포함한다. 인터내셔널 이뮤노진텍스(International ImMunoGeneTics)(IMGT) 데이터베이스(http://www_imgt_org)는 항원-결합 부위의 표준화된 넘버링과 정의를 제공한다. CDR, HV, 및 IMGT 도해 사이의 관련성은 문헌[Lefranc et al., (2003) *Dev Comparat ImmunoI* 27:55-77]에 기재되어 있다.

[0029] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "초티아 잔기"는 알-라지카니(Al-Lazikani)에 따라 넘버링된 항체 VL 및 VH 잔기이다(문헌[Al-Lazikani (Al-Lazikani et al., (1997) *J Mol Biol* 273:927-48)]).

[0030] "프레임워크" 또는 "프레임워크 서열"은 항원-결합 부위인 것으로 결정된 것 이외의 가변 영역의 나머지 서열이다. 항원 결합 부위가 전술된 바와 같은 다양한 용어에 의해 정의될 수 있기 때문에, 프레임워크의 정확한 아미노산 서열은 항원 결합 부위가 어떻게 정의되는지에 따라 달라진다.

[0031] "인간화 항체"는 항원 결합 부위가 인간 이외의 종으로부터 유래되고 가변 영역 프레임워크가 인간 면역글로불린 서열로부터 유래되는 항체를 지칭한다. 인간화 항체는 프레임워크 영역 내에 치환을 포함할 수 있으므로, 프레임워크는 발현된 인간 면역글로불린 또는 생식세포계열 유전자 서열의 정확한 카페가 아닐 수 있다.

[0032] "인간 항체"는 프레임워크 및 항원 결합 부위 둘 모두가 인간 기원의 서열로부터 유래되는, 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 이 항체가 불변 영역을 포함하는 경우, 불변 영역 또한 인간 기원의 서열로부터 유래된다.

[0033] 인간 항체는, 항체의 가변 영역이 인간 생식세포계열 면역글로불린 또는 재배열된 면역글로불린 유전자를 사용하는 시스템으로부터 얻어지는 경우, 인간 기원의 서열"로부터 유래되는" 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 그러한 시스템은, 과지 상에 디스플레이된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리, 및 인간 면역글로불린 유전자좌를 담지하는 유전자도입 인간 이외의 동물, 예컨대 마우스를 포함한다. "인간 항체"는 인간 생식세포계열 면역글로불린 또는 재배열된 면역글로불린 유전자와 비교할 때 아미노산 차이를 포함할 수 있는데, 이는, 예를 들어 천연 발생 체세포 돌연변이 또는 프레임워크 또는 항원 결합 부위 내의 치환의 의도적 도입, 또는 둘 모두에 기인한다. 전형적으로, 인간 항체는 인간 생식세포계열 면역글로불린 또는 재배열된 면역글로불린 유전자에 의해 인코딩된 아미노산 서열과 아미노산 서열이 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하다. 일부 경우에, "인간 항체"는, 예를 들어 문헌[Knappik et al., (2000) *J Mol Biol* 296:57-86]에 기재된 바와 같이 인간 프레임워크 서열 분석으로부터 유래되는 공통 프레임워크 서열을 함유하거나, 또는, 예를 들어 문헌[Shi et al., (2010) *J Mol Biol* 397:385-96] 및 국제 특허 출원 공개 WO2009/085462호에 기재된 바와 같이 과지 상에 디스플레이된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리 내로 도입된 합성 HCDR3을 함유할 수 있다.

[0034] 인간 면역글로불린 서열로부터 유래되는 인간 항체는, 합성 CDR 및/또는 합성 프레임워크를 도입시킨 과지 디스플레이와 같은 시스템을 사용하여 생성될 수 있거나, 또는 시험관내 돌연변이생성(*in vitro mutagenesis*)을 거

쳐서 항체 특성을 개선하여, 그 결과 생체내(*in vivo*)에서 인간 항체 생식세포계열 레퍼토리 내에는 천연적으로 존재하지 않는 항체를 생성할 수 있다.

[0035] 항원 결합 부위가 인간 이외의 종으로부터 유래되는 항체는 인간 항체의 정의에 포함되지 않는다.

[0036] "재조합 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 항체를 포함하는데, 이러한 항체는, 예컨대 인간 면역글로불린 유전자를 위해 유전자도입 또는 염색체도입된(transchromosomal) 동물, 예를 들어 마우스 또는 래트로부터 단리된 항체 또는 그로부터 제조된 하이브리도마(hybridoma)(하기에 추가로 기재됨), 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포로부터 단리된 항체, 재조합 조합 항체 라이브러리(recombinant combinatorial antibody library)로부터 단리된 항체, 및 다른 DNA 서열에 대해 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체, 또는 Fab 아암 교환을 사용하여 시험관내 생성되는 항체, 예컨대 이중특이성 항체이다.

[0037] "단일클론 항체"는 단일 분자 조성의 항체 분자의 조제물을 지칭한다. 단일클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타내거나, 또는 이중특이성 단일클론 항체의 경우에는, 2개의 별개의 에피토프에 대해 이중 결합 특이성을 나타낸다. 따라서, "단일클론 항체"는, 항체 중쇄로부터의 C-말단 라이신의 제거와 같은 가능한 잘 알려진 변경을 제외하고는, 각각의 중쇄 및 각각의 경쇄 내에 단일 아미노산 조성을 갖는 항체 집단을 지칭한다. 단일클론 항체는 항체 집단 내에 불균질한 글리코실화를 가질 수 있다. 단일클론 항체는 단일특이성 또는 다종특이성, 또는 1가, 2가 또는 다가일 수 있다. 이중특이성 항체가 용어 단일클론 항체 내에 포함된다.

[0038] "에피토프"는 항체가 특이적으로 결합하는 항원의 부분을 의미한다. 에피토프는 통상 아미노산 또는 다당류 측쇄와 같은 모이어티(moiety)의 화학적으로 활성(예컨대, 극성, 비극성 또는 소수성)인 표면 그룹화(grouping)로 이루어지며, 특이적인 3차원 구조 특징뿐만 아니라 특이적인 전하 특징을 가질 수 있다. 에피토프는 입체구조 공간 단위(conformational spatial unit)를 형성하는 연속 및/또는 비연속 아미노산으로 구성될 수 있다. 비연속 에피토프의 경우, 항원의 선형 서열의 상이한 부분으로부터의 아미노산이 단백질 분자의 접힘을 통해 3차원 공간에서 아주 근접하게 된다.

[0039] "변이체"는 하나 이상의 변형(modification), 예를 들어 치환, 삽입, 또는 결실에 의해 기준 폴리펩티드 또는 기준 폴리뉴클레오티드와 상이한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

[0040] "와 병용하여"는 둘 이상의 치료제가 대상체에게 혼합물 상태로 함께 투여되거나, 단제(single agent)로서 동시에 투여되거나, 또는 단제로서 임의의 순서로 순차적으로 투여됨을 의미한다. 일반적으로, 각각의 작용제는 그러한 작용제에 대해 결정된 용량으로 그리고/또는 시간 스케줄에 투여될 것이다.

[0041] "치료하다" 또는 "치료"는, 원치 않는 생리학적 변화 또는 질병, 예컨대 종양 또는 종양 세포의 발생 또는 확산을 문화(감퇴)시키거나, 치료 동안 유익하거나 원하는 임상 결과를 제공하는 것이 목적인 치료적 처리를 지칭한다. 유익하거나 원하는 임상 결과는, 검출가능하든 검출 불가능하든 어느 것이든 간에, 증상의 경감, 질병 정도의 저하, 안정화된(즉, 악화되지 않는) 질병 상태, 질병 진행의 지연 또는 감속, 전이의 부재, 질병 상태의 개선 또는 고식, 및 관해(remission)(부분 또는 전체 어느 것이든)를 포함한다. "치료"는 또한 대상체가 치료를 받지 않고 있을 경우에 예측되는 생존과 비교할 때 연장되는 생존을 의미할 수 있다. 치료를 필요로 하는 대상체는 원치 않는 생리학적 변화 또는 질병을 이미 갖는 대상체뿐만 아니라 생리학적 변화 또는 질병을 갖기 쉬운 대상체도 포함한다.

[0042] "치료적 유효량"은 필요한 투여량에서 그리고 필요한 시간 동안 원하는 치료 결과를 달성하는 데 유효한 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 개체의 질병 상태, 연령, 성별, 및 체중, 그리고 치료제 또는 치료제들의 병용물이 개체에서 원하는 반응을 유도하는 능력과 같은 인자들에 따라 변동될 수 있다. 유효한 치료제 또는 치료제들의 병용물의 예시적인 지표는, 예를 들어 환자의 개선된 웰빙(well-being), 종양 부하(tumor burden)의 감소, 종양의 정지성 또는 지연성 성장, 및/또는 체내의 다른 위치로의 암 세포의 전이의 부재를 포함한다.

[0043] (예를 들어, 종양 세포와 관련하여) "성장을 억제한다"는, 치료제, 또는 치료제 또는 약물의 병용물과 접촉될 때 시험관내 또는 생체내 종양 세포 또는 종양 조직의 성장에 있어서, 치료제 또는 치료 약물의 병용물의 부재 하에서의 동일한 종양 세포 또는 종양 조직의 성장의 감소 또는 지연과 대비할 때, 측정가능한 감소 또는 지연을 지칭한다. 시험관내 또는 생체내 종양 세포 또는 종양 조직의 성장의 억제는 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 또는 100%일 수 있다.

[0044] "조절성 T 세포" 또는 "Treg들" 또는 "Treg"는 다른 T 세포(들) 및/또는 다른 면역 세포의 활성을, 통상 그들의

활성을 억제함으로써 조절하는 T 림프구를 지칭한다. Treg는 $CD3^+ CD4^+ CD25^+ CD127^{\text{dim}}$ T 세포일 수 있다. Treg는 이러한 표현형으로 완전히 제한되지 않을 수 있고, Foxp3을 발현할 수 있음이 이해된다.

[0045] "이펙터 T 세포" 또는 "Teff들" 또는 "Teff"는 면역 반응의 기능, 예컨대 종양 세포의 사멸 및/또는 항종양 면역-반응의 활성화 - 이는 신체로부터의 종양 세포의 제거를 가져올 수 있음 - 를 수행하는 T 림프구를 지칭한다. Teff는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 를 갖는 $CD3^+$ 일 수 있다. Teff는 IFN- γ , 그랜자임(granzyme) B 및 ICOS와 같은 마커를 분비, 함유 또는 발현할 수 있다. Teff는 이들 표현형으로 완전히 제한되지 않을 수 있음이 이해된다.

[0046] "Treg의 기능" 또는 "Treg 기능"은 숙주 면역 반응의 조절 및/또는 자가면역의 예방과 관련된 Treg의 억제 기능을 지칭한다. Treg의 기능은 $CD8^+$ T 세포, 천연 살해(NK) 세포, Mφ 세포, B 세포, 또는 수지상 세포(DC)에 의해 유도된 항종양 반응의 억제, 또는 이펙터 T 세포의 증식의 억제일 수 있다.

[0047] "Treg의 기능을 억제한다" 또는 "Treg 기능을 억제한다"는 동물 또는 인간 대상체에서 시험관내 또는 생체내에서의 Treg의 기능의 수준을 감소시키는 것을 지칭하며, 이는 당업계에 알려진 종래의 기법에 의해 결정될 수 있다. Treg의 기능의 수준은, 예를 들어 적어도 약 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100%만큼 감소될 수 있다. "Treg의 기능을 억제한다"는, 예를 들어 항체 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 통해 Treg를 사멸함으로써 Treg의 수를 감소시키는 것을 포함한다.

[0048] "골수계-유래 억제 세포" 또는 "MDSC들" 또는 "MDSC"는, 조혈 계통(hematopoietic lineage)을 갖고 대식세포/단핵구 마커 CD11b 및 과립구 마커 Gr-1/Ly-6G를 발현하는 세포들의 특수화된 집단을 지칭한다. MDSC의 표현형은, 예를 들어 $CD11b^+ HLA-DR^- CD14^- CD33^+ CD15^+$ 일 수 있다. MDSC는 성숙 항원 제시 세포 마커 MHC 클래스 II 및 F480의 낮거나 검출 불가능한 발현을 나타낸다. MDSC는 골수계 계통의 미성숙 세포이고, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 단핵구 또는 과립구를 포함한 여러 세포 유형으로 추가로 분화될 수 있다. MDSC는 인간 및 동물의 정상적인 성체 골수에서 또는 정상적인 조혈 부위, 예컨대 비장에서 천연적으로 발견될 수 있다.

[0049] "MDSC의 기능을 억제한다" 또는 "MDSC 기능을 억제한다"는 동물 또는 인간 대상체에서 시험관내 또는 생체내에서의 MDSC의 기능의 수준을 감소시키는 것을 지칭하며, 이는 당업계에 알려진 종래의 기법에 의해 결정될 수 있다. MDSC의 기능의 수준은, 예를 들어 적어도 약 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100%만큼 감소될 수 있다. "MDSC의 기능을 억제한다"는, 예를 들어 항체 이펙터 기능, 예컨대 ADCC를 통해 MDSC를 사멸함으로써 MDSC의 수를 감소시키는 것을 포함한다. MDSC는 반응성 산소종, 페옥시아질 산염의 생성, 고수준의 아르기나제로 인한 증가된 아르기나제 대사, 및 증가된 아산화질소 신타제와 같은 다양한 기전에 의해 증식, 클론 증폭 또는 사이토카인 생성과 같은 T 세포 반응을 억제할 수 있다. MDSC는 IFN- γ 및 몇몇 사이토카인, 예컨대 IL-4 및 IL-13에 반응할 수 있다. IFN- γ 는 MDSC를 활성화할 수 있으며, 이는 산화질소 신타제 2(NOS2)의 활성을 유도한다. 대안적으로, Th2 사이토카인, 예컨대 인터류킨-4(IL-4) 및 IL-13이 MDSC를 활성화할 수 있으며, 이는 아르기나제-1(ARG1) 활성의 유도로 이어질 수 있다. NOS2 또는 ARG1에 의한 L-아르기닌의 대사는 T-세포 증식의 억제로 이어질 수 있고, 두 효소 모두가 함께 활성함으로써 반응성 질소-산화물 종의 생성을 통한 T-세포 아폽토시스를 가져올 수 있다.

[0050] "Treg 관련 질병"은 조절성 T 세포(Treg)에 연관된 질병 또는 장애를 지칭한다. Treg 관련 질병은 Treg 기능, 예를 들어 항-종양 반응의 억제 또는 이펙터 T 세포 증식의 억제에 의해 야기될 수 있다. Treg 매개 질병은 암일 수 있다. "Treg 관련 질병"과 "Treg 매개 질병"은 본 명세서에서 교환가능하게 사용된다.

[0051] "이펙터 T 세포의 반응을 향상시킨다" 또는 "T 세포 반응을 향상시킨다"는, 지속 또는 증폭된 생물학적 기능을 갖기 위한, 또는 소모된 또는 불활성인 T-세포를 재생 또는 재활성화하기 위한 동물 또는 인간 대상체에서 시험관내 또는 생체내에서의 이펙터 T 세포의 향상 또는 자극을 지칭한다. 예시적인 T-세포 반응은 증식, $CD8^+$ T-세포로부터의 γ -인터페론의 분비, 항원 반응성, 또는 클론 증폭이다. 이러한 향상을 측정하는 방식은 당업자에게 알려져 있다.

[0052] "MDSC 관련 질병"은 골수계-유래 억제 세포(MDSC)에 연관된 질병 또는 장애를 지칭한다. MDSC 관련 질병은 MDSC 기능, 예를 들어 항-종양 반응 또는 이펙터 T 세포 증식의 억제에 의해 야기될 수 있다. MDSC 매개 질병은 암일 수 있다. "MDSC 관련 질병"과 "MDSC 매개 질병"은 본 명세서에서 교환가능하게 사용된다.

[0053] "조절성 B 세포" 또는 "Breg" 또는 "Breg들"은 면역 반응을 억제하는 B 림프구를 지칭한다. Breg는

$CD19^+ CD24^+ CD38^+$ 세포일 수 있고, Breg에 의해 분비된 IL-10에 의해 매개된 T 세포 증식을 억제함으로써 면역 반응을 억제할 수 있다. 다른 Breg 하위세트가 존재하고, 예를 들어 문헌[Ding et al., (2015) *Human Immunology* 76: 615-621]에 기재되어 있음이 이해된다.

[0054] "Breg 관련 질병"은 조절성 B 세포에 연관된 질병 또는 장애를 지칭한다. Breg 관련 질병은, 예를 들어 항-종양 반응 또는 이펙터 T 세포 증식의 Breg 매개 억제에 의해 야기될 수 있다. Breg 매개 질병은 암일 수 있다. "Breg 관련 질병"과 "Breg 매개 질병"은 본 명세서에서 교환 가능하게 사용된다.

[0055] "환자"는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. "비인간 동물"은 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물 및 비포유동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 과충류 등을 포함한다. "환자" 및 "대상체"는 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용된다.

[0056] 본 발명은 종양 세포가 CD38을 발현하는지 아닌지의 여부와 관계없이 CD38과 특이적으로 결합하는 항체에 의해 고형 종양을 갖는 환자를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 조절성 T 세포(Treg), 골수계-유래 억제 세포(MDSC) 또는 조절성 B 세포(Breg) 매개 질병을 갖는 환자를 치료하기 위한 방법을 추가로 제공한다. 본 발명은 Treg, MDSC 또는 Breg 활성을 조절하여, CD38 양성이고/이거나 고수준의 이를 면역 억제 세포와 관련된 고형 종양을 치료하기 위한 방법을 추가로 제공한다.

[0057] 본 발명은, 항-CD38 항체 DARZALEX™(다라투무맙)가 환자들에서 면역조절 활성을 가져서, 면역 억제 Treg, MDSC 및 Breg의 수를 감소시키고, $CD8^+$ T 세포의 수 및 $CD8^+$ 대 Treg의 비를 증가시키고, $CD8^+$ 중추 기억 세포 형성을 촉진시키고, T 세포 클론성을 증가시킨다는 발견에 적어도 부분적으로 기초한다.

[0058] DARZALEX™(다라투무맙) 및 다른 항-CD38 항체는, 그들의 효능에 대하여 임상에서, 항체 이펙터 기능, 예컨대 ADCC, CDC, ACDP 및 아폽토시스에 의해 CD38-양성 세포를 제거하는 항체의 능력에 의해 다발성 골수종을 포함한 험 악성종양 및 형질 세포 장애를 치료하는 것으로 평가되고 있지만, 적응 면역 반응을 촉진하는 데 있어서의 그들의 면역조절 활성을 인식되어 있지 않다. 다른 면역 조절 항체(항-PD1, 항-CTLA4)는 항종양 반응을 억제하는 면역 시스템의 구성요소들을 표적화함으로써 기능한다. 예를 들어, 항-PD1 항체들은 T-세포 증식을 증가시키고, 항원-특이적 기억 반응을 자극하고, 시험관내에서 이펙터 T 세포의 Treg-매개 억제를 부분적으로 완화시키는 것으로 입증되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제8,779,105호 참조). 2개의 항-PD-1 항체, OPDIVO®(니볼루맙) 및 KEYTRUDA®(펨브롤리주맙)는 현재 흑색종의 치료에 대해 승인되어 있고, 이들 항체는 폐 비소세포암종, 전립선암, 두경부암, 위장암, 위암, 전립선암, 나팔관암, 난소암, 혀암, 유방암 및 뇌암, 신장암, 방광암, 요도암, 식도암 및 결직장암과 같은 다양한 고형 종양에 대해 임상 개발 중이다. 항-CTLA-4 항체 YERVOY®(이필리무맙)는 흑색종의 치료에 대해 승인되어 있다. YERVOY®(이필리무맙) 및 다른 항-CTLA-4 항체, 트레멜리무맙이 또한 전립선암, 비소세포 폐암, 난소암, 위장암, 위암, 결직장암, 신장암, 식도암, 및 비뇨생식기암을 위해 개발 중이다.

[0059] 어떠한 특정 이온에 의해 구애되고자 함이 없이, 본 명세서에 기재된 DARZALEX™(다라투무맙)에 대해 관찰된 면역조절 효과에 기초하여, DARZALEX™(다라투무맙) 및 다른 항-CD38 항체는 고형 종양의 치료에 효능이 있을 수 있다. DARZALEX™(다라투무맙)로 치료된 환자들에서 관찰된 면역 반응의 일반적인 활성화로 인해, CD38-음성 고형 종양을 갖는 환자들은 마찬가지로 항-CD38 항체 요법에 반응할 수 있다.

[0060] 본 발명은 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.

[0061] 본 발명은 또한 조절성 T 세포(Treg) 매개 질병을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 조절성 T 세포(Treg) 매개 질병의 치료를 필요로 하는 환자에게 Treg 매개 질병을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.

[0062] 본 발명은 또한 골수계-유래 억제 세포(MDSC) 매개 질병을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 골수계-유래 억제 세포(MDSC) 매개 질병의 치료를 필요로 하는 환자에게 MDSC 매개 질병을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.

[0063] 본 발명은 또한 조절성 B 세포(Breg) 매개 질병을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 조절성 B 세포(Breg) 매개 질병의 치료를 필요로 하는 환자에게 Breg 매개 질병을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.

- [0064] 본 발명은 또한 조절성 T-세포(Treg)의 활성을 억제하는 방법을 제공하며, 본 방법은 조절성 T 세포를 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0065] 본 발명은 또한 골수계-유래 억제 세포(MDSC)의 활성을 억제하는 방법을 제공하며, 본 방법은 MDSC를 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0066] 본 발명은 또한 조절성 B-세포(Breg)의 활성을 억제하는 방법을 제공하며, 본 방법은 Breg를 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0067] 본 방법은 또한 고령 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 환자에게 투여함으로써 환자에서 조절성 T 세포(Treg)의 수를 감소시키는 단계를 포함한다.
- [0068] 본 방법은 또한 고령 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 환자에게 투여함으로써 환자에서 골수계-유래 억제 세포(MDSC)의 수를 감소시키는 단계를 포함한다.
- [0069] 본 방법은 또한 고령 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 환자에게 투여함으로써 환자에서 조절성 B 세포(Breg)의 수를 감소시키는 단계를 포함한다.
- [0070] 본 발명은 또한 환자에서 면역 반응을 향상시키는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 면역 반응을 필요로 하는 환자에게 면역 반응을 향상시키기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- [0071] 일부 실시 형태에서, 환자는 바이러스성 감염을 갖는다.
- [0072] 본 발명은 또한 환자에서 바이러스성 감염을 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 바이러스성 감염의 치료를 필요로 하는 환자에게 바이러스성 감염을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- [0073] 일부 실시 형태에서, 면역 반응은 이펙터 T 세포(Teff) 반응이다.
- [0074] 일부 실시 형태에서, Teff 반응은 $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포에 의해 매개된다.
- [0075] 일부 실시 형태에서, Teff 반응은 $CD4^+$ T 세포에 의해 매개된다.
- [0076] 일부 실시 형태에서, Teff 반응은 $CD8^+$ T 세포에 의해 매개된다.
- [0077] 일부 실시 형태에서, Teff 반응은 $CD8^+$ T 세포의 수의 증가, 증가된 $CD8^+$ T 세포 증식, 증가된 T 세포 클론 증폭, 증가된 $CD8^+$ 기억 세포 형성, 증가된 항원-의존성 항체 생성, 또는 증가된 사이토카인, 케모카인 또는 인터류킨 생성이다.
- [0078] T 세포의 증식은, 예를 들어, 삼중수소화 티미딘을 사용하여 DNA 합성 속도를 측정함으로써 또는 시험관내에서의 인터페론- γ (IFN- γ)의 생성을 측정함으로써, 또는 알려진 방법을 사용하여 환자 샘플로부터의 세포들의 집단 내의 T 세포의 절대수 또는 절대 백분율을 측정함으로써 평가될 수 있다.
- [0079] 클론 증폭은, 예를 들어, 알려진 방법을 사용하여 T 세포들의 풀(pool)로부터 TCR을 서열분석함으로써 평가될 수 있다.
- [0080] 기억 세포 형성은, 예를 들어 FACS를 사용하여 나이브 T 세포($CD45RO^-/CD62L^+$) 대 기억 T 세포 ($CD45RO^+/CD62L^{high}$)의 비를 측정함으로써 평가될 수 있다.
- [0081] 사이토카인, 케모카인 또는 인터류킨 생성, 예컨대 인터페론- γ (IFN- γ), 종양 괴사 인자-알파(TNF- α), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 및 IL-23, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, CCL4의 생성은 ELISA 또는 ELLISPOT 검정과 같은 표준 방법을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0082] 항원-특이적 항체 생성은 ELISA 또는 방사면역검정(RIA)과 같은 표준 방법을 사용하여 환자로부터 유래된 샘플로부터 평가될 수 있다.
- [0083] 다양한 Teff 반응을 "증가시키다" 또는 "증가시키는"의 의미는 용이하게 이해된다. 증가는, 시험 샘플에서 또는 대상체에서 대조군과 대비하여, 예를 들어 항-CD38 항체로 치료된 환자에서 치료 전의 동일한 환자와 대비하

여, 또는 항-CD38 항체 치료에 대해 반응성인 환자 또는 환자들의 그룹에서 동일한 치료에 대해 무반응성인 환자 또는 환자들의 그룹과 대비하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 25%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400% 또는 그 이상의 증가일 수 있다. 전형적으로, 증가는 통계학적으로 유의하다.

[0084] 유사하게, Treg, MDSC 및/또는 Breg의 수를 "감소시키다" 또는 "감소시키는" 또는 "저하시키다"의 의미도 용이하게 이해된다. 감소는, 시험 샘플에서 또는 대상체에서 대조군과 대비하여, 예를 들어 항-CD38 항체로 치료된 환자에서 치료 전의 동일한 환자와 대비하여, 또는 항-CD38 항체 치료에 대해 반응성인 환자 또는 환자들의 그룹에서 동일한 치료에 대해 무반응성인 환자 또는 환자들의 그룹과 대비하여 적어도 10%, 25%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400% 또는 그 이상일 수 있다. 전형적으로, 감소는 통계학적으로 유의하다.

[0085] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 면역 억제 세포의 기능을 억제한다.

[0086] 일부 실시 형태에서, 면역 억제 세포는 조절성 T 세포(Treg), 콜수계-유래 억제 세포(MDSC) 또는 조절성 B 세포(Breg)이다.

[0087] 일부 실시 형태에서, Treg는 $CD3^+ CD4^+ CD25^+ CD127^{\text{dim}}$ T 세포이다.

[0088] 일부 실시 형태에서, $CD3^+ CD4^+ CD25^+ CD127^{\text{dim}}$ 세포는 Foxp3을 발현한다.

[0089] 일부 실시 형태에서, $CD3^+ CD4^+ CD25^+ CD127^{\text{dim}}$ T 세포는 CD38을 발현한다.

[0090] Treg 기능, 예컨대 Teff 세포를 억제하는 그의 능력은 알려진 방법을 사용하여 평가될 수 있는데, 예컨대 혼합 럼프구 반응(MLR)에서 Teff 증식을 억제하는 Treg의 능력을 평가함으로써 행해질 수 있다.

[0091] Treg 기능은, 예를 들어, Treg 또는 Treg의 하위-집단, 예컨대 $CD38^+$ Treg의 직접 사멸에 의해 Teff 수 대비 Treg의 상대수를 감소시킴으로써(예를 들어, $CD8^+$ /Treg 세포의 비를 증가시킴으로써) 억제될 수 있다.

[0092] 일부 실시 형태에서, Treg 기능은 Treg 세포를 사멸함으로써 억제된다.

[0093] 일부 실시 형태에서, Treg 사멸은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체에 의해 유도된 항체-유도 항체-의존성 세포 성 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP), 보체-의존성 세포독성(CDC) 또는 아폽토시스에 의해 매개된다.

[0094] 일부 실시 형태에서, Treg 사멸은 ADCC에 의해 매개된다.

[0095] 일부 실시 형태에서, $CD38^+$ Treg는 사멸된다.

[0096] 일부 실시 형태에서, Treg의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58% 또는 60%가 사멸된다.

[0097] CD38은 Treg 및 MDSC의 일부에서만 발현되기 때문에, 고령 종양을 갖는 환자들의 치료는 Treg 및 MDSC의 전신적 고갈을 가져오지 않을 것이며, 이에 따라 개선된 안전성 프로파일을 제공할 가능성이 높을 것으로 예측된다.

[0098] 일부 실시 형태에서, MDSC는 $CD11b^+ HLA-DR^- CD14^- CD33^+ CD15^+$ 세포이다.

[0099] 일부 실시 형태에서, $CD11b^+ HLA-DR^- CD14^- CD33^+ CD15^+$ MDSC는 CD38을 발현한다.

[0100] MDSC 기능은 예를 들어 MDSC 세포의 직접 사멸에 의해 MDSC의 수를 감소시킴으로써 억제될 수 있다.

[0101] 일부 실시 형태에서, MDSC 기능은 $CD38^+$ MDSC를 사멸함으로써 억제된다.

- [0102] 일부 실시 형태에서, MDSC 사멸은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체에 의해 유도된 항체-유도 항체-의존성 세포 성 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP), 보체-의존성 세포독성(CDC) 또는 아폽토시스에 의해 매개된다.
- [0103] 일부 실시 형태에서, MDSC 사멸은 ADCC에 의해 매개된다.
- [0104] 일부 실시 형태에서, MDSC의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58% 또는 60%가 사멸된다.
- [0105] 일부 실시 형태에서, Breg는 $CD19^+ CD24^+ CD38^+$ 세포이다.
- [0106] Breg 기능은 예를 들어 Breg 세포의 직접 사멸에 의해 Breg의 수를 감소시킴으로써 억제될 수 있다.
- [0107] 일부 실시 형태에서, Breg 기능은 $CD38^+$ Breg를 사멸함으로써 억제된다.
- [0108] 일부 실시 형태에서, Breg 사멸은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체에 의해 유도된 항체-유도 항체-의존성 세포 성 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP), 보체-의존성 세포독성(CDC) 또는 아폽토시스에 의해 매개된다.
- [0109] 일부 실시 형태에서, Breg 사멸은 ADCC에 의해 매개된다.
- [0110] 일부 실시 형태에서, Breg의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58% 또는 60%가 사멸된다.
- [0111] Treg는 말초 자기-관용의 유지에서 중대한 역할을 한다. 천연 발생 $CD4^+ CD25^{hi}$ Treg는 흉선에서 생성되고 Foxp3 을 발현하는데, Foxp3은 Treg 계통 정체의 확립 및 유지와 억제 기능에 필요한 전사 인자이다. Treg는 (예를 들어, 종양 내의) 질병 부위에 축적될 수 있는데, 여기서 이것은 종양 항원 특이적 T 세포의 이펙터 기능을 억제하여 불충분한 항종양 반응을 초래한다. 종양-침윤 Foxp3⁺ Treg의 증가된 밀도는 췌장, 난소, 및 간세포 암 종을 포함한 다양한 고형 종양에서 불량한 예후와 관련되어 왔다. Treg의 고갈은 뮤린 모델에서 향상된 항종양 면역 및 종양 거부를 가져오지만, 또한 자가면역 질병의 발생을 초래할 수 있다.
- [0112] 골수계-유래 억제 세포(MDSC)는 상이한 분화 단계에 있는 조기 골수계 선조체, 미성숙 과립구, 대식세포, 및 수지상 세포의 불균일한 집단이다. 이것은 대다수의 암 환자에서 축적되고, 이것은, 천연 살해 세포(NK) 및 천연 살해 T 세포(NKT)의 세포독성 활성, 및 $CD8^+$ T 세포에 의해 매개되는 적응 면역 반응 둘 모두를 억제하는 강력한 면역억제 기능을 갖는다. NK 세포 억제의 기전은 현재 잘 이해되어 있지 않지만, 아르기나제 1/ARG1의 생성 및 산화질소 신타제 2(NOS2)의 상향조절을 포함한 다수의 경로가 MDSC-매개 T 세포 억제를 담당하고 있다. ARG1 및 NOS2는 L-아르기닌을 대사하고, 함께 또는 개별적으로 T 세포 CD3zeta 쇄의 변역을 차단하고, T 세포 증식을 억제하고, T 세포 아폽토시스를 촉진시킨다. 추가적으로, MDSC는 면역억제 사이토카인을 분비하고, 조절성 T 세포 발생을 유도한다.
- [0113] MDSC는 전염증성 사이토카인에 의해 유도되고, 감염성 및 염증성 병리학적 조건에서 증가된 수가 발견된다. 이것은 종양-보유 마우스의 혈액, 골수, 및 2차 림프 기관에 축적되고, 종양 미세환경에서의 그의 존재는 종양-관련 면역 억제를 촉진시키는 데 있어서 원인이 되는 역할을 하는 것으로 제시되어 왔다.
- [0114] MDSC는 결장 암종, 흑색종, 간세포 암종, 두경부 편평 세포 암종, 비소세포 폐 암종, 신장 세포 암종, 췌장 선암종 및 유방 암종을 갖는 암 환자에서 기재되어 왔다(문헌[Mandruzzato et al., (2009) *J Immunol* 182: 6562-6568]; 문헌[Liu et al., (2009) *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 35-45]; 문헌[Ko et al., (2009) *Clin Cancer Res* 15: 2148-2157]; 문헌[Morse et al., (2009) *Expert Opin Biol Ther* 9: 331-339]; 문헌[Diaz-Montero et al., (2009) *Cancer Immunol Immunother* 58: 49-59]; 문헌[Corzo et al., (2009) *J Immunol* 182: 5693-5701]). 암 환자에서, Diaz et al(문헌[Diaz-Montero et al., (2009) *Cancer Immunol Immunother* 58: 49-59])은 MDSC의 축적이 더 많이 진행된 질병 및 불량한 예후와 상관된다고 제안한다.

