(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월26일
(11) 등록번호 10-2710877
(24) 등록일자 2024년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 9/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-7012268
(22) 출원일자(국제) 2018년10월05일
심사청구일자 2021년07월23일
(85) 번역문제출일자 2020년04월27일
(65) 공개번호 10-2020-0060471
(43) 공개일자 2020년05월29일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/077217
(87) 국제공개번호 WO 2019/068907
국제공개일자 2019년04월11일
(30) 우선권주장
62/568,812 2017년10월06일 미국(US)
62/686,143 2018년06월18일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2017089334 A1
KR102584011 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이나뜨 파르마 에스.에이.
프랑스 에프-13009 마르세유 아베뉘 드 루미니 117
(72) 발명자
샹뙤 스테빠니
프랑스 13009 마르세유 아브뉘 장 드 라뜨르 드 따시니 430 레지덩스 발몽 르동 바띠멍 레 로리에르
구르댕 니꼴라
프랑스 13008 마르세유 트라베르스 푸리에르 51 레지덩스 레 알리제 바띠멍 에이 아파트먼트 에이13
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

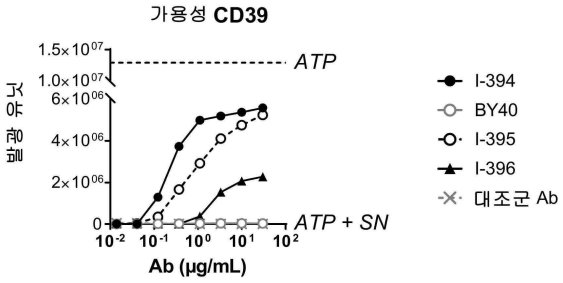
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 **CD39/CD73 축을 통한 T 세포 활성의 복원**

(57) 요 약

본 발명은 제한없이 CD73 발현 세포를 특징으로 하는 암의 치료를 포함하는, 암을 치료하기 위해 가용성 인간 CD39의 효소 활성을 억제하는 화합물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2b



(52) CPC특허분류
C12N 9/14 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
(72) 발명자
파뛰렐 까린
프랑스 69280 마르시 레뚜알 알레 뒤 부아 411
페로 이반
프랑스 13260 까시스 앵빠스 데 브라예 레지덩스 레 브라예 바띠멍 라 샤꼰
로시 벤자맹
프랑스 13008 마르세유 아브뉘 다이파 70 레지덩스 라 팔메레 바띠멍 씨

명 세 서

청구범위

청구항 1

가용성 세포외 도메인 인간 CD39 (NTPDase1) 단백질에 결합하여 이의 ATPase 활성을 억제할 수 있는 항체를 포함하는, 인간 CD73에 결합하여 이의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성을 중화시키는 항체와 조합하여 인간 개체에서의 암 치료에서 사용하기 위한 약학 조성물로서,

상기 가용성 세포외 도메인 인간 CD39 (NTPDase1) 단백질에 결합하여 이의 ATPase 활성을 억제할 수 있는 항체는 SEQ ID NO: 8로 나타내는 HCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 9로 나타내는 HCDR2 아미노산 서열; SEQ ID NO: 10으로 나타내는 HCDR3 아미노산 서열; SEQ ID NO: 11로 나타내는 LCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 12로 나타내는 LCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 13으로 나타내는 LCDR3 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 2

가용성 세포외 도메인 인간 CD39 (NTPDase1) 단백질에 결합하여 이의 ATPase 활성을 억제할 수 있는 항체를 포함하는, CD73-양성 암을 갖는 개체에서의 암 치료에서 사용하기 위한 약학 조성물로서,

상기 항체는 SEQ ID NO: 8로 나타내는 HCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 9로 나타내는 HCDR2 아미노산 서열; SEQ ID NO: 10으로 나타내는 HCDR3 아미노산 서열; SEQ ID NO: 11로 나타내는 LCDR1 아미노산 서열; SEQ ID NO: 12로 나타내는 LCDR2 아미노산 서열; 및 SEQ ID NO: 13으로 나타내는 LCDR3 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 치료는 개체에게 인간 CD73에 결합하여 이의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성을 중화시키는 항체를 투여하는 것을 더 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제3항에 있어서, 인간 CD39의 ATPase 활성을 중화시키는 항체는 인간 CD73의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성을 중화시키는 항체의 투여 이전에 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 인간 CD39의 ATPase 활성을 중화시키는 항체 및 CD73의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성을 중화시키는 항체는 개별 투여를 위해 제제화되고 동시발생적으로 또는 순차적으로 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 CD73-발현 세포의 높은 수준을 특징으로 하는 종양 조직 및/또는 종양 인접 조직을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 인간 CD73 폴리펩티드를 억제하는 작용제를 사용하는 이전 치료 이후에 진행되었거나 또는 재발된 암을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 고형 종양을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 난소암을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 위암을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 폐암을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 결장암을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 식도암을 갖는 것인 약학 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원의 교차-참조**

[0002] 본 출원은 2017년 10월 6일 출원된 미국 가출원 번호 US 62/568,812 및 2018년 6월 18일 출원된 미국 가출원 번호 US 62/686,143의 우선권을 주장하며; 이들 둘은 임의 도면을 포함하여 그들 전문을 참조로 본 명세서에 편입시킨다.

[0003] **서열 목록의 참조**

[0004] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록은 2018년 10월 5일 생성된, "CD39-7_ST25"의 파일 명칭으로서 제공되고, 그 크기는 73 KB이다. 전자 형식의 서열 목록 정보는 그 전문이 참조로 본 명세서에 편입된다.

[0005] **발명의 분야**

[0006] 본 발명은 암의 치료를 위한 CD39 중화제의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] CD39/ENTPD1 또는 혈관 CD39라고도 알려진 NTPDase 1 (엑토뉴클레오시드 트리포스페이트 디포스포히드롤라제1)은 다른 효소, CD73 (엑토-5'-뉴클레오티다제)과 함께 기능하여, 세포외 아데노신 트리포스페이트 (ATP) 및 아데노신 디포스페이트 (ADP)를 가수분해시켜 아데노신을 생성시키고, 이것은 아데노신 수용체에 결합하여 T-세포 및 자연 살해 (NK)-세포 반응을 억제시켜서, 면역계를 억제시킨다. CD73/CD39 경로를 통한 아데노신의 발생은 조절성 T 세포 (Treg) 면역억제 기능의 주요 기전으로서 인식된다. CD39는 N-말단부 및 C-말단부 근처에 2개의 경막 도메인, 짧은 세포질 N-말단 및 C-말단 절편, 및 활성 부위 함유의 대형 세포외 도메인을 가진다. 그러나, CD39는 전형적으로 분자의 2개 말단에서 2개의 경막 도메인을 통해서 막에 앵커링되는 한편, 최근에는 또한 가용성 촉매 활성 형태의 CD39가 인간 및 마우스의 순환계에 존재할 수 있다는 것이 보고된 바 있다 (Yegutkin et al., (2012) FASEB J. 26(9): 3875-3883).

[0008] CD73 (엑토-5'-뉴클레오티다제)은 조혈 세포의 서브세트 및 내피 세포 상에서 정상적으로 발현되는 70-kDa 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI)-앵커링된 단백질이다. CD73 발현은 특히, 백혈병, 방광암, 신경교종, 교아세포종, 난소암, 흑색종, 전립선암, 갑상선암, 식도암 및 유방암을 포함하는, 광범위한 종양 세포에서 보고되었다. CD73 발현은 또한 흑색종 및 유방암에서 전이촉진성 표현형과도 연관되었다.

[0009] CD73에 특이적으로 결합하는 항체는 CD73에 대한 더 큰 선택성을 갖는 소형 분자의 대안을 제공할 수 있다. 그러나, 시험된 항체는 일반적으로 단지 CD73CD73의 효소 활성의 부분 억제만을 보여주었다. 쥐과 CD73에 결합하는 항체를 사용한 요법이 마우스에서 유방 종양 성장 및 전이를 억제할 수 있다는 것이 확인되었다 (Stagg, et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:1547-1552). 그러나, 일반적으로 항체는 인간 및 마우스 CD73과 교차 반응하지 않아서, CD73의 생물학적 기능 및 항체의 연구를 복잡하게 만든다. A2A 수용체의 유전자 결실이 T 세포-의존적 종양 거부를 유도할 수 있다는 것이 확인되었다 (Ohta, et al., *(2006) Proc Natl Acad Sci USA* 103:13132-13137). 종양 세포 상에서 CD73의 과발현 또는 siRNA를 사용한 넉-다운은 종양 성장 및 전이를 조절할 수 있다 (Beavis et al (2013 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:14711-716; Stagg et al. (2010), 상동; Jin et al. (2010) Cancer Res. 70: 2245-55). CD73-/- 마우스는 자연발생 및 이식 종양으로부터 보호된다 (Stagg et al. (2010) Cancer Res. 71: 2892-2900). 인간에서, 높은 CD73 발현은 암에 대한 부정적인 예후일 수 있다 (Loi et al (2013 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110: 11091-11096). CD73CD73에 결합하는 항체가 보고되었는데, 예를 들어, 클론 AD2 (마우스 IgG1 이소타입)는수용체 클러스터링 및 내재화를 야기시켜서 CD73을 기능적으로 차단하지만 효소 활성에 대해서는 최소의 효과를 갖는다는 것이 보고되었다. [Sachsenmeier et al. ((2012) J. Biomed. Screening 17:993-998] 및 [Rust et al. (2013) Mol. Cancer 12:11]는 또한 세포내 내재화를 유도하는 항체를 보고하였다. 보다 최근에, 가용성 및 세포 표면 CD73 둘 모두를 차단하는 항체가 WO2016/055609 및 WO2016/131950에 개시되었고, 또한 (예를 들어, 종양 세포)에서 CD73의 세포내 내재화를 유도시켜 세포 표면 Cd73을 억제하는 항체가 WO2017/064043; WO2016/075099 및 WO2016/081748에 개시되었다.

[0010] CD39와 함께 CD73은 아데노신 트리포스페이트 (ATP) 물질대사를 조절한다. CD39 (NTPDase-1)는 ATP를 AMP

로 전환시키면서, 오직 미량의 ADP만을 방출시키는 한편, CD73은 AMP의 아데노신으로의 전환을 촉매한다. CD39 Treg의 개수는 일부 인간 암에서 증가되며, 종양 성장 및 전이의 촉진에서 CD39 Treg의 중요성은 몇몇 생체내 모델을 사용해 입증되었다. 그러나, CD39는 또한 종양 세포에 의해 발현되고 $CD39^+$ 종양 세포는 아데노신 경로를 통해 면역억제를 매개할 수 있다. 암 세포에서 CD39는 ATPase 활성을 보여주고, CD73과 함께 아데노신을 발생시킨다. $CD73^+CD39^+$ 암세포는 CD39-의존적 및 아데노신-의존적 방식으로 세포독성 이펙터 CD8 T 세포 (CTL)의 생성 및 CD4 및 CD8 T 세포의 증식을 억제하였다. CD39에 결합하고 억제하는 항체가 WO2009/095478에 개시되었다. [Hayes et al. (2015) Am. J. Transl. Res. 7(6):1181-1188]은 또한 차단한다고 명시된 항-CD39를 사용하지만 이 항체는 또한 FcγR에도 결합하고 이펙터 기능을 갖는다.

[0011] [Hausler et al. (2014) Am J Transl Res. 6(2):129-139]는 Fcγ 수용체에 결합하는 능력을 통해서 ADCC를 매개하는 CD39 및 CD73에 대한 항체들이 각각 표적 세포의 NK 세포 매개 용해를 유도시키고, 항체 각각은 또한 아데노신 생산의 부분 감소를 야기시킨다고 보고한다. 그러나, 항-CD39 및 CD73 항체를 아데노신 생산의 감소에 대해 함께 시험했을 때, 항체 조합의 가산 효과가 존재하지 않았다.

[0012] CD39를 실제로 차단하지 않거나 또는 순수한 차단제가 아닌 항체의 사용과 조합되어, 면역 세포 및 종양 세포를 포함한 상이한 세포 유형 상에서 CD39 발현은 항체의 근본 활성의 평가에 대해 복잡한 상황을 일으킨다. 항체와 같은 단백질 작용제를 사용한 효소 활성 부위 차단은 일반적으로 어렵다고 알려져 있다. 그러므로 CD39의 ATPase 활성을 항체가 억제할 수 있는지, 그렇다면 어떻게 억제할 수 있는지, 그리고 개선된 분자를 어떻게 디자인할지를 이해할 필요가 있다.

[0013] 따라서, CD39 및 CD73의 표적화에 대한 관심에도 불구하고, 아데노신 발생을 감소시키기 위한 가장 효과적인 방법이 결정되어야 한다.

발명의 내용

[0014] 본 발명은 특히 CD73 차단과 조합하여 사용시 면역억제를 실질적으로 감소시키지 않는 기지의 중화성 항-CD39 항체와 달리, 가용성 CD39 단백질을 중화시키는 항체가 CD73 차단과 조합하여 사용했을 때 면역억제의 극적인 감소를 제공한다는 발견으로부터 비롯된다.

[0015] 가용성 CD39의 ATPase 활성을 억제함으로써, 항-CD39 항체는 CD73에 대해 이용가능한 기질 풀을 감소시키고, 그 다음으로 이것은 아마도 CD73을 억제하는 작용제가 CD73 활성을 완전하게 억제하는 그들 능력을 제한하기 때문에, CD73의 효소 활성을 억제하는 작용제의 효능을 증강시킨다. 대조적으로, 막-결합된 CD39는 억제하지만 가용성 CD39는 억제하지 않는 항체는 CD73의 효소 활성을 억제하는 작용제의 효능을 증강시키지 않는다.

[0016] 뿐만 아니라, 증가적인 농도에서, 가용성 CD39를 중화시키는 항체는 CD39/CD73 축의 이화 활성의 실질적으로 완전한 억제를 제공한다. 가용성 CD39를 중화시키는 항체의 효과는, 예를 들어 어세이 시스템 (시험관내)에서 외생적으로 첨가된 ATP의 존재 하에서 관찰할 수 있는 바와 같이 또는 종양 예컨대 고형 종양 또는 일반적으로 CD39/CD73 축의 이화 활성이 높은 종양 (예를 들어, CD73 폴리펩티드 및/또는 CD73 폴리펩티드-발현 세포를 특징으로 하는 종양)에서 발생될 수 있는 바와 같이, 유의한 수준의 ATP의 존재 하에서 관찰된다. 그러므로 가용성 CD39를 중화시키는 항체는 CD73 폴리펩티드 및/또는 CD73 폴리펩티드-발현 세포를 특징으로 하는 세포에서, 또는 CD73 발현을 증가 (예를 들어, 화학요법제, 안트라사이클린)시키거나 또는 ATP의 발생을 야기 (예를 들어, 화학요법제)시키는 작용제와 병용하여, 유리하게 사용될 수 있다.

[0017] 추가적으로, 가용성 및 막-결합된 CD39의 ATPase 활성을 중화시킴으로써, 항체는 항-종양 면역력을 증강시키는, ATP의 이용가능한 풀의 보존을 허용한다 (ATP가 면역자극성임). 그러므로, 항-CD39 항체는 종양 세포로부터 ATP의 세포외 방출을 유도하는 치료제, 특히 면역원성 암 세포 사멸을 유도시키는 작용제 또는 치료 (예를 들어, 화학요법제, 방사선요법)와 병용하여 사용될 수 있다. 항-CD39 항체는 방출된 ATP가 CD73 기질 (및 궁극적으로 아데노신)의 풀을 증가시키는 것을 방지하게 될 뿐만 아니라, 이의 면역자극성 기능을 촉진하도록 방출된 ATP를 보존하게 될 것이다.

[0018] 따라서, 일 양상에서 본 발명은 CD73을 억제하는 작용제와 병용하여, 가용성 CD39에 결합하고 중화시키는 항체의 사용을 통해, 항-종양 면역 반응을 증강시키는 개선된 방법을 제공한다.

[0019] 다른 양상에서, 본 발명은 CD73 단백질의 존재를 특징으로 하는 암 (예를 들어, 가용성 CD73 및/또는 CD73 발현 세포가 존재하는 종양; CD73-양성 종양)의 치료를 위해 가용성 CD39에 결합하고 중화시키는 항체의 사용 (CD73을 억제하는 작용제를 사용하는 병용 치료 존재 또는 부재)을 통해, 항-종양 면역 반응을 증강시키는 개선된 방

법을 제공한다.

[0020] 이론으로 국한하고 싶지 않지만, 세포 표면에서 막-결합 CD39를 중화시키는 항체는 가용성 CD39 단백질 (sCD39)의 활성에는 유사하게 영향을 미치지 않으면서, 막-결합 CD39 (memCD39)의 도메인 움직임을 억제하여 기능한다고 여겨진다. memCD39는 동종-다량체 (예를 들어, 단량체 형태 이외에도, 사량체 및/또는 다른 다량체)로 존재하는 반면 sCD39는 단량체이고, 게다가 memCD39의 경막 도메인은 활성 부위와의 기능적 관계의 근간이 되는 동적 움직임을 겪는다는 것이 보고되었다 (Schulte am Esch et al. 1999 Biochem. 38(8):2248-58). memCD39 만을 차단하는 항체는 효소 활성 부위 밖에서 CD39를 인식할 수 있고 CD39의 단량체 형태를 차단하지 않고 다량체화를 방지한다. 다량체화의 차단은 효소 활성을 감소시킬 수 있으며, CD39 다량체화가 ATPase 활성을 실질적으로 증대시킨다는 것이 보고된 바 있다. 대조적으로, sCD39도 차단하는 항체는 CD39 기질을 방해할 수 있고 효소의 단량체 형태를 억제할 수 있다. 이러한 항체는 또한 memCD39가 다량체화를 방지할 수 있고, 따라서 CD39 효소 활성 억제의 제2 기전을 제공한다. (예를 들어, 종양 환경에서처럼) ATP의 존재하에서, sCD39의 차단없이 다량체화의 방지를 통한 CD39의 부분 억제는 잔존하는 AMP가 면역억제를 매개하도록 충분한 CD73-매개 아데노신 생산을 야기할 수 있기 때문에 CD73을 억제하는 작용제에 대한 임의의 검출가능한 가산적 효과를 방지하도록 충분한 잔여 AMP를 야기시킬 수도 있다.

[0021] 결론적으로, 가용성 CD39 (예를 들어, 단량체 sCD39)의 ATPase 활성에 결합하고 억제하는 항체는 막-결합 및 가용성 CD39 단백질 (용액 중 세포외 도메인 단백질) 둘 모두를 중화시켜 개체에서 CD39 활성의 더 큰 중화를 달성하여서, 예를 들어 암 및/또는 감염성 질환의 치료를 위한 면역억제를 감소시키기 위해 유리하게 사용될 수 있다.

[0022] 따라서, 일 양상에서, CD73-양성 암을 갖는 개체에게 sCD39의 억제 활성을 중화시키는 항체를 투여하는 단계를 포함하는 치료를 제공한다. 일 실시형태에서, CD73-양성 암을 갖는 개체에서 암 또는 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하는 방법을 제공하고, 그 방법은 단량체 인간 CD39 단백질 (예를 들어, 가용성 CD39 및/또는 단량체 memCD39)의 ATPase 활성에 특이적으로 결합하고 억제하는 작용제를 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

일 실시형태에서, CD73-양성 암은 일반적으로 종양 또는 종양 환경에서 가용성 CD73 단백질 및/또는 CD73-발현 세포의 존재를 특징으로 하는 것을 알려진 암이다. 일 실시형태에서, CD73-양성 암은 CD73-발현 세포를 포함하는 것으로 결정된 종양을 특징으로 한다. 일 실시형태에서, CD73-양성 암은 CD73을 발현하는 악성 세포를 포함하는 종양 조직을 특징으로 한다. 일 실시형태에서, CD73-양성 암은 CD73-발현 면역 세포 (예를 들어, 비악성 면역 세포)의 침윤을 특징으로 하는 종양 조직 또는 종양-인접 조직을 특징으로 한다. 일 실시형태에서, CD73-양성 암은 백혈병, 신경교종 또는 교아세포종, 또는 방광암, 유방암, 결장암, 식도암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 자궁암, 전립선암, 췌장암, 위암, 자궁경부암, 갑상선암, 두경부암 (두경부 편평 세포 암종), 및 피부암 (예를 들어, 흑색종)이다. 일 실시형태에서, 치료는 CD73 단백질의 억제 활성을 중화시키는 작용제를 개체에게 투여하는 단계를 더 포함한다. 임의로는, CD73-양성 암을 갖는 개체는 종양 세포로부터 ATP의 세포외 방출을 유도하는 작용제, 특히 면역원성 암 세포 사멸을 유도하는 작용제 또는 치료 (예를 들어, 화학요법제, 방사선요법)를 사용하여 추가적으로 치료된다. 임의로는, CD73-양성 암을 갖는 개체는 CD73 발현을 유도시키거나 또는 증가시키는 작용제로 추가로 치료된다.

[0023] 다른 양상에서, 본 명세서는 암을 갖는 개체의 치료에서 사용을 위한, (예를 들어, 본 명세서에 기술된 추가 특징을 갖는) 항-CD39 항체의 용도를 제공하고, 여기서 치료는 CD73의 활성을 억제하기 위한 수단과 병용하여 항-CD39 항체를 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 암을 갖는 개체를 치료하는데 사용을 위한, (예를 들어, 본 명세서에 기술된 추가 특징을 갖는) 항-CD39 항체를 제공하고, 여기서 치료는 (a) CD73의 활성 억제를 위한 수단 (예를 들어, 작용제 또는 치료, 단백질제, 항체 작용제, 핵산제, 또는 소형 분자 작용제) 및 (b) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물과 병용하여 항-Cd39 항체를 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0024] 다른 양상에서, 본 명세서는 CD73의 활성을 억제하는 작용제와 병용하여, CD39에 결합하고 가용성 (세포외 도메인) 인간 CD39 단백질의 효소 활성 (ATPase 활성)을 억제하는 항체의 용도를 제공한다. 가용성 CD39에 결합하는 항체는 추가적으로 세포 막결합 CD39 효소 (세포 표면에서 발현되는 CD39)의 효소 활성 (ATPase 활성)을 강력하게 억제한다. CD73의 활성을 억제하는 작용제와 병용되는 단량체 (예를 들어, 가용성 및 막결합 CD39) 및 다량체 CD39 (예를 들어, 막결합 CD39) 둘 모두의 중화는 CD73-양성 암을 치료하기 위해 특히 유리할 수 있다. 일 실시형태에서, CD73-양성 암은 일반적으로 종양 또는 종양 환경에서 가용성 CD73 단백질 및/또는 CD73-발현 세포의 존재를 특징으로 하는 것으로 알려진 암이다. 일 실시형태에서, CD73-양성 암은 CD73-발현 세포를 포함하는 것으로 결정된 종양을 특징으로 한다. 일 실시형태에서, CD73-양성 암은 CD73을 발현

하는 악성 세포를 포함하는 종양 조직을 특징으로 한다. 일 실시형태에서, CD73-양성 암은 CD73-발현 면역 세포 (예를 들어, 비악성 면역 세포)의 침윤을 특징으로 하는 종양 조직 또는 종양-인접 조직을 특징으로 한다.

일 실시형태에서, CD73-양성 암은 백혈병, 신경교종 또는 교아세포종, 또는 방광암, 유방암, 결장암, 식도암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 자궁암, 전립선암, 췌장암, 위암, 자궁경부암, 갑상선암, 두경부암 (두경부 편평 세포 암종), 및 피부암 (예를 들어, 흑색종)이다.

[0025] 단량체 (예를 들어, 가용성 및 막결합 CD39) 및 다량체 CD39 (예를 들어, 막결합 CD39) 둘 모두의 중화는 이러한 CD73 억제제가 최적 이하로 활성인 치료 상황에서, 예를 들어 CD73 억제를 종양 조직 (예를 들어, CD73-양성 종양) 내에서 시도하려는 경우, 종양 조직의 CD73을 포화시키고/시키거나 충분한 기간 (예를 들어, 1주, 2주, 3주, 4주, 6주 또는 8주 또는 그 이상) 동안 종양 조직에서 CD73 억제를 위한 EC_{50}, EC_{70} 또는 EC_{100} 를 제공하는 용량 또는 용법 (예를 들어, CD73-양성 종양에서; 1, 5 또는 10 μg/mL 미만 (또는 이하)의 종양 농도를 제공하는 용량)으로 CD73 억제제를 투여할 수 없는 경우; CD73 억제제가 CD73 활성을 완전하게 억제하지 않는 경우 (예를 들어, 가용성 CD73을 억제하지 않는 항-CD73 항체; 효소 활성의 억제를 매개하기 위해 CD73 하향-조절/세포내 내재화의 유도에 의존하는 항-CD73 항체); 또는 보다 일반적으로 종양 또는 종양-인접 조직의 세포에 의한 CD73CD73의 유의한 발현 수준을 특징으로 하는 암 (예를 들어, 신경교종 또는 교아세포종, 또는 방광암, 유방암, 결장암, 식도암, 신장암, 간암, 폐암, 난소암, 자궁암, 전립선암, 췌장암, 위암, 자궁경부암, 갑상선암, 두경부암 (두경부 편평 세포 암종), 및 피부암 (예를 들어, 흑색종))의 치료에서, CD73 억제제의 활성을 증강시키기 위해 특히 유리할 수 있다.

[0026] 일 실시형태에서, 개체에서 암 또는 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하기 위한 방법을 제공하고, 그 방법은 개체에게 (a) 가용성 CD39 단백질 (sCD39)의 ATPase 활성에 결합하고 억제하는 작용제, 및 (b) 인간 CD73 폴리펩티드의 활성을 억제하는 작용제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0027] 일 실시형태에서, 개체에서 암 또는 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하기 위한 방법을 제공하고, 그 방법은 개체에게 (a) 단량체 인간 CD39 단백질 (예를 들어, 가용성 CD39 및/또는 단량체 memCD39)의 ATPase 활성에 결합하고 억제하는 작용제, 및 (b) 인간 CD73 폴리펩티드의 활성을 억제하는 작용제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0028] 본 명세서의 임의의 실시형태의 일 양상에서, CD39 단백질의 ATPase 활성을 억제하거나 또는 중화시키는 화합물은 CD39 단백질에 결합하는 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 단일특이적 항체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체)이거나 또는 그를 포함한다.

[0029] 일 양상에서, 개체에게 sCD39의 억제 활성을 중화시키는 항체, 및 CD73의 억제 활성을 중화시키는 작용제의 조합물을 투여하는 단계를 포함하는 치료를 제공한다. 일 양상에서, sCD39의 억제 활성을 중화시키는 항체를 CD73의 억제 활성을 중화시키는 작용제를 사용한 치료에 대해 내성이거나 또는 나쁜 예후를 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 치료를 제공한다. 일 실시형태에서, 개체는 CD73-양성 암을 갖는다.

[0030] 일 양상에서, CD73의 억제 활성을 중화시키는 작용제를 사용한 치료에 대해 개체를 감작시키기 위한 방법을 제공하고, 그 방법은 sCD39의 억제 활성을 중화시키는 항체를 투여하는 단계를 포함한다.

[0031] 일 양상에서, 인간 sCD39 폴리펩티드를 억제하는 항체, 및 인간 CD73 폴리펩티드를 억제하는 작용제, 임의로는 항체를 포함하는 조성물을 제공한다. 일 양상에서, 조성물은 암, 임의로는 고형 종양, 임의로는 혈액학적 악성종양, 임의로는 CD73을 발현하는 악성 세포를 특징으로 하는 혈액학적 악성종양, 임의로는 백혈병, 임의로는 악성 세포를 특징으로 하는 암, 임의로는 CD73 폴리펩티드를 발현하는 종양 또는 종양 인접 조직 내 악성 및/또는 비악성 세포를 특징으로 하는 암의 치료 또는 예방에서 사용을 위한 것이다.

[0032] 항체는 AMP (및 상류 ATP 및 ADP)의 아데노신으로의 이화작용의 억제, 예를 들어 각 단계에서 이용가능한 아데노신 전구체 풀의 감소, 및 궁극적으로 종양 미세환경에서 아데노신 농도의 감소에 유용하게 될 것이다. 그러므로 이들 항체는 예를 들어 암의 치료에서, T 세포, B 세포 및 아데노신 수용체를 발현하는 다른 세포에 대한 면역억제 효과를 반전시키는데 유용하게 될 것이다. 일 실시형태에서, 항체는 T 세포에서 증식, 사이토카인 생산, 세포독성 및/또는 NFκB 활성의 아데노신-매개 억제를 중화시킨다. 일 실시형태에서, 개시 방법은 개체에서, 항-종양 면역성의 증가 또는 증강, 면역억제의 감소, 면역 이펙터 세포, 임의로는 CD8+ 종양-침윤성 T 세포 또는 NK 세포의 활성의 활성화 및/또는 강화, 및/또는 종양 환경에서 아데노신의 양 및/또는 농도의 감소에 유용하다.

[0033] 일 실시형태에서, 개체에서, 면역 이펙터 세포, 임의로는 CD8+ 종양-침윤성 T 세포 또는 NK 세포의 활성을 활성화 또는 강화시키는 방법, 및/또는 종양 환경에서 아데노신의 양 및/또는 농도를 감소시키는 방법을 제공하고,

그 방법은 개체에게, (a) 인간 sCD39 폴리펩티드의 효소 활성 (ATPase 활성)에 결합하고 억제하는 화합물의 치료적 활성량, 및 (b) 인간 CD73 폴리펩티드의 효소 활성을 억제하는 화합물의 치료적 활성량을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 개체에서 종양-침윤성 T 또는 NK 세포의 활성을 활성화, 강화, 및/또는 증식을 증가시키는 방법을 제공하고, 그 방법은 개체에게 (a) 인간 sCD39 폴리펩티드의 효소 활성 (ATPase 활성)에 결합하고 억제하는 화합물의 치료적 활성량, 및 (b) 인간 CD73 폴리펩티드를 억제하는 화합물의 치료적 활성량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0034] 본 명세서의 임의의 실시형태의 일 양상에서, 인간 CD73 폴리펩티드를 억제하는 화합물은 CD73의 효소 활성을 억제하는 항-CD73 항체이다. 다른 실시형태에서, 항-CD73 항체는 세포-표면 발현 CD73의 세포내 내재화, 또는 보다 일반적으로 하향-조절의 증가 및/또는 유도를 야기시켜 CD73의 5-엑토뉴클레오티다제 활성을 억제하고/하거나, CD73을 중화시키는 이의 능력에 적어도 부분적으로 의존한다. 일 실시형태에서, CD73의 효소 활성을 억제하는 항-CD73 항체는 임의로는 항체가 더 높은 (예를 들어, 10배) 과량의 항체: 효소로 제공될 때, 가용성 CD73의 효소 활성을 실질적으로 중화시킬 수 없거나 또는 억제시킬 수 없는 항체이다. 일 실시형태에서, CD73의 효소 활성을 억제하는 항-CD73 항체는 임의로는 항체가 더 높은 (예를 들어, 10배) 과량의 항체:효소에서 가용성 CD73의 효소 활성을 중화시킬 수 있을 때, 가용성 CD73의 효소 활성을 중화시킬 수 있는 항체이다.

일 실시형태에서, 인간 CD73 폴리펩티드를 억제하는 화합물은 유기 분자, 임의로는 소형 유기 화합물, 임의로는 3000 g/mol 이하, 임의로는 2000 g/mol 이하, 임의로는 1000 g/mol 이하의 분자량을 갖는 유기 화합물, 임의로는 100 g/mol 내지 300 g/mol, 100 g/mol 내지 1000 g/mol, 임의로는 적어도 300 g/mol, 400 g/mol, 500 g/mol, 600 g/mol, 700 g/mol, 800 g/mol, 900 g/mol, 1000 g/mol 또는 2000 g/mol의 분자량을 갖는 유기 화합물이다.

[0035] 일 실시형태에서, 개체에서 암을 치료하거나 또는 예방하기 위한 방법을 제공하고, 그 방법은 개체에게 (i) 가용성 CD39 단백질 (sCD39)의 ATPase 활성에 결합 및 억제, 및 (ii) (예를 들어, 이러한 CD73 폴리펩티드 발현 세포에서) 인간 CD73 폴리펩티드의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성에 결합 및 억제할 수 있는 작용제의 치료적 활성량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0036] 본 명세서의 임의 실시형태의 일 양상에서, sCD39 단백질은 막결합 CD39에 존재하는 2개 경막 도메인 (즉, N-말단부 및 C-말단부 근처 경막 도메인)의 결여를 특징으로 할 수 있다. 일 실시형태에서, sCD39는 예를 들어 인간 개체에서, 순환계에 존재하는 비-막결합 sCD39 단백질이다. 일 실시형태에서, sCD39는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열 (임의로는 C-말단 태그 또는 다른 비-CD39-유래 아미노산 서열을 더 포함), 예를 들어 본 명세서의 실시예에서 제조되는 바와 같은 sCD39 단백질을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 일 실시형태에서, 단백질, 항체 또는 항체 단편은 예를 들어, 본 명세서에 개시된 방법에 따라서, 용액 중에서 sCD39와 인큐베이션될 때 sCD39의 ATPase 활성을 억제 또는 중화시킨다. 일 실시형태에서, 단백질, 항체 또는 항체 단편은 가용성 (세포외 도메인 단백질) 및 막-결합 형태 둘 모두의 인간 CD39 단백질에 특이적으로 결합한다.

[0037] 본 명세서의 임의의 실시형태의 일 양상에서, 암은 고형 종양이다. 일 실시형태에서, 암은 혈액학적 악성종이다. 본 명세서의 임의의 실시형태의 일 양상에서, 암은 검출가능한 CD73 단백질을 발현하는 종양 또는 종양-인접 조직 내 세포 (예를 들어, 종양 환경 내 악성 세포 및/또는 비-악성 세포)를 특징으로 한다.

[0038] 본 명세서의 임의의 실시형태의 일 양상에서, 개체는 인간이라고 특정할 수 있다.

[0039] 일 실시형태에서, 항-CD39 항체는 암을 갖는 개체에게 주변부 및/또는 종양 미세환경에서 CD39 (sCD39 및/또는 memCD39)의 활성을 중화시키기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 일 실시형태에서, 항체는 종양 미세환경에서 AMP 및/또는 아데노신의 발생 및/또는 농도를 감소시키기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 일 실시형태에서, 항체는 종양 세포에 의해 발현된 CD39의 활성을 중화시키기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 일 실시형태에서, 항체는 백혈구 또는 림프구, 예를 들어 CD4 T 세포, CD8 T 세포, TReg 세포 및/또는 B 세포에 의해 발현된 CD39의 활성을 중화시키기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다.

[0040] 일 실시형태에서, CD73의 활성을 억제하는 작용제는 암을 갖는 개체에게 주변부 및/또는 종양 미세환경에서 CD73 (가용성 CD73 단백질 및/또는 막결합 CD73)의 활성을 중화시키기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 일 실시형태에서, 항체는 종양 미세환경에서 종양 세포 또는 비종양 세포에 의해 발현된 CD73의 활성을 중화시키기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 일 실시형태에서, 항체는 CD4 T 세포, CD8 T 세포 및/또는 B 세포에 의해 발현된 CD73의 활성을 중화시키기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다.

[0041] 일 실시형태에서, 항-CD39 항체 및 CD73의 활성을 억제하는 작용제는 종양 미세환경에서 아데노신의 발생 및/또

는 농도를 감소시키기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 일 실시형태에서, 항체는 종양 미세환경에서 ATP의 발생 및/또는 농도를 증가시키기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다.

[0042] 일 실시형태에서, 항-CD39 항체 및 CD73의 활성을 억제하는 작용제는 각각이 적어도 1회의 투여 주기 동안 투여되고, 투여 주기는 적어도 1회 및 2회 (및 임의로는 3회, 4회, 5회, 6회, 7회 및/또는 8회 또는 그 이상)의 항-CD39 항체 및 CD73CD73의 활성을 억제하는 작용제의 투여를 포함한다.

[0043] 일 실시형태에서 암은 후기 및/또는 난치성 고형 종양이다. 일 실시형태에서 암은 후기 및/또는 난치성 고형 종양이다. 비제한적인 일 실시형태에서, 암 (예를 들어, 후기 난치성 고형 종양)은 비소세포 폐암 (NSCLC), 신장암, 췌장 또는 식도 선암종, 유방암, 신장 세포 암종 (RCC), 흑색종, 직결장암,및 난소암 (및 임의로는 본 명세서에 기술된 추가의 암 유형)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0044] 일정한 선택 양상에서 항-CD39 작용제는 면역억제, 임의로는 종양 내 면역 침윤의 결여 또는 불충분한 면역 침윤, 임의로는 항-종양 면역성의 결여 또는 불충분한 항-종양 면역성을 특징으로 하는 암 또는 종양을 갖는 개체에서 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0045] 일정한 선택 양상에서 항-CD39 작용제는 나쁜 질환 예후, 특히 CD73을 중화시키는 작용제를 사용한 치료에 대한 반응에 대해 나쁜 예후를 갖는 개체에서 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 나쁜 질환 예후를 갖는 개체는 예를 들어 하나 이상의 예측 인자를 기반으로, 진행 위험성이 더 높다. 일 실시형태에서, 예후 인자(들)는 하나 이상의 유전자에 돌연변이의 존재 또는 부재를 포함한다. 일 실시형태에서, 예후 인자(들)는 하나 이상의 유전자 또는 단백질, 또는 예를 들어 면역 이펙터 세포 상의 억제성 또는 활성화 수용체의 발현 수준(들)을 포함한다. 일 실시형태에서, 예후 인자(들)는 CD73 및/또는 CD39를 발현하는 종양 환경 또는 순환계 내 세포의 존재 (예를 들어, 개수), 및/또는 종양 환경 또는 순환계 내 세포 상의 CD73 및/또는 CD39의 발현 수준을 포함하고, 일 실시형태에서, 세포는 종양 세포이고, 일 실시형태에서 세포는 백혈구, 예를 들어, B 세포, 조절성 T 세포 (Treg)이다. CD73 및/또는 CD39의 상승된 발현의 존재, 및/또는 CD73- 및/또는 CD39 발현 세포의 상승된 개수는 개체가 CD73을 중화시키는 항체를 사용한 치료에 대한 반응에 대해 나쁜 예후를 갖는다는 것을 의미한다.

[0046] 일정한 선택 양상에서 항-CD39 작용제는 비반응자이거나, 또는 CD73을 중화시키는 작용제를 사용한 치료에 대해 부분 또는 불완전 반응을 경험하였거나, 또는 그의 질환이 CD73을 중화시키는 항체를 사용한 치료 이후에 재발되었거나 또는 진행되었던 개체에서 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0047] 일 실시형태에서, 항-CD39 작용제는 CD39 상의 에피토프 또는 결정부와의 결합에서, 각각 SEQ ID NO: 52 및 53의 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체와 경쟁한다. 작용제는 예를 들어 인간 또는 인간화 항-CD39 항체일 수 있다.
일 실시형태에서, 항-CD39 항체는 각각 SEQ ID NO: 52의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%가 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 53의 경쇄 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%가 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0048] 일정한 선택 양상에서, 환자는 환자가 CD73-중화제에 대해 나쁜 반응자인 (반응에 대해 나쁜 예후를 갖는) 환자인지 여부를 평가함으로써 CD39-중화제 및 CD73-중화제 (예를 들어, 본 명세서에 개시된 임의의 작용제)를 사용한 치료에 대해 확인될 수 있다. 나쁜 반응자는 CD39-중화제 및 CD73-중화제의 병용물을 사용해 치료될 수 있다.

[0049] 일정한 선택 양상에서, 환자는 CD73 폴리펩티드 발현 및/또는 CD73-발현 세포 개수의 상승된 수준의 순환계 및/또는 종양 샘플 (예를 들어, 종양 조직 및/또는 종양 인접 조직)에서의 존재를 평가함으로써 CD39-중화제 (및 임의로는 추가의 CD73-중화제)를 사용한 치료에 대해 확인될 수 있다.

[0050] 일정한 선택 양상에서, 환자는 CD39 폴리펩티드 발현 및/또는 CD39-발현 세포 개수의 상승된 수준의 순환계 및/또는 종양 샘플 (예를 들어, 종양 조직 및/또는 종양 인접 조직)에서의 존재를 평가함으로써 CD39-중화제 및 CD73-중화제를 사용한 치료에 대해 확인될 수 있다.

[0051] 다른 실시형태에서, 약학 조성물 및 키트를 비롯하여, 그들을 사용하는 방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 인간 CD39 폴리펩티드의 ATPase 활성을 중화시키는 화합물 및 CD73 폴리펩티드의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성을 중화시키는 작용제를 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 일 실시형태에서, 인간 CD39 폴리펩티드의 억제 활성을 중화시키는 화합물 및 CD73 폴리펩티드의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성을 중화시키는 작용제를 포함하는 키트가 제공된다.

[0052] 이들 양상은 보다 상세히 설명하며, 추가의 양상, 특성 및 장점은 본 명세서에서 제공되는 설명을 통해 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0053] 도 1은 양성 대조군 I-394 항체와 비교된 항체 I-397, I-398 및 I-399를 보여주는 대표적인 스크리닝 결과를 도시한다.

도 2A는 항체 BY40, I-394, I-395 및 I-396이 세포-막 결합된 CD39를 억제하고, I-394 및 I-395 둘 모두는 BY40과 비교하여 모든 농도에서 더 큰 역가를 보일뿐만 아니라 세포 CD39의 더 큰 최대 억제성을 보인다는 것을 도시한다. 도 2B는 항체 I-395 및 I-396 둘 모두는 음성 대조군 (BY40) 및 양성 대조군 (I-394) 항체와 비교하여 가용성 CD39를 억제한다는 것을 도시한다.

도 3A는 CD39 단백질의 표면 상에서 돌연변이체 5 (M5), 15 (M15) 및 19 (M19)의 돌연변이된 잔기의 위치를 도시한다. 도 3B는 상이한 항체에 대한 돌연변이체 5, 15 및 19의 결합 결과를 도시한다.

도 4는 유세포측정법으로 평가된, 인간 CD39를 발현하는 세포에 대한 항체 I-394의 결합을 도시한다. I-394는 인간 CD39 를 발현하는 세포(CHO-huCD39), 사이노몰거스 CD39 를 발현하는 세포(CHO-cyCD39) 및 Ramos 림프종 세포에 결합하지만, 쥐과 CD39 를 발현하는 세포(CHO-moCD39)에는 결합하지 않는다.

도 5는 존재하는 ATP의 양에 비례하는 발광 유닛을 정량하여 평가시에, 항체 I-394가 종양 (Ramos) 세포, 인간 CD39 를 발현하는 세포(CHO-huCD39), 및 사이노몰거스 CD39 를 발현하는 세포(CHO-cyCD39)에서 CD39 효소 활성을 차단하는데 매우 강력하다는 것을 도시한다.

도 6은 존재하는 ATP의 양에 비례하는 발광 유닛을 정량하여 평가시에 항체 I-394가 가용성 재조합 인간 CD39 단백질의 효소 활성을 차단하는데 매우 강력하다는 것을 도시한다.

도 7은 ELISA 어세이로 평가시에 항체 I-394가 인간 CD39에는 결합하지만 임의의 인간 이소폼 CD39-L1, CD39-L2, CD39-L3 또는 CD39-L4에는 결합하지 않는다는 것을 도시한다.

도 8은 CD4 T 세포 활성화에 대한 ATP-매개된 DC 활성화의 효과를 평가하기 위한 실험 절차를 도시한 것으로서, ATP-활성화된 DC를 세척하였고 그 다음으로 5일 동안 혼합 림프구 반응 (MLR)을 위해 동종이계 CD4 T 세포 (1 MoDC / 4 T 세포의 비율)와 인큐베이션시켰다. T 세포 활성화 및 증식은 유세포측정에 의해 CD25 발현 및 Cell Trace Violet 희석을 통해 분석하였다.

도 9는 moDC 상에서 HLA-DR 발현을 도시하고 도 10은 moDC 상에서 CD83 발현을 도시한다. 이들 도면은 항-CD39 차단 항체 I-394 및 CD39의 화학적 억제제가 각각 0.125 mM, 0.25 mM 또는 0.5 mM에서 moDC 활성화를 야기시킨다는 것을 도시한다. 그러나, 항-CD39 항체 BY40 또는 항-CD73 항체는 수지상 세포 (DC)의 ATP-유도된 활성화를 촉진할 수 없어서, 항체가 ATP 이화작용을 충분히 피하도록 효소 활성을 차단할 수 없다는 것을 시사한다. 범례는 위에서 아래로 그래프의 좌측에서 우측의 막대에 상응한다.

도 11은 CD25 발현은 MLR 어세이에서 ATP의 존재 하에서 활성화된 MoDC가 T 세포 활성화 및 증식을 유도할 수 있었고, 항-CD39 차단 항체 I-394에 의한 ATP-매개된 MoDC 활성화의 증강은 그 결과로 더 높은 T 세포 증식 및 활성화를 야기시켰다는 것을 확인한 것을 도시한다. 위에서 아래로 범례는 좌측에서 우측으로 그래프의 막대에 상응한다.

도 12A는 0.01 μg/mL, 0.1 μg/mL 및 1 μg/mL로 항-sCD39 항체의 3가지 상이한 용량에서, 첨가된 ATP의 존재 하에, CD4 T 세포 증식에 대한 항-CD73 항체의 용량 범위를 도시한다. 가용성 인간 CD39를 중화시킬 수 있는 항-CD39 항체는 CD4 T 세포 증식의 복원에서 항-CD73 항체의 강력한 강화작용을 보여준다. 도 12B는 첨가된 ATP의 존재 하에서 CD8 T 세포 증식에 대한 항-CD73 항체의 용량 범위를 도시하며, 항-sCD39 항체는 CD8 T 세포 증식의 복원에서 항-CD73 항체의 강력한 강화작용을 보여준다.

도 13A, 13B 및 13C는 질환 병기 및 시기를 고려하여, 생존과 인간 암 샘플 중 CD39 및 CD73 유전자 발현을 상관짓는 연구를 도시한다. 도 13A는 난소암에서의 결과를 도시하며, 특히 암 샘플 중 낮은 CD39 발현은 난소암에서 더 높은 생존 확률과 상관있으며, 또한 난소암에서 보다 낮은 생존 확률과 CD73의 높은 발현의 상관성을 도시한다. 도 13B는 식도암에서의 결과를 도시하고, 특히 암 샘플에서 낮은 CD39 발현은 식도암에서 더 높은 생존 확률과 상관있으며, 또한 식도암에서 보다 낮은 생존 확률과 고발현 CD73의 상관성을 도시한다. 도 13C는 위 선암종에서의 결과를 도시하고, 특히 암 샘플에서 낮은 CD39 발현은 위암에서 더 높은 생존 확률과 상

관성이 있고, 또한 위암에서 보다 낮은 생존 확률과 고발현 CD73의 상관성이 도시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 정의

[0055] 본 명세서에서 사용되는 "한" 또는 "하나"는 하나 이상을 의미할 수 있다. 청구항(들)에서 사용시, "포함하는"이라는 단어와 함께 사용될 때, 단어 "한" 또는 "하나"는 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "다른"은 적어도 제2 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0056] "포함하는"이 사용될 때, 이것은 임의로는 "본질적으로 이루어지는" 또는 "이루어지는"으로 대체될 수 있다.

