(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0113752
(43) 공개일자 2023년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
C07K 14/495 (2006.01) *C07K 14/71* (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-7018338
(22) 출원일자(국제) 2021년11월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년05월31일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2021/133083
(87) 국제공개번호 WO 2022/111576
국제공개일자 2022년06월02일
(30) 우선권주장
PCT/CN2020/132392 2020년11월27일 중국(CN)
202111396829.4 2021년11월23일 중국(CN)

(71) 출원인
엘피사이언스 (쑤저우) 바이오파마, 엘티디.
중국 215127 지앙수 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 상티안 스트리트 218 빌딩 17
엘피사이언스 바이오파마, 엘티디.
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
(72) 발명자
선, 다웨이
중국 201203 상하이 푸동 카일룬 로드 987 3에프
우, 지하오
중국 201203 상하이 푸동 카일룬 로드 987 3에프
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

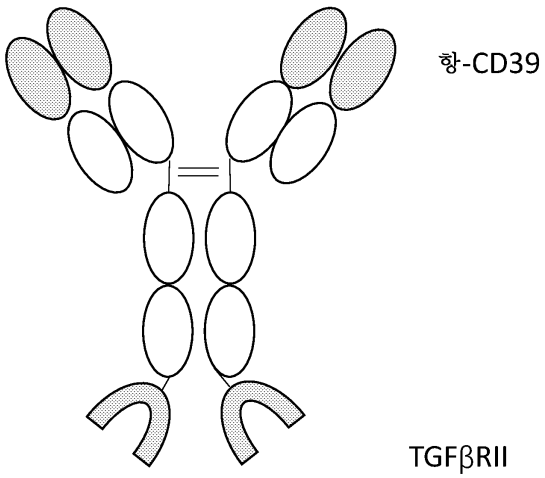
전체 청구항 수 : 총 93 항

(54) 발명의 명칭 **CD39 및 TGF베타를 표적화하는 신규 접합체 분자**

(57) 요 약

CD39와 그의 기질 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 CD39 억제 부분 및 TGFβ와 그의 수용체 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 TGFβ 억제 부분을 포함하는 접합체 분자, 그를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 그를 포함하는 제약 조성물 및 그의 용도가 제공된다.

대 표 도 - 도24a



(52) CPC특허분류
A61P 37/02 (2018.01)
C07K 14/495 (2013.01)
C07K 14/71 (2013.01)
C12N 9/78 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
(72) 발명자
선, 준
중국 201203 상하이 푸동 카일룬 로드 987 3에프
경, 옌안
중국 201203 상하이 푸동 카일룬 로드 987 3에프
가오, 루이
중국 201203 상하이 푸동 카일룬 로드 987 3에프
탕, 릴리
중국 201203 상하이 푸동 카일룬 로드 987 3에프
두, 칭린
중국 201203 상하이 푸동 카일룬 로드 987 3에프
취우, 양성
중국 201203 상하이 푸동 카일룬 로드 987 3에프
아치, 로버트 에이치.
중국 201203 상하이 푸동 카일룬 로드 987 3에프
루, 홍타오
중국 201203 상하이 푸동 카일룬 로드 987 3에프

명 세 서

청구범위

청구항 1

CD39와 그의 기질 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 CD39 억제 부분, 및 TGFβ와 그의 수용체 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 TGFβ 억제 부분을 포함하는 접합체 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, CD39 억제 부분이 CD39와 ATP/ADP 사이의 상호작용을 방해할 수 있고/거나 TGFβ 억제 부분이 TGFβ와 TGFβ 수용체 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 것인 접합체 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, CD39 억제 부분이 CD39-결합제, CD39의 코딩 서열을 표적화하는 RNAi, CD39의 코딩 서열을 표적화하는 안티센스 뉴클레오티드, 및 CD39와 경쟁하여 그의 기질에 결합하는 작용제로 이루어진 군으로부터 선택된 CD39의 길항제인 접합체 분자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, TGFβ 억제 부분이 TGFβ-결합제, TGFβ의 코딩 서열을 표적화하는 RNAi, TGFβ의 코딩 서열을 표적화하는 안티센스 뉴클레오티드, 및 TGFβ와 경쟁하여 그의 수용체에 결합하는 작용제로 이루어진 군으로부터 선택된 TGFβ의 길항제인 접합체 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, CD39-결합제가 CD39를 특이적으로 인식하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 CD39에 결합하는 소분자 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되고/거나, TGFβ-결합제가 TGFβ를 특이적으로 인식하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 TGFβ에 결합하는 소분자 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, TGFβ-결합 도메인에 연결된 CD39-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질인 접합체 분자.

청구항 7

제6항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 인간 및/또는 마우스 TGFβ에 결합하는 것인 접합체 분자.

청구항 8

제6항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 인간 TGFβ1, 인간 TGFβ2 및/또는 인간 TGFβ3에 결합하는 것인 접합체 분자.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 TGFβ 수용체의 세포외 도메인 (ECD)을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 10

제9항에 있어서, TGFβ 수용체가 TGFβ 수용체 I (TGFβRI), TGFβ 수용체 II (TGFβRII), 또는 TGFβ 수용체 III (TGFβRIII)인 접합체 분자.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, ECD가 서열식별번호(SEQ ID NO): 163, 서열식별번호: 164, 서열식별번호: 165의 아미노산 서열, 또는 그의 적어도 85% 서열 동일성을 갖지만 TGFβ에 대한 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 12

제6항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 TGFβ 수용체의 2개 이상의 ECD를 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 13

제12항에 있어서, 2개 이상의 ECD가 동일한 TGFβ 수용체로부터 유래되거나, 또는 적어도 2개의 상이한 TGFβ 수용체로부터 유래된 것인 접합체 분자.

청구항 14

제12항에 있어서, 2개 이상의 ECD가 TGFβRI로부터 유래된 제1 ECD 및 TGFβRII로부터 유래된 제2 ECD를 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 ECD가 직렬로 작동가능하게 연결된 것인 접합체 분자.

청구항 16

제15항에 있어서, 2개 이상의 ECD가 제1 링커를 통해 연결된 것인 접합체 분자.

청구항 17

제16항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 서열식별번호: 166, 서열식별번호: 167, 서열식별번호: 168, 서열식별번호: 169, 서열식별번호: 170, 서열식별번호: 171, 또는 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 18

제6항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CD39-결합 도메인이 인간 CD39에 결합하는 것인 접합체 분자.

청구항 19

제6항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 제2 링커를 통해 CD39 결합 도메인에 연결된 것인 접합체 분자.

청구항 20

제6항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, CD39-결합 도메인이 항-CD39 항체 모이어티를 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 21

제20항에 있어서, 항-CD39 항체 모이어티가 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 22

제21항에 있어서, 항-CD39 항체 모이어티가 중쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 부착된 중쇄 불변 도메인을 추가로 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 항-CD39 항체 모이어티가 경쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 부착된 경쇄 불변 도메인을 추가로 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, TGFβ-결합 도메인이 항-CD39 항체 모이어티의 1) 중쇄 가변 영역의 아미노 말단, 2) 경쇄 가변 영역의 아미노 말단, 3) 중쇄 가변 영역의 카르복실 말단; 4) 경쇄 가변 영역의 카르복실 말단; 5) 중쇄 불변 영역의 카르복실 말단; 및 6) 경쇄 불변 영역의 카르복실 말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결된 것인 접합체 분자.

청구항 25

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 (i) 모두 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역에 연결되거나, 또는 (ii) 모두 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역에 연결된 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 26

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 각각 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 연결된 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 27

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 모두 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역에 연결된 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 28

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 모두 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역에 연결된 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 29

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 각각 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄 불변 영역에 연결된 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 30

제6항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 융합 단백질이 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 초과의 TGFβ-결합 도메인을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 31

제16항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 링커가 절단가능한 링커, 비-절단가능한 링커, 펩티드 링커, 가요성 링커, 강성 링커, 나선형 링커 및 비-나선형 링커로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 접합체 분자.

청구항 32

제31항에 있어서, 제1 및/또는 제2 링커가 펩티드 링커를 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 33

제32항에 있어서, 펩티드 링커가 GS 링커를 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 34

제33항에 있어서, GS 링커가 서열식별번호: 177 (GGGS) 또는 서열식별번호: 173 (GGGGS)의 1개 이상의 반복부를 포함하거나, 또는 서열식별번호: 182 (GGGGSGGGGSGGGGSG)의 아미노산 서열을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 35

제20항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD39 항체 모이어티가 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄

가변 영역 및/또는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 여기서

a) HCDR1은 NYGMN (서열식별번호: 1), KYWMN (서열식별번호: 2), NYWMN (서열식별번호: 3), DTFLH (서열식별번호: 4), DYNMY (서열식별번호: 5) 및 DTYVH (서열식별번호: 6)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

b) HCDR2는 LINTYTGEPTYADDFKD (서열식별번호: 7), EIRLKSNKYGTHYAESVKG (서열식별번호: 8), QIRLNPDNYATHX_1AESVKG (서열식별번호: 9), X_{58}IDPA$X_{59}X_{60}$NIKYDPKFQG (서열식별번호: 151), FIDPYNGYTSYNQKFKG (서열식별번호: 11), 및 RIDPAIDNSKYDPKFQG (서열식별번호: 12)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

c) HCDR3은 KGIYYDYVWFFDV (서열식별번호: 13), QLDLYWFFDV (서열식별번호: 14), HGX_2RGFAY (서열식별번호: 15), SPYYYGSGYRIFDV (서열식별번호: 16), IYGYDDAYYFDY (서열식별번호: 17), 및 YYCALYDGYNVYAMDY (서열식별번호: 18)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

d) LCDR1은 KASQDINRYIA (서열식별번호: 19), RASQSISDYLH (서열식별번호: 20), KSSQSLLDSDGRTHLN (서열식별번호: 21), SAFSSVNYMH (서열식별번호: 22), SATSSVSYMH (서열식별번호: 23), 및 RSSKNLLHSNGITYLY (서열식별번호: 24)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

e) LCDR2는 YTSTLLP (서열식별번호: 25), YASQSIS (서열식별번호: 26), LVSKLDS (서열식별번호: 27), TTSNLAS (서열식별번호: 28), STSNLAS (서열식별번호: 29) 및 RASTLAS (서열식별번호: 30)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

f) LCDR3은 LQYSNLLT (서열식별번호: 31), QNGHSLPLT (서열식별번호: 32), WQGTLFPWT (서열식별번호: 33), QQRSTYPFT (서열식별번호: 34), QQRITYPFT (서열식별번호: 35) 및 AQLLELPHT (서열식별번호: 36)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

여기서 X_1은 Y 또는 F이고, X_2는 S 또는 T이고, X_{58}은 R 또는 K이고, X_{59}는 N, G, S 또는 Q이고, X_{60}은 G, A 또는 D인

접합체 분자.

청구항 36

제35항에 있어서,

a) HCDR1이 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

b) HCDR2가 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

c) HCDR3이 서열식별번호: 15의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

d) LCDR1이 서열식별번호: 21의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

e) LCDR2가 서열식별번호: 27의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

f) LCDR3이 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하고,

여기서 X_1 및 X_2는 제35항에 정의된 바와 같은 것인

접합체 분자.

청구항 37

제36항에 있어서,

HCDR2가 서열식별번호: 37 및 서열식별번호: 38로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고/거나,

HCDR3이 서열식별번호: 40 및 서열식별번호: 41로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인

접합체 분자.

청구항 38

제35항에 있어서,

a) HCDR1이 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

b) HCDR2가 서열식별번호: 151의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

c) HCDR3이 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

d) LCDR1이 서열식별번호: 22의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

e) LCDR2가 서열식별번호: 28의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

f) LCDR3이 서열식별번호: 34의 아미노산 서열을 포함하고,

여기서 X_{58}, X_{59} 및 X_{60}은 제35항에 정의된 바와 같은 것인

접합체 분자.

청구항 39

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 하기를 포함하는 것인 접합체 분자:

a) 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 7의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

b) 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 8의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 14의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

c) 서열식별번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 37의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 40의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

d) 서열식별번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 38의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 41의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

e) 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

f) 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 134, 135, 136, 137, 138 및 139로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

g) 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

h) 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 18의 서열을 포함하는 HCDR3.

청구항 40

제35항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄 가변 영역이 하기를 포함하는 것인 접합체 분자:

a) 서열식별번호: 19의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 25의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 31의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

b) 서열식별번호: 20의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 32의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

c) 서열식별번호: 21의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 27의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 33의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

d) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

e) 서열식별번호: 23의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 29의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호:

35의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

f) 서열식별번호: 24의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 30의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 36의 서열을 포함하는 LCDR3.