- [0115] 종양-침윤 Breg는 고형 종양에서 확인되어 왔고, CD8⁺ T 세포 및 NK 세포의 항종양 활성을 억제하는 것과 같은 다양한 기전에 의해 Breg는 종양 성장 및 전이를 촉진시킬 수 있으며, 이는, 예를 들어 문헌[Ding *et al.*, (2015) *Human Immunology* 76:615-62]에 기재된 바와 같다.
- [0116] "항체-의존성 세포성 세포독성", "항체-의존성 세포-매개성 세포독성" 또는 "ADCC"는, 이팩터 세포 상에서 발현되는 Fc 감마 수용체(Fc γ R)를 통한, 항체-코팅된 표적 세포와 용해 활성을 갖는 이팩터 세포, 예컨대 자연 살해 세포, 단핵구, 대식세포 및 호중구의 상호작용에 의존하는 세포사를 유도하기 위한 기전이다. 예를 들어, NK 세포는 Fc γ RIIIa를 발현하며, 한편 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 FcγRIIIa를 발현한다. 항체-코팅된 표적 세포, 예컨대 CD38-발현 세포의 죽음은 막 세공-형성 단백질 및 프로테아제의 분비를 통한 이팩터 세포 활성의 결과로서 일어난다. CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 항체는 면역 이팩터 세포와 조합된 CD38-발현 세포에 침가될 수 있으며, 이는 항원 항체 복합체에 의해 활성화되어 표적 세포를 세포 용해시킬 수 있다. 일반적으로 세포용해는 용해된 세포로부터의 표지(예를 들어, 방사성 기질, 형광 염료 또는 천연 세포내 단백질)의 방출에 의해 탐지된다. 그러한 검정을 위한 예시적인 이팩터 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 NK 세포를 포함한다. 예시적인 표적 세포는 CD38을 발현하는 Treg 또는 MDSC를 포함한다. 예시적인 검정에서는, 표적 세포를 2시간 동안 20 μCi의 ⁵¹Cr로 표지하고 광범위하게 세척한다. 표적 세포의 세포 농도는 1×10^6 개 세포/ml로 조정될 수 있고, 다양한 농도의 항-CD38 항체가 침가된다. 표적 세포를 40:1의 이팩터:표적 세포 비로 침가함으로써 검정이 시작된다. 37°C에서 3시간 동안 인큐베이션 후에, 원심분리에 의해 검정을 정지하고, 용해된 세포로부터의 ⁵¹Cr 방출을 신틸레이션 카운터에서 측정한다. 세포성 세포독성의 백분율은 % 최대 용해율로 계산될 수 있는데, 용해는 3% 과염소산을 표적 세포에 침가함으로써 유도될 수 있다.
- [0117] "항체-의존성 세포 식세포작용"(ADCP)은 식세포, 예컨대 대식세포 또는 수지상 세포에 의한 내재화에 의한 항체-코팅된 표적 세포의 제거의 기전을 지칭한다. ADCP는 GFP 또는 다른 표지된 분자를 발현하도록 조작된 표적 세포로서 CD38을 발현하는 Treg 또는 MDSC를 사용함으로써 평가될 수 있다. 이팩터:표적 세포 비는, 예를 들어 4:1일 수 있다. 이팩터 세포는 항-CD38 항체와 함께 또는 이것 없이 4시간 동안 표적 세포와 인큐베이션될 수 있다. 인큐베이션 후에, 세포는 아큐타제를 사용하여 탈착될 수 있다. 대식세포는 형광 표지에 커플링된 항-CD11b 및 항-CD14 항체로 확인될 수 있으며, % 식세포작용은 표준 방법을 사용하여 CD11⁺CD14⁺ 대식세포에서의 % GFP 형광에 기초하여 결정될 수 있다.
- [0118] "보체-의존성 세포독성" 또는 "CDC"는, 표적-결합된 항체의 Fc 이팩터 도메인이 보체 성분 C1q에 결합하여 이를 활성화하고, 이는 다시 보체 캐스케이드를 활성화하여 표적 세포사를 초래하는 세포사 유도 기전을 지칭한다. 보체의 활성화는 또한 표적 세포 표면 상에의 보체 성분의 침착을 가져올 수 있는데, 이는 백혈구 상의 보체 수용체(예를 들어, CR3)에 결합함으로써 ADCC를 용이하게 한다.
- [0119] ADCC를 유도하는 단일클론 항체의 능력은 그의 올리고당 성분을 조작함으로써 향상될 수 있다. 인간 IgG1 또는 IgG3은 잘 알려진 바이안테나리(biantennary) G0, G0F, G1, G1F, G2 또는 G2F 형태의 글리칸의 대부분에 의해 Asn297에서 N-글리코실화된다. 비조작된 CHO 세포에 의해 생성된 항체는 전형적으로 약 85% 이상의 글리칸 푸코스 함량을 갖는다. Fc 영역에 부착된 바이안테나리 복합형(complex-type) 올리고당으로부터의 코어(core) 푸코스의 제거는, 항원 결합 또는 CDC 활성을 변경시키지 않고서, 개선된 Fc γ RIIIa 결합을 통해 항체의 ADCC를 향상시킨다. 그러한 mAb는 바이안테나리 복합형의 Fc 올리고당을 담지하는 비교적 고도로 탈푸코실화된 항체의 성공적인 발현으로 이어지는 것으로 보고된 상이한 방법들을 사용하여 달성될 수 있는데, 이러한 방법에는, 예컨대 다음과 같은 것이 있다: 배양물 오스몰랄 농도(osmolality)의 제어(문헌[Konno *et al.*, (2012) *Cytotechnology* 64:249-65]), 숙주 세포주로서의 변이체 CHO 세포주 Lec13의 적용(문헌[Shields *et al.*, (2002) *J Biol Chem* 277:26733-26740]), 숙주 세포주로서의 변이체 CHO 세포주 EB66의 적용(문헌[Olivier *et al.*, (2010) *MAbs* 2(4), Epub ahead of print; PMID:20562582]), 숙주 세포주로서의 래트 하이브리도마 세포주 YB2/0의 적용(문헌[Shinkawa *et al.*, (2003) *J Biol Chem* 278:3466-3473]), 특이적으로 α 1,6-푸코실트랜스퍼라제(FUT8) 유전자에 대한 짧은 간섭(small interfering) RNA의 도입(문헌[Mori *et al.*, (2004) *Biotechnol Bioeng* 88:901-908]), 또는 β-1,4-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III과 골지(Golgi) α-만노시다제 II 또는 강력한 알파-만노시다제 I 억제제인 키푸넨신(kifunensine)의 공발현(문헌[Ferrara *et al.*, (2006) *J Biol Chem* 281:5032-5036]; 문헌[Ferrara *et al.*, (2006) *Biotechnol Bioeng* 93:851-861]; 문헌[Xhou *et al.*, (2008) *Biotechnol Bioeng* 99:652-65]). 본 발명의 방법에, 그리고 하기에 열거된 넘버링된 실시 형태들 각각 하나하나의 일부 실시 형태에 사용되는 항-CD38 항체에 의해 유도된 ADCC는 또한 항체 Fc에서의 소정 치환에 의

해 향상될 수 있다. 예시적인 치환은, 예를 들어 미국 특허 제6,737,056호에 기재된 바와 같은 아미노산 위치 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 또는 430(잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따름)에서의 치환이다.

- [0120] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 항체 Fc에서의 치환을 포함한다.
- [0121] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 항체 Fc 내의 아미노산 위치 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 또는 430(잔기 넘버링은 EU 인덱스에 따름)에서의 치환을 포함한다.
- [0122] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 푸코스 함량이 약 0% 내지 약 15%, 예를 들어 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 0%인 바이안테나리 글리칸 구조를 갖는다.
- [0123] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 푸코스 함량이 약 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 0%인 바이안테나리 글리칸 구조를 갖는다.
- [0124] Fc에서의 치환 및 감소된 푸코스 함량은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 ADCC 활성을 향상시킬 수 있다.
- [0125] "푸코스 함량"은 Asn297에서의 당 사슬 내의 푸코스 단당의 양을 의미한다. 푸코스의 상대량은 모든 당구조(glycostructure)에 대한 푸코스-함유 구조의 백분율이다. 이들은, 예를 들어 하기와 같은 다수의 방법에 의해 특성화 및 정량화될 수 있다: 1) 국제 특허 출원 공개 WO2008/077546호에 기재된 바와 같이 N-글리코시다제 F 처리된 샘플(예를 들어, 복합, 혼성, 및 올리고- 및 고-만노스 구조)의 MALDI-TOF를 사용하는 방법; 2) Asn297 글리칸의 효소적 방출을 행하고, 후속으로, 유도체화하고, 형광 검출을 사용하는 HPLC(UPLC) 및/또는 HPLC-MS(UPLC-MS)에 의해 검출/정량화함에 의한 방법; 3) 엔도(Endo) S, 또는 제1 GlcNAc 단당과 제2 GlcNAc 단당 사이를 절단하여 푸코스가 제1 GlcNAc에 부착된 상태로 남겨 두는 다른 효소로 Asn297 글리칸을 처리하거나 처리하지 않고서, 천연 또는 환원된 mAb의 온전한 단백질을 분석하는 방법; 4) 효소적 분해(예를 들어, 트립신 또는 엔도펩티다제 Lys-C)에 의해 mAb를 구성 웨პ티드들로 효소분해하고, 후속으로 HPLC-MS(UPLC-MS)에 의해 분리, 검출 및 정량화하는 방법; 또는 5) Asn297에서의 PNGase F에 의한 특이적인 효소적 탈글리코실화에 의해 mAb 단백질로부터 mAb 올리고당을 분리하는 방법. 방출된 올리고당은 형광단으로 표지되고, 하기를 가능하게 하는 다양한 상보적 기법에 의해 분리 및 확인될 수 있다: 실험 질량과 이론 질량의 비교에 의한 매트릭스-보조 레이저 탈착 이온화(matrix-assisted laser desorption ionization)(MALDI) 질량 분석에 의한 글리칸 구조의 미세한 특성화, 이온 교환 HPLC(글리코셉(GlycoSep) C)에 의한 시알릴화도(degree of sialylation)의 결정, 순상 HPLC(글리코셉 N)에 의한 친수성 기준에 따른 올리고당 형태의 분리 및 정량화, 및 고성능 모세관 전기영동-레이저 유도 형광(high performance capillary electrophoresis-laser induced fluorescence)(HPCE-LIF)에 의한 올리고당의 분리 및 정량화.
- [0126] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "저 푸코스" 또는 "저 푸코스 함량"은 푸코스 함량이 약 0% 내지 15%인 항체를 지칭한다.
- [0127] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "정상 푸코스" 또는 "정상 푸코스 함량"은 푸코스 함량이 약 50% 초과, 전형적으로 약 60%, 70%, 80% 초과 또는 85% 초과인 항체를 지칭한다.
- [0128] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 아폽토시스에 의한 Treg, MDSC 및/또는 Breg의 사멸을 유도할 수 있다. 아폽토시스를 평가하기 위한 방법은 잘 알려져 있으며, 예를 들어 표준 방법을 사용하는 아넥신 IV 염색을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용되는 항-CD38 항체는 세포의 약 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%로 아폽토시스를 유도할 수 있다.
- [0129] 일부 실시 형태에서, Teff 또는 면역 억제 세포는 골수 또는 말초 혈액 중에 존재한다.
- [0130] 일부 실시 형태에서, Teff 또는 면역 억제 세포는 골수 중에 존재한다.
- [0131] 일부 실시 형태에서, Teff 또는 면역 억제 세포는 말초 혈액 중에 존재한다.
- [0132] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 CD8⁺ T 세포 대 Treg의 비를 증가시킨다.
- [0133] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 CD8⁺ 중추 기억 세포 대 CD8⁺ 나이브 세포의 비를 증가시킨다. CD8⁺ 중추 기억 세포는 CD45RO⁺/CD62L^{high} 세포로서 확인될 수 있다. CD8⁺ 나이브 세포는 CD45RO⁻

/CD62L⁺ 세포로서 확인될 수 있다.

[0134] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 비효능적(non-agonistic) 항체이다.

[0135] CD38과 특이적으로 결합하는 비효능적 항체는, CD38에 결합 시에, 동종형 대조 항체 또는 배지 단독에 의해 유도된 증식에 비하여 시험관내에서 말초 혈액 단핵 세포의 샘플의 유의한 증식을 유도하지 않는 항체를 지칭한다.

[0136] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 비효능적 항체는 통계학적으로 유의하지 않는 방식으로 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 증식을 유도한다. PBMC 증식은, 건강한 공여자로부터 PBMC를 단리하고, 200 μl RPMI 중 시험 항체의 존재 또는 부재 하에서 편평바닥 96웰 플레이트 내에서 1×10⁵ 개 세포/웰로 세포를 배양함으로써 평가될 수 있다. 37°C에서 4일 인큐베이션 후에, 30 μl의 ³H-티미딘(16.7 μCi/ml)을 첨가하고, 배양을 하룻밤 계속할 수 있다. ³H-티미딘 흔입은 제조자의 설명서에 따라 Packard Cobra 감마 카운터(미국 코네티컷주 메리던 소재의 Packard Instruments)를 사용하여 평가될 수 있다. 데이터는 몇 명의 공여자로부터 얻어진 PBMC의 평균 cpm(±SEM)으로서 계산될 수 있다. 시험 항체의 존재 또는 부재 하에서 배양된 샘플들 사이의 통계학적 유의성 또는 무유의성은 표준 방법을 사용하여 계산된다.

[0137] 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 예시적인 항-CD38 항체는 DARZALEX™(다라투무맙)이다. DARZALEX™(다라투무맙)는, 각각 서열 번호 4 및 5에 나타낸 중쇄 가변 영역(VH) 및 경쇄 가변 영역(VL) 아미노산 서열; 각각 서열 번호 6, 7 및 8의 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3; 및 각각 서열 번호 9, 10 및 11의 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, IgG1/κ 아형을 갖고, 미국 특히 제7,829,693호에 기재되어 있다. DARZALEX™(다라투무맙)의 중쇄 아미노산 서열은 서열 번호 12에 나타나 있고, 경쇄 아미노산 서열은 서열 번호 13에 나타나 있다.

[0138] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는, CD38에 결합하기 위하여, 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열 번호 5의 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항체와 경쟁한다.

[0139] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 적어도 인간 CD38(서열 번호 1)의 영역 SKRNIQFSCKNIYR(서열 번호 2) 및 영역 EKVQTLEAWVIHGG(서열 번호 3)에 결합한다.

[0140] 서열 번호 1

```
MANCEFSPVSGDKPCRLSRRAQLCLGVSLVLILVVVLAVVVPRWRQQWSGP GT
TKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPCNITEEDYQPLM
KLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLGYLADDLTWCGEFN
TSKINYQSCPDWRKDSCNNPVSFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDK
NSTFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRN IQFSC
KNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI
```