[0057] *NT5E* 유전자에 의해 코딩되는, 엑토-5'-뉴클레오티다제 및 5-프라임-리보뉴클레오티드 포스포히드롤라제, EC 3.1.3.5로도 공지된 인간 CD73은 5'-뉴클레오티다제, 특히 AMP-뉴클레오시다제, NAD-뉴클레오시다제, 및 NMN-뉴클레오시다제 활성을 나타낸다. CD73은 중성 pH에서 푸린 5-프라임 모노뉴클레오티드의 뉴클레오시드로의 전환을 촉매하고, 바람직한 기질은 AMP이다. 이 효소는 원형질막의 외부면과의 글리코실 포스파티딜 이노시톨 연결을 통해 결합된 2개의 동일한 70-kDa 서브유닛의 이량체로 이루어진다. 아미노산 1-26에 신호 서열을 포함하여, 인간 CD73 프리단백질 (단량체)의 아미노산 서열은 수탁 번호 NP_002517 하에 유전자은행에서 확인되며, 이의 전체 개시 내용은 참조로 본 명세서에 편입되고, 다음과 같다:

```
MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSEDSSK CVNASRCMGG
VARLFTKVQQ IRRAEPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEF
DNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPVGDEV VGIVGYTSKE
TPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLKTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVV
GGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV
ISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNM
GNLICDAMIN NNLRHTDEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPFGGT
FDLVQLKGST LKKAFEHSVH RYGQSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLCTKCR
VPSYDPLKMD EVYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP
AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ
```

(SEQ ID NO: 1).

[0058]

[0059] 본 명세서의 문맥에서, CD73 폴리펩티드를 언급할 때 "억제하다", "억제하는", "중화시키다" 또는 "중화시키는" (예를 들어, "CD73을 중화시키다", CD73의 활성을 중화시키다" 또는 "CD73의 효소 활성을 중화시키다" 등)은 CD73의 5'-뉴클레오티다제 (5'-엑토뉴클레오티다제) 활성이 억제되는 과정을 의미한다. 이것은 특히 아데노신의 CD73-매개 발생의 억제, 즉 AMP의 아데노신으로의 CD73-매개 이화작용의 억제를 포함한다. 이것은 예를 들어 직접적으로 또는 간접적으로, AMP의 아데노신으로의 전환을 억제하는 시험 화합물의 능력을 측정하는 세포-무함유 어세이에서 측정할 수 있다. 일 실시형태에서, 항체 조제물은 예를 들어 본 명세서에 기술된 어세이를 참조하여, AMP의 아데노신으로의 전환에서 적어도 50% 감소, AMP의 아데노신으로의 전환에서 적어도 70% 감소, 또는 AMP의 아데노신으로의 전환에서 적어도 80% 감소를 야기시킨다.

[0060] NTPdase1, ENTPD1, ATPDase 및 혈관 ATP 디포스포히드롤라제라고도 공지된 인간 CD39는 ATPase 활성을 나타낸다. CD39는 세포외 ATP 및 ADP를 AMP로 가수분해시키는 막결합 단백질로서, AMP는 다른 효소, 5-프라임 뉴클레오티다제에 의해 아데노신으로 더욱 전환된다. 인간 CD39 성숙한 폴리펩티드 사슬의 아미노산 서열은 수탁 번호 P49961 하에 유전자은행에서 확인되며, 그 전체 개시 내용은 참조로 본 명세서에 편입되고, 다음과 같다:

```
MEDTKESNVK TFCSKNILAI LGFSSIIAVI ALLAVGLTQN KALPENVKYG IVLDAGSSHT
SLYIYKWPAE KENDTGVVHQ VEECRVKGPG ISKFVQKVNE IGIYLTDCME RAREVIPRSQ
HQETPVYLGA TAGMRLLRME SEELADRVLD VVERSLSNYP FDFQGARIIT GQEEGAYGWI
TINYLLGKFS QKTRWFSIVP YETNNQETFG ALDLGGASTQ VTFVPQNQTI ESPDNALQFR
LYGKDYNVYT HSFLCYGKDQ ALWQKLAKDI QVASNEILRD PCFHPGYKKV VNVSDLYKTP
CTKRFEMTLP FQQFEIQGIG NYQQCHQSIL ELFNTSYCPY SQCAFNGIFL PPLQGDFGAF
SAFYFVMKFL NLTSEKVSQE KVTEMMKKFC AQPWEEIKTS YAGVKEKYLS EYCFSGTYIL
SLLLQGYHFT ADSWEHIHFI GKIQGSDAGW TLGYMLNLTN MIPAEQPLST PLSHSTYVFL
MVLFSLVLFT VAIIGLLIFH KPSYFWKDMV
```

(SEQ ID NO: 2).

[0061]

[0062] 본 명세서의 문맥에서, CD39 폴리펩티드를 언급할 때 "억제하다", "억제하는", "중화시키다" 또는 "중화시키는"

(예를 들어, "CD39를 중화시키다", "CD39의 활성을 중화시키다" 또는 "CD39의 효소 활성을 중화시키다" 등)은 CD39의 ATP 가수분해 (ATPase) 활성을 억제하는 과정을 의미한다. 이것은 특히 AMP 및/또는 ADP의 CD39-매개 발생의 억제, 즉 ATP의 AMP 및/또는 ADP로의 CD39-매개 이화작용의 억제를 포함한다. 이것은 예를 들어 직접적으로 또는 간접적으로, ATP의 AMP 및/또는 ADP로의 전환을 억제하는 시험 화합물의 능력을 측정하는 세포 어세이에서 측정할 수 있다. 예를 들어, ATP의 소멸 및/또는 AMP의 발생은 본 명세서에 기술된 바와 같이 평가될 수 있다. 일 실시형태에서, 항체 조제물은 예를 들어 본 명세서에 기술된 어세이 (예를 들어, ATP의 소멸 및/또는 AMP의 발생)를 참조하여, ATP의 AMP로의 전환의 적어도 60% 감소, ATP의 AMP로의 전환의 적어도 70% 감소, 또는 ATP의 AMP로의 전환의 적어도 80% 또는 90% 감소를 야기시킨다.

[0063] 작용제 및 특정한 활성 (예를 들어, 세포와의 결합, 효소 활성의 억제, 면역 세포의 활성화 또는 억제)에 대한 "EC_{50}"은 이러한 활성에 대해서 이의 최대 반응 또는 효과의 50%를 생성시키는 작용제의 효율적인 농도를 의미한다. 작용제 및 특정한 활성에 대한 "EC_{100}"은 이러한 활성에 대해서 실질적으로 이의 최대 반응을 생성시키는 작용제의 효율적인 농도를 의미한다.

[0064] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 다클론 및 단일클론 항체를 의미한다. 중쇄의 불변 도메인의 유형에 따라서, 항체는 5종의 주요 클래스: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 중 하나로 지정된다. 이들 중 몇몇은 서브클래스 또는 이소타입, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 등으로 더욱 분류된다. 예시적인 면역글로불린 (항체) 구조 유닛은 사량체를 포함한다. 각각의 사량체는 폴리펩티드 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 구성되고, 각각의 쌍은 하나의 "경"쇄 (약 25 kDa) 및 하나의 "중"쇄 (약 50-70 kDa)를 갖는다. 각각의 사슬의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100개 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 한정한다. 용어 가변 경쇄 (V_L) 및 가변 중쇄 (V_H)는 각각 이들 경쇄 및 중쇄를 의미한다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 해당되는 중쇄 불변 도메인은 각각 "알파", "델타", "엡실론", "감마" 및 "뮤"라고 한다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차 입체형태는 충분히 공지되어 있다. IgG는 그들이 생리학적 상황에서 가장 일반적인 항체이기 때문에 그리고 그들이 실험실 상황에서 가장 쉽게 만들어지기 때문에 본 명세서에서 적용되는 예시적인 클래스의 항체이다. 임의로는 항체는 단일클론 항체이다. 항체의 특정한 예는 인간화, 키메라, 인간, 또는 아니면-인간-적합화 항체이다. "항체"는 또한 본 명세서에 기술된 임의의 항체의 임의 단편 또는 유도체를 포함한다.

[0065] 용어 "특이적으로 결합하다"는 바람직하게는 항체가 단백질의 재조합 형태, 그 안의 에피토프, 또는 단리된 표적 세포의 표면 상에 존재하는 천연 단백질을 사용하여 평가하게 되는, 결합 파트너, 예를 들어 CD39, CD73과의 경쟁적 결합 어세이에서 결합할 수 있다는 것을 의미한다. 경쟁적 결합 어세이 및 특이적 결합을 결정하기 위한 다른 방법은 당분야에서 충분히 공지되어 있다. 예를 들어 결합은 방사성표지, 물리적 방법 예컨대 질량 분광법, 또는 예를 들어, 세포형광계측 분석 (예를 들어, FACScan)을 사용해 검출된 직접 또는 간접 형광 표지를 통해서 검출할 수 있다. 대조군, 비특이적 작용제에 의해 확인되는 양을 초과하는 결합은 작용제가 표적에 결합한다는 것을 의미한다.

[0066] 항체가 특정한 단일클론 항체"와 경쟁한다"라고 할 때, 이것은 항체가 재조합 분자 (예를 들어, CD39, CD73) 또는 표면 발현된 분자 (예를 들어, CD39, CD73)를 사용하는 결합 어세이에서 단일클론 항체와 경쟁한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 시험 항체가 결합 어세이에서 항체 11E1, 6E1, 3C12 또는 8C7 중 어느 하나의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체의 CD73 폴리펩티드 또는 CD73-발현 세포에 대한 결합을 감소시키면, 그 항체는 각각 이러한 항체와 "경쟁한다"라고 한다. 예를 들어, 시험 항체가 결합 어세이에서 SEQ ID NO: 6의 중쇄 및 SEQ ID NO: 7의 경쇄를 갖는 항체의 CD39 폴리펩티드 또는 CD39-발현 세포에 대한 결합을 감소시키면, 그 항체는 각각 이러한 항체와 "경쟁한다"라고 한다.

[0067] 본 명세서에서 사용하는 용어 "친화성"은 항체의 에피토프에 결합하는 강도를 의미한다. 항체의 친화성은 [Ab]×[Ag]/[Ab-Ag]로서 정의된 해리 상수 Kd로 제공되고, 여기서 [Ab-Ag] 는 항체-항원 복합체의 몰 농도이고, [Ab] 는 미결합된 항체의 몰 농도이고 [Ag] 는 미결합된 항원의 몰 농도이다. 친화성 상수 K_a 는 1/Kd로 정의된다. mAb의 친화성을 결정하기 위한 방법은 [Harlow, et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988)], [Coligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993)], 및 [Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983)]에서 확인할 수 있고, 이들은 전체로 참조하여 본 명세서에 편입된다. mAb의 친화성을 결정하기 위해 당분야에 충분히 공지된 하나의 표준 방법은 표면 플라스몬 공명

(SPR) 스크리닝 (예컨대 BIAcore™ SPR 분석 장치를 사용한 분석에 의함)의 사용이다.

[0068] 본 명세서에 문맥 내에서, "결정부"는 폴리펩티드 상의 상호작용 또는 결합의 부위를 표시한다.

[0069] 용어 "에피토프"는 항원성 결합부를 의미하고, 항체가 결합하는 항원 상의 면적 또는 영역이다. 단백질 에피토프는 결합에 직접적으로 관여되는 아미노산 잔기를 비롯하여 특이적 항원 결합 항체 또는 펩티드에 의해 효과적으로 차단되는 아미노산 잔기, 즉 항체의 "풋프린트" 내 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 이것은 예를 들어 항체 또는 수용체와 조합될 수 있는 복합체 항원 분자 상의 가장 단순한 형태 또는 가장 작은 구조적 영역이다. 에피토프는 선형일 수 있거나 또는 입체형태/구조일 수 있다. 용어 "선형 에피토프"는 아미노산의 선형 서열 (1차 구조) 상에서 인접하는 아미노산 잔기로 구성된 에피토프로서 정의된다. 용어 "입체형태적 또는 구조적 에피토프"는 모두 인접하는 것은 아니고 따라서 분자의 폴딩에 의해서 서로 인접하게 되는 아미노산의 선형 서열의 분리된 부분을 나타내는 아미노산 잔기로 구성된 에피토프로서 정의된다 (2차, 3차 및/또는 4차 구조). 입체형태 에피토프는 3차 구조에 의존적이다. 그러므로 용어 "입체형태적"은 종종 "구조적"과 상호교환적으로 사용된다.

[0070] CD73- 또는 CD39-발현 세포에 대한 용어 "고갈되다" 또는 "고갈되는"은 샘플 또는 대상체에 존재하는 이러한 CD73- 또는 CD39-발현 세포의 개수에 부정적인 영향을 미치도록, 사멸, 제거, 용해 또는 이러한 사멸, 제거 또는 용해의 유도를 야기시키는 과정, 방법 또는 화합물을 의미한다.

[0071] "세포내 내재화"와 상호교환적으로 사용되는 용어 "내재화"는 세포의 세포외 표면으로부터 세포의 세포내 표면으로 분자의 전좌 과정과 연관된 분자적, 생화학적 및 세포적 사건을 의미한다. 분자의 세포내 내재화를 담당하는 과정은 충분히 공지되어 있고, 특히 세포외 분자 (예컨대 호르몬, 항체 및 소형 유기 분자); 막-회합 분자 (예컨대 세포-표면 수용체); 및 세포외 분자에 결합된 막-회합 분자의 복합체 (예를 들어, 경막 수용체에 결합된 리간드 또는 막-회합 분자에 결합된 항체)의 내재화를 포함할 수 있다. 따라서, "유도되고/되거나 증가된 내재화"는 세포내 내재화가 개시되고/되거나 세포내 내재화의 속도 및/또는 정도가 증가되는 사건을 포함한다.

[0072] 용어 "작용제"는 본 명세서에서 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대 분자, 또는 생물학적 재료로부터 만들어진 추출물을 의미하고자 사용된다. 용어 "치료제"는 생물학적 활성을 갖는 작용제를 의미한다.

[0073] 본 명세서의 목적을 위해서, "인간화" 또는 "인간" 항체는 하나 이상의 인간 면역글로불린의 불변 및 가변 프레임워크 영역이 동물 면역글로불린의 결합 영역, 예를 들어 CDR과 융합된 항체를 의미한다. 이러한 항체는 결합 영역이 유래되는 비인간 항체의 결합 특이성을 유지하지만, 비인간 항체에 대한 면역 반응은 피하도록 디자인된다. 이러한 항체는 항원성 공격에 대응하여 특이적 인간 항체를 생성하도록 "조작된" 유전자이식 마우스 또는 다른 동물로부터 수득될 수 있다 (예를 들어, [Green et al. (1994) Nature Genet 7:13]; [Lonberg et al. (1994) Nature 368:856]; [Taylor et al. (1994) Int Immun 6:579]을 참조하고, 이들의 전체 교시 내용은 참조로 본 명세서에 편입됨). 완전한 인간 항체는 또한 유전자 또는 염색체 형질감염 방법을 비롯하여, 파지 디스플레이 기술에 의해 구축될 수 있고, 이들 기술 모두는 당분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-553] 참조). 인간 항체는 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수도 있다 (예를 들어, 미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호를 참조하고, 이들은 그들 전문이 참조로 본 명세서에 편입됨).

[0074] "키메라 항체"는 (a) 불변 영역, 또는 이의 일부분이 변경, 치환 또는 교환되어서 항원 결합 부위 (가변 영역)가 상이하거나 또는 변경된 클래스, 이펙터 기능 및/또는 종의 불변 영역, 또는 키메라 항체에 새로운 특성을 부여하는 전체적으로 상이한 분자, 예를 들어 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 약물 등에 연결되거나; 또는 (b) 가변 영역, 또는 이의 일부분이 상이하거나 또는 변경된 항원 특이성을 갖는 가변 영역으로 변경, 치환 또는 교환된 항원 분자이다.

[0075] 본 명세서에서 사용시 용어 "초가변 영역"은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 일반적으로 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR" 유래 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 중쇄 가변 도메인의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); Kabat et al. 1991) 및/또는 "초가변 루프" 유래 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및 중쇄 가변 도메인의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol 1987;196:901-917]), 또는 항원 결합을 담당하는 필수 아미노산을 결정하기 위한 유사한 시스템을

포함한다. 전형적으로, 이 영역 내 아미노산 잔기의 번호매김은 문헌 [Kabat et al., 상동]에 기술된 방법으로 수행된다. 본 명세서에서 "카밧 위치", "카밧으로 번호매겨진 가변 도메인 잔기" 및 카밧에 따른"과 같은 어구는 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대한 이러한 번호매김 체계를 의미한다. 카밧 번호매김 체계를 사용하여, 펩티드의 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 그로의 삽입에 상응하는 소수의 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 CDR H2의 잔기 52 이후에 단일 아미노산 삽입 (카밧에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 이후에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카밧에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카밧 번호매김은 "표준" 카밧 번호매김 서열과 항체의 서열의 상동성 영역에서의 정렬에 의해 소정 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0076] 본 명세서에서 "프레임워크" 또는 "FR" 잔기란 CDR로서 정의된 그들 영역을 제외한 항체 가변 도메인의 영역을 의미한다. 각각의 항체 가변 도메인 프레임워크는 CDR에 의해 분리되어진 인접된 영역으로 더욱 세분될 수 있다 (FR1, FR2, FR3 및 FR4).

[0077] 용어 "Fc 도메인", "Fc 부분" 및 "Fc 영역"은 항체 중쇄의 C-말단 단편, 예를 들어, 인간 γ (감마) 중쇄의 대략 아미노산 (aa) 230 내지 대략 aa 450 또는 다른 유형의 항체 중쇄 (예를 들어, 인간 항체의 경우 α, δ, ε 및 μ) 또는 이의 천연 발생 알로타입에서의 이의 대응 서열을 의미한다. 달리 명시하지 않으면, 면역글로불린에 대해 일반적으로 허용되는 카밧 아미노산 번호매김이 본 개시 내용 전반에서 사용된다 (Kabat et al. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

[0078] 용어 "단리된", "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한"은 이의 천연 상태에서 존재하는 대로 정상적으로 이것을 수반하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 의미한다. 순도 및 균질성은 전형적으로 분석 화학 기술 예컨대 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액상 크로마토그래피를 사용하여 결정된다. 조제물에 존재하는 우세한 종의 단백질이 실질적으로 정제된다.

[0079] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 의미하기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 이 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산의 인공 화학 모방체인 아미노산 중합체를 비롯하여, 천연 발생 아미노산 중합체 및 비천연 발생 아미노산 중합체에 적용된다.

[0080] 예를 들어, 세포, 또는 핵산, 단백질, 또는 벡터에 대해서 사용시 용어 "재조합"은 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종성 핵산 또는 단백질의 도입 또는 천연 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유래된다는 것을 의미한다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 천연 (비재조합) 형태 내에 존재하지 않는 유전자를 발현하거나, 또는 그렇지 않으면 비정상적으로 발현되거나, 과소 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 천연 유전자를 발현한다.

[0081] 본 명세서의 문맥 내에서, 폴리펩티드 또는 에피토프에 "결합하는" 용어 항체는 특이성 및/또는 친화성으로 상기 결정부에 결합하는 항체를 의미한다.

[0082] 2개 이상의 폴리펩티드의 서열 간 관련성에 대해 사용될 때 용어 "동일성" 또는 "동일한"은 둘 이상의 아미노산 잔기의 스트링 간 일치부의 개수에 의해 결정되는, 폴리펩티드간 서열 관련성의 정도를 의미한다. "동일성"은 특정한 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램 (즉, "알고리즘")에 의해 처리되는 (존재한다면) 갭 정렬된 둘 이상의 서열 중 보다 작은 서열 사이의 동일한 일치부의 백분율을 측정한다. 관련 폴리펩티드의 동일성은 공지된 방법으로 쉽게 계산할 수 있다. 이러한 방법은 제한없이, 다음의 문헌들에 기술된 것들을 포함한다: [Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988]; [Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993]; [Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994]; [Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987]; [Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991]; 및 [Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)].

[0083] 동일성을 결정하기 위한 방법은 시험되는 서열 간 최대 일치성을 제공하도록 디자인된다. 동일성을 결정하는 방법은 공공으로 입수가능한 컴퓨터 프로그램에 기술되어 있다. 2개 서열 간 동일성을 결정하기 위한 컴퓨터 프로그램 방법은 GAP을 포함하는 GCG 프로그램 패키지 (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, 및 FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))를 포함한다. BLASTX 프로그램은 국립 생명공학 정

보 센터 (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) 및 다른 공급처 (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., supra)로부터 공공으로 입수가능하다. 충분히 공지된 스미스 워터만 (Smith Waterman) 알고리즘이 또한 동일성을 결정하는데 사용될 수 있다.

[0084] *sCD39 단백질을 억제하는 작용제*

[0085] 본 명세서에 따라 사용을 위한 CD39에 결합하고 억제하는 작용제는 가용성 CD39 단백질 (sCD39)의 ATPase 활성에 결합하여 억제 또는 중화시키는, 이러한, 임의로는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 항원 결합 도메인 또는 단백질일 수 있다. 일 실시형태에서 sCD39 단백질은 막결합 CD39에 존재하는 2개 경막 도메인 (즉, N-말단부 및 C-말단부 근처 경막 도메인)이 결여된다. 일 실시형태에서, sCD39는 순환계에서, 예를 들어 인간 개체에서 존재하는 비-막결합 sCD39 단백질이다. 일 실시형태에서, sCD39는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다 (임의로는 C-말단 태그 또는 다른 비-CD39-유래 아미노산 서열을 더 포함함).

일 실시형태에서, 단백질, 항체 또는 항체 단편은 예를 들어 본 명세서에 개시된 방법에 따라서, 용액 중에서 sCD39와 인큐베이션될 때 sCD39의 ATPase 활성을 억제한다. 일 실시형태에서, 단백질, 항체 또는 항체 단편은 가용성 (세포외 도메인 단백질) 및 막-결합 형태 둘 모두의 인간 CD39 단백질에 특이적으로 결합한다.

[0086] sCD39 (및 memCD39)의 활성을 중화시키는 항체는 그들이 sCD39 이외에도 memCD39를 표적화하는지 여부와 무관하게, 2가 결합제로서의 사용에 더하여, 1가 결합제로서도 유효할 수 있다. 결론적으로, 일 실시형태에서, CD39를 억제하는 작용제는 인간 CD39 단백질 (sCD39 및 임의로는 추가로 memCD39)에 1가적으로 결합하고 이의 효소 (ATPase) 활성을 중화시키는 항원 결합 단백질일 수 있다. 항원 결합 단백질은 임의로는 단일 CD39 단백질에 결합하고/하거나 CD39 단백질에 결합할 수 있는 단일 항원 결합 도메인을 보유하는 것으로 명시할 수 있다. 일 실시형태에서, 인간 CD39 단백질 (sCD39 및/또는 memCD39)에 1가적으로 결합하고 이의 효소 (ATPase) 활성을 중화시키는, 항체 단편, 임의로는 F(ab) 단편, 단쇄 항체, scFv, 다중특이적 항체를 제공한다.

일 실시형태에서, 인간 CD39 단백질에 1가적으로 결합하는 CD39-중화 항원 결합 단백질은 다중-특이적 항원 결합 단백질, 예를 들어, 다중-특이적 항체, 이특이적 항체, 삼중-특이적 항체 등이다. 일 실시형태에서, 인간 CD39 단백질에 1가적으로 결합하는 CD39-중화 항원 결합 단백질은 또한 인간 CD73 단백질의 효소 활성에 결합하고 억제한다. 일 실시형태에서, CD39 (sCD39 및/또는 memCD39)에 결합하는 제1 (또는 단독) 항원 결합 도메인 및 CD73 단백질에 결합하고 억제하는 제2 (및 임의로는 추가의) 항원 결합 도메인(들)을 포함하는 인간 CD39 단백질에 1가적으로 결합하는 CD39-중화 항원 결합 단백질의 용도를 제공한다.

[0087] 일 실시형태에서, 항-CD39 항체는 세포-표면 발현 CD39의 세포내 내재화, 또는 보다 일반적으로 하향-조절을 증가시키지 않거나 또는 유도시키지 않고/않거나, 이의 CD39 억제 활성에 의존하지 않는다.

[0088] 일 양상에서, 항-CD39 항체는 (a) 세포의 표면에서 발현되는 막-결합 CD39 단백질 (예를 들어, SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함)의 효소 활성을 억제할 수 있고, (b) 가용성 CD39 단백질 (예를 들어, SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 가짐)의 효소 활성을 억제할 수 있다.

[0089] 일 실시형태에서, 항-CD39 항체는 인간 Fcɣ 수용체 (예를 들어, CD16, CD32a, CD32b, CD64) 및/또는 C1q에 (예를 들어, 이의 Fc 도메인을 통해서) 실질적으로 결합하지 않고/않거나, CD39-발현 세포에 대해서 ADCC 및/또는 CDC를 실질적으로 유도시키지 않는다. 임의로는, 항체는 (예를 들어, 인간 IgG 이소타입의) Fc 도메인을 보유하고 인간 FcRn에 대한 결합성을 보유한다.

[0090] 일 실시형태에서, CD39 중화 항체는 sCD39 폴리펩티드 및/또는 단량체 CD39 폴리펩티드의 ATPase 활성의 감소를 야기시킬 수 있고, 임의로는 가용성 단량체 인간 CD39 단백질, 예를 들어 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열로 이루어진 CD39 단백질에 의해 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 만큼 AMP 발생의 감소를 야기시킬 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0091] 일 실시형태에서, CD39 중화 항체는 세포에서 CD39의 ATPase 활성의 감소를 야기시킬 수 있고, 임의로는 CD39-발현 세포에 의해 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 만큼 AMP 발생의 감소를 야기시킬 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다. 일 실시형태에서, CD39-중화 항체는 1 μg/mL 이하, 임의로는 0.5 μg/mL 이하, 임의로는 0.2 μg/mL 이하의 세포에 의해 발현된 CD39의 ATPase 활성의 억제에 대한 EC_{50} (예를 들어, CD39-발현 세포에 의한 AMP 발생의 억제에 대한 EC_{50})을 특징으로 할 수 있다.

[0092] 항원-결합 화합물은 본 명세서에 더욱 기술된 바와 같이 생산될 수 있고, 임의의 바람직한 단계에서 CD39의 효소 활성을 억제하는 이의 능력, 특히 sCD39의 ATPase 활성을 차단하고 가용성 CD39 단백질 및 임의로는 추가로

CD39-발현 세포에 의한 ADP 및 AMP (및, CD73과 함께, 아데노신)의 생성을 감소시키는 능력, 및 그 이후에 림프구 활성화 및/또는 증식의 아데노신-매개 억제를 경감시키고/시키거나 활성을 복원시키는 능력에 대해 평가될 수 있다.

[0093] 항체의 억제 활성 (예를 들어, 면역 증강 잠재성)은 예를 들어 ATP의 소멸 (가수분해) 및/또는 AMP의 발생을 검출하기 위한 어세이에서 평가될 수 있다.

[0094] 가용성 재조합 인간 CD39 단백질을 억제하는 항체의 능력은 가용성 CD39 단백질 (예를 들어, 실시예 1에서 제조된 바와 같고, 임의로는 정제 태그 또는 다른 기능성 또는 비기능성 비-CD39-유래 아미노산 서열을 더 포함하는 SEQ ID NO: 5의 아미노산 서열을 갖는 CD39 단백질)과 시험 항체를 인큐베이션시킨 후에 ATP를 검출하여 시험될 수 있다. 예를 들어, 실시예 1을 참조한다. 간략하게, ATP는 시험 항체의 용량 범위를 실시예 1에 기술된 바와 같은 가용성 재조합 인간 CD39 단백질과 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션시키는 어세이에서, Cell Titer Glo™ (Promega)를 사용하여 정량될 수 있다. CTG 시약의 첨가 이전에 37℃에서 추가 30분 동안 플레이트에 20 μM ATP를 첨가한다. 방출된 빛은 암실에서 5분의 짧은 인큐베이션 기간 이후에 Enspire™ 광도계를 사용해 정량한다.

[0095] CD39 단백질을 발현하는 세포를 억제하는 항체의 능력은 시험 항체를 세포 (예를 들어, Ramos 세포, CD39가 형질감염된 세포 등)와 인큐베이션시킨 후에 ATP를 검출하여 시험될 수 있다. 예를 들어, 실시예 1을 참조한다. 세포는 1시간 동안 37℃에서 시험 항체와 인큐베이션될 수 있다. 그 다음으로 세포는 20 μM ATP와 추가 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션된다. 플레이트는 2분 동안 400g에서 원심분리시키고 세포 상청액을 발광 마이크로플레이트 (흰색 웰)로 옮긴다. CTG를 상청액에 첨가하고 방출된 빛은 Enspire™ 광도계를 사용하여 암실에서 5분간 인큐베이션 후에 정량된다. 항-CD39 항체 효능은 ATP가 세포와 함께인 경우 (최소 빛 방출) 및 ATP 단독인 경우 (최대 빛 방출)에 항체 존재 하에서 방출되는 빛을 비교하여 결정된다.

[0096] 항체의 존재 하에서, ATP의 AMP로의 가수분해의 감소, 및/또는 ATP의 증가 및/또는 AMP 발생의 감소는 항체가 CD39를 억제한다는 것을 의미한다. 일 실시형태에서, 예를 들어 본 명세서의 실시예에서처럼, CD39 폴리펩티드를 발현하는 세포 (예를 들어, Ramos 세포)를 시험 항체와 인큐베이션시킨 후에 Cell Titer Glo™ (Promega)을 사용하여 ATP를 검출하여 평가시에, 항체 조제물은 세포에 의해 발현되는 CD39 폴리펩티드의 효소 활성에서 적어도 60% 감소를 야기시킬 수 있고, 바람직하게 항체는 세포에서 CD39 폴리펩티드의 효소 활성에서 적어도 70%, 80% 또는 90% 감소를 야기시킨다. 일 실시형태에서, 항체는 (예를 들어, ATP를 검출하여 평가시), 본 명세서에 기술된 항-CD39 항체, 예를 들어 I-394, I-395, I-396 또는 I-399에서 관찰된 EC_{50} 이하, 임의로는 본 명세서에 기술된 항-CD39 항체, 예를 들어 I-394, I-395, I-396 또는 I-399의 것보다 2-log 또는 1-log 이하로 큰 EC_{50} 의, 세포에 의해 발현된 CD39 폴리펩티드의 효소 활성의 감소를 야기시키는 것에 대한 EC_{50} 을 특징으로 한다.

[0097] 일 실시형태에서, 예를 들어, 실시예 1에서처럼, 가용성 재조합 CD39 폴리펩티드와 시험 항체를 인큐베이션시킨 후에, Cell Titer Glo™ (Promega)를 사용하여 ATP를 검출하여 평가시, 항체 조제물은 가용성 재조합 CD39 폴리펩티드의 효소 활성에서 적어도 60% 감소를 야기시킬 수 있고, 바람직하게는 적어도 가용성 재조합 CD39 폴리펩티드의 효소 활성에서 적어도 70%, 80%, 또는 90% 감소를 야기시킬 수 있다.

[0098] 항체의 활성은 또한 면역 세포 (예를 들어, 아데노신 수용체-발현 면역 세포; A2A-수용체 발현 세포)의 활성을 조절하는 이의 능력, 예를 들어 림프구 활성의 아데노신-매개 억제를 경감시키는 능력, 또는 림프구 활성의 활성화를 야기시키는 능력에 대해 간접 어세이에서 측정될 수 있다. 이것은 예를 들어 사이토카인-방출 어세이를 사용해 처리될 수 있다. 다른 예에서, 항체는 림프구의 증식을 조절하는 이의 능력에 대해 간접 어세이에서 평가될 수 있다.

[0099] 일례에서, 개시된 방법에서 사용할 수 있는 (예를 들어, CD73-양성 암의 치료에서 사용을 위해; CD73의 효소 활성을 억제하는 작용제와 병용하여 사용을 위해) 항-CD39 항체 또는 항원 결합 도메인을 제조 또는 확인하는 방법을 제공하고, 그 방법은 다음의 단계들을 포함한다:

[0100] (a) 인간 CD39 폴리펩티드에 결합하는 다수의 항체를 제공하는 단계,

[0101] (b) 각각의 항체를 가용성 세포외 도메인 CD39 단백질과 접촉시키고 이의 ATPase 활성의 중화를 평가하는 단계, 및

[0102] (c) 적어도 70%, 임의로는 80% 또는 임의로는 90% 까지 ATPase 활성의 중화를 일으키는 단계 (b)의 항체를 선택

하는 단계.

[0103] 임의로는, 그 방법은 다음의 단계들을 더 포함한다:

[0104] (d) CD73 단백질의 효소 활성을 억제하는 작용제의 활성을 강화시키는 단계 (c)에서 선택된 항체의 능력을 평가하는 단계; 및

[0105] (e) CD73 단백질의 효소 활성을 억제하는 작용제의 활성을 강화시키는 단계 (d)의 항체를 선택하는 단계.

[0106] 임의로는, 단계 (d)는 단계 (c)에서 선택된 항체 및 CD73 단백질의 효소 활성을 억제하는 작용제를 세포, 임의로는 인간 T 세포, 임의로는 CD4 T 세포, 임의로는 CD8 T 세포와 접촉시키는 단계, 및 세포의 활성화 및/또는 증식을 평가하는 단계를 포함한다. 임의로는, 어세이는 ATP (예를 들어, 외생적으로 첨가된 ATP)의 존재 하에서 수행된다.

[0107] 임의로는, 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 중화 항-CD39 항체는 sCD39 및 세포 표면에 발현된 CD39 (memCD39) 둘 모두에 존재하는 항원 결합부에 결합한다.

[0108] 임의로는, 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 중화 항-CD39 항체는 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399에 의해 결합되는 CD39 상의 에피토프와의 결합에 대해 경쟁한다 (예를 들어, I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399 중 어느 하나의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 갖는 항체와 CD39 폴리펩티드 상의 폴리펩티드와의 결합에 대해 경쟁한다).

[0109] 임의로는, 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 중화 항-CD39 항체는 단일클론 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 CD39 폴리펩티드와의 결합에 대해 경쟁하고, 예를 들어, I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 역을 갖는 항체와 CD39 폴리펩티드와의 결합에 대해 경쟁한다. 일 실시형태에서, 중화 항-CD39 항체는 각각 SEQ ID NO: 6 및 7의 VH 및 VL 영역을 갖는 항체와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 CD39 폴리펩티드와의 결합에 대해 경쟁한다.

[0110] 임의로는, 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399에 의해 결합되는 CD39 상의 아미노산 잔기로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 결합한다.

[0111] 임의로는, 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 결합 분자 (예를 들어, 항-CD39 항체)는 본 명세서에 기술된 바와 같은 경쇄 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 가변 중쇄 도메인 (V_H), 및 본 명세서에 기술된 바와 같은 중쇄 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 가변 경쇄 도메인 (V_L), 또는 CDR (또는 중쇄 및/또는 경쇄 CDR의 세트)이 상기 CDR (또는 중쇄 및/또는 경쇄 CDR의 상기 세트)과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 아미노산 동일성을 갖는 것인 아미노산 서열을 포함한다. 본 명세서의 임의의 실시형태의 일 양상에서, 항체는 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399의 중쇄 가변 영역 (VH)의 3개 CDR을 포함하는 중쇄 및 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399의 경쇄 가변 영역 (VL)의 3개 CDR을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다.

[0112] 임의로는, 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 본 명세서에 기술된 바와 같은 중쇄 (예를 들어, SEQ ID NO: 52의 중쇄)와 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 아미노산 동일성의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 본 명세서에 기술된 바와 같은 경쇄 (예를 들어, SEQ ID NO: 53의 경쇄)와 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 아미노산 동일성의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0113] 임의로는, 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 본 명세서에 개시된 임의 항체의 기능-보존적 변이체인 것을 특징으로 할 수 있다. "기능-보존적 변이체"는 제한없이, 유사한 성질 (예컨대, 예를 들어 극성, 수소 결합 잠재성, 산성, 염기성, 소수성, 방향족 등)을 갖는 것으로 아미노산의 치환을 포함하여, 폴리펩티드의 전반적인 입체형태 및 기능을 변경시키지 않고 변화된 것이다. 보존된 것으로 표시된 것 이외의 아미노산은 단백질에서 상이할 수 있어서 유사한 기능의 임의의 2종 단백질 간 단백질 또는 아미노산 서열 유사성 백분율은 다양할 수 있고, 예를 들어 Cluster 방법과 같은 정렬 계획에 따라 결정시 70% 내지 99%일 수 있고, 여기서 유사성은 MEGALIGN 알고리즘을 기반으로 한다. "기능-보존적 변이체"는 또한 BLAST 또는 FASTA 알고리즘으로 결정시 적어도 60%의 아미노산 동일성, 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 여전히 바람직하게는 적어도 90%, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 95% 아미노산 동일성을 갖고, 비교하려는 천연 또는 부모 단백질과 동일하거나 또는 실질적으로 유사한 성질 또는 기능을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0114] 임의로는, 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 Fc 도메인 및 인간 CD16A, CD16B, CD32A, CD32B 및/또는 CD64 폴리펩티드 사이의 결합을 감소시키도록 (동일 이소타입의 야생형 Fc 도메인과 비교하여) 변형된 인간 Fc 도메인을 포함하고, 임의로는 여기서 항체는 (i) SEQ ID NO: 6의 중쇄 가변 영역의 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 중쇄, 및 (ii) SEQ ID NO: 7의 경쇄 가변 영역의 CDR 1, 2 및 3을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일 양상에서, Fc 도메인은 Fc 도메인 및 인간 C1q 폴리펩티드 간 결합을 감소시키도록 (동일한 이소타입의 야생형 Fc 도메인과 비교하여) 변형된다. 일 실시형태에서, 항체는 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 243, 264, 268, 297, 298, 299, 309, 310, 318, 320, 322, 327, 330 및 331 (카밧 EU 번호매김)로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상의 잔기에서 중쇄 불변 영역에 아미노산 치환을 포함한다. 일 실시형태에서, 항체는 234, 235, 237, 322, 330 및 331로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 3개, 4개, 5개 또는 그 이상의 잔기에서 중쇄 불변 영역에 아미노산 치환을 갖는다. 일 실시형태에서, 항체는 SEQ ID NO: 59-62 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다.

[0115] 일 실시형태에서, 항체는 하기 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하지만 카밧 위치 234, 235 및 331 (밑줄)에 아미노산 잔기를 보유하는 중쇄 불변 영역을 포함한다:

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E **A** **E** G G P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A **S** I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N

[0116] N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 59).

[0117]

[0118] 일 실시형태에서, 항체는 하기 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하지만 카밧 위치 234, 235 및 331 (밑줄)에 아미노산 잔기를 보유하는 중쇄 불변 영역을 포함한다:

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E **F** **E** G G P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A **S** I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 60).

[0119]

[0120] 일 실시형태에서, 항체는 하기 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하지만 카밧 위치 234, 235, 237, 330 및 331 (밑줄)에 아미노산 잔기를 보유하는 중쇄 불변 영역을 포함한다:

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E **A** **E** G **A** P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P **S** **S** I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 61).

[0121]

[0122] 일 실시형태에서, 항체는 하기 아미노산 서열, 또는 이와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 포함하지만 카밧 위치 234, 235, 237 및 331 (밑줄)에 아미노산 잔기를 보유하는 중쇄 불변 영역을 포함한다:

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V

[0123]

V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E **A** **E** G **A** P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A **S** I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 62).

[0124]

[0125] 일 양상에서, 항-CD39 항체는 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399와 동일한 에피토프에 결합한다. 일 실시형태에서, 항체는 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399에 의해 결합되는 에피토프와 적어도 부분적으로 중복되거나, 또는 그 에피토프의 적어도 하나의 잔기를 포함하는 CD39의 에피토프에 결합된다. 항체에 의해 결합되는 잔기는 CD39 폴리펩티드의 표면 상에, 예를 들어, 세포의 표면 상에 발현되는 CD39 폴리펩티드에 존재한다고 명시될 수 있다.

[0126] CD39 돌연변이체로 형질감염된 세포에 대한 항-CD39 항체의 결합은 측정되어 야생형 CD39 폴리펩티드 (예를 들어, SEQ ID NO: 2)에 결합하는 항-CD39 항체의 능력과 비교될 수 있다. 항-CD39 항체 및 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 (예를 들어, 표 1의 돌연변이체) 간 결합의 감소는 결합 친화성의 감소 (예를 들어, 특정한 돌연변이체를 발현하는 세포의 FACS 시험과 같은 기지 방법에 의해, 또는 돌연변이체 폴리펩티드와의 결합의 Biacore 시험에 의해 측정) 및/또는 항-CD39 항체의 전체 결합 능력의 감소 (예를 들어, 폴리펩티드 농도에 따른 항-CD39 항체의 그래프에서 Bmax의 감소로 입증)가 존재한다는 것을 의미한다. 결합의 유의한 감소는 돌연변이된 잔기가 항-CD39 항체와의 결합에 직접적으로 관여하거나 또는 항-CD39 항체가 CD39에 결합될 때 결합 단백질과 가까이 근접해 존재한다는 것을 의미한다.

[0127] 일부 실시형태에서, 결합의 유의한 감소는 항-CD39 항체 및 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 간 결합 친화성 및/또는 능력이 항체 및 야생형 CD39 폴리펩티드 간 결합에 비해서 40% 초과, 50% 초과, 55% 초과, 60% 초과, 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과 또는 95% 초과까지 감소된다는 것을 의미한다. 일정 실시형태에서, 결합은 검출가능한 한계치 미만으로 감소된다. 일부 실시형태에서, 결합의 유의한 감소는 돌연변이체 CD39 폴리펩티드에 대한 항-CD39 항체의 결합이 항-CD39 항체와 야생형 CD39 폴리펩티드 간에 관찰된 결합의 50% 미만 (예를 들어, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% 또는 10% 미만)일 때 입증된다.

[0128] 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399에 의해 결합되는 아미노산 잔기를 포함하는 절편 내 잔기가 상이한 아미노산으로 치환된 것인 돌연변이체 CD39 폴리펩티드에 대해 유의하게 더 낮은 결합을 나타낸다.

[0129] 일부 실시형태에서, 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399에 의해 결합되는 CD39 상의 에피토프에 결합하는 항-CD39 항체 (예를 들어, I-394 이외)가 제공된다.

[0130] 일 양상에서, 항체는 R138, M139 및 E142 (SEQ ID NO: 2 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 (예를 들어, 잔기 중 1개, 2개 또는 3개)를 포함하는 CD39 상의 에피토프에 결합된다.

[0131] 일 양상에서, 항-CD39 항체는 야생형 CD39 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 2의 CD39 폴리펩티드)와 비교하여, R138, M139 및 E142 (SEQ ID NO: 2 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1개, 2개 또는 3개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드에 대해 감소된 결합 (예를 들어, 실질적으로 완전한 결합 상실)을 나타내고; 임의로는, 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: R138A, M139A 및 E142K를 갖는다. 선택적인 일 양상에서, 항체는 돌연변이체 19 이외의 표 1의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 중 어느 하나에 대해 결합 상실을 갖지 않는다. 다른 선택적 양상에서, 항-CD39 항체는 야생형 CD39 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 2의 CD39 폴리펩티드)와 비교하여, Q96, N99, E143 및 R147 (SEQ ID NO: 2 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1개, 2개, 3개 또는 4개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드에 대해 감소된 결합 (임의로는 감소지만 실질적으로 완전한 결합 상실은 아니거나; 또는 임의로는 실질적으로 완전한 결합 상실)을 나타내고; 임의로는, 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: Q96A, N99A, E143A 및 R147E를 갖는다.

[0132] 일 양상에서, 항체는 Q96, N99, E143 및 R147 (SEQ ID NO: 2 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 (예를 들어, 잔기 중 1개, 2개, 3개 또는 4개)를 포함하는 CD39 상의 에피토프에 결합한다. 일 양상에서, 항체는 각 경우에 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열을 포함하는 야생형 CD39 폴리펩티드 및 항체 간 결합에 비해서, Q96, N99, E143 및 R147 (SEQ ID NO: 2 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개, 2개, 3개 또는 4개 잔기에 돌연변이를 포함하는 돌연변이체 CD39 폴리펩티드에 대해 감소된 결합 (예를 들어, 실질적으로 완전한 결합 상실)을 갖는다.

[0133] 일 양상에서, 항체는 (a) R138, M139 및 E142 (SEQ ID NO: 2 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 (예를 들어, 잔기 중 1개, 2개 또는 3개), 및 (b) Q96, N99, E143 및 R147로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 (예를 들어, 잔기 중 1개, 2개, 3개 또는 4개)를 포함하는 CD39 상의 에피토프에 결합한다.

[0134] 일 양상에서, 항-CD39 항체는 각 경우에 야생형 CD39 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 2의 CD39 폴리펩티드)에 비해서, (a) Q96, N99, E143 및 R147 (SEQ ID NO: 2 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1개, 2개, 3개 또는 4개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드, 및 (b) R138, M139 및 E142 (SEQ ID NO: 2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1개, 2개 또는 3개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드 둘 모두에 대해 감소된 (예를 들어, 실질적으로 완전한 상실의) 결합을 나타낸다. 임의로는, (a)의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: Q96A, N99A, E143A 및 R147E를 갖는다. 임의로는, (b)의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: R138A, M139A 및 E142K를 갖는다. 임의로는 항체는 돌연변이체 5 및 19 이외의 표 1의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 중 어느 하나에 대해 결합 상실을 갖지 않는다.

[0135] 일 양상에서, 항체는 K87, E100 및 D107 (SEQ ID NO: 2 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 (예를 들어, 잔기 중 1개, 2개, 3개 또는 4개)를 포함하는 CD39 상의 에피토프에 결합한다.

[0136] 일 양상에서, 항-CD39 항체는 야생형 CD39 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 2의 CD39 폴리펩티드)와 비교하여, K87, E100 및 D107 (SEQ ID NO: 2 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1개, 2개, 3개 또는 4개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드에 대해 감소된 결합 (예를 들어, 실질적으로 완전한 결합 상실)을 나타내고, 임의로는, 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: K87A, E100A 및 D107A를 갖는다. 임의로는 항체는 돌연변이체 15 이외의 표 1의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 중 어느 하나에 대해 결합 상실을 갖지 않는다.

[0137] 일 양상에서, 항체는 N371, L372, E375, K376 및 V377 (SEQ ID NO: 2 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 (예를 들어, 잔기 중 1개, 2개, 3개 또는 4개)를 포함하는 CD39 상의 에피토프에 결합한다.

[0138] 일 양상에서, 항-CD39 항체는 야생형 CD39 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 2의 CD39 폴리펩티드)와 비교하여, N371, L372, E375, K376 및 V377 (SEQ ID NO: 2 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드에 대해 감소된 (예를 들어, 실질적으로 완전한 상실의) 결합을 나타내고, 임의로는, 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: N371K, L372K, E375A, K376G 및 V377S, 및 잔기 376 및 377 사이에 발린의 삽입을 갖는다. 임의로는 항체는 돌연변이체 11 이외의 표 1의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 중 어느 하나에 대해 결합 상실을 갖지 않는다.