청구항 41

제35항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,

a) HCDR1이 서열식별번호: 1의 서열을 포함하고, HCDR2가 서열식별번호: 7의 서열을 포함하고, HCDR3이 서열식별번호: 13의 서열을 포함하고; LCDR1이 서열식별번호: 19의 서열을 포함하고, LCDR2가 서열식별번호: 25의 서열을 포함하고, LCDR3이 서열식별번호: 31의 서열을 포함하거나; 또는

b) HCDR1이 서열식별번호: 2의 서열을 포함하고, HCDR2가 서열식별번호: 8의 서열을 포함하고, HCDR3이 서열식별번호: 14의 서열을 포함하고, LCDR1이 서열식별번호: 20의 서열을 포함하고, LCDR2가 서열식별번호: 26의 서열을 포함하고, LCDR3이 서열식별번호: 32의 서열을 포함하거나; 또는

c) HCDR1이 서열식별번호: 3의 서열을 포함하고, HCDR2가 서열식별번호: 37의 서열을 포함하고, HCDR3이 서열식별번호: 40의 서열을 포함하고; LCDR1이 서열식별번호: 21의 서열을 포함하고, LCDR2가 서열식별번호: 27의 서열을 포함하고, LCDR3이 서열식별번호: 33의 서열을 포함하거나; 또는

d) HCDR1이 서열식별번호: 3의 서열을 포함하고, HCDR2가 서열식별번호: 38의 서열을 포함하고, HCDR3이 서열식별번호: 41의 서열을 포함하고, LCDR1이 서열식별번호: 21의 서열을 포함하고, LCDR2가 서열식별번호: 27의 서열을 포함하고, LCDR3이 서열식별번호: 33의 서열을 포함하거나; 또는

e) HCDR1이 서열식별번호: 4의 서열을 포함하고, HCDR2가 서열식별번호: 10의 서열을 포함하고, HCDR3이 서열식별번호: 16의 서열을 포함하고, LCDR1이 서열식별번호: 22의 서열을 포함하고, LCDR2가 서열식별번호: 28의 서열을 포함하고, LCDR3이 서열식별번호: 34의 서열을 포함하거나; 또는

f) HCDR1이 서열식별번호: 4의 서열을 포함하고, HCDR2가 서열식별번호: 134, 135, 136, 137, 138 및 139로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고, HCDR3이 서열식별번호: 16의 서열을 포함하고; LCDR1이 서열식별번호: 22의 서열을 포함하고, LCDR2가 서열식별번호: 28의 서열을 포함하고, LCDR3이 서열식별번호: 34의 서열을 포함하거나; 또는

g) HCDR1이 서열식별번호: 5의 서열을 포함하고, HCDR2가 서열식별번호: 11의 서열을 포함하고, HCDR3이 서열식별번호: 17의 서열을 포함하고; LCDR1이 서열식별번호: 23의 서열을 포함하고, LCDR2가 서열식별번호: 29의 서열을 포함하고, LCDR3이 서열식별번호: 35의 서열을 포함하거나; 또는

h) HCDR1이 서열식별번호: 6의 서열을 포함하고, HCDR2가 서열식별번호: 12의 서열을 포함하고, HCDR3이 서열식별번호: 18의 서열을 포함하고; LCDR1이 서열식별번호: 24의 서열을 포함하고, LCDR2가 서열식별번호: 30의 서열을 포함하고, LCDR3이 서열식별번호: 36의 서열을 포함하는 것인

접합체 분자.

청구항 42

제35항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD39 항체 모이어티가 중쇄 프레임워크 영역 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상, 및/또는 경쇄 프레임워크 영역 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하며, 여기서

HFR1은 서열식별번호: 84-86, 115, 119-120, 및 131로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고;

HFR2는 서열식별번호: 87-90 및 121-123으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고;

HFR3은 서열식별번호: 91-97, 116-117 및 124-125로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고;

HFR4는 서열식별번호: 79 및 118로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고;

LFR1은 서열식별번호: 98-103 및 127-129로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고;

LFR2는 서열식별번호: 104, 105 및 130으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고;

LFR3은 서열식별번호: 106-110 및 132-133으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하고,

LFR4는 서열식별번호: 83 및 153으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인

접합체 분자.

청구항 43

제35항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD39 항체 모이어티가

서열식별번호: 60, 62, 64, 66, 140, 141, 142, 146, 147 및 39로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 인간 CD39에 대한 특이적 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

서열식별번호: 61, 63, 65, 67, 143, 144, 145, 111, 112 및 63으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 인간 CD39에 대한 특이적 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 44

제35항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD39 항체 모이어티가

서열식별번호: 68, 70, 72 및 74로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 인간 CD39에 대한 특이적 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

서열식별번호: 69, 71, 73 및 75로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 인간 CD39에 대한 특이적 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역

을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 45

제35항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD39 항체 모이어티가 하기를 포함하는 것인 접합체 분자:

a) 서열식별번호: 42의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 51의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

b) 서열식별번호: 43의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 52의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

c) 서열식별번호: 44의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 53의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

d) 서열식별번호: 45의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 54의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

e) 서열식별번호: 47의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 56의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

f) 서열식별번호: 49의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 58의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

g) 서열식별번호: 50의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 59의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

h) 서열식별번호: 60의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

i) 서열식별번호: 62의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

j) 서열식별번호: 64의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영

역, 또는

k) 서열식별번호: 66의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

l) 서열식별번호: 60의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 65의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

m) 서열식별번호: 62의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 65의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

n) 서열식별번호: 64의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 65의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

o) 서열식별번호: 66의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 65의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

p) 서열식별번호: 60의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 67의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

q) 서열식별번호: 62의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 67의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

r) 서열식별번호: 64의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 67의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

s) 서열식별번호: 66의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 67의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

t) 서열식별번호: 140의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 61의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

u) 서열식별번호: 141의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 61의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

v) 서열식별번호: 142의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 61의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

w) 서열식별번호: 140의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 143의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

x) 서열식별번호: 141의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 143의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

y) 서열식별번호: 142의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 143의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

z) 서열식별번호: 140의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 144의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

aa) 서열식별번호: 141의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 144의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

bb) 서열식별번호: 142의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 144의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

cc) 서열식별번호: 140의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 145의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

dd) 서열식별번호: 141의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 145의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

ee) 서열식별번호: 142의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 145의 서열을 포함하는 경쇄 가변

영역, 또는

ff) 서열식별번호: 146의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 111의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

gg) 서열식별번호: 146의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 112의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

hh) 서열식별번호: 147의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 111의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

ii) 서열식별번호: 39의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 63의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

jj) 서열식별번호: 68의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 69의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

kk) 서열식별번호: 70의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 69의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

ll) 서열식별번호: 72의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 69의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

mm) 서열식별번호: 74의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 69의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

nn) 서열식별번호: 68의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 71의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

oo) 서열식별번호: 70의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 71의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

pp) 서열식별번호: 72의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 71의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

qq) 서열식별번호: 74의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 71의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

rr) 서열식별번호: 68의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 73의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

ss) 서열식별번호: 70의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 73의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

tt) 서열식별번호: 72의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 73의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

uu) 서열식별번호: 74의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 73의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

vv) 서열식별번호: 68의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 75의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

ww) 서열식별번호: 70의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 75의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

xx) 서열식별번호: 72의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 75의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는

yy) 서열식별번호: 74의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 75의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역.

청구항 46

제35항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD39 항체 모이어티가 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만 인간 CD39에 대한 특이적 결합 특이성을 보유하는 것인 접합체 분자.

청구항 47

제46항에 있어서, 치환 또는 변형 중 적어도 1개가 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 CDR 서열 중 1개 이상 및/또는 비-CDR 서열 중 1개 이상에 있는 것인 접합체 분자.

청구항 48

제21항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 불변 영역이 인간 이뮤노글로불린 (Ig), 또는 임의로 인간 IgG로부터 유래된 것인 접합체 분자.

청구항 49

제48항에 있어서, 불변 영역이 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 또는 IgM으로부터 유래된 것인 접합체 분자.

청구항 50

제35항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD39 항체 모이어티가 인간화된 것인 접합체 분자.

청구항 51

제19항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 항-CD39 항체 모이어티가 디아바디, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv 단편, 디술피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), $(dsFv)_2$, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디술피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), 단일-쇄 항체 분자 (scFv), scFv 이량체 (2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체 또는 2가 도메인 항체인 접합체 분자.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, FACS 검정에 의해 측정 시 10^{-8} M 이하의 EC_{50}으로 인간 CD39에 특이적으로 결합할 수 있는 접합체 분자.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 특성을 갖는 접합체 분자:

a) FACS 검정에 의해 측정 시 인간 CD39에 특이적으로 결합하지만 마우스 CD39에는 특이적으로 결합하지 않음;

b) FACS 검정에 의해 측정 시 10^{-8} M 이하의 EC_{50}으로 시노몰구스 CD39에 특이적으로 결합함;

c) 비아코어 검정에 의해 측정 시 10^{-7} M 이하 (예를 들어 5×10^{-8} M 이하, 3×10^{-8} M 이하, 2×10^{-8} M 이하, 1×10^{-8} M 이하, 또는 8×10^{-9} M 이하)의 K_D 값으로 인간 CD39에 특이적으로 결합함;

d) 옥텟 검정에 의해 측정 시 10^{-8} M 이하 (예를 들어 8×10^{-9} M 이하, 5×10^{-9} M 이하, 4×10^{-9} M 이하, 3×10^{-9} M 이하, 1×10^{-9} M 이하, 또는 9×10^{-10} M 이하)의 K_D 값으로 인간 CD39에 특이적으로 결합함;

e) ATPase 활성 검정에 의해 측정 시 50 nM 이하 (예를 들어 1 nM 이하, 5 nM 이하, 10 nM 이하 또는 30 nM 이하)의 IC_{50}으로 CD39 발현 세포에서 ATPase 활성을 억제함;

f) FACS 검정에 의한 CD80, CD86 및/또는 CD40 발현의 분석에 의해 측정 시 10 nM 이하 (예를 들어 5 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 1 nM 이하, 0.5 nM 이하 또는 0.2 nM 이하)의 농도에서 ATP 매개 단핵구 활성화를 증진

시킬 수 있음;

g) IL-2 분비, IFN-γ 분비, CD4+ 또는 CD8+ T 세포 증식에 의해 측정 시 25 nM 이하의 농도에서 PBMC에서 ATP 매개 T 세포 활성화를 증진시킬 수 있음;

h) FACS 검정에 의한 CD83 발현의 분석에 의해, 또는 T 세포 증식을 촉진하는 활성화된 DC의 능력에 의해, 또는 혼합-림프구 반응 (MLR) 검정에서 IFN-γ 생산을 촉진하는 활성화된 DC의 능력에 의해 측정 시 25 nM 이하 (또는 10 nM 이하, 또는 5 nM 이하, 또는 1 nM 이하, 또는 0.5 nM 이하)의 농도에서 ATP 매개 수지상 세포 (DC) 활성화를 증진시킬 수 있음;

i) FACS 검정에 의해 측정 시 1 nM 이하 (예를 들어 0.1 nM 이하, 0.01 nM 이하)의 농도에서 아데노신 (ATP로부터 가수분해됨)에 의해 유도된 $CD4^+$ T 세포 증식의 억제를 차단할 수 있음;

j) 포유동물에서 NK 세포 또는 대식세포 세포 의존성 방식으로 종양 성장을 억제할 수 있음;

k) T 세포 증식, $CD25^+$ 세포, 및 살아있는 세포 집단에 의해 측정 시 eATP에 의해 억제된 인간 $CD8^+$ T 세포 증식을 역전시킬 수 있음; 및

l) ELISA 검정에 의해 측정 시 50 nM 이하 (또는 12.5 nM 이하, 또는 3.13 nM 이하, 또는 0.78 nM 이하, 또는 0.2 nM 이하, 또는 0.049 nM 이하, 또는 0.012 nM 이하, 또는 0.003 nM 이하, 또는 0.0008 nM 이하)의 농도에서 LPS 자극에 의해 유도된 인간 대식세포 IL1β 방출을 증진시킬 수 있음.

청구항 54

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, CD39-결합 도메인이 서열식별번호: 43의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 52의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 CD39에의 결합에 대해 경쟁하는 것인 접합체 분자.

청구항 55

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, CD39-결합 도메인이 인간 CD39에의 결합에 대해, 서열식별번호: 44의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 53의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하거나, 또는 서열식별번호: 45의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 54의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁하는 것인 접합체 분자.