[0141] 서열 번호 2

```
SKRNIQFSCKNIYR
```

[0142] 서열 번호 3

```
EKVQTLEAWVIHGG
```

[0143] 서열 번호 4

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFNSFAMS WVRQAPGKGLEWVSA
ISGSGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDK
ILWFGEPVFDYWGQQGTLVTVSS
```

[0148]	서열 번호 5
	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASN RATGIPARFSGSGSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQ GTKVEIK
[0149]	
[0150]	서열 번호 6
[0151]	SFAMS
[0152]	서열 번호 7
	AISGSGGGTYYADSVKG
[0153]	
[0154]	서열 번호 8
	DKILWFGEPVFDY
[0155]	
[0156]	서열 번호 9
[0157]	RASQSVSSYLA
[0158]	서열 번호 10
[0159]	DASN RAT
[0160]	서열 번호 11
[0161]	QQRSNWPPTF
[0162]	서열 번호 12
	EVQLLESGGGLVQP GGLSLRLSCAVSGFTFNSFAM SWVRQAPGKGLEWVSAISGSG GGTYYADSVKGRTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCAKDKILWFGE PVF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEP VTV SWN SGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKV DKRV EPKSCDKTH CPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHN A KTPREEQYN STYRVV SVLTV LHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKN QVSLT CLVK G FYP PSDIAVE WESNGQPENNYK TTPV LDSLGSFFLYSKLTV DKS RWQQGNV FSCS VMHEALHN
[0163]	HYTQKSLSLSPGK
[0164]	서열 번호 13
	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD ASN RAT GIPARFSGSGSGTDFLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQ GTKVEIK RTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
[0165]	
[0166]	항체는 잘 알려진 시험관내 방법을 사용하여 CD38에 결합하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 갖는 참조 항체, 예컨대 DARZALEX™(다라투무맙)와의 그들의 경쟁에 대해 평가될 수 있다. 예시적인 방법에서는, CD38을 재조합적으로 발현하는 CHO 세포를 비표지된 참조 항체와 4°C에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 과량의

형광 표지된 시험 항체와 4°C에서 45분 동안 인큐베이션할 수 있다. PBS/BSA 중에서 세척한 후에, 표준 방법을 사용하여 유세포측정에 의해 형광을 측정할 수 있다. 다른 예시적인 방법에서는, 인간 CD38의 세포외 부분을 ELISA 플레이트의 표면 상에 코팅할 수 있다. 과량의 비표지된 참조 항체를 약 15분 동안 첨가하고, 후속으로 비오티닐화 시험 항체를 첨가할 수 있다. PBS/Tween 중에서 세척한 후에, 고추냉이 페옥시다제(HRP)-접합된 스트렙타비딘 및 표준 방법을 사용하여 검출된 신호를 사용하여 비오티닐화 시험 항체의 결합을 검출할 수 있다. 경쟁 검정에서, 참조 항체가 표지되고 시험 항체가 비표지될 수 있음이 용이하게 명백하다. 시험 항체는, CD38에 대하여, 참조 항체가 시험 항체의 결합을, 또는 시험 항체가 참조 항체의 결합을 적어도 80%, 예를 들어 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 억제할 때, 참조 항체와 경쟁한다. 시험 항체의 에피토프는, 예를 들어 알려진 방법을 사용하여 웹티드 맵핑 또는 수소/중수소 보호 검정에 의해, 또는 결정 구조의 결정에 의해 추가로 규정될 수 있다.

- [0167] 인간 CD38(서열 번호 1)의 영역 SKRNIQFSCKNIYR(서열 번호 2) 및 영역 EKVQTLEAWVIHGG(서열 번호 3)에 결합하는 항체는, 예를 들어 표준 방법 및 본 명세서에 기재된 것들 사용하여 서열 번호 2 및 3에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 웹티드로 마우스를 면역화하고, 예를 들어 ELISA 또는 돌연변이생성 연구를 사용하여 그 웹티드에 대한 결합을 위하여 얻어진 항체를 특성화함으로써 생성될 수 있다.
- [0168] 본 발명은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 인간 CD38(서열 번호 1)의 영역 SKRNIQFSCKNIYR(서열 번호 2) 및 영역 EKVQTLEAWVIHGG(서열 번호 3)에 결합하는 항-CD38 항체를 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체의 에피토프는 서열 번호 2 또는 서열 번호 3에 나타낸 서열을 갖는 잔기들 중 일부 또는 모두를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 항체 에피토프는 인간 CD38(서열 번호 1)의 영역 SKRNIQFSCKNIYR (서열 번호 2)에서 적어도 하나의 아미노산 및 영역 EKVQTLEAWVIHGG(서열 번호 3)에서 적어도 하나의 아미노산을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 항체 에피토프는 인간 CD38(서열 번호 1)의 영역 SKRNIQFSCKNIYR (서열 번호 2)에서 적어도 2개의 아미노산 및 영역 EKVQTLEAWVIHGG(서열 번호 3)에서 적어도 2개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 항체 에피토프는 인간 CD38(서열 번호 1)의 영역 SKRNIQFSCKNIYR (서열 번호 2)에서 적어도 3개의 아미노산 및 영역 EKVQTLEAWVIHGG(서열 번호 3)에서 적어도 3개의 아미노산을 포함한다.
- [0169] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는, 각각 서열 번호 6, 7 및 8의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 아미노산 서열을 포함한다.
- [0170] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는, 각각 서열 번호 9, 10 및 11의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 아미노산 서열을 포함한다.
- [0171] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는, 각각 서열 번호 6, 7, 8, 9, 10 및 11의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 아미노산 서열을 포함한다.
- [0172] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 서열 번호 4와 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 VH 및 서열 번호 5와 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 VL을 포함한다.
- [0173] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함한다.
- [0174] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 서열 번호 12의 중쇄 및 서열 번호 13의 경쇄를 포함한다.
- [0175] 본 발명의 임의의 실시 형태에서 사용될 수 있는 다른 예시적인 항-CD38 항체는 하기와 같다:
- [0176] 각각 서열 번호 14 및 15의 VH 및 VL 서열을 포함하고 미국 특허 제7,829,693호에 기재된 mAb003. mAb003의 VH 및 VL은 IgG1/ κ로 발현될 수 있다.
- [0177] 서열 번호 14
 QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAFSWVRQAPGQGLEWMGRVIPF
 LGIANSQAQKFQGRVTITADKSTSTAY
- [0178] MDLSSLRSEDTAVYYCARDDIAALGPFDYWGQGTLTVSSAS

- [0179] 서열 번호 15
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISSWLAWYQQKPEAKPSLIYAASSLQS
 GVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQP
 EDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK;
- [0180]
- [0181] 각각 서열 번호 16 및 17의 VH 및 VL 서열을 포함하고 미국 특허 제7,829,693호에 기재된 mAb024. mAb024의 VH 및 VL은 IgG1/ κ로 발현될 수 있다.
- [0182] 서열 번호 16
 EVQLVQSGAEVKPGESLKISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPH
 DSDARYSPSFQGQVTFSADKSISTAY
 LQWSSLKASDTAMYYCARHVGWSRYWYFDLWGRGTLTVSS
- [0183]
- [0184] 서열 번호 17
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RAT
 GIPARFSGSGSGTDFLTISSLEP
 EDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK;
- [0185]
- [0186] 각각 서열 번호 18 및 19의 VH 및 VL 서열을 포함하고 미국 특허 제8,088,896호에 기재된 MOR-202(MOR-03087). MOR-202의 VH 및 VL은 IgG1/ κ로 발현될 수 있다.
- [0187] 서열 번호 18
 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYYMNWVRQAPGKGLEWVSGISGD
 PSNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY
 LQMNSLRAEDTAVYYCARDLPLVYTGFAYWGQGTLTVSS
- [0188]
- [0189] 서열 번호 19
 DIELTQPPSVSVPQTARISCSGDNLRHYYVYWWQQKPGQAPVLVIYGDSKRPS
 GIPERFSGSNSGNATLTISGTQAEDeadYYCQTYGGASLVFGGGTKLTVLGQ;
- [0190]
- [0191] 이사특시맙; 각각 서열 번호 20 및 21의 VH 및 VL 서열을 포함하고 미국 특허 제8,153,765호에 기재됨. 이사특시맙의 VH 및 VL은 IgG1/ κ로 발현될 수 있다.
- [0192] 서열 번호 20
 QVQLVQSGAEVAKPGTSVKLSCKASGYTFTDYWMQWVKQRPGQGLEWIGT
 IYPGDGDTGYAQKFQGKATLTADKSSKTVYMHLSLASEDSAVYYCARGD
 YYGSNSLDYWGQGTSVTVSS
- [0193]
- [0194] 서열 번호 21:
 DIVMTQSHLSMSTS LGDPVSITCKASQDVSTVVAWYQQKPGQSPRRLIYS
 ASYRYIGVPDRFTGSGAGTDFTFTISSVQAEDLA VYYCQQHYSPPYTFGG
 GTKLEIK
- [0195]
- [0196] 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 다른 예시적인 항-CD38 항체는 국제 특허 출원 공개 WO05/103083호, 국제 특허 출원 공개 WO06/125640호, 국제 특허 출원 공개 WO07/042309호, 국제 특허 출원 공개 WO08/047242호 또는 국제 특허 출원 공개 WO14/178820호에 기재된 것들을 포함한다.
- [0197] 본 발명은 또한 고령 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호

5의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.

- [0198] 본 발명은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 서열 번호 14의 VH 및 서열 번호 15의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- [0199] 본 발명은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 서열 번호 16의 VH 및 서열 번호 17의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- [0200] 본 발명은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 서열 번호 18의 VH 및 서열 번호 19의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- [0201] 본 발명은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 서열 번호 20의 VH 및 서열 번호 21의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- [0202] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 흑색종이다.
- [0203] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 폐암이다.
- [0204] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 편평 비소세포 폐암(NSCLC)이다.
- [0205] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 비편평 NSCLC이다.
- [0206] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 폐 선암종이다.
- [0207] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 신장 세포 암종(RCC)(예를 들어, 신장 투명 세포 암종 또는 신장 유두상 세포 암종), 또는 그의 전이성 병변이다.
- [0208] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 중피종이다.
- [0209] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 비인두 암종(NPC)이다.
- [0210] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 결직장암이다.
- [0211] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 전립선암 또는 거세-저항성(castration-resistant) 전립선암이다.
- [0212] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 위암(stomach cancer)이다.
- [0213] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 난소암이다.
- [0214] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 위암(gastric cancer)이다.
- [0215] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 간암이다.
- [0216] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 췌장암이다.
- [0217] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 갑상선암이다.
- [0218] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 두경부의 편평 세포 암종이다.
- [0219] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 식도 또는 위장관의 암종이다.
- [0220] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 유방암이다.
- [0221] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 나팔관암이다.
- [0222] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 뇌암이다.
- [0223] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 요도암이다.
- [0224] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 비뇨생식기암이다.
- [0225] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 자궁내막종이다.

- [0226] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 자궁경부암이다.
- [0227] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 상기 암의 전이성 병변이다.
- [0228] 일부 실시 형태에서, 고형 종양은 검출가능한 CD38 발현이 부재한다.
- [0229] 고형 종양은, 고형 종양 조직에서의 또는 고형 종양으로부터 단리된 세포 상에서의 CD38 발현이, 대조군에 비하여 통계학적으로 유의하지 않을 때, 예를 들어 잘 알려진 방법을 사용하여 동종형 대조 항체에 대해 검출된 발현 대비 항-CD38 항체에 대해 검출된 발현이 통계학적으로 유의하지 않을 때, 검출가능한 CD38 발현이 부재한다.
- [0230] 본 발명의 방법에 사용되는 항-CD38 항체는 또한, 예를 들어 파지 디스플레이 라이브러리로부터 드 노보(*de novo*)로 선택될 수 있으며, 여기서 파지는 인간 면역글로불린 또는 그의 부분들, 예컨대 Fab, 단일쇄 항체(scFv), 또는 쌍을 이루지 않거나 쌍을 이룬 항체 가변 영역들을 발현하도록 조작된다(문헌[Knappik *et al.*, (2000) *J Mol Biol* 296:57-86]; 문헌[Krebs *et al.*, (2001) *J Immunol Meth* 254:67-84]; 문헌[Vaughan *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology* 14:309-314]; 문헌[Sheets *et al.*, (1998) *PITAS (USA)* 95:6157-6162]; 문헌[Hoogenboom and Winter, (1991) *J Mol Biol* 227:381]; 문헌[Marks *et al.*, (1991) *J Mol Biol* 222:581]). CD38 결합 가변 도메인은, 예를 들어 문헌[Shi *et al.*, (2010) *J Mol Biol* 397:385-96] 및 국제 특허 출원 공개 WO09/085462호에 기재된 바와 같이 박테리오파지 pIX 외피 단백질과의 융합 단백질로서 항체 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 항체 라이브러리는 인간 CD38 세포 외 도메인에 대한 결합에 대하여 스크리닝되고, 얻어진 양성 클론은 추가로 특성화되고, Fab가 클론 용해물로부터 단리되고, 후속으로 전장 항체로서 클로닝된다. 인간 항체를 단리하기 위한 이러한 파지 디스플레이 방법은 당업계에 확립되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,223,409호, 미국 특허 제5,403,484호, 미국 특허 제5,571,698호, 미국 특허 제5,427,908호, 미국 특허 제5,580,717호, 미국 특허 제5,969,108호, 미국 특허 제6,172,197호, 미국 특허 제5,885,793호, 미국 특허 제6,521,404호, 미국 특허 제6,544,731호, 미국 특허 제6,555,313호, 미국 특허 제6,582,915호, 및 미국 특허 제6,593,081호를 참조한다.
- [0231] 일부 실시 형태에서, 항-CD38 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 동종형을 갖는다.
- [0232] 항체의 Fc 부분은 항체-의존성 세포-매개성 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP) 또는 보체 의존성 세포독성(CDC)과 같은 항체 이펙터 기능을 매개할 수 있다. 그러한 기능은 식세포작용 또는 용해 활성을 갖는 면역 세포 상의 Fc 수용체에 대한 Fc 이펙터 도메인(들)의 결합에 의해 또는 보체 시스템의 성분에 대한 Fc 이펙터 도메인(들)의 결합에 의해 매개될 수 있다. 전형적으로, Fc-결합 세포 또는 보체 성분에 의해 매개된 효과(들)는 표적 세포, 예를 들어 CD38-발현 세포의 억제 및/또는 고갈을 가져온다. 인간 IgG 동종형 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4는 이펙터 기능에 대해 차별적인 능력을 나타낸다. ADCC는 IgG1 및 IgG3에 의해 매개될 수 있고, ADCP는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4에 의해 매개될 수 있고, CDC는 IgG1 및 IgG3에 의해 매개될 수 있다.
- [0233] 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하는 항체와 실질적으로 동일한 항체가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "실질적으로 동일한"은 비교하는 2개의 항체 VH 또는 VL 아미노산 서열이 동일하거나, 또는 "미미한 (insubstantial) 차이"를 갖는 것을 의미한다. 미미한 차이는, 항체 특성에 불리한 영향을 주지 않는, 항체 중쇄 또는 경쇄 내의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 아미노산의 치환이다. % 동일성은, 예를 들어 Vector NTI v.9.0.0의 AlignX 모듈(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Invitrogen)의 디폴트 설정을 사용하여, 쌍별 정렬(pairwise alignment)에 의해 결정될 수 있다. 본 발명의 단백질 서열을 질의 서열(query sequence)로 사용하여, 예를 들어 관련 서열을 확인하기 위해 공개 데이터베이스 또는 특허 데이터베이스에 대한 검색을 수행할 수 있다. 이러한 검색을 수행하기 위해 사용되는 예시적인 프로그램은, 디폴트 설정을 사용하는 XBLAST 또는 BLASTP 프로그램 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 또는 GenomeQuest™(미국 매사추세츠주 웨스트보로우 소재의 GenomeQuest) 제품군(suite)이다. CD38과 특이적으로 결합하는 항체에 대해 이루어질 수 있는 예시적인 치환은, 예를 들어 유사한 전하, 소수성, 또는 입체화학 특성을 갖는 아미노산으로의 보존적 치환이다. 보존적 치환은 또한 항체 특성, 예를 들어 안정성 또는 친화성을 개선하도록, 또는 항체 이펙터 기능을 개선하도록 이루어질 수 있다. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 아미노산 치환, 예를 들어 항-CD38 항체의 중쇄 또는 경쇄에 대해 이루어질 수 있다. 더욱이, VH 또는 VL 내의 임의의 천연 잔기는 또한 알라닌으로 치환될 수 있는데, 이는 알라닌 스캐닝 돌연변이생성(alanine scanning mutagenesis)에 대해 이전에 기재된 바와 같다(문헌[MacLennan *et al.*, *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67, 1998]; 문헌[Sasaki *et al.*, *Adv Biophys* 35:1-24, 1998]). 원하는 아미노산 치환은 그러한 치환이 요구되는 때에 당업자에 의해 결정될 수 있다. 아미노산

치환은, 예를 들어 PCR 돌연변이 생성에 의해 행해질 수 있다(미국 특허 제4,683,195호). 변이체의 라이브러리를 잘 알려진 방법을 사용하여 생성할 수 있는데, 예를 들어, 무작위(NNK) 또는 비무작위 코돈, 예를 들어 DVK 코돈 - 이는 11개의 아미노산(Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp)을 인코딩함 - 을 사용하고, 원하는 특성을 갖는 변이체에 대한 라이브러리를 스크리닝하여 생성할 수 있다. 생성된 변이체들은 CD38에 대한 그들의 결합, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 시험관내에서 ADCC, ADCP 또는 아폽토시스를 유도하거나, 또는 CD38 효소 활성을 조절하는 그들의 능력에 대해 시험될 수 있다.

[0234] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 다양한 친화도(K_D)로 인간 CD38과 결합할 수 있다. 본 발명에 따른 일 실시 형태에서, 그리고 하기에 열거된 넘버링된 실시 형태들 각각 하나하나의 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 고친화도로, 예를 들어 당업자에 의해 실시되는 바와 같이, 표면 플라즈몬 공명 또는 키넥사(Kinexa) 방법에 의해 결정될 때, 약 10^{-7} M 이하, 예컨대 제한 없이, 1 내지 9.9(또는 그 안의 임의의 범위 또는 값, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9) $\times 10^{-8}$ M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M, 10^{-14} M, 10^{-15} M 또는 그 안의 임의의 범위 또는 값의 K_D 로 CD38에 결합한다. 하나의 예시적인 친화도는 1×10^{-8} M 이하이다. 다른 예시적인 친화도는 1×10^{-9} M 이하이다.

[0235] 일부 실시 형태에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 이중특이성 항체이다. 기준의 항-CD38 항체의 VL 및/또는 VH 영역 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 드 노보로 확인된 VL 및 VH 영역은 이중특이성 전장 항체 내로 조작될 수 있다. 그러한 이중특이성 항체는 미국 특허 제7,695,936호; 국제 특허 출원 공개 WO04/111233호; 미국 특허 출원 공개 제2010/0015133호; 미국 특허 출원 공개 제2007/0287170호, 국제 특허 출원 공개 WO2008/119353호; 미국 특허 출원 공개 제2009/0182127호; 미국 특허 출원 공개 제2010/0286374호; 미국 특허 출원 공개 제2011/0123532호, 국제 특허 출원 공개 WO2011/131746호, 국제 특허 출원 공개 WO2011/143545호; 또는 미국 특허 출원 공개 제2012/0149876호에 기재된 것과 같은 기술을 사용하여 단일특이성 항체 중쇄들 사이의 CH3 상호작용을 조절하여 이중특이성 항체를 형성함으로써 제조될 수 있다. 본 발명의 항체의 VL 및/또는 VH 영역이 도입될 수 있는 추가의 이중특이성 구조는, 예를 들어 이중 가변 도메인 면역글로불린(국제 특허 출원 공개 WO2009/134776호), 또는 상이한 특이성을 갖는 2개의 항체 아암을 연결시키기 위한 다양한 이량화 도메인, 예컨대 류신 지퍼 또는 콜라겐 이량화 도메인을 포함하는 구조(국제 특허 출원 공개 WO2012/022811호, 미국 특허 제5,932,448호; 미국 특허 제6,833,441호)이다.

[0236] 예를 들어, 이중특이성 항체는, 2개의 단일특이성 동종이량체성 항체의 CH3 영역 내에 비대칭 돌연변이를 도입시키고, 이황화물 결합 이성질화를 가능하게 하는 환원성 조건에서 2개의 모(parental) 단일특이성 동종이량체성 항체로부터 이중특이성 이종이량체성 항체를 형성함으로써 무세포 환경에서 시험관내에서 생성될 수 있는데, 이는 국제 특허 출원 공개 WO2011/131746호에 기재된 방법에 따른 것이다. 이를 방법에서, 제1 단일특이성 2가 항체(예를 들어, 항-CD38 항체) 및 제2 단일특이성 2가 항체는 CH3 도메인에서 이종이량체 안정성을 촉진하는 소정의 치환을 갖도록 조작되며; 이를 항체는 헌지 영역 내의 시스테인이 이황화물 결합 이성질화를 거칠 수 있게 하기에 충분한 환원성 조건 하에서 함께 인큐베이션되고; 그럼으로써 Fab 아암 교환에 의해 이중특이성 항체를 생성한다. 인큐베이션 조건은 비환원성 상태로 최적으로 회복될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 환원제는 2-메르캅토에틸아민(2-MEA), 다이티오토레이톨(DTT), 다이티오에리트리톨(DTE), 글루타티온, 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP), L-시스테인 및 베타-메르캅토에탄올이며, 바람직하게는 환원제는 2-메르캅토에틸아민, 다이티오토레이톨 및 트리스(2-카르복시에틸)포스핀으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 예를 들어, pH 5 내지 8에서, 예를 들어 pH 7.0에서 또는 pH 7.4에서 적어도 25 mM 2-MEA의 존재 하에서 또는 적어도 0.5 mM 다이티오토레이톨의 존재 하에서 20°C 이상의 온도에서 90분 이상 동안의 인큐베이션이 사용될 수 있다.

[0237] 이중특이성 항체의 제1 중쇄에 그리고 제2 중쇄에 사용될 수 있는 예시적인 CH3 돌연변이는 K409R 및/또는 F405L이다.

[0238] 본 발명의 방법은 임의의 분류에 속하는 동물 환자를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 동물의 예에는 포유동물, 예를 들어 인간, 설치류, 개, 고양이 및 가축이 포함된다.

투여/약제학적 조성물

[0240] CD38과 특이적으로 결합하는 항체는, 본 발명의 방법에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 적합한 약제학적 조성물로 제공될 수 있다. 담체는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 함께 투여되는 희석제, 애쥬반트(adjuvant), 부형제, 또는 비히클일 수 있다. 이러한 비히클은 석유, 동

물, 식물, 또는 합성 기원의 것들, 예컨대 낙화생유, 대두유, 광유, 참기름 등을 포함하는, 물 및 오일과 같은 액체일 수 있다. 예를 들어, 0.4% 염수 및 0.3% 글리신이 사용될 수 있다. 이들 용액은 무균성이고 일반적으로 미립자 물질이 없다. 이들은 종래의 잘 알려진 멸균 기법(예를 들어, 여과)에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 pH 조정제 및 완충제, 안정제, 증점제, 윤활제 및 착색제 등과 같은 생리적 조건에 근접시키기 위하여 필요한, 약제학적으로 허용되는 보조 물질을 함유할 수 있다. 그러한 약제학적 제형에서 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 농도는 광범위하게, 즉 약 0.5 중량% 미만부터, 통상 적어도 약 1 중량%까지, 많게는 15 또는 20 중량%, 25 중량%, 30 중량%, 35 중량%, 40 중량%, 45 중량% 또는 50 중량%까지 변동될 수 있으며, 선택된 특정 투여 방식에 따라, 필요 용량, 유체 부피, 점도 등에 기초하여 주로 선택될 것이다. 다른 인간 단백질, 예를 들어 인간 혈청 알부민을 포함하는 적합한 비히클 및 제형이, 예를 들어 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, 특히 pp. 958-989 참조]에 기재되어 있다.

- [0241] 본 발명의 방법에서의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 투여 방식은 비경구 투여, 예를 들어 진피내, 근육내, 복막내, 정맥내 또는 피하, 폐, 경첨막(구강, 비강내, 질내, 직장) 또는 당엽자에 의해 이해되는 다른 수단과 같은 임의의 적합한 경로일 수 있으며, 이는 당엽계에 잘 알려진 바와 같다. CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 알려진 방법을 사용하여 종양 내로의 국부 전달을 위하여 림프절 배출 부위에, 종양내로 투여될 수 있다.