[0139] 항-CD39 항체는 예를 들어 아미노산 서열: DYNMH (SEQ ID NO: 8), 또는 이의 적어도 4개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR1; 아미노산 서열: YIVPLNGGSTFNQKFKG (SEQ ID NO: 9), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR2; 아미노산 서열: GGTRFAY (SEQ ID NO: 10), 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR3; 아미노산 서열: RASESVDNFGVSFMY (SEQ ID NO: 11), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR1; 아미노산 서열: GASNQGS (SEQ ID NO: 12) 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR2; 및/또는 아미노산 서열: QQTKEVPYT (SEQ ID NO: 13), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7 또는 8개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산이 결실될 수 있거나 또는 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-394의 LCDR3 영역을 포함할 수 있다. CDR 위치는 카밧 번호매김에 따를 수 있다.

[0140] 인간 sCD39 단백질의 효소 활성을 억제하는 항체의 예시적인 항-CD39 VH 및 VL 쌍은 항체 I-394의 것이고, 이의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 6)에 열거되고, 이의 경쇄 가변 영역의 아미노산은 하기 (SEQ ID NO: 7)에 열거된다. 카밧 번호매김에 따른 CDR은 SEQ ID NO: 6 및 7에서 밑줄표시된다. 임의로는, VH 및 VL은 인간 억셉터 프레임워크를 포함한다 (예를 들어, 도입하도록 변형됨). 일 실시형태에서, 본 개시의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 6의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 VH CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 번호매김에 따름)을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 개시의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 번호매김에 따름)을 포함한다.

I-394 VH:
EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT**DYNMH**WVKQSHGRTLEWIG**YIVPLNGGSTF**
NQKFKGRATLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCAR**GGTRFAY**WGQGTLVTVSA (SEQ
ID NO: 6).

I-394 VL:
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC**RASESVDNFGVSFMY**WFQQKPGQPPNLLIY**GASNQGS**G
VPARFRGSGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFC**QQTKEVPYT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
7).

[0141]

[0142] 본 개시에 따른 다른 예시적인 항-CD39 VH 미치 VL 쌍은 항체 I-395의 것이고, 이의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 14)에 열거되고, 이의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 15)에 열거된다. 카밧 번호매김에 따른 CDR은 SEQ ID NO: 14 및 15에서 밑줄로 표시된다. 임의로는, VH 및 VL은 인간 억셉터 프레임워크을 포함한다 (예를 들어, 도입되도록 변형됨). 일 실시형태에서, 본 개시의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 VH CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 번호매김에 따름)을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 개시의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 번호매김에 따름)을 포함한다.

I-395 VH:
EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKASGYTFT**DYNMH**WVKKNHGKGLEWIG**YINPNNGGTT**
YNQKFKGKATLTVNTSSKTAYMELRSLTSEDSAVYYCTR**GGTRFAS**WGQGTLVTVSA
(SEQ ID NO: 14).

I-395 VL:
NIVLTQSPASLAVSLGQRATISC**RASESVDNYGISFMY**WFQQKPGQPPKLLIY**AASTQGS**G
VPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC**QQSKEVPFT**FGSGTKLEIK
(SEQ ID NO:15).

[0143]

[0144] 항-CD39 항체는 예를 들어 아미노산 서열: DYNMH (SEQ ID NO: 16), 또는 이의 적어도 4개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395의 HCDR1; 아미노산 서열: YINPNNGGTTYNQKFKG (SEQ ID NO: 17), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395의 HCDR2; 아미노산 서열: GGTRFAS (SEQ ID NO: 18), 또는 이의 적어도 4, 5, 6개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395의 HCDR3; 아미노산 서열: RASESVDNYGISFMY (SEQ ID NO: 19), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395의 LCDR1; 아미노산 서열: AASTQGS (SEQ ID NO: 20) 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395의 LCDR2 영역; 및/또는 아미노산 서열: QQSKEVPFT (SEQ ID NO: 21), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7 또는 8개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 결실될 수 있거나 또는 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395의 LCDR3 영역을 포함할 수 있다. CDR 위치는 카밧 번호매김에 따를 수 있다.

[0145] 본 개시에 따른 다른 예시적인 항-CD39 VH 및 VL 쌍은 항체 I-396의 것이고, 이의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 22)에 열거되고, 이의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 23)에 열거된다. 카밧 번호매김에 따른 CDR은 SEQ ID NO: 22 및 23에 밑줄로 표시된다. 임의로는, VH 및 VL은 인간 억셉터 프레임워크을 포함한다 (예를 들어, 도입하도록 변형됨). 일 실시형태에서, 개시의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 VH CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 번호매김에 따름)을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 개시의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 번호매김에 따름)을 포함한다.

I-396 VH:
EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCIVSGFNIK**DTYIN**WVKQRPEQGLEWIG**RIDPANGNTKYD**
PKFQGKATMTSDTSSNTAYLHLSSLTSDDSAVYYCAR**WGYDDEEADYFDS**WGQGTTLTV
SS
(SEQ ID NO: 22).

I-396 VL:
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC**RASESVDNYGISFMN**WFQQKPGQPPKLLIY**AASNQGS**G
VPARFSGSGSGTDFSLNILPMEEVDAAMYFC**HQSKEVPWT**FGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 23).

[0146]

[0147] 항-CD39 항체는 예를 들어 아미노산 서열: DTYIN (SEQ ID NO: 24), 또는 이의 적어도 4개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR1; 아미노산 서열: RIDPANGNTKYDPKFQG (SEQ ID NO: 25), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR2; 아미노산 서열: WGYDDEEADYFDS (SEQ ID NO: 26), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접

한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR3; 아미노산 서열: RASESVDNYGISFMN (SEQ ID NO: 27), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR1; 아미노산 서열: AASNQGS (SEQ ID NO: 28) 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR2 영역; 및/또는 아미노산 서열: HQSKEVPWT (SEQ ID NO: 29), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7 또는 8개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 결실될 수 있거나 또는 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-396의 LCDR3 영역을 포함할 수 있다. CDR 위치는 카밧 번호매김에 따를 수 있다.

[0148] 본 개시에 따른 다른 예시적인 항-CD39 VH 및 VL 쌍은 항체 I-399의 것이고, 이의 중쇄 가변 영역의 아미노산은 하기 (SEQ ID NO: 30)에 열거되고, 이의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 31)에 열거된다. 카밧 번호매김에 따른 CDR은 SEQ ID NO: 30 및 31에서 밑줄로 표시된다. 임의로는, VH 및 VL은 인간 억셉터 프레임워크를 포함한다 (예를 들어, 도입하도록 변형됨). 일 실시형태에서, 본 개시의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 VH CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 번호매김에 따름)을 포함한다. 일 실시형태에서, 본 개시의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 31의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 번호매김에 따름)을 포함한다.

I-399 VH:
PVQLQQPGAEVVMPGASVKLSCKASGYTFT**SFWMN**WMRQRPGQGLEWIG**EIDPSDFYTN**
SNQRFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR**GDFGWYFDV**WGTGTSVTVSS
(SEQ ID NO: 30).

I-399 VL:
EIVLTQSPTTMTSSPGEKITFTC**SASSSINSNYLH**WYQQKPGFSPKLLIY**RTSNLAS**GVPTRF
SGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYC**QQGSSLPRT**FGGGTKLEIK
(SEQ ID NO: 31).

[0149]

[0150] 항-CD39 항체는 예를 들어 아미노산 서열: SFWMN (SEQ ID NO: 32), 또는 이의 적어도 4개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR1; 아미노산 서열: EIDPSDFYTNSNQRFKG (SEQ ID NO: 33), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR2; 아미노산: GDFGWYFDV (SEQ ID NO: 34), 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR3; 아미노산 서열: SASSSINSNYLH (SEQ ID NO: 35), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR1; 아미노산 서열: RTSNLAS (SEQ ID NO: 36) 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR2 영역; 및/또는 아미노산 서열: QQGSSLPRT (SEQ ID NO: 37), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7 또는 8개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 결실될 수 있거나 또는 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-399의 LCDR3 영역을 포함할 수 있다. CDR 위치는 카밧 번호매김에 따를 수 있다.

[0151] I-394, I-395, I-396 및 I-399 항체 중 어느 하나에서, HCDR 1, 2, 3 및 LCDR 1, 2, 3 서열 (각각의 CDR 독립적으로, 또는 모든 CDR)은 카밧 번호매김 체계 (밑줄로 VH 및 VL 서열에 표시된 바와 같음), 초티아 (Chothia) 번호매김 체계, 또는 IMGT 번호매김 체계, 또는 임의의 다른 적합한 번호매김 체계의 것으로서 명시될 수 있다.

[0152] 임의의 양상에서, 명시된 가변 영역, FR 및/또는 CDR 서열은 하나 이상의 서열 변형, 예를 들어, 치환 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이상의 서열 변형)을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서 치환은 보존적 변형이다.

[0153] 다른 양상에서, 항-CD39 화합물은 본 명세서에 개시된 항체의 VH 도메인과 적어도 약 60%, 70% 또는 80% 서열 동일성, 임의로는 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 도메인을 포함한다. 다른 양상에서, 항-CD39 항체는 본 명세서에 개시된 항체의 VL 도메인과 적어도 약 60%, 70% 또는 80% 서열 동일성, 임의로는 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함한다.

[0154] *CD73을 억제하는 작용제*

[0155] CD73 효소의 엑토-5' 뉴클레오티다제 활성의 억제 또는 중화는 CD73에 결합하고 CD73 효소의 엑토-5' 뉴클레오티다제 활성을 억제하는 작용제 (예를 들어, 소형 분자 유기 화합물, 항체, Fc 도메인에 융합된 폴리펩티드, 이뮤노어드헤신 등)의 사용을 유리하게 포함할 수 있다.

[0156] CD73 이량체의 각 서브유닛은 2개의 구조적 도메인: N-말단 도메인 (잔기 27-317, [Knapp et al. (2012)]에서 언급된 대로 번호매김) 및 C-말단 도메인 (잔기 337-549)으로 이루어지는데, CD73의 보다 큰 N-말단 도메인은 금속 이온 결합 부위를 함유하고, 2개의 샌드위치된 혼합 B 시트를 포함하여, 4-적층 a/b-b-b-a 구조를 갖는다. C-말단 도메인은 기질 결합 부위 및 이량체화 계면을 함유하고, 4-적층 구조의 조성 a/b-b-a-b을 갖는다. 2개 도메인은 효소가 큰 도메인 움직임을 겪을 수 있게 하여서 개방형 및 폐쇄형 입체형태를 전환할 수 있게 하는, 소형 힌지 영역을 포함하는 단일 나선 (잔기 318-336)에 의해 연결된다. 폐쇄형 입체형태에서 관찰되는, 활성 부위는 N-말단 및 C-말단 도메인 사이의 계면에 위치되고 양쪽 도메인의 잔기에 의해 형성된다. 예를 들어, [Knapp et al. (2012) Structure 20, 2161-2173]를 참조하고, 이의 개시 내용은 참조로 본 명세서에 편입된다.

[0157] 상이한 작용 기전을 통해서 CD73의 엑토-5' 뉴클레오티다제 활성을 억제하는 기능을 하는 다양하게 상이한 CD73 결합제가 당분야에 공지되어 있다. 소형 분자 작용제 예컨대 푸린 및 ADP 유사체 예컨대 비가수분해성 ADP 유사체 APCP (아데노신 5'-[α,β-메틸렌]디포스페이트)는 (예를 들어, CD73의 ADP 결합 부위에 결합하여) ADP의 경쟁적 억제제로서 작용한다. 항체 및 소형 분자 작용제 둘 모두를 포함하여, 다른 작용제는 비경쟁적 억제제로서 작용할 수 있다. 예를 들어, BMS-986179와 같은 항체는 CD73의 세포내 내재화를 유도하여 CD73의 효소 활성을 억제한다는 것이 보고되었다 (예를 들어, PCT 공개 번호 WO2016/081748 참조). 다른 예에서, 소형 분자 및/또는 항체 작용제 둘 모두는 예를 들어 효소 활성에 필요한 도메인 움직임의 손상을 초래하는 부위에서 CD73에 결합하여 알로스테릭 억제제로서 작용할 수 있다. 예를 들어, 계산 생물학은 CD73의 이량체화 계면을 표적화할 수 있어서, CD73을 비경쟁적으로 억제할 수 있는 3-분지형 기반 분자로서 5-원 또는 6-원 방향족 고리와 같은 강건한 스캐폴드를 조합한 소형 분자의 설계를 허용하였고 (Rahimova et al. (2018) PLOS Computational Biology; https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005943 참조), 및 2-알콕시-3-(술포닐아릴아미노메틸렌)-크로만-4-온 유도체는 비경쟁적 억제제로서 보고되었다 (Al-Rashida and Iqbal (2014) Med Res Rev 34: 703-743 참조). 항체 MEDI9447 (올레클루맙; PCT 공개 번호 WO2016/075099 참조)은 입체적으로 CD73을 차단하여 CD73가 촉매적 활성 입체형태를 채택하지 못하게 한다 (Geoghegan et al. (2016) mAbs 8: 454-467 참조). 세포 막-결합 CD73의 비경쟁적 억제제 (내재화에 비의존)로서 작용하고 추가적으로 가용성 CD73의 효소 활성을 억제하는 항체가 추가적으로 임의로는 내재화에 대한 의존없이 가용성 CD73 폴리펩티드를 더 억제할 수 있다는 것이 또한 보고되었다 (PCT 공개 번호 WO2016/055609 참조). 다른 작용제는 핵산 (예를 들어, RNA) 기반의 CD73 발현 억제제를 포함할 수 있다.

[0158] CD73의 효소 활성을 억제한다고 보고된 항체 작용제의 예는 PCT 공개 번호 WO2016/055609; WO2016/131950; WO2017/064043; WO2017/100670; WO2016/075099; 및 WO2016/081748에 개시되어 있고, 이들 개시 내용은 참조로 본 명세서에 편입된다. CD73의 효소 활성을 억제한다고 보고된 소형 분자 유기 화합물의 예는 PCT 공개 번호 WO2015/049447 및 WO2015/164573 (푸린 유도체), WO2018094148, WO2017/120508, WO2017/153952 및 WO2017/098421에 개시되어 있고, 이들 개시 내용은 참조로 본 명세서에 편입된다.

[0159] 항체는 바람직하게는 종양 세포를 포함하는, 세포의 표면에서 발현되는 CD73CD73에 존재하는 에피토프에 결합하고, CD73 효소 (예를 들어, 세포 표면에 발현된 막-결합 CD73 단백질)의 효소 (엑토-5' 뉴클레오티다제) 활성을 억제한다. 일 실시형태에서, 이들 항체는 순수한 CD73 차단 항체로서 사용될 수 있고, 예를 들어, 그들은 Fcɣ 수용체와의 실질적인 결합없이/없거나 CD73-발현 세포에 대한 실질적인 ADCC 유도없이 세포의 표면에 발현된 막-결합 CD73 단백질의 효소 활성을 억제한다. 임의로는, 항체는 Fc 도메인을 보유하고 인간 FcRn과의 결합을 보유한다. 임의로는 항체는 예를 들어 (예를 들어, 종양 환경에서 MMP와 같은 프로테아제에 대한) 프로테아제 감도를 감소시키고/시키거나 인간 Fcɣ 수용체 (예를 들어, CD16)와의 결합을 감소시키도록 변형된 Fc 도메인을 포함한다.

[0160] 임의로는, 항체는 바람직한 기간 동안, 예를 들어 1주, 2주, 1개월, 항-CD73 항체의 다음 연속 투여까지, CD73의 효소 활성을 억제하는데 유효한 양으로 투여된다.

[0161] 항-CD73 항체의 예는 PCT 공개 번호 WO2017/064043; WO2017/100670; WO2016/075099; 및 WO2016/081748에 제공

된다.

[0162] 일례에서, 본 개시에 따라 사용되는 항-CD73 항체는 세포-표면 발현 CD73의 세포내 내재화, 또는 보다 일반적으로 하향-조절을 야기 또는 유도시켜 CD73의 효소 활성을 중화시킨다. 항체 BMS-986179 (PCT 공개 번호 WO2016/081748)은 이러한 항체의 일례이고, 이 항체는 CD73 상의 입체형태적 에피토프에 결합하여 기능하는데, 여기에서 항체는 인간 CD73 (SEQ ID NO: 1 참조)의 절편 65-83 및 157-172 내 아미노산 잔기를 포함하는 부위에 결합한다.

[0163] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 기질이 결합되지 않았을 때 "개방형" 입체형태뿐만 아니라 기질 (예를 들어, AMP와 같은 천연 기질 또는 AMP 유사체 아데노신 5'-(α,β-메틸렌)디포스페이트 (APCP)와 같은 활성 부위에 결합하는 억제제 또는 다른 화합물)이 결합되었을 때 "폐쇄형" 입체형태의 CD73 상에 존재하는 CD73의 에피토프에 결합될 수 있다. 일 양상에서, 항-CD73 항체는 CD73 폴리펩티드와의 결합을 위해 CD73의 기질과 경쟁하지 않는다. CD73의 기질 예는 예를 들어 천연 기질 예컨대 AMP 또는 활성 부위에 결합하는 억제제 또는 다른 화합물 예컨대 AMP 유사체 아데노신 5'-(α,β-메틸렌)디포스페이트 (APCP)를 포함한다.

[0164] 일 실시형태에서, 이들 항체는 가용성 재조합 CD73 단백질로서 CD73의 효소 활성을 억제하지 않으며, 예를 들어 이 항체는 항체가 그들이 올리고머를 형성할 수 없는 상황/입체형태일 때, 예를 들어 그들이 CD73 폴리펩티드 이량체에 대해 실질적인 몰 과량 (예를 들어, 적어도 10-배, 20-배, 100-배 등)으로 제공될 때 가용성 인간 이량체 CD73 폴리펩티드의 효소 활성을 억제할 수 없다. 예를 들어, CD73의 세포내 내재화를 야기시켜 CD73을 억제하는 항체 (예를 들어, BMS-986179) 또는 막-결합 CD73은 억제하지만 반드시 가용성 CD73을 억제하는 것은 아니도록 설계된 항체 (예를 들어, 올레쿨맙 및/또는 인간화 1E9 항체)는 항체가 그들이 올리고머를 형성할 수 없는 상황/입체형태일 때 가용성 인간 이량체 CD73 폴리펩티드의 효소 활성을 억제하지 못 할 수도 있다. 잔류 CD73 효소 활성이 면역억제 효과를 매개하기에 충분한 아데노신 발생을 야기시킬 수 있기 때문에, 치료적 효과를 매개하기 위해서 높은 수준의 항체-매개 효소 차단이 유리하다. sCD39를 억제하는 항체들과의 병용물을 이용하는 본 명세서의 치료 방법 및 조성물은 이러한 항체들의 활성을 증강시키는데 특히 유용할 수 있다.

[0165] 일 실시형태에서, 항-CD73 항체는 MEDI9447 (올레클루맙; PCT 공개 번호 WO2016/075099 참조)이거나, 또는 CD73 상의 공통 결정부 또는 에피토프 부위를 공유하는 항체이다. 일 실시형태에서, 치료적 항-CD73 항체는 BMS-986179 (PCT 공개 번호 WO2016/081748 참조)이거나, 또는 CD73 상의 공통 결정부 또는 에피토프 부위를 공유하는 항체이다. 일 실시형태에서, 치료적 항-CD73 항체는 인간화 1E9 (PCT 공개 번호 WO2017/100670 참조)이거나, 또는 CD73 상의 공통 결정부 또는 에피토프 부위를 공유하는 항체이다.

[0166] 일례에서, 본 개시에 따라 사용되는 항-CD73 항체는 세포-표면 발현 CD73의 세포내 내재화 또는 보다 일반적으로 하향-조절을 야기시키지 않고/않거나, 그들 CD73-중화 활성에 의존하지 않는다. 이러한 항체의 예는 PCT 공개 번호 WO2016/075099 (예를 들어, 항체 MEDI9447, 올레클루맙), WO2016/055609 (예를 들어, 항체 11E1, 6E1, 3C12 및 8C7) 및 WO2016/131950에 기술되어 있다. 올레클루맙은 아미노산 절편 158-171 및 206-211 내 잔기, 예를 들어 잔기 V170 K206 및 N211 (SEQ ID NO: 1 참조)에서 CD73에 결합한다. 항체 11E1, 6E1, 3C12 및 8C7은 잔기 K136 (SEQ ID NO: 1의 CD73 폴리펩티드 참조)에 치환을 갖는 CD73 돌연변이체에 대한 결합을 상실한다. 항체 11E1, 6E1, 3C12 및 8C7은 또한 잔기 A99, E129, K133, E134 및 A135 (SEQ ID NO: 1의 CD73 폴리펩티드 참조)에 치환을 갖는 돌연변이체를 비롯하여, 잔기 K97, E125, Q153 및 K330 (SEQ ID NO: 1의 CD73 폴리펩티드 참조)에 치환을 갖는 돌연변이체에 대한 결합을 상실한다.

[0167] 본 개시에 따라 사용되는 항-CD73 항체는 임의로는 가용성 재조합 CD73 단백질로서 CD73의 효소 활성을 억제할 수 있다 (예를 들어, 항체는 항체가 그들이 올리고머를 형성할 수 없는 상황/입체형태로 존재할 때, 예를 들어, 그들이 CD73 폴리펩티드 이량체에 대해서 실질적인 몰 과량(예를 들어, 적어도 10-배, 20-배, 100-배 등)으로 제공될 때, 가용성 인간 이량체 CD73 폴리펩티드의 효소 활성을 억제할 수 있음). 항체 11E1, 6E1, 3C12 및 8C7은 이러한 항체의 예이다. 이러한 CD73을 확인하기 위해 사용될 수 있는 가용성 CD73을 사용하는 어세이가 PCT 공개 번호 WO2016/055609 및 WO2016/131950에 제공된다. sCD39를 억제하는 항체와의 조합물로 사용될 때, 이러한 항체들은 최고 정도의 아데노신 발생 억제 및/또는 면역억제를 제공할 수 있다.

[0168] 따라서, 항체는 CD73 폴리펩티드의 알로스테릭 억제제일 수 있으며, 예를 들어 항체는 제한없이 종양 세포를 포함하여, 세포의 표면에서 발현된 인간 CD73 폴리펩티드에 결합하고, CD73 폴리펩티드에 결합하는 CD73 폴리펩티드의 기질의 능력을 방해하지 않으면서, 효소 (엑토-5' 뉴클레오티다제) 활성 CD73 폴리펩티드를 억제한다.

[0169] CD73이 CD73 이량체로서 존재할 때 동일한 면 상에 존재하는 CD73 상의 에피토프에 결합하고, 예를 들어 잠재적

으로 항체가 특히 결합 부위가 공간적으로 더 떨어진 "폐쇄형" 위치에서, 하나의 CD73 이량체에 대해 2가적으로 결합하도록 허용하는 것인 예시적인 항체가 본 명세서에서 기술된다. 리간드-결합된 CD73과의 결합을 고려하여, 본 명세서에 개시된 항체는 예를 들어, 상류 ADP 및/또는 AMP가 치료 이전에 유의한 수준으로 존재하는 종양 환경에서, AMP에 결합될 때 CD73과의 결합에 유용할 수 있다. 종양 미세환경은 임의의 적절한 매개변수, 예를 들어 높은 수준의 AMP를 산출하기 위해 기질 및 세포 침윤물 (예를 들어, Treg 세포) 상의 CD39에 의해 흡수되는 높은 수준의 ADP (예를 들어, 사멸되는 세포에 의해 발생)를 비롯하여, 보다 일반적으로 AMP, 아데노신, CD39 발현 또는 CD39-발현 세포의 존재 또는 수준, CD73 발현 또는 CD73-발현 세포의 존재 또는 수준, 아데노신 수용체 발현 또는 아데노신-수용체 발현 세포의 존재 또는 수준을 특징으로 할 수 있다. 따라서, 종양 환경 내 CD73 분자는 기질-결합된 입체형태로 존재할 수 있고 기질 미결합된 CD73 이외에도 기질-결합된 CD73 (예를 들어, AMP와 같은 기질과 사전인큐베이션된 CD73 발현 세포)에 결합하고 억제하는 능력은 생체내에서 CD73을 억제하는 더 큰 능력을 제공할 수 있다. 임의로는, ADP 또는 AMP (및/또는 ATP 또는 아데노신)의 수준은 치료 전에 종양 환경에서 평가될 수 있다. 항체는 종양 샘플에서 유의한 수준 (예를 들어, 기준과 비교하여 높은 수준)의 ADP, AMP, ATP 또는 아데노신을 갖는 개체에서 치료를 위해 특정한 장점을 가질 수 있다.

[0170] 예시적인 항체는 세포 표면에서 발현되는 인간 CD73 폴리펩티드에 결합할 수 있고 CD73 폴리펩티드의 효소 (엑토-5' 뉴클레오티다제) 활성을 억제하며, 여기서 항체는 단일 CD73 폴리펩티드 이량체 (가용성 CD73 폴리펩티드 이량체 또는 세포에 의해 발현되는 CD73 폴리펩티드 이량체)에 2가적으로 결합할 수 있다. 임의로는, 항체는 이량체 내 제1 CD73 폴리펩티드에 제1 항원 결합 도메인에 의해 결합되고 제2 CD73 폴리펩티드에 제2 항원 결합 도메인에 의해 결합된다.

[0171] 예시적인 항체는 세포 표면에서 발현되는 인간 CD73 폴리펩티드에 결합할 수 있고 CD73 폴리펩티드의 효소 (엑토-5' 뉴클레오티다제) 활성을 억제하며, 여기서 항체는 기질-결합된 입체형태의 CD73 폴리펩티드에 결합할 수 있다.

[0172] 작용제 (예를 들어, CD73-결합 화합물, 항-CD73 항체)는 CD73의 효소 활성을 억제하는 이의 능력, 특히 CD73의 5'-뉴클레오티다제 활성을 차단하고 CD73-발현 세포에 의한 아데노신의 생성을 감소시키고, 이어서 림프구의 활성을 복원하고/하거나 림프구의 아데노신-매개 억제를 경감시키는 능력에 대해 평가되고 선택될 수 있다.

[0173] CD73의 효소 활성을 억제하는 항체의 능력은 (이량체로서) 재조합 가용성 인간 CD73 및 AMP를 사용하는 세포-무함유 어세이에서 시험될 수 있으며, 여기서 AMP의 아데노신으로의 전환 (및/또는 이의 억제)은 (예를 들어, 기질 및 생성물, 즉 AMP, 아데노신 및/또는 포스페이트의 측정에 의해) 직접적으로, 또는 간접적으로 검출된다.

일례에서, AMP 및/또는 아데노신은 재조합 CD73과 시험 화합물의 인큐베이션 이전 및 이후에 HPLC를 통해 검출된다. 재조합 CD73은 예를 들어, WO2016/055609 및 WO2016/131950에 기술된다.

[0174] 항체의 억제 활성은 또한 임의의 많은 다른 방식으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 간접 어세이에서, 루시퍼라제-기반 시약 (예를 들어, Promega에서 입수가능한 CellTiter-Glo® 시스템)을 사용하여 AMP의 소멸을 검출한다. 어세이에서 루시퍼라제 반응은 AMP에 의해 억제된다. 반응에 CD73 효소의 첨가는 AMP를 분해시키고, 억제를 경감시켜서, 검출가능한 신호를 생성한다.

[0175] 가용성 CD73을 사용하는 어세이는 유리하게 항체가 CD73 폴리펩티드 이량체에 대해 실질적인 몰 과량 (예를 들어, 10-배, 20-배, 50-배, 100-배 등)으로 제공되는 조건에서의 시험을 포함할 수 있다. 효소에 대해 몰 과량으로 제공될 때, 항-CD73 항체는 더 이상 항체 및 CD73 이량체의 다량체 복합체를 형성할 수 없게 될 것이고, 그러면 CD73의 효소 활성 억제를 보유하는 항체가 선택될 수 있다.

[0176] CD73의 5'-엑토뉴클레오티다제 효소 활성을 억제하는 항체의 능력은 대안적으로 또는 추가로 또한 세포 어세이 (CD73을 발현하는 세포 사용)에서 시험될 수도 있다. 유리하게, 항체는 CD73의 내재화를 야기시켜 CD73을 억제하는 항체를 선택할 가능성을 감소시키기 위해 효소의 활성을 차단하는 항체를 확인하도록 세포-무함유 어세이에서 먼저 시험 또는 스크리닝될 수 있고, 그 다음으로 정제된 항체로서 세포 어세이에서 시험될 수 있다.

세포 어세이는 WO2016/055609에 표시된 대로 수행될 수 있다. 예를 들어, CD73-발현 세포주 (예를 들어, MDA-MB-231 세포주)를 항-CD73 항체의 존재 하에서 편평-바닥 96웰 플레이트에 플레이팅하고 인큐베이션시킨다.

AMP를 세포에 첨가하고 (CD73 하향-조절을 피하기 위해) 4℃에서 인큐베이션시킨다. 그 다음으로 플레이트를 원심분리하고 상청액을 편평 바닥 96웰 배양 플레이트로 옮긴다. 그 다음으로 AMP의 아데노신으로의 가수분해에 의해 생성된 유리 포스페이트를 정량한다. 항체의 존재 하에서 AMP의 아데노신으로의 가수분해 감소는 항체가 세포 CD73을 억제한다는 것을 의미한다.

[0177] 일 실시형태에서, 항체 조제물은 CD73 폴리펩티드의 효소 활성에서 적어도 50% 감소, 바람직하게는 CD73 폴리펩티드 (예를 들어, 가용성 동종이량체 CD73 폴리펩티드; 세포에 의해 발현된 CD73)의 효소 활성에서 적어도 60%, 70% 또는 80% 감소를 야기시킨다.

[0178] 항체의 활성은 또한 림프구의 활성을 조절하는 이의 능력, 예를 들어 림프구 활성의 아데노신-매개 억제를 경감시키는 능력, 또는 림프구 활성의 활성화를 야기시키는 능력에 대해 간접 어세이에서 측정될 수 있다. 이것은 예를 들어 사이토카인-방출 어세이를 사용하여 처리될 수 있다. 다른 예에서, 항체는 림프구의 증식을 조절하는 이의 능력에 대해 간접 어세이에서 평가될 수 있다.

[0179] 항체는 CD73의 하향-조절을 유도하거나 또는 내재화시키는 이의 능력, 예를 들어 세포 표면으로부터 CD73 발산의 유도에 의해서인지 또는 내재화에 의한 것인지에 대해 시험될 수 있다. 항-CD73 항체가 포유동물 세포 상의 CD73에 결합시 내재화되는지 여부, 또는 CD73 폴리펩티드가 (예를 들어, 항체에 의한 결합시) 세포내 내재화를 겪는지 여부는 예를 들어 WO2016/055609에 기술된 것들을 포함한 다양한 어세이를 통해 결정될 수 있고, 이의 개시 내용은 참조로 본 명세서에 편입된다.

[0180] 일례에서, 항체는 항체가 그들이 올리고머를 형성할 수 없는 상황/입체형태일 때, 예를 들어 그들이 CD73 폴리펩티드 이량체에 대해 실질적인 몰 과량 (예를 들어, 적어도 10-배, 20-배, 100-배 등)으로 제공될 때 가용성 인간 이량체 CD73 폴리펩티드의 효소 활성을 억제하는 능력에 대해 선택될 수 있다. 올리고머화를 야기시켜 기능하는 항체는 항체가 CD73 폴리펩티드 이량체에 대해 실질적인 몰 과량으로 제공될 때 CD73 억제를 실패한다. 뿐만 아니라 항체는 CD73이 세포 표면에서 발현될 때 유지되는 CD73 상의 에피토프에 결합한다.

이러한 어세이의 사용을 통해서, 항체는 또한 단일 CD73 이량체에 2가적으로 결합하는 것이 확인될 수 있으며, 이러한 항체는 시험관내 및 생체내 CD73-발현 세포에서 개선된 CD73-결합 및 CD73 차단 활성을 가질 수 있다. 그 다음으로 이들 방법을 통해 확인된 항체는 정제된 항체를 사용하는 세포 효소 활성 어세이에서 시험되었고, 세포 CD73의 효소 활성을 중화시키는 것으로 확인되었다. 내재화를 유도시켜 CD73을 억제하거나 또는 세포 CD73에 대한 유의한 결합을 상실한 항체는 덜 강력하였고 효소 활성을 중화시킬 수 없어서, 겨우 세포에서 CD73의 효소 활성의 단지 부분 억제만을 제공한다.

[0181] 이들 항체에 의해 결합되는 CD73 상의 에피토프는 다양한 세포, 예를 들어 암 세포, CD4 T 세포, CD8 T 세포, B 세포, 형질감염된 세포에 의해 발현되는 CD73 폴리펩티드 상에 존재하고, 유세포측정법으로 결정시 높은 친화성으로 결합한다. 예를 들어, 항체는 그들 표면에 CD73 폴리펩티드를 발현하는 세포와의 결합에 대해서, 유세포측정법으로 결정시, 본 명세서에 기술된 항-CD73 항체 (예를 들어, 항체 6E1)와 비슷하거나, 또는 2-log 이하, 임의로는 1-log 이하로 크거나, 또는 5 μg/mL 이하, 임의로는 2 μg/mL 이하, 1 μg/mL 이하, 0.5 μg/mL 이하, 0.1 μg/mL 이하 또는 0.05 μg/mL 이하인, EC_{50} 을 특징으로 할 수 있다. 일 실시형태에서 세포는 그들 표면에서 CD73을 발현하도록 만들어진 세포이다. 일 실시형태에서 세포는 그들 표면에서 CD73을 내생적으로 발현하는 세포, 예를 들어, 암 세포, 백혈병 세포, 방광암 세포, 신경교종 세포, 교아세포종 세포, 난소암 세포, 흑색종 세포, 전립선암 세포, 갑상선암 세포, 식도암 세포 또는 유방암 세포이다.

[0182] 일 실시형태에서, CD73 중화 항체는 적어도 60%, 75% 또는 80% 까지 세포 CD73의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성의 감소를 야기시킬 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다. 일 실시형태에서, CD73-중화 항체는 세포에 의해 발현되는 CD73의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성의 억제에 대해서 본 명세서에 기술된 항체와 비슷하거나 또는 그 이하이거나, 본 명세서에 기술된 항-CD73 항체 (예를 들어, 항체 6E1) 보다 2-log 이하, 임의로는 1-log 이하로 크거나, 또는 1 μg/mL 이하, 임의로는 0.5 μg/mL 이하, 임의로는 0.2 μg/mL 이하인 EC_{50} 을 특징으로 할 수 있다.

[0183] 임의로는, 세포에 의해 발현되는 CD73의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성은 AMP의 아데노신으로의 가수분해를 정량하여 MDA-MB-231 세포에서 5' 엑토뉴클레오티다제 활성의 중화를 평가함으로써 결정된다 (예를 들어, WO2016/055609의 실시예 5 참조).

[0184] 본 명세서에 개시된 중화 항체에 의해 결합되는 CD73 상의 에피토프는 2가 방식으로 CD73에 결합하는 전체 길이 항체가 사용될 때를 포함하여, 세포 상에서 CD73 발현의 하향 조절을 일으키지 않는다 (그리고, 예를 들어, 항체-CD73 복합체의 클러스터링 및 내재화를 야기하지 않음). 따라서 항-CD73 항체는 세포 표면에서 CD73과 함께, 결합된 채로 남아있는다. CD73의 광범위한 조직 발현을 고려하여, CD73 하향 조절 및/또는 내재화를 촉발시키지 않는 항체는 종양 미세환경에서 더 많은 양의 항체 및 개선된 약리학적 성질을 제공할 수 있다.

[0185] 일 실시형태에서, 인간 CD73 (예를 들어, SEQ ID NO: 1이 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드)에 특이적으로 결합하고 용액 중에서 동종이량체 인간 CD73 폴리펩티드의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성을 중화시키는 단리된 항

체를 제공한다. 일 실시형태에서, 가용성 인간 CD73 폴리펩티드의 효소 활성에 결합하고 억제하는 항체, 특히 AMP의 아데노신으로의 CD73-매개 이화작용을 중화시키는 항체를 제공한다. 일 실시형태에서, 항체는 2가 방식으로 CD73에 결합한다. 일 실시형태에서, 항체는 비-고갈성 항체 예를 들어 Fc 침묵 항체이다. 일 실시형태에서, 항체는 CD73 폴리펩티드 : 항-CD73 항체 올리고머의 유도에 의존하지 않고 용액 중에서 CD73을 중화시킨다.

[0186] 일 실시형태에서, 항체는 세포의 표면에서 인간 CD73에 특이적으로 결합하고 가용성 인간 CD73 폴리펩티드의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성을 중화시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 항체는 가용성 CD73의 올리고머화를 유도하지 않는다.

[0187] 일 실시형태에서, 항체는 세포의 표면에서 인간 CD73에 특이적으로 결합하고 세포 CD73 (세포에 의해 발현되는 CD73)의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성을 중화시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 항체는 세포의 표면에서 인간 CD73의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성에 특이적으로 결합하고 중화시키고, CD73에 결합 시 CD73-발현 세포로 내재화되지 않는다. 항체는 CD73의 다량체화 및 후속 내재화를 야기시키지 않는다. 일 실시형태에서, 항체는 용액 중에서 재조합 인간 CD73 폴리펩티드의 효소 활성에 결합하고 억제할 수 있으며, 여기서 상기 항체는 CD73-발현 세포로 내재화되지 않는다. 일 실시형태에서, 비내재화 항체는 2가 방식으로 CD73CD73에 결합한다. 일 실시형태에서, 항체는 비고갈성 항체, 예를 들어 Fc 침묵 항체이다. 항체는 게다가 CD73 폴리펩티드 항-CD73 항체의 올리고머의 유도에 의존하지 않고, 용액 중에서 이량체 인간 CD73 폴리펩티드의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성을 중화시킬 수 있다.

[0188] 일 실시형태에서, 항체는 인간 CD73 폴리펩티드에 특이적으로 2가적으로 결합하고 세포 인간 CD73 (및 임의로는 추가로 재조합 가용성 인간 CD73)의 효소 활성을 억제하며, 여기서 상기 항체는 CD73-발현 세포로 내재화되지 않는다. 바람직하게, 항체는 실질적으로 (예를 들어, 이의 Fc 도메인을 통한) Fcɣ 수용체 결합이 결여된다.

[0189] 일 실시형태에서, 항체는 인간 CD73 폴리펩티드에 특이적으로 결합하고 세포 인간 CD73 (및 임의로는 추가로 재조합 가용성 인간 CD73)의 효소 활성을 억제하며, 여기서 상기 항체는 CD73-발현 세포에서 CD73의 세포내 내재화를 증가시키거나 또는 유도시킨다. 바람직하게, 항체는 실질적으로 (예를 들어, 이의 Fc 도메인을 통한) Fcɣ 수용체 결합이 결여된다.

[0190] 일 양상에서, 항체는 AMP와 사전 인큐베이션된 세포의 표면에서 인간 CD73에 특이적으로 결합하고, 이의 5'-엑토뉴클레오티다제 활성을 중화시킬 수 있다. 임의로는, 5'-엑토뉴클레오티다제 활성의 중화는 AMP의 아데노신으로의 가수분해를 정량하여 MDA-MB-231 세포에서 5' 엑토뉴클레오티다제 활성의 중화를 평가하여 결정된다 (예를 들어, WO2016/055609의 실시예 5 참조).

[0191] 임의로는, 항-CD73 항체는 가용성 CD73 및 세포 표면에 발현된 CD73 둘 모두 상에 존재하는 공통 항원 결정부에 결합할 수 있다.

[0192] 임의로는, 항-CD73 항체는 "개방형" 입체형태 (CD73 활성 부위가 기질, 예를 들어 AMP, APCP에 의해 점유/결합되지 않은 경우)일 때 CD73 및 "폐쇄형" 입체 형태 (CD73 활성 부위가 기질 예를 들어 AMP, APCP에 의해 점유/결합된 경우)일 때 "폐쇄형" CD73 상에 존재하는 공통 항원 결정부에 결합한다.

[0193] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 CD73 이량체 내 각각의 CD73 폴리펩티드 내 항원 결정부에 결합하고, 예를 들어, 여기서 항원 결정부는 CD73 이량체의 공통 면 상에 존재한다.

[0194] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 절편 158-171 내 잔기 및/또는 절편 206-211 내 잔기에 아미노산 치환을 갖는 CD73 폴리펩티드, 예를 들어 어느 하나 이상의 잔기 V170 K206 및 N211 (SEQ ID NO: 1 참조)에 아미노산 치환을 갖는 CD73 폴리펩티드에 대해 감소된 결합을 갖는다.

[0195] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 절편 65-83 내 잔기 및/또는 절편 157-172 내 잔기 (SEQ ID NO: 1 참조)에 아미노산 치환을 갖는 CD73 폴리펩티드에 대해 감소된 결합을 갖는다.

[0196] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 잔기 K136 (SEQ ID NO: 1 참조)을 포함하는 CD73 상의 에피토프에 결합한다.

[0197] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 K97, E125, Q153 및 K330 (SEQ ID NO: 1 참조)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1개, 2개, 3개 또는 4개를 포함하는 CD73 상의 에피토프에 결합한다.

[0198] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 A99, E129, K133, E134, 및 A135 (SEQ ID NO: 1 참조)로 이루어진 군으로부터 선

택되는 잔기 중 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개를 포함하는 CD73 상의 에피토프에 결합한다.

[0199] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 아미노산 잔기 K97, A99, E125, E129, K133, E134, A135, K136, Q153 및 K330 (SEQ ID NO: 1 참조)을 포함하는 인간 CD73 단백질 (예를 들어, CD73 동종이량체 단백질) 상의 아미노산 잔기의 절편 또는 도메인 내에서 적어도 부분적으로 결합한다. 일 양상에서, 항-CD73 항체는 K97, A99, E125, E129, K133, E134, A135, K136, Q153 및 K330 (SEQ ID NO: 1 참조)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 또는 그 이상을 포함하는 CD73 상의 에피토프에 결합한다.

[0200] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 잔기 K136 (SEQ ID NO: 1 참조)에 돌연변이를 갖는 CD73 폴리펩티드에 대해 감소된 결합을 가지고; 임의로는, 돌연변이체 CD73 폴리펩티드는 돌연변이: K136A를 갖는다.

[0201] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 K97, E125, Q153 및 K330 (SEQ ID NO: 1 참조)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기에 돌연변이를 갖는 CD73 폴리펩티드에 대해 감소된 결합을 가지며; 임의로는, 돌연변이체 CD73 폴리펩티드는 돌연변이: K97A, E125A, Q153A 및/또는 K330A (예를 들어, K97A, E125A 및 K330A; K97A, E125A 및/또는 Q153A)를 갖는다.

[0202] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 A99, E129, K133, E134, 및 A135 (SEQ ID NO: 1 참조)로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기에 돌연변이를 갖는 CD73 폴리펩티드에 대해 감소된 결합을 가지며; 임의로는, 돌연변이체 CD73 폴리펩티드는 돌연변이: A99S, E129A, K133A, E134N, 및 A135S를 갖는다.

[0203] 일 양상에서, 항-CD73 항체는 올레클루맙, 인간화 1E9, BMS-986179, 11E1, 8C7, 3C12 및/또는 6E1에 의해 결합되는 CD73 상의 에피토프와의 결합에 대해 경쟁한다 (예를 들어, 상기 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 갖는 항체와 CD73 폴리펩티드 상의 에피토프와의 결합에 대해 경쟁함).

[0204] 본 명세서의 임의의 실시형태의 일 양상에서, 항원-결합 화합물은 단일클론 항체 11E1, 8C7, 3C12 및/또는 6E1과 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 CD73 폴리펩티드 상의 에피토프와의 결합에 대해 경쟁한다 (예를 들어, 11E1, 8C7, 3C12 또는 6E1 중 어느 하나의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 갖는 항체와 CD73 폴리펩티드와의 결합에 대해 경쟁함). 일 실시형태에서, 항원-결합 화합물은

[0205] (a) 각각 SEQ ID NO: 3 및 4의 VH 및 VL 영역을 갖는 항체 (6E1);

[0206] (b) 각각 SEQ ID NO: 40 및 41의 VH 및 VL 영역을 갖는 항체 (11E1);

[0207] (c) 각각 SEQ ID NO: 42 및 43의 VH 및 VL 영역을 갖는 항체 (8C7); 및

[0208] (d) 각각 SEQ ID NO: 44 및 45의 VH 및 VL 영역을 갖는 항체 (3C12)

[0209] 로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체와 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 CD73 폴리펩티드 상의 에피토프와의 결합에 대해 경쟁한다.

[0210] 일 실시형태에서, 항-CD73 항체는 11E1, 6E1, 3C12 또는 8C7에 의해 결합되는 CD73 상의 아미노산 잔기로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개, 2개 또는 3개 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 결합한다.

[0211] 본 명세서의 임의의 실시형태의 일 양상에서, 항체는 올레클루맙, 인간화 1E9, BMS-986179, 11E1, 6E1, 3C12 및 8C7로 이루어진 항체의 군으로부터 선택되는 항체의 개별 중쇄 및/또는 경쇄의 1개, 2개 또는 3개 CDR을 갖는 중쇄 및/또는 경쇄를 가질 수 있다.

[0212] 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 항-CD73 항체는 세포 (예를 들어, 종양 세포, CD73을 발현하도록 만들어진 세포, 예를 들어 MDA-MB-231 종양 세포주, 또는 WO2016/055609에 표시된 바와 같이, CD73을 발현하도록 만들어진 재조합 숙주 세포)의 표면에서 발현된 인간 CD73 폴리펩티드에 결합하는 것을 특징으로 할 수 있고, 임의로는 추가로 항체는 유세포측정으로 결정된 높은 친화성으로 결합한다. 예를 들어, 항체는 그들 표면에 CD73 폴리펩티드를 발현하는 세포, 예를 들어 CD73을 발현하는 종양 세포, 그들 표면에 CD73 폴리펩티드를 발현하는 세포, CD73CD73을 발현하는 림프구 등과의 결합에 대해서, 5 μg/mL 이하, 임의로는 1 μg/mL 이하, 0.5 μg/mL 이하, 0.1 μg/mL 이하 또는 0.05 μg/mL 이하의 유세포측정으로 결정된 시험관내 EC_{50} 을 특징으로 할 수 있다.

임의로는, 항원-결합 화합물은 (i) 그들 표면에 인간 CD73 (예를 들어, SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드)을 발현하는 세포 및/또는 (ii) 그들 표면에 인간 인간이외의 영장류 CD73 (예를 들어, 사이노몰거스 원숭이 CD73)을 발현하는 세포와의 결합에 대해서 1 μg/mL 이하, 임의로는 0.5 μg/mL 이하, 0.1 μg/mL 이하, 또는 0.05 μg/mL 이하의 시험관내 EC_{50} 을 갖는다.

[0213] 본 명세서의 임의의 실시형태의 일 양상에서, 항-CD73 항체는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 사량체 항체이고, 중쇄는 인간 이소타입의 Fc 영역을 포함하고 실질적으로 인간 Fcɣ 수용체 (예를 들어, CD16A, CD16B, CD32A, CD32B 및/또는 CD64)와의 결합이 결여된다. 일 양상에서, 항- CD73 항체는 (동일한 이소타입의 야생형 Fc 도메인과 비교하여) Fc 도메인 및 인간 CD16A, CD16B, CD32A, CD32B 및/또는 CD64 폴리펩티드 간 결합을 감소시키도록 변형된 Fc 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 항체는 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 243, 264, 268, 297, 298, 299, 309, 310, 318, 320, 322, 327, 330 및 331 (카밧 EU 번호매김)로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 어느 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상에서 중쇄 불변 영역에 아미노산 치환을 포함한다. 일 실시형태에서, 항체는 234, 235, 237, 322, 330 및 331로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 어느 3개, 4개, 5개 또는 그 이상에서 중쇄 불변 영역에 아미노산 치환을 갖는다. 일 실시형태에서, 항체는 SEQ ID NO: 59-62 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다.