청구항 56

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, CD39-결합 도메인이 서열식별번호: 47의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 56의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 CD39에의 결합에 대해 경쟁하는 것인 접합체 분자.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, CD39-결합 도메인이 CD39의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 에피토프가 Q96, N99, E143, R147, R138, M139, E142, K5, E100, D107, V81, E82, R111 및 V115로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기를 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 58

제57항에 있어서, 에피토프가 Q96, N99, E143 및 R147로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기를 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 59

제57항에 있어서, 에피토프가 R138, M139 및 E142로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기를 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 60

제57항에 있어서, 에피토프가 K5, E100 및 D107로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기를 포함하는 것

인 접합체 분자.

청구항 61

제57항에 있어서, 에피토프가 V81, E82, R111 및 V115로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기를 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, CD39-결합 도메인이 서열식별번호: 162의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD39에 특이적으로 결합하는 것인 접합체 분자.

청구항 63

제56항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, CD39-결합 도메인이 항체 9-8B, 항체 T895, 및 항체 I394 중 임의의 것으로부터 유래되지 않고, 여기서

항체 9-8B는 서열식별번호: 46의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 48의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고;

항체 T895는 서열식별번호: 55의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열식별번호: 57의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고;

항체 I394는 서열식별번호: 113의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 114의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인

접합체 분자.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 특성을 갖는 접합체 분자:

a) 인간 TGFβ1, 인간 TGFβ2 및/또는 인간 TGFβ3에 특이적으로 결합함;

b) 인간 TGFβ1 및 마우스 TGFβ1에 유사한 친화도로 특이적으로 결합함;

c) ELISA 검정에 의해 측정 시 3 x 10^{-11} M 이하 (예를 들어 2 x 10^{-11} M 이하, 1 x 10^{-11} M 이하, 0.9 x 10^{-11} M 이하, 0.8 x 10^{-11} M 이하, 0.7 x 10^{-11} M 이하, 0.6 x 10^{-11} M 이하, 0.5 x 10^{-11} M 이하)의 EC_{50}으로 인간 TGFβ1에 특이적으로 결합함;

d) 차단 검정에 의해 측정 시 4 x 10^{-10} M 이하 (예를 들어, 3 x 10^{-10} M 이하, 2 x 10^{-10} M 이하, 1 x 10^{-10} M 이하, 0.5 x 10^{-10} M 이하)의 IC_{50}으로 인간 TGFβ1 및 TGFβRII 결합을 차단할 수 있음;

e) FACS 검정에 의해 측정 시 용량-의존성 방식으로 인간 CD39에 결합할 수 있음;

f) ELISA 검정 또는 FACS 검정에 의해 측정 시 CD39 및 TGFβ에 동시에 결합할 수 있음;

g) TGF-β SMAD 리포터 검정에 의해 측정 시 4 x 10^{-11} M 이하의 IC_{50}으로 TGFβ 신호를 억제할 수 있음;

h) ATPase 활성 검정에 의해 측정 시 7 x 10^{-10} M 이하 (예를 들어, 6 x 10^{-10} M 이하, 5 x 10^{-10} M 이하, 4 x 10^{-10} M 이하, 3 x 10^{-10} M 이하, 2 x 10^{-10} M 이하, 1 x 10^{-10} M 이하, 0.5 x 10^{-10} M 이하)의 IC_{50}으로 CD39 발현 세포에서 ATPase 활성을 억제할 수 있음;

i) 옥텟 검정에 의해 측정 시 4 x 10^{-10} M 이하 (예를 들어, 3 x 10^{-10} M 이하, 2 x 10^{-10} M 이하, 1 x 10^{-10} M 이하, 또는 0.5 x 10^{-10} M 이하)의 K_D 값으로 인간 CD39에 특이적으로 결합함;

j) 옥텟 검정에 의해 측정 시 4 x 10^{-11} M 이하 (예를 들어 3 x 10^{-11} M 이하, 2 x 10^{-11} M 이하, 1 x 10^{-11} M 이하, 또는 0.5 x 10^{-11} M 이하)의 K_D 값으로 인간 TGFβ1에 특이적으로 결합함;

k) Treg 억제 검정에 의해 측정 시 T 세포 기능을 회복시킬 수 있음;

l) 용량-의존성 방식으로 인간 T 세포 아폽토시스를 억제할 수 있음;

m) 자극에 대한 인간 T 세포 생존 및 활성화를 촉진할 수 있음;

n) 총 T 세포 상에서의 TGFβ 유도된 Foxp3 발현을 차단할 수 있음; 및

o) 인간 T 세포 증식에 대한 ATP 유도된 억제를 회복시킬 수 있음.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 접합체 모이어티를 추가로 포함하는 접합체 분자.

청구항 66

제65항에 있어서, 접합체 모이어티가 클리어런스-변형제, 화학요법제, 독소, 방사성 동위원소, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지, DNA-알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜불린-결합제, 정제 모이어티 또는 다른 항암 약물을 포함하는 것인 접합체 분자.

청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 접합체 분자, 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항의 접합체 분자를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 69

제68항의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 70

제69항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 71

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 접합체 분자 및/또는 제67항의 제약 조성물, 및 제2 치료제를 포함하는 키트.

청구항 72

제69항의 벡터가 발현되는 조건 하에 제70항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 접합체 분자를 발현시키는 방법.

청구항 73

대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 접합체 분자 및/또는 제67항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 CD39 관련 및/또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화시키는 방법.

청구항 74

대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 접합체 분자 및/또는 제67항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 CD39의 ATPase 활성을 감소시킴으로써 치료가능한 질환을 치료, 예방 또는 완화시키는 방법.

청구항 75

대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 접합체 분자 및/또는 제67항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 T, 단핵구, 대식세포, DC, APC, NK 및/또는 B 세포 활성의 아데노신-매개 억제와 연관된 질환을 치료, 예방 또는 완화시키는 방법.

청구항 76

대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 접합체 분자 및/또는 제67항의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 TGFβ의 증가된 수준 및/또는 활성과 연관된 질환을 치료, 예방 또는 완화시키는 방법.

청구항 77

제73항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 질환, 장애 또는 상태가 암, 췌장 위축 또는 섬유증인 방법.

청구항 78

제77항에 있어서, 암이 항문암, 충수암, 성상세포종, 기저 세포 암종, 담낭암, 위암, 폐암, 기관지암, 골암, 간 및 담관암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 신우 및 요관암, 타액선암, 소장암, 요도암, 방광암, 두경부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 식도암, 위장암, 피부암, 전립선암, 뇌하수체암, 질암, 갑상선암, 인후암, 교모세포종, 흑색종, 골수이형성 증후군, 육종, 기형종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, T 또는 B 세포 림프종, GI 기관 간질종, 연부 조직 종양, 간세포성 암종 또는 선암종인 방법.

청구항 79

제77항에 있어서, 암이 백혈병, 림프종, 방광암, 신경교종, 교모세포종, 난소암, 흑색종, 전립선암, 갑상선암, 식도암 또는 유방암인 방법.

청구항 80

제73항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 CD39 및/또는 TGFβ를 발현하는 암 세포 또는 종양 침윤 면역 세포 또는 면역 억제 세포를, 임의로 비-암 세포 또는 비-면역 억제 세포에서 정상적으로 발견되는 수준으로부터 유의하게 더 높은 수준으로 갖는 것으로 확인된 것인 방법.

청구항 81

제80항에 있어서, 면역 억제 세포가 조절 T 세포인 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 대상체가 대조군 대상체에서 정상적으로 발견되는 조절 T 세포의 활성과 비교하여 종양 미세환경에서 과다활성 조절 T 세포를 갖는 것으로 확인된 것인 방법.

청구항 83

제81항 또는 제82항에 있어서, 대상체가 면역억제의 복귀, 또는 기능장애성 소진된 T 세포의 복귀로부터 유익할 것으로 예상되는 것인 방법.

청구항 84

제73항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 질환, 장애 또는 상태가 자가면역 질환 또는 감염인 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 자가면역 질환이 면역 혈소판감소증, 전신 경피증, 경화증, 성인 호흡 곤란 증후군, 습진, 천식, 쇼그렌 증후군, 애디슨병, 거대 세포 동맥염, 면역 복합체 신염, 면역 혈소판감소성 자반증, 자가면역 혈소

판감소증, 복강 질환, 건선, 피부염, 결장염 또는 전신 홍반성 루푸스인 방법.

청구항 86

제84항에 있어서, 감염이 HIV 감염, HBV 감염, HCV 감염, 염증성 장 질환 또는 크론병인 방법.

청구항 87

제73항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 88

제73항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 경구, 비강, 정맥내, 피하, 설하 또는 근육내 투여를 통한 것인 방법.

청구항 89

제73항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 유효량의 제2 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 제2 치료제가 화학요법제, 항암 약물, 방사선 요법제, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적화 요법제, 세포 요법제, 유전자 요법제, 호르몬 요법제, 항바이러스제, 항생제, 진통제, 항산화제, 금속 킬레이트화제 및 시토카인으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 91

CD39-양성 세포를 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 접합체 분자 및/또는 제67항의 제약 조성물에 노출시키는 것을 포함하는, CD39-양성 세포에서 CD39 활성을 조정하는 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, CD39-양성 세포가 면역 세포인 방법.

청구항 93

대상체에서 CD39 관련 또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화시키기 위한 의약의 제조에서의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 접합체 분자 및/또는 제67항의 제약 조성물의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 CD39 및 TGFβ를 표적화하는 신규 접합체 분자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 엑토-뉴클레오시드 트리포스페이트 디포스포히드롤라제-1 (ENTPDase 1)로도 공지된 CD39는 ATP 또는 ADP를 AMP로 전환시키는 내재성 막 단백질이고, 이어서 CD73이 AMP를 아데노신으로 탈인산화시키며, 아데노신은 강력한 면역억제인자이고, $CD4^+$, $CD8^+$ T 세포 및 자연 킬러 (NK) 세포의 표면에서 아데노신 수용체 (예를 들어, A2A 수용체)에 결합하고, T-세포 및 NK-세포 반응을 억제하여, 이로써 면역계를 억제한다. 아데노신은 또한 대식세포 및 수지상 세포 상의 A2A 또는 A2B 수용체에 결합하고, 식세포작용 및 항원 제시를 억제하고, 종양발생촉진 인자, 예컨대 VEGF, TGFβ 및 IL-6의 분비를 증가시킨다. CD39 및 CD73의 효소적 활성은 각각 ADP 및 ATP의 AMP로의 전환 및 AMP의 아데노신으로의 전환을 통해 면역 세포에 전달된 퓨린성 신호의 지속기간, 규모 및 화학적 성질을 보정하는 데 있어서 전략적 역할을 한다 (Luca Antonioli et al., Trends Mol Med. 2013 Jun;19(6):355-367). CD39 및 CD73에 의해 매개된 증가된 아데노신 수준은 암의 발생 및 진행을 촉진하는 면역억제 환경을 생성한다.

[0003] 형질전환 성장 인자 베타 (TGFβ)는 후기 원발성 및 전이성 종양에서 상승된 수준으로 발현되는 다면발현성 시토카인이고, 항증식성 및 종양-촉진 신호전달 캐스케이드 둘 다를 활성화시킨다. 종양 기질 세포 및 많은 유형의 종양, 예컨대 유방, 결장, 폐, 췌장, 전립선, 뿐만 아니라 혈액 악성종양은 높은 수준의 TGFβ를 생산하였다. 종양 세포의 상피-중간엽 이행 (EMT), 침습 및 전이를 촉진하는 것 이외에, TGFβ는 종양이 인터페론-γ (IFN-γ)의 발현을 억제하는 것, Th1 세포의 분화를 제한하는 것, $CD8^+$ 이펙터 세포의 기능을 약화시키는 것과 같은 메카니즘을 통해 면역 감시를 피할 수 있게 한다. 가장 유의하게, TGFβ는 조절 T 세포 (Treg)의 분화를 유도한다. Treg는 면역억제 시토카인 (IL-10, TGFβ 및 IL-35)의 생산, 억제 분자 (CTLA-4)의 발현을 통해 및 ATP를 CD39를 통해 아데노신으로 가수분해함으로써 염증을 추가로 억제한다.

[0004] 종양에 대한 면역 반응을 조정하는 데 있어서의 CD39 및 TGFβ의 역할을 고려하면, 질환, 예를 들어 암의 치료를 위해 CD39 활성, 또는 CD39 및 TGFβ 활성 둘 다를 길항하는 치료제에 대한 필요가 남아있다.

발명의 내용

[0005] 발명의 요약

[0006] 본 개시내용 전반에 걸쳐, 단수 표현은 단수 표현의 문법적 대상의 하나 또는 하나 초과 (즉, 적어도 하나)를 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 예로서, "항체"는 하나의 항체 또는 하나 초과의 항체를 의미한다.