- [0242] CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 임의의 적합한 경로에 의해, 예를 들어 정맥내(*i.v.*) 주입 또는 볼루스 주사에 의해 비경구로, 근육내로 또는 피하로 또는 복막내로 환자에게 투여될 수 있다. *i.v.* 주입은, 예를 들어 15, 30, 60, 90, 120, 180, 또는 240분, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12시간에 걸쳐 제공될 수 있다.
- [0243] 환자에게 제공되는 용량은 치료되는 질병을 경감시키거나 또는 적어도 부분적으로 정지시키기에 충분하고("치료적 유효량"), 때때로 0.005 mg 내지 약 100 mg/kg, 예를 들어 약 0.05 mg 내지 약 30 mg/kg 또는 약 5 mg 내지 약 25 mg/kg, 또는 약 4 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 16 mg/kg 또는 약 24 mg/kg, 또는, 예를 들어 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mg/kg일 수 있지만, 더욱 더 높을 수 있으며, 예를 들어 약 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 mg/kg일 수 있다.
- [0244] 고정 단위 용량, 예를 들어 50, 100, 200, 500 또는 1000 mg이 또한 제공될 수 있거나, 또는 이러한 용량은 환자의 표면적에 기초해서, 예를 들어 500, 400, 300, 250, 200, 또는 100 mg/m²일 수 있다. 통상 1 내지 8회(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8회)의 용량이 투여될 수 있지만, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20회 또는 그 이상 횟수의 용량이 제공될 수 있다.
- [0245] 본 발명의 방법에서의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 투여는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 5주, 6주, 7주, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 그 이상 후에 반복될 수 있다. 만성 투여인 바와 같이, 반복된 치료 과정이 또한 가능하다. 반복 투여는 동일한 용량으로 또는 상이한 용량으로 행해질 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법에서의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 정맥내 주입에 의해 8주 동안 매주 간격으로 8 mg/kg으로 또는 16 mg/kg으로 투여된 후, 추가 16주 동안 2주마다 8 mg/kg으로 또는 16 mg/kg으로 투여된 후, 4주마다 8 mg/kg으로 또는 16 mg/kg으로 투여될 수 있다.
- [0246] CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 본 발명의 방법에서 유지 요법(maintenance therapy)에 의해, 예를 들어 6 개월 이상의 기간 동안 주 1회 투여될 수 있다.
- [0247] 예를 들어, 본 발명의 방법에서의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 일일 투여량으로서, 치료 개시 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40일 중 적어도 하나에 대해, 또는 대안적으로, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20주 중 적어도 하나에 대해, 매 24, 12, 8, 6, 4, 또는 2시간마다의 단회 또는 분할 용량, 또는 이들의 임의의 조합을 사용하여, 1일당 약 0.1 내지 100 mg/kg, 예컨대 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 mg/kg의 양으로, 또는 이들의 임의의 조합으로 제공될 수 있다.
- [0248] 본 발명의 방법에서의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 또한 암 발생 위험을 감소시키고/시키거나, 암 진행에서의 사건의 발생의 개시를 지연시키고/시키거나, 암이 관해기에 있을 때 재발 위험을 감소시키기 위하여 예

방적으로 투여될 수 있다. 이는 다른 생물학적 인자들로 인해 존재하는 것으로 알려진 종양의 위치를 찾는 것이 어려운 환자에서 특히 유용할 수 있다.

[0249] 본 발명의 방법에서의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 저장을 위해 동결건조되고, 사용 전에 적합한 담체 중에 재구성될 수 있다. 이 기법은 종래의 단백질 제제에 유효한 것으로 밝혀져 있으며, 잘 알려진 동결건조 및 재구성 기법이 사용될 수 있다.

[0250] 본 발명의 방법에서의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 제2 치료제와 병용하여 투여될 수 있다.

[0251] 본 발명의 방법에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 당업자에게 알려진 화학치료 약물들 또는 다른 항암 치료제들 중 어느 하나 이상과 함께 투여될 수 있다. 화학치료제는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물이며, 성장 억제제 또는 다른 세포독성제를 포함하고, 알킬화제, 항대사물제, 항미소관 억제제, 토포이소머라제 억제제, 수용체 티로신 키나제 억제제, 혈관생성 억제제 등을 포함한다. 화학치료제의 예에는 하기가 포함된다: 알킬화제, 예컨대 티오텐과 및 사이클로포스파미드(CYTOXAN®); 알킬 설포네이트, 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피포 설판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보퀸, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아밀아민 - 알트레타민, 트라이에틸렌멜라민, 트라이에틸렌포스포아미드, 트라이에틸렌티오포스포아미드 및 트라이메틸올로멜라민을 포함함 -; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로로나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 카티노마이신, 칼리케아미신, 카루비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-다이아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포르피로마이신, 푸로마이신, 웰라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물제, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-FU; 엽산 유사체, 예컨대 테노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 푸린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토푸린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 다이데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지퀸; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 폐나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK®; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지퀸; 2',2''-트라이클로로트라이에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다틱르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오텐과; 탁소이드 또는 탁세인 패밀리의 구성원, 예컨대 파클리탁셀(TAXOL®), 도세탁셀(TAXOTERE®) 및 이들의 유사체; 클로람부실; 겜시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토푸린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포사이드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빙크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 다이플루오로메틸로르니틴(DMFO); 레틴산; 에스페라미신; 카페시타빈; 수용체 티로신 키나제 및/또는 혈관생성의 억제제, 예컨대 NEXAVAR®(소라페닙), SUTENT®(수니티닙), VOTRIENT™(파조파닙), PALLADIA™(토세라닙), ZACTIMA™(반데타닙), RECENTIN®(세디라닙), 래고라페닙(BAY 73-4506), 악시티닙(AG013736), 레스타우르티닙(CEP-701), TARCEVA®(에를로티닙), IRESSA™(계피티닙), Gilotrif®(아파티닙), TYKERB®(라파티닙), 네라티닙 등, 및 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체. 이러한 정의에서는 종양에 대한 호르몬 작용을 조절 또는 억제하도록 작용하는 항-호르몬제, 예컨대 하기가 또한 포함된다: 항-에스트로겐제 - 예를 들어, 타목시펜, 랄록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY 117018, 오나프리스톤, 및 FARESTON®(토레미펜)을 포함함 -; 및 항-안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 바이칼루타미드, 류프롤라이드, 및 고세레릴; 및 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체. 문헌 [Wiemann et al., 1985, in *Medical Oncology* (Calabresi et al., eds.), Chapter 10, McMillan Publishing]에 개시된 것들과 같은 다른 종래의 세포독성 화학적 화합물이 또한 본 발명의 방법에 적용가능하다.

[0252] 본 발명의 방법에서 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 병용하여 사용될 수 있는 예시적인 작용제는 티로신 키

나제 억제제 및 표적화된 항암 요법, 예컨대 IRESSA™(게피티닙) 및 Tarceva®(에를로티닙) 및 HER2, HER3, HER4 또는 VEGF의 다른 길항제를 포함한다. 예시적인 HER2 길항제는 CP-724-714, HERCEPTIN™(트라스투주맙), OMNITARG™(페르투주맙), TAK-165, TYKERB®(라파티닙)(EGFR 및 HER2 억제제), 및 GW-282974를 포함한다. 예시적인 HER3 길항제는 항-Her3 항체를 포함한다(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2004/0197332호 참조). 예시적인 HER4 길항제는 항-HER4 siRNA를 포함한다(예를 들어, 문헌[Maatta *et al.*, Mol Biol Cell 17: 67-79, 2006] 참조). 예시적인 VEGF 길항제는 Avastin™(베바시주맙)이다.

- [0253] 본 발명의 방법에서의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 병용하여 사용될 수 있는 예시적인 작용제는 고형 종양을 위한 표준 치료 약물, 또는 면역 관문 억제제를 포함한다.
- [0254] 본 발명의 방법에서의 제2 치료제는 면역 관문 억제제일 수 있다.
- [0255] 일부 실시 형태에서, 면역 관문 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-LAG3 항체, 항-TIM3 항체, 또는 항-CTLA-4 항체이다.
- [0256] 일부 실시 형태에서, 면역 관문 억제제는 길항적 항-PD-1 항체, 길항적 항-PD-L1 항체, 길항적 항-PD-L2 항체, 길항적 항-LAG3 항체, 또는 길항적 항-TIM3 항체이다.
- [0257] 일부 실시 형태에서, 면역 관문 억제제는 항-PD-1 항체이다.
- [0258] 일부 실시 형태에서, 면역 관문 억제제는 항-PD-L1 항체이다.
- [0259] 일부 실시 형태에서, 면역 관문 억제제는 항-PD-L2 항체이다.
- [0260] 일부 실시 형태에서, 면역 관문 억제제는 항-LAG3 항체이다.
- [0261] 일부 실시 형태에서, 면역 관문 억제제는 항-TIM3 항체이다.
- [0262] 일부 실시 형태에서, 면역 관문 억제제는 항-CTLA-4 항체이다.
- [0263] 임의의 길항적 항-PD-1 항체는 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 항-PD-1 항체는 OPVIDO®(니볼루맙) 및 KEYTRUDA®(펨브롤리주맙)이다. OPVIDO®(니볼루맙)는, 예를 들어 미국 특허 제8,008,449호(항체 5C4)에 기재되어 있고, 서열 번호 24의 VH 및 서열 번호 25의 VL을 포함한다. KEYTRUDA®(펨브롤리주맙)는, 예를 들어 미국 특허 제8,354,509호에 기재되어 있고, 서열 번호 22의 VH 및 서열 번호 23의 VL을 포함한다. 니볼루맙 및 펨브롤리주맙의 아미노산 서열은 또한 CAS 레지스트리를 통해 입수 가능하다. 사용될 수 있는 추가의 PD-1 항체는 미국 특허 제7,332,582호, 미국 특허 출원 공개 제2014/0044738호, 국제 특허 출원 공개 WO2014/17966호 및 미국 특허 출원 공개 제2014/0356363호에 기재되어 있다.
- [0264] "길항제"는, 세포 단백질에 결합될 때, 단백질의 천연 리간드에 의해 유도되는 적어도 하나의 반응 또는 활성을 억제하는 문자를 지칭한다. 문자는, 적어도 하나의 반응 또는 활성이, 길항제의 부재 하에서(예를 들어, 음성 대조군) 억제되는 적어도 하나의 반응 또는 활성보다 적어도 약 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 더 많이 억제될 때, 또는 그러한 억제가 길항제의 부재 하에서의 억제에 비하여 통계학적으로 유의할 때, 길항제이다. 길항제는 항체, 가용성 리간드, 소분자, DNA 또는 RNA, 예컨대 siRNA일 수 있다. 예를 들어 PD-1이 그의 수용체 PD-L1 또는 PD-L2에 결합함으로써 유도되는 전형적인 반응 또는 활성은 항원-특이적 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포 증식의 감소 또는 T 세포에 의한 인터페론-γ(IFN-γ) 생성의 감소일 수 있으며, 이는, 예를 들어 종양에 대한 면역 반응의 억제를 초래한다. TIM-3이 그의 수용체, 예컨대 갈렉틴-9에 결합함으로써 유도되는 전형적인 반응 또는 활성은 항원 특이적 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포 증식의 감소, T 세포에 의한 감소된 IFN-γ 생성의 감소, 또는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포 상에서의 CD137 표면 발현의 감소일 수 있으며, 이는, 예를 들어 종양에 대한 면역 반응의 억제를 초래한다. 따라서, PD-1과 특이적으로 결합하는 길항적 PD-1 항체, 길항적 PD-L2, TIM-3과 특이적으로 결합하는 길항적 항체는 억제 경로를 억제함으로써 면역 반응을 유도한다.
- [0265] 서열 번호 22
- [0266] QVQLVQSGVEVKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTTDSSTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYR FDMGFDYWGQGTTVSS
- [0267] 서열 번호 23

- [0268] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFLTISSEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF
GGGTKVEIK
- [0269] 서열 번호 24
- [0270] QVQLVESGGGVVQPGRLSLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDY
WGQGTLVTVSS
- [0271] 서열 번호 25
- [0272] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFLTISSEPEDFAVYYCQQSSNW PRTFGQGT
KVEIK
- [0273] 면역 반응을 항상시키는 항-PD-L1 항체가 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다(예를 들어, 길항적 항-PD-L1 항체). 사용될 수 있는 예시적인 항-PD-L1 항체는 두르발루맙, 아테졸리주맙 및 아벨루맙, 및, 예를 들어 미국 특허 출원 공개 제2009/0055944호, 미국 특허 제8,552,154호, 미국 특허 제8,217,149호 및 미국 특허 제8,779,108호에 기재된 것들이다.
- [0274] 두르발루맙은 서열 번호 26의 VH 및 서열 번호 27의 VL을 포함한다.
- [0275] 아테졸리주맙은 서열 번호 28의 VH 및 서열 번호 29의 VL을 포함한다.
- [0276] 아벨루맙은 서열 번호 30의 VH 및 서열 번호 31의 VL을 포함한다.
- [0277] 서열 번호 26
- [0278] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVAN IKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG
GWFGELAFDYWGQGTLVTVSS
- [0279] 서열 번호 27
- [0280] EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQK
PGQAPRLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS LPWTFGQGTKVEIK
- [0281] 서열 번호 28
- [0282] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWP
GGFDYWGQGTLVTVSS
- [0283] 서열 번호 29
- [0284] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGT
KVEIK
- [0285] 서열 번호 30
- [0286] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLG
TVTTVDYWGQGTLVTVSS
- [0287] 서열 번호 31
- [0288] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGSSDVGGNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYTSSSTRVFG
TGTKVTVL
- [0289] 본 발명은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 서열 번호 24의 VH 및 서열 번호 25의 VL을 포함하는 항-PD-1 항체와 병용하여 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- [0290] 본 발명은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 서열 번호 22의 VH 및 서열 번호 23의 VL을 포함하는 항-PD-1 항체와 병용하여 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.

분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.

[0304] 본 발명은 또한 폐암을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 길항적 항-PD-L2 항체와 병용하여 폐암의 치료를 필요로 하는 환자에게 폐암을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.

[0305] 본 발명은 또한 전립선암을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 길항적 항-PD-1 항체와 병용하여 전립선암의 치료를 필요로 하는 환자에게 전립선암을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.

[0306] 본 발명은 또한 전립선암을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 길항적 항-PD-L1 항체와 병용하여 전립선암의 치료를 필요로 하는 환자에게 전립선암을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.

[0307] 본 발명은 또한 전립선암을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 길항적 항-PD-L2 항체와 병용하여 전립선암의 치료를 필요로 하는 환자에게 전립선암을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.

[0308] 면역 반응을 향상시키는 항-LAG-3 항체가 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 항-LAG-3 항체는, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 WO2010/019570호에 기재된 것들이다.

[0309] 면역 반응을 향상시키는 항-CTLA-4 항체가 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙이다.

[0310] 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-PD-L2, 항-LAG3, 항-TIM3 및 항-CTLA-4 항체는 또한 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 드 노보로 생성될 수 있다.

[0311] 일부 실시 형태에서, 서열 번호 32의 VH 및 서열 번호 33의 VL을 포함하는 항-PD1 항체가 사용될 수 있다.

[0312] 일부 실시 형태에서, 서열 번호 34의 VH 및 서열 번호 35의 VL을 포함하는 항-PD1 항체가 사용될 수 있다.

[0313] 일부 실시 형태에서, 서열 번호 36의 VH 및 서열 번호 37의 VL을 포함하는 항-TIM-3 항체가 사용될 수 있다.

[0314] 일부 실시 형태에서, 서열 번호 38의 VH 및 서열 번호 39의 VL을 포함하는 항-TIM-3 항체가 사용될 수 있다.

[0315] 서열 번호 32

[0316] QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGI IPIFDTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPGLAAAYDTGSLDYWGQGTLTVSS

[0317] 서열 번호 33

[0318] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFAVYYCQQRNYWPLTFGQGT KVEIK

[0319] 서열 번호 34

[0320] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSRYDMSWVRQAPGKGLESVAYISGGGANTYYLDNVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPYLS YFDVWGQGTLTVSS

[0321] 서열 번호 35

[0322] EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSLSDYLHWYQQKPGQAPRLLIKSASQSISGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQNGHSFPYTFGQGT KLEIK

[0323] 서열 번호 36

[0324] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPYA PLDYWGQGTLTVSS

[0325] 서열 번호 37

[0326] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNDYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFAVYYCQQGGHAPI TFGQGT KVEIK

- [0327] 서열 번호 38
- [0328] EVQLVQSGAEVKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMQWVRQMPGKGLEWMGAIYPGDGDIRYTQNFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARWEKS
TTVVQRNYFDYWGQGTTVTVSS
- [0329] 서열 번호 39
- [0330] DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASENVGTFVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRTGVPSRFSGSQGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQSYSYPTFGQGTK
LEIK
- [0331] 본 발명은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 서열 번호 32의 VH 및 서열 번호 33의 VL을 포함하는 항-PD-1 항체와 병용하여 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- [0332] 본 발명은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 서열 번호 34의 VH 및 서열 번호 35의 VL을 포함하는 항-PD-1 항체와 병용하여 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- [0333] 본 발명은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 서열 번호 36의 VH 및 서열 번호 37의 VL을 포함하는 항-TIM-3 항체와 병용하여 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- [0334] 본 발명은 또한 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 서열 번호 38의 VH 및 서열 번호 39의 VL을 포함하는 항-TIM-3 항체와 병용하여 고형 종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 고형 종양을 치료하기에 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 포함한다.
- [0335] 본 발명의 방법에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 제2 치료제의 병용물은 임의의 편리한 시간프레임에 걸쳐 투여될 수 있다. 예를 들어, CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 제2 치료제는 동일한 날에, 그리고 심지어는 동일한 정맥내 주입으로 환자에게 투여될 수 있다. 그러나, CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 제2 치료제는 또한 하루씩 교대로, 또는 1주씩 또는 1개월씩 교대로, 기타 등등으로 투여될 수 있다. 일부 방법에서, CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 제2 치료제는 치료되고 있는 환자에서 이들이 검출가능한 수준으로 (예를 들어, 혈청 중에) 동시에 존재하기에 충분한 시간 근접성을 두고서 투여될 수 있다. 일부 방법에서, 일정 기간에 걸쳐 다회의 용량들로 이루어진 CD38과 특이적으로 결합하는 항체에 의한 전체 치료 과정 이후에 또는 이전에 다회의 용량들로 이루어진 제2 치료제에 의한 치료 과정이 행해진다. 1일, 2일 또는 수일 또는 수주의 회복 기간이 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 제2 치료제의 투여 사이에서 사용될 수 있다.
- [0336] CD38과 특이적으로 결합하는 항체 또는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 제2 치료제의 병용물은 외부 빔 방사, 세기 조절 방사선 요법(intensity modulated radiation therapy)(IMRT), 집속 방사(focused radiation), 및 임의의 형태의 방사선 수술 - 감마 나이프(Gamma Knife), 사이버나이프(Cyberknife), 리낙(Linac), 및 조직내 방사(interstitial radiation)(예를 들어, 이식된 방사성 시드, 글리아사이트 벌룬(GliaSite balloon))를 포함함 - 을 포함하는 임의의 형태의 방사선 요법과 함께 그리고/또는 수술과 함께 투여될 수 있다.
- [0337] 사용될 수 있는 집속 방사 방법은 정위적 방사선 수술(stereotactic radiosurgery), 분할 정위적 방사선 수술(fractionated stereotactic radiosurgery), 및 세기-조절 방사선 요법(IMRT)을 포함한다. 정위적 방사선 수술이, 주위 비종양성 정상 조직을 피하면서, 종양성 조직, 예를 들어 뇌 종양에의 방사선의 정확한 전달을 수반함은 명백하다. 정위적 방사선 수술을 사용하여 적용되는 방사선의 선량은 전형적으로 1 Gy 내지 약 30 Gy로 변동될 수 있고, 예를 들어 1 내지 5, 10, 15, 20, 25, 최대 30 Gy 선량을 포함한 중간 범위를 포함할 수 있다. 비침습적 고정 장치로 인해, 정위적 방사는 단회 치료로 전달될 필요는 없다. 치료 계획은 신뢰성 있게 매일(day-to-day) 중복될 수 있으며, 그럼으로써 전달되는 방사선의 다회 분할 선량을 가능하게 한다. 시간 경과에 따라 종양을 치료하는 데 사용되는 경우, 이러한 방사선 수술은 "분할 정위적 방사선 수술" 또는 FSR로 지칭된다. 대조적으로, 정위적 방사선 수술은 원-세션(one-session) 치료를 지칭한다. 분할 정위적 방사선 수술은 높은 치료가능비(therapeutic ratio), 즉 종양 세포의 높은 치사율 및 정상 조직에 대한 낮은 영향을 가져올 수

있다. 종양 및 정상 조직은 다회의 더 작은 선량의 방사선과 대비하여 높은 단회 선량의 방사선에 대해 상이하게 반응한다. 단회의 큰 선량의 방사선은 수회의 더 작은 선량의 방사선보다 더 많은 정상 조직을 치사시킬 수 있다. 따라서, 다회의 더 작은 선량의 방사선은 정상 조직은 그대로 두면서 더 많은 종양 세포를 치사시킬 수 있다. 분할 정위적 방사를 사용하여 적용되는 방사선의 선량은 1 Gy 내지 약 50 Gy 범위로 변동될 수 있고, 예를 들어 1 내지 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 최대 50 Gy 저분할(hypofractionated) 선량을 포함한 중간 범위를 포함할 수 있다. 세기-조절 방사선 요법(IMRT)이 또한 사용될 수 있다. IMRT는 진보된 방식의 고정밀 3차원 입체조형 방사선 요법(three-dimensional conformal radiation therapy)(3DCRT)이며, 이는 컴퓨터-제어 선형 가속기를 사용하여 정확한 방사 선량을 악성 종양에 또는 종양 내의 특정 영역에 전달한다. 3DCRT에서, 각각의 방사선 빔의 프로파일은 다엽 시준기(multileaf collimator)(MLC)를 사용함으로써 다수의 빔을 생성하여 빔 방향상(beam's eye view)(BEV)으로부터 표적의 프로파일을 적합시키도록 형상화된다. IMRT는 다수의 작은 부피에서 방사선 빔의 세기를 조절함으로써 방사 선량이 종양의 3차원(3-D) 형상에 더 정확하게 정합될 수 있게 한다. 따라서, IMRT는 주위의 정상 중요 구조에 대해서는 선량을 최소화하면서, 더 높은 방사 선량이 종양 내의 영역에 집속될 수 있게 한다. IMRT는 치료 부피를 오목한 종양 형상에 정합하는 능력을 개선하는데, 이는, 예를 들어, 종양이 취약한 구조, 예컨대 척수 또는 주요 기관 또는 혈관 주위를 둘러싸고 있을 때이다.

[0338] CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 하이알루로니다제를 포함하는 약제학적 조성물의 피하 투여

CD38과 특이적으로 결합하는 항체는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 하이알루로니다제를 포함하는 약제학적 조성물로서 피하 투여될 수 있다.