[0214] 항체 11E1, 6E1, 3C12 및 8C7의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 표 A에 열거된다. 특정한 실시형태에서, 본 개시는 단일클론 항체 11E1, 6E1, 3C12 또는 8C7과 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 에피토프 또는 결정부에 결합하는 항체를 제공하고; 임의로는 항체는 항체 11E1, 6E1, 3C12 또는 8C7의 초가변 영역을 포함한다. 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 항체 11E1은 아미노산 서열 및/또는 이를 코딩하는 핵산 서열을 특징으로 할 수 있다. 일 실시형태에서, 단일클론 항체는 11E1, 6E1, 3C12 또는 8C7의 Fab 또는 $F(ab')_2$ 부분을 포함한다. 또한 11E1, 6E1, 3C12 또는 8C7의 중쇄 가변 영역을 포함하는 단일클론 항체를 제공한다. 일 실시형태에 따라서, 단일클론 항체는 11E1, 6E1, 3C12 또는 8C7의 중쇄 가변 영역의 3개 CDR (예를 들어, 카밧, 초티아 또는 IGMT 번호매김에 따름)을 포함한다. 또한 11E1, 6E1, 3C12 또는 8C7의 가변 경쇄 가변 영역 또는 11E1, 6E1, 3C12 또는 8C7의 경쇄 가변 영역의 CDR 중 1개, 2개 또는 3개 (예를 들어, 카밧, 초티아 또는 IGMT 번호매김에 따름)를 더 포함하는 단일클론 항체를 제공한다. 임의로는 상기 경쇄 또는 중쇄 CDR의 어느 하나 이상은 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 또는 그 이상의 아미노산 변형 (예를 들어, 치환, 삽입 또는 결실)을 함유할 수 있다. 임의로는, 항체 11E1, 6E1, 3C12 또는 8C7의 항원 결합 영역의 일부 또는 전부를 포함하는 임의의 경쇄 및/또는 중쇄 가변 영역이 인간 IgG 유형, 임의로는 인간 불변 영역, 임의로는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 이소타입의 면역글로불린 불변 영역에 융합된 항체가 제공된다. 일 실시형태에서, 인간 불변 영역은 임의로는 이펙터 기능 (인간 Fcɣ 수용체와의 결합)을 감소시키기 위해 아미노산 치환을 더 포함한다. 일 실시형태에서, 인간 불변 영역 (임의로는 힌지 영역)은 임의로는 CD73의 세포내 내재화를 증가 또는 유도시키기 위해 아미노산 치환을 더 포함한다.

[0215] 항-CD73 항체는 예를 들어 아미노산 서열: SYNMY (SEQ ID NO: 46), 또는 이의 적어도 4개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 6E1의 HCDR1; 아미노산 서열: YIDPYNGGSSYNQKFKG (SEQ ID NO: 47), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 6E1의 HCDR2; 아미노산 서열: GYNNYKAWFAY (SEQ ID NO: 48), 또는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 6E1의 HCDR3; 아미노산 서열: KASQSVTNDVA (SEQ ID NO: 49), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 6E1의 LCDR1; 아미노산 서열: YASNRYT (SEQ ID NO: 50) 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 6E1의 LCDR2; 및/또는 아미노산 서열: QQDYSSLT (SEQ ID NO: 51), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7 또는 8개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로는 하나 이상의 이들 아미노산은 결실될 수 있거나 또는 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 6E1의 LCDR3을 포함할 수 있다. CDR 위치는 카밧 번호매김에 따를 수 있다.

[0216] 본 명세서의 임의의 실시형태의 다른 양상에서, 중쇄 및 경쇄의 임의의 CDR 1, 2 및/또는 3은 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 인접한 아미노산의 서열, 및/또는 상응하는 SEQ ID NO로 열거된 특정한 CDR 또는 CDR 세트와 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 서열 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0217] 임의의 항체, 예를 들어, 11E1, 8C7, 3C12 또는 6E1에서, 명시된 가변 영역 및 CDR 서열은 서열 변형, 예를 들어 치환 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이상의 서열 변형)을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 중쇄 및 경쇄의 CDR 1, 2 및/또는 3은 1, 2, 3 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 여기서 치환된 잔기는 인간 기원의 서열에 존재하는 잔기이다. 일 실시형태에서 치환은 보존적 변형이다. 보존적 서열 변형은 아미

노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특징에 유의하게 영향을 미치지 않거나 또는 변경시키지 않는 아미노산 변형을 의미한다. 이러한 보존적 변형는 아미노산 치환, 첨가 및 결실을 포함한다. 변형은 당분야에 공지된 표준 기술, 예컨대 부위-지정 돌연변이유발법 및 PCR-매개 돌연변이유발법을 통해 항체에 도입될 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 전형적으로 아미노산 잔기가 유사한 물리화학적 성질을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환되는 것이다. 명시된 가변 영역 및 CDR 서열은 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 치환을 만드는 경우에, 바람직한 치환은 보존적 변형일 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리가 당분야에서 정의되어 있다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다.

따라서, 항체의 CDR 영역 내 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기로 치환될 수 있고 변경된 항체는 본 명세서에 기술된 어세이를 사용하여 보유된 기능 (즉, 본 명세서에 기재된 성질)에 대해 시험될 수 있다.

[0218] 항체의 가변 영역의 서열은 하기 표 A에 열거된다 (리더 서열이 존재하면 임의 항체 사슬은 리더 서열의 종결부 바로 직후 아미노산 위치에서 출발한다고 명시될 수 있음). 본 명세서의 임의의 실시형태에서, VL 또는 VH 서열은 신호 펩티드 또는 이의 임의 부분을 함유하거나 또는 결여시키기 위해 명시되거나 또는 번호매겨질 수 있다. 표 A에 표시된 VH 및 VL 서열을 갖는 항체의 HCDR1, 2, 3 및 LCDR1, 2, 3은 임의로는 모두 (또는 각각, 독립적으로) 카밧 번호매김 체계의 것, 초티아 번호매김 체계의 것, IMGT 번호매김 체계의 것, 또는 임의의 다른 적합한 번호매김 체계의 것으로 명시될 수 있다.

[0219] **표 A**

	SEQ ID NO:	항-CD73 항체의 아미노산 서열
6E1 VH	3	EFQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKRLEWIG YIDPYNGGSSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNNLTSEDSAVYYCAR GYNNYKAWFAYWGQGTLVTVSA
6E1 VL	4	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIY YASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTMQAEDLAVYFCQQDYSSLTFG AGTKLELK
11E1 VH	40	EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSLEWIG YIDPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAR GYGNYKAWFAYWGQGTLVTVSA
11E1 VL	41	DAVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIY YASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFG AGTKLELK
8C7 VH	42	EVQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFASYNMNWVKQSHGKSLDWIG YIDPYNGGSSYNLTFKGKATLTVDKSSTTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAR GYGNYKAWFAYWGQGTLVTVSAASTKGP
8C7 VL	43	SIVMTPTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIY YASTRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFG AGTKLELKRTVAAP
3C12 VH	44	QIQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFASYNMNWVKQSHGKSLDWIG

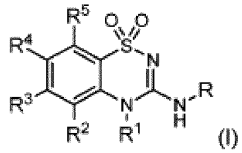
[0220]

		YIDPYNGGSSYNLTFKGKATLTVDKSSTTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAR GYGNYKAWFAYWGQGTLVTVSAASTKGP
3C12 VL	45	DVVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIY YASTRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFG AGTKLELKRTVAAP

[0221]

[0222] 일 실시형태에서, 항체는 암을 갖는 개체에게 종양 미세환경에서 CD73의 활성을 억제하기 위해 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 일 실시형태에서, 항체는 종양 미세환경에서 아데노신의 발생 및/또는 농도를 감소시키기 위해 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 일 실시형태에서, 항체는 종양 미세환경에서 ATP의 발생 및/또는 농도를 증가시키기 위해 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 일 실시형태에서, 항체는 종양 세포에 의해 발현된 CD73의 활성을 중화시키기 위해 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 일 실시형태에서, 항체는 CD4 T 세포, CD8 T 세포 및/또는 B 세포에 의해 발현된 CD73의 활성을 중화시키기 위해 충분한 양 및 빈도로 투여된다.

[0223] 일 실시형태에서 CD73의 소형 분자 억제제는 CD73의 이량체화 계면에 결합하고 비경쟁적 억제제로서 작용한다. 다른 실시형태에서, CD73의 소형 분자 억제제는 CD73의 기질 (ADP) 결합 부위에 결합된다. 일 실시형태에서, 억제제는 푸린 유도체 모이어티를 포함한다. 일 실시형태에서, 억제제는 하기 화학식 (I)의 WO2017/098421에 따른 모이어티, 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다:

[0224] 
(I)

[0225] 상기 식에서 R은

[0226] 아릴,

[0227] 아릴로서

[0228] 플루오로,

[0229] 클로로,

[0230] 브로모,

[0231] 요오도,

[0232] C_{1-6}알킬,

[0233] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-NH_2$-N(H)C_{1-4}알킬, -N(C_{1-4}알킬)$_2$ 및 -CN로 부터 독립적으로 선택된, 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0234] 시클로알킬,

[0235] C_{1-4}알콕시,

[0236] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0237] -CN,

[0238] 옥소,

[0239] -OH,

[0240] -O아릴,

[0241] -C(O)OC(CH_3)$_3$,

[0242] -COOH,

[0243] -C_{1-4}알킬OC_{1-4}알킬,

[0244] -NO_2,

[0245] -NH_2,

[0246] -N(H)C_{1-4}알킬,

[0247] -N(C_{1-4}알킬)$_2$,

[0248] -C_{1-4}알킬NHBoc,

[0249] -N(H)아릴,

[0250] -N(H)C(O)아릴,

[0251] -N(H)OC(O)C_{1-4}알킬,

[0252] -N(H)C(O)C_{1-4}알킬,

[0253] -N(H)S(O)$_2$$C_{1-4}$알킬,

[0254] -N(H)S(O)$_2$아릴,

[0255] -N(H)S(O)$_2$시클로알킬,

[0256] -N(H)S(O)$_2$$CH_2$아릴, 및

[0257] -SO_2NH_2

[0258] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 아릴,

[0259] 헤테로아릴,

[0260] 헤테로아릴로서

[0261] 플루오로,

[0262] 클로로,

[0263] 브로모,

[0264] 요오도,

[0265] C_{1-6}알킬,

[0266] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, -NH_2, -N(H)C_{1-4}알킬, -N(C_{1-4}알킬)$_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬

[0267] 시클로알킬,

[0268] C_{1-4}알콕시,

[0269] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0270] -CN,

[0271] 옥소,

[0272] -OH,

[0273] -O아릴,

[0274] -C(O)OC(CH_3)$_3$,

[0275] -COOH,

[0276] -C_{1-4}알킬OC_{1-4}알킬,

[0277] -NO_2,

[0278] -NH_2,

[0279] -N(H)C_{1-4}알킬,

[0280] -N(C_{1-4}알킬)$_2$,

[0281] -C_{1-4}알킬NHBoc,

[0282] -N(H)아릴,

[0283] -N(H)C(O)아릴,

[0284] -N(H)OC(O)C_{1-4}알킬,

[0285] -N(H)C(O)C_{1-4}알킬,

[0286] -N(H)S(O)$_2$$C_{1-4}$알킬,

[0287] -N(H)S(O)$_2$아릴,

[0288] -N(H)S(O)$_2$시클로알킬,

[0289] -N(H)S(O)$_2$$CH_2$아릴, 및

[0290] SO_2NH_2

[0291] 로 부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 헤테로아릴,

[0292] 바이시클로헤테로아릴,

[0293] 바이시클로헤테로아릴로서,

[0294] 플루오로,

[0295] 클로로,

[0296] 브로모,

[0297] 요오도,

[0298] C_{1-6}알킬,

[0299] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, -NH_2, -N(H)C_{1-4}알킬, -N(C_{1-4}알킬)$_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환되는 것인 C_{1-6}알킬,

[0300] 시클로알킬,

[0301] C_{1-4}알콕시,

[0302] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 C_{1-4}알콕시,

[0303] -CN,

[0304] 옥소,

[0305] -OH,

[0306] -O아릴,

[0307] $-C(O)OC(CH_3)_3$,

[0308] -COOH,

[0309] $-C_{1-4}$알킬OC_{1-4}알킬,

[0310] $-NO_2$,

[0311] $-NH_2$,

[0312] $-N(H)C_{1-4}$알킬,

[0313] $-N(C_{1-4}$알킬$)_2$,

[0314] $-C_{1-4}$알킬NHBoc,

[0315] -N(H)아릴,

[0316] -N(H)C(O)아릴,

[0317] $-N(H)OC(O)C_{1-4}$알킬,

[0318] $-N(H)C(O)C_{1-4}$알킬,

[0319] $-N(H)S(O)_2C_{1-4}$알킬,

[0320] $-N(H)S(O)_2$아릴,

[0321] $-N(H)S(O)_2$시클로알킬,

[0322] $-N(H)S(O)_2CH_2$아릴, 및

[0323] SO_2NH_2

[0324] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 바이시클로헤테로아릴,

[0325] 시클로알킬, 및

[0326] 시클로알킬로서,

[0327] 플루오로,

[0328] 클로로,

[0329] 브로모,

[0330] 요오도,

[0331] C_{1-6}알킬,

[0332] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-NH_2$, $-N(H)C_{1-4}$알킬, $-N(C_{1-4}$알킬$)_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 C_{1-6}알킬,

[0333] 시클로알킬,

[0334] C_{1-4}알콕시,

[0335] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0336] -CN,

[0337] 옥소,

[0338] -OH,

[0339] -O아릴,

[0340] $-C(O)OC(CH_3)_3$,

[0341] -COOH,

[0342] $-C_{1-4}$알킬OC_{1-4}알킬,

[0343] $-NO_2$,

[0344] $-NH_2$,

[0345] $-N(H)C_{1-4}$알킬,

[0346] $-N(C_{1-4}$알킬$)_2$,

[0347] $-C_{1-4}$알킬NHBoc,

[0348] -N(H)아릴,

[0349] -N(H)C(O)아릴,

[0350] $-N(H)OC(O)C_{1-4}$알킬,

[0351] $-N(H)C(O)C_{1-4}$알킬,

[0352] $-N(H)S(O)_2C_{1-4}$알킬,

[0353] $-N(H)S(O)_2$아릴,

[0354] $-N(H)S(O)_2$시클로알킬,

[0355] $-N(H)S(O)_2CH_2$아릴, 및

[0356] SO_2NH_2

[0357] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 시클로알킬

[0358] 로부터 선택되고;

[0359] R^1 은

[0360] 수소,

[0361] C_{1-4}알킬, 및

[0362] C_{1-4}알킬로서, 플루오로, 클로로, -OH, 및 $-NH_2$로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬

[0363] 로부터 선택되고;

[0364] R^2 는

[0365] 수소,

[0366] 플루오로,

[0367] 클로로,

[0368] 브로모,

[0369] 요오도,

[0370] -OH,

[0371] -CN,

[0372] C_{1-6}알킬,

[0373] C_{1-4}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C_{1-4}알킬, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-CF_3$, $-C_{1-4}$알킬OC_{1-4}알킬, $-NO_2$, $-NH_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬,

[0374] C_{1-4}알킬옥시,

[0375] C_{1-4}알킬옥시로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬옥시, 및

[0376] $-OC(O)C_{1-4}$알킬

[0377] 로부터 선택되고;

[0378] R^3 은

[0379] 수소,

[0380] 플루오로,

[0381] 클로로,

[0382] 브로모,

[0383] 요오도,

[0384] -OH,

[0385] -CN,

[0386] C_{1-6}알킬,

[0387] C_{1-4}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C_{1-4}알킬, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-CF_3$, $-C_{1-4}$알킬OC_{1-4}알킬, $-NO_2$, $-NH_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬,

[0388] C_{1-4}알킬옥시,

[0389] C_{1-4}알킬옥시로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬옥시, 및

[0390] $-OC(O)C_{1-4}$알킬

[0391] 로부터 선택되고;

[0392] R^4 는

[0393] 수소,

[0394] 플루오로,

[0395] 클로로,

[0396] 브로모,

[0397] 요오도,

[0398] -OH,

[0399] -CN,

[0400] C_{1-6}알킬,

[0401] C_{1-4}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C_{1-4}알킬, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-CF_3$, $-C_{1-4}$알킬OC_{1-4}알킬, $-NO_2$, $-NH_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬,

[0402] C_{1-4}알킬옥시,

[0403] C_{1-4}알킬옥시로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬옥시, 및

[0404] $-OC(O)C_{1-4}$알킬

[0405] 로부터 선택되고;

[0406] R^5 는

[0407] 수소,

[0408] 플루오로,

[0409] 클로로,

[0410] 브로모,

[0411] 요오도,

[0412] -OH,

[0413] -CN,

[0414] C_{1-6}알킬,

[0415] C_{1-4}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, C_{1-4}알킬, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, -CF3, $-C_{1-4}$알킬OC_{1-4}알킬, $-NO_2$, $-NH_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬,

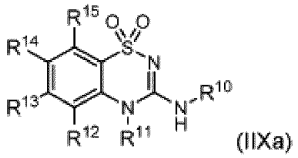
[0416] C_{1-4}알킬옥시,

[0417] C_{1-4}알킬옥시로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬옥시, 및

[0418] $-OC(O)C_{1-4}$알킬

[0419] 로부터 선택된다.

[0420] 임의로는, 상기 화학식 (I)의 화합물은 하기 화학식 (IIXa) 및 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 표시된다:

[0421] 
(IIXa)

[0422] 상기 식에서,

[0423] R^{10} 은

[0424] 아릴,

[0425] 아릴로서,

[0426] 플루오로,

[0427] 클로로,

[0428] 브로모,

[0429] 요오도,

[0430] C_{1-6}알킬,

[0431] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-NH_2$, $-N(H)C_{1-4}$알킬, $-N(C_{1-4}$알킬$)_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0432] 시클로알킬,

[0433] C_{1-4}알콕시,

[0434] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0435] -CN,

[0436] 옥소,

[0437] -OH,

[0438] -O아릴,

[0439] $-C(O)OC(CH_3)_3$,

[0440] -COOH,

[0441] $-C_{1-4}$알킬OC_{1-4}알킬,

[0442] $-NO_2$,

[0443] $-NH_2$,

[0444] $-N(H)C_{1-4}$알킬,

[0445] $-N(C_{1-4}$알킬$)_2$,

[0446] $-C_{1-4}$알킬NHBoc,

[0447] -N(H)아릴,

[0448] -N(H)C(O)아릴,

[0449] -N(H)OC(O)C_{1-4}알킬,

[0450] -N(H)C(O)C_{1-4}알킬,

[0451] -N(H)S(O)$_2$$C_{1-4}$알킬,

[0452] -N(H)S(O)$_2$아릴,

[0453] -N(H)S(O)$_2$시클로알킬,

[0454] -N(H)S(O)$_2$$CH_2$아릴, 및

[0455] SO_2NH_2

[0456] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 아릴:

[0457] 헤테로아릴,

[0458] 헤테로아릴로서,

[0459] 플루오로,

[0460] 클로로,

[0461] 브로모,

[0462] C_{1-6}알킬,

[0463] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-NH_2$, -N(H)C_{1-4}알킬, -N(C_{1-4}알킬)$_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0464] 시클로알킬,

[0465] C_{1-4}알콕시,

[0466] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0467] 옥소,

[0468] -OH,

[0469] -COOH,

[0470] $-O_2$,

[0471] $-NH_2$,

[0472] -N(H)C_{1-4}알킬, 및

[0473] -N(C_{1-4}알킬)$_2$

[0474] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 헤테로아릴;

[0475] 바이시클로헤테로아릴,

[0476] 바이시클로헤테로아릴로서,

[0477] 플루오로,

[0478] 클로로,

[0479] 브로모,

[0480] C_{1-6}알킬,

[0481] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-NH_2$, -N(H)C_{1-4}알킬, -N(C_{1-4}알킬)$_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0482] 시클로알킬,

[0483] C_{1-4}알콕시,

[0484] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0485] 옥소,

[0486] -OH,

[0487] -COOH,

[0488] $-NO_2$,

[0489] $-NH_2$,

[0490] -N(H)C_{1-4}알킬, 및

[0491] -N(C_{1-4}알킬)$_2$

[0492] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 바이시클로헤테로아릴,

[0493] 시클로알킬, 및

[0494] 시클로알킬로서,

[0495] 플루오로,

[0496] 클로로,

[0497] 브로모,

[0498] C_{1-6}알킬,

[0499] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-NH_2$, -N(H) C_{1-4}알킬, -N(C_{1-4}알킬)$_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0500] 시클로알킬,

[0501] C_{1-4}알콕시,

[0502] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0503] 옥소,

[0504] -OH,

[0505] -COOH,

[0506] $-NO_2$,

[0507] $-NH_2$,

[0508] -N(H) C_{1-4}알킬, 및

[0509] $-N(C_{1-4}\text{알킬})_2$

[0510] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 시클로알킬

[0511] 로부터 선택되고;

[0512] R^{11} 은

[0513] 수소, 및

[0514] C_{1-4}알킬

[0515] 로부터 선택되고;

[0516] R^{12} 는

[0517] 수소,

[0518] 플루오로,

[0519] 클로로,

[0520] 브로모,

[0521] 요오도,

[0522] -OH,

[0523] C_{1-6}알킬,

[0524] C_{1-4}알킬로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬,

[0525] C_{1-4}알킬옥시,

[0526] C_{1-4}알킬옥시로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬옥시, 및

[0527] $-OC(O)C_{1-4}$알킬

[0528] 로부터 선택되고;

[0529] R^{13} 은

[0530] 수소,

[0531] 플루오로,

[0532] 클로로,

[0533] 브로모,

[0534] 요오도,

[0535] -OH,

[0536] C_{1-6}알킬,

[0537] C_{1-4}알킬로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로부터 선택된 것인 C_{1-4}알킬,

[0538] C_{1-4}알킬옥시,

[0539] C_{1-4}알킬옥시로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-}

$_4$알킬옥시, 및

[0540] -OC(O)C_{1-4}알킬

[0541] 로부터 선택되고;

[0542] R^{14} 는

[0543] 수소,

[0544] 플루오로,

[0545] 클로로,

[0546] 브로모,

[0547] 요오도,

[0548] -OH,

[0549] -CN,

[0550] C_{1-6}알킬,

[0551] C_{1-4}알킬로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬,

[0552] C_{1-4}알킬옥시,

[0553] C_{1-4}알킬옥시로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로부터 치환된 것인 C_{1-4}알킬옥시, 및

[0554] -OC(O)C_{1-4}알킬

[0555] 로부터 선택되고;

[0556] R^{15} 는

[0557] 수소,

[0558] 플루오로,

[0559] 클로로,

[0560] 브로모,

[0561] 요오도,

[0562] -OH,

[0563] -CN,

[0564] C_{1-6}알킬,

[0565] C_{1-4}알킬로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 것인 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬,

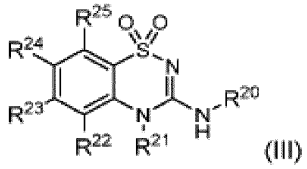
[0566] C_{1-4}알킬옥시,

[0567] C_{1-4}알킬옥시로서, 플루오로, 클로로 및 브로모로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알킬옥시, 및

[0568] -OC(O)C_{1-4}알킬

[0569] 로부터 선택된다.

[0570] 임의로는, 화합물은 하기 화학식 (III)로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 표시된다:

[0571] 

(III)

[0572] 상기 식에서,

[0573] R^{20} 은

[0574] 페닐,

[0575] 페닐로서,

[0576] 플루오로,

[0577] 클로로,

[0578] 브로모,

[0579] 요오도,

[0580] C_{1-6}알킬,

[0581] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-NH_2$, $-N(H)C_{1-4}$알킬, $-N(C_{1-4}$알킬$)_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0582] 시클로알킬,

[0583] C_{1-4}알콕시,

[0584] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0585] -CN,

[0586] 옥소,

[0587] -OH,

[0588] -O아릴,

[0589] $-C(O)OC(CH_3)_3$,

[0590] -COOH,

[0591] $-C_{1-4}$알킬OC_{1-4}알킬,

[0592] $-NO_2$,

[0593] $-NH_2$,

[0594] $-N(H)C_{1-4}$알킬,

[0595] $-N(C_{1-4}$알킬$)_2$,

[0596] $-C_{1-4}$알킬NHBoc,

[0597] -N(H)아릴,

[0598] -N(H)C(O)아릴,

[0599] -N(H)OC(O)C_{1-4}알킬,

[0600] -N(H)C(O)C_{1-4}알킬,

[0601] -N(H)S(O)$_2$$C_{1-4}$알킬,

[0602] -N(H)S(O)$_2$아릴,

[0603] -N(H)S(O)$_2$시클로알킬,

[0604] -N(H)S(O)$_2$$CH_2$아릴, 및

[0605] SO_2NH_2

[0606] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 페닐,

[0607] 헤테로아릴,

[0608] 헤테로아릴로서,

[0609] 플루오로,

[0610] 클로로,

[0611] 브로모,

[0612] C_{1-6}알킬,

[0613] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-NH_2$, -N(H)CH_3, -N$(CH_3)_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0614] C_{1-4}알콕시,

[0615] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0616] 옥소,

[0617] -OH,

[0618] $-NH_2$,

[0619] -N(H)CH_3, 및

[0620] -N$(CH_3)_2$

[0621] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 헤테로아릴,

[0622] 바이시클로헤테로아릴, 및

[0623] 바이시클로헤테로아릴로서,

[0624] 플루오로,

[0625] 클로로,

[0626] 브로모,

[0627] C_{1-6}알킬,

[0628] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, -NH2, $-N(H)CH_3$, $-N(CH_3)_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0629] C_{1-4}알콕시,

[0630] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0631] 옥소,

[0632] -OH,

[0633] $-NH_2$,

[0634] $-N(H)CH_3$, 및

[0635] $-N(CH_3)_2$

[0636] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 바이시클로헤테로아릴

[0637] 로부터 선택되고;

[0638] R^{21} 은

[0639] 수소, 및

[0640] C_{1-4}알킬

[0641] 로부터 선택되고;

[0642] R^{22} 는

[0643] 수소,

[0644] 플루오로,

[0645] 클로로,

[0646] 브로모,

[0647] -OH,

[0648] -CN,

[0649] C_{1-4}알킬,

[0650] C_{1-4}알킬옥시, 및

[0651] $-OC(O)C_{1-4}$알킬

[0652] 로부터 선택되고;

[0653] R^{23} 은

[0654] 수소, 플루오로,

[0655] 클로로,

[0656] 브로모,

[0657] -OH,

[0658] -CN,

[0659] C_{1-4}알킬,

[0660] C_{1-4}알킬옥시, 및

[0661] -OC(O)C_{1-4}알킬

[0662] 로부터 선택되고;

[0663] R^{24} 는

[0664] 수소, 플루오로,

[0665] 클로로,

[0666] 브로모,

[0667] -OH,

[0668] -CN,

[0669] C_{1-4}알킬,

[0670] C_{1-4}알킬옥시, 및

[0671] -OC(O)C_{1-4}알킬

[0672] 로부터 선택되고;

[0673] R^{25} 는

[0674] 수소, 플루오로,

[0675] 클로로,

[0676] 브로모,

[0677] -OH,

[0678] -CN,

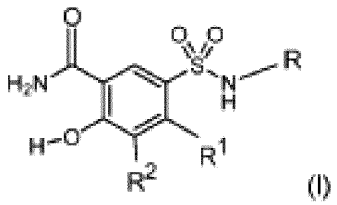
[0679] C_{1-4}알킬,

[0680] C_{1-4}알킬옥시, 및

[0681] -OC(O)C_{1-4}알킬

[0682] 로부터 선택된다.

[0683] 일 실시형태에서, CD73 억제제는 PCT 공개 번호 WO2017/153952의 개시에 따른 소형 분자 유기 화합물, 예를 들어 하기 화학식 (I)에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다:

[0684] 

(I)

[0685] 상기 식에서,

[0686] R은

[0687] 아릴,

[0688] 아릴로서,

[0689] 플루오로,

[0690] 클로로,

[0691] 브로모,

[0692] 요오도,

[0693] C_{1-6}알킬,

[0694] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, C_{1-4}알킬옥시, -OH, -COOH, $-NR^{310}R^{320}$, $-N(H)C_{1-4}$알킬, $-N(C_{1-4}$알킬$)_2$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 9개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0695] 시클로알킬,

[0696] 헤테로아릴,

[0697] C_{1-6}알콕시,

[0698] C_{1-6}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH, 페닐 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 9개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알콕시,

[0699] -CN,

[0700] 옥소,

[0701] -OH,

[0702] -O시클로알킬,

[0703] -O페닐,

[0704] $-C(O)OC(CH_3)_3$,

[0705] -COOH,

[0706] $-C_{1-4}$알킬OC_{1-4}알킬,

[0707] $-NO_2$,

[0708] $-NH_2$,

[0709] $-N(H)C_{1-4}$알킬,

[0710] $-N(H)C_{1-4}$알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH, 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 9개 치환기로 치환된 것인 $-N(H)C_{1-4}$알킬,

[0711] $-N(C_{1-4}$알킬$)_2$,

[0712] $-C_{1-4}$알킬NHBoc,

[0713] -N(H)아릴,

[0714] -N(H)C(O)아릴,

[0715] $-N(H)OC(O)C_{1-4}$알킬,

[0716] $-N(H)C(O)C_{1-4}$알킬,

[0717] $-N(H)S(O)_2C_{1-4}$알킬,

[0718] -N(H)S(O)$_2$시클로알킬,

[0719] -N(H)S(O)$_2$페닐,

[0720] -SC$_{1-6}$알킬,

[0721] -SC$_{1-6}$알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH, 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 9개 치환기로 치환된 것인 SC$_{1-6}$알킬,

[0722] -SO$_2$NH$_2$

[0723] 로부터 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 아릴,

[0724] 헤테로아릴,

[0725] 헤테로아릴로서,

[0726] 플루오로,

[0727] 클로로,

[0728] 브로모,

[0729] 요오도,

[0730] C$_{1-6}$알킬,

[0731] C$_{1-6}$알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, -OH, -NR^{310}R^{320}, 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 9개 치환기로 치환된 것인 C$_{1-6}$알킬,

[0732] 아릴,

[0733] C$_{1-4}$알콕시,

[0734] -CN,

[0735] 옥소,

[0736] -OH,

[0737] -COOH,

[0738] -NO$_2$,

[0739] -IMH$_2$, 및

[0740] SO$_2$NH$_2$

[0741] 로부터 독립적으로 선택된 것인 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 헤테로아릴,

[0742] 바이시클로헤테로아릴,

[0743] 바이시클로헤테로아릴로서,

[0744] 플루오로,

[0745] 클로로,

[0746] 브로모,

[0747] 요오도,

[0748] C$_{1-6}$알킬,

[0749] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, -OH, -COOH, $-NR^{310}R^{320}$, 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 9개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0750] $-C(O)OC_{1-6}$알킬,

[0751] 시클로알킬,

[0752] 아릴,

[0753] C_{1-4}알콕시,

[0754] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0755] -CN,

[0756] 옥소,

[0757] -OH,

[0758] -O페닐,

[0759] -COOH,

[0760] $-NO_2$,

[0761] $-NH_2$,

[0762] $-N(H)C_{1-4}$알킬,

[0763] $-N(C_{1-4}알킬)_2$,

[0764] -N(H)아릴, 및

[0765] -N(H)C(O)아릴

[0766] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 바이시클로헤테로아릴

[0767] 로부터 선택되고;

[0768] R^1 및 R^2 는

[0769] 수소,

[0770] C_{1-6}알킬,

[0771] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 옥소, -OH, 및 $-NH_2$로 부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0772] 플루오로,

[0773] 클로로,

[0774] 브로모,

[0775] 요오도,

[0776] $-N(H)C_{1-6}$알킬,

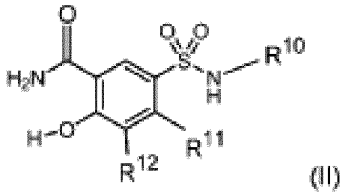
[0777] $-N(H)C_{1-6}$알킬로서, 플루오로, 클로로, 옥소, -OH, $-NH_2$, 페닐, 치환된 페닐, 헤테로아릴, 및 치환된 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택된 1 내지 9개 치환기로 치환된 것인 $-N(H)C_{1-6}$알킬

[0778] 로부터 독립적으로 선택되고;

[0779] 여기서,

[0780] R^{310} 및 R^{320} 은 수소 및 C_1-C_4알킬로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 R^{310} 및 R^{320} 은 그들이 부착되는 질소와 함께, 산소 및 질소로부터 선택되는 하나 이하의 다른 이종원자를 함유하는 5원 내지 6원 복소환 고리를 형성한다.

[0781] 임의로는, 상기 화학식 (I)은 하기 화학식 (II) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 나타낸다:

[0782] 
(II)

[0783] 상기 식에서,

[0784] R^{10} 은

[0785] 아릴,

[0786] 아릴로서,

[0787] 플루오로,

[0788] 클로로,

[0789] 브로모,

[0790] C_{1-6}알킬,

[0791] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, C1-4알킬옥시, -OH, -COOH, 및 $-NR^{311}R^{321}$ 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0792] 시클로알킬,

[0793] 헤테로아릴,

[0794] C_{1-6}알콕시,

[0795] C_{1-6}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH, 페닐 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알콕시,

[0796] -CN,

[0797] 옥소,

[0798] -OH,

[0799] -O시클로알킬,

[0800] -O페닐,

[0801] -COOH,

[0802] $-NO_2$,

[0803] $-NH_2$,

[0804] -N(H)C_{1-4}알킬,

[0805] -N(H)C_{1-4}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH, 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 N(H)C_{1-4}알킬,

[0806] -N(C_{1-4}알킬)$_2$,

[0807] -N(H)아릴,

[0808] -N(H)C(O)아릴,

[0809] -N(H)OC(O)C_{1-4}알킬,

[0810] -N(H)C(O)C_{1-4}알킬,

[0811] -N(H)S(O)$_2$$C_{1-4}$알킬,

[0812] -N(H)S(O)$_2$시클로알킬,

[0813] -N(H)S(O)$_2$페닐,

[0814] -SC_{1-6}알킬,

[0815] -SC_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH, 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 -SC_{1-6}알킬, 및

[0816] -SO_2NH_2

[0817] 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 아릴,

[0818] 헤테로아릴,

[0819] 헤테로아릴로서,

[0820] 플루오로,

[0821] 클로로,

[0822] 브로모,

[0823] 요오도,

[0824] C_{1-6}알킬,

[0825] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, -OH, -$NR^{311}R^{321}$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0826] 아릴,

[0827] C_{1-4}알콕시,

[0828] -CN,

[0829] 옥소,

[0830] -OH,

[0831] -COOH,

[0832] -NO_2,

[0833] -IMH_2, 및

[0834] SO_2NH_2

[0835] 로부터 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 헤테로아릴,

[0836] 바이시클로헤테로아릴,

[0837] 바이시클로헤테로아릴로서,

[0838] 플루오로,

[0839] 클로로,

[0840] 브로모,

[0841] 요오도,

[0842] C_{1-6}알킬,

[0843] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 옥소, -OH, -COOH, $-NR^{311}R^{321}$ 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0844] $-C(O)OC_{1-6}$알킬,

[0845] 시클로알킬,

[0846] 아릴,

[0847] C_{1-4}알콕시,

[0848] C_{1-4}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH 및 -CN으로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-4}알콕시,

[0849] -CN, 옥소, -OH, -O페닐, -COOH, $-NO_2$, $-IMH_2$, 및 $-N(H)C_{1-4}$알킬로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 바이시클로헤테로아릴

[0850] 로부터 선택되고;

[0851] R^{11} 및 R^{12} 는

[0852] 수소,

[0853] C_{1-6}알킬,

[0854] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 옥소, -OH, 및 $-NH_2$ 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0855] 플루오로,

[0856] 클로로,

[0857] 브로모,

[0858] 요오도,

[0859] $-N(H)C_{1-6}$알킬,

[0860] $-N(H)C_{1-6}$알킬로서, 플루오로, 클로로, 옥소, -OH, $-NH_2$, 페닐, 치환된 페닐, 헤테로아릴, 및 치환된 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 $-N(H)C_{1-6}$알킬

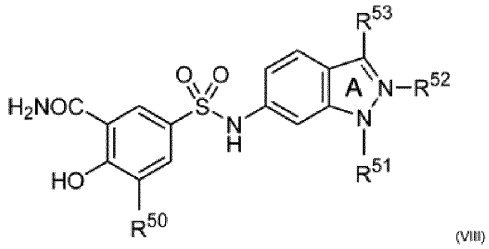
[0861] 로부터 독립적으로 선택되고;

[0862] 여기서,

[0863] R^{311} 및 R^{321} 은 수소 및 C_1-C_4알킬로부터 독립적으로 선택되고, R^{311} 및 R^{321} 은 그들이 부착된 질소와 함께, 산소

및 질소로부터 선택된 하나 이하의 다른 이종원자를 함유하는 5원 내지 6원 복소환 고리를 형성한다.

[0864] 임의로는, 화합물은 하기 화학식 (VIII) 및 이의 약학적으로 허용가능한 염으로 표시된다:

[0865] 

(VIII)

[0866] 상기 식에서,

[0867] A 고리는 점선으로 표시되는 선택적 이중 결합을 함유하고,

[0868] R^{50} 은

[0869] 수소,

[0870] C_{1-6}알킬,

[0871] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 클로로, 옥소, -OH, 및 $-NH_2$ 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0872] 플루오로,

[0873] 클로로,

[0874] 브로모,

[0875] 요오도, 및

[0876] $-N(H)C_{1-6}$알킬

[0877] 로부터 선택되고;

[0878] R^{51} 은

[0879] 수소,

[0880] 플루오로,

[0881] 클로로,

[0882] C_{1-6}알킬,

[0883] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 및 -OH로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0884] C_{1-6}알콕시,

[0885] C_{1-6}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH, -CN, 및 페닐로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알콕시,

[0886] -OH, 및

[0887] $-C(O)OC_{1-6}$알킬

[0888] 로부터 선택되고;

[0889] R^{52} 는 부재하거나 또는

[0890] 수소,

[0891] 플루오로,

[0892] 클로로,

[0893] C_{1-6}알킬,

[0894] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 및 -OH로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0895] C_{1-6}알콕시,

[0896] C_{1-6}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH, -CN, 및 페닐로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알콕시,

[0897] -OH, 및

[0898] $-C(O)OC_{1-6}$알킬

[0899] 로부터 선택되고;

[0900] R^{53} 은

[0901] 수소,

[0902] 플루오로,

[0903] 클로로,

[0904] C_{1-6}알킬,

[0905] C_{1-6}알킬로서, 플루오로, 및 -OH로부터 독립적으로 선택된 1 내지 5개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알킬,

[0906] C_{1-6}알콕시,

[0907] C_{1-6}알콕시로서, 플루오로, 클로로, 브로모, 옥소, -OH, -CN, 및 페닐로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개 치환기로 치환된 것인 C_{1-6}알콕시,

[0908] -OH, 및

[0909] $-C(O)OC_{1-6}$알킬

[0910] 로부터 선택되고;

[0911] 단 R^{52} 가 부재할 때, A 고리는 점선으로 표시되는 이중 결합을 함유하지 않는다.

[0912] CD73의 효소 활성을 억제하는 소형 분자 유기 작용제의 추가 예는 푸린-기반 작용제이다. 예를 들어, CD73의 효소 활성을 억제하는 작용제는 WO2015/164573의 화학식 I의 화합물일 수 있거나, 또는 예를 들어 하기 중 어느 하나일 수 있다:

[0913] (1-((5-(6-아미노-2-클로로-9H-푸린-9-일)-3,4-디히드록시테트라히드로퓨란-2-일)메톡시)-2-에톡시-2-옥소에틸)포스폰산;

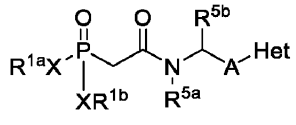
[0914] (1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-2-클로로-9H-푸린-9-일)-3,4-디히드록시테트라히드로퓨란-2-일)메톡시)-2-에톡시-2-옥소에틸)포스폰산; 또는

[0915] ((R)-1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-아미노-2-클로로-9H-푸린-9-일)-3,4-디히드록시테트라히드로퓨란-2-일)메톡시)-2-에톡시-2-옥소에틸)포스폰산;

[0916] 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[0917] 추가 예에서, CD73의 효소 활성을 억제하는 소형 분자 유기 작용제는 WO2018/094148의 화학식 I의 모이어티를

포함한다:

[0918]  (I)

[0919] 상기 식에서,

[0920] R^{1a} 및 R^{1b} 는 수소, 임의로 치환된 C_1-C_6 알킬, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 -C($R^{2a}R^{2b}$)-아릴, -C($R^{2a}R^{2b}$)-O-C(O)-OR^3, -C($R^{2a}R^{2b}$)-O-C(O)R^3, 및 -C(R^{2a} R^{2b})C(O)OR^3 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0921] 임의로는, R^{1a} 및 R^{1b} 기는 조합되어 5-원 내지 6-원 복소환 고리를 형성하고;

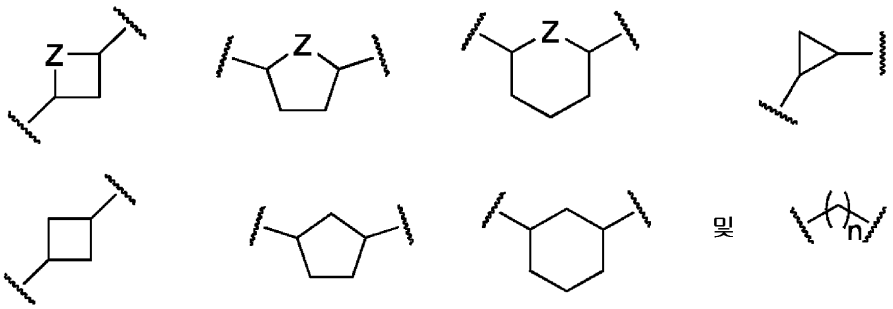
[0922] 각각의 R^{2a} 및 R^{2b} 는 H 및 임의로 치환된 C_1-C_6 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0923] 각각의 R^3 은 H, C_1-C_6 알킬, C_1-C_4 알콕시(C_1- C_4)알킬 및 임의로 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0924] R^{5a} 및 R^{5b} 는 H, 임의로 치환된 C_1-C_6 알킬, -C(O)OR^3, C_3-C_6 시클로알킬(C_1-C_6)알킬 아릴(C_1-C_6)알킬, C_3-C_6 시클로알킬 및 아릴로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0925] 각각의 X는 O, H, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0926] A는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:



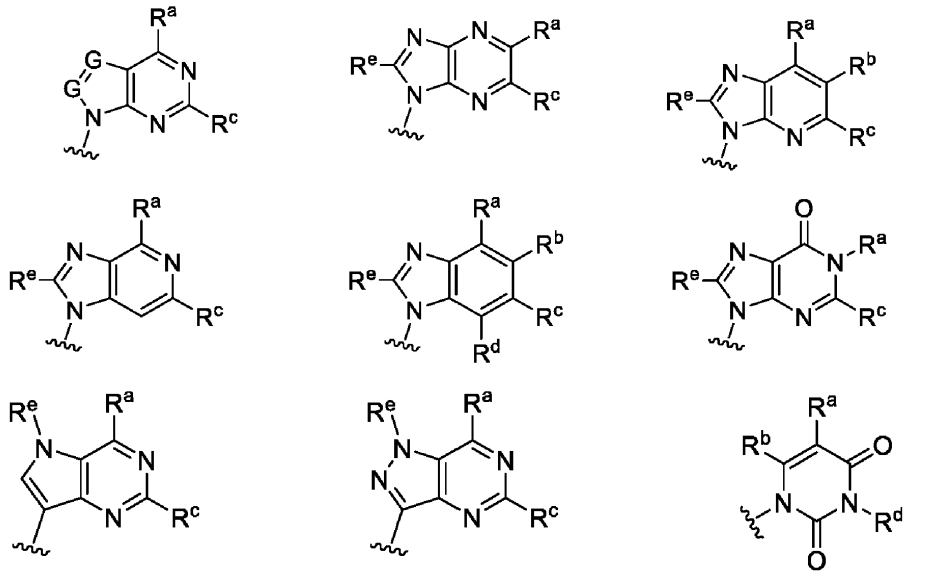
[0927]

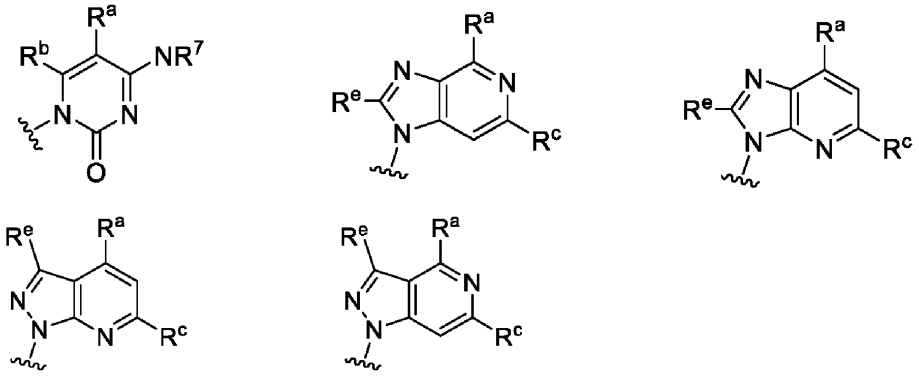
[0928] 이들 각각은 1 내지 5개의 R^6 치환기로 임의 치환되고, 첨자 n은 0 내지 3의 정수이고;

[0929] Z는 NH, NR^6, 및 O로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0930] 각각의 R^6 은 CH_3, OR^g, CN, F, 및 임의 치환된 C_1-C_6 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나; 또는 인접한 고리 정점 상의 2개 R^6 기는 임의로 함께 연결되어 고리 정점으로서 적어도 하나의 이종원자를 갖는 5원 내지 6원 고리를 형성하고;

[0931] Het는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0932] 

[0933] 

[0934] 여기서 물결선은 화합물의 나머지에 대한 부착점을 의미하고, 각각의 G는 존재할 경우에, N 및 CR^e 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고,

[0935] R^a 는 H, NH_2, NHR^{7a}, $NHC(O)R^{7a}$, $NR^{7a}R^{7b}$, R^{7a}, OH, $SR^{7a:}$ 및 OR^{7a}로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0936] R^b 는 H, 할로겐, NH_2, NHR^{7a}, $NR^{7a}R^{7b}$, R^{7a}, OH로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0937] R^c 및 R^d 는 H, 할로겐, 할로알킬, NH_2, NHR^{7a}, $NR^{7a}R^{7b}$, R^{7a}, OH, OR^{7a}, SR^{7a}, SO_2R^{7a}, $-X^1NH_2$, $-X^1NHR^{7a}$, $-X^1NR^{7a}R^{7b}$, $-X^1OH$, $-X^1OR^{7a}$, $-X^1SR^{7a}$ 및 $-X^1SO_2R^{7a}$ 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0938] 각각의 R^e 는 H, 할로겐, 및 임의로 치환된 C_1-C_6 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0939] 각각의 R^g 는 H 및 $-C(O)-C_1$-C_6 알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0940] 각각의 X^1 은 C_1-C_4알킬렌이고;

[0941] 각각의 R^{7a} 및 R^{7b} 는 임의로 치환된 C_1-C_{10} 알킬, 임의로 치환된 C_2-C_{10} 알케닐, 임의로 치환된 C_2-C_{10}알키닐, 임의로 치환된 C_3-C_7 시클로알킬, 임의로 치환된 C_3-C_7 시클로알킬C_1-C_4알킬, 임의로 치환된 4-7원 시클로헤테로알킬, 임의로 치환된 4-7원 시클로헤테로알킬C_1-C_4알킬, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 아릴C_1-C_4알킬, 임의

로 치환된 아릴C_2-C_4알케닐, 임의로 치환된 아릴C_2- C_4알키닐, 임의로 치환된 헤테로아릴, 임의로 치환된 헤테로아릴C_1-C_4알킬, 임의로 치환된 헤테로아릴C_1-C_4알케닐, 및 임의로 치환된 헤테로아릴C_2-C_4알키닐로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나; 또는 R^{7a} 및 R^{7b} 는 동일한 질소 원자에 부착될 때 임의로 함께 연결되어 임의로 아릴 고리에 융합된, 4-원 내지 7-원 복소환 고리를 형성한다.