[0007] 한 측면에서, 본 개시내용은 CD39와 그의 기질 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 CD39 억제 부분, 및 TGFβ와 그의 수용체 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 TGFβ 억제 부분을 포함하는 접합체 분자를 제공한다.

[0008] 특정 실시양태에서, CD39 억제 부분은 CD39와 ATP/ADP 사이의 상호작용을 방해할 수 있고/거나, TGFβ 억제 부분은 TGFβ와 TGFβ 수용체 사이의 상호작용을 방해할 수 있다. 특정 실시양태에서, CD39 억제 부분은 CD39-결합제, CD39의 코딩 서열을 표적화하는 RNAi, CD39의 코딩 서열을 표적화하는 안티센스 뉴클레오티드, 및 CD39와 경쟁하여 그의 기질에 결합하는 작용제로 이루어진 군으로부터 선택된 CD39의 길항제이다. 특정 실시양태에서, TGFβ 억제 부분은 TGFβ-결합제, TGFβ의 코딩 서열을 표적화하는 RNAi, TGFβ의 코딩 서열을 표적화하는 안티센스 뉴클레오티드, 및 TGFβ와 경쟁하여 그의 수용체에 결합하는 작용제로 이루어진 군으로부터 선택된 TGFβ의 길항제이다. 특정 실시양태에서, CD39-결합제는 CD39를 특이적으로 인식하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 CD39에 결합하는 소분자 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되고/거나, TGFβ-결합제는 TGFβ를 특이적으로 인식하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 TGFβ에 결합하는 소분자 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0009] 특정 실시양태에서, 접합체 분자는 TGFβ-결합 도메인에 연결된 CD39-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 인간 및/또는 마우스 TGFβ에 결합한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 인간 TGFβ1, 인간 TGFβ2 및/또는 인간 TGFβ3에 결합한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ 수용체의 세포외 도메인 (ECD)을 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ 수용체는 TGFβ 수용체 I (TGFβRI), TGFβ 수용체 II (TGFβRII), 또는 TGFβ 수용체 III (TGFβRIII)이다. 특정 실시양태에서, ECD는 서열식별번호(SEQ ID NO): 163, 서열식별번호: 164, 서열식별번호: 165의 아미노산 서열, 또는 그의 적어도 85% 서열 동일성을 갖지만 TGFβ에 대한 결합 특이성을 보유하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ 수용체의 2개 이상의 ECD를 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 동일한 TGFβ 수용체로부터 유래되거나, 또는 적어도 2개의 상이한 TGFβ 수용체로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 TGFβRI로부터 유래된 제1 ECD 및 TGFβRII로부터 유래된 제2 ECD를 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 직렬로 작동가능하게 연결된다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 제1 링커를 통해 연결된다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 서열식별번호: 166, 서열식별번호: 167, 서열식별번호: 168, 서열식별번호: 169, 서열식별번호: 170, 서열식별번호: 171, 또는 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0010] 특정 실시양태에서, CD39-결합 도메인은 인간 CD39에 결합한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 제2 링커를 통해 CD39 결합 도메인에 연결된다. 특정 실시양태에서, CD39-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티는 중쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 부착된 중쇄 불변 도메인을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티는 경쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 부착된 경쇄 불변 도메인을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 1) 중쇄 가변 영역의 아미노 말단, 2) 경쇄 가변 영역의 아미노 말단, 3) 중쇄 가변 영역의 카르복실 말단; 4) 경쇄 가변 영

역의 카르복실 말단; 5) 중쇄 불변 영역의 카르복실 말단; 및 6) 경쇄 불변 영역의 카르복실 말단으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결된다.

[0011] 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 (i) 모두 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역에 연결되거나, 또는 (ii) 모두 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역에 연결된 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 각각 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 연결된 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역에 연결된 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역에 연결된 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 융합 단백질은 각각 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄 불변 영역에 연결된 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다.

[0012] 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 초과의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 링커는 절단가능한 링커, 비-절단가능한 링커, 펩티드 링커, 가요성 링커, 강성 링커, 나선형 링커, 및 비-나선형 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 링커는 펩티드 링커를 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 링커는 GS 링커를 포함한다. 특정 실시양태에서, GS 링커는 서열식별번호: 177 (GGGS) 또는 서열식별번호: 173 (GGGGS)의 1개 이상의 반복부를 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 링커는 GGGGSGGGGSGGGGSG (서열식별번호: 182)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 접합체 분자, 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 접합체 분자를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 접합체 분자 및/또는 본 개시내용의 제약 조성물, 및 제2 치료제를 포함하는 키트를 제공한다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 벡터가 발현되는 조건 하에 본 개시내용의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 본 개시내용의 접합체 분자를 발현시키는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 본 개시내용의 접합체 분자 및/또는 본 개시내용의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 CD39 관련 및/또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화시키는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 본 개시내용의 접합체 분자 및/또는 본 개시내용의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 CD39의 ATPase 활성을 감소시킴으로써 치료 가능한 질환을 치료, 예방 또는 완화시키는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 본 개시내용의 접합체 분자 및/또는 본 개시내용의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 T, 단핵구, 대식세포, DC, APC, NK 및/또는 B 세포 활성의 아데노신-매개 억제와 연관된 질환을 치료, 예방 또는 완화시키는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 CD39-양성 세포를 본 개시내용의 접합체 분자 및/또는 본 개시내용의 제약 조성물에 노출시키는 것을 포함하는, CD39-양성 세포에서 CD39 활성을 조정하는 방법을 제공한다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 본 개시내용의 접합체 분자 및/또는 본 개시내용의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 TGFβ의 증가된 수준 및/또는 활성과 연관된 질환을 치료, 예방 또는 완화시키는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 CD39 관련 또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화시키기 위한 의약의 제조에서의 본 개시내용의 접합체 분자 및/또는 본 개시내용의 제약 조성물의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 항-CD39 모노클로날 항체 mAb21 및 mAb23에 의한 T 세포 증식의 ATP-매개 억제의 차단을 보여준다. mIgG2a를 이소형 대조군 항체로서 사용하였다.

도 2는 항-CD39 키메라 항체 c14, c19, c21 및 c23에 의한 T 세포 증식의 ATP-매개 억제의 차단을 보여준다. hIgG4는 인간 IgG4 이소형 대조군 항체를 지칭한다.

도 3은 수지상 세포 (DC) 상의 CD39 발현 수준을 보여준다.

도 4a 내지 4c는 FACS를 사용하여 CD86 (도 4a), CD83 (도 4b) 및 HLA-DR (도 4c) 발현에 의해 측정된, 항-CD39 키메라 항체 c14, c19, c21 및 c23에 의한 ATP-매개 DC 활성화를 보여준다.

도 5는 MOLP-8 세포 (인간 다발성 골수종 세포주)를 접종한 마우스에서 항-CD39 키메라 항체 c23-hIgG4 및 c23-hIgG1로 처리한 후의 종양 성장을 보여준다.

도 6a는 각각 ENTPD1 (즉, CD39), ENTPD2 (즉, CD39L1), ENTPD3 (즉, CD39L3), ENTPD5 (즉, CD39L4) 및 ENTPD6 (즉, CD39L2) 단백질에 대한 인간화 항체 hu23.H5L5의 결합 특성을 보여준다. 도 6b는 각각 음성 대조군 hIgG4와 ENTPD1 (즉, CD39), ENTPD2 (즉, CD39L1), ENTPD3 (즉, CD39L3), ENTPD5 (즉, CD39L4) 및 ENTPD6 (즉, CD39L2) 단백질의 결합을 보여준다.

도 7a 및 7b는 FACS에 의한 MOLP-8 세포와 c23 인간화 항체의 결합 활성을 보여준다.

도 8은 MOLP-8 세포와 c23 인간화 항체 (효모 디스플레이에 의해 수득됨)의 결합 활성을 보여준다.

도 9a 및 9b는 FACS에 의한 SK-MEL-28 세포에 대한 c23 인간화 항체의 ATPase 억제를 보여준다.

도 10a 내지 10c는 FACS에 의한 MOLP-8 세포와 c14 인간화 항체의 결합 활성을 보여준다.

도 11a 내지 11d는 IL-2 (도 11a), IFN-γ (도 11b), $CD4^+$ T 세포 증식 (도 11c) 및 $CD8^+$ T 세포 증식 (도 11d)에 의해 측정된, 인간화 항체 hu23.H5L5에 의한 PBMC에서의 ATP-매개 T 세포 활성화를 보여준다.

도 12a 내지 12e는 FACS에 의해 인간화 항체 hu23.H5L5 및 hu14.H1L1과 SK-MEL-5 (도 12a), SK-MEL-28 (도 12b), MOLP-8 (도 12c), CHOK1-cynoCD39 (도 12d) 및 CHOK1-mCD39 (도 12e) 세포의 결합 활성을 보여준다.

도 13a 내지 13b는 SK-MEL-5 세포 (도 13a) 및 MOLP-8 세포 (도 13b)에 대한 인간화 항체 hu23.H5L5 및 hu14.H1L1에 의한 ATPase 억제 활성을 보여준다.

도 14a 내지 14c는 CD80 (도 14a), CD86 (도 14b) 및 CD40 (도 14c) 발현에 의해 측정된, 항-CD39 인간화 항체 hu23.H5L5에 의한 ATP-매개 단핵구 활성화를 보여준다.

도 15는 인간화 항체 hu23.H5L5가 CD83 발현에 의해 측정된 바와 같이 ATP-매개 DC 활성화를 증가시켰고 (도 15a), T 세포 증식 (도 15b) 및 T 세포 활성화를 증진시켰음 (도 15c)을 보여준다.

도 16은 MOLP-8 이종이식 마우스에서 인간화 항체 hu23.H5L5 및 hu14.H1L1에 의한 종양 성장 억제를 보여준다.

도 17은 NK 고갈 MOLP-8 이종이식 마우스에서 항-CD39 인간화 항체 hu23.H5L5의 종양 성장 억제를 보여준다.

도 18은 대식세포 고갈 MOLP-8 이종이식 마우스에서 항-CD39 인간화 항체 hu23.H5L5의 종양 성장 억제를 보여준다.

도 19a는 인간화 항체 hu23.H5L5 및 hu14.H1L1과 참조 항체의 에피토프 비닝 결과를 보여준다. 도 19b는 시험된 항체의 에피토프 그룹화를 보여준다.

도 20은 LPS 자극에 의해 유도된 인간 대식세포 IL1β 방출에 대한 항-CD39 인간화 항체 hu23.H5L5의 효과를 보여준다.

도 21은 PBMC 채택 마우스에서 상이한 투여량 (0.03 mg/kg, 0.3 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg)의 인간화 항체 hu23.H5L5의 종양 성장 억제를 보여준다.

도 22는 인간화 항체 hu23.H5L5, 키메라 항체 c34 및 c35, 뿐만 아니라 참조 항체 T895, I394 및 9-8B의 에피토프 맵핑 결과를 보여준다.

도 23a 내지 23c는 T 세포 증식 (도 23a), $CD25^+$ 세포 (도 23b), 및 살아있는 세포 집단 (도 23c)에 의해 측정된, 인간화 항체 hu23.H5L5에 의해 역전된 세포외 ATP 억제된 $CD8^+$ T 세포 증식을 보여준다.

도 24a 내지 24g는 본 개시내용의 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 개략적 도면을 보여준다.

도 25a 내지 25d는 각각 인간 TGFβ1 (도 25a), 인간 TGFβ2 (도 25b), 인간 TGFβ3 (도 25c) 및 마우스 TGFβ1 (도 25d)에 대한 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 결합 특성을 보여준다.

도 26은 인간 TGFβ1 및 TGFβRII에 대한 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 차단 검정 결과를 보여준다.

도 27a 및 27b는 각각 FACS에 의한 MOLP-8 세포 (도 27a) 및 CHOK1 세포 (도 27b)를 사용한 인간 CD39에 대한 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 결합 활성을 보여준다.

도 28a 및 28b는 각각 ELISA (도 28a) 및 FACS (도 28b)에 의한 인간 CD39 및 TGFβ1에 대한 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 동시 결합 활성을 보여준다.

도 29a는 형질감염된 HEK293 세포에서의 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 TGFβ 리포터 검정 결과를 보여준다. 도 29b는 상이한 CD39 단백질 : 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 비로 사전-인큐베이션되었을 때의 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 TGFβ 중화 활성을 보여준다.

도 30a 내지 30c는 각각 MOLP-8 세포 (도 30a 및 30b) 및 CHO 세포 (도 30c) 상에서의 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자에 의한 ATPase 억제 활성을 보여준다.