피하 투여되는 약제학적 조성물 중의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 농도는 약 20 mg/ml일 수 있다.

피하 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,200 mg 내지 1,800 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.

피하 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,200 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.

피하 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,600 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.

피하 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,800 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 포함할 수 있다.

피하 투여되는 약제학적 조성물은 약 30,000 U 내지 45,000 U의 하이알루로니다제를 포함할 수 있다.

피하 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,200 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 약 30,000 U의 하이알루로니다제를 포함할 수 있다.

피하 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,800 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 약 45,000 U의 하이알루로니다제를 포함할 수 있다.

피하 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,600 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 약 30,000 U의 하이알루로니다제를 포함할 수 있다.

피하 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,600 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 약 45,000 U의 하이알루로니다제를 포함할 수 있다.

피하 투여되는 약제학적 조성물은 서열 번호 40의 아미노산 서열을 갖는 하이알루로니다제 rHuPH20을 포함할 수 있다.

rHuPH20은 재조합 하이알루로니다제(HYLENEX® 재조합)이고, 국제 특허 출원 공개 WO2004/078140호에 기재되어 있다.

하이알루로니다제는 하이알루론산을 분해하는 효소(EC 3.2.1.35)이고, 세포외 기질 내의 하이알루로난의 점도를 낮추고, 그럼으로써 조직 침투성을 증가시킨다.

[0353] 서열 번호 40

MGVLKFKHIFFRSFVKSSGVSQIVFTFLLIPCCLTLNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQVTIFYVDRLGYYPI
DSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTWARNWPKDVYKNRSIELVQQQNQLSLTEATEKAKQEFEKAGKDFLVEI
KLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDDLSWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRI
VFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIWIWGLSIMRSMKSCLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSCVLCQEKGVCIRKNWNSSDYLHLNPDNFAIQ

LEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEADVKDTCADVCIADGVCIDAFLKPPMETEEPQIFYNASPSTLSATMFIVSILFLIISSVASL

- [0355] CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 하이알루로니다제를 포함하는 약제학적 조성물의 투여는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 그 이상 후에 반복될 수 있다. 만성 투여인 바와 같이, 반복된 치료 과정이 또한 가능하다. 반복 투여는 동일한 용량으로 또는 상이한 용량으로 행해질 수 있다. 예를 들어, CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 하이알루로니다제를 포함하는 약제학적 조성물은 8주 동안 주 1회, 이어서 16주 동안 2주마다 1회, 이어서 4주마다 1회 투여될 수 있다. 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,200 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 약 30,000 U의 하이알루로니다제를 포함할 수 있으며, 약제학적 조성물 내의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 농도는 약 20 mg/ml이다. 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,800 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 약 45,000 U의 하이알루로니다제를 포함할 수 있다. 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,600 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 약 30,000 U의 하이알루로니다제를 포함할 수 있다. 투여되는 약제학적 조성물은 약 1,600 mg의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 약 45,000 U의 하이알루로니다제를 포함할 수 있다.
- [0356] CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 하이알루로니다제를 포함하는 약제학적 조성물은 복부 부위에 피하 투여될 수 있다.
- [0357] CD38과 특이적으로 결합하는 항체 및 하이알루로니다제를 포함하는 약제학적 조성물은 약 80 ml, 90 ml, 100 ml, 110 ml 또는 120 ml의 총 부피로 투여될 수 있다.
- [0358] 투여를 위하여, 25 mM 소듐 아세테이트, 60 mM 염화나트륨, 140 mM D-만니톨, 0.04% 폴리소르베이트 20, pH 5.5 중 20 mg/ml의 CD38과 특이적으로 결합하는 항체가 10 mM L-히스티딘, 130 mM NaCl, 10 mM L-메티오닌, 0.02% 폴리소르베이트 80, pH 6.5 중 rHuPH20, 1.0 mg/mL(75 내지 150 kU/mL)와 혼합된 후, 이 혼합물을 대상체에게 투여할 수 있다.
- [0359] 본 발명을 일반적인 개념으로 설명하였지만, 본 발명의 실시 형태는 하기 실시예에서 추가로 개시될 것이며, 이 때 실시예는 청구범위의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0360] **본 발명의 추가의 실시 형태**
- [0361] 본 명세서의 어딘가 다른 곳에 있는 본 개시내용에 따른 본 발명의 특정의 추가 실시 형태들이 하기에 나열되어 있다. 본 명세서에 개시된 본 발명과 관련된 것으로서 기재된 상기에 나열된 본 발명의 실시 형태들로부터의 특징은 또한 이를 추가의 넘버링된 실시 형태들 각각 하나하나와 관련된다.
- [0362] 1. 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 데 사용하기 위한 CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0363] 2. 조절성 T 세포(Treg) 매개 질병을 갖는 환자를 치료하는 데 사용하기 위한 CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0364] 3. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 골수계-유래 억제 세포(MDSC) 매개 질병을 갖는 환자를, CD38과 특이적으로 결합하는 항체의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하여 치료하는 데 사용하기 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0365] 4. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 조절성 T 세포(Treg)의 활성을, 조절성 T 세포를 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계를 포함하여 억제하는 데 사용하기 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0366] 5. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 골수계-유래 억제 세포(MDSC)의 활성을, MDSC를 CD38과 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계를 포함하여 억제하는 데 사용하기 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0367] 6. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 고형 종양을 갖는 환자를, CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 환자에게 투여함으로써 환자에서 조절성 T 세포의 수를 감소시키는 단계를 포함하여 치료하는 데 사용하기 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0368] 7. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 고형 종양을 갖는 환자를, CD38과 특이적으로 결합하는 항체를 환자에게 투여함으로써 환자에서 골수계-유래 억제 세포(MDSC)의 수를 감소시키는 단계를 포함하여 치료하는 데 사용하기 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0369] 8. 실시 형태 1 내지 실시 형태 7 중 어느 하나에 있어서, 항체는 환자에서 면역 반응을 유도하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.

- [0370] 9. 실시 형태 1 내지 실시 형태 8 중 어느 하나에 있어서, 면역 반응은 이펙터 T 세포(Teff) 반응인, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0371] 10. 실시 형태 1 내지 실시 형태 9 중 어느 하나에 있어서, Teff 반응은 $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포에 의해 매개되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0372] 11. 실시 형태 9 또는 실시 형태 10에 있어서, Teff 반응은 $CD8^+$ T 세포에 의해 매개되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0373] 12. 실시 형태 1 내지 실시 형태 11 중 어느 하나에 있어서, Teff 반응은 $CD8^+$ T 세포의 수의 증가, 증가된 $CD8^+$ T 세포 증식, 증가된 T 세포 클론 증폭, 증가된 $CD8^+$ 기억 세포 형성, 증가된 항원-의존성 항체 생성, 또는 증가된 사이토카인, 케모카인 또는 인터류킨 생성인, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0374] 13. 실시 형태 1 내지 실시 형태 13 중 어느 하나에 있어서, 항체는 면역 억제 세포의 기능을 억제하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0375] 14. 실시 형태 1 내지 실시 형태 14 중 어느 하나에 있어서, 면역 억제 세포는 조절성 T 세포(Treg) 또는 골수계-유래 억제 세포(MDSC)인, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0376] 15. 실시 형태 15에 있어서, Treg는 $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{\text{dim}}$ T 세포인, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0377] 16. 실시 형태 14 또는 실시 형태 15에 있어서, Treg는 CD38을 발현하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0378] 17. 실시 형태 13 내지 실시 형태 16 중 어느 하나에 있어서, Treg 기능은 Treg 사멸에 의해 억제되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0379] 18. 실시 형태 17에 있어서, Treg 사멸은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체에 의해 유도된 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP), 세포-의존성 세포독성(CDC) 또는 아폽토시스에 의해 매개되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0380] 19. 실시 형태 17 또는 실시 형태 18에 있어서, Treg 사멸은 ADCC에 의해 매개되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0381] 20. 제17항 내지 제19항 중 어느 하나에 있어서, Treg의 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58% 또는 60%가 사멸되는, 방법.
- [0382] 21. 실시 형태 14에 있어서, MDSC는 $CD11b^+HLA-DR^-CD14^-CD33^+CD15^+$ 세포인, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0383] 22. 실시 형태 21에 있어서, $CD11b^+HLA-DR^-CD14^-CD33^+CD15^+$ 세포는 CD38을 발현하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0384] 23. 실시 형태 21 또는 실시 형태 22에 있어서, MDSC 기능은 MDSC 사멸에 의해 억제되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0385] 24. 실시 형태 23에 있어서, MDSC 사멸은 CD38과 특이적으로 결합하는 항체에 의해 유도된 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP), 보체-의존성 세포독성(CDC) 또는 아폽토시스에 의해 매개되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0386] 25. 실시 형태 23 또는 실시 형태 24에 있어서, MDSC 사멸은 ADCC에 의해 매개되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0387] 26. 실시 형태 23 내지 실시 형태 25 중 어느 하나에 있어서, MDSC의 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%,

30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58% 또는 60%가 사멸되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.

- [0388] 27. 실시 형태 14 내지 실시 형태 26 중 어느 하나에 있어서, Teff 또는 면역 억제 세포는 골수 또는 말초 혈액 중에 존재하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0389] 28. 실시 형태 14 내지 실시 형태 27 중 어느 하나에 있어서, 고형 종양은 흑색종, 폐암, 편평 비소세포 폐암 (NSCLC), 비편평 NSCLC, 결직장암, 전립선암, 거세-저항성 전립선암, 위암, 난소암, 위암, 간암, 췌장암, 갑상선암, 두경부의 편평 세포 암종, 식도 또는 위장관의 암종, 유방암, 나팔관암, 뇌암, 요도암, 비뇨생식기암, 자궁내막증, 자궁경부암 또는 상기 암의 전이성 병변인, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0390] 29. 실시 형태 1 내지 실시 형태 28 중 어느 하나에 있어서, 고형 종양은 CD38 발현이 부재하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0391] 30. 실시 형태 1 내지 실시 형태 29 중 어느 하나에 있어서, 항체는, CD38에 결합하기 위하여, 서열 번호 4의 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열 번호 5의 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항체와 경쟁하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0392] 31. 실시 형태 1 내지 실시 형태 30 중 어느 하나에 있어서, 항체는 적어도 인간 CD38(서열 번호 1)의 영역 SKRNIQFSCKNIYR(서열 번호 2) 및 영역 EKVQTLEAWVIHGG(서열 번호 3)에 결합하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0393] 32. 실시 형태 1 내지 실시 형태 31 중 어느 하나에 있어서, 항체는, 각각 서열 번호 6, 7 및 8의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR) 1(HCDR1), 2(HCDR2) 및 3(HCDR3) 서열을 포함하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0394] 33. 실시 형태 1 내지 실시 형태 32 중 어느 하나에 있어서, 항체는, 각각 서열 번호 9, 10 및 11의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR) 1(LCDR1), 2(LCDR2) 및 3(LCDR3) 서열을 포함하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0395] 34. 실시 형태 1 내지 실시 형태 33 중 어느 하나에 있어서, 항체는, 각각 서열 번호 6, 7, 8, 9, 10 및 11의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3 서열을 포함하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0396] 35. 실시 형태 1 내지 실시 형태 34 중 어느 하나에 있어서, 항체는, 서열 번호 4와 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 VH 및 서열 번호 5와 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 VL을 포함하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0397] 36. 실시 형태 1 내지 실시 형태 31 중 어느 하나에 있어서, 항체는 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0398] 37. 실시 형태 1 내지 실시 형태 29 중 어느 하나에 있어서, 항체는
- [0399] a. 서열 번호 14의 VH 및 서열 번호 15의 VL;
- [0400] b. 서열 번호 16의 VH 및 서열 번호 17의 VL;
- [0401] c. 서열 번호 18의 VH 및 서열 번호 19의 VL; 또는
- [0402] d. 서열 번호 20의 VH 및 서열 번호 21의 VL의 HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0403] 38. 실시 형태 37에 있어서, 항-CD38 항체는
- [0404] a. 서열 번호 14의 VH 및 서열 번호 15의 VL;
- [0405] b. 서열 번호 16의 VH 및 서열 번호 17의 VL;
- [0406] c. 서열 번호 18의 VH 및 서열 번호 19의 VL; 또는
- [0407] d. 서열 번호 20의 VH 및 서열 번호 21의 VL을 포함하는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.

- [0408] 39. 실시 형태 1 내지 실시 형태 38 중 어느 하나에 있어서, 항체는 제2 치료제와 병용하여 투여되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0409] 40. 실시 형태 39에 있어서, 제2 치료제는 화학치료제, 표적화된 항암 요법, 고형 종양의 치료를 위한 표준 치료 약물, 또는 면역 관문 억제제인, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0410] 41. 실시 형태 40에 있어서, 면역 관문 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L2 항체, 항-LAG3 항체, 항-TIM3 항체, 또는 항-CTLA-4 항체인, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0411] 42. 실시 형태 39에 있어서, 제2 치료제는 동시에, 순차적으로 또는 개별적으로 투여되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0412] 43. 실시 형태 39 내지 실시 형태 42 중 어느 하나에 있어서, 환자는 방사선 요법으로 치료되는, 상기 사용을 위한, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0413] 44. 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0414] 45. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하고, 상기 항체는 서열 번호 22의 VH 및 서열 번호 23의 VL을 포함하는 항-PD-1 항체와 병용하여 투여되는, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0415] 46. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하고, 상기 항체는 서열 번호 24의 VH 및 서열 번호 25의 VL을 포함하는 항-PD-1 항체와 병용하여 투여되는, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0416] 47. 환자에서 면역 반응을 향상시키는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하는 CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0417] 48. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 환자에서 면역 반응을 향상시키는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하고, 상기 항체는 서열 번호 22의 VH 및 서열 번호 23의 VL을 포함하는 항-PD-1 항체와 병용하여 투여되는, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0418] 49. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 환자에서 면역 반응을 향상시키는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하고, 상기 항체는 서열 번호 24의 VH 및 서열 번호 25의 VL을 포함하는 항-PD-1 항체와 병용하여 투여되는, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0419] 50. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하고, 상기 항체는 서열 번호 26의 VH 및 서열 번호 27의 VL을 포함하는 항-PD-L1 항체와 병용하여 투여되는, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0420] 51. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하고, 상기 항체는 서열 번호 28의 VH 및 서열 번호 29의 VL을 포함하는 항-PD-L1 항체와 병용하여 투여되는, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0421] 52. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 고형 종양을 갖는 환자를 치료하는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하고, 상기 항체는 서열 번호 30의 VH 및 서열 번호 31의 VL을 포함하는 항-PD-L1 항체와 병용하여 투여되는, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0422] 53. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 환자에서 면역 반응을 향상시키는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하고, 상기 항체는 서열 번호 26의 VH 및 서열 번호 27의 VL을 포함하는 항-PD-L1 항체와 병용하여 투여되는, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0423] 54. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 환자에서 면역 반응을 향상시키는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하고, 상기 항체는 서열 번호 28의 VH 및 서열 번호 29의 VL을 포함하는 항-PD-L1 항체와 병용하여 투여되는, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.
- [0424] 55. CD38과 특이적으로 결합하는 항체로서, 환자에서 면역 반응을 향상시키는 데 사용하기 위한 서열 번호 4의 VH 및 서열 번호 5의 VL을 포함하고, 상기 항체는 서열 번호 30의 VH 및 서열 번호 31의 VL을 포함하는 항-PD-L1 항체와 병용하여 투여되는, CD38과 특이적으로 결합하는 항체.

[0425] 실시예 1. 일반적 재료 및 방법

[0426] 샘플 수집 및 처리

[0427] 말초 혈액 및 골수 흡인물을 제1 주입 직전 기저선에서, 그리고 치료 동안 지정된 시점에서 혼파린 첨가 투브 내에 수집하였다. 샘플의 대부분을, 이들이 수집 후 24 내지 48시간째에 중앙 실험실에 도착하였을 때, 실시간 유세포측정을 사용하여 평가하였다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 전혈로부터 얻고, 밀도-구배 원심분리에 의해 단리하고, 분석 시까지 동결 상태로 저장하였다. T-세포 활성화, 클론성, 및 CD38⁺ Treg 억제 검정에 대하여, 치료전 및 치료후 샘플을 동결된 PBMC 샘플을 사용하여 동시에 분석하였다.

[0428] 검증전 면역표현형분석 검정을 사용하여 NK, T, B, 골수종 세포(CD138⁺) 및 CD38 발현의 평가를 위하여, 이들 샘플의 유세포측정 분석을 BARC Global Central Laboratory에서 수행하였다. 간략하게 말하면, 혈액 샘플 및 골수 샘플을 하기 멀티플루오로크롬(multifluorochrome) 항체 패널로 염색하였다: 세포 계통 패널: PerCP Cy5.5 α-CD19 (clone HIB19; Becton Dickinson [BD]), APC α-CD24 (SN3; eBioscience), PC7 α-CD3 (UCHT-1; Beckman Coulter), V500 α-CD16 (3G8; BD), 및 PE α-CD56 (MY; BD); 조절성 T 세포(Treg) 패널: APC α-CD25 (2A3; BD), PE α-CD127 (HIL-7R-M21; BD), APC-H7 α-HLA-DR (G46-6; BD), 및 PerCP α-CD4 (L200; BD); 나이브/기억 T-세포 패널: APC-H7 α-CD4 (RPA-T4; BD), PerCP-Cy5.5 α-CD8 (RPA-T4 BD), PE α-CD62L (SK11; BD), 및 APC α-CD45RA (HI100; BD). 서열 번호 14 및 서열 번호 15의 VH 및 VL 서열을 갖는 미국 특허 제7,829,693호에 기재된 Alexa 647 표지 항체 mAb 003을 사용하여 CD38 발현을 평가하였다. 상이한 용해-세척(Lyse-wash) 방법을 사용하여 혈액 샘플을 제조하였다. 골수 흡인물 샘플의 경우, 다양한 항체를 사용하여 막 또는 세포내 염색을 수행하였다. Becton Dickinson FACSLysing 용액을 말초 혈액 샘플 중의 적혈구의 용해를 위하여 사용하였고, Invitrogen으로부터의 Fix and Perm 세포 투과화 시약을 골수 흡인물 샘플의 세포내 염색을 위하여 사용하였다. 염색된 샘플을 FACS Canto II 유세포측정기 상에서 획득하고, FacsDiva 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석하였다. 골수 샘플 중의 립프구의 퍼센트로서의 그리고 혈액 샘플 중의 면역 세포 집단의 절대 카운트를 시험된 모든 시점에서 결정하였다.

[0429] T-세포 수용체(TCR) 서열분석

[0430] T-세포 다양성을 TCR 재배열의 심층 서열분석에 의해 분석하여, PBMC 샘플로부터의 게놈 DNA를 사용하여 CD8⁺ T-세포 클론성을 평가하였다. Adaptive Biotechnologies commercial Immunoseq™ 검정을 사용하여 TCR 서열분석을 수행하고, 사전승인된 멀티플렉스 중합효소 연쇄 반응(PCR) 검정(TR2015CRO-V-019)을 사용하여 분석을 수행하였는데, 이것은 정방향 및 역방향 프라이머로 구성되었으며, 이들 프라이머는 가변(V) 유전자(정방향 프라이머) 및 결합(J) 유전자(역방향 프라이머)의 패밀리를 직접 표적화하였다. 각각의 V 및 J 유전자 프라이머는 프라이밍 쌍으로서 작용하여 체세포적으로 재조합된 TCR을 증폭시키고, 각각의 프라이머는 특이적 범용 DNA 서열을 함유하였다. 초기 PCR 증폭 후에, Illumina에 의한 DNA 서열분석에 필요한 범용 서열 및 어댑터 서열을 함유하는 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 각각의 앰플리콘을 재차 증폭시켰다.

[0431] 바이러스성- 및 동종항원에 대한 T-세포 반응

[0432] 환자 PBMC를 96웰 플레이트(2×10^5 개 세포/웰) 상에 시딩(seeding)하고, 인간 거대세포바이러스(CMV), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus)(EBV), 및 인플루엔자 바이러스로부터의 23개의 주요 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I-제한 바이러스성 웨티드들의 각테일(2 μg/ml; CEF 웨티드 풀; PANATEcs[®]), 또는 건강한 공여자로부터의 동등한 수의 25-Gy 조사 동종이계 PBMC로 5일 동안 자극하였다. 비자극 PBMC 및 항-CD3/CD28-코팅 비드로 자극된 PBMC는 각각 음성 및 양성 대조군으로서의 역할을 하였다. 일주 5에, 샌드위치 효소-결합 면역흡착 검정(ELISA; Human IFN gamma ELISA Ready-SET-Go; eBioscience)에 의해 무세포 상층액으로부터의 인터페론 γ(IFN-γ)를 측정하고, T-세포 활성화에 대한 대비 마커로서의 역할을 하였다.

[0433] 이펙터 세포 기능의 조절성 T-세포(Treg) 억제: 카르복시플루오레세인 석신이미딜(CFSE) 희석 검정

[0434] 건강한 공여자로부터의 PBMC를 PerCP-Cy5.5 α-CD3 (SK7; BD), KO α-CD45 (J33; Beckman Coulter), V450 α-CD4 (SK3; BD), PE α-CD25 (M-A251, BD), PE Cy7 α-CD127 (HIL-7R-M21; BD), 및 APC α-CD38 (HB-7; BD)로 표지하고, FACS Aria (BD)에 의해 분류하였다. 분류된 이펙터 세포를 카르복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE; eBioscience)로 표지하고, RPMI + 10% 소태아 혈청 중 CD38⁺ Treg 또는 CD38⁻ Treg(1:1 Treg 대 이펙터 세포 비)의 존재 또는 부재 하에서 항-CD3/CD28-코팅 비드로 자극하였다. 72시간 후에, 유세포측정을