[0942] *항체의 제조*

[0943] 항-CD73 및 항-CD39 항체는 당분야에 공지된 임의의 다양한 기술을 통해 제조될 수 있다. 전형적으로, 그들은 각각 CD73 또는 CD39 폴리펩티드를 포함하는 면역원으로 인간 이외의 동물, 예를 들어 마우스를 면역화하거나, 또는 CD73 또는 CD39 폴리펩티드로 후보 결합 도메인의 라이브러리를 스크리닝하여 제조된다. CD39 또는 CD73 폴리펩티드는 각각 인간 CD39 또는 CD73 폴리펩티드의 전체 길이 서열, 또는 이의 단편 또는 유도체, 전형적으로 면역원성 단편, 즉 CD39 또는 CD73 폴리펩티드를 발현하는 세포 표면 상에 노출된 에피토프를 포함하는 폴리펩티드의 일부분을 포함할 수 있다. 이러한 단편은 전형적으로 성숙한 폴리펩티드 서열의 적어도 약 7개의 연속적인 아미노산, 보다 더 바람직하게 이의 적어도 약 10개의 연속적인 아미노산을 함유한다. 전형적으로 단편은 수용체의 세포외 도메인으로부터 본질적으로 유래된다. 일 실시형태에서, 면역원은 전형적으로 세포 표면에서, 지질막에 야생형 인간 CD39 또는 CD73 폴리펩티드를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 면역원은 온전한 세포, 특히 온전한 인간 세포, 임의로는 처리 또는 용해된 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 폴리펩티드는 재조합 CD39 또는 CD73 폴리펩티드이다.

[0944] 인간이외의 동물을 항원으로 면역화하는 단계는 마우스에서 항체의 생산을 자극시키기 위해 당분야에 충분히 공지된 임의 방식으로 수행될 수 있다 (예를 들어, [E. Harlow and D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)]을 참조하고, 이의 전체 개시 내용을 참조로 본 명세서에 편입시킴). 면역원은 임의로는 보강제, 예컨대 완전 또는 불완전 프로인트 보강제와 함께, 완충액에 현탁 또는 용해된다. 면역원의 양, 완충액의 유형, 및 보강제의 양을 결정하기 위한 방법은 당업자에게 충분히 공지되어 있고 임의 방식으로 제한되지 않는다. 이들 매개변수는 상이한 면역원에 따라 상이할 수 있지만, 쉽게 설명된다.

[0945] 유사하게, 항체의 생산을 자극시키기 위해 충분한 면역화 위치 및 빈도가 역시 당분야에 충분히 공지되어 있다. 전형적인 면역화 프로토콜에서, 인간이외의 동물은 1일 및 다시 약 1주 후에 항원이 복강내로 주사된다. 이후에 임의로는 불완전 프로인트 보강제와 같은 보강제와 함께, 대략 20일에 항원의 리콜 주사가 후속된다. 리콜 주사는 정맥내로 수행되고 며칠 연속으로 반복될 수 있다. 이어서 전형적으로 보강제없이, 정맥내로 또는 복강내로, 40일에 부스터 주사가 후속된다. 이러한 프로토콜은 약 40일 이후에 항원 특이적 항체-생산 B 세포의 생성을 야기시킨다. 다른 프로토콜은 그들이 면역화에 사용되는 항원에 대해 유도된 항체를 발현시키는 B 세포의 생성을 야기시킨다면 역시 사용될 수 있다.

[0946] 단일클론 항체의 경우, 비장세포는 항체-생성 하이브리도마를 형성시키기 위해서 면역화된 인간이외 포유동물로부터 단리되고 이들 비장세포와 불멸화 세포를 후속 융합시킨다. 인간이외 포유동물로부터 비장세포의 단리는 당분야에 충분히 공지되어 있으며 전형적으로 마취시킨 인간이외 포유동물로부터 비장을 제거하는 단계, 이것을 작은 조각으로 절단하는 단계 및 단일 세포 현탁액을 생성시키기 위해서 비장 피막으로부터 비장세포를 세포 스트레이터의 나일론 메쉬를 통해서 적절한 완충액으로 압착시키는 단계를 포함한다. 세포를 세척하고, 원심분리시키고 임의의 적혈 세포를 용해시키는 완충액에 재현탁시킨다. 그 용액을 다시 원심분리시키고 펠렛에 남은 림프구를 최종적으로 신선한 완충액에 재현탁시킨다.

[0947] 단일 세포 현탁액으로 단리되어 존재하면, 림프구는 불멸 세포주에 융합시킬 수 있다. 이것은 전형적으로 마우스 골수종 세포주이지만, 하이브리도마를 생성시키는데 유용한 많은 다른 불멸 세포주가 당분야에 공지되어 있다. 쥐과 골수종 세포주는 제한없이, 미국, 샌디에고 소재, Salk Institute Cell Distribution Center에서 입수가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 유래의 것, X63 Ag8653 및 미국, 메릴랜드, 록빌 소재 American Type Culture Collection에서 입수가능한 SP-2 세포를 포함한다. 융합은 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용해 실시된다. 그 다음으로 최종 하이브리도마는 비융합된, 부모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 선별 배지에서 성장시킨다. 예를 들어, 부모 골수종 세포가 효소 히포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결여되면, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 히포잔틴, 아미놉테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 포함하게 될 것이고, 이러한 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0948] 전형적으로 하이브리도마는 마크로파지의 피더층 상에서 성장된다. 마크로파지는 바람직하게는 비장세포를 단리하는데 사용된 인간이외 포유동물의 한배새끼 유래이고 전형적으로 하이브리도마를 플레이팅하기 전에 수일 동안 불완전 프로인트 보강제 등으로 프라이밍된다. 융합 방법은 [Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]에 기술되어 있고, 이의 개시 내용을 본 명세서에 참조로 편입시킨다.

[0949] 세포는 콜로니 형성 및 항체 생산에 충분한 시간 동안 선별 배지에서 성장될 수 있게 한다. 일반적으로 이는 약 7일 내지 약 14일이다.

[0950] 그 다음으로 하이브리도마 콜로니는 CD39 또는 CD73 폴리펩티드 유전자 생성물에 특이적으로 결합하는 항체의 생성에 대해 어세이된다. 전형적으로 어세이는 비색 ELISA-유형 어세이이지만, 하이브리도마가 성장되는 웰에 적합화시킬 수 있는 임의의 어세이를 적용해도 된다. 다른 어세이는 방사성면역어세이 또는 형광 활성화 세포 분류법을 포함한다. 바람직한 항체 생성에 양성인 웰은 하나 이상의 별개 콜로니가 존재하는가를 결정하기 위해 조사된다. 하나 초과의 콜로니가 존재하면, 세포는 오직 단일 세포에서 바람직한 항체를 생성하는 콜로니가 생성되는 것을 보장하기 위해 재클로닝하고 성장시킬 수 있다. 전형적으로, 항체는 또한 CD39 또는 CD73 폴리펩티드, 예를 들어, CD39-발현 세포 또는 CD73-발현 세포에 결합하는 능력에 대해 시험될 것이다.

[0951] 단일클론 항체를 생산하는 것으로 확인된 하이브리도마는 DMEM 또는 RPMI-1640과 같은 적절한 배지에서 더 많은 양으로 성장시킬 수 있다. 대안적으로, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로서 생체내에서 성장시킬 수 있다.

[0952] 바람직한 단일클론 항체를 생성시키도록 충분한 성장 이후에, 단일클론 항체를 함유하는 성장 배지 (또는 복수액)를 세포와 분리시키고 그에 존재하는 단일클론 항체를 정제한다. 전형적으로 정제는 겔 전기영동, 투석, 단백질 A 또는 단백질 G-세파로스, 또는 고형 지지체 예컨대 아가로스 또는 세파로스 비드에 연결된 항-마우스 Ig를 사용한 크로마토그래피를 통해 달성된다 (모두 예를 들어 [Antibody Purification Handbook, Biosciences, publication No. 18-1037-46, Edition AC]에 기술되어 있으며, 이의 개시 내용은 참조로 본 명세서에 편입됨). 결합된 항체는 전형적으로 항체-함유 분획의 즉시 중화와 함께 낮은 pH 완충액 (pH 3.0 이하의 글리신 또는 아세테이트 완충액)을 사용하여 단백질 A/단백질 G 컬럼으로부터 용리된다. 이들 분획을 모아서, 투석하고 필요에 따라 농축한다.

[0953] 전형적으로 분명한 단일 콜로니가 존재하는 양성 웰은 오직 하나의 단일클론 항체가 검출되고 생성되는 것을 보장하기 위해 재클로닝하고 재어세이된다.

[0954] 항체는 또한 예를 들어 그 전체 개시 내용이 참조로 본 명세서에 편입되는 [Ward et al. Nature, 341 (1989) p. 544]에 개시된 바와 같이, 면역글로불린의 조합 라이브러리의 선별을 통해 생성될 수 있다.

[0955] 관심 항원 즉, CD39 또는 CD73, CD73의 경우에 단일클론 항체 11E1, 8C7 또는 6E1와 특히 실질적으로 또는 본질적으로 동일한 에피토프, 또는 CD39의 경우에 단일클론 항체 I-394, I-395, I-396 또는 I-399와 특히 실질적으로 또는 본질적으로 동일한 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항체의 확인은 항체 경쟁을 평가할 수 있는 다양한 면역학적 스크리닝 어세이 중 어느 하나를 사용하여 쉽게 결정될 수 있다. 많은 이러한 어세이는 통상적으로 실시되며 당분야에 충분히 공지되어 있다 (예를 들어, 특별히 참조로 본 명세서에 편입되는 1997년 8월 26일 공표된 미국 특허 제5,660,827호 참조). 실제로 본 명세서에 기술된 항체가 결합하는 에피토프를 결정하는 단계가 본 명세서에 기술된 단일클론 항체와 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 확인하기 위해 임의 방식으로 요구되는 것이 아님을 이해하게 될 것이다.

[0956] 예를 들어, 조사하려는 시험 항체가 상이한 출처의 동물로부터 수득되거나, 또는 상이한 Ig 이소타입인 경우에, 대조군 (예를 들어, I-394, I-395, I-396 또는 I-399) 및 시험 항체가 혼합 (또는 사전흡착)되고 CD39 또는 CD73 폴리펩티드를 함유하는 샘플에 적용되는 단순 경쟁 어세이가 적용될 수 있다. 웨스턴 블롯 및 BIACORE 분석의 사용을 기반으로 하는 프로토콜이 이러한 경쟁 연구에서 사용하기에 적합하다.

[0957] 일정 실시형태에서, CD39 항원 샘플에 적용하기 전에 대조군 항체 (예를 들어, I-394, I-395, I-396 또는 I-399)를 다양한 양의 시험 항체 (예를 들어, 약 1:10 또는 약 1:100)와 일정 기간 동안 사전 혼합한다. 다른 실시형태에서, 대조군 및 다양한 양의 시험 항체는 CD39 항원 샘플에 노출 동안 단순하게 혼합될 수 있다. (예를 들어, 미결합된 항체를 제거하기 위한 분리 또는 세척 기술을 사용하여) 결합된 것과 유리 항체를 구별할 수 있고 (예를 들어, 종-특이적 또는 이소타입-특이적 2차 항체를 사용하거나 또는 검출가능한 표지로 I-394,

I-395, I-396 또는 I-399를 특이적으로 표지하여) I-394, I-395, I-396 또는 I-399와 시험 항체를 구별할 수 있는 한, I-394, I-395, I-396 또는 I-399와 CD39 상의 동일 부위와의 결합에 대해 경쟁한다는 것을 의미하는, 시험 항체가 항원에 대한 I-394, I-395, I-396 또는 I-399의 결합을 감소시키는지 여부를 결정할 수 있다. 완전히 무관한 항체의 부재 하에서 (표지된) 대조군 항체의 결합은 높은 값의 대조군으로서 제공될 수 있다. 낮은 값의 대조군은 표지된 (I-394, I-395, I-396 또는 I-399) 항체를 정확하게 동일한 유형 (I-394, I-395, I-396 또는 I-399)의 미표지된 항체와 인큐베이션시켜 수득될 수 있고, 여기서 경쟁이 일어나서 표지된 항체의 결합을 감소시키게 된다. 시험 어세이에서, 시험 항체의 존재 하에서 표지된 항체 반응의 유의한 감소는 실질적으로 동일한 에피토프를 인식하는 시험 항체, 즉 표지된 (I-394, I-395, I-396 또는 I-399) 항체와 "교차-반응" 또는 경쟁하는 것을 의미한다. 약 1:10 내지 약 1:100의 I-394, I-395, I-396 또는 I-399:시험 항체의 임의 비율에서, CD39 항원에 대한 I-394, I-395, I-396 또는 I-399의 결합이 적어도 약 50%, 예컨대 적어도 약 60%, 또는 보다 바람직하게 적어도 약 80% 또는 90% (예를 들어, 약 65-100%) 만큼 감소된 임의의 시험 항체는 I-394, I-395, I-396 또는 I-399와 실질적으로 동일한 에피토프 또는 결정부에 대한 결합에 대해 경쟁하는 항체로 간주된다. 바람직하게, 이러한 시험 항체는 CD39 항원에 대한 I-394, I-395, I-396 또는 I-399의 결합을 적어도 약 90% (예를 들어, 약 95%) 만큼 감소시키게 될 것이다.

[0958] 경쟁은 또한 예를 들어 유세포측정 시험으로 평가할 수 있다. 이러한 시험에서, 소정 CD39 폴리펩티드를 보유하는 세포는 예를 들어 먼저 I-394, I-395, I-396 또는 I-399와 인큐베이션 (또는 CD73 폴리펩티드를 11E1, 8C7, 3C12 또는 6E1과 인큐베이션)시킬 수 있고, 그 다음으로 형광색소 또는 바이오틴으로 표지된 시험 항체와 인큐베이션시킬 수 있다. 항체는 I-394, I-395, I-396 또는 I-399의 포화량과 사전인큐베이션시에 수득된 결합이 I-394, I-395, I-396 또는 I-399와 사전인큐베이션하지 않은 항체에 의해 수득된 (형광을 통해 측정된) 결합의 약 80%, 바람직하게 약 50%, 약 40% 이하 (예를 들어, 약 30%, 20% 또는 10%)라면 I-394, I-395, I-396 또는 I-399와 경쟁한다고 한다. 대안적으로, 항체는 시험 항체의 포화량과 사전인큐베이션된 세포 상에서 (형광색소 또는 바이오틴으로) 표지된 I-394, I-395, I-396 또는 I-399 항체에 의해 수득된 결합이 시험 항체와 사전인큐베이션하지 않고 수득된 결합의 약 80%, 바람직하게 약 50%, 약 40% 이하 (예를 들어, 약 30%, 20% 또는 10%)라면 I-394, I-395, I-396 또는 I-399와 경쟁한다고 한다.

[0959] 시험 항체를 CD39 항원 (또는 항-CD73 항체의 경우 CD73)이 고정된 표면에 포화 농도로 사전 흡착 및 도포시키는 단순 경쟁 어세이가 또한 적용될 수 있다. 단순 경쟁 어세이의 표면은 바람직하게는 BIACORE 칩 (또는 표면 플라스몬 공명 분석에 적합한 다른 매질)이다. 그 다음으로 대조군 항체 (예를 들어, I-394, I-395, I-396 또는 I-399)를 CD39-포화 농도의 표면과 접촉시키고 및 대조군 항체의 CD39 및 표면 결합을 측정한다. 대조군 항체의 이러한 결합은 시험 항체의 부재 하에서 CD39-함유 표면에 대한 대조군 항체의 결합과 비교한다. 시험 어세이에서, 시험 항체의 존재 하에서 대조군 항체에 의한 CD39-함유 표면의 결합의 유의한 감소는 시험 항체가 대조군 항체와 동일한 결정부 또는 에피토프에 대한 결합에 대해 경쟁하여서 시험 항체가 대조군 항체와 "교차-반응"한다는 것을 의미할 수 있다. 적어도 약 30% 이상, 바람직하게는 약 40% 까지 대조군 (예컨대 I-394, I-395, I-396 또는 I-399) 항체의 결합을 감소시키는 임의의 시험 항체는 대조군 (예를 들어, I-394, I-395, I-396 또는 I-399)과 실질적으로 동일한 에피토프 또는 결정부에 결합하는 항체로 간주될 수 있다. 바람직하게는, 이러한 시험 항체는 적어도 약 50% (예를 들어, 적어도 약 60%, 적어도 약 70% 이상) 까지 대조군 항체 (예를 들어, I-394, I-395, I-396 또는 I-399)의 결합을 감소시킬 것이다. 대조군 및 시험 항체의 순서는 반전될 수 있다는 것을 이해할 것이며, 즉 대조군 항체가 먼저 표면에 결합될 수 있고 이후에 시험 항체가 경쟁 어세이에서 표면과 접촉된다. 바람직하게는, 제2 항체 (항체가 교차-반응한다고 가정)에 대해 확인된 결합의 감소가 더 큰 규모일 것으로 예상되므로, CD73 항원에 대해 더 높은 친화성을 갖는 항체를 먼저 표면에 결합시킨다. 이러한 어세이의 추가 예는 예를 들어, [Saunal (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41]에 제공되고, 이의 개시 내용은 참조로 본 명세서에 편입된다.

[0960] 일 실시형태에서, 항체는 각각 CD39 또는 CD73-발현 세포에 개별적으로 결합하는 그들 능력을 시험하는 면역어세이에서 검증된다. 예를 들어, 혈액 샘플 또는 종양 생검이 수행되고 종양 세포 또는 종양 침윤 세포를 수집한다. 그 다음으로 세포에 결합하는 소정 항체의 능력은 당분야에 충분히 공지된 표준 방법을 사용해 평가된다. 항체는 예를 들어 개체 또는 환자의 유의한 백분율 (예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 이상)로부터의, 각각 CD39 또는 CD73을 발현하는 것으로 알려진 세포, 예를 들어 종양 세포의 실질적인 비율 (예를 들어, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 이상)에 결합할 수도 있다. 항체는 환자에서 악성 세포의 존재 또는 수준을 결정하기 위한 진단 목적으로, 예를 들어 항-CD73 작용제를 사용한 치료에 환자가 적합한지 여부를 평가하기 위한 바이오마커로서, 또는 본 명세서에 기술된 치료 방법에서 사용을 위해서, 사용될 수 있다. 세포에 대한 항체의 결합을 평가하기 위해서, 항체는 직접적으로 또는 간접적으로 표지될 수 있다. 간접적

으로 표지될 때, 전형적으로 2차의, 표지된 항체가 첨가된다.

[0961] 항체가 에피토프 영역 내에 결합하는지 여부의 결정은 당업자에게 공지된 방식으로 수행될 수 있다. 이러한 맵핑/특징규명 방법의 일례로서, 항-CD73 또는 항-CD39 항체에 대한 에피토프 영역은 각각의 CD73 또는 CD39 단백질에서 노출된 아민/카르복실의 화학적 변형을 사용하는 에피토프 "풋-프린팅"을 통해 결정될 수 있다. 이러한 풋-프린팅 기술의 일 특정 예는 HXMS (질량 분광법으로 검출된 수소-중수소 교환)의 사용이고, 여기서 수용체 및 리간드 단백질 아미드 양자의 수소/중수소 교환, 결합, 및 역교환이 발생되고, 단백질 결합에 참여한 골격 아미드 기는 역교환으로부터 보호되므로 중수소화된 채로 남게 될 것이다. 관련 영역은 이 시점에 펩티드 단백질가수분해, 고속 소구경 고성능 액상 크로마토그래피 분리, 및/또는 전자분무 이온화 질량 분광법을 통해 확인될 수 있다. 예를 들어, [Ehring H, Analytical Biochemistry, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999)], [Engen, J. R. and Smith, D. L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265A]를 참조한다. 적합한 에피토프 확인 기술의 다른 예는 핵 자기 공명 에피토프 맵핑 (NMR)이고, 여기서는 전형적으로 항원 결합 펩티드, 예컨대 항체와 복합체를 형성한 항원 및 유리 항원의 2차원 NMR 스펙트럼에서 신호의 위치를 비교한다. 전형적으로 항원은 15N으로 선택적으로 동위원소 표지되어서 NMR-스펙트럼에서 항원에 상응하는 신호만이 확인되고 항원 결합 펩티드로부터의 신호는 보이지 않는다. 전형적으로 항원 결합 펩티드와의 상호작용에 관여하는 아미노산으로부터 기원된 항원 신호는 유리 항원의 스펙트럼과 비교된 복합체의 스펙트럼에서 위치가 이동하게 되며, 결합에 관여된 아미노산이 이러한 방식으로 확인될 수 있다. 예를 들어, [Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67]; [Huang et al., Journal of Molecular Biology, Vol. 281 (1) pp. 6_{1-6}7 (1998)]; 및 [Saito and Patterson, Methods. 1996 Jun; 9 (3): 516-24]를 참조한다.

[0962] 에피토프 맵핑/특징규명은 또한 질량 분광 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, [Downard, J Mass Spectrom. 2000 Apr; 35 (4): 493-503] 및 [Kiselar and Downard, Anal Chem. 1999 May 1; 71 (9): 1792-1801]을 참조한다. 프로테아제 분해 기술은 또한 에피토프 맵핑 및 확인에서 유용할 수 있다. 항원결정부-관련 영역/서열은 프로테아제 분해, 예를 들어 CD73에 대해 약 1:50의 비율로 트립신을 사용하거나 또는 pH 7-8에서 o/n 분해를 사용한 후에, 펩티드 확인을 위한 질량 분광법 (MS) 분석에 의해 결정될 수 있다. 항-CD73 또는 항-CD39 결합제에 의한 트립신 절단으로부터 보호된 펩티드는 이후에 트립신 분해를 겪은 샘플 및 항체와 인큐베이션된 후에 예를 들어 트립신으로 분해된 샘플의 비교에 의해 확인될 수 있다 (그리하여 결합제에 대한 풋프린트를 밝힘). 키모트립신, 펩신 등과 같은 다른 효소가 역시 또는 대안적으로 유사한 에피토프 특징규명 방법에서 사용될 수 있다. 게다가, 효소 분해는 잠재적인 항원 결정부 서열이 표면 노출되지 않은 CD73 또는 CD39 폴리펩티드의 영역 내에 존재하는 지 여부, 및 따라서 아마도 면역원성/항원성 관점에서 관련이 없는지 여부를 분석하기 위한 신속한 방법을 제공할 수 있다.

[0963] 부위-지정 돌연변이유발법은 결합 에피토프의 해명에 유용한 다른 기술이다. 예를 들어, "알라닌-스캐닝"에서, 단백질 절편 내 각각의 잔기는 알라닌 잔기로 치환되고, 결합 친화성에 대한 결과가 측정된다. 돌연변이가 결합 친화성에 유의한 감소를 야기시키면, 이것은 아마도 결합에 관여될 것이다. 구조적 에피토프에 특이적인 단일클론 항체 (즉, 언폴딩된 단백질에 결합하지 않는 항체)는 알라닌-치환이 단백질의 전체 폴드에 영향을 미치지 않는다는 것을 검증하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, [Clackson and Wells, Science 1995; 267:383-386]; 및 [Wells, Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:1-6]를 참조한다.

[0964] 전자 현미경이 또한 에피토프 "풋-프린팅"에 사용될 수 있다. 예를 들어, [Wang et al., Nature 1992; 355:275-278]은 천연 동부 모자이크 바이러스의 캡시드 표면 상의 Fab-단편의 물리적 풋프린트를 결정하기 위해 저온 전자 현미경, 3차원 영상 재구성법, 및 X-선 결정학의 공동 적용을 사용하였다.

[0965] 에피토프 평가를 위한 "표지-무함유" 어세이의 다른 형태는 표면 플라스몬 공명법 (SPR, BIACORE) 및 반사계 간섭 분광법 (RifS)을 포함한다. 예를 들어, [Fagerstam et al., Journal Of Molecular Recognition 1990;3:208-14]; [Nice et al., J. Chroma-togr. 1993; 646:159-168]; [Leipert et al., Angew. Chem. Int. Ed. 1998; 37:3308-3311]; [Kroger et al., Biosensors and Bioelectronics 2002; 17:937-944]를 참조한다.

[0966] 항체와 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 에피토프와의 항체 결합은 본 명세서에 기술된 예시적인 경쟁 어세이 중 하나 이상에서 확인될 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0967] 전형적으로, 본 명세서에 제공되는 항-CD73 또는 항-CD39 항체는 각각 CD73 (예를 들어, CD73 동종이량체로서) 또는 CD39 폴리펩티드에 대해 약 10^4 내지 약 10^{11} M^{-1} (예를 들어, 약 10^8 내지 약 10^{10} M^{-1})의 범위의 친화성을 갖는다. 예를 들어, 특정한 양상에서 항-CD73 또는 항-CD39 항체는 CD73 또는 CD39 각각에 대해서, 예를 들

어, 표면 플라스몬 공명 (SPR) 스크리닝 (예컨대 BIAcore™ SPR 분석 장치를 사용한 분석에 의함)으로 결정된, 1 x 10^{-9} M 미만의 평균 해리 상수 (K_D)를 갖는다. 보다 특정한 예시적인 양상에서, 항-CD73 또는 항-CD39 항체는 각각 CD73 또는 CD39에 대해서, 약 1 x 10^{-8} M 내지 약 1 x 10^{-10} M, 또는 약 1 x 10^{-9} M 내지 약 1 x 10^{-11} M의 KD를 갖는다. 일 실시형태에서, 결합은 1가 결합이다. 일 실시형태에서, 결합은 2가 결합이다.

[0968] 항체는 예를 들어 약 100, 60, 10, 5, 또는 1 나노몰 이하 (즉, 더 양호한 친화성), 바람직하게는 나노몰 이하 또는 임의로는 약 500, 200, 100 또는 10 피코몰 이하의 평균 KD를 특징으로 할 수 있다. KD는 예를 들어 재조합적으로 생산된 인간 CD73 또는 CD39 단백질을 칩 표면 상에 고정시킨 후에, 용액 중에 시험하려는 항체를 도포하여 결정될 수 있다. 일 실시형태에서, 방법은 (b) CD73과의 결합에 대해 항체 11E1, 8C7, 3C12 또는 6E1과 경쟁할 수 있거나, 또는 CD39와의 결합에 대해 항체 I-394, I-395, I-396 또는 I-399와 경쟁할 수 있는 항체를 선별하는 단계를 더 포함한다.

[0969] 임의의 실시형태의 일 양상에서, 본 방법에 따라 제조된 항체는 단일클론 항체이다. 다른 양상에서, 본 명세서의 방법에 따라 항체를 생성시키는데 사용되는 인간이외의 동물은 포유동물, 예컨대 설치류, 소, 돼지, 가금류, 낙타과, 말, 토끼, 염소 또는 양이다.

[0970] CD73 또는 CD39 폴리펩티드 상에 존재하는 에피토프에 결합하는 항체를 코딩하는 DNA를 하이브리도마로부터 단리하고 적절한 숙주에 형질감염을 위한 적절한 발현 벡터에 위치시킨다. 그 다음으로 숙주는 항체, 또는 이의 변이체, 예컨대 단일클론 항체의 인간화 버전, 항체의 활성 단편, 항체의 항원 인식 부분을 포함하는 키메라 항체, 또는 검출가능한 모이어티를 포함하는 버전의 재조합 생산에 사용된다.

[0971] 본 개시의 단일클론 항체, 예를 들어, 항체 I-394, I-395, I-396 또는 I-399, 11E1, 8C7, 3C12 또는 6E1을 코딩하는 DNA는 통상의 절차를 사용하여 (예를 들어, 쥐과 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 쉽게 단리할 수 있고 시퀀싱할 수 있다. 단리되면, DNA는 발현 벡터에 위치시킬 수 있고, 이것을 달리 면역글로불린 단백질을 생성시키지 않는 숙주 세포 예컨대 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 골수종 세포에 형질감염시켜서, 재조합 숙주 세포에서 단일클론 항체의 합성을 수득한다. 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같이, 이러한 DNA 서열은 임의의 다수 목적을 위해서, 예를 들어 항체의 인간화, 단편 또는 유도체의 생산, 또는 예를 들어 항체의 결합 특이성의 최적화를 위해 항원 결합 부위에서, 항체의 서열 변형을 위해, 변형될 수 있다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현은 당분야에 충분히 공지되어 있다 (예를 들어, [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5, pp. 256 (1993)]; 및 [Pluckthun, Immunol. 130, p. 151 (1992)] 참조).

[0972] 항체의 단편 및 유도체 (이 용어는 달리 명시하거나 문맥에서 명확하게 반박하지 않으면, 본 출원에서 사용시 용어 "항체" 또는 "항체들"에 포괄됨)는 당분야에 공지된 기술로 제조될 수 있다. "단편"은 온전한 항체의 일부분, 일반적으로 항원 결합 부위 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2, 및 Fv 단편; 디아바디; 제한없이 (1) 단쇄 Fv 분자 (2) 회합된 중쇄 모이어티없이, 오직 하나의 경쇄 가변 도메인, 또는 경쇄 가변 도메인의 3개 CDR을 함유하는 이의 단편을 함유하는 단쇄 폴리펩티드 및 (3) 회합된 경쇄 모이어티없이, 오직 하나의 중쇄 가변 영역, 또는 중쇄 가변 영역의 3개 CDR을 함유하는 이의 단편을 함유하는 단쇄 폴리펩티드를 포함하는, 인접한 아미노산 잔기의 하나의 미개재 서열로 이루어진 1차 구조를 갖는 폴리펩티드인 임의의 항체 단편 (본 명세서에서는 "단쇄 항체 단편" 또는 "단쇄 폴리펩티드"라고 함); 및 항체 단편으로 형성된 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항체를 포함한다. 특히, 나노바디, 도메인 항체, 단일 도메인 항체 또는 "dAb"를 포함한다.

[0973] 일 양상에서, 작용제는 완전한 인간 항체, 인간화 항체, 및 키메라 항체로부터 선택되는 항체이다.

[0974] 일 양상에서, 작용제는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로부터 선택된 불변 도메인을 포함하는 항체의 단편이다. 일 양상에서, 작용제는 Fab 단편, Fab' 단편, Fab'-SH 단편, F(ab)2 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 중쇄 Ig (라마 또는 낙타 Ig), V_{HH} 단편, 단일 도메인 FV, 및 단쇄 항체 단편으로부터 선택된 항체 단편이다. 일 양상에서, 작용제는 scFV, dsFV, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 카파 바디, IgNAR; 및 다중특이적 항체로부터 선택된 합성 또는 반합성 항체-유도 분자이다. 일 양상에서, 항체는 적어도 부분적으로 정제된 형태이다. 일 양상에서, 항체는 본질적으로 단리된 형태이다.

[0975] 항-CD39 또는 항-CD73 작용제 예컨대 항체는 약학 제제에 도입되어 1 mg/mL 내지 500 mg/mL의 농도로 포함되고, 여기서 상기 제제는 2.0 내지 10.0의 pH를 갖는다. 제제는 완충 시스템, 보존제(들), 등장화제(들), 킬레이

트화제(들), 안정화제 및 계면활성제를 더 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 약학 제제는 수성 제제, 즉 물을 포함하는 제제이다. 이러한 제제는 전형적으로 용액 또는 현탁액이다. 추가 실시형태에서, 약학 제제는 수성 용액이다. 용어 "수성 제제"는 적어도 50 %w/w의 물을 포함하는 제제로서 정의된다. 유사하게, 용어 "수성 용액"은 적어도 50 %w/w의 물을 포함하는 용액으로서 정의되고, 용어 "수성 현탁액"은 적어도 50 %w/w의 물을 포함하는 현탁액으로서 정의된다.

[0976] 다른 실시형태에서, 약학 제제는 동결-건조된 제제이고, 여기에 의사 또는 환자가 사용 전에 용매 및/또는 희석제를 첨가한다.

[0977] 다른 실시형태에서, 약학 제제는 임의의 사전 용해없이 사용을 위해 준비된 건조 제제 (예를 들어, 동결-건조 또는 분무-건조)이다.

[0978] 추가 양상에서, 약학 제제는 이러한 항체의 수성 용액, 및 완충제를 포함하고, 여기서 항체는 1 mg/mL 이상의 농도로 존재하고, 상기 제제는 약 2.0 내지 약 10.0의 pH를 갖는다.

[0979] 다른 실시형태에서, 제제의 pH는 약 2.0 내지 약 10.0, 약 3.0 내지 약 9.0, 약 4.0 내지 약 8.5, 약 5.0 내지 약 8.0, 및 약 5.5 내지 약 7.5로 이루어진 목록으로부터 선택되는 범위이다.

[0980] 추가 실시형태에서, 완충제는 소듐 아세테이트, 소듐 카보네이트, 시트레이트, 글리실글리신, 히스티딘, 글리신, 리신, 아르기닌, 소듐 디히드로겐 포스페이트, 디소듐 히드로겐 포스페이트, 소듐 포스페이트, 및 트리스(히드록시메틸)-아미노메탄, 비신, 트리신, 말산, 숙시네이트, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 아스파르트산 또는 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이들 특별한 완충제의 각각의 하나가 본 발명의 대안적인 실시형태를 구성한다.

[0981] 추가 실시형태에서, 제제는 약학적으로 허용가능한 보존제를 더 포함한다. 추가 실시형태에서, 제제는 등장화제를 더 포함한다. 추가 실시형태에서, 제제는 또한 킬레이트화제를 포함한다. 추가 실시형태에서 제제는 안정화제를 더 포함한다. 추가 실시형태에서, 제제는 계면활성제를 더 포함한다. 편의를 위해 [Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995]을 참조한다.

[0982] 다른 성분들이 퀩티드 약학 제제에 존재하는 것이 가능하다. 이러한 추가의 성분은 습윤제, 유화제, 항산화제, 증량제, 등장성 개질제, 킬레이트화제, 금속 이온, 유성 비히클, 단백질 (예를 들어, 인간 혈청 알부민, 젤라틴 또는 단백질) 및 쌍성이온 (예를 들어, 아미노산 예컨대 베타인, 타우린, 아르기닌, 글리신, 리신 및 히스티딘)을 포함할 수 있다. 물론, 이러한 추가 성분은 본 발명의 약학 제제의 전반적인 안정성에 부정적으로 영향을 미쳐서는 안된다.

[0983] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여는 몇몇 투여 경로, 예를 들어, 정맥내를 통해서일 수 있다. 적합한 항체 제제는 또한 이미 개발된 다른 치료적 단일클론 항체에 대한 경험을 조사하여 결정할 수 있다. 몇몇 단일클론 항체가 임상적 상황에서 효율적인 것으로 확인되었는데, 예컨대 리툭산 (리툭시맙), 허셉틴 (트라스투주맙), 졸레어 (오말리주맙), 벡사 (토시투모맙), 캄파트 (알렘투주맙), 제발린, 온코림 및 유사한 제제가 본 발명의 항체와 사용될 수 있다.

[0984] 또한 선행 방법에서 사용을 위해 적합화된 치료적 유효량으로, 항-CD39 항체, 항-CD73 항체, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 약학 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 임의로는 또한 예를 들어 전문가 (예를 들어, 의사, 간호사, 또는 환자)가 암 (예를 들어, 고형 종양)을 갖는 환자에게 조성물을 투여하기 위해서 그에 함유된 조성물을 투여할 수 있도록, 투여 일정을 포함하는 설명서를 포함할 수 있다. 키트는 또한 시린지를 포함할 수 있다.

[0985] 임의로는, 키트는 상기 제공된 방법에 따라서 단회 투여를 위한 항-CD39 또는 항-CD73 항체의 유효량을 각각 함유하는 단일-용량 약학 조성물의 다수 패키지를 포함한다. 약학 조성물(들)을 투여하는데 필요한 장비 또는 장치가 또한 키트에 포함될 수도 있다. 예를 들어, 키트는 하나 이상의 사전 충전된, 항-CD39 항체의 양을 함유하는 시린지 및 항-CD73 항체의 양을 함유하는 시린지, 또는 항-CD73 항체 둘 모두의 양을 함유하는 시린지를 제공할 수 있다.

[0986] 일 실시형태에서, 본 발명은 인간 환자에서 암을 치료하기 위한 키트를 제공하고, 그 키트는 다음을 포함한다:

[0987] (a) sCD39의 활성을 중화시키는 항-CD39 항체로서, 임의로는 항체는 항체 I-394, I-395, I-396 또는 I-399의 중쇄 가변 영역의 초가변 영역 (예를 들어, CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인), 및 항체 I-394, I-395, I-396 또는

I-399의 경쇄 가변 영역의 초가변 영역 (예를 들어, CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인)을 포함하는 것인 항체의 용량;

[0988] (b) CD73에 결합하고 CD73의 활성을 중화시키는 작용제로서, 임의로는 작용제는 항-CD73 항체인 것인 작용제의 용량; 및

[0989] (c) 임의로는, 본 명세서에 기술된 임의 방법에서 항-CD39 항체 및 CD73 결합제를 사용하기 위한 설명서.

[0990] **악성종의 진단, 예후 및 치료**

[0991] 개체에서 암의 진단, 예후, 모니터링, 치료 및 예방에 유용한 방법을 기술한다. 본 명세서에 기술된 치료 용법 및 방법이 고형 종양의 치료에 특히 유용하지만, 본 명세서에 기술된 치료 용법 및 방법은 또한 다양한 혈액학적 암에도 사용할 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물은 예를 들어 제한없이 방광, 유방, 결장, 신장, 간, 폐, 난소, 자궁, 전립선, 췌장, 위, 자궁경부, 갑상선, 두경부 (두경부 편평 세포 암종), 및 피부 (예를 들어, 흑색종)의 암을 포함한, 암종; 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 모발 세포 림프종 및 버킷 림프종, 및 다발성 골수종을 포함한, 림프 계통의 조혈 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 및 골수이형성 증후군을 포함한, 골수 계통의 조혈 종양; 섬유육종 및 횡문근육종을 포함한, 중간엽 기원의 종양; 흑색종, 정상피종, 기형-암종, 신경아세포종 및 신경교종을 포함하는, 기타 종양; 성상세포종, 신경아세포종, 신경교종, 및 신경초종을 포함한, 중추 및 말초 신경계의 종양; 섬유육종, 횡문근육종, 및 골육종을 포함한, 중간엽 기원의 종양; 및 흑색종, 색소성 건피증, 각질가시세포종, 정상피종, 및 갑상선 여포암을 포함한 기타 종양을 포함한 다양한 암 및 다른 증식성 질환의 치료에 이용된다.

[0992] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 항-CD39 항체는 CD73-양성인 암을 치료하는데 유리하게 사용될 수 있다. 따라서, CD73-양성 암을 갖는 개체에서 암 또는 감염성 질환을 치료하거나 또는 예방하기 위한 방법을 제공하고, 그 방법은 단량체 인간 CD39 단백질 (예를 들어, 가용성 CD39 및/또는 단량체 memCD39)의 ATPase 활성에 결합하고 억제하는 작용제 또는 항체 또는 작용제를 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 개시는 개체에서 CD73-양성 암의 치료 또는 예방을 위한 방법을 제공하고, 그 방법은 개체에게 가용성 인간 CD39 단백질의 활성에 결합하고 억제하는 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 항체는 단량체 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성에 결합하고 억제한다.

[0993] CD73-양성 암은 일반적으로 종양 또는 종양 환경에서 CD73-발현 세포의 존재를 특징으로 하는 것으로 공지된 암이다. 따라서, 암을 갖는 개체는 종양 미세환경에서 세포 (예를 들어, 종양 세포, CD4 T 세포, CD8 T 세포, B 세포) 상의 CD73의 발현을 평가하기 위해 사전 검출 단계 존재 또는 부재로 항-CD39 항체를 사용해 치료될 수 있다.

[0994] 임의로는, 치료 방법은 개체 유래 종양의 생물학적 샘플 (예를 들어, 암 조직, 암 근접 또는 암 주변부 조직, 암 인접 조직, 인접한 비종양 조직 또는 정상 인접 조직)에서 CD73 핵산 또는 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 생물학적 샘플이 CD73 폴리펩티드를 특징으로 한다는 결정, 예를 들어 CD73을 발현하는 세포를 포함한다는 결정은 예를 들어, sCD39를 억제하는 작용제 (임의로는 CD73을 억제하는 작용제와 더욱 조합하여)를 사용한 치료로 강력한 이득을 가질 수 있는 암을 갖는다는 것을 의미한다. 본 개시에 따른 치료에 적합한 암을 갖는 환자는 CD73을 현저하게 발현하고; (예를 들어, 기준값과 비교하여, 건강한 개체와 비교하여, 항-CD73 작용제를 사용한 치료에 대해 나쁜 반응자인 개체에 상응하는 수준에서, 그 종양이 하나 이상의 면역요법에 내성인 개체에 상응하는 수준에서) 높은 수준으로 CD73을 발현하고, 항-CD73 항체에 의한 높은 강도의 염색을 보이는 종양을 갖는 것으로 결정될 수 있다.

[0995] 일 실시형태에서, 방법은 생물학적 샘플에서 CD73 핵산 또는 폴리펩티드의 발현 수준을 결정하는 단계 및 그 수준을 건강한 개체에 상응하는 기준 수준과 비교하는 단계를 포함한다. 생물학적 샘플이 기준 수준과 비교하여 증가된 수준으로 CD73 핵산 또는 폴리펩티드를 발현하는 세포를 포함한다는 결정은 환자가 항-CD39 항체를 사용하여 치료할 수 있는 암을 갖는다는 것을 의미한다. 임의로는, 생물학적 샘플에서 CD73 폴리펩티드의 검출은 악성 세포, CD4 T 세포, CD8 T 세포, B 세포의 표면 상에서 발현된 CD73 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 생물학적 샘플이 CD73 핵산 또는 폴리펩티드를 현저하게 발현하는 세포를 포함한다는 결정은 환자가 항-CD39 항체를 사용하여 치료할 수 있는 암을 갖는다는 것을 의미한다. CD73 폴리펩티드를 언급할 때 "현저하게 발현되는"은 CD73 폴리펩티드가 소정 환자로부터 채취된 실질적인 수의 세포에서 발현된다는 것을 의미한다. 용어 "현저하게 발현되는"의 정의는 정확한 백분율 값으로 한정되지 않지만, 일부 예에서 "현저하게 발현된다"고 하는 수용체는 환자로부터 채취된 종양 세포 또는 종양 조직의 세포 또는 종

양-인접 조직 샘플 (예를 들어, 생검) 중 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 이상에 존재하게 될 것이다.

[0996] 개체가 CD73 폴리펩티드를 발현하는 세포를 특징으로 하는 암을 갖는지 여부의 결정은 예를 들어 암 환경 (예를 들어, 종양 또는 종양 인접 조직) 유래 세포를 포함하는 개체로부터의 생물학적 샘플 (예를 들어, 생검 수행)을 수득하는 단계, 상기 세포를 CD73 폴리펩티드에 결합하는 항체와 접촉시키는 단계, 및 세포가 그들 표면 상에 CD73을 발현하는지 여부를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 임의로는, 개체가 CD73을 발현하는 세포를 갖는지 여부의 결정은 면역조직화학 어세이를 수행하는 단계를 포함한다.

[0997] 일 실시형태에서, 본 개시는 암의 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체에서 암의 치료 또는 예방을 위한 방법을 제공하고, 그 방법은 하기 단계들을 포함한다:

[0998] a) 종양 환경에서, 임의로는 종양 및/또는 인접한 조직 내에서 CD73 폴리펩티드 (예를 들어, CD73-발현 세포)를 검출하는 단계, 및

[0999] b) 종양 환경이 임의로는 기준 수준과 비교하여 증가된 수준으로 CD73을 포함한다고 결정되면, 개체에게 (a) CD39의 활성을 억제하기 위한 수단 (예를 들어, 작용제 또는 치료, 단백질 작용제, 항체 작용제, 핵산 작용제, 또는 소형 분자 작용제), 및 (b) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 투여하는 단계. 일 실시형태에서, 작용제는 가용성 인간 CD39 단백질의 활성에 결합하고 억제하는 항체이다. 임의로는, 방법은 개체에게 (즉, CD39-억제제에 더해서) 인간 CD73 단백질의 활성에 결합하고 억제하는 작용제를 투여하는 단계를 더 포함한다. 임의로는, 방법은 개체에게, CD39-억제제에 더해서, 종양 세포로부터 ATP의 세포외 방출을 유도하고/하거나 조양 세포의 사멸을 유도하는 치료 (예를 들어, 치료제), 방사선요법 또는 화학요법제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 더 포함한다. 임의로는, 종양 환경 내에서 CD73 폴리펩티드 또는 CD73-발현 세포의 검출은 개체로부터 암 조직 및/또는 암 근접 또는 주변부 조직 (예를 들어, 암 인접 조직, 인접 비종양 조직 또는 정상 인접 조직)을 포함하는 생물학적 샘플을 수득하는 단계, 및 CD73 폴리펩티드 또는 CD73-발현 세포의 수준을 검출하는 단계를 포함한다. CD73-발현 세포는 예를 들어, 종양 세포, CD4 T 세포, CD8 T 세포, B 세포를 포함할 수 있다.

[1000] 본 명세서에서 제공되는 암의 치료를 위한 병용 요법은 암을 앓는 대상체를 치료하기 위해서, 항-CD39 작용제 (예를 들어, 항체) 및 CD73-중화제 (예를 들어, 항체)의 투여 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 고형 종양 (예를 들어, 고형 종양, 후기 난치성 고형 종양)을 갖는 대상체 또는 혈액학적 종양을 갖는 대상체를 치료하기 위해, 병용하여 사용을 위한, 항-CD39 항체 및 항-CD73 항체를 제공한다.