도 31a는 동종 DC에 의해 프라이밍된 자가 T 세포에 Treg를 부가하는 것이 T 세포의 IFN-γ 분비를 억제하였다는 것을 보여준다. 도 31b 내지 31d는 $CD4^+$ T 세포 증식% (도 31b), $CD8^+$ T 세포 증식% (도 31c) 및 IFN-γ 분비의 변경 (도 31d)에 의해 측정된, 인간 T 세포의 Treg-매개 억제에 대한 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 효과를 보여준다.

도 32는 지시된 바와 같이 동일한 몰의 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1 및 ES014-2, 항-CD39 항체 ES014_v2, TGF-베타 트랩 ES014_v1 및 대조군 항체 ES014_v3으로 처리된 인간 T 세포 상에서의 아폽토시스의 퍼센트 억제를 도시하는 그래프를 제공한다. 도 32a는 총 T 세포 상에서의 초기 아폽토시스의 백분율을 보여주고, 여기서 x-축은 항체 및 농도를 나타내고, y-축은 초기 T 세포 아폽토시스의 백분율 (%)을 보여준다 (아넥신 V^+PI^-). 도 32b는 총 T 세포 상에서의 후기 아폽토시스의 백분율을 보여주고, 여기서 x-축은 항체 및 농도를 나타내고, y-축은 후기 T 세포 아폽토시스의 백분율 (%)을 보여준다 (아넥신 V^+PI^+).

도 33은 지시된 바와 같이 동일한 몰의 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1 및 ES014-2, 항-CD39 항체 ES014_v2, TGF-베타 트랩 ES014_v1 및 대조군 항체 ES014_v3으로 처리된 T 세포 기능을 도시하는 그래프를 제공한다. 도 33a는 세포 생존율 및 세포 활성화에 대한 FACS 플롯을 보여주고, 도 33b는 상청액에서의 IL-2 및 IFN-γ 생산을 보여준다.

도 34는 지시된 바와 같이 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1 및 ES014-2, 항-CD39 항체 ES014_v2, TGF-베타 트랩 ES014_v1 및 대조군 항체 ES014_v3으로 처리된 T 세포 상에서의 Foxp3 발현을 도시하는 그래프를 제공한다. 도 34a는 $CD4^+$ T 세포 상에서의 Foxp3 발현의 백분율을 나타내고, 도 34b는 $CD8^+$ T 세포 상에서의 Foxp3 발현의 백분율을 나타낸다.

도 35는 지시된 바와 같이 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1 및 ES014-2, 항-CD39 항체 ES014_v2, TGF-베타 트랩 ES014_v1 및 대조군 항체 ES014_v3으로 처리된 총 T 세포의 분열 백분율 (%)을 도시하는 그래프를 제공한다. 도 35a는 $CD4^+$ T 세포의 분열 백분율 (%)을 나타내고, 도 35b는 $CD8^+$ T 세포의 분열 백분율 (%)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 발명의 상세한 설명

[0018] 본 개시내용의 하기 설명은 단지 본 개시내용의 다양한 실시양태를 예시하도록 의도된다. 따라서, 논의된 구체적 변형은 본 개시내용의 범주에 대한 제한으로 해석되어서는 안된다. 본 개시내용의 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 등가물, 변화 및 변형이 이루어질 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 이러한 등가 실시양태가 본원에 포함되어야 하는 것으로 이해된다. 공보, 특허 및 특허 출원을 포함한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0019] 정의

[0020] 본원에 사용된 용어 "항체"는 특이적 항원에 결합하는 임의의 이뮤노글로불린, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다가 항체, 2가 항체, 1이 항체, 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체를 포함한다. 천연 무손상 항체는 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함한다. 포유동물 중쇄는 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 분류되고, 각각의 중쇄는 가변 영역 (VH) 및 제1, 제2, 제3 및 임의로 제4 불변 영역 (각각 CH1, CH2, CH3, CH4)으로 이루어지고; 포유동물 경쇄는 λ 또는 κ로 분류되고, 각각의 경쇄는 가변 영역 (VL) 및 불변 영역으로 이루어진다. 항체는 "Y" 형태를 가지며, Y의 줄기는 디술피드 결합을 통해 함께 결합된 2개의 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역으로 이루어진다. Y의 각각의 아암은 단일 경쇄의 가변 및 불변 영역에 결합된 단일 중쇄의 가변 영역 및

제1 불변 영역을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다. 두 쇄 내의 가변 영역은 일반적으로 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리는 3개의 고도로 가변적인 루프를 함유한다 (경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, 중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2, HCDR3을 포함함). 본원에 개시된 항체 및 항원-결합 단편에 대한 CDR 경계는 카바트(Kabat), IMGT, 코티아(Chothia) 또는 알-라지카니(Al-Lazikani)의 규정에 의해 정의 또는 확인될 수 있다 (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989) ; Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Marie-Paule Lefranc et al., Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc et al., Immunome Research, 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (second edition), chapter 26, 481-514, (2015)). 3개의 CDR은 프레임워크 영역 (FR) (LFR1, LFR2, LFR3, 및 LFR4를 포함한 경쇄 FR, HFR1, HFR2, HFR3, 및 HFR4를 포함한 중쇄 FR)으로 공지된 플랭킹 스트레치 사이에 개재되며, 이는 CDR보다 더 고도로 보존되고 고도로 가변성인 루프를 지지하는 스캐폴드를 형성한다. 중쇄 및 경쇄의 불변 영역은 항원-결합에 관여하지 않지만, 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체는 그의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여 부류로 배정된다. 항체의 5가지 주요 부류 또는 이소형은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이고, 이들은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤 중쇄의 존재를 특징으로 한다. 주요 항체 부류 중 몇몇은 하위부류, 예컨대 IgG1 (감마1 중쇄), IgG2 (감마2 중쇄), IgG3 (감마3 중쇄), IgG4 (감마4 중쇄), IgA1 (알파1 중쇄) 또는 IgA2 (알파2 중쇄)로 분류된다.

[0021] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 그의 임의의 항원-결합 단편을 포괄한다. 본원에 사용된 용어 "항원-결합 단편"은 1개 이상의 CDR을 포함하는 항체의 일부분으로부터 형성된 항체 단편, 또는 항원에 결합하지만 무손상 천연 항체 구조를 포함하지 않는 임의의 다른 항체 단편을 지칭한다. 항원-결합 단편의 예는 비제한적으로 디아바디, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv 단편, 디술피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), $(dsFv)_2$, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디술피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), 단일쇄 항체 분자 (scFv), scFv 이량체 (2가 디아바디), 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체를 포함한다. 항원-결합 단편은 모 항체가 결합하는 것과 동일한 항원에 결합할 수 있다.

[0022] 항체와 관련하여 "Fab"는 디술피드 결합에 의해 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역에 결합된 단일 경쇄 (가변 및 불변 영역 둘 다)로 이루어지는 항체의 일부분을 지칭한다.

[0023] "Fab'"는 힌지 영역의 일부분을 포함하는 Fab 단편을 지칭한다.

[0024] "$F(ab')_2$"는 Fab'의 이량체를 지칭한다.

[0025] 항체 (예를 들어, IgG, IgA 또는 IgD 이소형)와 관련하여 "Fc"는 디술피드 결합을 통해 제2 중쇄의 제2 및 제3 불변 도메인에 결합된 제1 중쇄의 제2 및 제3 불변 도메인으로 이루어진 항체의 부분을 지칭한다. IgM 및 IgE 이소형의 항체와 관련하여 Fc는 제4 불변 도메인을 추가로 포함한다. 항체의 Fc 부분은 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 담당하지만, 항원 결합에서는 기능하지 않는다.

[0026] 항체와 관련하여 "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 보유하는 항체의 가장 작은 단편을 지칭한다. Fv 단편은 단일 중쇄의 가변 영역에 결합된 단일 경쇄의 가변 영역으로 이루어진다.

[0027] "단일-쇄 Fv 항체" 또는 "scFv"는 직접적으로 또는 펩티드 링커 서열을 통해 서로 연결된 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역으로 이루어지는 조작된 항체를 지칭한다 (Huston JS et al. Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879 (1988)).

[0028] "단일-쇄 Fv-Fc 항체" 또는 "scFv-Fc"는 항체의 Fc 영역에 연결된 scFv로 이루어지는 조작된 항체를 지칭한다.

[0029] "낙타화 단일 도메인 항체", "중쇄 항체" 또는 "HCAb"는 2개의 V_H 도메인을 함유하고 경쇄는 함유하지 않는 항체를 지칭한다 (Riechmann L. and Muyldermans S., J Immunol Methods. Dec 10; 231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., J Biotechnol. Jun; 74(4):277-302 (2001); WO 94/04678; WO 94/25591; 미국 특허 번호 6,005,079). 중쇄 항체는 원래 낙타과로부터 유래되었다 (낙타, 단봉낙타, 및 라마). 경쇄가 없지만, 낙타화 항체는 진정한 항원-결합 레퍼토리를 갖는다 (Hamers-Casterman C. et al., Nature. Jun 3; 363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. et al. Immunogenetics. Apr; 54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. et al. Immunology. May;

109(1): 93-101 (2003)). 중쇄 항체의 가변 도메인 (VHH 도메인)은 적응 면역 반응에 의해 생성된 가장 작은 공지된 항원-결합 단위를 나타낸다 (Koch-Nolte F. et al., FASEB J. Nov; 21(13): 3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007)).

[0030] "나노바디"는 중쇄 항체로부터의 VHH 도메인 및 2개의 불변 도메인 CH2 및 CH3으로 이루어지는 항체 단편을 지칭한다.

[0031] "디아바디" 또는 "dAb"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 포함하며, 여기서 단편은 동일한 폴리펩티드 쇄에서 VL 도메인에 연결된 VH 도메인 (VH-VL 또는 VL-VH)을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Holliger P. et al., Proc Natl Acad Sci USA. Jul 15;90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161). 동일한 쇄에서 2개의 도메인 사이의 연결을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 연결되도록 강제되어 2개의 항원-결합 부위를 생성한다. 항원-결합 부위는 동일한 또는 상이한 항원 (또는 에피토프)을 표적화할 수 있다. 특정 실시양태에서, "이중특이적 ds 디아바디"는 2개의 상이한 항원 (또는 에피토프)을 표적화하는 디아바디이다.

[0032] "도메인 항체"는 중쇄의 가변 영역만을 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 항체 단편을 지칭한다. 특정한 예에서, 2개 이상의 VH 도메인이 펩티드 링커에 의해 공유 연결되어, 2가 또는 다가 도메인 항체를 생성한다. 2가 도메인 항체의 2개의 VH 도메인은 동일한 또는 상이한 항원을 표적화할 수 있다.

[0033] 본원에 사용된 용어 "가"는 주어진 분자 내 명시된 개수의 항원 결합 부위의 존재를 지칭한다. 용어 "1가"는 단지 1개의 단일 항원-결합 부위를 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭하고; 용어 "다가"는 다중 항원-결합 부위를 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭한다. 따라서, 용어 "2가", "4가" 및 "6가"는 항원-결합 분자 내 각각 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위의 존재를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 2가이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 4가이다.

[0034] 본원에 사용된 "이중특이적" 항체는 2개의 상이한 모노클로날 항체로부터 유래되거나 또는 하나의 항체 및 또 다른 단백질 (예를 들어 TGFβ 수용체)로부터 유래된 단편을 갖고, 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 인공 항체를 지칭한다. 2개의 에피토프는 동일한 항원 상에 존재할 수 있거나 또는 이들은 2개의 상이한 항원 상에 존재할 수 있다.

[0035] 특정 실시양태에서, "scFv 이량체"는 한 모이어티의 VH가 다른 모이어티의 VL과 배위되어 동일한 항원 (또는 에피토프) 또는 상이한 항원 (또는 에피토프)을 표적화할 수 있는 2개의 결합 부위를 형성하도록 또 다른 VH-VL 모이어티와 이량체화된 VH-VL (펩티드 링커에 의해 연결됨)을 포함하는 2가 디아바디 또는 이중특이적 scFv (BsFv)이다. 다른 실시양태에서, "scFv 이량체"는 VH1과 VL1이 배위되고 VH2와 VL2가 배위되어 각각의 배위된 쌍이 상이한 항원 특이성을 갖도록 VL1-VH2 (또한 펩티드 링커에 의해 연결됨)와 회합된 VH1-VL2 (펩티드 링커에 의해 연결됨)를 포함하는 이중특이적 디아바디이다.