수행하고, T-세포 증식에 대한 대리물로서 CFSE의 % 희석률을 사용하였다.

[0435] 골수계-유래 억제 세포(MDSC) 표현형 분석 및 DARZALEX™(다라투무맙)-매개 ADCC

3명의 정상적인 건강한 공여자로부터의 PBMC를 6일 동안 골수종 종양 세포주(RPMI8226, U266, H929)와 함께 공동-배양하고, 문헌[Gorgun *et al.*, Blood 121:2975-87, 2013]에 기재된 바와 같이 과립구성 MDSC(G-MDSC)(CD11b⁺CD14⁻HLA⁻DR⁻CD15⁺CD33⁺)의 생성에 대해 평가하였다. G-MDSC는 정상적인 건강한 PBMC에는 존재하지 않았지만, 모든 3개의 골수종 세포주와의 공동-배양 후에는 G-MDSC가 총 PBMC 집단의 5 내지 25%로 존재하였다(데이터는 도시되지 않음). G-MDSC의 유세포측정 평가를 위한 게이팅 전략은 제1 게이트로서 CD11b⁺를 포함하였으며, 이후에 CD14⁻ 및 HLA⁻DR⁻ 게이팅을, 그리고 이어서 CD15⁺ 및 CD33⁺ 게이팅을 수행하였다. G-MDSC를 세포 분류하고, CD38 발현 수준 및 DARZALEX™(다라투무맙) 매개 ADCC에 대한 감수성을 평가하였다. MDSC의 ADCC/CDC에 대한 DARZALEX™(다라투무맙)의 효과를 평가하기 위하여, 보체 또는 동종형 대조군을 함유하는 혈청을 ADCC 검정에 추가하였다.

[0437] 나이브 및 기억 T-세포 분석

DARZALEX™(다라투무맙)의 각각의 주입 전에, 헤파린 첨가 말초-혈액 샘플을 환자들로부터 얻었다. 말초-혈액 단핵 세포(PBMC)를 Ficoll-Hypaque 밀도-구배 원심분리에 의해 단리하고, 액체 질소 중에서 동결보존 배지(10% 인간 혈청 및 10% 다이메틸 셀록사이드로 보충된 RPMI) 중에 저장하였다. FACS 분석을 위하여, PBMC를 해동시키고, 2×10^6 개 세포/패널을 0.05% 아지드 및 0.1% HAS를 갖는 인산염-완충 식염수(PBS) 중에 재현탁시켰다.

[0439] 데이터 분석

모든 데이터 분석 및 관련 그래프의 생성을 R 소프트웨어(문헌[R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011, ISBN 3-900051-07-0], <http://www.R-project.org/>)를 사용하여 예외 없이 수행하였다. 평가 가능한 반응을 갖는 모든 치료된 대상체를 데이터 분석에 포함시켰다. 전체에 걸쳐 일관되게, 반응자들은 sCR, VGPR 및 PR의 IRC에 의한 최상의 반응을 갖는 대상체들로 규정되고, 무반응자들은 MR, SD 및 PD의 IRC에 의한 최상의 반응을 갖는 대상체들로 규정된다.

상이한 통계학적 비교들은 (i) 반응자들과 무반응자들 사이의 기저선 수준, (ii) 반응자들 및 무반응자들에 대한 기저선 vs. 치료 중, (iii) 반응자들과 무반응자들 사이의 % 변화, (iv) 기저선 vs. 치료 중의 변화 비를 포함하였다. 각각의 비교는 먼저 사피로-윌크 검정(Shapiro-Wilk test)에 의한 정규성에 대한 검정을 포함하였다(문헌[Royston (1995) Remark AS R94: A remark on Algorithm AS 181: The W test for normality. Applied Statistics, 44, 547–551]). 거의 예외 없이, 데이터는 정규 분포를 갖지 않는 것으로 확인되었다. 차등적 수준(differential level) 검정은 비모수적 윌콕스 순위합 검정(non-parametric Wilcoxon rank sum test)(문헌[Hollander and Wolfe (1973), Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons. Pages 27 –33 (one-sample), 68–75 (two-sample)]), 및 박스 콕스 변환(Box Cox transformation) 후의 t-검정(문헌[Weisberg, S. (2014) Applied Linear Regression, Fourth Edition, Wiley Wiley, Chapter 7]) 둘 모두를 수행하는 것을 포함하였다. 박스 콕스 전환의 경우, 작은 수(1e-07)를 0 값에 가산하였다. 모든 경우에, 2개의 검정은 일치하였다. 윌콕스 순위합 검정 p-값은 달리 나타내지 않는 한 본 명세서 전체에 걸쳐 표에 제시되어 있다. 반응자들 및 무반응자들에 대한 기저선 vs. 치료 중의 차이에 대해 검정할 때, 대상체당 2-그룹 쌍별 검정을 실시하였으며, 모든 다른 경우에는 2-그룹 비쌍별 검정을 수행하였다.

다양한 림프구 집단을 분석하기 위한 샘플들을 상이한 투여 스케줄 동안 동일한 시점에서 취하지 않았기 때문에, 집단 모델링을 수행하였다. 모델 적합화(model fitting)를 방문 순위로 행하였다. 총 NK 세포 및 활성화 NK 세포에 대한 집단 모델링은 부러진 막대기(broken stick) 모델을 적합화하는 것을 수반하였다(문헌[Lutz *et al.*, "Statistical model to estimate a threshold dose and its confidence limits for the analysis of sublinear dose-response relationships, exemplified for mutagenicity data." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 678.2 (2009): 118–122]). 랜덤한 절편 및 기울기를 갖는 선형 혼합 효과 모델을 B-세포, T-세포 하위집단, 및 백혈구, 단핵구, 호중구 및 림프구 환자 집단 데이터에 대해 적합화하였다(문헌[Bates *et al.*, (2014). "lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4." ArXiv e-print; submitted to Journal of Statistical Software], <http://arxiv.org/abs/1406.5823>). 선형 혼합 모델링을 치료 개시 이후로의 상태 일수(ADY)에 대해 행하였

다. 선형 혼합 모델 적합화를 로그 변환된 반응 변수에 대해 행하였다. 반응 변수 값이 0인 경우에, 모든 반응 변수 값에 0.1을 가산하여 로그 척도로 모델링이 가능하도록 하였다.

[0443] 실시예 2. 연구 54767414MMY2002 설계(SIRIUS)

연구 54767414MMY2002(SIRIUS)에 대한 표적 집단은 프로테아좀 억제제(PI) 및 면역조절 약물(IMiD)을 포함한 적어도 3가지 사전 요법을 제공받은 진행된 다발성 골수종을 갖는 환자들 또는 PI 및 IMiD에 대해 이중으로 불응 성인 환자들이다. 1차 종점/최종 분석에 대한 반응 평가는, 2011 IMWG 가이드라인을 사용하여, 독립 검토 위원회(independent review committee)(IRC) 및 전산화 알고리즘으로부터의 평가에 기초하였다(문헌[Clinical Study Report: An Open-label, Multicenter, Phase 2 Trial Investigating the Efficacy and Safety of DARZALEX™ (daratumumab) in Subjects With Multiple Myeloma Who Have Received at Least 3 Prior Lines of Therapy (Including a Proteasome Inhibitor and IMiD) or are Double Refractory to a Proteasome Inhibitor and an IMiD (EDMS-ERI-92399922; de Weers *et al.*, (2011) *J Immunol* 186(3):1840–1848]).

[0445] 이들 평가는 하기를 포함하였다: 전체 반응률(ORR), 반응의 지속시간, 반응 및 최상의 반응까지의 시간, 임상 이득률, 진행까지의 시간(TTP), 무진행 생존율(PFS), 및 전체 생존율(OS).

[0446] 총 124명의 대상체를 이 연구에서 DARZALEX™(다라투무맙)로 치료하였다(문헌[de Weers *et al.*, (2011) *J Immunol* 186(3):1840–1848]). 18명의 대상체는 8 mg/kg으로 치료하고, 106명의 대상체는 16 mg/kg으로 치료하였다. 투여 스케줄은 하기와 같았다:

[0447] 그룹 A: DARZALEX™(다라투무맙) 16 mg/kg: 사이클 1 및 2: 일수 1, 8, 15, 및 22(매주), 사이클 3 내지 6: 일수 1 및 15(격주), 사이클 7+: 일수 1(매 4주). 각각의 사이클은 4주였다.

[0448] 그룹 B: DARZALEX™(다라투무맙) 8 mg/kg: 사이클 1+: 일수 1(매 4주).

[0449] 이 연구의 1차 목적은 PI 및 IMiD를 포함한 적어도 3가지 사전 요법을 제공받은 다발성 골수종을 갖는 대상체들 또는 PI 및 IMiD 둘 모두에 대해 이중으로 불응 성인 질병을 갖는 대상체들에서, ORR(CR + PR)에 의해 측정될 때, DARZALEX™(다라투무맙)의 2가지 치료 계획의 효능을 결정하는 것이었다(문헌[Clinical Study Report: An Open-label, Multicenter, Phase 2 Trial Investigating the Efficacy and Safety of DARZALEX™ (daratumumab) in Subjects With Multiple Myeloma Who Have Received at Least 3 Prior Lines of Therapy (Including a Proteasome Inhibitor and IMiD) or are Double Refractory to a Proteasome Inhibitor and an IMiD. EDMS-ERI-92399922]).

[0450] 이 연구의 2차 목적은 DARZALEX™(다라투무맙)의 안전성 및 내성의 평가, 효능(예를 들어, 임상 이득, TTP, PFS, 및 OS)의 추가 척도의 입증과 함께, 약동학적 특성, 면역원성, 약력학적 특성의 평가, 및 DARZALEX™(다라투무맙)에 대한 반응을 예측하는 바이오마커의 탐색을 포함하였다. 추가 연구에 관한 정보는 임상 연구 프로토콜로부터 입수가능하다(문헌[Clinical Study Report: An Open-label, Multicenter, Phase 2 Trial Investigating the Efficacy and Safety of DARZALEX™ (daratumumab) in Subjects With Multiple Myeloma Who Have Received at Least 3 Prior Lines of Therapy (Including a Proteasome Inhibitor and IMiD) or are Double Refractory to a Proteasome Inhibitor and an IMiD. EDMS-ERI-92399922]).

[0451] 파트 1의 단계 1에서, 1명의 대상체(6%)가 8 mg/kg 그룹에서 반응하였고, 5명의 대상체(31%)가 16 mg/kg 그룹에서 반응하였다. 따라서, 단지 16 mg/kg 그룹만을 파트 1의 단계 2로 그리고 파트 2로 전개하였다.

[0452] 16 mg/kg 그룹에서, 31명의 대상체가 IRC 평가에 기초하여 PR 반응 또는 더 우수한 반응을 달성하였으며; ORR은 29%(95% CI: 21%, 39%)였다. 3명의 대상체(3%)는 sCR을 달성하였고, 13명의 대상체(12%)는 VGPR 또는 더 우수한 반응을 달성하였다.

[0453] 실시예 3. 54767414MMY2002 연구(SIRIUS)에 등록된 환자들에서의 T-세포 종류 및 활성에 대한 DARZALEX™(다라투무맙)의 효과

[0454] CD38은 다양한 면역 및 조혈 세포 상에서 발현된다. 유세포측정에 의한 광범위 면역 프로파일링을 수행하여 면역 세포 하위세트에 대한 DARZALEX™(다라투무맙)의 효과 및 임상 반응에 대한 이들 세포의 기저선 수준의 연관성을 조사하였다. T-세포(CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ 및 조절성 T-세포(Treg)), B-세포(CD19⁺), NK 세포, 단핵구(CD14⁺), 백혈구, 및 호중구를 포함한 다양한 세포 집단을 기저선에서 그리고 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 후에 말초 혈액 및 골수 흡인물에서 유세포측정에 의해 평가하여 반응자들 및 무반응자들에서 이들 세포 집단의 변화에 대해

모니터링하였다.

[0455] 림프구, 백혈구, 단핵구 및 호중구

[0456] 백혈구, 림프구, 단핵구, 및 호중구 카운트를 반응자들 및 무반응자들의 말초 혈액에서 연구하였다. 총 림프구 수는 8 mg/kg 및 16 mg/kg 용량 둘 모두에 대한 반응자들에서의 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 의해 증가된 것으로 확인되었다(도 1). 선형 혼합 효과 모델링은 100일당 로그 척도로 0.8×10^6 개 세포/ μL 의 증가를 보여주었다(CI = 0.06, 0.11). 단핵구 및 백혈구에 대해 약간의 증가가 확인되었는데, 매 100일마다 로그 척도로 각각 0.03×10^6 개 세포/ μL (CI = 0.01, 0.04) 및 0.03×10^6 개 세포/ μL (CI = 0.01, 0.05)의 유의한 증가가 있었다. 중위 호중구 카운트는 기저선과 일치하였고 유의하게 변동하지 않았지만, 일부 환자에 대해 호중구감소증이 기록되었다.

[0457] 각각의 이들 세포 집단의 기저선 수준을 반응 그룹들 사이에서 비교하였다. 월콕슨 부호-순위 검정(Wilcoxon signed-rank test)을 사용하여 반응 그룹들 전체에 걸쳐 이들 세포 유형 중 어느 것에 대해서도 기저선 수준이 상이하다는 증거는 확인되지 않았다(표 1).

[표 1]

기저선에서의 반응자들 vs. 무반응자들의 말초 혈액 세포 카운트					
	N	중위 값	평균 (SD)	범위	p-값*
백혈구: R	33	4.3	4.32 (1.65)	(1.6; 8.8)	
백혈구: NR	82	4.19	4.77 (2.26)	(2.13; 13.8)	0.60987
림프구: R	33	0.9	1.09 (0.59)	(0.27; 2.67)	
림프구: NR	82	1	1.05 (0.55)	(0.3; 2.8)	0.85028
단핵구: R	33	0.43	0.5 (0.25)	(0.2; 0.97)	
단핵구: NR	82	0.5	0.51 (0.25)	(0.04; 1.3)	0.72803
호중구: R	33	2.47	2.54 (1.23)	(1.06; 5.94)	
호중구: NR	82	2.44	3.05 (2.08)	(1; 11.7)	0.40373

N: 그룹 당 샘플 수
R: 반응자
NR: 무반응자
*무반응자 vs. 반응자
SD: 표준 편차

[0459]

[0460] NK 세포

[0461] 총 NK 세포 수($\text{CD}16^+ \text{CD}56^+$) 및 활성화된 NK 세포 수($\text{CD}16^+ \text{CD}56^{\text{dim}}$)는 시간 경과에 따라 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 의해 감소하였다(데이터는 도시되지 않음).

[0462]

B 세포

[0463] B-세포($\text{CD}45^+ \text{CD}3^- \text{CD}19^+$)의 절대 카운트는 반응자들 및 무반응자들에서 시간 경과에 따라 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 동안 말초 혈액 또는 골수 흡인물에서 측정하였다. B-세포는 전혈에서는 약간 증가하였고 골수 흡인물에서는 유지되었다. 말초 혈액 중의 B-세포의 선형 혼합 모델링은 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 과정에 걸쳐 로그 척도로 매 100일마다 0.1×10^6 개 세포/ μL [CI=0.04, 0.16]의 최소한의 증가를 보여주었다. 반응자들 또는 무반응자들에서 다라투무맙 치료 동안 골수 흡인물 중의 B-세포($\text{CD}45^+ \text{CD}3^- \text{CD}19^+$ /림프구)의 백분율에 대해서는 어떠한 변화도 없었다(각각 p = 0.1 및 0.4). 또한, B-세포 카운트가 반응자들과 무반응자들 사이의 기저선에서 상이하다는 증거는 없었다(p = 0.5).

[0464] T-세포

[0465] 림프구는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 의해 증가되는 것으로 기록되었지만(도 1), B 세포는 단지 최소한의 증가만을 보여주었다(상기 참조). 추가로 조사하기 위하여, 말초 혈액 및 골수 둘 모두에서 다양한 T-세포 집단(CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T 세포, 조절성 T 세포)을 연구하였다.

[0466] CD3⁺, CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 후 말초 혈액 중에서 증가되었다(절대 카운트/ μ l 및 림프구 백분율 둘 모두). 도 2는 매 환자마다 시간 경과에 따라 말초 혈액 중에서 기저선으로부터 CD3⁺ T-세포 (CD45⁺CD3⁺)의 절대 카운트의 % 변화를 나타낸다. 이 도면에서의 흑색 선은 모든 환자에 대한 중위 절대 카운트 $\times 10^6$ 개 세포/ μ L를 나타낸다. 2회 초과의 관찰을 갖는 방문만을 도면에 포함시켰다. 도 3은 매 환자마다 시간 경과에 따라 말초 혈액 중에서 기저선으로부터 CD4⁺ T-세포(CD45⁺CD3⁺CD4⁺)의 절대 카운트의 % 변화를 나타낸다. 이 도면에서의 흑색 선은 모든 환자에 대한 중위값을 나타낸다. 2회 초과의 관찰을 갖는 방문만을 도면에 포함시켰다. 도 4는 매 환자마다 시간 경과에 따라 말초 혈액 중에서 기저선으로부터 CD8⁺ T-세포 (CD45⁺CD3⁺CD8⁺)의 절대 카운트의 % 변화를 나타낸다. 이 도면에서의 흑색 선은 모든 환자에 대한 중위값을 나타낸다. 2회 초과의 관찰을 갖는 방문만을 도면에 포함시켰다. 말초 혈액 중의 절대 카운트에 대한 선형 혼합 모델링은 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 후 매 100일마다 로그 척도로 평균 0.13×10^6 개 세포/ μ l의 총 T-세포 수(CD45⁺CD3⁺) 증가를 보여주었다(CI = 0.1, 0.15). CD8⁺ T-세포는 매 100일마다 로그 척도로 0.16×10^6 개 세포 / μ l로 유의하게 증가되는 것으로 확인되었다(CI = 0.13, 0.19). CD4⁺ 세포는 매 100일마다 로그 척도로 0.11×10^6 개 세포 / μ l의 보통 정도의 증가를 갖는 것으로 확인되었다(CI = 0.09, 0.13).

[0467] T-세포 하위집단 각각에 대하여, 반응자들은 무반응자들보다 기저선에 대한 절대 카운트의 더 높은 최대 % 변화를 나타내었다(CD3⁺ p=3.2993e-05; CD4⁺ p=3.486e-05; CD8⁺ p=2.7172e-05; 조절성 T 세포 p=0.002). 표 2는 기저선에 대한 절대 카운트의 % 변화에 대한 반응자들과 무반응자들 사이의 말초 혈액 중의 각각의 T-세포 하위집단의 비교에 대한 월콕슨 부호-순위 검정 결과를 나타낸다.

[0468]

[표 2]

절대 세포 카운트의 % 변화; 말초 혈액					
샘플	N	중위 값	평균 (SD)	범위	p-값*
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : R	33	86.76	118.91 (104.07)	(-16.1; 398.71)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : NR	80	28.08	43.02 (69.55)	(-67.11; 286.67)	3.30E-05
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : R	33	72.08	77.74 (60.99)	(-21.05; 233.21)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : NR	80	19.48	29.36 (59.58)	(-68; 298.89)	3.49E-05
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : R	33	106.6	180.81 (192.37)	(-7.07; 760.51)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ : NR	80	32.24	63.96 (112.44)	(-66.22; 588.89)	2.72E-05
N: 그룹 당 샘플 수					
R: 반응자					
NR: 무반응자					
*반응자 vs. 무반응자					
SD: 표준 편차					

[0469]

[0470] 유사하게 골수 중에서도, 총 T-세포 수(림프구 수의 백분율로서의 CD45⁺CD3⁺) 및 CD8⁺ T-세포 수(림프구 수의 백분율로서의 CD45⁺CD3⁺CD8⁺)는 반응자들 및 무반응자들을 모두에 대해 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 동안 유의하게 증가된 것으로 확인되었다(CD3⁺ 반응자들 p=3.8147e-06, 무반응자들 p=9.8225e-05; CD8⁺ 반응자들 p=3.8147e-06, 무반응자들 p=0.0003). 골수 중에서는 어떠한 임상 반응 그룹에서도 중위 CD4⁺ T-세포 수에 변화가 없었다. 표 3은 골수 중 % 림프구로서의 다양한 T 세포에 대한 월록슨 부호-순위 검정 결과를 나타낸다. 도 5는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 동안 시간 경과에 따른 CD45⁺CD3⁺ 세포의 백분율(%)을 나타낸다(반응자들 및 무반응자들을 모두가 그래프에 포함됨). 도 6은 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 동안 시간 경과에 따른 CD45⁺CD3⁺CD8⁺ 세포의 백분율(%)을 나타낸다(반응자들 및 무반응자들을 모두가 그래프에 포함됨).

[0471]

[표 3]

골수 중의 T 세포 집단(% 림프구)					
샘플		NR: 기저선	NR: 치료 중	R: 기저선	R: 치료 중
CD45 ⁺ CD3 ⁺ / 림프구	N	29	29	19	19
	중위값	72.2	83.6	77.9	91.4
	평균 (SD)	68.57 (13.64)	80.93 (11.57)	71.82 (14.92)	87.67 (9.49)
	범위	(36.3; 94.5)	(50.9; 97.4)	(42.2; 94.8)	(63.3; 97.2)
	p-값*		9.8225e-05		3.8147e-06
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD4 ⁺ / 림프구	N	29	29	19	19
	중위값	33.7	29.2	22.7	22.8
	평균 (SD)	31.24 (12.14)	32.96 (12.57)	24.18 (7.37)	24.29 (9.58)
	범위	(6.3; 54.2)	(9.6; 60.9)	(8.1; 36.6)	(12.5; 45.4)
	p-값*		0.18351		0.98432
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD8 ⁺ / 림프구	N	29	29	19	19
	중위값	36.3	43.3	49.4	66.9
	평균 (SD)	37.39 (13.64)	47.74 (18.14)	46.91 (14.89)	62.82 (12.79)
	범위	(15.9; 67.2)	(18.5; 81)	(24.5; 79.6)	(33.1; 83.3)
	p-값*		0.00026883		3.8147e-06
N: 그룹 당 샘플 수					
R: 반응자					
NR: 무반응자					
*반응자 또는 무반응자 그룹에 대한 기저선 vs. 치료 중					
SD: 표준 편차					

[0472]

[0473]

반응자들 및 무반응자들 둘 모두 말초 혈액 및 골수 중에서의 T-세포 증가를 보여주었지만, 반응자들은 기저선으로부터 최대 백분율 변화를 가졌다. 반응자들 또는 무반응자들이 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 전에 상이한 수준의 CD3⁺, CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포를 가졌는지의 여부를 구별하기 위하여, 각각의 하위그룹의 기저선 측정치를 말초 혈액에서 비교하였다.

[0474]

말초 혈액 중에서 기저선에서 절대 T-세포 카운트에 있어서(표 4) 또는 골수 중에서 총 림프구 수로부터의 T-세포의 백분율에 있어서(표 5) 반응자들과 무반응자들 사이에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(월록순 부호-순위 검정).

[0475]

[표 4]

기저선에서의 치료 전의 말초 혈액 중의 절대 세포 카운트					
샘플	N	중위 값	평균 (SD)	범위	p-값*
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : R	33	574	715.91 (472.54)	(186; 2096)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : NR	80	638	672.5 (426.36)	(85; 2407)	0.81527
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD4 ⁺ : R	33	190	276.91 (207.39)	(77; 1085)	
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD4 ⁺ : NR	80	214	251.61 (146.13)	(21; 766)	0.94965
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁻ : R	33	332	424.55 (324.49)	(93; 1238)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁻ : NR	80	318	398.14 (354.52)	(43; 2221)	0.56555
N: 그룹당 샘플 수					
R: 반응자					
NR: 무반응자					
*세포 유형에 대한 반응자 vs. 무반응자					
SD: 표준 편차					

[0476]

[0477] [표 5]

치료 전 골수 중의 T 세포 수(% 런프구 수)					
샘플	N	중위 값	평균 (SD)	범위	P-값
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : R	23	78.4	73.66 (14.43)	(42.2; 94.8)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ : NR	65	76.5	73.5 (13.93)	(36.3; 94.5)	0.81232
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : R	23	25	25.57 (8.32)	(8.1; 41.4)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ : NR	65	25.3	27.53 (12.76)	(6.3; 55.2)	0.76482
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁻ : R	23	50	47.7 (13.73)	(24.5; 79.6)	
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁻ : NR	65	44.3	44.73 (15.49)	(15.9; 76.1)	0.41678
N: 그룹당 샘플 수					
R: 반응자					
NR: 무반응자					
*세포 유형에 대한 반응자 vs. 무반응자					
SD: 표준 편차					

[0478]

[0479] 조절성 T 세포

[0480]

Treg 세포가 샘플에서 CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim} 세포 집단으로서 확인되었다. CD8⁺ T 세포 대 Treg의 비를 시간 경과에 따라 DARZALEX™(다라투무맙)로 치료된 환자의 말초 혈액 및 골수에서 평가하였다. 이 비는 말초 혈액 및 골수 둘 모두에서 증가하였다. 도 7a는 말초 혈액에서의 시점마다의 모든 환자의 CD8⁺/Treg 및 CD8⁺/CD4⁺ 세포 비의 중위 값을 나타낸다. 도 7b는 골수에서의 시점마다의 모든 환자의 CD8⁺/Treg 및 CD8⁺/CD4⁺ T-세포 비의 중위 값을 나타낸다. CD8⁺/Treg 및 CD8⁺/CD4⁺의 절대 카운트의 비의 변화는 치료의 시간 경과에 따라 말초 혈액에서(표 6) 그리고 골수(표 7)에서 유의하였다(일록은 부호-순위 검정).

[0481]

SIRIUS 및 GEN501 연구의 조합된 데이터 분석(실시예 6)에서, 말초 혈액 중의 CD8⁺/CD4⁺ 및 CD8⁺/Treg 세포의 중위 비는 주수 8에서 증가하였고(CD8⁺/CD4⁺의 경우 $p = 5.1 \times 10^{-5}$ 및 CD8⁺/Treg의 경우 $p = 1.8 \times 10^{-7}$), 주수 16에서 증가하였다(CD8⁺/CD4⁺의 경우 $p=0.00017$ 및 CD8⁺/Treg의 경우 $p = 4.1 \times 10^{-7}$). 유사하게, 골수에서는, CD8⁺/CD4⁺ 및 CD8⁺/Treg 세포의 중위 비가 기저선에 비하여 치료 중(주수 12 ± 1회 사이클)에 증가하였다(CD8⁺/CD4⁺의 경우 $p = 0.00016$ 및 CD8⁺/Treg의 경우 $p = 2.8 \times 10^{-7}$). 반응자들과 무반응자들 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

다.

[0482]

[표 6]

말초 혈액 중의 T 세포 비					
샘플	N	중위 값	평균 (SD)	범위	p-값*
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ : 기저선	66	119.75	191.78 (231.09)	(24.17; 1461.18)	
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ : C3D1	66	204.86	222.96 (167.44)	(25.53; 867.58)	0.00046409
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ : C4D1	66	210.05	215.15 (151.31)	(25.86; 798.83)	0.00042154
CD8 ⁺ /Treg: 기저선	66	1258.33	2338.46 (3465.12)	(206.82; 18550)	
CD8 ⁺ /Treg: C3D1	66	2326.74	3361.87 (3661.61)	(155; 23066.67)	5.25E-06
CD8 ⁺ /Treg: C4D1	66	2763.16	3382.86 (3629.69)	(316.67; 22087.5)	9.95E-08

*기저선 대비; N: 그룹당 샘플 수; SD: 표준 편차

[0483]

[0484]

[표 7]

골수 중의 T 세포 비					
샘플	N	중위 값	평균 (SD)	범위	p-값*
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ (/림프구): 기저선	31	163.18	184.4 (129.5)	(32.58; 674.58)	
CD8 ⁺ /CD4 ⁺ (/림프구): 치료 중	31	221.89	240.85 (155.57)	(30.38; 666.4)	0.0038599
CD8 ⁺ /Treg(/림프구): 기저선	30	1219.58	1802.73 (1582.7)	(306.41; 7960)	
CD8 ⁺ /Treg(/림프구): 치료 중	30	2273.56	3905.72 (4232.73)	(451.22; 20825)	3.15E-07

*기저선 대비; N: 그룹당 샘플 수; SD: 표준 편차

[0485]

실시예 4. 연구 설계(GEN501)

[0486]

연구 GEN501(NCT00572488)은 이중-불응성 MM 환자에서 단체요법으로서 DARZALEX™(다라투무맙)를 평가하였다. 샘플 단리, 처리 및 통계학적 분석은 실시예1 및 실시예 2에 기재된 바와 같았다. 이 연구는 문현[Lokhorst et al., N Eng J Med 373:1207-19, 2005]에 기재되어 있다.

[0487]

간략하게 말하면, 연구 GEN501은 MM을 갖는 대상체에서의 DARZALEX™(다라투무맙)의 인간에서의 최초의 임상 연구였다. 그것은 1/2상, 용량-점증, 안전성 연구(Phase 1/2, dose-escalation, safety study)로서, 2개의 파트로 나누어져 있다. 파트 1은 오픈-라벨, 용량-점증 연구이고; 파트 2는 파트 1에서 확립된 용량 수준에 기초한, 다수의 코호트에 의한 오픈-라벨, 단일군 연구(open-label, single-arm study)이다.

[0488]