[1001] 본 명세서에서 사용되는, 부가 또는 병용 투여 (공동-투여)는 동일하거나 또는 상이한 제형으로 화합물의 동시 투여, 또는 화합물의 개별 투여 (예를 들어, 순차적 투여)를 포함한다. 따라서, 항-CD39 및 항-CD73 항체는 단일 제제로 동시에 투여될 수 있다. 대안적으로, 항-CD39 및 항-CD73 항체는 개별 투여를 위해 제제화될 수 있고 동시발생적으로 또는 순차적으로 투여된다.

[1002] 암을 갖는 환자는 종양 ATPase 활성, 5'-엑토뉴클레오티다제 활성, 종양의 아데노신 축적 (예를 들어, 종양내 아데노신 농도), 및/또는 세포 (예를 들어, 순환성 및/또는 종양-침윤성 백혈구, T Reg 세포, B 세포 및/또는 종양 세포) 상에서 CD39 및/또는 CD73 발현을 평가하기 위한 이전 검출 단계 존재 또는 부재에서 항-CD39 작용제 및 항-CD73 작용제를 사용하여 치료될 수 있다. 임의로는, 치료 방법은 종양을 갖는 개체 유래 생물학적 샘플 (예를 들어, 종양 조직 및/또는 종양 인접 조직을 포함하는 샘플)에서 종양 ATPase 활성 및/또는 종양 아데노신 축적 (예를 들어, 상승된 종양내 아데노신 농도)을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 생물학적 샘플이 예를 들어 기준과 비교하여 상승된 종양 ATPase 활성 또는 종양의 아데노신 축적 (예를 들어, 종양내 아데노신 농도)을 갖는다는 결정은 개체가 CD73을 억제하는 작용제와 병용하여 CD39를 억제하는 작용제를 사용한 치료로부터 강력한 이득을 가질 수 있는 암을 갖는다는 것을 의미한다. 임의로는, 치료 방법은 개체 유래 종양의 생물학적 샘플 중에서 (예를 들어, 종양 세포 상에서) CD39 핵산 또는 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 생물학적 샘플이 CD39를 발현 (예를 들어, 종양 세포, 종양 침윤 세포 또는 일반적으로 TReg 세포가 CD39를 발현하고, 기준과 비교하여, 세포가 높은 수준으로 CD39를 발현, 많은 개수의 세포가 CD39-양성, 높은 강도로 항-CD39 항체로 염색)한다는 결정은 개체가 임의로는 CD73을 억제하는 작용제와 병용하여, 가용성 CD39 단백질을 억제하는 작용제를 사용한 치료로부터 강력한 이득을 가질 수 있는 암을 갖는다는 것을 의미한다.

[1003] 임의로는, 치료 방법은 개체 유래 생물학적 샘플에서 CD39 핵산 또는 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함할 수

있다. 생물학적 샘플의 예는 임의의 적합한 생물학적 유체 (예를 들어, 혈청, 림프, 혈액), 세포 샘플 또는 조직 샘플을 포함한다. 기준과 비교하여, 생물학적 샘플 중 세포 (예를 들어, 암 세포, 림프구, 예를 들어 TReg 세포, B 세포, T 세포)가 높은 수준으로 CD39를 발현하거나, 또는 샘플 중 높은 개수의 세포가 CD39-양성이거나, 또는 높은 강도의 항-CD39 항체 염색을 보인다는 임의의 결정은 개체가 CD73을 억제하는 작용제와 병용하여 CD39를 억제하는 작용제를 사용한 치료로부터 강력한 이득을 가질 수 있는 암을 갖는다는 것을 의미할 수 있다. 일 실시형태에서, 치료 방법은 개체 유래 종양의 생물학적 샘플 (예를 들어, 종양-침윤성 세포)에서 CD39 핵산 또는 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[1004] 치료 방법에서, 항-CD39 항체 및 CD73-중화제 (예를 들어, 항-CD73 항체)는 개별적으로, 함께 또는 순차적으로, 또는 칵테일로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 CD73-중화제의 투여 이전에 투여된다. 예를 들어, 항-CD39 항체는 CD73-중화제의 투여 전 대략 0 내지 30일에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 CD73-중화제의 투여 전 약 30분 내지 약 2주, 약 30분 내지 약 1주, 약 1시간 내지 약 2시간, 약 2시간 내지 약 4시간, 약 4시간 내지 약 6시간, 약 6시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 1일, 또는 약 1일 내지 5일에 투여된다. 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 CD73-중화제의 투여와 동시발생적으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 항-CD73 항체의 투여 이후에 투여된다. 예를 들어, 항-CD39 항체는 CD73-중화제의 투여 이후에 대략 0 내지 30일에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 CD73-중화제의 투여 이후 약 30분 내지 약 2주, 약 30분 내지 약 1주, 약 1시간 내지 약 2시간, 약 2시간 내지 약 4시간, 약 4시간 내지 약 6시간, 약 6시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 1일, 또는 약 1일 내지 5일에 투여된다

[1005] 암을 갖는 인간을 치료하기에 적합한 치료 프로토콜은 예를 들어, 환자에게 CD39의 활성을 억제하는 항체 및 인간 CD73의 활성을 중화시키는 항체의 각각의 유효량을 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 방법은 항-CD39 항체의 적어도 하나의 용량은 1-20 mg/kg 체중의 용량으로 투여되고 항-CD73 항체의 적어도 하나의 용량은 1-20 mg/kg 체중의 용량으로 투여되는 적어도 하나의 투여 주기를 포함한다. 일 실시형태에서, 투여 주기는 2주 내지 8주이다.

[1006] 일 실시형태에서, 방법은 적어도 하나의 투여 주기를 포함하고, 여기서 주기는 8주 이하의 기간이고, 각각의 적어도 하나의 주기 동안, 항-CD39 항체의 2, 3, 또는 4 용량은 1-20 mg/kg 체중의 용량으로 투여되고 항-CD73 항체의 2, 3 또는 4 용량은 1-20 mg/kg 체중의 용량으로 투여된다.

[1007] 일 실시형태에서, 항-CD39 항체는 바람직한 기간 동안, 예를 들어, 1주, 2주, 1개월, 항-CD39 항체의 다음 연속 투여까지, sCD39 및/또는 memCD39의 효소 활성을 중화시키는데 유효한 양으로 투여된다. 일 실시형태에서, 항체는 sCD39 단백질의 ATPase 활성의 억제에 대해 적어도 EC_{50}, EC_{70} 또는 EC_{100} 과 동등한 항체의 혈액 농도를 제공하는 용량 및/또는 빈도로 투여되고, 임의로는 농도는 적어도 1주, 2주, 1개월, 또는 항-CD39 항체의 다음 연속 투여까지 유지된다.

[1008] 일 실시형태에서 항-CD73 항체 및 항-CD39 항체는 i.v로 투여된다. 일 실시형태에서 항-CD73 항체 및 항-CD39 항체는 동일한 날에, 임의로는 추가로 2주 마다 1회로, 임의로는 추가로 i.v를 통해 투여된다.

[1009] 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 치료는 CD39의 효소 활성의 중화에 대해서, 적어도 시험관내 EC_{50} (예를 들어, 0.01 내지 0.5 ㎍/mL의 EC_{50}), 임의로는 EC_{70} 또는 임의로는 EC_{100} (예를 들어, 0.05 내지 1 ㎍/mL, 0.1 내지 1 ㎍/mL의 EC_{100})에 상응하는 혈액 (혈청) 또는 혈관외 조직 (예를 들어, 종양 환경) 중 농도를, 항-CD39 항체의 2회 연속 투여 사이에, 획득 및/또는 유지하기에 유효한 양으로, 항-CD39 항체를 적어도 1회, 임의로는 적어도 2회 투여하는 적어도 하나의 투여 주기 동안, CD39의 효소 활성을 중화시키는 항-CD39 항체를 개체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 시험관내 EC_{50}, EC_{70} 또는 EC_{100} 은 예를 들어 항-CD39 항체의 중화 활성을 시험하기 위한 본 명세서에 개시된 방법에 따라서 결정할 수 있다. 항체는 예를 들어 순환계 또는 혈관외 조직 (예를 들어, 종양 환경)에서 적어도 약 0.1 ㎍/mL, 0.5 ㎍/mL, 1 ㎍/mL 또는 2 ㎍/mL의 농도를 획득 및/또는 유지하기 위한 양으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 0.05 내지 1 ㎍/mL, 또는 0.1 내지 1 ㎍/mL의 혈관외 조직 중 농도를 획득하기 위해서, 항-CD39 항체는 0.5 내지 10 ㎍/mL, 또는 1 내지 10 ㎍/mL의 항-CD39 항체의 순환계 중 농도를 획득하기에 유효한 양으로 투여된다. 임의로는, 항-CD39 항체는 항-CD39 항체의 농도 적어도 상기 언급된 농도를 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 항-CD39 항체의 2회 연속 투여 사이 및/또는 투여 주기 전반 동안 유지하기에 유효한 양으로 적어도 2회 투여된다.

[1010] 본 명세서의 임의의 실시형태에서, 치료는 CD73의 효소 활성의 중화에 대해서, 적어도 시험관내 EC_{50} (예를 들어, 0.01 내지 0.5 ㎍/mL의 EC_{50}), 임의로는 EC_{70} 또는 임의로는 EC_{100} (예를 들어, 0.05 내지 1 ㎍/mL, 0.1 내지 1 ㎍/mL의 EC_{100})에 상응하는 혈관외 조직 (예를 들어, 종양 환경) 또는 혈액 (혈청) 중 농도를, 항-CD73 항체의 2회 연속 투여 사이에 획득 및/또는 유지하기에 유효한 양으로, 항-CD73 항체를 적어도 1회, 임의로는 적어도 2회 투여하는 적어도 하나의 투여 주기 동안, CD73의 효소 활성을 중화시키는 항-CD73 항체를 개체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체는 적어도 약 0.1 ㎍/mL, 0.5 ㎍/mL, 1 ㎍/mL 또는 2 ㎍/mL)의 혈관외 조직 (예를 들어, 종양 환경) 또는 순환계 중 농도를 획득 및/또는 유지하는 양으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 0.05 내지 1 ㎍/mL, 또는 0.1 내지 1 ㎍/mL의 혈관외 조직 중 농도를 획득하기 위해서, 항-CD73 항체는 0.5 내지 10 ㎍/mL, 또는 1 내지 10 ㎍/mL의 항-CD73 항체의 순환계 중 농도를 획득하기에 유효한 양으로 투여된다. 임의로는, 항-CD73 항체는 항-CD73 항체의 농도 적어도 상기 언급된 농도를 적어도 1주, 2주, 3주, 4주 동안, 항-CD73 항체의 2회 연속 투여 사이 및/또는 투여 주기 전반에서 유지하기에 유효한 양으로 적어도 2회 투여된다.

[1011] 일정한 양상에서 항-CD39 작용제 및 항-CD73 작용제는 면역억제 및/또는 고갈의 하나 이상의 마커를 특징으로 하는 면역 이펙터 세포를 갖는 개체에서 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[1012] 일정한 양상에서 항-CD39 작용제 (임의로는 항-CD73 작용제와 병용 또는 임의로는 항-CD73 작용제와의 병용 치료 부재)는 항-CD73 작용제에 대한 반응에 대해 나쁜 질환 예후, 예를 들어 항-종양 면역 반응의 결여를 의미하고/하거나, 면역 고갈을 의미하고/하거나, 면역억제를 의미하는 하나 이상의 마커로 입증된 나쁜 예후 특히 CD73을 중화시키는 작용제 (예를 들어, 항-CD73 항체)를 사용한 치료에 대한 반응에 대해 나쁜 예후를 갖는 개체에서 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 나쁜 질환 예후를 갖는 개체는 예를 들어 하나 이상의 예측 인자를 기반으로, 보다 높은 진행 위험성이 있다. 일 실시형태에서, 예후 인자(들)는 하나 이상의 유전자에 돌연변이의 보유 또는 결여를 포함한다. 일 실시형태에서, 예후 인자(들)는 하나 이상의 유전자 또는 단백질 (예를 들어, 유전자 서명)의 발현 수준(들)을 포함한다.

[1013] 일 실시형태에서, 예후 인자(들)는 CD39 및/또는 CD73을 발현하는 순환계 또는 종양 환경 중 세포의 존재 (예를 들어, 개수), 및/또는 순환계 또는 종양 환경 중 세포 상에서 CD39 및/또는 CD73의 발현 수준을 포함하고; 일 실시형태에서, 세포는 종양 세포이고, 일 실시형태에서 세포는 백혈구, 예를 들어, B 세포, 조절성 T 세포 (Treg)이다. CD39 및/또는 CD73의 상승된 발현의 존재, 및/또는 CD39- 및/또는 CD73-발현 세포의 상승된 수준은 CD73을 중화시키는 항체를 사용한 치료에 대한 반응에 대해 나쁜 예후를 갖는 개체를 의미할 수 있다.

[1014] 일 양상에서, 항-CD39 작용제는 비반응자이거나, 또는 CD73을 중화시키는 작용제 (예를 들어, 항-CD73 항체)를 사용한 치료에 대해 부분 또는 불완전 반응을 경험하였거나, 또는 CD73을 중화시키는 작용제를 사용한 치료 이후에 그 질환이 진행된 개체에서 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 개체는 CD73을 중화시키는 작용제를 사용하는 병용 치료없이 (예를 들어, 항-CD39 단일요법으로서, 또는 항-CD39 항체 및 CD73을 중화시키는 작용제 이외의 제1 치료제의 병용으로서), 항-CD39 작용제를 사용하여 치료된다. 다른 실시형태에서, 개체는 CD73을 중화시키는 작용제와 병용하여 항-CD39 작용제를 사용해 치료된다.

[1015] 일 양상에서, 항-CD39 작용제는 CTLA-4 또는 PD-1 축을 억제하는 작용제 (예를 들어, 항체)에 대한 반응에 대해 나쁜 예후를 갖거나, 또는 비반응자이거나, 또는 CTLA-4 또는 PD-1 축을 억제하는 작용제 (예를 들어, 항체)를 사용한 치료에 대해 부분 또는 불완전 반응을 경험하였거나, 또는 CTLA-4 또는 PD-1 축을 억제하는 작용제 (예를 들어, 항체)를 사용한 치료 이후에 그 질환이 진행된 개체에서 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 개체는 CD73을 중화시키는 작용제를 사용하는 병용 치료없이 (예를 들어, 항-CD39 단일요법으로서, 또는 항-CD39 항체 및 CD73을 중화시키는 항체 이외의 제2 치료제의 병용으로서) 항-CD39 작용제를 사용해 치료된다. 다른 실시형태에서, 개체는 CD73을 중화시키는 항체와 병용하여 항-CD39 작용제를 사용해 치료된다.

[1016] 임의로는 추가로 CD73에 결합하고 억제하는 작용제와 병용하여, 항-CD39 항체 조성물은 하나 이상의 다른 치료 또는 치료제를 사용한 병용 (추가 병용) 치료일 수 있다. 이러한 치료제는 제한없이 항암제 및 화학요법제를 포함한다.

[1017] 일 실시형태에서, 추가적인 치료제는 종양 세포의 사멸을 유도하는 작용제 또는 치료, 예를 들어, 종양 세포로부터 ATP의 세포외 방출을 유도시킬 수 있는 작용제 또는 치료, 면역원성 암 세포 사멸을 유도하는 작용제 또는 치료이다. 세포외 ATP는 스트레스 (기계적, 저장성 또는 저산소성)의 경우에 또는 세포 사멸의 경우에 종양

세포로부터 방출된다. 괴사는 전체 세포 내용물의 방출을 통한 ATP의 수동 방출을 선호하는 반면, 아폽토시스는 파넥신1 (ATP 수송체)을 절단 및 활성화시키는 캐스파제 3 및 9의 활성화를 통한 ATP의 방출을 선호한다.

종양 세포로부터 ATP의 세포외 방출을 유도하는 작용제의 예는 화학요법, 방사선요법, 및 보다 일반적으로, 아폽토시스를 유도하여 ATP 방출을 선호하는 작용제를 포함할 수 있다. ATP의 세포외 방출을 유도하는 작용제는 면역원성 세포 사멸을 유도한다는 것이 확인되었다. 예를 들어, 실질적인 ATP 방출은 안트라사이클린, 옥살리플라틴, 시스플라틴 및 X선에 의해 유도된다. ATP의 세포외 방출을 유도하는 작용제의 추가 예는 탁산, 안트라사이클린, 캄프토테신, 에포틸론, 미토마이신, 콤브레타스타틴, 빈카 알칼로이드, 질소 머스타드, 마이탄시노이드, 칼리케아마이신, 두오카마이신, 튜불리신, 돌라스타틴 및 아우리스타틴, 엔다이인, 아마톡신, 피롤로벤조디아제핀, 에틸렌이민, 방사성동위원소, 치료적 단백질 및 펩티드, 및 이의 독소 또는 단편을 포함할 수 있다. 작용제는 예를 들어 유리 화합물로서 또는 접합체의 일부로서 포함되는, 임의의 적합한 구성 또는 제제로 존재할 수 있다. 작용제는 편리하게 표적화 모이어티, 예컨대 면역접합체에 접합될 수 있다. 용어 "면역접합체" 및 "항체 접합체"는 상호작용적으로 사용되고 항원 결합제, 예를 들어, 다른 모이어티 (예를 들어, 세포독성제)에 접합된 항체 또는 항체 결합 단백질을 의미한다. 세포독성제에 접합된 항원 결합제를 포함하는 면역접합체는 또한 "항체 약물 접합체" 또는 "ADC"라고 할 수 있다.

[1018] 일 실시형태에서, 추가적인 치료제는 CTLA-4 또는 PD-1 축을 억제하는 (즉, PD-1 또는 PD-L1을 억제하는) 작용제 (예를 들어, 항체)이다. CTLA-4, PD1 또는 PD-L1에 결합하는 항체는 예를 들어 이러한 작용제가 예를 들어 하기 기술된 바와 같이, 단일요법으로서 사용되는 예시적인 용량 및/또는 빈도로 사용될 수 있다.

[1019] 일 실시형태에서, 제2 또는 추가의 제2 치료제는 CTLA-4 또는 PD-1 축을 억제하는 (즉, PD-1 또는 PD-L1을 억제하는) 작용제 (예를 들어, 항체)이다. CTLA-4, PD1 또는 PD-L1에 결합하는 항체는 예를 들어, 이러한 작용제가 예를 들어 하기 기술된 바와 같이, 단일요법으로서 사용되는 예시적인 용량 및/또는 빈도로 사용될 수 있다.

[1020] PD-1는 또한 CD28, CTLA-4, ICOS 및 BTLA를 포함하는 수용체의 CD28 패밀리의 억제 구성원이다. PD-1은 활성화된 B 세포, T 세포, 및 골수 세포 상에서 발현된다 (Okazaki et al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8). PD-1에 결합시 T 세포 활성화를 하향조절한다는 것이 확인된, PD-1에 대한 2개 리간드, PD-L1 및 PD-L2가 확인되었다 (Freeman et al. (2000) J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. (2001) Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. (2002) Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1은 다양한 인간 암에 풍부하다 (Dong et al. (2002) Nat. Med. 8:787-9). PD-1 및 PD-L1 간 상호작용은 그 결과로 종양 침윤성 림프구의 감소, T-세포 수용체 매개 증식의 감소, 및 암성 세포에 의한 면역 회피를 야기시킨다. 면역 억제는 PD-L1와 PD-1의 국소 상호작용을 억제하여 반전시킬 수 있고, PD-L2와 PD-1의 상호작용이 역시 차단될 때 그 효과는 가산적이다. PD-1의 차단은 유리하게, 예를 들어 이의 천연 리간드 PD-L1과의 상호작용을 차단함으로써, PD-L1-유도된 PD-1 신호전달을 방지하는 항체의 사용을 포함할 수 있다. 일 양상에서, 항체는 PD-1에 결합하고 (항-PD-1 항체); 이러한 항체는 PD-1 및 PD-L1 간 및/또는 PD-1 및 PD-L2 간 상호작용을 차단할 수 있다. 다른 양상에서 항체는 PD-L1에 결합하고 (항-PD-L1 항체) PD-1 및 PD-L1 간 상호작용을 차단한다.

[1021] 현재 시판되거나 또는 임상 평가 중인 PD-1/PD-L1 경로를 차단하는 적어도 6종의 작용제가 존재하고, 이들 모두는 본 개시의 항-CD73 항체와 병용하여 유용할 수 있다. 한가지 작용제는 BMS-936558 (니볼루맙/ONO-4538, Bristol-Myers Squibb; 이전명 MDX-1106)이 있다. 니볼루맙 (상표명 Opdivo®)은 PD-1 및 CD80 둘 모두에 대한 PD-L1 리간드의 결합을 억제하는, FDA-승인된 전체 인간 IgG4 항-PD-L1 mAb이고 그 개시 내용이 참조로 본 명세서에 편입되는 WO 2006/121168에 항체 5C4로서 기술되어 있다. 흑색종 환자의 경우에, 가장 유의한 OR은 3 mg/kg의 용량에서 관찰되었고, 한편 다른 암 유형의 경우에는 10 mg/kg이었다. 니볼루맙은 일반적으로 암 진행까지 3주마다 10 mg/kg으로 투여된다.

[1022] 다른 작용제는 둘바루맙 (Imfinzi®, MEDI-4736)으로서, AstraZeneca/Medimmune이 개발하고 WO2011/066389 및 US2013/034559에 기술된 항-PD-L1이다.

[1023] 다른 작용제는 MK-3475 (Merck의 인간 IgG4 항-PD1 mAb)로서, 람브롤리주맙 또는 펨브롤리주맙 (상표명 Keytruda®)이라고도 하며 흑색종의 치료에 대해 FDA가 승인하였고 다른 암에서는 시험 중이다. 펨브롤리주맙은 질환 진행까지 2주 또는 3주 마다 2 mg/kg 또는 10 mg/kg으로 시험되었다.

[1024] 다른 작용제는 아테졸리주맙 (Tecentriq®, MPDL3280A/RG7446, Roche/Genentech)으로서, FcγR 결합 및 그에 따른 항체-의존적 세포의 세포독성 (ADCC)을 최소화시킴으로써 효능 및 안전성을 최적화하도록 설계된 조작된

Fc 도메인을 함유하는 인간 항-PD-L1 mAb이다. ≤ 1, 10, 15, 및 25 mg/kg의 용량으로 MPDL3280A가 1년 이하 동안 3주마다 투여되었다. 3상 실험에서, MPDL3280A는 NSCLC에서 3주마다 정맥내 주입을 통해 1200 mg이 투여된다.

[1025] 추가의 공지된 PD-1 항체 및 다른 PD-1 억제제는 세미플리맙 (Sanofi and Regeneron Pharmaceuticals), MGA012 (Macrogenics inc. 및 Incyte Corp.), 피들리주맙 (CT-011; CureTech) (CureTech/Teva의 인간화 IgG1 항-PD1 mAb, 예를 들어, WO2009/101611 참조), AMP-224 (GSK가 허가받은 B7-DC/IgG1 융합 단백질), WO 2012/145493에 기술된 AMP-514, WO2010/077634에 기술된 항체 YW243.55.S70 (항-PD-L1), WO2007/005874에 기술된 Bristol-Myers Squibb가 개발한 항-PD-L1 항체인, BMS-936559로도 공지된 MDX-1105, 및 WO2006/121168, WO2009/014708, WO2009/114335 및 WO2013/019906에 기술된 항체 및 억제제를 포함하고, 이들 개시 내용은 참조로 본 명세서에 편입된다. 항-PD1 항체의 추가 예는 WO2015/085847 (Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co. Ltd.)에 기술되어 있다. PD-1 또는 PD-L1과의 결합에 대해 임의의 이들 항체와 경쟁하는 항체가 또한 사용될 수 있다.

[1026] CD152라고도 알려진, CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)는 CD28 수용체 패밀리의 다른 억제 구성원이고, T 세포 상에서 발현된다. CTLA-4에 결합하고 억제하는 항체는 당분야에 공지되어 있다. 일례에서, 항체는 인간 IgG 항체인, 이필리무맙 (상표명 Yervoy®, Bristol-Myers Squibb)이다. 일례에서, 항체는 트레멜리무맙 (CP-675,206; Medimmune/AstraZeneca)이다. Yervoy에 대한 예시적인 투여 용법은 3주마다 90분 동안 정맥내 3 mg/kg이다. 일례에서, 본 개시의 항-CD73 항체와 병용하여 사용되는 항체는 CTLA-4와의 결합에 대해 이필리무맙 또는 트레멜리무맙과 경쟁하는 항체이다.

[1027] **실시예**

[1028] **방법**

[1029] *CD39 돌연변이체의 생성*

[1030] CD39 돌연변이체는 PCR로 생성시켰다. 증폭된 서열을 아가로스 겔 상에서 러닝시켰고 Macherey Nagel PCR 클린-업 겔 추출 키트 (참조 740609)를 사용해 정제하였다. 각 돌연변이체에 대해 생성된 정제된 PCR 생성물은 이후에 ClonTech InFusion 시스템을 사용하여 발현 벡터에 결찰시켰다. 돌연변이된 서열을 함유하는 벡터는 미니프렙으로 제조하였고 서열분석하였다. 서열분석 후, 돌연변이된 서열을 함유하는 벡터는 Promega PureYield™ 플라스미드 미디프렙 시스템을 사용하여 미디프렙으로 제조하였다. HEK293T 세포는 DMEM 배지 (Invitrogen)에서 성장시켰고, Invitrogen의 Lipofectamine 2000을 사용하여 벡터로 형질감염시켰으며, 이식유전자 발현을 시험하기 전에 48시간 동안 CO_2 인큐베이터에 37℃에서 인큐베이션시켰다. 돌연변이체는 하기 표에 표시된 바와 같이 Hek-293T 세포에 형질감염시켰다. 하기 표 1에서 표적화된 아미노산 돌연변이는 SEQ ID NO: 2의 번호매김을 사용하여 표시된다.

[1031] 표 1

돌연변이체	치환					
1	V77G	H79Q	Q444K	G445D		
2A	V81S	E82A	R111A	V115A		
2B	E110A	R113T	E114A			
3	R118A	S119A	Q120K	Q122H	E123A	
4	D150A	E153S	R154A	S157K	N158A	L278F
5	Q96A	N99A	E143A	R147E		
6	K188R	잔기 190 내지 207의 KTPGGS로의 치환				
7	A273S	N275A	I277S	R279A		
8	S294A	K298G	K303A	E306A	T308K	Q312A
9	K288E	K289A	V290A	E315R		
10A	Q354A	D356S	E435A	H436Q		
10B	H428A	T430A	A431D	D432A		
11	N371K	L372K	E375A	K376G	삽입 377V	V377S
12	K388N	Q392K	P393S	E396A		
13	A402P	G403A	K405A	E406A		
15	K87A	E100A	D107A			
16	Q323A	Q324A	Q327A	E331K		
17	N334A	S336A	Y337G	N346A		
18	Q228A	I230S	D234A	Q238A		
19	R138A	M139A	E142K			

[1032]

[1033] *가용성 huCD39의 클로닝, 생성 및 정제*

[1034] *분자 생물학*

[1035] huCD39 단백질은 하기의 프라이머를 사용하여 인간 PBMC cDNA로부터 클로닝되었다: TACGACTCACAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGATACAAAGGAGTC (SEQ ID NO: 38) (전방향), 및 CCGCCCCGACTCTAGATCACTTGTCATCGTCATCTTTGTAATCGACATAGGTGGAGTGGGAGAG (SEQ ID NO: 56) (역방향). 정제된 PCR 생성물은 InFusion 클로닝 시스템을 사용하여 발현 벡터에 클로닝되었다. M2 태그 (FLAG 태그, SEQ ID NO: 39에 밑줄표시)는 정제 단계를 위해 단백질의 C-말단에 첨가되었고, CD39 세포외 도메인 단백질 (예를 들어, SEQ ID NO: 54)은 임의 실시형태에서, 임의로, M2 태그가 결여된 것으로 명시될 수 있다는 것을 이해하게 될 것이다.

[1036] *huCD39 단백질의 발현 및 정제*

[1037] 클로닝된 서열의 검증 이후에, CHO 세포는 핵도입되었고 생성된 풀은 서브클로닝하여 huCD39 단백질을 생성하는 세포 클론을 수득하였다. 롤러에서 성장시킨 huCD30 클론 유래의 상층액을 회수하였고 M2 크로마토그래피 컬럼을 사용해 정제하였으며 M2 펩티드를 사용해 용리시켰다. 다음으로 정제된 단백질을 S200 크기 배제 크로마토그래피 컬럼 상에 로딩하였다. 단량체에 상응하는 정제된 단백질은 TBS PH7.5 완충액에 배합시켰다.

M2 태그가 없는 CD39-M2 세포외 도메인 재조합 단백질의 아미노산 서열은 다음과 같았다:

MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALLAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIY
KWPAEKENDTGVVHQVEECRVKGPGISKFVQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPV
YLGATAGMRLLRMESEELADRVLDVVERSLSNYPFDFQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGK
FSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNALQFRLYGKDYNVY
THSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCFHPGYKKVVNVSDLYKTPCTKRFEMTLP
FQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNL
TSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADS
WEHIHFIGKIQGSDAGWTLGYMLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYV
(SEQ ID NO: 5).

[1038]

[1039] M2 태그가 존재하는 CD39-M2 세포외 도메인 재조합 단백질의 최종 아미노산 서열은 다음과 같았다:

MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALLAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIY
KWPAEKENDTGVVHQVEECRVKGPGISKFVQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPV
YLGATAGMRLLRMESEELADRVLDVVERSLSNYPFDFQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGK
FSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNALQFRLYGKDYNVY
THSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCFHPGYKKVVNVSDLYKTPCTKRFEMTLP
FQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNL
TSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADS
WEHIHFIGKIQGSDAGWTLGYMLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYVDYKDDDDK
(SEQ ID NO: 54).

[1040]

[1041] *가용성 CD39의 효소 활성의 억제*

[1042] 생성된 가용성 CD39 단백질의 효소 활성의 항체에 의한 억제는 존재하는 ATP의 양에 비례하는 발광 신호를 발생시키는 시약의 사용을 통해서 ATP 가수분해의 평가를 가능하게 하는 Cell Titer Glo™ (Promega, 참조 G7571)를 사용하여 평가하였다. 이러한 방식으로, 가용성-CD39-매개 ATP 가수분해의 억제를 평가할 수 있다. 간략하게, 100 μg/mL 내지 $6x10^{-3}$ μg/mL의 용량 범위의 항-CD39 항체를 방법 부문에 기술된 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 54)을 갖는 400 ng/mL의 가용성 재조합 인간 CD39 단백질과 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 20 μM ATP가 CTG (Cell Titer Glo) 시약의 첨가 전에 추가 30분 동안 37℃에서 플레이트에 첨가되었다. 발광되는 빛은 암실에서 5분의 짧은 인큐베이션 기간 이후에 Enspire™ 광도계를 사용하여 정량되었다. 항-CD39 항체 효능은 항체 존재 하에서 발광된 빛을 ATP 단독 (최대 발광) 및 가용성 CD39 단백질과 함께한 ATP (최소 발광)와 비교하여 결정하였다.

[1043] *세포 CD39의 효소 활성의 억제*

[1044] 항체에 의한 CD39-발현 세포에서 CD39 효소 활성의 억제는 존재하는 ATP의 양에 비례하는 발광 신호를 발생시키는 시약의 사용을 통해서 ATP 가수분해의 평가를 가능하게 하는 Cell Titer Glo™ (Promega, 참조 G7571)를 사용하여 평가하였다. 따라서, 어세이는 세포 배양 상청액 중 CD39에 의해 가수분해된 ATP의 억제의 평가가 가능하도록 설계되었다. 간략하게, $5x10^{4}$ Ramos 인간 림프종 세포, $5x10^{3}$ 인간 CD39-발현 CHO 세포, 사이노몰거스 CD39-발현 CHO 세포 및 마우스 CD39-발현 CHO 세포를 1시간 동안 37℃에서 30 μg/mL 내지 $5x10^{-4}$ μg/mL의 항-CD39 항체와 인큐베이션시켰다. 그 다음으로 세포를 20 μM ATP와 추가 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션시켰다. 플레이트를 2분 동안 400g에서 원심분리하였고 50 μℓ의 세포 상청액을 발광 마이크로플레이트 (흰색 웰)로 옮겼다. 50 μℓ의 CellTiter-Glo® 시약 (CTG)을 상청액에 첨가하였고 발광되는 빛을 Enspire™ 광도계를 사용하여 암실에서 5분 인큐베이션 후에 정량하였다. 항-CD39 항체 효능은 항체의 존재 하에서 발광된 빛을 ATP 단독 (최대 발광) 및 세포와 함께한 ATP (최소 발광)와 비교하여 결정하였다.

[1045] *항체의 생성: 마우스에서 면역화 및 스크리닝*

[1046] 항-인간 CD39 항체를 수득하기 위해서, Balb/c 마우스를 상기 기술된 재조합 인간 CD39-M2 세포외 도메인 재조합 단백질로 면역화시켰다. 마우스는 50 μg의 CD39 단백질 및 완전 프로인트 보강제의 에멀션으로 1회 1차-

면역접종을 받았고, 50 ㎍의 CD39 단백질 및 불완전 프로인트 보강제의 에멀션으로 2차 면역접종을 복강내로 받았으며, 최종적으로 정맥내로 10 ㎍의 CD39 단백질로 부스팅되었다. 면역 비장 세포는 부스팅 이후 3일에 X63.Ag8.653 불멸화 B 세포와 융합시켰고, 조사된 비장 세포의 존재 하에서 배양시켰다. 하이브리도마는 반고형 메틸셀룰로스-함유 배지에 플레이팅시켰고 성장된 클론은 clonepix 2 장비 (Molecular Devices)를 사용해 선택하였다.

[1047] **실시예 1: 기지의 중화 CD39 mAb의 에피토프 맵핑**

[1048] 세포 CD39의 효소 (ATPase) 활성을 억제하는 항체의 기능에 대한 통찰력을 얻기 위해서, 우리는 세포 어세이에서 CD39의 ATPase 활성을 억제하는 것으로 보고된 항체가 결합하는 에피토프를 조사하였다: PCT 공개 특허 출원 번호 WO2009/095478에 개시된 BY40.

[1049] 항-CD39 항체의 에피토프를 정의하기 위해서, 우리는 CD39의 표면 상의 분자 표면에 노출된 아미노산의 치환에 의해 정의되는 CD39 돌연변이체를 설계하였다. 돌연변이체는 SEQ ID NO: 2의 번호매김을 사용하여, 표 1에 표시된 바와 같이, Hek-293T 세포에 형질감염시켰다.

[1050] I-394의 용량 범위 (10 - 2.5 - 0.625 - 0.1563 - 0.0391 - 0.0098 - 0.0024 - 0.0006 ㎍/mL)를 유세포측정을 통해서 20종의 생성된 돌연변이체에서 시험하였다. BY40 항체 둘 모두는 임의의 다른 돌연변이체에 대한 결합의 소실없이, CD39의 돌연변이체 5를 발현하는 세포에 대한 결합의 완전한 소실을 가졌다. 돌연변이체 5는 잔기 Q96, N99, E143 및 R147에 아미노산 치환을 함유한다. CD39의 표면 상에서 돌연변이체 5의 위치는 **도 3A**에 도시되어 있다.

[1051] **실시예 2: 기지의 중화 CD39 mAb는 재조합 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성을 억제할 수 없다**

[1052] 세포 어세이에서 CD39의 ATPase 활성을 억제하는 것으로 보고된 2종 항체 (BY40 및 BY12)는 재조합 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성을 억제할 수 있는지 여부를 결정하기 위해 평가되었다. 상기 기술된 바와 같이 생성된 가용성 CD39 단백질의 효소 활성의 항체에 의한 억제는 Cell Titer Glo™ (Promega, 참조 G7571)를 사용해 평가되었다. 세포 CD39 단백질의 효소 활성의 항체에 의한 억제는 상기 표시된 대로 평가되었다.

[1053] 예상한 바와 같이, BY40은 세포에서 CD39 단백질의 ATPase 활성을 억제하였다. 그러나, BY40는 가용성 CD39 단백질의 효소 활성을 억제할 수 없었다. **도 2B**는 본 명세서에서 확인된 신규 항체와 BY40의 비교를 도시한다.

[1054] **실시예 3: sCD39 활성을 차단하는 신규한 mAb에 대한 스크리닝**

[1055] 일련의 면역접종은 sCD39의 ATPase 활성을 중화시키는 항체를 찾기 위해 수행되었다. 항-인간 CD39 항체를 수득하기 위해서, 상기 기술된 재조합 인간 CD39-M2 세포외 도메인 재조합 단백질로 동물을 면역화시켰다. 총 15회의 면역화가 상이한 프로토콜 및 상이한 동물을 사용해 수행되었다. 상이한 마우스 품종, 래트 및 토끼가 포함되었다.

[1056] 초기 면역화 프로토콜에서, 1차 스크리닝은 야생형 CHO 및 huCD39를 발현하는 CHO 세포주를 사용하여 유세포측정을 통해 성장하는 클론의 상청액 (SN)을 시험하는 단계를 포함하였다. 세포는 각각 0.1 μM 및 0.005 μM의 CFSE로 염색시켰다. 유세포측정 스크리닝을 위해서, 모든 세포는 동일하게 혼합하였고, 상청액 중 반응 항체의 존재는 APC로 표지된 염소 항-마우스 다클론 항체 (pAb)로 확인하였다. huCD39에 결합된 항체의 경우, 상기 기술되고 개발된 스크리닝 어세이 (방법)를 사용하여 가용성 CD39의 효소 활성의 억제에 대해 상청액을 스크리닝하였다.

[1057] 결과는 수많은 특이적 CD39-결합 항체를 수득할 수 있었지만, 임의의 이들 면역화에 의한 항체의 어떠한 것도 가용성 CD39의 효소 활성의 억제를 보이지 않았다. 한가지 가능성은 CD39 상의 우성 에피토프가 CD39의 촉매 부위에 또는 그 근처에 적합하게 위치된 임의의 에피토프를 포함하지 않는다는 것이다. 세포 CD39를 억제하는 이용가능한 소수의 항체 및 항체를 사용하여 효소의 촉매 부위를 억제시 알려진 어려움의 관점에서, sCD39를 중화시키는 항체의 부재는 가용성 (세포외 도메인) CD39를 억제하는 항체를 수득하는 것이 가능하지 않다는 것을 의미할 수 있다. 다른 가능성은 특히 가용성 CD39를 억제할 수 있는 임의 항체의 결여가 sCD39 차단 어세이의 검증을 방해하므로, 비기능적 스크리닝 어세이 및/또는 부적절하게 폴딩되거나 또는 기능하는 가용성 CD39 단백질과 관련된다.

[1058] 가용성 CD39를 억제할 수 있는 항체의 부재 관점에서, 항체 BY40의 에피토프에 의해 확인시 CD39의 활성 부위에 결합하는 항체의 생성을 촉진하도록 설계된 스크리닝 프로토콜을 사용하여 추가 면역화를 수행하였다. 간략

하게, 1차 스크리닝은 이전 면역화에서처럼, 야생형 CHO 및 huCD39를 발현하는 CHO 세포주를 사용하는 유세포측정에 의해 성장하는 클론의 상청액 (SN)을 시험하고, 이후 표 1에 표시된 바와 같이, 야생형 CD39와 비교하여, CD39 돌연변이체 5를 발현하는 Hek-293T 세포와의 결합 소실에 대해 스크리닝하는 것을 포함한다. 돌연변이체 5는 잔기 Q96, N99, E143 및 R147에 치환을 갖는다. 그러나, 역시 결과는 돌연변이체 5와의 결합 소실을 보이는 수많은 특이적 CD39-결합 항체를 수득할 수 있었지만, 임의의 초기 면역화에 의한 항체의 어떠한 것도 가용성 CD39의 효소 활성의 임의 억제를 보이는 것은 없었다는 것을 보여준다.

[1059] **실시예 4: 에피토프-지정 스크리닝의 일부로서 sCD39 활성을 억제하는 제1 항체의 확인**

[1060] BY40-유사 항체와 경쟁하지 않는 항체를 갖기 위해서 Q96, N99, E143 및 R147 영역 (돌연변이체 5에 의해 정의)에 결합하지 않는 항-CD39 항체를 확인하고자 하였다. CD39의 ATPase 활성을 차단하는 어떠한 능력도 가질 필요가 없는 이러한 항체는 예를 들어, 세포 CD39를 억제하는 BY40 또는 BY40-유사 항체의 존재 하에서 세포 상의 유리 Cd39 단백질을 검출하고 정량하기 위해, BY40 결합 부위에 결합하는 세포 CD39를 억제하는 항체의 약리학 실험에 유용할 수 있다.

[1061] 하이브리도마를 CD39 돌연변이체 5와의 결합 소실에 대해 스크리닝한 실시예 3의 면역화의 결과로부터 출발하여, CD39 돌연변이체 5와의 결합 소실을 보이는 것이 아닌 하이브리도마를 선택하였다. 이러한 하이브리도마 (I-394)는 돌연변이체 5와의 결합에서 가능한 부분 감소를 나타내는 미확정 데이타에 기인하여 아마도 광범위한 풀 중 하나였지만, I-394는 돌연변이체 5와의 결합을 상실하지 않았고 따라서 초기에 보유되지 않았었다.

[1062] 가용성 CD39의 효소 활성의 억제에 대한 추가 면역화로부터의 상청액의 진행중인 스크리닝의 상황에서, 클로닝되어 생성된 항체 I-394가 대조군으로서 포함되었다. 놀랍게도, 항체 I-394가 에피토프-지정 스크리닝에서 유지된 클론 중 하나가 아님에도 불구하고, 이 항체는 상기 기술된 어세이 (방법)에서 가용성 CD39의 효소 활성의 강력한 억제를 보였다

[1063] I-394는 인간 Fcγ 수용체 CD16A, CD16B, CD32A, CD32B 및 CD64와의 결합 결여를 야기시키는 돌연변이 L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (카밧 EU 번호매김)를 갖는 변형된 Fc 도메인을 갖는, IgG1 이소타입의 인간 불변 영역을 갖게 생성되었다. 간략하게, I-394 항체의 VH 및 Vk 서열 (각각 SEQ ID NO: 6 및 7에 표시된 VH 및 Vk 가변 영역)은 각각 상기 언급된 돌연변이를 보유하는 huIgG1 불변 도메인 및 huCk 불변 도메인을 함유하는 발현 벡터에 클로닝되었다. 2종의 수득된 벡터를 CHO 세포주에 공동 형질감염시켰다. 확립된 세포 풀을 사용하여 CHO 배지 중에서 항체를 생성시켰다. 그 다음으로 항체는 단백질 A를 사용하여 정제되었다. I-394의 각각의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열은 하기에 표시되어 있다 (카밧 CDR은 밑줄 표시됨).

[1064] I-394 중쇄 가변 도메인 서열:

[1065] EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT**DYNMH**WVKQSHGRTLEWIG**YIVPLNGGSTFNQKFKG**RA TLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCAR**GGTRFAY**WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 6).

[1066] I-394 경쇄 가변 도메인 서열:

[1067] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC**RASESVDNFGVSFMY**WFQQKPGQPPNLLIY**GASNQGS**GVPARFRG SGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFC**QQTKEVPYT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 7).

[1068] L234A/L235E/G237A/A330S/P331S 치환 (N297-연결된 글리코실화 보유)을 갖는, 인간 IgG1 불변 영역을 가지는 I-394의 중쇄 및 경쇄 서열은 하기에 표시된다:

[1069] I-394 중쇄 서열:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT**DYNMH**WVKQSHGRTLEWIG**YIVPLNGGSTFNQKFKG**RA
TLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCAR**GGTRFAY**WGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1070] (SEQ ID NO: 52).

[1071] I-394 경쇄 서열:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC**RASESVDNFGVSFMY**WFQQKPGQPPNLLIY**GASNQGS**GVPARFRG
SGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFC**QQTKEVPYT**FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC

[1072] (SEQ ID NO: 53).

[1073] 다음으로 항체 I-394는 CD39의 표면 상에 분자 표면에서 노출된 아미노산의 치환에 의해 정의되는 CD39 돌연변이체와의 결합 소실에 대해 시험되었다. 표 1에 표시된 바와 같이, SEQ ID NO: 2의 번호매김을 사용한 돌연변이체를 Hek-293T 세포로 형질감염시켰다. 항체 I-394의 용량 범위는 유세포측정을 통해 20종 돌연변이체에 대해 시험되었다. **도 3B**에 도시된 바와 같이, I-394는 CD39의 돌연변이체 19를 발현하는 세포와의 결합의 완전한 소실을 보였다. 돌연변이체 19는 잔기 R138, M139 및 E142에 치환을 포함한다. 따라서 I-394의 코어 에피토프는 하나 이상 (또는 전부)의 잔기 R138, M139 및 E142를 포함한다.

[1074] 돌연변이체 5와의 결합을 상실하고 가용성 CD39가 아닌 세포 CD39를 억제하는 능력을 갖는 이전 항체 BY40과 달리, 항체 I-394는 인접한 돌연변이체 19와의 결합을 상실하였고, 돌연변이체 5와의 결합은 강력하게 감소되었다 (그러나 돌연변이체 5와의 일부 잔여 결합 존재). 흥미롭게도, 돌연변이체 19의 잔기는 잔기 5와 매우 근접하거나 또는 인접하여, I-394는 BY40과 비교해 에피토프의 이동을 나타낼 수 있다. 따라서 항체 I-394는 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성의 억제를 가능하게 하는 항-CD39 항체에 대한 가치있는 신규 에피토프를 제시한다. 또한 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성을 중화하는 추가 항체를 검출하기 위한 스크리닝 어세이의 검증 및 시험을 가능하게 하는 특이적 양성 대조군을 제공한다.

[1075] **실시예 5: sCD39-중화 mAb에 대한 비-에피토프 지정 스크리닝**

[1076] 가용성 CD39의 항체-매개 억제가 가능하다는 것을 의미하는 실시예 4의 결과를 기반으로, sCD39의 ATPase 활성을 중화시키는 항체를 찾기 위해서 실시예 3의 상이한 프로토콜을 사용한 상이한 면역화로부터의 융합체가 고안되었다.

[1077] ATPase 억제에 대한 스크리닝을 위한 상이한 접근법이 평가되었다. 한 실험에서, I-394 항체는 가용성 CD39의 ATPase 활성을 억제하는 능력에 대해 음성으로 확인된 실시예 3의 면역화의 하이브리도마 유래의 상청액을 섞는데 사용되었다. 상청액에 I-394의 이러한 첨가는 CD39의 ATPase 활성을 억제하는 음성 상청액의 능력을 복원시키지 않았다. 다음으로 항체 I-394는 단백질 A 코팅된 비드를 사용하여 음성 상청액으로부터 정제되었고, 우리는 정제된 I-394가 다시 ATPase 활성을 억제할 수 있고 복원되었다는 것을 관찰하였다.