[0036] "dsFv"는 단일 경쇄의 가변 영역과 단일 중쇄의 가변 영역 사이의 연결이 디술피드 결합인 디술피드-안정화된 Fv 단편을 지칭한다. 일부 실시양태에서, "$(dsFv)_2$" 또는 "(dsFv-dsFv')"는 3개의 펩티드 쇄: 펩티드 링커 (예를 들어 긴 가요성 링커)에 의해 연결되고, 각각 디술피드 가교를 통해 2개의 VL 모이어티에 결합된 2개의 VH 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, dsFv-dsFv'는 이중특이적이며, 여기서 각각의 디술피드 쌍형성된 중쇄 및 경쇄가 상이한 항원 특이성을 갖는다.

[0037] 본원에 사용된 용어 "키메라"는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 한 종으로부터 유래되고 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지는 다른 종으로부터 유래된 것인 항체 또는 항원-결합 단편을 의미한다. 예시적인 예에서, 키메라 항체는 인간으로부터 유래된 불변 영역 및 비-인간 동물, 예컨대 마우스로부터 유래된 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-인간 동물은 포유동물, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양, 기니 피그 또는 햄스터이다.

[0038] 본원에 사용된 용어 "인간화"는 항체 또는 항원-결합 단편이 비-인간 동물로부터 유래된 CDR, 인간으로부터 유래된 FR 영역, 및 적용가능한 경우 인간으로부터 유래된 불변 영역을 포함하는 것을 의미한다.

[0039] 본원에 사용된 용어 "친화도"는 이뮤노글로불린 분자 (즉, 항체) 또는 그의 단편과 항원 사이의 비-공유 상호작용의 강도를 지칭한다.

[0040] 본원에 사용된 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다"는 두 분자 사이의, 예를 들어 항체와 항원 사이의 비-무작위 결합 반응을 지칭한다. 특이적 결합은 결합 친화도, 예를 들어 K_D 값, 즉 항원과 항원-결합 분자

사이의 결합이 평형에 도달할 때의 해리율 대 회합률의 비 (k_{off}/k_{on})에 의해 나타내어지는 것을 특징으로 할 수 있다. K_D는 표면 플라즈몬 공명 방법, 옥텟(Octet) 방법, 미세규모 열영동 방법, HPLC-MS 방법 및 FACS 검정 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 관련 기술분야에 공지된 임의의 통상적인 방법을 사용하여 결정될 수 있다. $\leq 10^{-6}$ M (예를 들어 $\leq 5 \times 10^{-7}$ M, $\leq 2 \times 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 5 \times 10^{-8}$ M, $\leq 2 \times 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 4 \times 10^{-9}$ M, $\leq 3 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, 또는 $\leq 10^{-9}$ M)의 K_D 값은 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 CD39 (예를 들어 인간 CD39) 사이의 특이적 결합을 나타낼 수 있다.

[0041] 본원에 사용된 "인간 CD39에의 결합에 대해 경쟁하는" 능력은 인간 CD39와 제2 항-CD39 항체 사이의 결합 상호작용을 임의의 검출가능한 정도로 억제하는 제1 항체 또는 항원-결합 단편의 능력을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간 CD39에의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 CD39와 제2 항-CD39 항체 사이의 결합 상호작용을 적어도 85%, 또는 적어도 90% 억제한다. 특정 실시양태에서, 이러한 억제는 95% 초과, 또는 99% 초과일 수 있다.

[0042] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 상의 원자 또는 아미노산의 특이적인 기를 지칭한다. 두 항체가 항원에 대해 경쟁적인 결합을 나타내는 경우 이들은 항원 내의 동일한 또는 밀접하게 관련된 에피토프에 결합할 수 있다. 에피토프는 선형 또는 입체형태적일 수 있다 (즉, 이격된 아미노산 잔기를 포함함). 예를 들어, 항체 또는 항원-결합 단편이 항원에 대한 참조 항체의 결합을 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95%만큼 차단하는 경우에, 항체 또는 항원-결합 단편은 참조 항체와 동일한/밀접하게 관련된 에피토프에 결합하는 것으로 간주될 수 있다.

[0043] 본원에 사용된 용어 "아미노산"은 아민 ($-NH_2$) 및 카르복실 (-COOH) 관능기를 각각의 아미노산에 특이적인 측쇄와 함께 함유하는 유기 화합물을 지칭한다. 아미노산의 명칭은 또한 본 개시내용에서 표준 단일 문자 또는 3-문자 코드로서 나타내어지며, 이는 하기와 같이 요약된다.

명칭	3-문자 코드	단일-문자 코드
알라닌	Ala	A
아르기닌	Arg	R
아스파라긴	Asn	N
아스파르트산	Asp	D
시스테인	Cys	C
글루탐산	Glu	E
글루타민	Gln	Q
글리신	Gly	G
히스티딘	His	H
이소류신	Ile	I
류신	Leu	L
리신	Lys	K
메티오닌	Met	M
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
트립토판	Trp	W
티로신	Tyr	Y
발린	Val	V

[0044]

[0045] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위하여 본원에서 번갈아 사용된다. 상기 용어는 또한, 1개 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생적 아미노산의 인공 화학적 모방체인 아미노산 중합체에 적용될 뿐만 아니라 자연 발생적 아미노산 중합체 및 비-자연 발생적 아미노산 중합체에도 적용된다.

[0046] 아미노산 서열과 관련하여 "보존적 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 생리화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 상이한 아미노산 잔기로 대체하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 치환은 소수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 Met, Ala, Val, Leu 및 Ile) 중에서, 중성 친수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 Cys, Ser, Thr, Asn 및 Gln) 중에서, 산성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 Asp, Glu) 중에서, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 His, Lys 및 Arg) 중에서, 또는 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 Trp, Tyr 및 Phe) 중에서 이루어질 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 보존적 치환은 통상적으로 단백질 입체형태적 구조에서 유의한 변화를 초래하지 않고, 따라서 단백질의 생물학적 활성을 보유할 수 있다.

[0047] 본원에 사용된 용어 "상동"은 최적으로 정렬된 경우에 또 다른 서열에 대해 적어도 60% (예를 들어 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%)의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열 (또는 그의 상보적 가닥) 또는 아미노산 서열을 지칭한다.

[0048] 아미노산 서열 (또는 핵산 서열)에 관하여 "퍼센트 (%) 서열 동일성"은 서열을 정렬하고, 필요한 경우에 갭을 도입하여 동일한 아미노산 (또는 핵산)의 최대 수를 달성한 후, 참조 서열에서의 아미노산 (또는 핵산) 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 (또는 핵산) 잔기의 백분율로서 정의된다. 다시 말해서, 아미노산 서열 (또는 핵산 서열)의 퍼센트 (%) 서열 동일성은 그것이 비교되는 참조 서열에 대해 동일한 아미노산 잔기 (또는 염기)의 수를 후보 서열 또는 참조 서열 중 더 짧은 것에서의 아미노산 잔기 (또는 염기)의 총 수로 나눔으로써 계산될 수 있다. 아미노산 잔기의 보존적 치환은 동일한 잔기로서 고려될 수 있거나 고려되지 않을 수 있다. 퍼센트 아미노산 (또는 핵산) 서열 동일성을 결정하려는 목적을 위한 정렬은, 예를 들어 공중 이용가능한 도구, 예컨대 BLASTN, BLASTp (미국 국립 생물 정보 센터 (NCBI)의 웹사이트 상에서 이용가능함, 또한 문헌 [Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Stephen F. et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)] 참조), ClustalW2 (유럽 생물정보학 연구소의 웹사이트 상에서 이용가능함, 또한 문헌 [Higgins D.G. et al., Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al., Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)] 참조), 및 ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 도구에 의해 제공되는 디폴트 파라미터를 사용할 수 있거나, 또는 예를 들어 적합한 알고리즘을 선택하는 것과 같이 정렬에 적절한 파라미터를 맞춤화할 수 있다.

[0049] 본원에 사용된 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역이 그의 이펙터, 예컨대 C1 복합체 및 Fc 수용체에 결합하는 데 기여할 수 있는 생물학적 활성을 지칭한다. 예시적인 이펙터 기능은 항체와 C1 복합체 상의 C1q 사이의 상호작용에 의해 매개되는 보체 의존성 세포독성 (CDC); 항체의 Fc 영역이 이펙터 세포 상의 Fc 수용체에 결합함으로써 매개되는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 및 식세포작용을 포함한다. 이펙터 기능은 다양한 검정, 예컨대 Fc 수용체 결합 검정, C1q 결합 검정 및 세포 용해 검정을 사용하여 평가될 수 있다.

[0050] "단리된" 물질은 인간의 손에 의해 천연 상태로부터 변경된 것이다. "단리된" 조성물 또는 물질이 자연에서 발생하는 경우, 이는 그의 원래 환경으로부터 변화 또는 제거되었거나 또는 이들 둘 다이다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드가 실질적으로 순수한 상태로 존재하도록 그의 천연 상태의 공존 물질로부터 충분히 분리된 경우 이는 "단리된" 것이다. "단리된 핵산 서열"은 단리된 핵산 분자의 서열을 지칭한다. 특정 실시양태에서, "단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편"은 전기영동 방법 (예컨대 SDS-PAGE, 등전 포커싱, 모세관 전기영동), 또는 크로마토그래피 방법 (예컨대 이온 교환 크로마토그래피 또는 역상 HPLC)에 의해 결정시 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 순도를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 지칭한다.

[0051] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 유전 요소가 그 유전 요소의 발현을 일으키도록, 예컨대 유전 요소에 의해 코딩된 단백질, RNA 또는 DNA를 생산하도록, 또는 유전 요소를 복제하도록 작동가능하게 삽입될 수 있는 비히클을 지칭한다. 벡터는 그것이 숙주 세포 내에 운반하는 유전 요소를 발현시키도록 숙주 세포를 형질전환, 형질도입 또는 형질감염시키기 위해 사용될 수 있다. 벡터의 예는 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 인공 염색체, 예컨대 효모 인공 염색체 (YAC), 박테리아 인공 염색체 (BAC) 또는 P1-유래된 인공 염색체 (PAC), 박테리오파지, 예컨대 람다 파지 또는 M13 파지, 및 동물 바이러스를 포함한다. 벡터는 발현을 제어하는 다양한 요소, 예컨대 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선택 요소 및 리포터 유전자를 함유할 수 있다. 추가로, 벡터는 복제 기점을 함유할 수 있다. 벡터는 또한 그의 세포 내로의 진입을 보조하는 물질, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니지만, 바이러스 입자, 리포솜 또는 단백질 코팅을 포함할 수 있다. 벡터는 발현 벡터 또는 클로닝 벡터일 수 있다. 본 개시내용은 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 본원에 제공된 핵산 서열, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 1종의 프로모터 (예를 들어 SV40, CMV, EF-1α), 및 적어도 1종의 선택 마커를 함

유하는 벡터 (예를 들어 발현 벡터)를 제공한다.

[0052] 본원에 사용된 어구 "숙주 세포"는 외인성 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터가 도입될 수 있거나 도입된 세포를 지칭한다.

[0053] 용어 "대상체"는 인간 및 비-인간 동물을 포함한다. 비-인간 동물은 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물 및 비-포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 마우스, 래트, 고양이, 토끼, 양, 개, 소, 닭, 양서류 및 파충류를 포함한다. 언급된 경우를 제외하고는, 용어 "환자" 또는 "대상체"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0054] 용어 "항종양 활성"은 종양 세포 증식, 생존율 또는 전이 활성의 감소를 의미한다. 예를 들어, 항종양 활성은 요법이 없는 대조군과 비교하여, 요법 동안 발생하는 비정상 세포의 성장 속도에서의 저하, 또는 종양 크기 안정성 또는 감소, 또는 요법으로 인한 더 긴 생존으로써 나타날 수 있다. 이러한 활성은 이종이식편 모델, 동종이식편 모델, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 모델, 및 항종양 활성을 조사하기 위한 관련 기술분야에 공지되어 있는 다른 기지의 모델을 포함하나 이에 제한되지는 않는 허용된 시험관내 또는 생체내 종양 모델을 사용하여 평가될 수 있다.

[0055] 본원에 사용된 질환, 장애 또는 상태를 "치료하는" 또는 그의 "치료"는 질환, 장애 또는 상태의 예방 또는 완화, 질환, 장애 또는 상태의 발병 또는 발생 속도의 둔화, 질환, 장애 또는 상태의 발생 위험의 감소, 질환, 장애 또는 상태와 연관된 증상의 발생의 예방 또는 지연, 질환, 장애 또는 상태와 연관된 증상의 감소 또는 종료, 질환, 장애 또는 상태의 완전 또는 부분 퇴행의 생성, 질환, 장애 또는 상태의 치유, 또는 그의 일부 조합을 포함한다.