파트 1에서는, DARZALEX™(다라투무맙)의 10개의 용량 수준을 평가하였다: 0.005, 0.05, 0.10, 0.50, 1, 2, 4, 8, 16, 및 24 mg/kg. 2개의 최저 용량 코호트에 각각 1명(+3명)의 대상체(들)를 할당하고, 표준 3명(+3명)의 대상체 할당을 나머지 8개의 용량 코호트에 적용하였다. 파트 2는 2개의 용량 수준, 8 mg/kg 및 16 mg/kg을 포함하는 오픈-라벨, 단일 연구였다. 파트 1은 32명의 대상체를 포함하였고, 파트 2는 72명의 대상체를 포함하였

다.

[0490] 실시예 5. DARZALEX™(다라투무맙) 치료는 환자에서 T 세포 클론성을 유도한다

[0491] MY2002 연구에서의 말초 혈액 및 골수 둘 모두에서 기록된 CD8⁺ T-세포의 증폭을 고려하여, Immunoseq™ 검정을 사용하여 T-세포 수용체(TCR)의 고처리량 차세대 서열분석을 수행하여 CD8⁺ T-세포의 증폭이 본질적으로 클론성 인지의 여부를 결정하였는데, 이때 이러한 클론성은 적응 면역 반응임을 나타내는 것이다. GEN501 연구에 등록된 대상체들 중 총 17명의 환자 샘플을 평가하였다(n=6명 반응자, 즉 PR 이상; n=11명 무반응자, 즉 MR, SD, PD).

[0492] TCR 서열분석은 DARZALEX™(다라투무맙) 치료가 환자들 전체에 걸쳐 클론성을 유의하게 증가시켰음을 보여주었다. 도 8a는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 전 vs. 치료 후의 T 세포 클론성 사이의 상관을 나타낸다($p = 0.0056$). 도 8b는 개별 환자들에서의 클론성의 배수 변화를 나타낸다. 반응자들은 별 모양으로 표시되어 있다. 이 데이터는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 대해 기록된 T 세포 증폭이 본질적으로 클론성일 수 있음을 시사한다.

[0493] 반응자들은 (풍부도 변화(CIA)에 의해 측정될 때) TCR 레퍼토리에 있어서 무반응자들에 비하여 더 큰 총 증폭을 가졌다. 도 8c는 개별 환자들에 대한 % CIA를 나타낸다. 그룹 A: 반응자들, 그룹 B: 무반응자들. 통계학적으로 유의한 차이가 반응자들과 무반응자들 사이에서 관찰되었다($p=0.037$). 도 8d는 각각의 증폭된 T 세포 클론에 대한 반응자들 및 무반응자들에서의 절대 풍부도 변화(CIA)의 합계를 나타낸다. 도 8e는 각각의 개별 환자에 대한 최대 % CIA를 나타낸다. 그룹 A: 반응자들, 그룹 B: 무반응자들. 통계학적으로 유의한 차이가 반응자들과 무반응자들 사이에서 관찰되었다($p=0.048$). 도 8f는 반응자들(그룹 A) 및 무반응자들(그룹 B)에서의 단일 T-세포 클론의 최대 CIA를 나타낸다.

[0494] 피셔의 정확 검정(Fisher's exact test)을 사용하여(문헌[DeWitt et al. J. Virol. 2015]) 그리고 각각의 증폭된 클론에 대한 절대 풍부도 변화를 합하여, 2개의 샘플 사이의 클론 풍부도에 있어서 유의한 차이를 확인함으로써 CIA를 얻었다.

[0495] 실시예 6. GEN501 연구에 등록된 환자들에서의 DARZALEX™(다라투무맙)의 면역조절 효과

[0496] GEN501에 등록된 반응자들 및 무반응자들에서 다양한 T 및 B 세포 집단을 평가하였다.

[0497] 램프구

[0498] SIRIUS(MMY2002) 연구와 유사하게, 램프구는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 동안 말초 혈액 및 골수 둘 모두에서 증가되었다. 이러한 증가는 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포 둘 모두의 증가된 수에 기인되었다.

[0499] CD8⁺ 중추 기억 세포

[0500] GEN 501 연구에 등록된 17명 환자들의 하위세트에서 시간 경과에 따라 DARZALEX™(다라투무맙)로 치료된 환자에서 CD8⁺ T-세포 표현형을 연구하였다. 환자들로부터의 CD8⁺ 세포는 표준 프로토콜을 사용하여 나이브(CD45RO⁻/CD62L⁺)(T_N) 또는 중추 기억(T_{CM})(CD45RO⁺/CD62L^{high}) 세포로서 확인되었다.

[0501] 도 9a는 CD8⁺ 나이브 세포의 %(CD8⁺ 세포의 %)를 나타내고, 도 9b는 CD8⁺ 중추 기억 세포의 %를 나타낸다. DARZALEX™(다라투무맙) 치료는 나이브 CD8⁺ T 세포의 양을 유의하게 감소시켰고(주수 8에서 $p = 1.82 \times 10^{-4}$), CD8⁺ 기억 T 세포의 양을 증가시켰다(주수 8에서 $p = 4.88 \times 10^{-2}$). 이는 나이브 세포독성 T 세포로부터 특이적 항원에 대해 활성화될 수 있는 기억 T 세포로의 이행을 시사할 것이다. 백색 정사각형들은 적어도 최소한의 반응(MR 이상)을 달성한 환자들을 나타내고, 흑색 정사각형들은 안정된 질병 또는 진행성 질병을 갖는 환자들을 나타낸다. CD8⁺ 나이브 T 세포의 유의하게 더 큰 감소가 치료에 반응한 환자들에서 명백하였다(데이터는 도시되지 않음). 도 9c는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료가, 부분적으로 바이러스-특이적 및 동종반응성 T 세포 반응을 유도하는 HLA 클래스 I-제한 T-세포의 백분율을 증가시켰음을 나타낸다. 도 9d는 증폭하는 이팩터 기억 T 세포는 낮은 수준의 CD38을 발현하였음을 나타낸다. 이러한 T 세포는 바이러스성 웨피드 및 동종항원에 대해 정상적인 그리고 심지어는 증가된 기능적 활성을 나타낸다는 것을 아는 것이 중요하다(실시예 8 참조). 이러한 기능적 결과로부터, DARZALEX™(다라투무맙) 치료 동안 바이러스성 항원 및 동종항원에 대한 항원-경험 T 세포의

증폭, 또는 그의 개선된 활성이 존재하는 것으로 결론내렸다. 이러한 데이터는, 조절성 세포 하위세트와 달리, 이펙터 T 세포가 적절하게 기능 및 증폭하는 데 CD38 발현을 필요로 하지 않음을 시사한다.

[0502] CD38-양성 조절성 T-세포

몇몇 면역-억제 세포 하위세트가 CD38을 발현함을 나타내는 최근 문헌과 함께 세포독성 T-세포의 강력한 증폭 및 증가된 활성의 관찰은 조절성 세포 집단인 조절성 T-세포(Treg), 골수계-유래 억제 세포(MDSC) 및 조절성 B-세포(Breg)에 대한 DARZALEX™(다라투무맙)의 효과에 관한 조사를 촉구하였다.

[0504] 조절성 T-세포(Treg)(CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim})를 표준 프로토콜을 사용하여 단리하였다. 유세포측정을 사용하여 Treg의 빈도를 분석하였다.

[0505] 말초 Treg의 하위집단(10% ± 10%)은 Treg 활성화 전에 높은 수준의 CD38을 발현하였다. 도 10a, 상단 패널은 기저선에서의 CD3⁺CD4⁺ 세포 집단(P4 세포 집단)에서의 Treg의 빈도를 나타낸다. 도 10a, 하단 패널은 높은 CD38을 발현하는 Treg의 하위세트(P5 세포 집단)를 나타낸다. 이들 CD38⁺ Treg는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 대해 고감수성이었고, DARZALEX™(다라투무맙)의 최초 용량 후 유의한 그리고 거의 즉각적인 감소를 나타내었다(n = 17명 환자; 기저선 대비 주수 1에서 $P = 8.88 \times 10^{-16}$). DARZALEX™(다라투무맙) 치료 후 Treg의 빈도는 도 10b, 상단 패널(P4 세포 집단)에 나타나 있다. 도 10b, 하단 패널은 DARZALEX™(다라투무맙)의 최초 주입 후 CD38^{high} Treg(P5 세포)가 가장 유의하게 고갈된 Treg 집단이었음을 나타낸다. 이들 CD38⁺ Treg는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 전체에 걸쳐 고갈된 상태를 유지하였다(기저선 대비, 주수 1, 4, 및 8에서 각각 $p = 8.88 \times 10^{-16}$, 1.11×10^{-15} , 및 1.50×10^{-11}). 도 10c는 기저선, 주수 1, 주수 4, 주수 8, 재발, 및 치료 종료(EOT) 후 6개월에서의 총 CD3⁺ 세포 수로부터의 CD38^{high} Treg의 %를 나타낸다. CD38^{high} Treg는 그 시점에서 기저선으로 회복되었다. CD38⁺ Treg의 변화는 치료에 반응한 환자들과 치료에 반응하지 않은 환자들 사이에서 유사하였지만, CD8⁺ T-세포:Treg 비는 DARZALEX™(다라투무맙)에 대해 반응을 보여준 환자들에서 주수 8에서 유의하게 더 높았다($P = 0.00955$; 도 10d).

[0506] DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 의한 CD38⁺ Treg의 고갈의 가능한 생물학적 관련성을 평가하기 위하여, 자가(autologous) CD3⁺ T 세포 상에서 CD38⁻ Treg 대비 CD38⁺ Treg의 억제 능력을 평가하였다. 다수의 건강한 공여체로부터의 샘플에 대해 수행된 일련의 실험에서, CD38⁺ Treg는 CD38⁻ Treg(53.2%의 세포 증식이 관찰됨) 또는 음성 대조군(74.9%의 세포 증식이 관찰됨)보다 더 강력하게 T-세포 증식을 억제하였다(9.9%의 세포 증식이 관찰됨)(도 10e).

[0507] MDSC는 동결된 PBMC 샘플에서 용이하게 검출가능하지 않았기 때문에, CD38⁺ 과립구성 MDSC(CD11b⁺CD14⁻HLA-DR⁻CD15⁺CD33⁺)를 기저선에서의 환자들로부터 그리고 DARZALEX™(다라투무맙)의 1회 주입을 제공받은 환자들로부터 단리된 PBMC로부터 시험관내에서 생성하였다. 도 11은 확인된 MDSC의 유세포측정 히스토그램을 나타낸다(도 11, 상단 히스토그램, 박스로 표시된 세포 집단). 대략 절반의 MDSC가 CD38을 발현하였다(도 11, 중간 그래프; 원으로 표시된 P7 세포 집단). CD38^{high} MDSC는 DARZALEX™(다라투무맙)로 치료된 환자들에서 거의 고갈되었다(도 11, 하단 그래프; 원으로 표시된 P7 세포 집단).

[0508] CD38^{high} 계통 비특이적 MDSC는 무반응자들 및 치료에 대해 적어도 최소한의 반응을 갖는 환자들 둘 모두에서 시간 경과에 따라 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 의해 고갈되었다. 도 12는 CD38^{high} MDSC의 백분율이 치료 1주째, 4주째 또는 8주째에 환자들에서 거의 0%로 감소되었음을 나타낸다. CD38^{high} 계통 비특이적 MDSC는 치료 종료 후에 기저선으로 복귀되었다.

[0509] 계통 비특이적 MDSC 내의 최대 CD38⁺ 집단을 갖는 환자들은 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 대해 최상의 그리고 가장 지속적인 반응을 보여주었다. 도 13은 (도 11에 나타낸 바와 같이) CD38^{high} MDSC의 최고 백분율을 갖고, PR 또는 MR을 갖는 환자들로서 분류된 환자 2, 4, 15, 16 및 17이 적어도 8개월의 무진행 생존율(PFS)을 가졌음을 나타낸다.

- [0510] $CD38^{high}$ 계통 비특이적 MDSC는 또한 시험관내에서 DARZALEX™(다라투무맙)-유도 ADCC에 대해 감수성이었다. ADCC 측정은 2명의 공여자로부터의 $CD38^{high}$ MDSC 및 대조 표적 세포로서의 다우디 세포를 50:1의 이펙터:표적 세포 비를 사용하여 수행하였다. 도 14는 한 명의 공여자로부터의 실험의 결과를 나타낸다. DARZALEX™(다라투무맙)는 MDSC 세포의 용해를 유도하였다.
- [0511] $CD38^+$ Breg를 DARZALEXTM (다라투무맙)-치료된 환자($n = 16$)에서 측정하였으며, $CD38^+$ Treg와 유사하게, DARZALEX™(다라투무맙)의 최초 용량 후에 고갈되었고(기저선 대비 주수 1에서 $p = 0.0018$; 쌍별 월록순 순위 검정), 환자들이 치료 중인 동안에 낮은 상태로 유지되었다(도 15a). FACS 분류된 Breg는, 자극되었을 때, IL-10을 생성하였다(도 15b).
- [0512] 종합적으로, 이러한 관찰은 면역억제 $CD38^+$ MDSC, Breg, 및 Treg의 고갈이 T-세포 집단 및 클론성에 있어서의 DARZALEX™(다라투무맙)-유도 변화에 대한 유의한 기여 기전임을 시사한다.
- [0513] **실시예 7. $CD38^+$ MDSC 세포는 암 환자에 존재한다**
- [0514] MDSC($Lin^- CD14^- HLADR^{low/-}$) 및 그의 $CD38$ 발현의 백분율을 유세포측정을 사용하여 NSCLC 또는 전립선암을 갖는 환자들의 말초 혈액에서 연구하였다.
- [0515] MDSC의 백분율은 NSCLC 및 전립선암 환자들로부터의 분석된 샘플 중의 PBMC의 각각 약 10% 내지 37% 및 약 10% 내지 27%였다. $CD38$ 발현이, NSCLC 환자들로부터의 PBMC로부터의 $Lin^- CD14^+ HLADR^{-/low}$ MDSC의 80 내지 100%에서 그리고 전립선암 환자들로부터의 PBMC로부터의 MDSC의 70 내지 100%에서 확인되었다.
- [0516] **실시예 8. DARZALEX™(다라투무맙)는 항바이러스성 T-세포 반응을 향상시킨다**
- [0517] T-세포 활성화 및 기능성에 대한 DARZALEX™(다라투무맙)의 효과를 추가로 평가하기 위하여, 바이러스성 항원 및 동종항원에 대한 반응에서 말초 T 세포로부터의 IFN- γ 생성을 다양한 임상 결과를 갖는 DARZALEX™(다라투무맙)-치료된 환자($n = 7$)에서 측정하였다. PR 또는 더 우수한 반응을 갖는 환자들은 치료 동안 적어도 하나의 시점에 대하여, 기저선과 대비하여, DARZALEX™(다라투무맙) 치료 후 바이러스성 항원 및 동종항원에 대한 반응에서 IFN- γ 분비에 있어서 유의한 증가를 보여주었는데, 이는 낮은 $CD38$ 발현에 의해 T 세포 기능이 손상되지 않음을 시사한다(실시예 6, 도 9c 참조). TCR 클론성 데이터와 유사하게, 이러한 증가는 DARZALEX™(다라투무맙)에 반응한 환자들에서 그렇지 않은 환자들보다 더 현저하였다. 도 16a는 VGPR을 갖는 한 명의 대표적인 환자의 항-바이러스 반응을 나타낸다. 도 16b는 CR을 갖는 한 명의 대표적인 환자의 항-바이러스 반응을 나타낸다. 도 16c는 PD를 갖는 한 명의 대표적인 환자의 항-바이러스 반응을 나타낸다. 도 16d는 MR을 갖는 한 명의 대표적인 환자의 항-바이러스 반응을 나타낸다. 이를 도면에서, 오차 막대는 중복 배양물들의 평균의 표준 오차를 나타낸다. 별표(*)는 지시된 비교들 사이의 통계학적으로 유의한 변화를 나타낸다. 독립 검토 위원회에 따른 최상의 반응이 나타나 있다. 이를 결과와 일치되게, VGPR(도 16e) 또는 CR(도 16f)을 갖는 환자들에서의 바이러스-반응성 T-세포는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료 동안 증식 능력의 증가를 보여주었다.
- [0518] **실시예 9. DARZALEX™(다라투무맙)에 대한 $CD38$ 발현 면역 세포 아형의 감수성의 기전**
- [0519] GEN501 및 SIRIUS 연구 둘 모두로부터의 데이터는, $CD38$ 을 발현하는 일부 면역 세포가 고갈되고(NK 세포, 조절성 T-세포(Treg), 조절성 B-세포(Breg), 및 골수계-유래 억제 세포(MDSC)), 한편 $CD38$ 을 발현하는 다른 것들은 DARZALEX™(다라투무맙) 요법에 의해 개수(세포독성 및 헬퍼 T 세포)가 증가됨을 나타내었다.
- [0520] 감수성의 기전에 접근하기 위하여, GEN501 또는 SIRIUS 연구에 등록된 건강한 공여자들에서의 그리고 다발성 골수종 환자들에서의 면역 세포의 다양한 하위집단에서 $CD38$ 의 발현 수준을 평가하였다. 도 17a는 건강한 공여자로부터의 면역 세포에서의 $CD38$ 의 발현의 히스토그램을 나타내고, 도 17b는 다발성 골수종 환자로부터의 면역 세포에서의 $CD38$ 의 발현의 히스토그램을 나타낸다. 건강한 공여자에서, $CD38$ 발현은 NK 세포 상에서 최고였으며, 단핵구, B 및 T 세포가 그 뒤를 따랐다. 다발성 골수종 환자에서, $CD38$ 발현은 형질 세포 상에서 최고였으며, B 세포, NK 세포, 단핵구, B-세포 및 T-세포의 하위세트가 그 뒤를 따랐다. 도 17c는 재발성 및 불응성 골수종 환자들로부터의 NK 세포, Treg, Breg, B- 및 T-세포 전체에 걸친 $CD38$ 의 평균 형광 세기(MFI)의 비교를 나타내는데, 이는 형질 세포 이후로, NK 세포가 최고 수준의 $CD38$ 을 발현하였고, 조절성 T-세포(Treg) 및 조절성 B-세포(Breg)가 그 뒤를 따랐음을 보여준다.

[0521] CD38 발현에 더하여, 다른 세포 표면 단백질, 예컨대 보체 억제 단백질(CIP; CD46, CD55, CD59)이 DARZALEX™(다라투무맙)에 대한 감수성 또는 저항성에 기여할 수 있다. 면역 세포 하위집단 전체에 걸친 CIP의 시험판내 평가는, NK 세포가 매우 낮은 수준의 CD59 및 CD55를 발현하며, 한편 다른 T 및 B 세포 집단은 훨씬 더 높은 수준을 발현함을 확인시켜 주었다. 이것 또한 면역 세포 아형 전체에 걸쳐 DARZALEX™(다라투무맙) 감수성의 변동성에 기여할 수 있다(데이터는 도시되지 않음).

[0522]

논의

[0523] 이 연구는 CD38⁺ 면역 억제 세포 집단의 감소, 및 이에 수반하는, 헬퍼 및 세포독성 T-세포 증폭의 유도, 바이러스성 웨티드에 대한 반응에서의 IFN-γ의 생성, 및 증가된 TCR 클론성 - 이는 개선된 적응 면역 반응을 나타냄 - 을 통한 DARZALEX™(다라투무맙)의 이전에 알려지지 않은 면역조절 효과를 설명한다.

[0524]

이 연구는, MDSC 및 Breg가 CD38을 발현하고, DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 대해 감수성이었음을 보여준다. 이들 세포는, 종양 미세환경에 존재하고 종양 성장, 면역 회피, 혈관생성, 전이, 및 억제 사이토카인의 생성에 기여하는 것으로 알려져 있다. 이들 CD38⁺ 억제 세포 하위세트에 더하여, 높은 수준의 CD38을 또한 발현하고 월등한 자가 T-세포 억제 능력을 보여준 조절성 T 세포의 신규한 하위집단(CD4⁺CD25⁺CD127^{dim})이 확인되었다. 이들 세포는 또한 DARZALEX™(다라투무맙)에 대해 감수성이었고, 치료를 받은 환자들에서 유의하게 감소되었다. 이들 CD38⁺ 면역조절성 세포의 DARZALEX™(다라투무맙)-매개 제거는 골수종 미세환경 내에서 국부 면역 억제를 감소시키고 양성 면역 이팩터 세포가 증폭되고 항종양 반응에 기여되게 할 수 있다.

[0525]

실제로, CD4⁺ 및 CD8⁺ 둘 모두를 포함한 광범위한 T-세포 집단의 유의한 증가가 말초 혈액 및 골수 둘 모두(즉, 종양)에서 관찰되었다. 나이브 T-세포의 유의한 감소, 및 이에 수반되는, 이팩터 기억 CD8⁺ T-세포의 유의한 증가를 포함하여, 특이적 CD8⁺ 하위집단이 DARZALEX™(다라투무맙) 요법에 의해 변경되었는데, 이는, 면역학적 기억을 보유하여 종양 항원에 대해 반응할 수 있는 항원 경험 표현형 쪽으로의 이팩터 T-세포의 이동을 나타낸다. CD8⁺:CD4⁺ 및 CD8⁺:Treg의 비가 또한 치료에 의해 유의하게 증가하였는데, 이는 음성 면역 조절인자 대비 양성 면역 조절인자의 이동을 입증한다.

[0526]

증폭된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T-세포가 본질적으로 클론성인지의 여부를 평가하기 위하여, T-세포 래퍼토리가 환자들의 하위세트에서 조사되었다. T-세포 클론성이 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 의해 유의하게 증가되었는데, 이는 심지어 SD의 최상의 반응을 가진 환자들 또는 진행된 환자들에서도 그러하였다. 따라서, 증가된 T-세포 클론성은 단순히 종양 부하의 감소에 기인할 수 없다. 그러한, T-세포 클론성의 일탈(skew)은 우수한 임상 반응을 갖는 환자들에서 더 커졌고, CD8⁺ T-세포의 증가와 상관되었는데, 이는 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 의해 관찰된 T-세포 증폭이 항원-유도(antigen-driven)에 의한 것이었음을 시사한다. 이것은 이 환자 집단에서 현저한데, 이러한 환자 집단은 강도 높게 사전치료되었고(중위 5가지의 요법), 강한 항종양 면역 반응을 일으킬 수 있을 것으로 예측되지 않았다. 증가된 TCR 클론성에 더하여, DARZALEX™(다라투무맙)에 대해 반응을 갖는 환자들은 기존의 바이러스성 항원 및 동종항원에 대해 증가된 T-세포 반응을 보여주었으며, 이는 면역억제 상태로부터 면역 시스템의 구조(rescue)를 시사한다.

[0527]

DARZALEX™(다라투무맙)에 의한 치료는 면역 억제 MDSC 및 조절성 T- 및 B-세포의 감소를 야기하였다. 이러한 감소는 CD4⁺ T-헬퍼 세포 및 CD8⁺ 세포독성 T-세포의 증폭에 수반되었다. IFN-γ 생성에 의해 측정된 바와 같은 기능적 항-바이러스 반응 및 T-세포 클론성은 또한 DARZALEX™(다라투무맙) 치료에 의해 증가되었다. 이러한 관찰은, 낮은 CD38 발현에도 T-세포가 적절하게 계속 기능하였음을 나타내고, 증가된 T-세포 반응은 조절성 세포의 고갈에 기인할 수 있음을 시사한다. 또한, T-세포 증폭, 활성, 및 클론성에 있어서의 이러한 변화는 DARZALEX™(다라투무맙)에 반응한 환자들에서 그렇지 않은 환자들에 비하여 더 현저하였다. DARZALEX™(다라투무맙) 요법으로부터의 재발은 이를 변화 중 다수의 역전과 관련되었다. 이것은 임상 반응 및 효능에 기여할 수 있는 면역조절을 통한 DARZALEX™(다라투무맙)의 이전에 특징규명되지 않은 추가 작용 기전을 시사한다.

[0528]

최근에는, 암을 직접 표적화하기보다는 오히려 항종양 면역 반응을 촉진시키는 항체가 광범위한 환경에서 효능을 보여주었다. CTLA-4 및 PD-1을 억제하는 항체는 T-세포 증폭을 촉진시키고 T-세포 활성화를 향상시켜, 그 결과, 진행된 고형 종양 및 혈액학적 악성종양, 예컨대 호지킨 림프종을 갖는 환자에서 연장된 생존 및 지연된 질병 재발로 이어진다. 항암 면역을 향상시킴으로써, 이러한 면역조절 항체는 임상 반응을 유도할 수 있을 뿐

만 아니라, 질병 재발을 예방할 수 있다.

[0529] 실시예 10. 54767414MMY2002(SIRIUS) 파트 2 임상 연구에서 단제 DARZALEX™(다라투무맙)로 치료된 다발성 골수종 대상체의 혈청 프로테옴 분석

[0530] 바이오마커 샘플 수집 및 처리

[0531] 말초 혈액 샘플을 표준 혈청 세페레이터 튜브(2.5 mL 내지 5 mL)에 수집하고, 혈청 분취물을 다중분석 혈청 단백질 프로파일링(multianalyte serum protein profiling)을 위하여 SomaLogic, Inc.사(미국 콜로라도주 볼더 소재)에 동결된 상태로 운송하였다.

[0532] SOMAmer 친화성 기반 분자의 사용에 의해 1129개의 단백질 분석물을 측정하는 사전검증된 SOMAscan 검정을 사용하여 SomaLogic사에서 혈청 단백질 프로파일링을 수행하였다. SOMAmer 시약은 단일 가닥 DNA-기반 단백질 친화성 시약이다. 이러한 검정은 소량의 입력 샘플(150 μL의 혈장)을 사용하고 단백질 신호를 SOMAmer 신호로 전환시키는데, SOMAmer 신호는 맞춤형 DNA 마이크로어레이에 의해 정량화된다.

[0533] 각각의 SOMAmer는 4개의 기능적 모이어티를 함유한다:

[0534] 1. 독특한 단백질 인식 서열

[0535] 2. 포획을 위한 비오틴

[0536] 3. 광절단성 링커(Photocleavable linker)

[0537] 4. 검출을 위한 형광 분자

[0538] 독특한 단백질 인식 서열은 DNA를 사용하고, 아미노산 측쇄를 모방하는 화학적으로 변형된 뉴클레오티드를 도입시켜, 표준 암타머의 다양성을 확대시키고 단백질-핵산 상호작용의 특이성 및 친화성을 향상시킨다(문헌[Gold *et al.*, PLoS One 5:e15004, 2010]). 암타머는 SELEX에 의해 선택된다. SOMAmer 시약은 천연 입체구조의 단백질을 사용하여 선택된다. 그렇기 때문에, SOMAmer 시약은 결합을 위하여 온전한 3차 단백질 구조를 필요로 한다. 폴리거나 변성된, 추축컨대 불활성인 단백질은 SOMAmer 시약에 의해 검출되지 않는다.

[0539] SOMAmer 시약들의 마스터 믹스가 샘플 유형 및 희석을 위해 그룹화된다. 이 시약은 샘플 인큐베이션 전에 스트렙타비딘 비드에 사전결합된다. 샘플 중의 단백질을 평형 동안 동종 SOMAmer에 결합시키고, 세척하고, NHS-비오틴과 함께 인큐베이션하고, 세척하고, 이어서 비드를 UV 광에 노출시켜 광절단성 링커를 절단한다. 용출액(elution)은 비오틴 표지 단백질에 결합된 SOMAmer 시약을 함유한다. 스트렙타비딘 포획 및 후속 세척은 결합되지 않은 SOMAmer 시약을 제거한다. 최종 용출액에서, SOMAmer 분자는 변성 조건을 통해 그의 동종 단백질로부터 방출된다. 최종 용출액을 맞춤형 Agilent DNA 마이크로어레이에 혼성화하고, SOMAmer 분자로부터의 형광 단을 상대 형광 단위(RFU)로 정량화한다. RFU는 샘플 중의 단백질의 양에 비례한다.

[0540] MMY2002 연구로부터의 샘플을 2개의 1차 배치(batch)에서 시험하였다. 180개의 샘플의 제1 배치는 90명의 대상체로부터의 한 쌍의 사이클 1 일수 1(C1D1, 기저선) 및 C3D1(사이클 3 일수 1) 혈청 샘플을 함유하였다. 180개의 샘플을 3개의 별개의 SomaScan 플레이트 상에서 함께 분석하였다. 샘플의 제2 배치는 배치 1로부터의 35개의 반복 샘플을 포함하여 50개의 C1D1 샘플을 포함한다.

[0541] 데이터 분석

[0542] 입력 데이터세트 및 정의

[0543] 평가 가능한 반응을 갖는 치료된 대상체를 데이터 분석에 포함시켰다. 보고서 전체에 걸쳐 일치되게, 반응자들은 sCR, VGPR, 및 PR의 전체적인 최상의 반응(IRC에 따라, MMY2002에 대해)을 갖는 대상체들로서 정의되고, 안정된 질병(SD) 대상체들은 최소한의 반응(MR) 또는 SD를 갖는 대상체로서 정의되고, 무반응자들은 진행성 질병(PD)의 전체적인 최상의 반응(IRC에 따라, MMY2002에 대해)을 갖는 대상체들로서 정의된다.

[0544] SomaLogic 데이터 전처리

[0545] 배치 정렬

[0546] MMY2002 샘플의 배치 1 및 2를 SOMAscan 플랫폼의 2개의 상이한 버전에서 시험하였다. 2개의 버전 사이의 차이는 미소하였으며, 이를 버전 사이에서 변화된 3개의 SOMAmer 서열을 포함하였다(CTSE: 3594-6_1 → 3594-6_5, FCN1: 3613-62_1 → 3613-62_5, BMPER: 3654-27_1 → 3654-27_4). 이들을 이 분석으로부터 제거하였다.

[0547] 3개의 배치 1 플레이트의 측정치를 SomaLogic의 표준 플레이트간 보정 워크플로우에 따라 정렬하였는데, 이는 마스터-믹스 특이적 전역 참조값 대 7개의 플레이트내 컨트롤 캘리브레이터(in-plate control calibrator) 측정치들의 중위값의 비를 계산함으로써 각각의 SOMAmer에 대하여 플레이트폭 보정 축척 계수(plate-wide calibration scaling factor)들을 정의함으로써 행하였다. 각각의 SOMAmer 시약에 대한 플레이트-특이적 축척 계수를 동등하게 플레이트 상의 각각의 샘플에 적용하였다.

[0548] 배치 1 및 2의 상이한 SOMAscan 플랫폼 버전들을 고려하여, 배치들 전체에 걸쳐 35개의 샘플의 반복된 측정을 레버리징(leveraging)함으로써, SomaLogic의 표준 플레이트간 보정 워크플로우의 변형된 구현으로 체계적인 배치간 변동성 보정을 행하였다. 각각의 SOMAmer에 대하여, 배치 1 보정후 측정치를 배치 2 보정전 측정치로 나눈 비를 35개의 반복된 샘플 각각에 대해 계산하였다($r_{i,j}$). 이를 35개의 비의 중위값을 사용하여, 배치 2의 샘플들에 대하여 수정된 SOMAmer-특이적 교정 축척 계수를 정의하였다. 이어서, 이를 보정 축척 계수를 표준 SOMAscan 절차와 동일하게 구현하였다.

$$r_{i,j} = \left(\frac{\text{보정후 농도배치 } 1_{,ij}}{\text{보정전 농도배치 } 2_{,ij}} \right), \quad \vec{r}_i = (r_{i,1}, r_{i,2}, \dots, r_{i,j}) \quad \text{모든 반복된 샘플 } j \text{에 대하여}$$

$$\text{보정 축척 계수}_i = \text{중위값 } (\vec{r}_i) = \tilde{r}_i$$

[0549]

[0550] 일단 수정된 보정 축척 계수를 계산하였으면, 분석의 각각의 배치에 대한 모든 축척 계수의 분포를 도표로 나타내어 이상치(outlier)의 존재를 평가하였다. 극도로 크거나 작은 캘리브레이터(0.25 초과 및 3 미만)를 갖는 9 개의 SOMAmer는 불량한 재현성으로 인해 분석으로부터 제거하였다.

[0551] 배치 정렬 및 SOMAmer 필터링이 MMY2002에 대해 완료된 후에, log2 변환을 MMY2002의 모든 단백질 농도 값에 대해 적용하여, 데이터가 정상 분포와 더 일치되게 하고 모수적 통계학적 시험의 성능을 개선하였다.

교락 변수(Confounding Variable) 보정

[0553] (인구통계, 반응 클래스, 및 샘플 시점과 같은) 메타-변수들에 의해 설명되는 데이터세트 분산의 부분의 추산 및 잠재적 교락 인자의 확인을 센터링 및 스케일링된 데이터세트에 대한 주요 성분 분석에 의해 수행하였다. 단순 선형 모델을 적합화하여, 관심 변수 각각과 유의하게 관련된 최고 순위 PC를 확인하였다. 이들 연관성의 유의성을 월드 검정(Wald test)을 사용하여 결정하였고, 이 모델에 의해 설명되는 PC 변동성의 분율을 적합의 R2로 추산하였다. MMY2002 데이터의 경우, 부위 ID는 PC1과 상관되는 것으로 확인되었고 데이터세트 변동성의 최대 부분을 차지하였다(7.37% 이상, $p\text{-값} = 3.71 \times 10^{-9}$). 데이터 내에서의 샘플 취득 부위 관련 효과의 영향을 감소시키기 위하여, ComBat28을 이용하여 부위 ID 효과를 보정하였다.

반복된 샘플 통합(Merging)

[0555] MMY2002 배치 1과 배치 2 사이에서 반복된 35개의 샘플의 데이터를 각각의 단백질에 대한 평균을 계산함으로써 통합하였다.

차별적 단백질 농도 분석

반응자들 vs. 무반응자들

[0558] DARZALEX™(다라투무맙) 반응자들 vs. 무반응자들에서의 단백질 농도 분포의 통계학적 비교를 하기의 2가지의 상보적 방법을 사용하여 기저선 및 치료 중 둘 모두에서 수행하였다: (i) 각각의 개별 SOMAmer에 대해 행해지는 월록슨 순위합 검정(문헌[Hollander and Wolfe, Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons. 1973. 27-33 (one-sample), 68-75 (two-sample)] 및 (ii) 모든 SOMAmer에 대해 동시에 행해지는 럼마(Limma) 분석(문헌[Ritchie, M.E., et al., Nucleic Acids Res. 2015; 20:43(7):e47]). 모든 p-값을 다중 가설 보정을 위한 벤자미니-호흐베르크(Benjamini-Hochberg)(BH) 방법을 사용하여 조정하였다(문헌[Benjamini and Hochberg, (1995) J. R. Statist. Soc. B.57: 289–300; R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2011; ISBN 3-900051-07-0]). 조정된 p-값이 0.05 미만일 때, 차별적 발현을 갖지 않는 널 가설을 거부하였다.

치료 중 vs. 기저선

[0560] 기저선 vs. 치료 중 단백질 수준을 3가지의 대안적인 통계학적 방법을 사용하여 비교하였다: (i) 이원 반복-측정 ANOVA6, (ii) 월콕슨 부호-순위 검정, 및 (iii) 프리드만 검정(Friedman test)(문헌[Johnson et al., (2007) *Biostatistics* 8(1):118-127]). 다중 가설 보정을 위한 BH 방법을 사용하여 모든 p-값을 조정하여 FDR을 제어하였다(문헌[Benjamini and Hochberg, J.R. Statist. Soc. B.57:289-300, 1995]). 치료 유의성에 더하여, 이원 반복-측정 ANOVA(문헌[Chambers et al., Analysis of variance; designed experiments: Chapter 5. Statistical Models in S, Editors J.M Chambers and T.J Hastie. Wadsworth & Brookes/Cole. 1992])를 또한 적용하여 유의한 시점:반응-클래스 상호작용이 각각의 SOMAmer에 대해 발생하였는지를 결정하였다. 변형된 월콕슨 순위합 검정을 사후 검정(post-hoc test)으로서 적용하여, 모든 각각의 대상체의 치료 중 단백질 농도 값과 기저선 단백질 농도 값 사이의 차이를 계산하고 월콕슨 순위합 검정을 수행함으로써, 반응자들 및 무반응자들이 상이한 치료 효과를 보여주었는지를 구체적으로 결정하였다. BH 방법을 사용하여 유의성 값을 조정하고, 조정된 p-값이 0.05 미만일 때 널 가설을 거부하였다.