[1078] 전술한 결과의 관점에서, 새로운 면역화 및 스크리닝 프로토콜은 신규 및 과거 면역화에 의해 성장하는 클론을 가용성 CD39 또는 세포 CD39 ATPase 활성의 억제의 평가 없이, 에피토프에 대한 스크리닝 편중없이 야생형 CHO 및 huCD39를 발현하는 CHO 세포주를 사용해 유세포측정으로 스크리닝하는 것이 개발되었다. 돌연변이체 5 또는 19에 대한 결합 소실과 관련된 데이타가 일부 하이브리도마로부터 입수가능하였지만, 이러한 데이타는 클론 선택을 위해 사용되지 않고 단지 ATPase 차단 어세이에서 음성 결과의 사건에서 클로닝의 하이브리도마를 구제하는 목적을 위해 보유되었다. CD39에 결합하는 하이브리도마가 선택되었고 클로닝되었고, 하기 프로토콜에 따라 단백질 A를 사용하여 정제되었다:

[1079] - 300 ㎕의 하이브리도마 상청액에 10 ㎕의 단백질 A 비드를 첨가한다.

[1080] - NaCl을 1.5 M의 최종 농도로 첨가한다.

[1081] - 튜브를 3-4시간 동안 4℃에서 회전시킨다.

[1082] - 1분간 1500 rpm에서 원심분리한다.

[1083] - 상청액을 제거하고 3회 1 mL의 TBS로 세척한다.

[1084] - 3차 세척 후 모든 TBS를 제거한다.

[1085] - 50 ㎕의 시트레이트 0.1 M, pH 3을 첨가하고, 균질화시키고 RT에서 5분 동인 인큐베이션시킨다.

[1086] - 비드를 1분 동안 1500 rpm에서 원심분리한다.

[1087] - 50 ㎕의 용리액을 회수하고 신속하게 450 ㎕의 TBS를 첨가하고 4℃에 보관한다.

[1088] 다음으로 수득된 항체는 I-394와 유사한 정도로 CD39의 ATPase 활성을 억제하는 능력에 대해 비교 어세이에서 스크리닝되었다. 가용성 및 세포 CD39의 효소 활성의 억제에 사용된 어세이는 상기에 기술된 바와 같다 (방법). 놀랍게도, 이러한 방식으로 생성된 예시적인 항체 중에서, 몇몇은 가용성 CD39의 억제 (뿐만 아니라 세포 CD39의 억제)를 보였다. **도 1**은 양성 대조군 I-394 항체와 비교하여 항체 I-397, I-398 및 I-399를 보여주는 대표적인 스크리닝 결과이다. 유사하게, 상이한 면역화에 의한 항체 I-395 및 I-396은 가용성 CD39 단백질의 효소 활성을 억제하였다. **도 2A 및 2B**는 더 많은 양의 항체가 가용성 및 세포 CD39 중화 둘 모두를 위한 추가 실험에 이용가능한 항체 I-395 및 I-396에 대한 결과를 도시한다. **도 2A**는 항체 I-395 및 I-396 둘 모두는 BY40 및 I-394 항체와 비교하여 세포-막 결합된 CD39를 억제하고, I-394 및 I-395 둘 모두는 BY40과 비교하여 세포 CD39의 최대 억제 및 보다 큰 역가를 보인다는 것을 도시한다. **도 2B**는 항체 I-395 및 I-396 둘 모두가 BY40 및 I-394 항체와 비교하여 가용성 CD39를 억제한다는 것을 도시한다. BY40가 임의 농도에서 가용성 CD39를 억제하지 않은데 반해서, I-394, I-395 및 I-396은 모두가 가용성 CD39를 억제하였는데 I-394가 최대 역가를 보였고, 그 다음으로 I-395 및 그 다음으로 I-396이 보다 낮은 역가를 보였다.

[1089] 수득된 결과는 하이브리도마 상청액 중 인자(들)가 세포 배양 및 가용성 CD39 어세이 둘 모두에서 ATP를 신속하게 가수분해하여, ATP에 대한 신호가 통상의 방법을 사용하는 항체의 스크리닝에서 검출되지 않을 가능성을 제기한다. 가용성 인자는 예를 들어 융합 파트너에 의해 생성되는 CD39 또는 일부 다른 효소일 수 있다.

[1090] 다음으로, I-394에 대해 본 명세서에서 표시된 바와 동일한 방식으로, 인간 Fcɣ 수용체 CD16A, CD16B, CD32A, CD32B 및 CD64와의 결합 결여를 야기하는 돌연변이 L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (카밧 EU 번호매김)를 갖는 IgG1 Fc 도메인을 갖는 인간 불변 영역을 갖도록 변형된, 항체를 클로닝하였다. 다음으로 최종 항체를 적정하고 역가에 따라 항체를 순위매기도록 EC_{50} 및 IC_{50} 결정을 평가하기 위해 실시예 7-9 (적정, ATPase 활성의 억제)에 표시된 바와 같은 보다 상세한 활성 평가를 수행할 수 있다.

[1091] **실시예 6: sCD39 중화 mAb의 에피토프 맵핑**

[1092] 실시예 4에 표시된 바와 같이, I-394는 CD39의 돌연변이체 19를 발현하는 세포와의 결합의 완전한 소실을 보였지만, 돌연변이체 5와의 결합은 소실되지 않았다. 실시예 5의 추가 항-CD39 항체의 에피토프를 정의하기 위해서, 그들을 실시예 1 및 표 1에 기술된 바와 같은 CD39 돌연변이체의 패널과의 결합의 소실에 대해 시험하였다. 돌연변이체는 SEQ ID NO: 1의 번호매김을 사용하여 표 1에 표시된 바와 같이, Hek-293T 세포에 형질감염시켰다. 용량 범위의 시험 항체 (10 - 2.5 - 0.625 - 0.1563 - 0.0391 - 0.0098 - 0.0024 - 0.0006 ㎍/mL)는 유세포측정에 의해 20종의 생성된 돌연변이체에 대해 시험되었다.

[1093] 결과는 가용성 CD39를 억제하는 능력에 대해 실시예 5에서 선택된 항체가 몇몇 상이한 에피토프를 나타낸다는 것을 보여주었다. 실시예 5에서 가용성 세포외 CD39의 억제를 보여주는 항체 중에서, 항체 I-395는 잔기 Q96, N99, E143 및 R147에 치환을 갖는 돌연변이체 5와의 결합 소실, 및 또한 잔기 R138, M139 및 E142에 치환을 갖는 돌연변이체 19와의 결합 소실을 보이는 항체의 예이다. 돌연변이체 19는 잔기 R138, M139 및 E142에 치환을 포함한다. 따라서 I-395의 CD39 상의 코어 에피토프는 잔기 Q96, N99, E143 및 R147 중 1, 2, 3 또는 4개를 비롯하여 잔기 R138, M139 및 E142 중 1, 2, 또는 3개를 포함한다.

[1094] 다른 한편으로 항체 I-398은 잔기 R138, M139 및 E142에 치환을 갖는 돌연변이체 19와의 결합의 소실을 보이지만, 잔기 Q96, N99, E143 및 R147에 치환을 갖는 돌연변이체 5와의 결합의 소실이나 또는 감소를 갖지 않는 항

체의 예이다.

[1095] 실시예 5에서 가용성 세포외 CD39의 억제를 보인 다른 항체는 매우 상이한 에피토프를 가졌고, 돌연변이체 5 또는 19와의 결합의 소실을 보이지 않아서, 가용성 CD39가 또한 sCD39 상의 다른 부위와의 결합에 의해 억제될 수 있다는 것을 시사한다. 일부 항체의 경우에, 표 1의 20종 돌연변이체 중 하나와의 결합 소실은 CD39 상의 결합 부위의 국재화를 가능하게 하였지만, 나머지의 경우 임의의 20종 돌연변이체와의 결합이 소실되지 않아서 결합 부위는 결정되어야 하는 채로 남아있다. 실시예 5에서 가용성 CD39의 ATPase 활성의 억제를 보이는 항체 중에서, 항체 I-396은 임의의 다른 20종 돌연변이체와의 결합 소실없이, 치환 K87A, E100A 및 D107A을 갖는 돌연변이체 15와의 결합 소실을 보였다. 따라서 이 항체의 CD39 상의 코어 에피토프는 잔기 K87, E100 및 D107 중 하나 이상 (또는 전부)을 포함한다. 항체 I-399는 임의의 다른 20종 돌연변이체와의 결합 소실없이, 치환 N371K, L372K, E375A, K376G, V377A 및 K376 내지 V377 사이에 발린의 삽입 (표 1에서 "삽입 377V")을 갖는 돌연변이체 11과의 결합 소실을 보였다. 따라서 이 항체의 CD39 상의 코어 에피토프는 하나 이상 (또는 전체)의 잔기 N371, L372, E375, K376 및 V377을 포함한다. **도 3A**는 CD39 단백질의 표면 상에서 돌연변이체 5 (M5), 15 (M15) 및 19 (M19)의 돌연변이된 잔기의 위치를 도시한다. **도 3B**는 상이한 항체에 대한 돌연변이체 5, 15 및 19의 결합 결과를 도시한다.

[1096] 따라서 결과는 가용성 CD39를 억제하는 항체가 상이한 에피토프에 대해서 수득될 수 있다는 것을 보여준다. 에피토프는 가용성 CD39는 억제하지 않고 오직 세포 CD39를 억제하는 BY40 또는 BY40-유사 항체의 결합 부위에 인접하여 위치된 돌연변이체 19의 하나 이상의 잔기에 의해 정의되는 에피토프 (돌연변이체 5와의 결합은 소실), BY40 또는 BY40-유사 항체와 비교하여 가능하게 약간의 이동을 의미하는 돌연변이체 19의 하나 이상의 잔기와 또한 부분적으로 돌연변이체 5에 의해 정의되는 에피토프, 돌연변이체 5의 잔기가 아닌 돌연변이체 19의 하나 이상의 잔기에 의해 정의되는 에피토프를 비롯하여, 다른 에피토프 예컨대 돌연변이체 11의 하나 이상의 잔기 또는 돌연변이체 15의 하나 이상의 잔기, 또는 추가로 에피토프의 위치를 결정해야 되는 채로 남겨진 임의의 돌연변이체 5, 15 또는 10와의 임의의 결합 감소를 갖지 않는 다른 항체에 의해 정의되는 것들을 포함한다.

[1097] **실시예 7: 유세포측정에 의한 CD39 발현 세포 상에서 항체 적정**

[1098] 항체 I-394는 인간 CD39를 발현하는 CHO 세포, 사이노몰거스 (마카카 파시쿨라리스 (macaca fascicularis)) CD39를 발현하는 CHO 세포, 쥐과 CD39를 발현하는 CHO 세포, 및 인간 Ramos 림프종 세포 (ATCC™, 참조 CRL-1596)와의 결합에 대해 2회 반복 실험에서 시험되었다. 세포는 30 μg/mL 내지 $5x10^{-4}$ μg/mL의 다양한 농도의 미표지된 항-CD39 항체와 30분 동안 4℃에서 인큐베이션되었다. 세척 후에, 세포는 염소 항-마우스 H+L 표지된 2차 항체와 30분 동안 4℃에서 인큐베이션되었다.

[1099] 결과는 **도 4**에 도시되어 있다. 항체 I-394는 인간 CD39를 발현하는 세포 (CHO-huCD39), 사이노몰거스 CD39를 발현하는 세포 (CHO-cyCD39) 및 Ramos 림프종 세포에 결합하였지만, 쥐과 CD39를 발현하는 세포 (CHO-moCD39)에는 결합하지 않았다. I-394는 각각 제1 및 제2 실험 세트에서 0.16 μg/mL 및 0.19 μg/mL의 EC_{50} 값으로 Ramos 세포에 결합하였다. 몇몇 다른 항-CD39 항체는 Ramos 세포와의 결합에 대해 비슷한 EC_{50} 값을 보였다.

[1100] **실시예 8: 세포 ATPase 활성의 억제를 위한 IC50 결정**

[1101] CD39-발현 세포에서 CD39의 ATPase 활성의 항체 I-394에 의한 억제는 상기 (방법)에 기술된 바와 같이 세포 CD39의 효소 활성의 억제에 사용되는 어세이를 사용하여 평가되었다.

[1102] 결과는 **도 5**에 도시되어 있다. I-394는 종양 (Ramos) 세포에서 CD39 효소 활성을 차단하는데서 고도로 강력하고, 시험된 모든 다른 항체와 비교하여 보다 큰 역가를 갖는다. I-394는 또한 인간 CD39를 발현하는 세포 (CHO-huCD39), 및 사이노몰거스 CD39를 발현하는 세포 (CHO-cyCD39)에서 CD39 효소 활성을 차단한다. 쥐과 CD39를 발현하는 세포 (CHO-moCD39)는 음성 대조군으로서 표시된다. 계산된 IC_{50} (50,000개 Ramos 세포에 의해 발현되는 CD39의 효소 활성의 50%의 억제)은 0.05 μg/mL이다. 획득된 최대 억제는 81.6%이다. 이소타입 대조군은 효과가 없었다.

[1103] **실시예 9: 재조합 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성의 억제를 위한 IC50 결정**

[1104] 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성의 항체 I-394에 의한 억제는 상기 (방법)에 기술된 바와 같이 가용성 CD39의 효소 활성의 억제에 사용된 어세이를 사용해 평가하였다. 결과는 **도 6**에 도시되어 있다. I-394는 가용

성 CD39 단백질의 효소 활성을 억제한다. 비교 항체 BY40은 가용성 CD39 단백질의 효소 활성을 억제하지 않았다. 계산된 IC_{50} 은 0.003 ㎍/mL이었다. 획득된 최대 억제는 74.9%이다.

[1105] **실시예 10: CD39-L1, L2, L3, L4 이소폼에 대한 ELISA 적정**

[1106] 항체 I-394는 500 ng/mL 또는 1 ㎍/mL로 PBS 1X에 4℃에서 밤새 96웰 플레이트에 코팅시킨 하기 표시된 아미노산 서열을 갖는 재조합 인간 CD39 이소폼 (Rec-huCD39 이소폼)과의 결합에 대해 시험되었다. 웰은 TBS Tween 20으로 세척하였고, TBS 차단 완충액 중에 RT에서 2시간 동안 더욱 포화시켰다. 용량 범위 농도의 1차 항체를 TBS 차단 완충액 중에 2시간 동안 RT에서 인큐베이션시켰다. 웰은 TBS Tween 20에서 세척하였다.

2차 항체 (TBS 차단 완충액 중 GAM-HRP 또는 GAH-HRP)는 1시간 동안 RT에서 인큐베이션시켰고, TMB로 발색시켰다. 광학 밀도는 Enspire™ 상에서 OD=450에서 측정하였다.

[1107] *클로닝된 huCD39의 아미노산 서열 (혈관 이소폼):*

[1108] NTPDase2 또는 ENTPD2로도 알려진 인간 CD39-L1:

```
  1 MAGKVRSLLP PLLLAAAGLA GLLLLCVPTR DVREPPALKY GIVLDAGSSH TSMFIYKWPA
 61 DKENDTGIVG QHSSCDVPGG GISSYADNPS GASQSLVGCL EQALQDVPKE RHAGTPLYLG
121 ATAGMRLLNL TNPEASTSVL MAVTHTLTQY PFDFRGARIL SGQEEGVFGW VTANYLLENF
181 IKYGWVGRWF RPRKGTLGAM DLGGASTQIT FETTSPAEDR ASEVQLHLYG QHYRVYTHSF
241 LCYGRDQVLQ RLLASALQTH GFHPCWPRGF STQVLLGDVY QSPCTMAQRP QNFNSSARVS
301 LSGSSDPHLC RDLVSGLFSF SSCPFSRCSF NGVFQPPVAG NFVAFSAFFY TVDFLRTSMG
361 LPVATLQQLE AAAVNVCNQT WAQQLLSRGY GFDERAFGGV IFQKKAADTA VGWALGYMLN
421 LTNLIPADPP GLRKGTDFSS WVVLLLLFAS ALLAALVLLL RQVHSAKLPS TI
```

(SEQ ID NO: 55).

[1109]

[1110] NTPDase6 또는 ENTPD6으로도 알려진 인간 CD39-L2:

```
  1 MKKGIRYETS RKTSYIFQQP QHGPWQTRMR KISNHGSLRV AKVAYPLGLC VGVFIYVAYI
 61 KWHRATATQA FFSITRAAPG ARWGQQAHSP LGTAADGHEV FYGIMFDAGS TGTRVHVFQF
121 TRPPRETPTL THETFKALKP GLSAYADDVE KSAQGIRELL DVAKQDIPFD FWKATPLVLK
181 ATAGLRLLPG EKAQKLLQKV KEVFKASPFL VGDDCVSIMN GTDEGVSAWI TINFLTGSLK
241 TPGGSSVGML DLGGGSTQIA FLPRVEGTLQ ASPPGYLTAL RMFNRTYKLY SYSYLGLGLM
301 SARLAILGGV EGQPAKDGKE LVSPCLSPSF KGEWEHAEVT YRVSGQKAAA SLHELCAARV
361 SEVLQNRVHR TEEVKHVDFY AFSYYYDLAA GVGLIDAEKG GSLVVGDFEI AAKYVCRTLE
421 TQPQSSPFSC MDLTYVSLLL QEFGFPRSKV LKLTRKIDNV ETSWALGAIF HYIDSLNRQK
481 SPAS
```

(SEQ ID NO:56).

[1111]

[1112] NTPDase3 또는 ENTPD3으로도 알려진 인간 CD39-L3:

```
  1 MFTVLTRQPC EQAGLKALYR TPTIIALVVL LVSIVVLVSI TVIQIHKQEV LPPGLKYGIV
 61 LDAGSSRTTV YVYQWPAEKE NNTGVVSQTF KCSVKGSGIS SYGNNPQDVP RAFEECMQKV
121 KGQVPSHLHG STPIHLGATA GMRLLRLQNE TAANEVLESI QSYFKSQPFD FRGAQIISGQ
181 EEGVYGWITA NYLMGNFLEK NLWHMWVHPH GVETTGALDL GGASTQISFV AGEKMDLNTS
241 DIMQVSLYGY VYTLYTHSFQ CYGRNEAEKK FLAMLLQNSP TKNHLTNPCY PRDYSISFTM
301 GHVFDSLCTV DQRPESYNPN DVITFEGTGD PSLCKEKVAS IFDFKACHDQ ETCSFDGVYQ
361 PKIKGPFVAF AGFYYTASAL NLSGSFSLDT FNSSTWNFCS QNWSQLPLLL PKFDEVYARS
421 YCFSANYIYH LFVNGYKFTE ETWPQIHFEK EVGNSSIAWS LGYMLSLTNQ IPAESPLIRL
481 PIEPPVFVGT LAFFTAAALL CLAFLAYLCS ATRRKRHSEH AFDHAVDSD
```

(SEQ ID NO: 57).

[1113]

[1114] NTPDase5 또는 ENTPD5로도 알려진 인간 CD39-L4:

```
  1 MATSWGTVFF MLVVSCVCSA VSHRNQQTWF EGIFLSSMCP INVSASTLYG IMFDAGSTGT
 61 RIHVYTFVQK MPGQLPILEG EVFDSVKPGL SAFVDQPKQG AETVQGLLEV AKDSIPRSHW
121 KKTPVVLKAT AGLRLLPEHK AKALLFEVKE IFRKSPFLVP KGSVSIMDGS DEGILAWVTV
181 NFLTGQLHGH RQETVGTLDL GGASTQITFL PQFEKTLEQT PRGYLTSFEM FNSTYKLYTH
241 SYLGFGLKAA RLATLGALET EGTDGHTFRS ACLPRWLEAE WIFGGVKYQY GGNQEGEVGF
301 EPCYAEVLRV VRGKLHQPEE VQRGSFYAFS YYYDRAVDTD MIDYEKGGIL KVEDFERKAR
361 EVCDNLENFT SGSPFLCMDL SYITALLKDG FGFADSTVLQ LTKKVNNIET GWALGATFHL
421 LQSLGISH
```

(SEQ ID NO: 58).

[1115]

[1116] I-394는 CD39에 결합하였지만 이소폼 CD39-L1, CD39-L2, CD39-L3 또는 CD39-L4 중 어떠한 것에도 결합하지 않았다. 이소타입 대조군 항체 (IC)는 임의의 CD39 또는 CD39-L 분자에 결합하지 않았다. 결과는 **도 7**에

도시되어 있다.

[1117] **실시예 11: 수지상 세포의 활성화**

[1118] ATP가 프로염증성 활성을 갖지만, ATP의 CD39-매개 이화작용은 수지상 세포 (DC) 활성화를 손상시킬 수 있고, 결국 종양 항원에 대한 광범위한 획득 면역 반응을 변경시킬 수 있다고 여겨진다. 항-CD39 항체를 사용한 CD39 차단이 ATP의 존재 하에서 수지상 세포 (DC) 활성화의 CD39-매개 변경을 극복할 수 있는지 여부를 평가하기 위해서, 우리는 ATP의 존재 하에서 단핵구-유래 DC (moDC)를 항-CD39 항체와 인큐베이션시켰다.

[1119] 간략하게, 인간 단핵구는 인간의 건강한 혈액으로부터 정제하였고 6일 동안 GM-CSF 및 IL-4의 존재 하에서 MoDC로 분화시켰다. 다음으로 MoDC는 24시간 동안 ATP (Sigma, 0.25 - 1 mM)의 존재 하에서 활성화되었고 DC 활성화는 유세포측정법을 통해서 CD80, CD83 및 HLA-DR 발현을 분석하여 평가되었다. 일부 경우에서, MoDC는 1시간 동안 CD39 억제제: ARL6716 (Tocris, 250 μM), CD73 억제제: APCP (Tocris 50 μM), 항-CD39 차단 항체 I-394 또는 BY40 (BY40의 경우 WO2009/095478 참조), 또는 항-CD73 차단 항체의 존재 하에서 사전인큐베이션되었다. LPS (Invivogen, 10 ng/mL)는 양성 대조군으로서 사용되었다. CD4 T 세포 활성화에 대한 ATP-매개 DC 활성화의 최종 효과를 평가하기 위해서, ATP-활성화된 DC를 세척시킨 후 5일 동안 혼합 림프구 반응 (MLR)을 위해 동종이계 CD4 T 세포 (1 MoDC / 4 T 세포의 비율)와 인큐베이션시켰다. T 세포 활성화 및 증식은 유세포측정법에 의한 Cell Trace Violet 희석 및 CD25 발현을 통해 분석되었다 (**도 8**).

[1120] 결과는 **도 9, 10 및 11**에 도시되어 있다. 음성 대조군 (배지)의 존재 하에서, moDC 활성화는 1 mM ATP의 존재 하에서 관찰되었지만, 0.125 mM, 0.25 mM 또는 0.5 mM의 ATP는 moDC 활성화를 허용하지 않았다. 활성부위에 결합하여 CD39 효소 활성을 완전히 차단하는 것으로 여겨지는 CD39의 화학적 억제제의 첨가는 0.125 mM, 0.25 mM 또는 0.5 mM 각각에서 moDC 활성화를 야기시켰다. 그러나, 항-CD39 항체 예컨대 BY40 또는 항-CD73 항체는 수지상 세포 (CD)의 ATP-유도된 활성화를 촉진할 수 없었고, 항체가 ATP 이화작용을 피하도록 충분히 효소 활성을 차단할 수 없다는 것을 시사한다. 놀랍게도, CD39의 ATPase 활성을 실질적으로 완전하게 차단하고 그에 따라 ATP의 축적을 가능하게 할 수 있는 항-CD39 차단 항체 I-394 (농도 10 μg/mL로 도면에 도시)는 각각 0.125 mM, 0.25 mM 또는 0.5 mM에서 HLA-DR 또는 CD83 발현을 통해 평가 시 moDC 활성화를 가능하게 하였다 (**도 9 및 10**). 흥미롭게도, ATP의 존재 하에서 활성화된 MoDC는 MLR 어세이에서 더 양호한 T 세포 활성화 및 증식을 유도할 수 있었다. 게다가, 항-CD39 차단 항체 I-394에 의한 ATP-매개 MoDC 활성화의 증강은 그 결과로 더 높은 T 세포 증식 및 활성화를 일으켰다 (**도 11**).

[1121] APT의 존재 하에서 DC를 활성화시키는 CD39 억제제의 능력의 평가는 높은 정도의 CD39의 억제를 획득할 수 있는 항-CD39 항체를 확인하고 평가하는 방법을 제공한다. 뿐만 아니라, DC에 대해 CD39에 의해 발휘되는 면역억제 효과를 경감시키기 위해 항-CD39 항체를 사용하는 가능성은 특히 종양 세포 상의 항원에 대한 획득 면역 반응의 증강을 제공한다. 뿐만 아니라, 이러한 항-CD39 항체는 화학요법제의 면역원성 효과를 증강시키기 위해 사용될 때 특히 흥미로울 수 있다. 종양 세포의 괴사를 야기시키는 수많은 화학요법제는 ATP를 유도시킬 수 있고, 항-CD39 항체와의 병용은 이들 상황에서 항종양 반응을 증가시키는데 특히 유용할 수 있다.

[1122] **실시예 12: 재조합 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성을 억제하는 항체는 ATP의 존재 하에서 CD73 차단을 강하게 강화시킨다**

[1123] T 세포 증식 어세이

[1124] 건강한 공혈자로부터의 말초 혈액은 EFS로부터 수득하였고, 단핵 세포는 Ficoll 구배 상에서 단리하였다. 림프구는 세포 펠렛을 수집하여 52% Percoll 구배 상에서 더욱 농축하였고 제조사가 제공하는 TDS에 따라서 Cell Trace 염료 (Thermofisher)로 염색하였다. $5x10^4$ 내지 $1x10^5$ 의 염색된 세포를 96웰 둥근-바닥 플레이트에 분배하였고, 1시간 동안 37℃에서 항-huCD73 항체 (항체 6E1) 및/또는 항-huCD39 Ab (본 명세서에 기술된 I-394)와 인큐베이션시켰고 항-CD3/항-CD28-코팅된 비드 (비드:세포 = 1:4 ; Life Technologies)를 첨가하여 3일 내지 5일 동안 활성화시켰다. T 세포 증식의 억제는 ATP (200 μM)를 첨가하여 수행하였다. T 세포 증식 및 AMP의 면역 억제 효과를 차단하는 Ab의 능력은 증식성 T 세포 서브세트에서 염료 희석을 정량하여 유세포측정을 통해 평가하였다.

[1125] 항-CD73 Ab 농도에 대한 증식성 T 세포의 백분율은 GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 그래프로 표시된다.

[1126] 결과

[1127] 항체는 종양 환경에서 존재할 수 있는 조건을 대표하고자, 첨가된 ATP의 존재 하에서 CD4 또는 CD8 T 세포 증식

을 복원시키는 능력을 시험하였다. 각각의 항-CD73 및 CD39는 항-CD73 또는 항-CD39 항체의 다른 3가지 상이한 용량으로 용량 범위에서 시험하였다. 항-CD39 항체 I-394는 CD4 또는 CD8 T 세포 증식의 복원에서 항-CD73 항체의 효과를 강력하게 강화시켜서, 항-CD73 항체의 저농도 (예를 들어, 0.01 μg/mL 미만, 0.001 μg/mL 미만 및 0.001 μg/mL 미만)에서도 항-CD39 항체와 병용하여 사용했을 때, CD4 또는 CD8 T 세포 증식을 강력하게 증강시켰다. 뿐만 아니라, 항-CD73 없이 단독으로 용량 범위에서 시험했을 때, 항-CD39 항체 I-394는 0.1 μg/mL 및 1 μg/mL의 농도에서 CD4 또는 CD8 T 세포 증식의 두드러진 증강을 야기시켰다. **도 12A**는 0.01 μg/mL, 0.1 μg/mL 및 1 μg/mL의, 항-CD39 항체 I-394의 3종의 상이한 용량에서 CD4 T 세포 증식에 대한 항-CD73 항체 6E1의 용량 범위를 도시한다. 가용성 및/또는 단량체 인간 CD39를 중화시킬 수 있는 항-CD39 항체는 CD4 T 세포 증식의 복원에서 항-CD73 항체에 의한 효과의 강력한 강화를 보여준다. 효과는 항-CD73 항체를 사용한 치료 과정 동안 종양 조직에서 관찰될 수 있는 농도 범위에 상응하는, 항-CD73 항체가 최적 이하로 활성인 농도에서 특히 강력하였다. 0.01 μg/mL의 농도에서, 항-CD39 항체는 항-CD73 항체의 역가에 대략 1-log 증가를 제공하였고, 0.1 μg/mL의 농도에서, 항-CD39 항체는 항-CD73 항체의 역가에 대략 4-log 증가를 제공하였다. 그러므로 항-CD39 항체는 특히 종양 조직, 예를 들어 CD73-발현 세포를 보유하는 종양에서, 항-CD73 항체의 활성을 증강시키는데 유용할 수 있다. 뿐만 아니라, 시험된 (가용성 CD73 단백질을 중화시킬 수있는) 항-CD73 항체가 CD4 T 세포 증식을 복원시키는 높은 능력을 보유하였으나, (예를 들어, 효소 억제 어세이, T 세포 증식 어세이, 또는 다른 적합한 어세이에서 평가하여) 보다 낮은 역가를 갖는 다른 항체들은 항-sCD39 항체와의 병용으로부터 더 이득을 얻을 수 있다. **도 12B**는 CD8 T 세포 증식에 대한 항-CD73 항체의 용량 범위를 도시한다. 다시, 항-CD39 항체는 CD8 T 세포 증식을 복원하는데서 항-CD73 항체와의 강력한 상승 및/또는 가산 효과를 보인다. 그 효과는 항-CD73 항체를 사용한 치료 과정 동안 종양 조직에서 관찰할 수 있는 농도 범위에 상응하는, 항-CD73 항체가 최적 이하로 활성인 농도에서 특히 강력하였다.

[1128] CD39 및 CD73 유전자 발현의 연구는 33개 유형의 암에서 핵심 게놈 변화의 다차원 맵을 기반으로 하는 Cancer Genome Atlas (National Cancer Institute와 National Human Genome Research Institute의 협업)를 사용하여 수행하였다. (높거나 또는 낮다로 표시되는) 발현 수준은 질환 병기 및 시간을 감안하여, 고려하였다. 각각의 암, 및 각각의 유전자 (CD39/ENTPD1 및 CD73/NT5E)의 경우에, 환자는 Cox 회귀의 p-값에 따라서 2개 그룹 (유전자 고 및 저 발현)으로 분류하였다 (각 그룹은 환자의 적어도 10%를 함유해야함). 각각의 2개 그룹에 대해 생존 확률 그래프를 그렸다. 저 및 고 CD39 발현 간 통계적 생존 편차가 난소암 및 위 선암종 샘플에서 관찰되었는데, 고-발현 CD39가 보다 낮은 생존을 나타냈다. 또한 식도 편평 암종 및 폐 편평 세포 암종 샘플에 대해서 경향이 관찰되었다. 결과는 **도 13A-C**에 도시되어 있고, 인간 암 (도 13A, B 및 C에서 각각 난소암, 식도암 및 위암)에서 낮은 CD39 발현은 더 높은 생존 확률과 상관있는 반면 고발현 CD73은 더 낮은 생존 확률과 상관있다 (난소암, 식도암 및 위암).

[1129] 본 명세서에서 인용되는 출판물, 특허 출원 및 특허를 포함한 모든 참조 문헌은 본 명세서의 다른 곳에서 임의의 별개로 제공되는 특정 문서의 편입과 무관하게, 각 참조 문헌이 참조로 편입시킨다고 개별적으로 특별히 표시하고 본 명세서에 그 전문으로 기재된다고 한 바와 동일한 정도로 (법이 허용하는 최대 정도로) 그들 전문이 참조로 본 명세서에 편입된다.

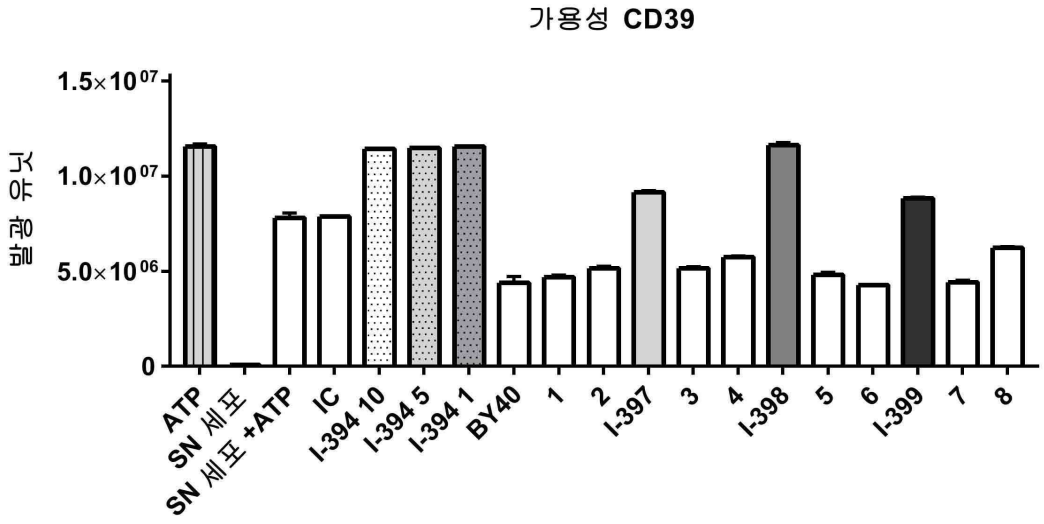
[1130] 달리 명시하지 않으면, 본 명세서에서 제공되는 모든 정확한 값은 상응하는 근사값을 대표한다 (예를 들어, 특정한 인자 또는 측정치에 대하여 제공되는 모든 정확한 예시적인 값은 또한 적절한 경우에 "약"으로 변형된, 상응하는 근사 측정치를 제공하는 것을 고려할 수 있음). "약"이 수치와 함께 사용되는 경우에, 이것은 명시된 수치의 +/-10%에 해당하는 값을 포함하는 것으로 명시될 수 있다.

[1131] 요소 또는 요소들과 관련하여 "포함하는", "가지는", "포괄하는" 또는 "함유하는"과 같은 용어를 사용하는 본 발명의 임의의 양상 또는 실시형태의 본 명세서에서의 설명은 달리 명시하지 않거나 또는 문맥에서 명백하게 반박하지 않으면, 특정한 요소 또는 요소들로 "이루어지거나", "본질적으로 이루어지거나", 또는 "포함하는" 본 발명의 유사한 양상 또는 실시형태에 대한 뒷받침을 제공하고자 한다 (예를 들어, 특정한 효소를 포함하는 것으로 본 명세서에서 기술된 조성물은 달리 명시하지 않거나 또는 문맥에서 명백하게 반박하지 않으면, 그 요소로 이루어진 조성물을 또한 설명하는 것으로 이해해야 함).

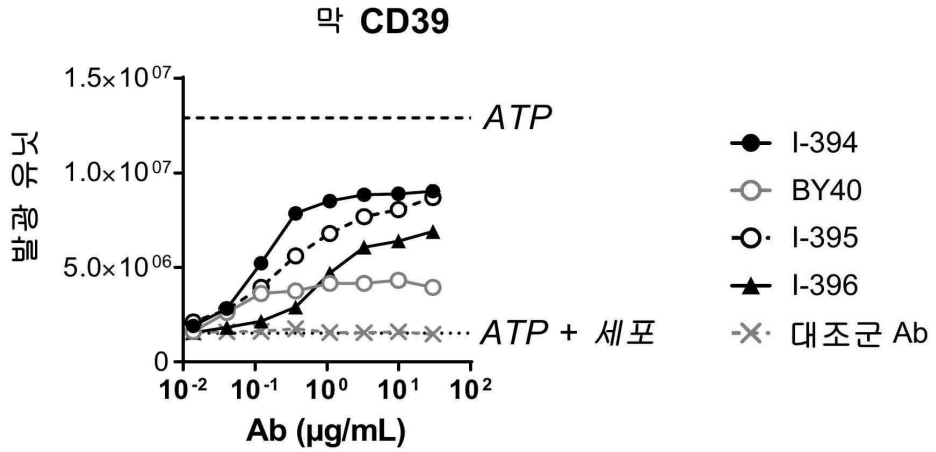
[1132] 본 명세서에서 제공되는 임의의 모든 예, 또는 예시적인 언어 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 보다 잘 예시하려는 의도이고 달리 청구하지 않으면 본 발명의 범주의 제한을 의미하는 것이 아니다. 명세서의 어떠한 언어도 임의의 비청구 요소를 본 발명의 실시에서 본질적인 것을 의미하는 것으로서 해석되어서는 안된다.

도면

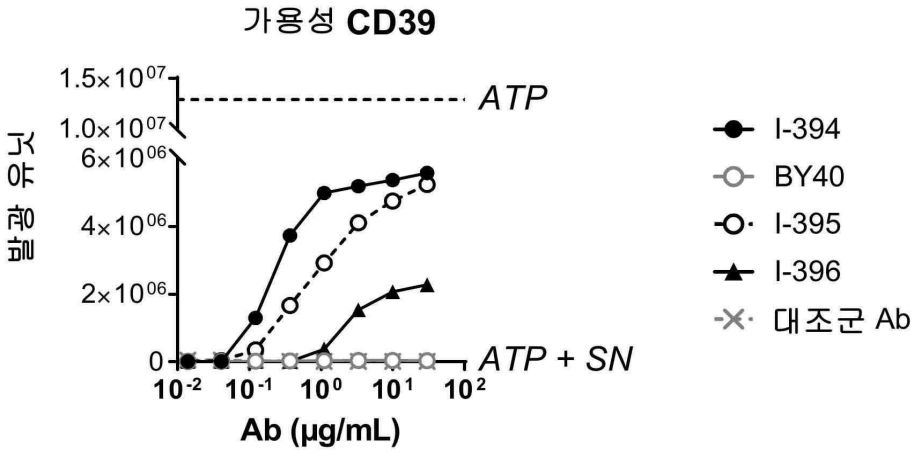
도면1



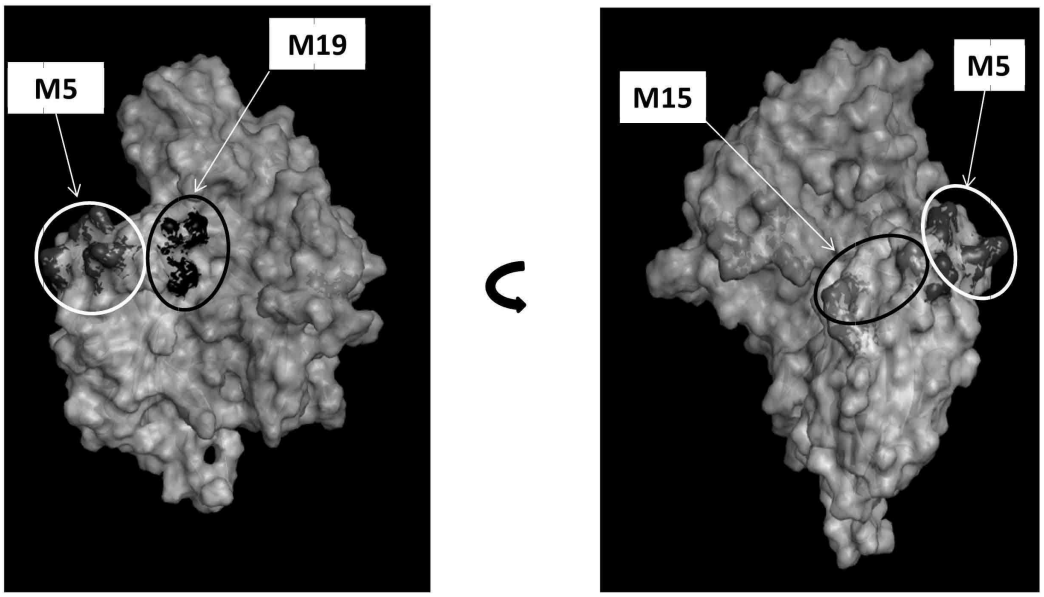
도면2a



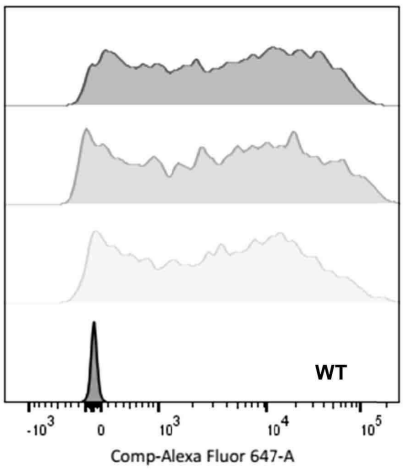
도면2b



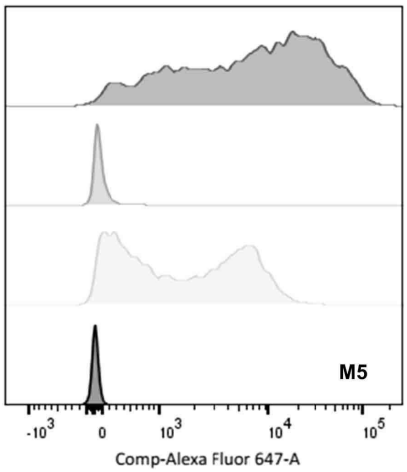
도면3a



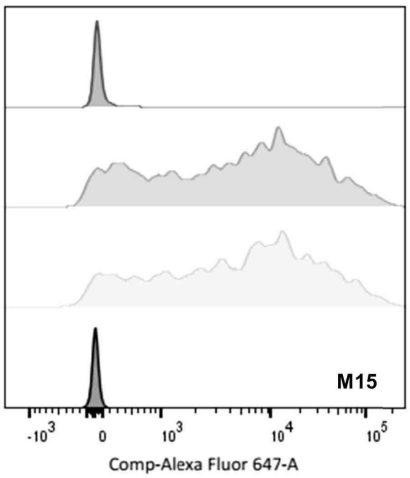
도면3b



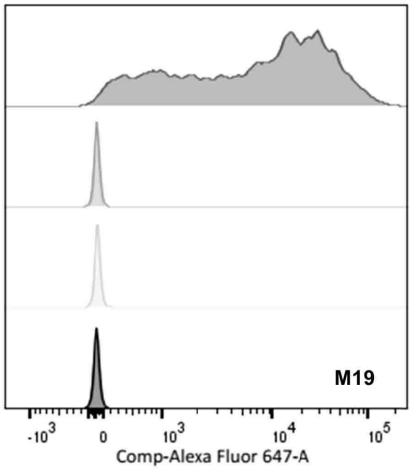
	튜브명	계측치	중앙치 : Comp-Alexa Fluor 647-A
	I-396	2487	4343
	I-395	2565	4237
	I-394	2151	3716
	US	1942	10.3



	튜브명	계측치	중앙치 : Comp-Alexa Fluor 647-A
	I-396	2152	8189
	I-395	2281	52.6
	I-394	2219	1459
	US	1524	8.98

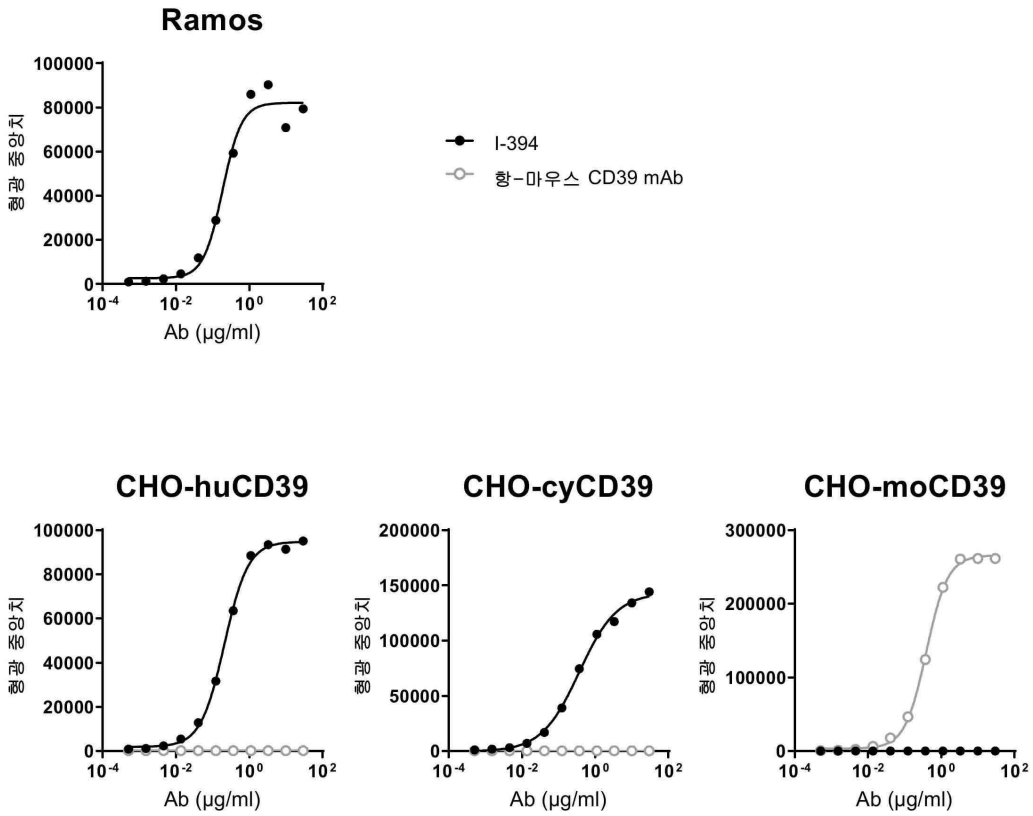


	튜브명	계측치	중앙치 : Comp-Alexa Fluor 647-A
	I-396	2186	35.9
	I-395	2138	5750
	I-394	2014	6363
	US	1908	8.98

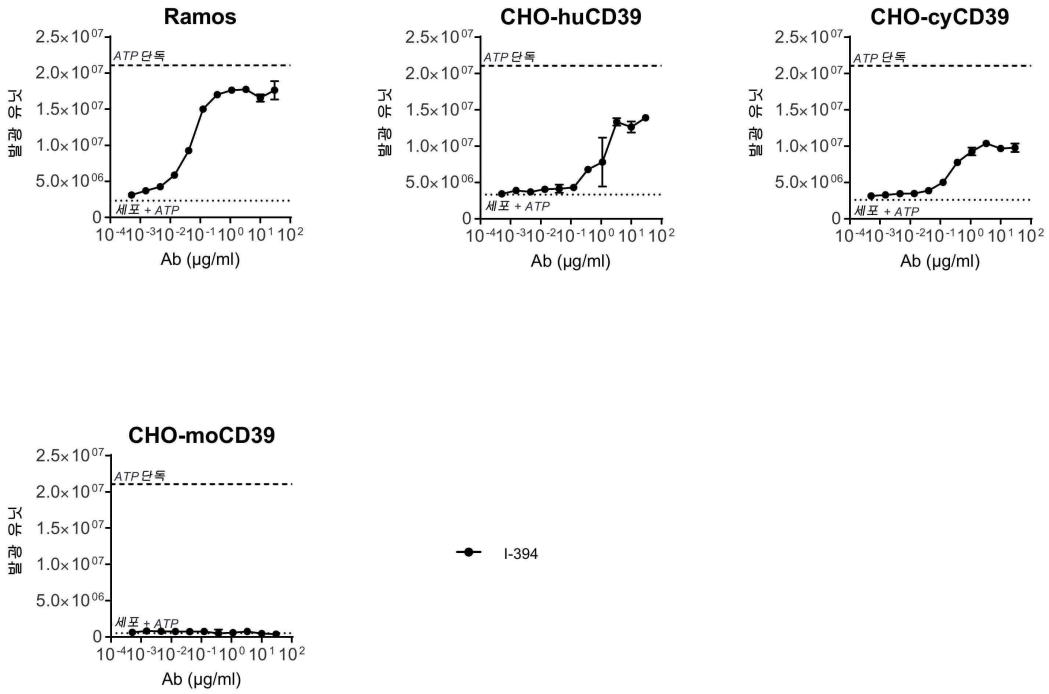


	튜브명	계측치	중앙치 : Comp-Alexa Fluor 647-A
	I-396	2375	8893
	I-395	2698	15.4
	I-394	2611	24.4
	US	1879	8.98