[0056] 용어 "진단", "진단하다" 또는 "진단하는"이란 병리학적 상태, 질환 또는 상태의 확인, 예컨대 CD39 관련 질환의 확인을 지칭하거나, 또는 특정한 치료 요법으로부터 이익을 얻을 수 있는 CD39 관련 질환을 갖는 대상체의 확인을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 진단은 CD39의 비정상적 양 또는 활성의 확인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 진단은 대상체에서의 암 또는 자가면역 질환의 확인을 지칭한다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "생물학적 샘플" 또는 "샘플"은 예를 들어 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학적 특징에 기초하여 특징화 및/또는 확인되는 세포성 및/또는 다른 분자 실체를 함유하는 관심 대상체로부터 수득되거나 유래된 생물학적 조성물을 지칭한다. 생물학적 샘플은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법에 의해 수득된 대상체의 세포, 조직, 기관 및/또는 생물학적 유체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 유체 샘플이다. 일부 실시양태에서, 유체 샘플은 전혈, 혈장, 혈청, 점액 (비강 배액 및 가래 포함), 복막액, 흉막액, 흉액, 타액, 소변, 활액, 뇌척수액 (CSF), 흉강천자액, 복부액, 복수 또는 심막액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체의 심장, 간, 비장, 폐, 신장, 피부 또는 혈관으로부터 수득된 조직 또는 세포이다.

[0058] 용어 "작동가능하게 연결하다" 또는 "작동가능하게 연결된"은 2개 이상의 관심 생물학적 서열이 이들을 의도된 방식으로 기능하도록 허용하는 관계에 있도록 하는 방식으로 이들을 스페이서 또는 링커와 함께 또는 스페이서 또는 링커 없이 병렬배치시키는 것을 지칭한다. 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때, 이는 연결된 생성물이 의도된 생물학적 기능을 갖도록 하는 방식으로 폴리펩티드 서열이 연결된 것을 의미하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 항체 가변 영역은 항원-결합 활성을 갖는 안정한 생성물을 제공하도록 불변 영역에 작동가능하게 연결될 수 있다. 상기 용어는 또한 폴리뉴클레오티드와 관련하여 사용될 수 있다. 한 예에서, 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 조절 서열 (예를 들어, 프로모터, 인핸서, 사일렌서 서열 등)에 작동가능하게 연결될 때, 이는 폴리뉴클레오티드 서열이 폴리뉴클레오티드로부터 폴리펩티드의 조절된 발현을 허용하는 방식으로 연결됨을 의미하는 것으로 의도된다.

[0059] 용어 "융합" 또는 "융합된"은 아미노산 서열 (예를 들어, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질)과 관련하여 사용될 때, 예를 들어 화학적 결합 또는 재조합 수단에 의해 자연적으로 존재하지 않는 단일 아미노산 서열로의 2개 이상의 아미노산 서열의 조합을 지칭한다. 융합 아미노산 서열은 2개의 코딩 폴리뉴클레오티드 서열의 유전자 재조합에 의해 생산될 수 있고, 재조합 폴리뉴클레오티드를 함유하는 구축물을 숙주 세포 내로 도입하는 방법에 의해 발현될 수 있다.

[0060] ENTPD1 또는 ENTPDase 1로도 공지된, 본원에 사용된 "CD39"는 ATP를 AMP로 전환시키는 내재성 막 단백질을 지칭한다. 구조적으로, 이는 2개의 막횡단 도메인, 작은 세포질 도메인 및 큰 세포외 소수성 도메인을 특징으로 한다. 특정 실시양태에서, CD39는 인간 CD39이다. 본원에 사용된 CD39는 다른 동물 종, 예컨대 특히 마우스 및 시노몰구스로부터의 것일 수 있다. 인간 CD39 단백질의 예시적인 서열은 NCBI 참조 서열 번호 NP_001767.3에

개시되어 있다. 무스 무스쿨루스(Mus musculus) (마우스) CD39 단백질의 예시적인 서열은 NCBI 참조 서열 번호 NP_033978.1에 개시되어 있다. 시노몰구스 (원숭이) CD39 단백질의 예시적인 서열은 NCBI 참조 서열 번호 XP_015311945.1에 개시되어 있다.

[0061] CD39 이외에도, ENTPDase 패밀리는 ENTPDase 2, 3, 4, 5, 6, 7, 및 8 (ENTPD2, 3, 4, 5, 6, 7, 및 8로 또한 공지되고, 본 개시내용에서 상호교환가능하게 사용됨)을 포함하는 여러 다른 구성원을 또한 포함한다. ENTPDase 중 4종은 세포외 대면 촉매 부위를 갖는 전형적인 세포 표면-위치된 효소이다 (ENTPDase 1, 2, 3, 8). ENTPDase 5 및 6은 세포내 국재화를 나타내고, 이종 발현 후에 분비를 겪는다. ENTPDase 4 및 7은 세포질 소기관의 내강에 대면하여 전적으로 세포내에 위치한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 CD39 (즉, ENTPDase 1)에 특이적으로 결합하지만, 다른 패밀리 구성원, 예를 들어 ENTPDase 2, 3, 5, 또는 6에는 결합하지 않는다.

[0062] 용어 "항-CD39 항체 모이어티"는 CD39 (예를 들어 인간 또는 원숭이 CD39)에 특이적으로 결합할 수 있고, CD39 및 TGFβ 둘 다를 표적화하는 접합체 분자의 일부분을 형성하는 항체 (그의 항원-결합 단편 포함)를 지칭한다. 용어 "항-인간 CD39 항체 모이어티"는 인간 CD39에 특이적으로 결합할 수 있고, 인간 CD39 및 TGFβ 둘 다를 표적화하는 접합체 분자의 일부분을 형성하는 항체 (그의 항원-결합 단편 포함)를 지칭한다.

[0063] 본원에 사용된 "CD39 관련" 질환, 장애 또는 상태는 CD39의 증가 또는 감소된 발현 또는 활성에 의해 유발되거나, 악화되거나, 또는 달리 연관된 임의의 질환 또는 상태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, CD39 관련 질환, 장애 또는 상태는 면역-관련 장애, 예컨대 예를 들어 자가면역 질환이다. 일부 실시양태에서, CD39 관련 질환, 장애 또는 상태는 과도한 세포 증식과 관련된 장애, 예컨대 예를 들어 암이다. 특정 실시양태에서, CD39 관련 질환 또는 상태는 CD39 및/또는 CD39 관련 유전자, 예컨대 ENTPD1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 유전자의 발현 또는 과다발현을 특징으로 한다.

[0064] 본원에 사용된 용어 "형질전환 성장 인자 베타" 및 "TGFβ"는 전구체 및 성숙 TGFβ의 잠복 형태 및 회합 또는 비회합 복합체 ("잠복 TGFβ")를 포함한, 대상체 (예를 들어 인간)로부터의 임의의 TGF-베타의 전장, 천연 아미노산 서열을 갖는 임의의 TGFβ 패밀리 단백질을 지칭한다. 본원에서 이러한 TGFβ에 대한 언급은 TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3 이소형 및 그의 잠복 버전을 포함한 현재 확인된 형태 중 어느 하나, 뿐만 아니라 임의의 공지된 TGFβ의 서열로부터 유래되고 서열과 적어도 약 75%, 바람직하게는 적어도 약 80%, 보다 바람직하게는 적어도 약 85%, 보다 더 바람직하게는 적어도 약 90%, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 약 95% 상동인 폴리펩티드를 포함한, 향후 확인되는 인간 TGFβ 종에 대한 언급인 것으로 이해될 것이다. 구체적 용어 "TGFβ1", "TGFβ2" 및 "TGFβ3"은 문헌, 예를 들어 문헌 [Derynck et al., Nature, Cancer Res., 47: 707 (1987); Seyedin et al., J. Biol. Chem., 261: 5693-5695 (1986); deMartin et al., EMBO J., 6: 3673 (1987); Kuppner et al., Int. J. Cancer, 42: 562 (1988)]에 정의된 TGF-베타를 지칭한다. 용어 "형질전환 성장 인자 베타", "TGFβ", "TGF 베타", "TGF-β", "TGF-베타", "TGFb", "TGF-b", "TGFB" 및 "TGF-B"는 본 개시내용에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0065] 본원에 사용된 용어 "인간 TGFβ1"은 인간 TGFB1 유전자 (예를 들어, 야생형 인간 TGFB1 유전자)에 의해 코딩되는 TGFβ1 단백질을 지칭한다. 예시적인 야생형 인간 TGFβ1 단백질은 진뱅크(GenBank) 수탁 번호 NP_000651.3에 의해 제공된다. 본원에 사용된 용어 "인간 TGFβ2"는 인간 TGFB2 유전자 (예를 들어, 야생형 인간 TGFB2 유전자)에 의해 코딩되는 TGFβ2 단백질을 지칭한다. 예시적인 야생형 인간 TGFβ2 단백질은 진뱅크 수탁 번호 NP_001129071.1 및 NP_003229.1에 의해 제공된다. 본원에 사용된 용어 "인간 TGFβ3"은 인간 TGFB3 유전자 (예를 들어, 야생형 인간 TGFB3 유전자)에 의해 코딩되는 TGFβ3 단백질을 지칭한다. 예시적인 야생형 인간 TGFβ3 단백질은 진뱅크 수탁 번호 NP_003230.1, NP_001316868.1, 및 NP_001316867.1에 의해 제공된다.

[0066] 본원에 사용된 용어 "마우스 TGFβ1", "마우스 TGFβ2", 및 "마우스 TGFβ3"은 각각 마우스 TGFB1 유전자 (예를 들어, 야생형 마우스 TGFB1 유전자), 마우스 TGFB2 유전자 (예를 들어, 야생형 마우스 TGFB2 유전자), 및 마우스 TGFB3 유전자 (예를 들어, 야생형 마우스 TGFB3 유전자)에 의해 코딩되는 TGFβ1 단백질, TGFβ2 단백질, 및 TGFβ3 단백질을 지칭한다. 예시적인 야생형 마우스 (무스 무스쿨루스) TGFβ1 단백질은 진뱅크 수탁 번호 NP_035707.1 및 CAA08900.1에 의해 제공된다. 예시적인 야생형 마우스 TGFβ2 단백질은 진뱅크 수탁 번호 NP_033393.2에 의해 제공된다. 예시적인 야생형 마우스 TGFβ3 단백질은 진뱅크 수탁 번호 AAA40422.1에 의해 제공된다.

[0067] 본원에 사용된 용어 "TGFβ 수용체"는 적어도 1종의 TGFβ 이소형에 결합하는 임의의 수용체를 지칭한다. 일반적으로, TGFβ 수용체는 TGFβ 수용체 I (TGFβRI), TGFβ 수용체 II (TGFβRII), 또는 TGFβ 수용체 III (TGF

βRIII)을 포함한다.

[0068] 인간과 관련하여, 용어 "TGFβ 수용체 I" 또는 "TGFβRI"는 야생형 인간 TGFβ 수용체 유형 1 서열 (예를 들어 진뱅크 수탁 번호 ABD46753.1의 아미노산 서열)을 갖거나 또는 진뱅크 수탁 번호 ABD46753.1의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 서열을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. TGFβRI는 야생형 서열의 TGFβ-결합 활성의 적어도 0.1%, 적어도 0.5%, 적어도 1%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 35%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%를 보유할 수 있다. 발현된 TGFβRI의 폴리펩티드에는 신호 서열이 없다.

[0069] 인간과 관련하여, 용어 "TGFβ 수용체 II" 또는 "TGFβRII"는 야생형 인간 TGFβ 수용체 유형 2 이소형 A 서열 (예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 NP_001020018.1의 아미노산 서열)을 갖는 폴리펩티드, 또는 야생형 인간 TGFβ 수용체 유형 2 이소형 B 서열 (예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 NP_003233.4의 아미노산 서열)을 갖거나, 또는 진뱅크 수탁 번호 NP_001020018.1 또는 진뱅크 수탁 번호 NP_003233.4의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성의 서열을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. TGFβRII는 야생형 서열의 TGFβ-결합 활성의 적어도 0.1%, 적어도 0.5%, 적어도 1%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 35%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%를 보유할 수 있다. 발현된 TGFβRII의 폴리펩티드에는 신호 서열이 없다.

[0070] 인간과 관련하여, 용어 "TGFβ 수용체 III" 또는 "TGFβRIII"은 야생형 인간 TGFβ 수용체 유형 3 이소형 A 서열 (예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 NP_003234.2의 아미노산 서열)을 갖는 폴리펩티드, 또는 야생형 인간 TGFβ 수용체 유형 3 이소형 B 서열 (예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 NP_001182612.1의 아미노산 서열)을 갖거나, 또는 진뱅크 수탁 번호 NP_003234.2 및 NP_001182612.1의 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성의 서열을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. TGFβRIII는 야생형 서열의 TGFβ-결합 활성의 적어도 0.1%, 적어도 0.5%, 적어도 1%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 25%, 적어도 35%, 적어도 50%, 적어도 75%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%를 보유할 수 있다. 발현된 TGFβRIII의 폴리펩티드에는 신호 서열이 없다.