[0561] 분류자 트레이닝(Classifier training)

[0562] 기저선 단백질 수준 MMY2002 데이터를 사용하여 반응 예측 분류자를 구축하였다. 중첩-루프 층별화 10배 교차-검증 접근법(nested-loop stratified 10-fold cross-validation approach)을 하기의 4가지 상이한 머신 러너(machine learner)를 사용하여 30회 반복하였다: 서포트 벡터 머신(Support Vector Machine)(SVM), 랜덤 포레스트(Random Forest)(RF), 나이브 베이즈(Naïve Bayes)(NB), 및 j48 의사결정 트리(decision tree). 각각의 러너에 대하여, 데이터세트(외부 루프)의 10개의 밸런싱된 폴드(balanced fold)를 생성하는 것으로 트레이닝 절차가 시작되었다. 이를 폴드 중 하나를 시험 코호트로서 유지하였으며, 한편 나머지 9개는 트레이닝 코호트로서 내부 루프에 전달하였다. 내부 루프 내에서, 트레이닝 코호트를 다시 한번 10개의 밸런싱된 폴드로 분할하여, 내부-트레이닝 및 내부-시험 세트를 생성하였다. 러너들을 이들 내부-트레이닝 세트들 각각에 대해 트레이닝하고, 이 과정을 외부 루프 내의 각각의 코호트에 대해 30회 반복하였다. 내부-시험 세트를 예측할 때 각각의 내부 루프 러너의 정확도를 사용하여 특징(feature)을 선택하고 모델 파라미터를 최적화하였다. 일단 30x 내부 루프가 각각의 트레이닝 코호트에 대해 완료되었으면, (최적화된 파라미터 및 특징을 사용하여) 외부 루프의 성능을 각각의 상응하는 시험 코호트에 대해 평가하였다. 이어서, 전체 외부 루프 절차를 30회 반복하여, 데이터세트 내의 모든 각각의 샘플에 대하여 30개의 반응 예측을 생성하였다. 이러한 루프 접근으로부터 획득된 AUC, 감수성, 및 특이성 통계자료는, 원래의 완전 데이터세트에 대해 트레이닝된 최종 모델이 얼마나 잘 새로운 시험 케이스에 대해 수행될 것인지에 대한 근사였다.

[0563] MMY2002 연구로부터의 결과

[0564] 단백질 발현에 있어서의 치료 유도 반응 의존성 변화를 포함하여 다양한 비교를 수행하였다. 시간 경과에 따라 반응자들에서 감소된 발현을 보여준 단백질들 중 하나는 PD-L1이었으며, 한편 PD-L1 단백질 발현은 시간 경과에 따라 무반응자들에서 증가하였다. T 세포 상에의 PD-L1의 결합은 감소된 T 세포 기능 및 증가된 Treg 발생으로 이어진다. 도 18은 반응자들, 무반응자들 및 안정된 질병을 갖는 환자들에서의 사이클 1 및 사이클 3에서의 PD-L1의 단백질 발현 프로파일을 나타낸다.

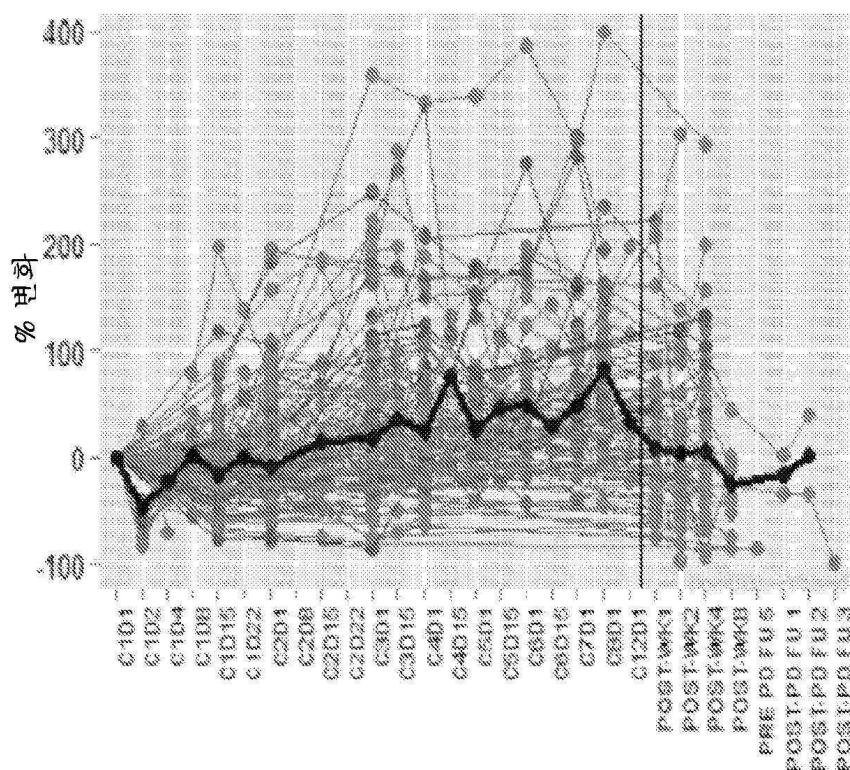
[0565] PD-L1과 그의 수용체 PD-1의 결합은 항종양 반응을 억제하고 T 세포 아네르기(anergy) 및 고갈을 유도한다. 어떠한 특정 이론에 의해 구애되고자 하지는 않지만, CD38 처리 시의 PD-L1의 하향조절은 또한 고형 종양에서의 항종양 면역 반응의 개선된 증강(potentiation)을 가져올 수 있다.

도면

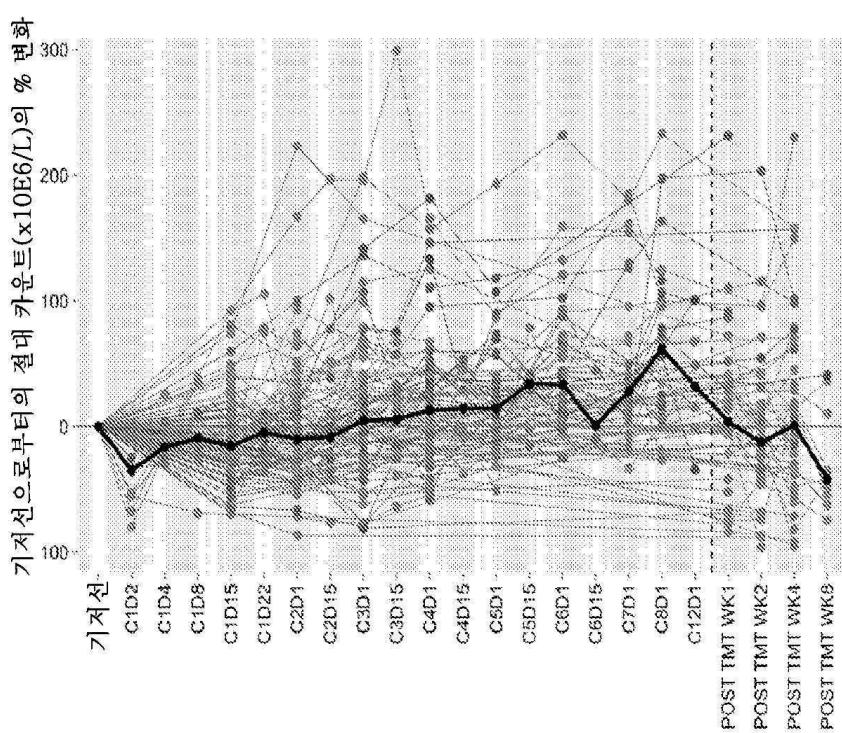
도면1



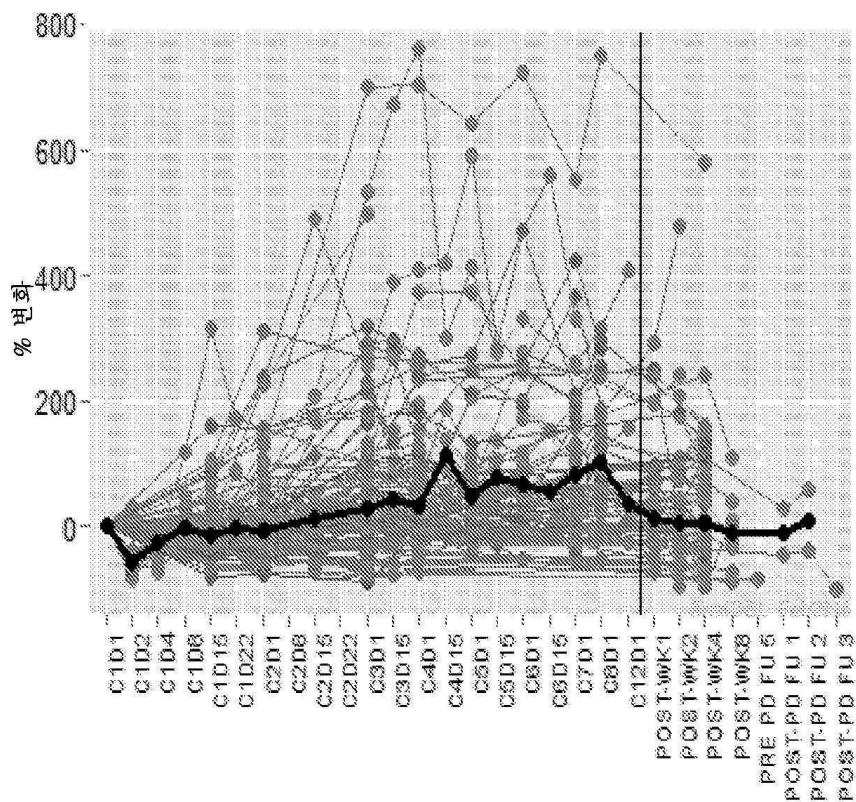
도면2



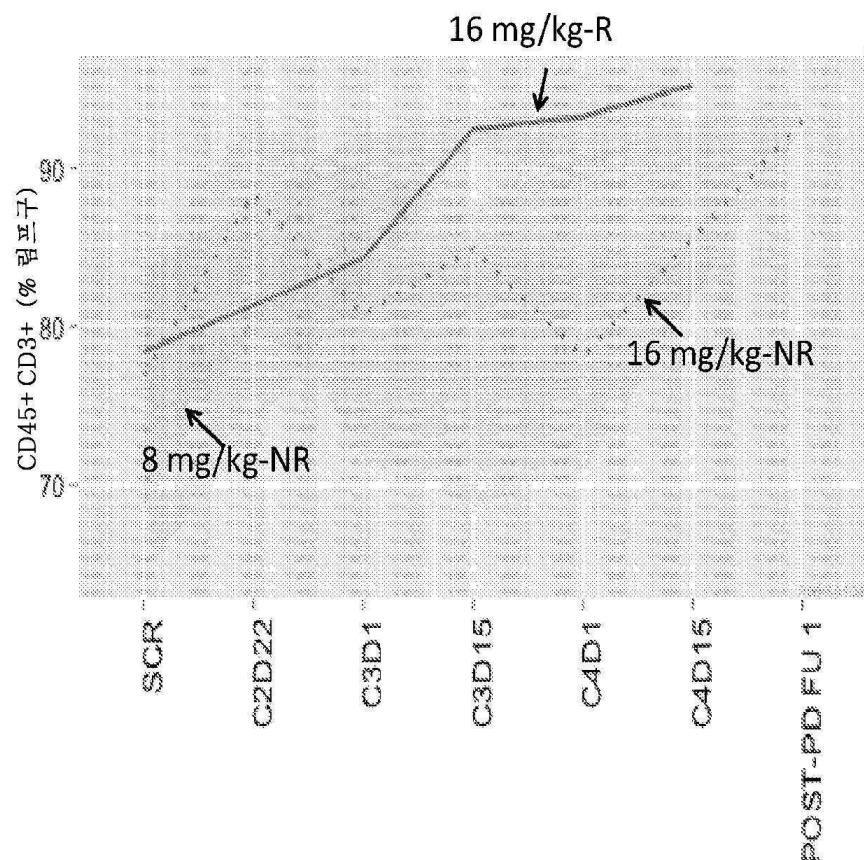
도면3



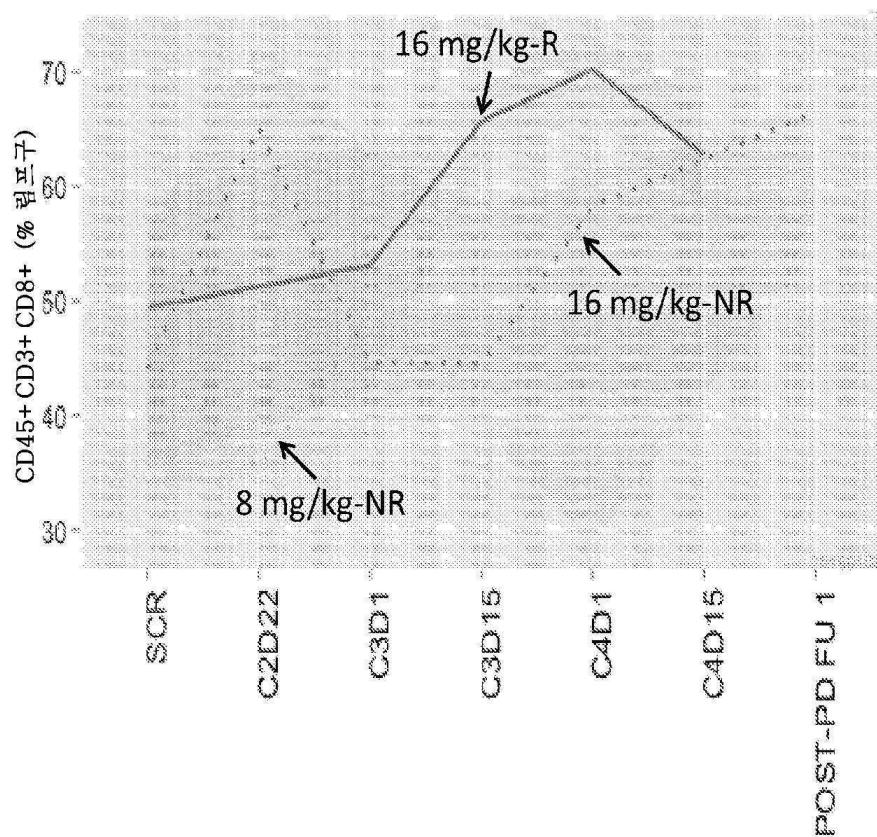
도면4



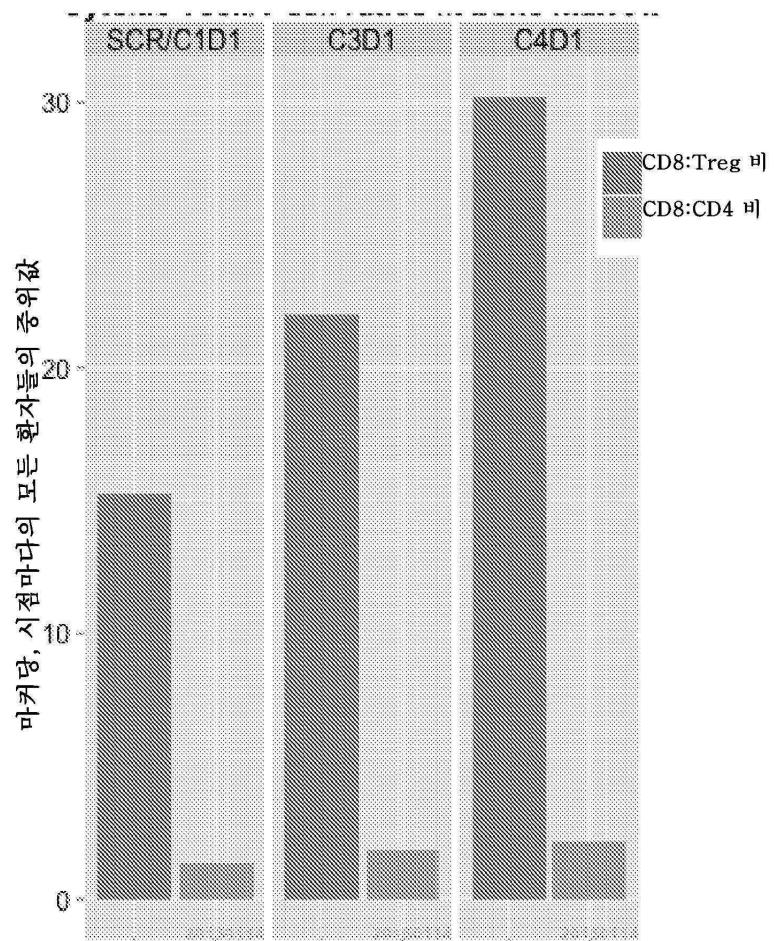
도면5



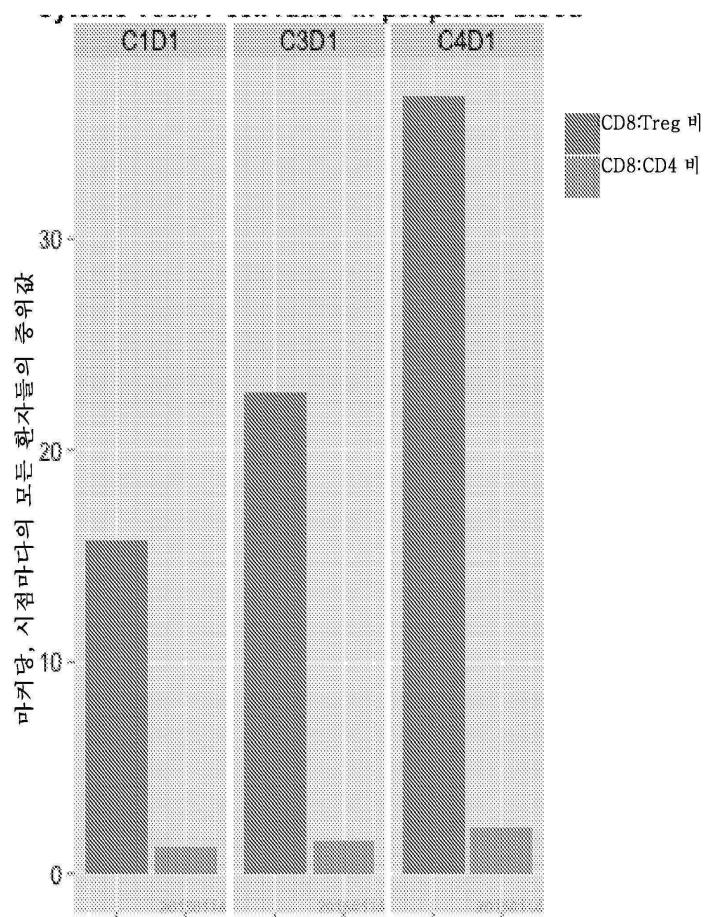
도면6



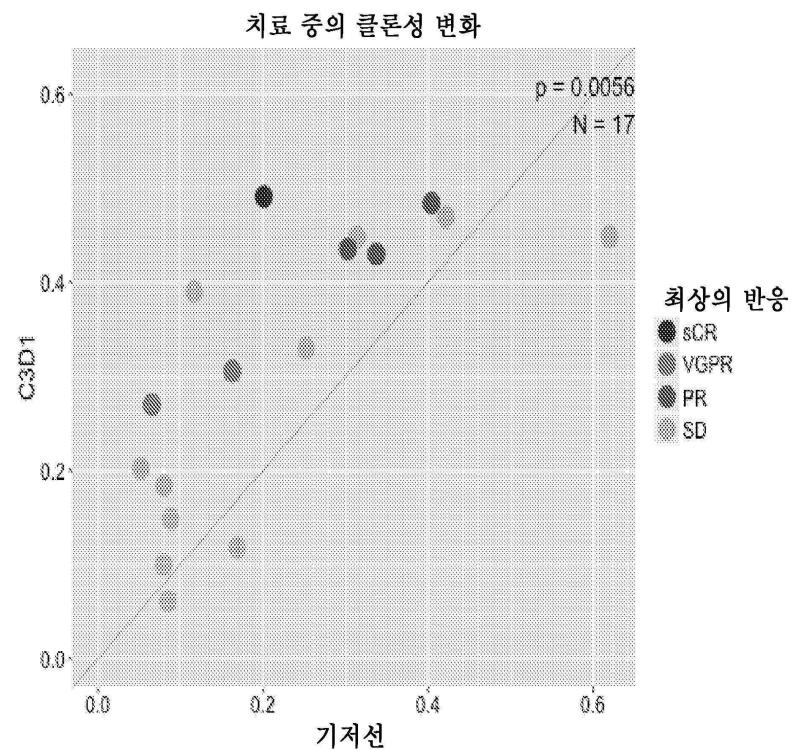
도면7a



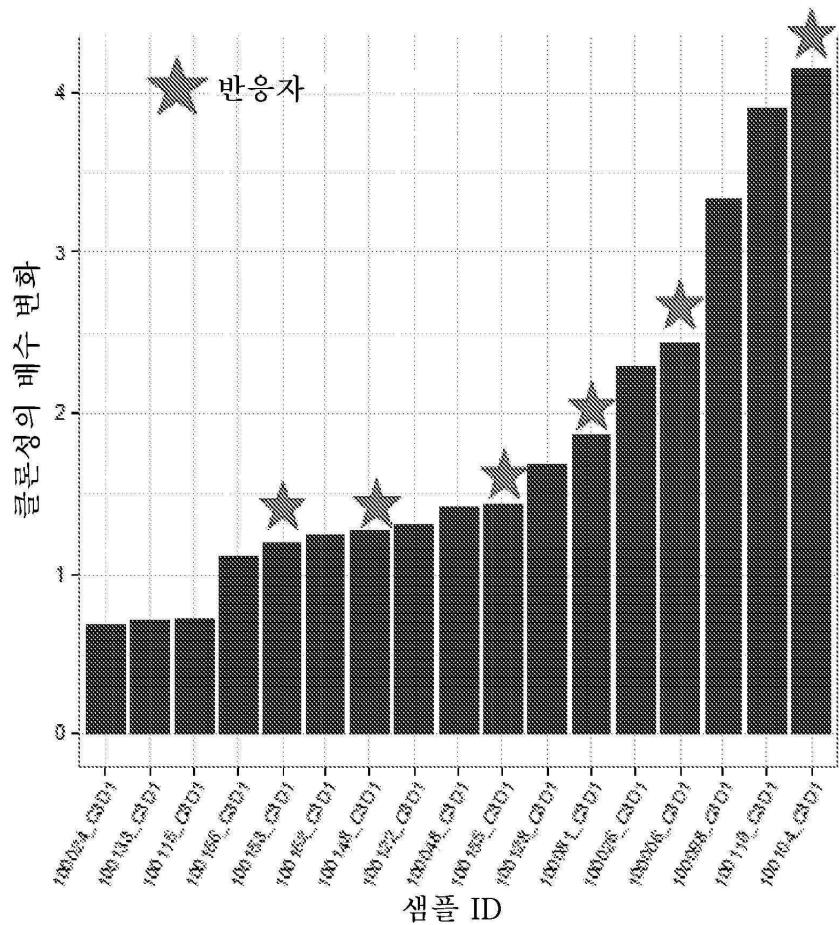
도면7b



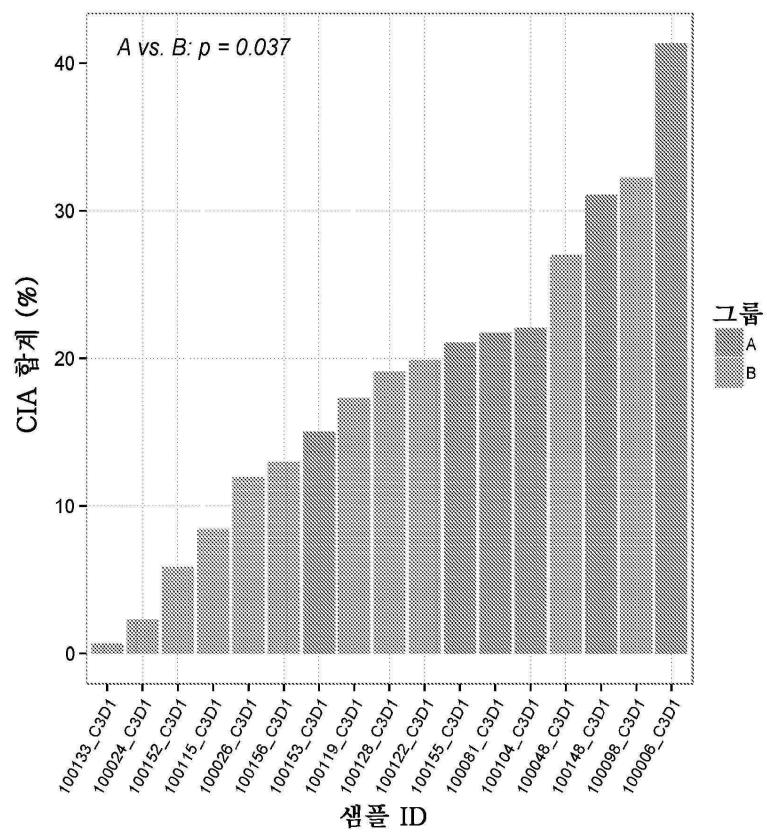
도면8a



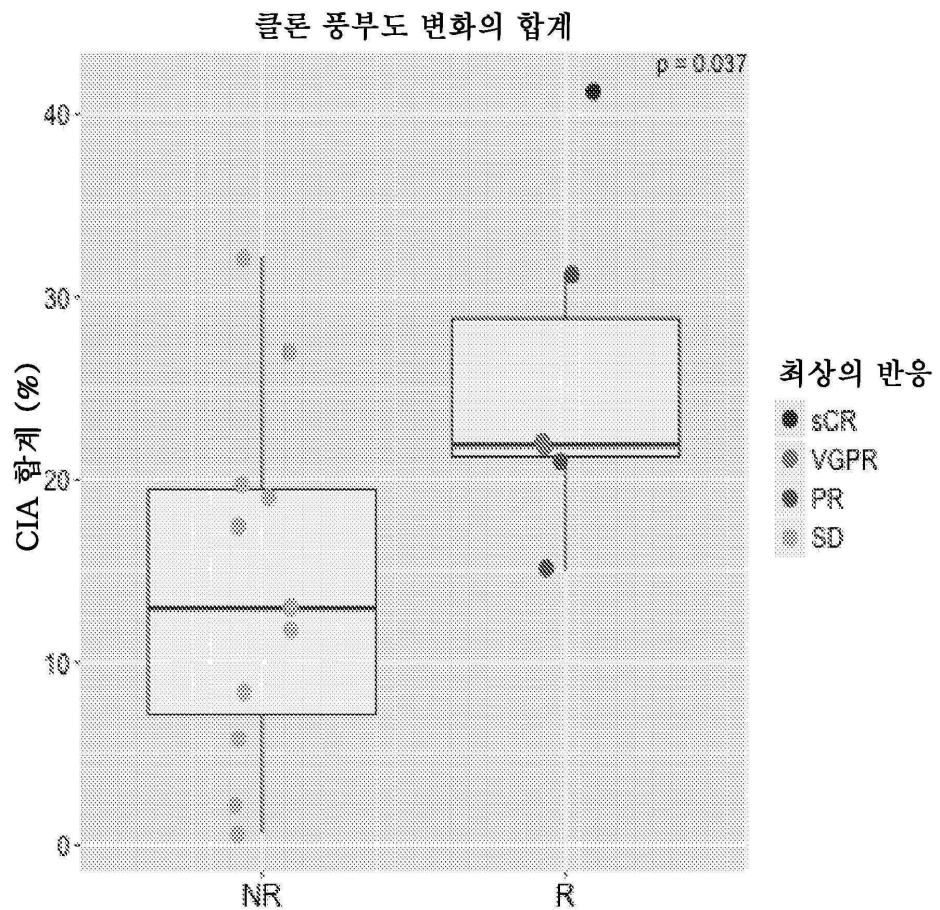
도면8b



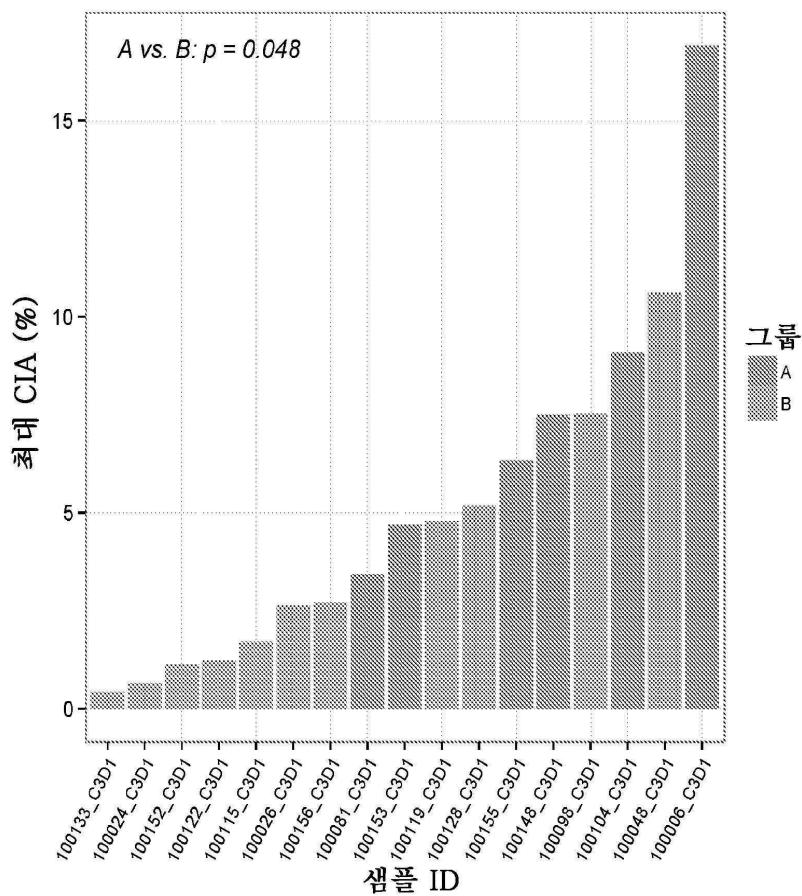
도면8c



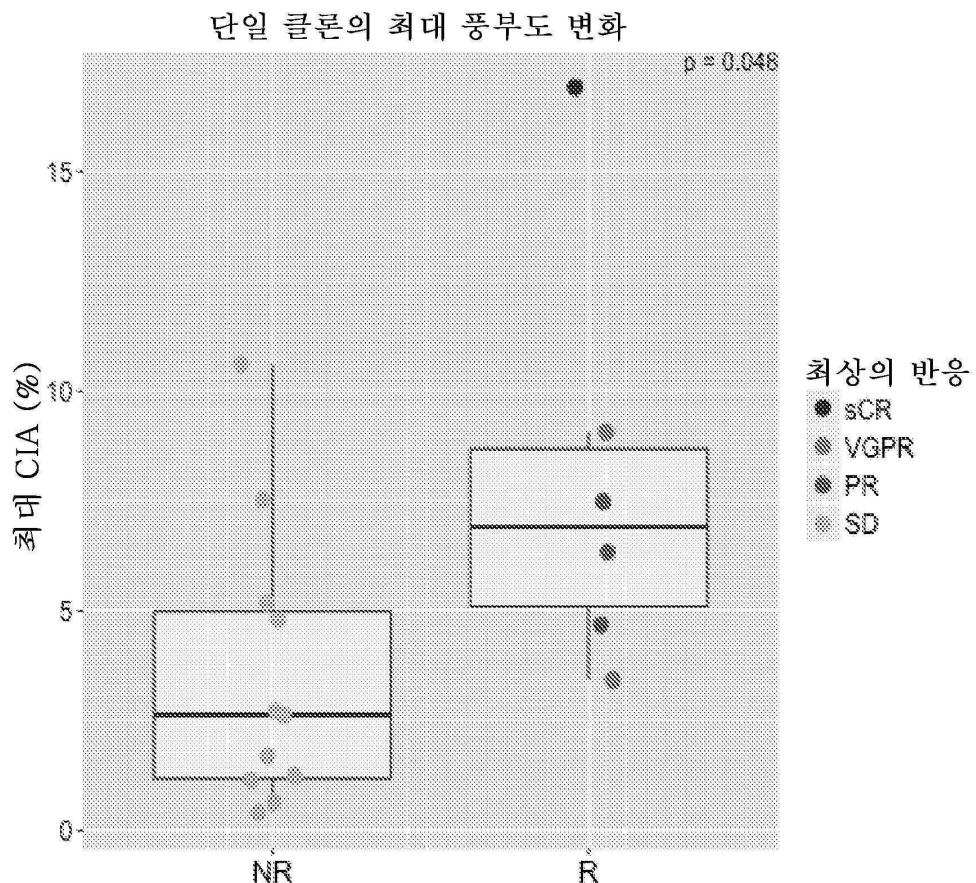
도면 8d



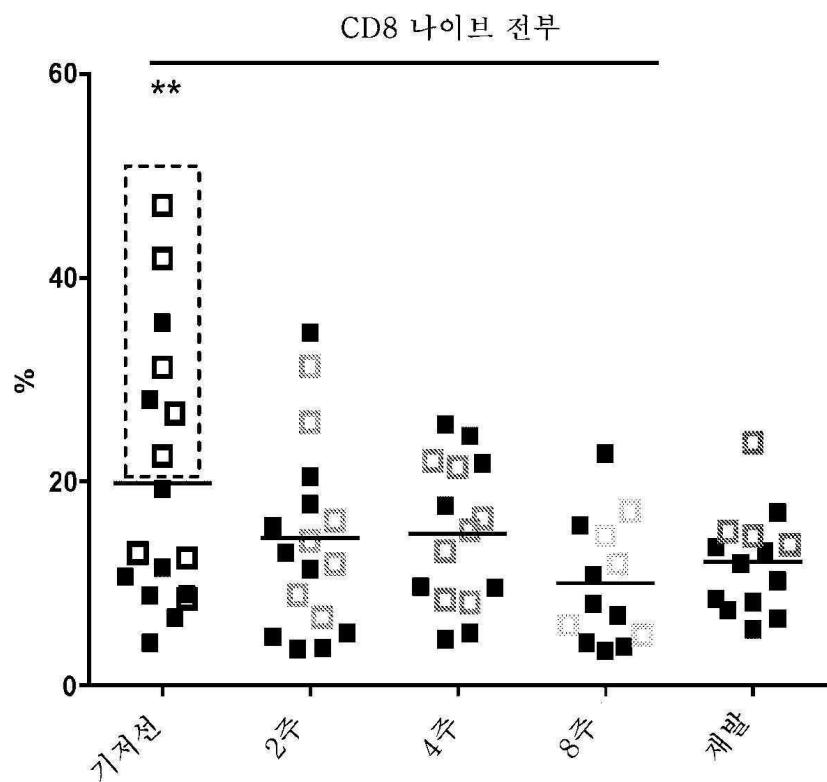
도면8e



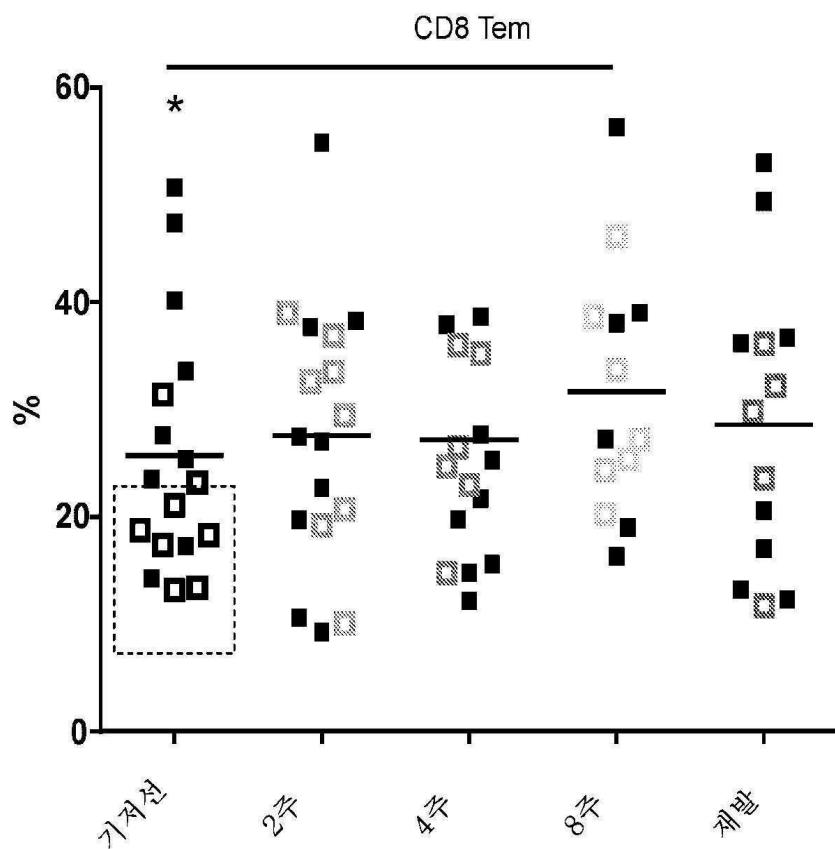
도면8f



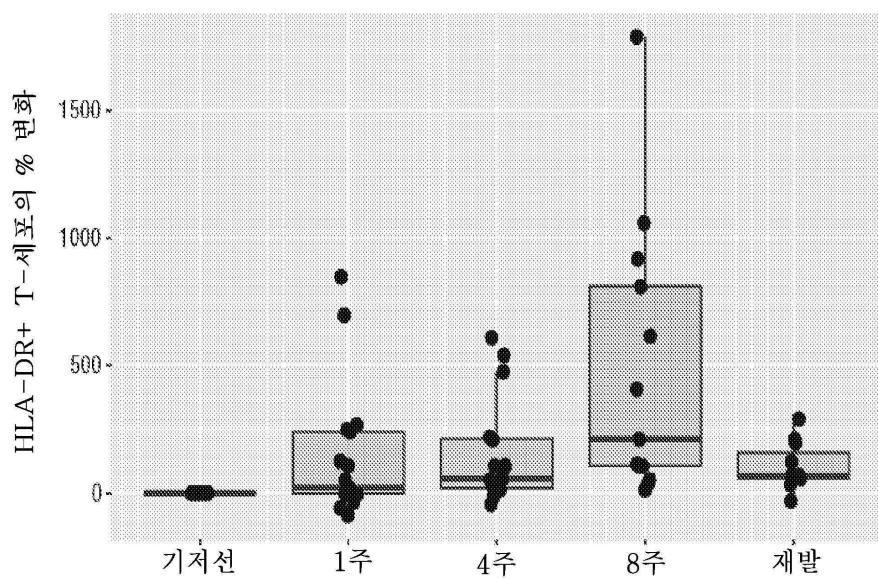
도면9a



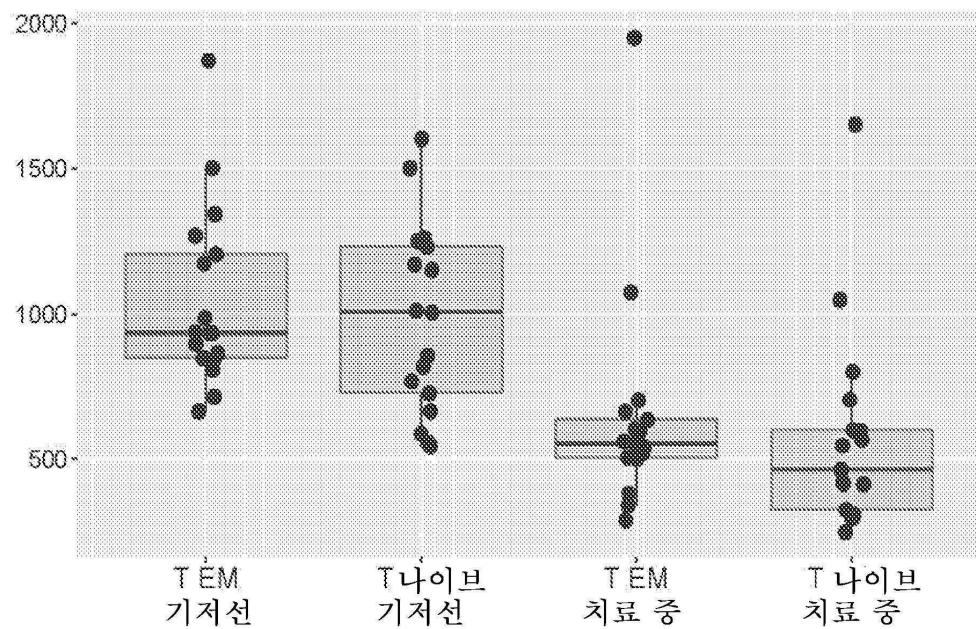
도면9b



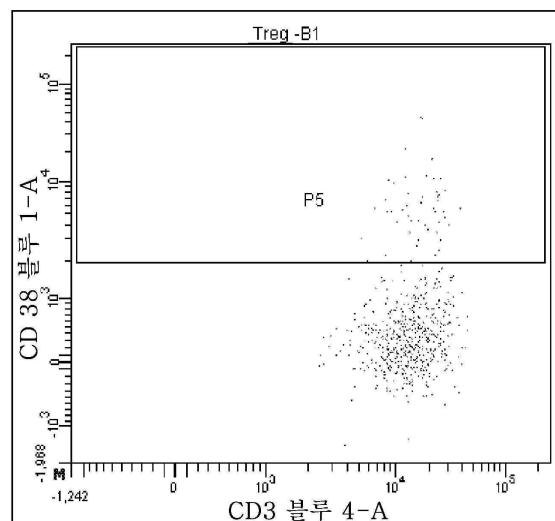
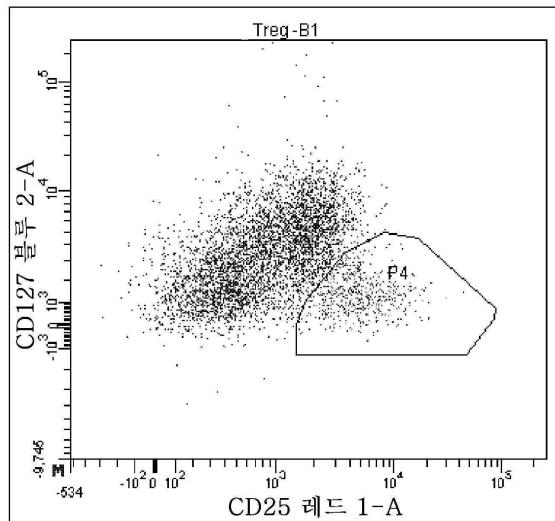
도면9c



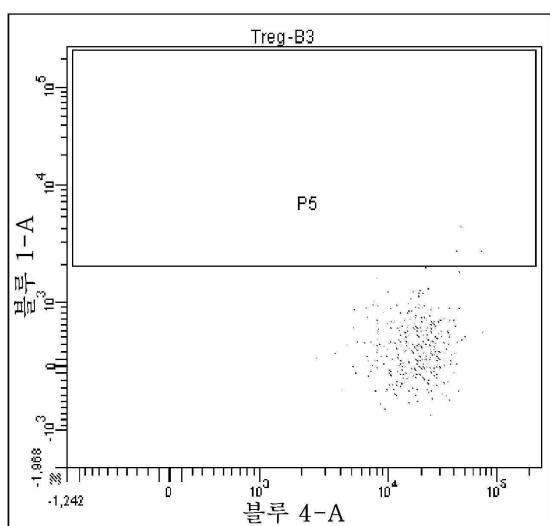
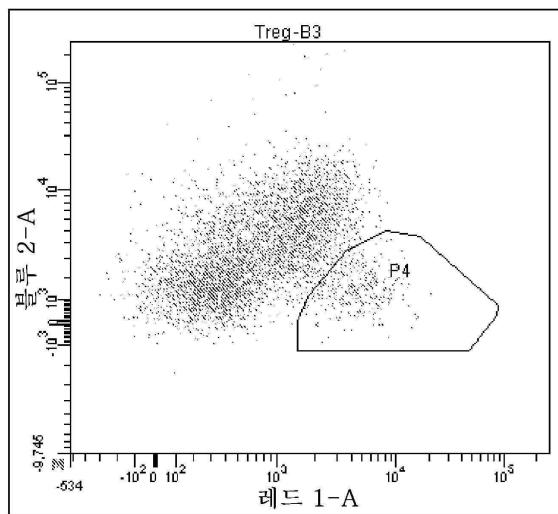
도면9d



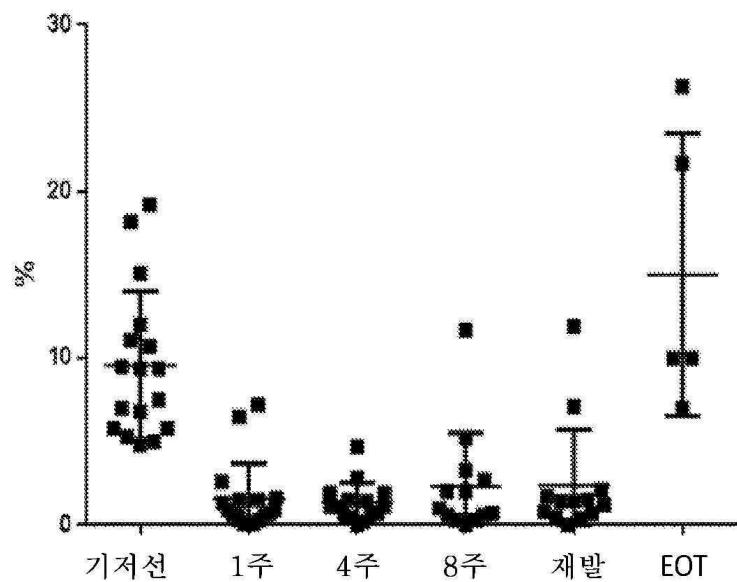
도면10a



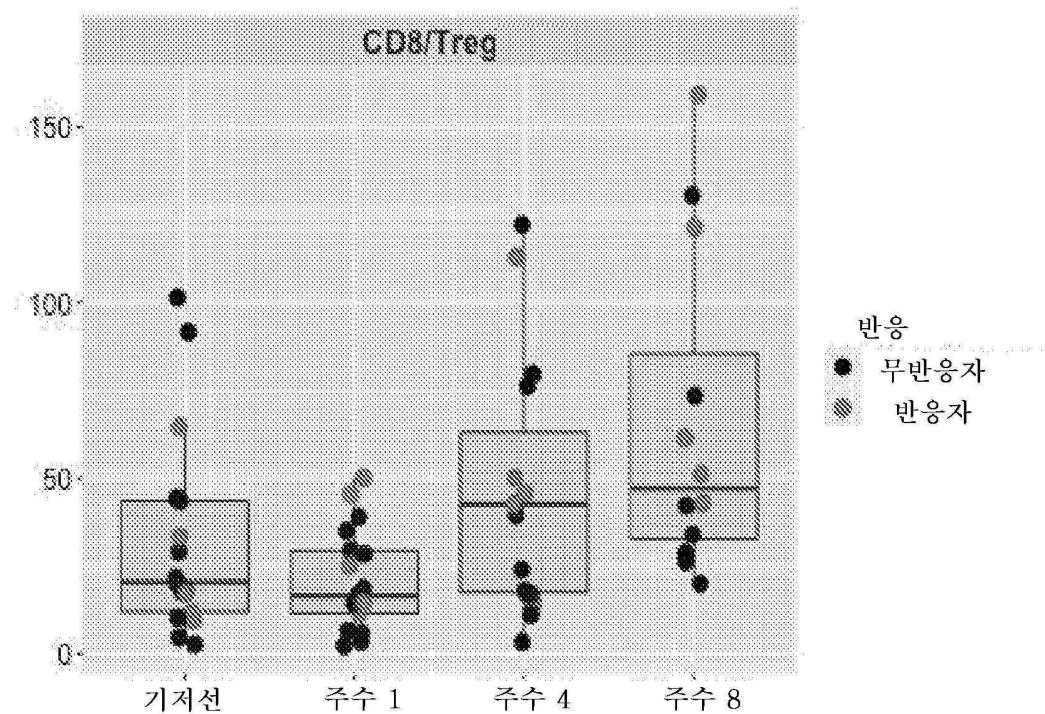
도면10b



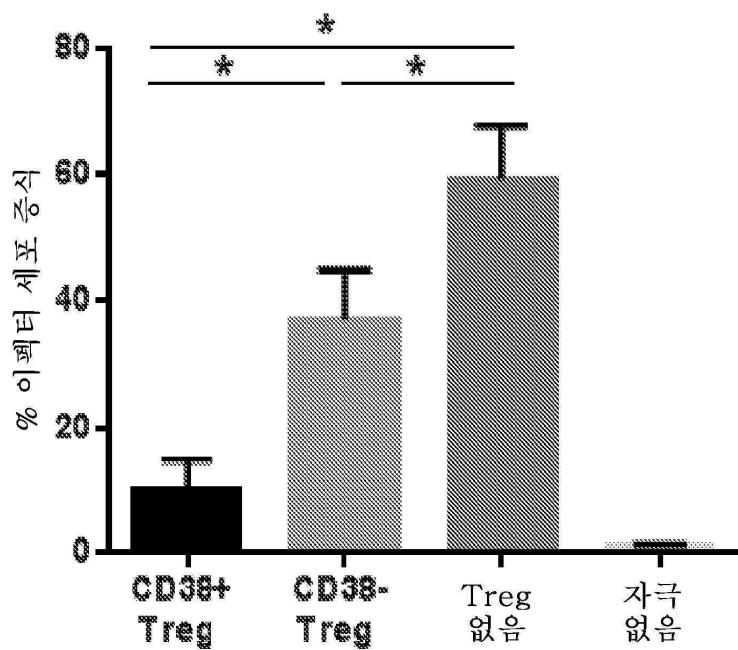
도면 10c



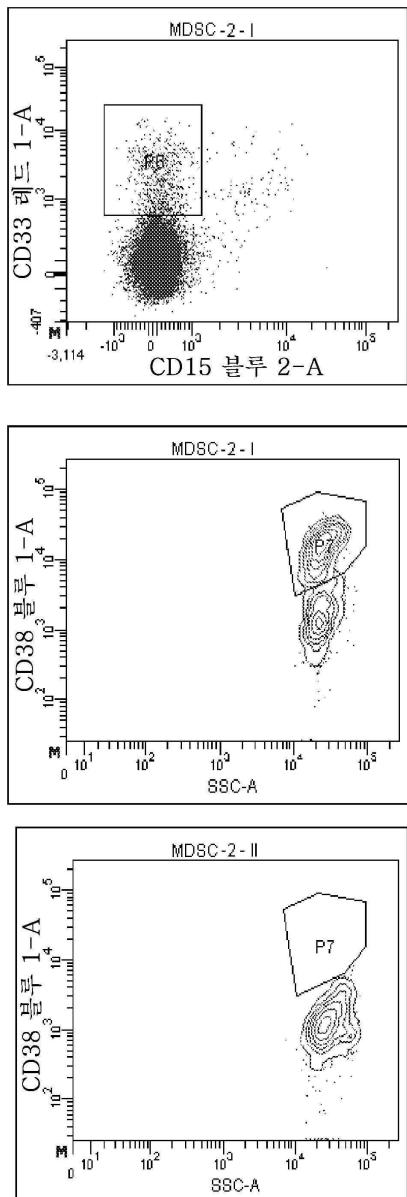
도면 10d



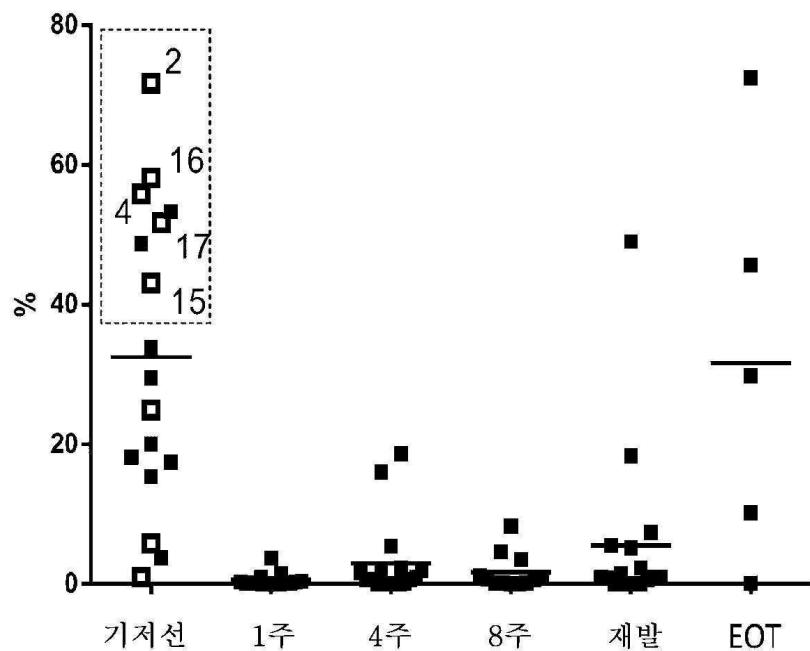
도면 10e



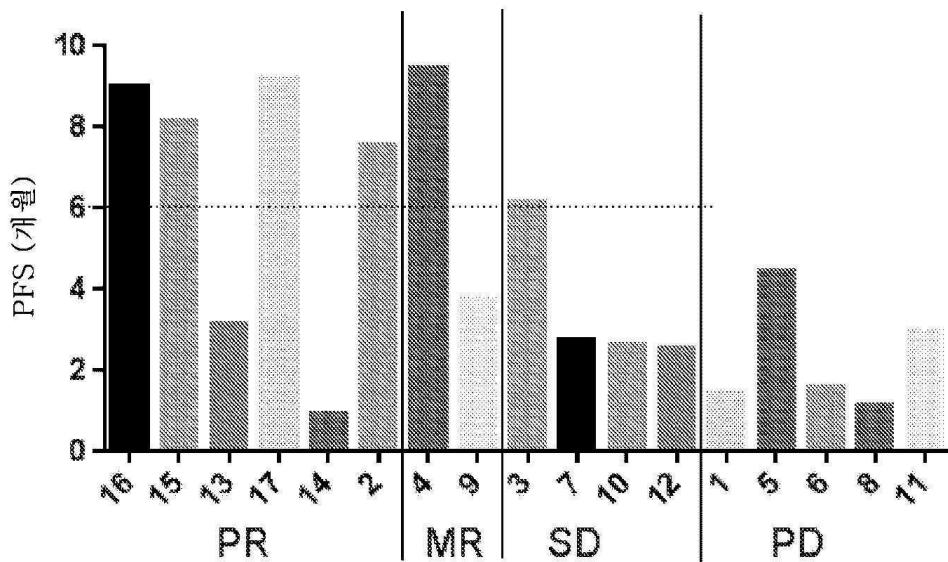
도면11



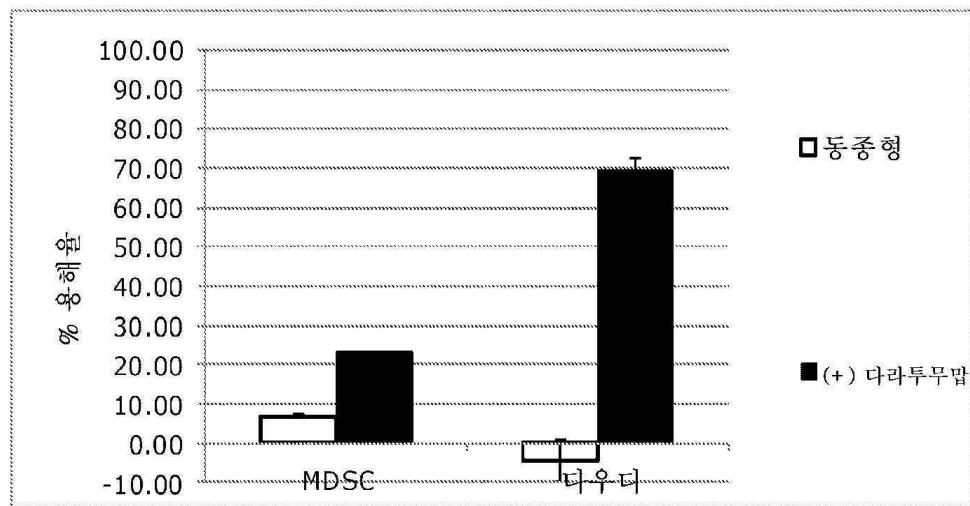
도면12



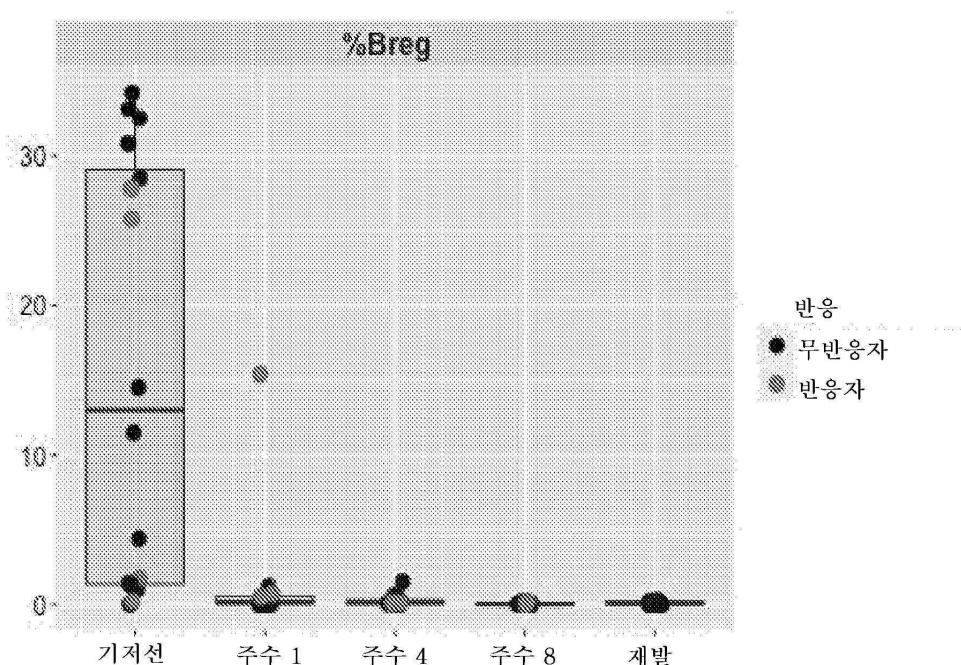
도면13



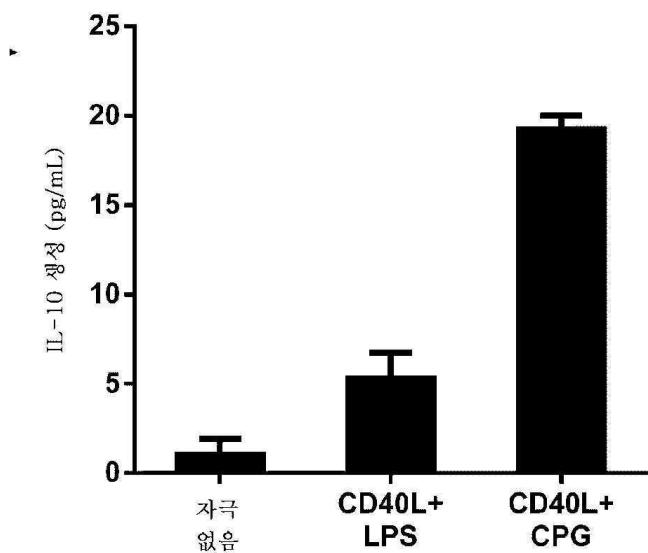
도면14



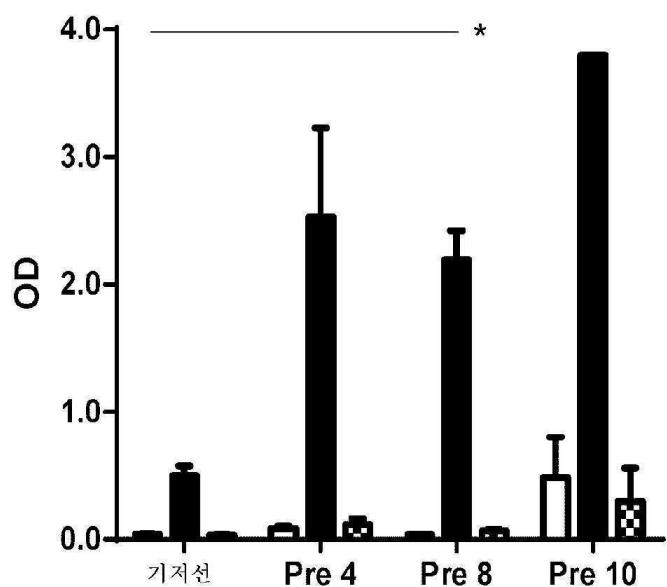
도면15a



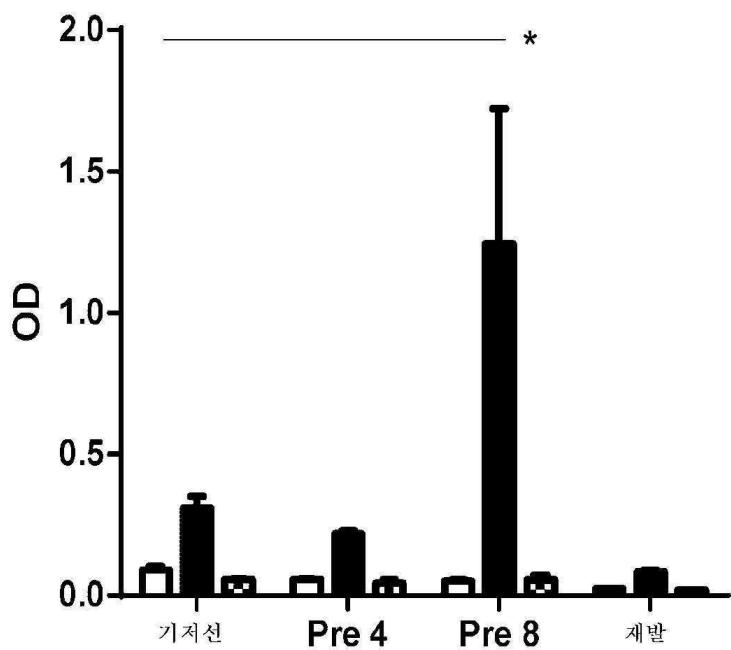
도면15b



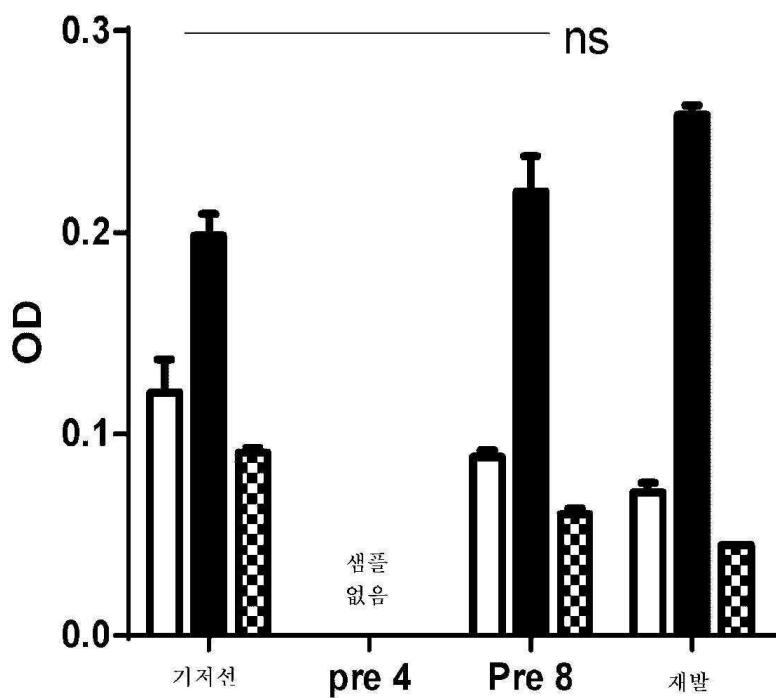
도면16a



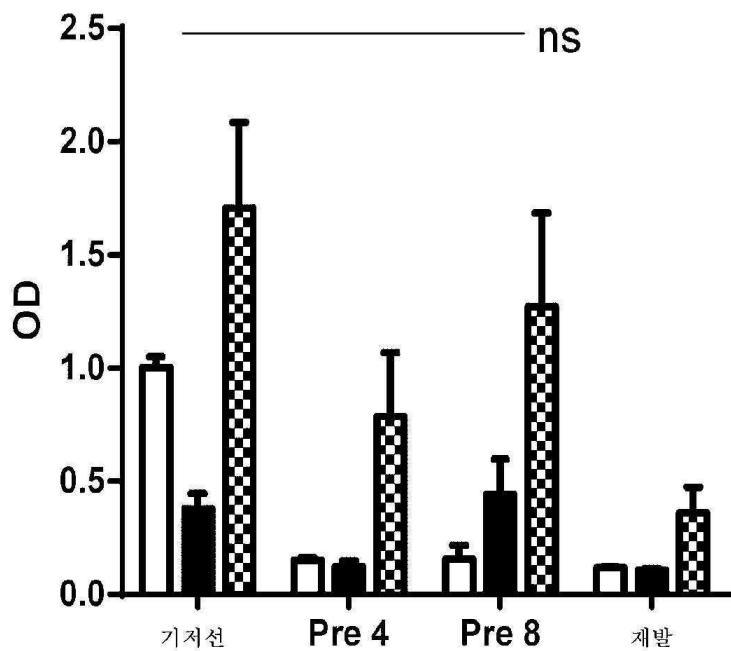
도면16b



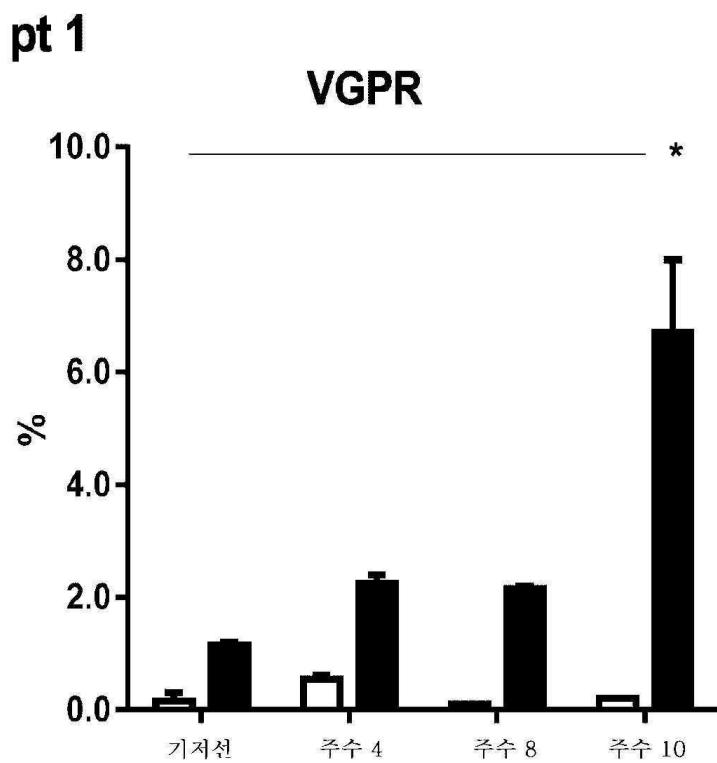
도면16c



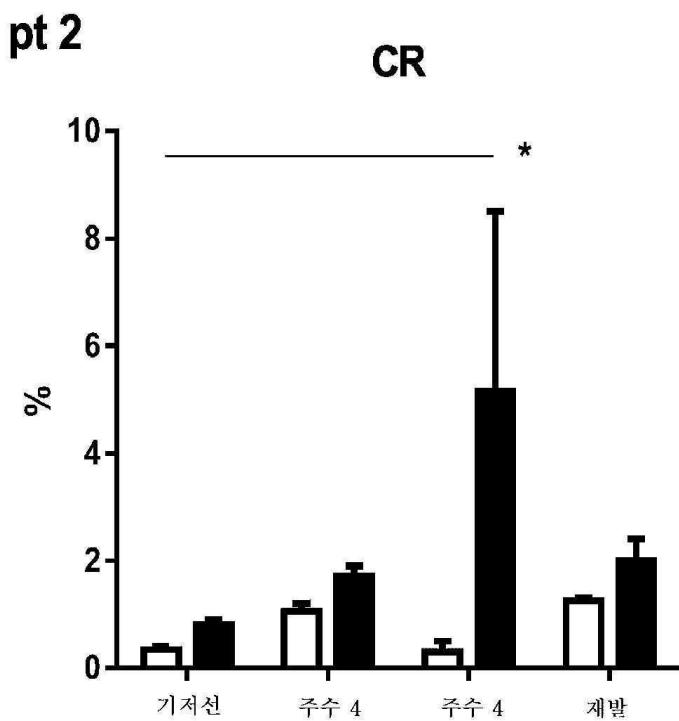
도면 16d



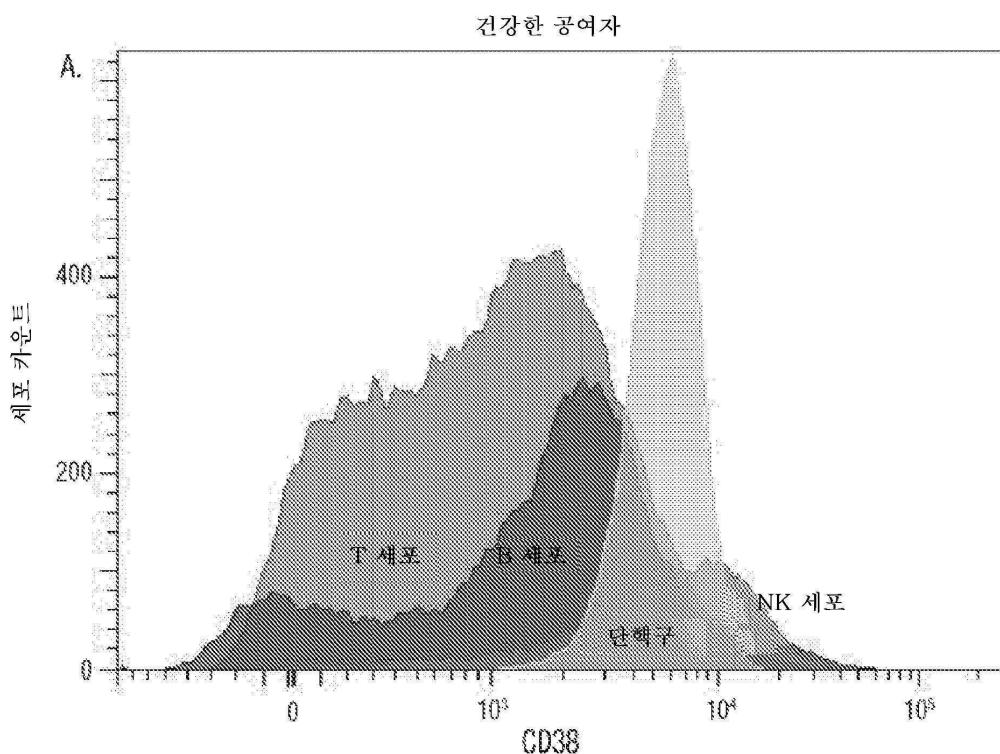
도면 16e



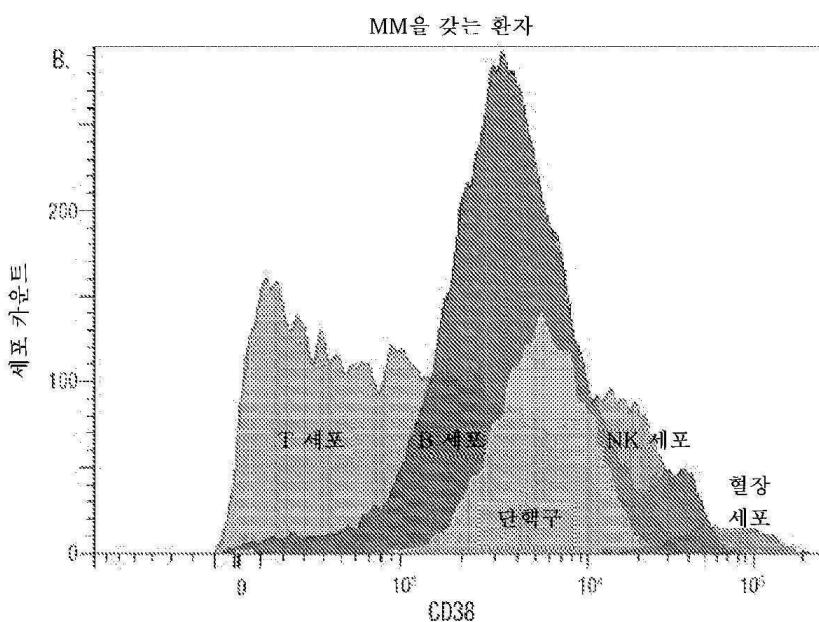
도면16f



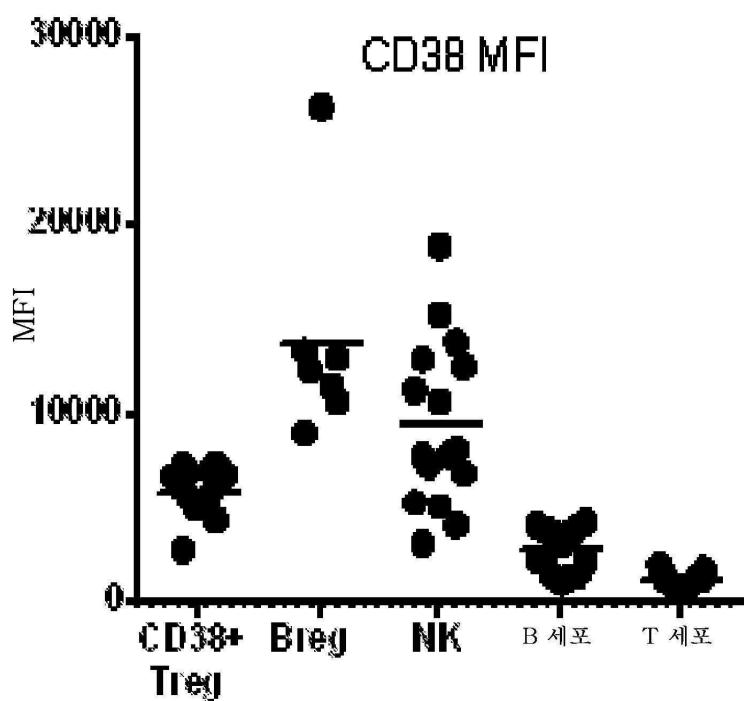
도면17a



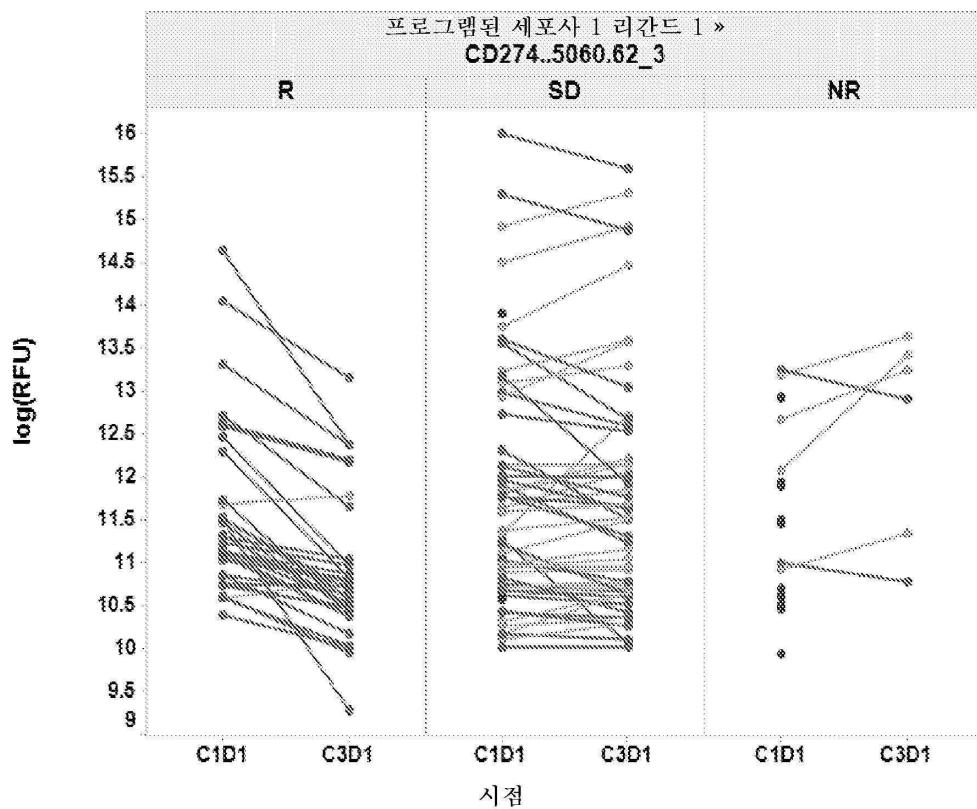
도면17b



도면17c



도면18



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Janssen Biotech, Inc.

Ahmadi, Tahamtan

Casneuf, Tineke

Lokhorst, Henk

Mutis, Tuna

Sasser, Amy

<120> Immune modulation and treatment of solid tumors with antibodies
that specifically bind CD38

<130> JBI5067WOPCT

<140> To Be Assigned

<141> 2016-06-24

<150> 62/331489

<151> 2016-05-04

<150> 62/263307

<151> 2015-12-04

<150> 62/250566

<151> 2015-11-04

<150> 62/249546

<151> 2015-11-02

<150> 62/184018

<151> 2015-06-24

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 300

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys

1	5	10	15
---	---	----	----

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val

20	25	30
----	----	----

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln

35	40	45
----	----	----

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys

85	90	95
----	----	----

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile

115	120	125
-----	-----	-----

Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr

130	135	140
-----	-----	-----

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys

145 150 155 160

Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp

165 170 175

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val

180 185 190

Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu

195 200 205

Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser

210 215 220

Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala

225 230 235 240

Trp Val Ile His Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp

245 250 255

Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln

260 265 270

Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val

275 280 285

Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile

290 295 300

<210> 2

<211

> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Lys Arg Asn Ile Gln Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg

1 5 10

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala Trp Val Ile His Gly Gly

1	5	10	
<210>	4		
<211>	122		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	VH of anti-CD38 antibody		
<400>	4		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe			
20	25	30	
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys			
85	90	95	
Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120		

<210>	5		
<211>	107		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	VL of anti-CD38 antibody		

<400>	5	10	15
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1	5	10	15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr			

20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 6		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> HCDR1 of anti-CD38 antibody		
<400> 6		
Ser Phe Ala Met Ser		
1	5	
<210> 7		
<211> 17		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> HCDR2 of anti-CD38 antibody		
<400> 7		
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
1	5	10
Gly		
<210> 8		
<211> 13		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		

<220><223> HCDR3 of anti-CD38 antibody

<400> 8

Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR1 of anti-CD38 antibody

<400> 9

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR2 of anti-D38 antibody

<400> 10

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LCDR3 of anti-CD38 antibody

<400> 11

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe

1 5 10

<210> 12

<211> 452

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain of anti-CD38 antibody

<400> 12

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr

180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn

195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser

210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu

225 230 235 240

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

245 250 255

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

275 280 285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

355 360 365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

435 440 445

Ser Pro Gly Lys

450

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain of anti-CD38 antibody

<400> 13

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 14

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-CD38 antibody 003

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Val Ile Pro Phe Leu Gly Ile Ala Asn Ser Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Asp Ile Ala Ala Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

115 120

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-CD38 antibody 003

<400> 15

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35	40	45
----	----	----

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50	55	60
----	----	----

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg

85	90	95
----	----	----

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100	105	
-----	-----	--

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-CD38 antibody 024

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr

20	25	30
----	----	----

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35	40	45
----	----	----

Gly Ile Ile Tyr Pro His Asp Ser Asp Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

50	55	60
----	----	----

Gln Gly Gln Val Thr Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85	90	95
----	----	----

Ala Arg His Val Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115	120	
-----	-----	--

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-CD38 antibody 024

<400> 17

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-CD38 antibody MOR202

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Asp Pro Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

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

<210> 19

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-CD38 antibody MOR202

<400> 19

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

Gly Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu		
65	70	75
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Thr Gly Gly Ala Ser Leu		
85	90	95
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln		
100	105	

<210>

20

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-CD38 mAb isatuximab

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr

65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 21

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-CD38 mAb isatuximab

<400> 21

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-PD-1 mAb Keytruda

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Val Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Ser Asn Gly Gly Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Asn Arg Val Thr Leu Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Asp Tyr Arg Phe Asp Met Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 23

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-PD-1 mAb Keytruda

<400> 23

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Gly Val Ser Thr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr 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 Ser

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg

85 90 95

Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 24

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-PD-1 mAb Opdivo

<400> 24

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser

20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
100	105	110
Ser		

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> VL of anti-PD-1 mAb Opdivo
<400> 25

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		

35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	

<210> 26
<211> 121
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-PD-L1 mAb durvalumab

<400> 26

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-PD-L1 mAb durvalumab

<400> 27

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

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

	100	105	
<210> 28			
<211> 118			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> VH of anti-PD-L1 mAb atezolizumab			
<400> 28			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser			
20	25	30	
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	

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

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 29			
<211> 107			
<212> PRT			

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-PD-L1 mAb atezolizumab

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-PD-L1 mAb avelumab

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val

50 55 60

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

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

<210> 31

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-PD-L1 mAb avelumab

<400> 31

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

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

<210> 32

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-PD-1 mAb

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Asp Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Pro Gly Leu Ala Ala Tyr Asp Thr Gly Ser Leu Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-PD-1 mAb

<400> 33

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Asn Tyr Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 34

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-PD-1 mAb

<400> 34

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Ser Val

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Pro Tyr Leu Ser Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> VH of anti-PD-1 mAb

<400> 35

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Ser Asp Tyr

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Ser Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 36

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-TIM-3 mAb

<400> 36

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Ser Pro Tyr Ala Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL of anti-TIM-3 mAb

<400> 37

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Asp Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gly His Ala Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 38

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH of anti-TIM-3 mAb

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1	5	10	15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr			
20	25	30	
Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Arg Tyr Thr Gln Asn Phe			
50	55	60	
Lys Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Trp Glu Lys Ser Thr Thr Val Val Gln Arg Asn Tyr Phe Asp			
100	105	110	
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Val Thr Val Ser Ser			
115	120		
<210> 39			
<211> 106			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> VL of anti-TIM-3 mAb			
<400> 39			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Phe			
20	25	30	
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 40

<211> 509

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant hyaluronidase

<400> 40

Met Gly Val Leu Lys Phe Lys His Ile Phe Phe Arg Ser Phe Val Lys
 1 5 10 15

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

Cys Leu Thr Leu Asn Phe Arg Ala Pro Pro Val Ile Pro Asn Val Pro
 35 40 45

Phe Leu Trp Ala Trp Asn Ala Pro Ser Glu Phe Cys Leu Gly Lys Phe
 50 55 60

Asp Glu Pro Leu Asp Met Ser Leu Phe Ser Phe Ile Gly Ser Pro Arg
 65 70 75 80

Ile Asn Ala Thr Gly Gln Gly Val Thr Ile Phe Tyr Val Asp Arg Leu
 85 90 95

Gly Tyr Tyr Pro Tyr Ile Asp Ser Ile Thr Gly Val Thr Val Asn Gly
 100 105 110

Gly Ile Pro Gln Lys Ile Ser Leu Gln Asp His Leu Asp Lys Ala Lys
 115 120 125

Lys Asp Ile Thr Phe Tyr Met Pro Val Asn Leu Gly Met Ala Val
 130 135 140

Ile Asp Trp Glu Glu Trp Arg Pro Thr Trp Ala Arg Asn Trp Lys Pro
 145 150 155 160

Lys Asp Val Tyr Lys Asn Arg Ser Ile Glu Leu Val Gln Gln Gln Asn
 165 170 175

Val Gln Leu Ser Leu Thr Glu Ala Thr Glu Lys Ala Lys Gln Glu Phe
 180 185 190
 Glu Lys Ala Gly Lys Asp Phe Leu Val Glu Thr Ile Lys Leu Gly Lys
 195 200 205

Leu Leu Arg Pro Asn His Leu Trp Gly Tyr Tyr Leu Phe Pro Asp Cys
 210 215 220
 Tyr Asn His His Tyr Lys Lys Pro Gly Tyr Asn Gly Ser Cys Phe Asn
 225 230 235 240
 Val Glu Ile Lys Arg Asn Asp Asp Leu Ser Trp Leu Trp Asn Glu Ser
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Leu Asn Thr Gln Gln Ser Pro Val
 260 265 270

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

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

Asn Pro Asp Asn Phe Ala Ile Gln Leu Glu Lys Gly Gly Lys Phe Thr
 405 410 415
 Val Arg Gly Lys Pro Thr Leu Glu Asp Leu Glu Gln Phe Ser Glu Lys

420 425 430
Phe Tyr Cys Ser Cys Tyr Ser Thr Leu Ser Cys Lys Glu Lys Ala Asp
435 440 445
Val Lys Asp Thr Asp Ala Val Asp Val Cys Ile Ala Asp Gly Val Cys
450 455 460

Ile Asp Ala Phe Leu Lys Pro Pro Met Glu Thr Glu Glu Pro Gln Ile
465 470 475 480
Phe Tyr Asn Ala Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Thr Met Phe Ile Val
485 490 495
Ser Ile Leu Phe Leu Ile Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu
500 505