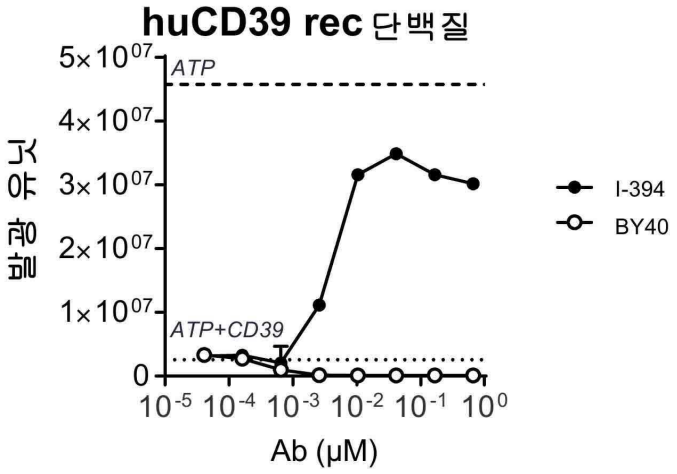
도면4


Ramos
형광 중앙치
Ab (μg/ml)
I-394
항-마우스 CD39 mAb
CHO-huCD39
CHO-cyCD39
CHO-moCD39

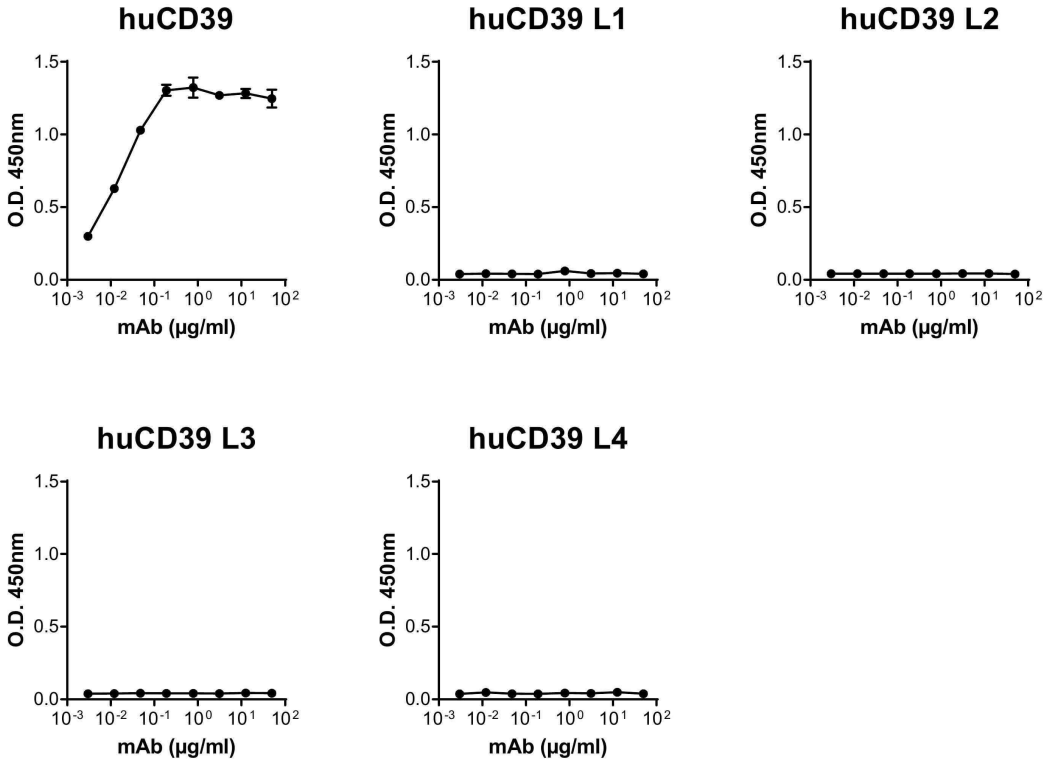
도면5


Ramos
CHO-huCD39
CHO-cyCD39
CHO-moCD39
발광 유닛
ATP단독
세포 + ATP
Ab (μg/ml)
I-394

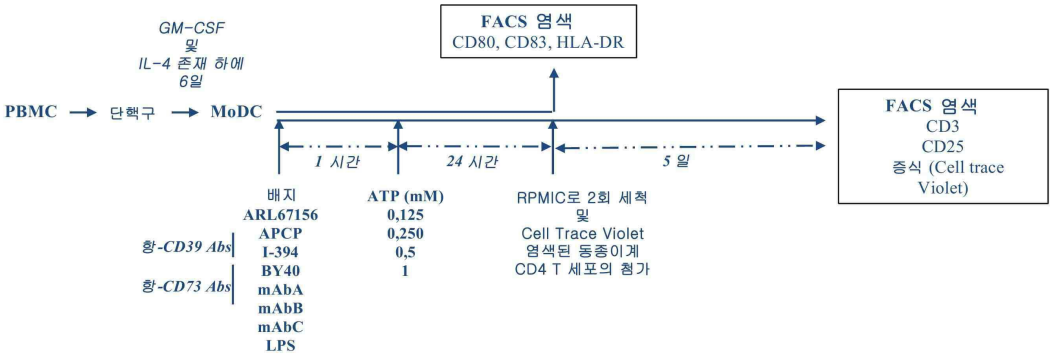
도면6


huCD39 rec 단백질
ATP
ATP+CD39
I-394
BY40
Ab (μM)

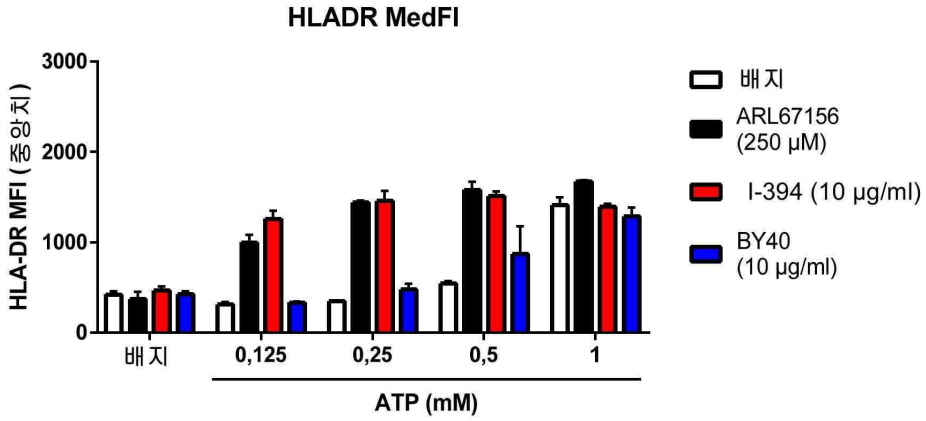
도면7

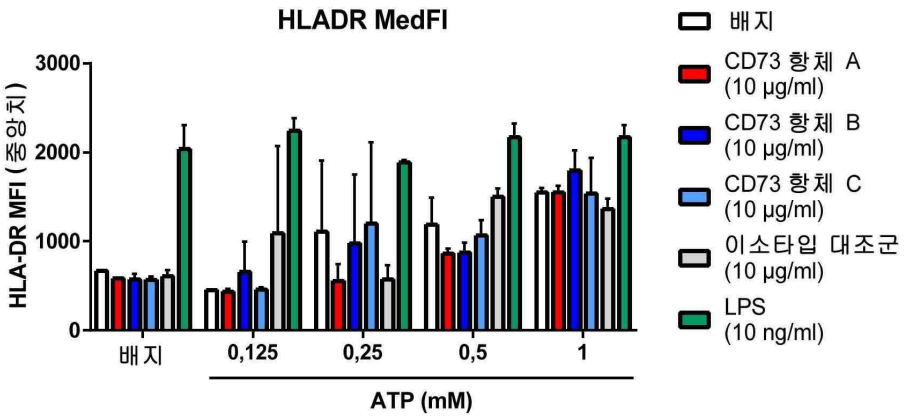

huCD39
huCD39 L1
huCD39 L2
huCD39 L3
huCD39 L4
O.D. 450nm
mAb (μg/ml)

도면8

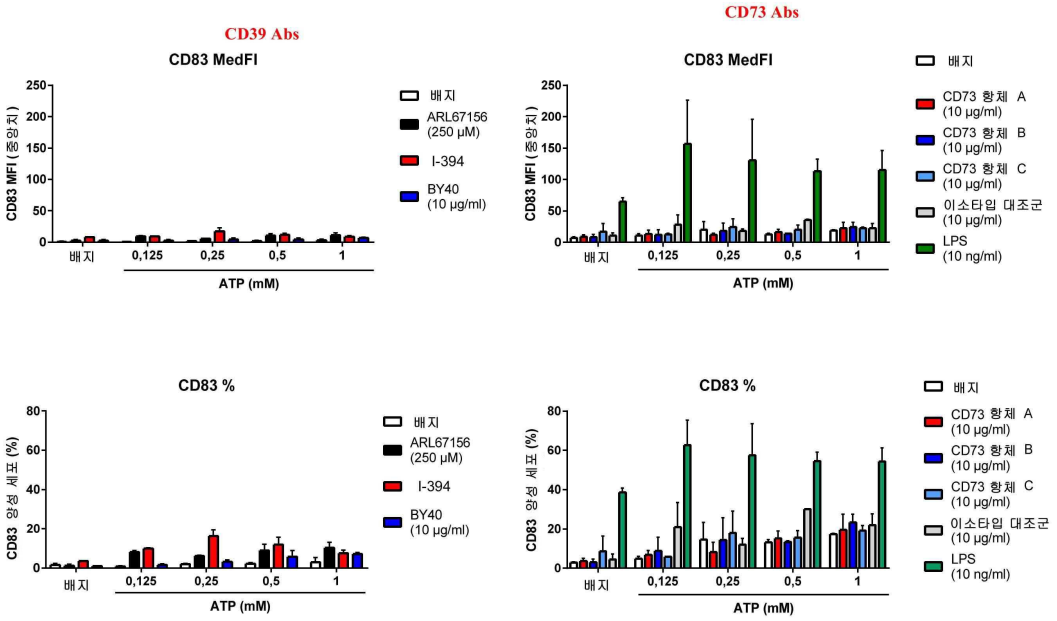

GM-CSF
및
IL-4 존재 하에
6일
PBMC
단핵구
MoDC
FACS 염색
CD80, CD83, HLA-DR
FACS 염색
CD3
CD25
증식 (Cell trace
Violet)
1 시간
24 시간
5 일
배지
ARL67156
APCP
I-394
BY40
mAbA
mAbB
mAbC
LPS
항-CD39 Abs
항-CD73 Abs
ATP (mM)
0,125
0,250
0,5
1
RPMIC로 2회 세척
및
Cell Trace Violet
염색된 동종이계
CD4 T 세포의 첨가

도면9

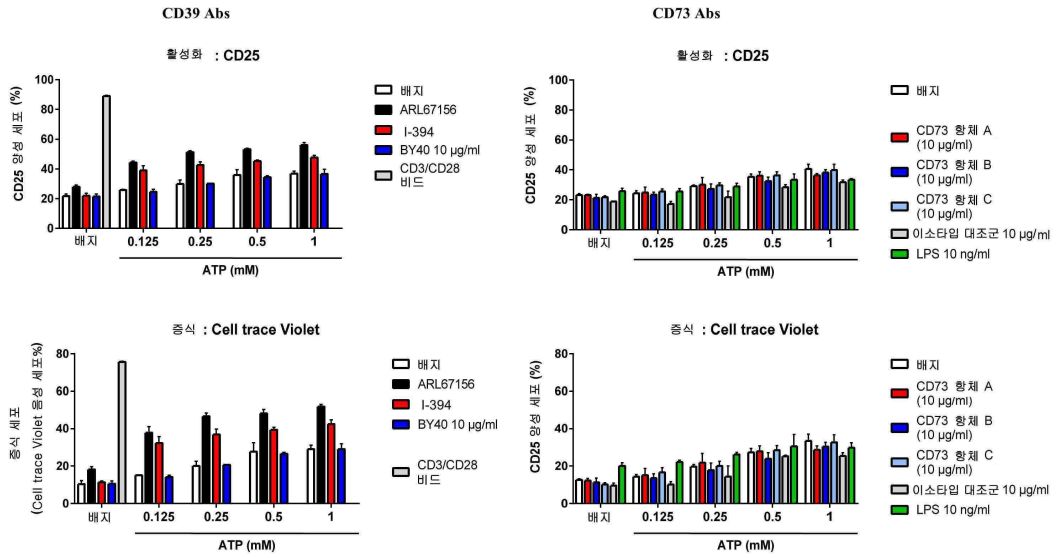

HLADR MedFI
HLA-DR MFI (중앙치)
3000
2000
1000
0
배지
0,125
0,25
0,5
1
ATP (mM)
배지
ARL67156
(250 μM)
I-394 (10 μg/ml)
BY40
(10 μg/ml)


HLADR MedFI
HLA-DR MFI (중앙치)
3000
2000
1000
0
배지
0,125
0,25
0,5
1
ATP (mM)
배지
CD73 항체 A
(10 μg/ml)
CD73 항체 B
(10 μg/ml)
CD73 항체 C
(10 μg/ml)
이소타입 대조군
(10 μg/ml)
LPS
(10 ng/ml)

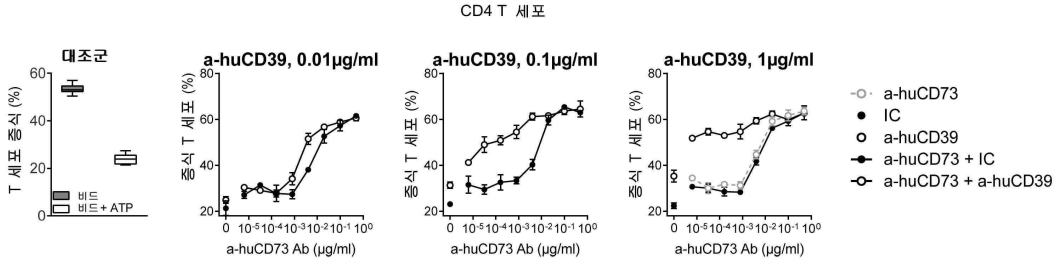
도면10



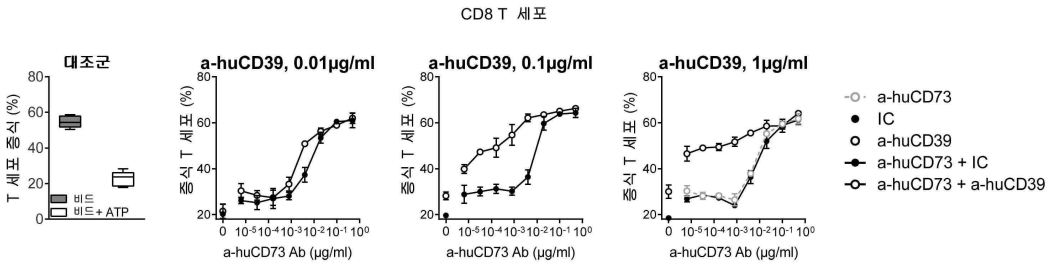
도면11



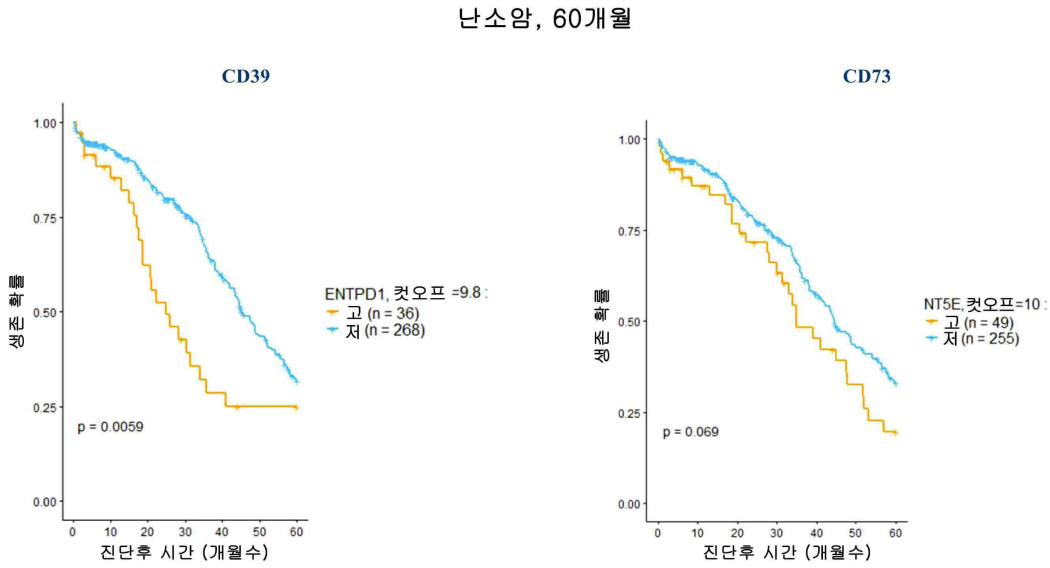
도면12a



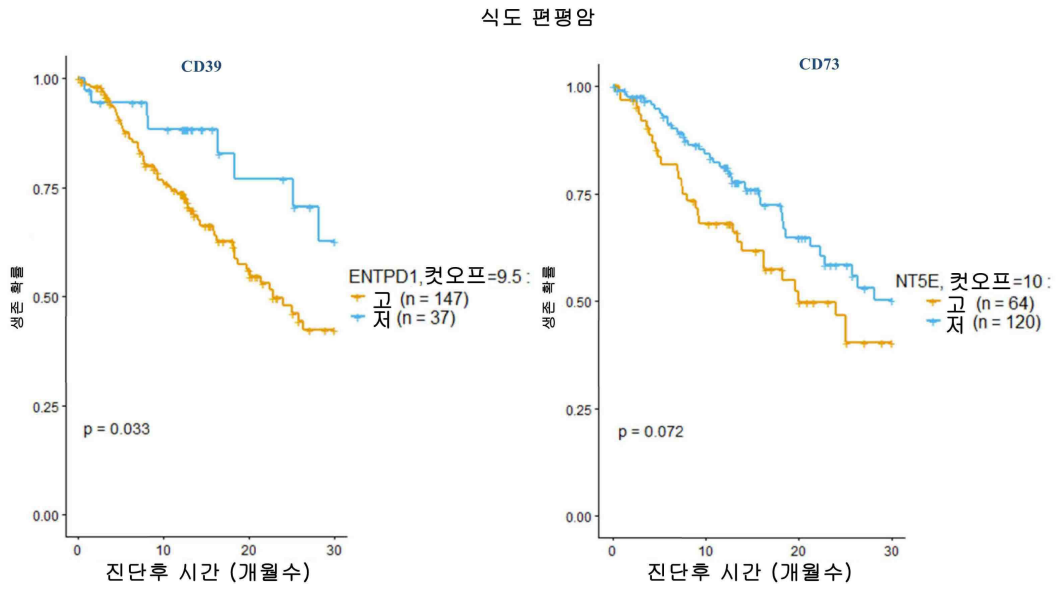
도면12b



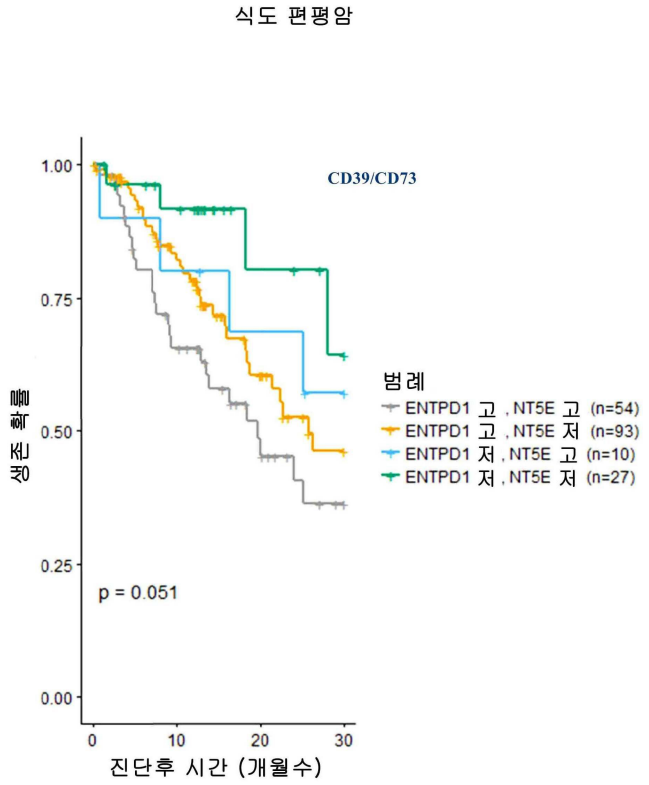
도면13a



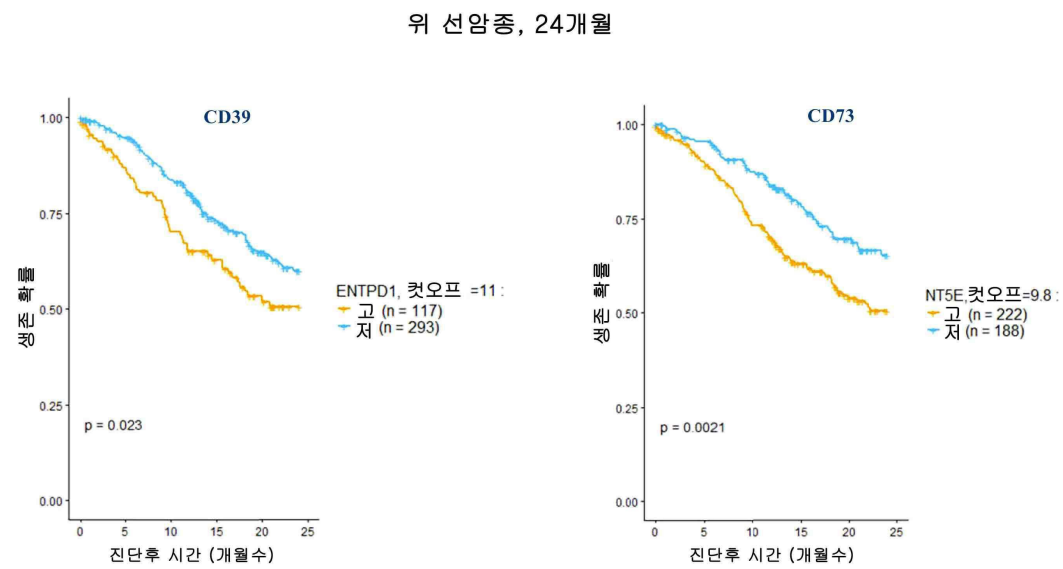
도면13ba



도면13bb



도면13c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> INNATE PHARMA

<120> RESTORATION OF T CELL ACTIVITY VIA THE CD39/CD73 AXIS

<130> CD39-7

<150> US 62/686,143

<151> 2018-06-18

<150> US 62/568,812

<151> 2017-10-06

<160> 62

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 574

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Met Cys Pro Arg Ala Ala Arg Ala Pro Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Gly Ala Val Leu Trp Pro Ala Ala Gly Ala Trp Glu Leu Thr Ile Leu
20 25 30

His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu Gln Thr Ser Glu Asp Ser
35 40 45

Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met Gly Gly Val Ala Arg Leu
50 55 60

Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala Glu Pro Asn Val Leu Leu
65 70 75 80

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

Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn Ala Leu Arg Tyr Asp Ala
100 105 110

Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn Gly Val Glu Gly Leu Ile
115 120 125

Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro Ile Leu Ser Ala Asn Ile
130 135 140

Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly Leu Tyr Leu Pro
145 150 155 160

Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val Val Gly Ile Val Gly Tyr
165 170 175
Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn Pro Gly Thr Asn Leu Val
180 185 190
Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys
195 200 205
Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe Glu

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

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

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

405 410 415

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

420 425 430

Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr Gly Gln Ser Thr Gly Glu

435 440 445

Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val Tyr Asp Leu Ser Arg Lys

450 455 460

Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val Leu Cys Thr Lys Cys Arg

465 470 475 480

Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp Glu Val Tyr Lys Val Ile

485 490 495

Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp Gly Phe Gln Met Ile Lys

500 505 510

Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp Gln Asp Ile Asn Val Val

515 520 525

Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile Tyr Pro Ala Val Glu Gly

530 535 540

Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser His Cys His Gly Ser Phe Ser Leu

545 550 555 560

Ile Phe Leu Ser Leu Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln

565 570

<210> 2

<211> 510

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 2

Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser Lys Asn

1 5 10 15

Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu Tyr Ile
50 55 60
Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln
65 70 75 80

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

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

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

Ala Ser Asn Glu Ile Leu Arg Asp Pro Cys Phe His Pro Gly Tyr Lys
275 280 285
Lys Val Val Asn Val Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Pro Cys Thr Lys Arg

290 295 300

Phe Glu Met Thr Leu Pro Phe Gln Gln Phe Glu Ile Gln Gly Ile Gly
305 310 315 320

Asn Tyr Gln Gln Cys His Gln Ser Ile Leu Glu Leu Phe Asn Thr Ser
325 330 335

Tyr Cys Pro Tyr Ser Gln Cys Ala Phe Asn Gly Ile Phe Leu Pro Pro
340 345 350

Leu Gln Gly Asp Phe Gly Ala Phe Ser Ala Phe Tyr Phe Val Met Lys
355 360 365

Phe Leu Asn Leu Thr Ser Glu Lys Val Ser Gln Glu Lys Val Thr Glu
370 375 380

Met Met Lys Lys Phe Cys Ala Gln Pro Trp Glu Glu Ile Lys Thr Ser
385 390 395 400

Tyr Ala Gly Val Lys Glu Lys Tyr Leu Ser Glu Tyr Cys Phe Ser Gly
405 410 415

Thr Tyr Ile Leu Ser Leu Leu Leu Gln Gly Tyr His Phe Thr Ala Asp
420 425 430

Ser Trp Glu His Ile His Phe Ile Gly Lys Ile Gln Gly Ser Asp Ala
435 440 445

Gly Trp Thr Leu Gly Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Met Ile Pro Ala
450 455 460

Glu Gln Pro Leu Ser Thr Pro Leu Ser His Ser Thr Tyr Val Phe Leu
465 470 475 480

Met Val Leu Phe Ser Leu Val Leu Phe Thr Val Ala Ile Ile Gly Leu
485 490 495

Leu Ile Phe His Lys Pro Ser Tyr Phe Trp Lys Asp Met Val
500 505 510

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 4

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Met Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 5
<211> 478
<212> PRT
<213> HOMO SAPIENS
<400> 5

Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser Lys Asn
1 5 10 15
Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu
20 25 30
Leu Ala Val Gly Leu Thr Gln Asn Lys Ala Leu Pro Glu Asn Val Lys
35 40 45
Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu Tyr Ile
50 55 60
Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln
65 70 75 80
Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe Val Gln
85 90 95
Lys Val Asn Glu Ile Gly Ile Tyr Leu Thr Asp Cys Met Glu Arg Ala
100 105 110
Arg Glu Val Ile Pro Arg Ser Gln His Gln Glu Thr Pro Val Tyr Leu
115 120 125
Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu Arg Met Glu Ser Glu Glu Leu
130 135 140
Ala Asp Arg Val Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Pro
145 150 155 160
Phe Asp Phe Gln Gly Ala Arg Ile Ile Thr Gly Gln Glu Glu Gly Ala
165 170 175
Tyr Gly Trp Ile Thr Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Lys Phe Ser Gln Lys

180 185 190

Thr Arg Trp Phe Ser Ile Val Pro Tyr Glu Thr Asn Asn Gln Glu Thr

195 200 205

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

210 215 220

Pro Gln Asn Gln Thr Ile Glu Ser Pro Asp Asn Ala Leu Gln Phe Arg

225 230 235 240

Leu Tyr Gly Lys Asp Tyr Asn Val Tyr Thr His Ser Phe Leu Cys Tyr

245 250 255

Gly Lys Asp Gln Ala Leu Trp Gln Lys Leu Ala Lys Asp Ile Gln Val

260 265 270

Ala Ser Asn Glu Ile Leu Arg Asp Pro Cys Phe His Pro Gly Tyr Lys

275 280 285

Lys Val Val Asn Val Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Pro Cys Thr Lys Arg

290 295 300

Phe Glu Met Thr Leu Pro Phe Gln Gln Phe Glu Ile Gln Gly Ile Gly

305 310 315 320

Asn Tyr Gln Gln Cys His Gln Ser Ile Leu Glu Leu Phe Asn Thr Ser

325 330 335

Tyr Cys Pro Tyr Ser Gln Cys Ala Phe Asn Gly Ile Phe Leu Pro Pro

340 345 350

Leu Gln Gly Asp Phe Gly Ala Phe Ser Ala Phe Tyr Phe Val Met Lys

355 360 365

Phe Leu Asn Leu Thr Ser Glu Lys Val Ser Gln Glu Lys Val Thr Glu

370 375 380

Met Met Lys Lys Phe Cys Ala Gln Pro Trp Glu Glu Ile Lys Thr Ser

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Tyr Ile Leu Ser Leu Leu Leu Gln Gly Tyr His Phe Thr Ala Asp

420 425 430

Ser Trp Glu His Ile His Phe Ile Gly Lys Ile Gln Gly Ser Asp Ala
435 440 445
Gly Trp Thr Leu Gly Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Met Ile Pro Ala
450 455 460
Glu Gln Pro Leu Ser Thr Pro Leu Ser His Ser Thr Tyr Val

465 470 475
<210> 6
<211> 116
<212> PRT
<213> MUS MUSCULUS
<400> 6
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Arg Thr Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Thr Val Ser Ala
115
<210> 7
<211> 111
<212> PRT
<213> MUS MUSCULUS
<400> 7

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe

20 25 30

Gly Val Ser Phe Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Met Glu Ala Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys

85 90 95

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

100 105 110

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> MUS MUSCULUS

<400> 8

Asp Tyr Asn Met His

1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Tyr Ile Val Pro Leu Asn Gly Gly Ser Thr Phe Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Gly Gly Thr Arg Phe Ala Tyr

1 5

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe Gly Val Ser Phe Met Tyr

1 5 10 15

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 14

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

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

1 5 10 15

Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Lys Asn His Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Thr Ser Ser Lys Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Arg Gly Gly Thr Arg Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 15

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

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

100 105 110

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Asp Tyr Asn Met His

1 5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

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

1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Gly Gly Thr Arg Phe Ala Ser

1 5

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Tyr

1 5 10 15

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ser

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Ile Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 23

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile Leu
65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Val Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys His Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Asp Thr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 25

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Trp Gly Tyr Asp Asp Glu Glu Ala Asp Tyr Phe Asp Ser

1 5 10

<

210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn

1 5 10 15

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

His Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213

> Mus musculus

<400> 30

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

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

Trp Met Asn Trp Met Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Asp Phe Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<

400> 31

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

Glu Lys Ile Thr Phe Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Leu Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Ser Phe Trp Met Asn

1 5

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Phe Tyr Thr Asn Ser Asn Gln Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Gly Asp Phe Gly Trp Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 35

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Ser Asn Tyr Leu His

1 5 10

<210> 36

<211

> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Gln Gln Gly Ser Ser Leu Pro Arg Thr

1 5

<210> 38

<211> 45

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 38

tacgactcac aagcttgccg ccaccatgga agatacaaag gagtc 45

<210> 39

<211> 64

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 39

ccgccccgac tctagatcac ttgtcatcgt catctttgta atcgacatag gtggagtggg 60

agag 64

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 41

<211> 106

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 41

Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 42

<211> 126

<212
> PRT

<213> mus musculus

<400> 42

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

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

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

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Thr Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

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

<210> 43

<211> 112

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 43

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

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

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

<210> 44

<211> 126

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 44

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

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

<210> 45

<211> 112

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 45

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

<210> 46

<211> 5

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 46

Ser Tyr Asn Met Tyr

1 5

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 47

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 48

Gly Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 49

Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp Val Ala

1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 50

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 51

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr

1 5

<210> 52

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric homo sapiens mus musculus

<400> 52

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

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

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

Gly Tyr Ile Val Pro Leu Asn Gly Gly Ser Thr Phe Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asn Thr Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Thr Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val

260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285

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

290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

370 375 380

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

385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415

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

420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440 445

<210> 53

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric homo sapiens mus musculus

<400> 53

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe

20 25 30

Gly Val Ser Phe Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Met Glu Ala Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys

85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125

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

130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 54

<211> 486

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 54

Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser Lys Asn
1 5 10 15

Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu
20 25 30

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

35 40 45

Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu Tyr Ile
50 55 60

Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln
65 70 75 80

Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe Val Gln
85 90 95

Lys Val Asn Glu Ile Gly Ile Tyr Leu Thr Asp Cys Met Glu Arg Ala

100 105 110

Arg Glu Val Ile Pro Arg Ser Gln His Gln Glu Thr Pro Val Tyr Leu
115 120 125

Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu Arg Met Glu Ser Glu Glu Leu
130 135 140

Ala Asp Arg Val Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Pro
145 150 155 160

Phe Asp Phe Gln Gly Ala Arg Ile Ile Thr Gly Gln Glu Glu Gly Ala

165 170 175

Tyr Gly Trp Ile Thr Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Lys Phe Ser Gln Lys
180 185 190

Thr Arg Trp Phe Ser Ile Val Pro Tyr Glu Thr Asn Asn Gln Glu Thr
195 200 205

Phe Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln Val Thr Phe Val
210 215 220

Pro Gln Asn Gln Thr Ile Glu Ser Pro Asp Asn Ala Leu Gln Phe Arg

225 230 235 240

Leu Tyr Gly Lys Asp Tyr Asn Val Tyr Thr His Ser Phe Leu Cys Tyr

245 250 255

Gly Lys Asp Gln Ala Leu Trp Gln Lys Leu Ala Lys Asp Ile Gln Val

260 265 270

Ala Ser Asn Glu Ile Leu Arg Asp Pro Cys Phe His Pro Gly Tyr Lys

275 280 285

Lys Val Val Asn Val Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Pro Cys Thr Lys Arg

290 295 300

Phe Glu Met Thr Leu Pro Phe Gln Gln Phe Glu Ile Gln Gly Ile Gly

305 310 315 320

Asn Tyr Gln Gln Cys His Gln Ser Ile Leu Glu Leu Phe Asn Thr Ser

325 330 335

Tyr Cys Pro Tyr Ser Gln Cys Ala Phe Asn Gly Ile Phe Leu Pro Pro

340 345 350

Leu Gln Gly Asp Phe Gly Ala Phe Ser Ala Phe Tyr Phe Val Met Lys

355 360 365

Phe Leu Asn Leu Thr Ser Glu Lys Val Ser Gln Glu Lys Val Thr Glu

370 375 380

Met Met Lys Lys Phe Cys Ala Gln Pro Trp Glu Glu Ile Lys Thr Ser

385 390 395 400

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

405 410 415

Thr Tyr Ile Leu Ser Leu Leu Leu Gln Gly Tyr His Phe Thr Ala Asp

420 425 430

Ser Trp Glu His Ile His Phe Ile Gly Lys Ile Gln Gly Ser Asp Ala

435 440 445

Gly Trp Thr Leu Gly Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Met Ile Pro Ala

450 455 460

Glu Gln Pro Leu Ser Thr Pro Leu Ser His Ser Thr Tyr Val Asp Tyr

465 470 475 480

Lys Asp Asp Asp Asp Lys

485

<210> 55

<211> 472

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 55

Met Ala Gly Lys Val Arg Ser Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Ala Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Ala Gly Leu Leu Leu Leu Cys Val Pro Thr Arg Asp Val

20 25 30

Arg Glu Pro Pro Ala Leu Lys Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser

35 40 45

Ser His Thr Ser Met Phe Ile Tyr Lys Trp Pro Ala Asp Lys Glu Asn

50 55 60

Asp Thr Gly Ile Val Gly Gln His Ser Ser Cys Asp Val Pro Gly Gly

65 70 75 80

Gly Ile Ser Ser Tyr Ala Asp Asn Pro Ser Gly Ala Ser Gln Ser Leu

85 90 95

Val Gly Cys Leu Glu Gln Ala Leu Gln Asp Val Pro Lys Glu Arg His

100 105 110

Ala Gly Thr Pro Leu Tyr Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu

115 120 125

Asn Leu Thr Asn Pro Glu Ala Ser Thr Ser Val Leu Met Ala Val Thr

130 135 140

His Thr Leu Thr Gln Tyr Pro Phe Asp Phe Arg Gly Ala Arg Ile Leu

145 150 155 160

Ser Gly Gln Glu Glu Gly Val Phe Gly Trp Val Thr Ala Asn Tyr Leu

165 170 175

Leu Glu Asn Phe Ile Lys Tyr Gly Trp Val Gly Arg Trp Phe Arg Pro

180 185 190

Arg Lys Gly Thr Leu Gly Ala Met Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln

195 200 205

Ile Thr Phe Glu Thr Thr Ser Pro Ala Glu Asp Arg Ala Ser Glu Val

210 215 220

Gln Leu His Leu Tyr Gly Gln His Tyr Arg Val Tyr Thr His Ser Phe

225 230 235 240

Leu Cys Tyr Gly Arg Asp Gln Val Leu Gln Arg Leu Leu Ala Ser Ala

245 250 255

Leu Gln Thr His Gly Phe His Pro Cys Trp Pro Arg Gly Phe Ser Thr

260 265 270

Gln Val Leu Leu Gly Asp Val Tyr Gln Ser Pro Cys Thr Met Ala Gln

275 280 285

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

290 295 300

Ser Asp Pro His Leu Cys Arg Asp Leu Val Ser Gly Leu Phe Ser Phe

305 310 315 320

Ser Ser Cys Pro Phe Ser Arg Cys Ser Phe Asn Gly Val Phe Gln Pro

325 330 335

Pro Val Ala Gly Asn Phe Val Ala Phe Ser Ala Phe Phe Tyr Thr Val

340 345 350

Asp Phe Leu Arg Thr Ser Met Gly Leu Pro Val Ala Thr Leu Gln Gln

355 360 365

Leu Glu Ala Ala Ala Val Asn Val Cys Asn Gln Thr Trp Ala Gln Gln

370 375 380

Leu Leu Ser Arg Gly Tyr Gly Phe Asp Glu Arg Ala Phe Gly Gly Val

385 390 395 400

Ile Phe Gln Lys Lys Ala Ala Asp Thr Ala Val Gly Trp Ala Leu Gly

405 410 415

Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Leu Ile Pro Ala Asp Pro Pro Gly Leu

420 425 430

Arg Lys Gly Thr Asp Phe Ser Ser Trp Val Val Leu Leu Leu Leu Phe

435 440 445

Ala Ser Ala Leu Leu Ala Ala Leu Val Leu Leu Leu Arg Gln Val His

450 455 460

Ser Ala Lys Leu Pro Ser Thr Ile

465 470

<210> 56

<211> 484

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 56

Met Lys Lys Gly Ile Arg Tyr Glu Thr Ser Arg Lys Thr Ser Tyr Ile

1 5 10 15

Phe Gln Gln Pro Gln His Gly Pro Trp Gln Thr Arg Met Arg Lys Ile

20 25 30

Ser Asn His Gly Ser Leu Arg Val Ala Lys Val Ala Tyr Pro Leu Gly

35 40 45

Leu Cys Val Gly Val Phe Ile Tyr Val Ala Tyr Ile Lys Trp His Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Arg Trp Gly Gln Gln Ala His Ser Pro Leu Gly Thr Ala Ala Asp

85 90 95

Gly His Glu Val Phe Tyr Gly Ile Met Phe Asp Ala Gly Ser Thr Gly

100 105 110

Thr Arg Val His Val Phe Gln Phe Thr Arg Pro Pro Arg Glu Thr Pro

115 120 125

Thr Leu Thr His Glu Thr Phe Lys Ala Leu Lys Pro Gly Leu Ser Ala

130 135 140

Tyr Ala Asp Asp Val Glu Lys Ser Ala Gln Gly Ile Arg Glu Leu Leu

145 150 155 160

Asp Val Ala Lys Gln Asp Ile Pro Phe Asp Phe Trp Lys Ala Thr Pro
165 170 175
Leu Val Leu Lys Ala Thr Ala Gly Leu Arg Leu Leu Pro Gly Glu Lys
180 185 190
Ala Gln Lys Leu Leu Gln Lys Val Lys Glu Val Phe Lys Ala Ser Pro
195 200 205
Phe Leu Val Gly Asp Asp Cys Val Ser Ile Met Asn Gly Thr Asp Glu

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

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

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

405 410 415

Arg Thr Leu Glu Thr Gln Pro Gln Ser Ser Pro Phe Ser Cys Met Asp

420 425 430

Leu Thr Tyr Val Ser Leu Leu Leu Gln Glu Phe Gly Phe Pro Arg Ser

435 440 445

Lys Val Leu Lys Leu Thr Arg Lys Ile Asp Asn Val Glu Thr Ser Trp

450 455 460

Ala Leu Gly Ala Ile Phe His Tyr Ile Asp Ser Leu Asn Arg Gln Lys

465 470 475 480

Ser Pro Ala Ser

<210> 57

<211> 529

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 57

Met Phe Thr Val Leu Thr Arg Gln Pro Cys Glu Gln Ala Gly Leu Lys

1 5 10 15

Ala Leu Tyr Arg Thr Pro Thr Ile Ile Ala Leu Val Val Leu Leu Val

20 25 30

Ser Ile Val Val Leu Val Ser Ile Thr Val Ile Gln Ile His Lys Gln

35 40 45

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

50 55 60

Ser Ser Arg Thr Thr Val Tyr Val Tyr Gln Trp Pro Ala Glu Lys Glu

65 70 75 80

Asn Asn Thr Gly Val Val Ser Gln Thr Phe Lys Cys Ser Val Lys Gly

85 90 95

Ser Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Asn Asn Pro Gln Asp Val Pro Arg Ala

100 105 110

Phe Glu Glu Cys Met Gln Lys Val Lys Gly Gln Val Pro Ser His Leu

115 120 125

```
His Gly Ser Thr Pro Ile His Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu
    130                 135                 140
Leu Arg Leu Gln Asn Glu Thr Ala Ala Asn Glu Val Leu Glu Ser Ile
145                 150                 155                 160
Gln Ser Tyr Phe Lys Ser Gln Pro Phe Asp Phe Arg Gly Ala Gln Ile
                165                 170                 175

Ile Ser Gly Gln Glu Glu Gly Val Tyr Gly Trp Ile Thr Ala Asn Tyr
            180                 185                 190
Leu Met Gly Asn Phe Leu Glu Lys Asn Leu Trp His Met Trp Val His
        195                 200                 205
Pro His Gly Val Glu Thr Thr Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser
    210                 215                 220
Thr Gln Ile Ser Phe Val Ala Gly Glu Lys Met Asp Leu Asn Thr Ser
225                 230                 235                 240

Asp Ile Met Gln Val Ser Leu Tyr Gly Tyr Val Tyr Thr Leu Tyr Thr
                245                 250                 255
His Ser Phe Gln Cys Tyr Gly Arg Asn Glu Ala Glu Lys Lys Phe Leu
            260                 265                 270
Ala Met Leu Leu Gln Asn Ser Pro Thr Lys Asn His Leu Thr Asn Pro
        275                 280                 285
Cys Tyr Pro Arg Asp Tyr Ser Ile Ser Phe Thr Met Gly His Val Phe
    290                 295                 300

Asp Ser Leu Cys Thr Val Asp Gln Arg Pro Glu Ser Tyr Asn Pro Asn
305                 310                 315                 320
Asp Val Ile Thr Phe Glu Gly Thr Gly Asp Pro Ser Leu Cys Lys Glu
                325                 330                 335
Lys Val Ala Ser Ile Phe Asp Phe Lys Ala Cys His Asp Gln Glu Thr
            340                 345                 350
Cys Ser Phe Asp Gly Val Tyr Gln Pro Lys Ile Lys Gly Pro Phe Val
        355                 360                 365

Ala Phe Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Ala Ser Ala Leu Asn Leu Ser Gly
```

370 375 380

Ser Phe Ser Leu Asp Thr Phe Asn Ser Ser Thr Trp Asn Phe Cys Ser

385 390 395 400

Gln Asn Trp Ser Gln Leu Pro Leu Leu Leu Pro Lys Phe Asp Glu Val

405 410 415

Tyr Ala Arg Ser Tyr Cys Phe Ser Ala Asn Tyr Ile Tyr His Leu Phe

420 425 430

Val Asn Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Glu Thr Trp Pro Gln Ile His Phe

435 440 445

Glu Lys Glu Val Gly Asn Ser Ser Ile Ala Trp Ser Leu Gly Tyr Met

450 455 460

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

465 470 475 480

Pro Ile Glu Pro Pro Val Phe Val Gly Thr Leu Ala Phe Phe Thr Ala

485 490 495

Ala Ala Leu Leu Cys Leu Ala Phe Leu Ala Tyr Leu Cys Ser Ala Thr

500 505 510

Arg Arg Lys Arg His Ser Glu His Ala Phe Asp His Ala Val Asp Ser

515 520 525

Asp

<210> 58

<211> 428

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 58

Met Ala Thr Ser Trp Gly Thr Val Phe Phe Met Leu Val Val Ser Cys

1 5 10 15

Val Cys Ser Ala Val Ser His Arg Asn Gln Gln Thr Trp Phe Glu Gly

20 25 30

Ile Phe Leu Ser Ser Met Cys Pro Ile Asn Val Ser Ala Ser Thr Leu

35 40 45

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

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

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

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

275 280 285
Gln Tyr Gly Gly Asn Gln Glu Gly Glu Val Gly Phe Glu Pro Cys Tyr

290 295 300

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

305 310 315 320

Val Gln Arg Gly Ser Phe Tyr Ala Phe Ser Tyr Tyr Tyr Asp Arg Ala

325 330 335

Val Asp Thr Asp Met Ile Asp Tyr Glu Lys Gly Gly Ile Leu Lys Val

340 345 350

Glu Asp Phe Glu Arg Lys Ala Arg Glu Val Cys Asp Asn Leu Glu Asn

355 360 365

Phe Thr Ser Gly Ser Pro Phe Leu Cys Met Asp Leu Ser Tyr Ile Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

Leu Thr Lys Lys Val Asn Asn Ile Glu Thr Gly Trp Ala Leu Gly Ala

405 410 415

Thr Phe His Leu Leu Gln Ser Leu Gly Ile Ser His

420 425

<210> 59

<211> 330

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 59

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110
Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 60

<211> 330

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 60

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

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

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

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

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

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 61

<211> 330

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

```
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
            100                 105                 110
Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
        115                 120                 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

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

        195                 200                 205
Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225                 230                 235                 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245                 250                 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

            260                 265                 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
```

325 330

<210> 62

<211> 330

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 62

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

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

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

180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

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

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330