[0071] 본원에 사용된 "TGFβ 관련" 질환, 장애 또는 상태는 TGFβ의 증가 또는 감소된 발현 또는 활성에 의해 유발되거나, 악화되거나, 또는 달리 연관된 임의의 질환 또는 상태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태는 면역-관련 장애, 예컨대, 예를 들어 자가면역 질환이다. 일부 실시양태에서, TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태는 과도한 세포 증식과 관련된 장애, 예컨대 예를 들어 암이다. 특정 실시양태에서, TGFβ 관련 질환 또는 상태는 TGFβ 및/또는 TGFβ 관련 유전자, 예컨대 TGFB1, TGFB2, TGFB3 유전자의 발현 또는 과다발현을 특징으로 한다.

[0072] 용어 "항-TGFβ 항체 모이어티"는 TGFβ (예를 들어 TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3)에 특이적으로 결합할 수 있고, CD39 및 TGFβ 둘 다를 표적화하는 단백질의 일부분을 형성하는 항체를 지칭한다. 용어 "항-인간 TGFβ 항체 모이어티"는 인간 TGFβ에 특이적으로 결합할 수 있고, CD39 및 인간 TGFβ 둘 다를 표적화하는 단백질의 일부분을 형성하는 항체를 지칭한다.

[0073] 용어 "제약상 허용되는"은 지정된 담체, 비히클, 희석제, 부형제(들) 및/또는 염이 일반적으로 제제를 구성하는 다른 성분과 화학적으로 및/또는 물리적으로 상용성이고, 그의 수용자와 생리학상 상용성인 것을 나타낸다.

[0074] 본원에 사용된 용어 "CD39-양성 세포"는 세포의 표면 상에 CD39를 발현하는 세포 (예를 들어 식세포)를 지칭한다.

[0075] 본원에 사용된 용어 "경로"는 함께 단계적 공정에서 하나의 화합물을 또 다른 화합물로 전환시킬 수 있는 생화학적 반응의 군을 지칭한다. 경로에서 제1 단계의 생성물은 제2 단계를 위한 기질일 수 있고, 제2 단계의 생성물은 제3 단계를 위한 기질일 수 있는 등이다. 경로의 성분은 경로 내의 모든 기질, 보조인자, 부산물, 중간체, 최종-생성물, 임의의 효소를 포함한다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "아데노신 경로"는 그 중 어느 하나가 아데노신을 수반하는 생화학적 경로, 예를 들어 아데노신의 생산 또는 아데노신의 다른 물질로의 전환의 집합을 지칭한다. 본원에 사용된 용어 "TGFβ 신호전달 경로"는 그 중 어느 하나가 TGFβ를 수반하는 생화학적 경로, 예를 들어 TGFβ의 생산 또는 TGFβ의 다른 물질로의 전환의 집합을 지칭한다.

[0076] 본원에 사용된 용어 "길항제"는 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드의 발현 수준 또는 활성을 억제함으로써

단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드의 양, 형성, 기능 및/또는 하류 신호전달을 감소시키는 분자를 지칭한다. 예를 들어, 본 개시내용의 "CD39의 길항제"는 CD39의 발현 수준 또는 활성을 억제함으로써 CD39의 양, 형성, 기능 및/또는 하류 신호전달을 감소시키는 분자를 지칭한다. 또 다른 예를 들어, 본 개시내용의 "TGFβ의 길항제"는 TGFβ의 발현 수준 또는 활성을 억제함으로써 TGFβ의 양, 형성, 기능 및/또는 하류 신호전달을 감소시키는 분자를 지칭한다.

[0077] 본원에 사용된 용어 "코딩된" 또는 "코딩하는"은 mRNA로의 전사 및/또는 펩티드 또는 단백질로의 번역이 가능한 것을 의미한다. 용어 "코딩 서열" 또는 "유전자"는 펩티드 또는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 이들 두 용어는 본 개시내용에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 코딩 서열은 메신저 RNA (mRNA)로부터 역전사되는 상보적 DNA (cDNA) 서열이다. 일부 실시양태에서, 코딩 서열은 mRNA이다.

[0078] 본원에 사용된 용어 "안티센스 뉴클레오티드"는 수소 결합을 통해 표적 핵산에 혼성화할 수 있는 올리고머 화합물을 지칭한다. 예를 들어, "CD39의 코딩 서열을 표적화하는 안티센스 뉴클레오티드"는 CD39의 코딩 서열 또는 그의 부분에 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드를 지칭한다.

[0079] CD39 및 TGFβ를 표적화하는 접합체 분자

[0080] 현재의 면역 체크포인트 억제제 (예를 들어 PD1 및 CTLA-4)의 잠재적 제한은 아데노신 및 TGFβ가 풍부한 종양 미세환경 ("TME")이다. 종양-침윤 T 세포의 국재화된 미세환경에서의 아데노신 및 TGFβ 신호전달은 이들을 Treg로 편향시키고 면역 이펙터 세포의 활성화를 약화시킬 수 있다. 본 발명자들은 예상외로 신규 접합체 분자에 의해 CD39 및 TGFβ를 동시에 표적화함으로써, 아데노신 경로 (CD39의 억제를 통함) 및 TGFβ 신호전달 경로 (TGFβ 트랩을 통함)의 동시 차단으로 인해 보다 면역-정상화된 TME 및 상승작용적 항종양 효과가 달성될 수 있다는 것을 발견하였다. 실제로, 본 발명자들은 본 개시내용의 CD39 및 TGFβ를 동시에 표적화하는 접합체 분자가, 특히 T 세포 생존, 시토카인 생산 및 Treg 억제의 관점에서, TGFβ 수용체 또는 항-CD39 항체를 사용한 단독요법에서 관찰된 것을 넘어서는 상승작용적 항종양 효과를 나타낸다는 것을 입증하였다.

[0081] 한 측면에서, 본 개시내용은 CD39와 그의 기질 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 CD39 억제 부분, 및 TGFβ와 그의 수용체 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 TGFβ 억제 부분을 포함하는 접합체 분자를 제공한다. 접합체 분자는 소분자, 화합물 (천연 또는 합성), 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 간섭 RNA, 메신저 RNA 등일 수 있다. 특정 실시양태에서, 접합체 분자는 2종 이상의 상이한 물질의 혼합물이 아니다 (즉, 2종 이상의 상이한 물질이 단지 함께 놓이고 화학적으로 결합되지 않음). 특정 실시양태에서, 접합체 분자는 CD39와 그의 기질 사이의 상호작용을 방해할 수 있고 TGFβ와 그의 수용체 사이의 상호작용을 방해할 수 있는 이관능성 분자이다.

[0082] 아데노신 경로는 면역 및 염증 세포, 예컨대 대식세포, 수지상 세포, 골수 유래 억제 세포, T 세포 및 자연 킬러 (NK) 세포의 기능을 조절함으로써 면역-내성 종양 미세환경의 생성에 참여한다. 아데노신 경로는 또한 각각 암 세포 및 내피 세포 상에서 발현되는 아데노신 수용체를 통해 암 세포 증식, 아폽토시스 및 혈관신생을 방해함으로써 암 성장 및 파종을 조절한다. 고형 종양은 높은 수준의 CD39 및 CD73, 뿐만 아니라 낮은 수준의 뉴클레오시드 수송체 (NT), 엑토-아데노신 데아미나제 및 그의 보조인자 CD26을 발현하며, 이는 암 환경에서 아데노신 신호전달의 증가로 이어진다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 CD39 억제 부분은 CD39와 ATP/ADP 사이의 상호작용을 방해할 수 있다. 특정 실시양태에서, 접합체 분자의 CD39 억제 부분은 암을 치료, 예방 또는 완화시키는 데 특히 유용하다.

[0083] 특정 실시양태에서, 접합체 분자의 CD39 억제 부분은 CD39-결합제, CD39의 코딩 서열을 표적화하는 RNAi, CD39의 코딩 서열을 표적화하는 안티센스 뉴클레오티드, 및 CD39와 경쟁하여 그의 기질에 결합하는 작용제로 이루어진 군으로부터 선택된 CD39의 길항제이다.

[0084] 분자가 CD39의 발현 (전사 또는 번역 수준에서의 발현) 수준 또는 활성의 유의한 감소를 유발하는 경우에, 분자는 CD39의 발현 수준 또는 활성을 억제하는 것으로 간주된다. 유사하게, 분자가 CD39와 그의 기질 사이의 결합의 유의한 감소를 유발하여, 이것이 CD39에 의해 매개되는 하류 신호전달 및 기능의 유의한 감소를 유발하는 경우에, 분자는 CD39와 그의 기질 (예를 들어 ATP 또는 ADP) 사이의 결합을 억제하는 것으로 간주된다. 예를 들어, 감소가 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%이면, 감소가 유의한 것으로 간주된다.

[0085] CD39-결합제 (길항제)는 2가지 방식으로 작용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 CD39-결합제는 CD39와 경쟁하여 그의 기질에 결합함으로써 CD39가 그의 기질에 결합하는 것을 방해하거나, 차단하거나 또는 달

리 방지할 수 있다. 기질에 결합하지만 예상되는 신호 전달을 촉발하지 않는 이러한 유형의 길항제는 또한 "경쟁적 길항제"로 공지되어 있다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 CD39-결합제는 CD39의 그의 기질에 대한 결합을 실질적으로 방해하거나, 차단하거나 또는 달리 방지하기에 충분한 친화도 및 특이성으로 CD39에 결합하여 그를 격리할 수 있다. 이러한 유형의 길항제는 또한 "중화 길항제"로 공지되어 있고, 예를 들어 CD39에 특이적으로 결합하는 CD39에 대해 지시된 항체 또는 압타머를 포함할 수 있다.

[0086] 특정 실시양태에서, CD39-결합제는 CD39를 특이적으로 인식하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 CD39에 결합하는 소분자 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0087] 본원에 사용된 용어 "소분자 화합물"은 효소 기질 또는 생물학적 과정의 조절제로서 작용할 수 있는 저분자량 화합물을 의미한다. 일반적으로, "소분자 화합물"은 크기가 약 5 킬로달톤 (kD) 미만인 분자이다. 일부 실시양태에서, 소분자는 약 4 kD, 3 kD, 약 2 kD, 또는 약 1 kD 미만이다. 일부 실시양태에서, 소분자는 약 800 달톤 (D), 약 600 D, 약 500 D, 약 400 D, 약 300 D, 약 200 D, 또는 약 100 D 미만이다. 일부 실시양태에서, 소분자는 약 2000 g/mol 미만, 약 1500 g/mol 미만, 약 1000 g/mol 미만, 약 800 g/mol 미만, 또는 약 500 g/mol 미만이다. 일부 실시양태에서, 소분자는 비-중합체성이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따르면, 소분자는 단백질, 폴리펩티드, 올리고펩티드, 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 폴리사카라이드, 당단백질, 프로테오글리칸 등이 아니다. 일부 실시양태에서, 소분자는 치료제이다. 일부 실시양태에서, 소분자는 아주반트이다. 일부 실시양태에서, 소분자는 약물이다.

[0088] 특정 실시양태에서, 접합체 분자의 TGFβ 억제 부분은 TGFβ와 TGFβ 수용체 사이의 상호작용을 방해할 수 있다. 특정 실시양태에서, TGFβ와 TGFβ 수용체 사이의 상호작용은 TGFβ 신호전달 경로 내의 신호 전달 캐스케이드를 파괴하고, TGFβ 또는 TGFβ 슈퍼패밀리 리간드가 그의 내인성 수용체에 결합하는 것을 파괴 또는 방지할 수 있는 작용제에 의해 차단된다. TGFβ 신호전달 경로 억제제의 억제 활성을 결정하는 데 사용될 수 있는 예시적인 검정은, 비제한적으로, 특히 WO 2006/012954에 기재된 바와 같은 전기영동 이동성 변화 검정, 항체 슈퍼시프트 검정, 뿐만 아니라 TGFβ-유도성 유전자 리포터 검정을 포함한다.

[0089] 특정 실시양태에서, 접합체 분자의 TGFβ 억제 부분은 TGFβ-결합제, TGFβ의 코딩 서열을 표적화하는 RNAi, TGFβ의 코딩 서열을 표적화하는 안티센스 뉴클레오티드, 및 TGFβ와 경쟁하여 그의 수용체 (예를 들어 TGFβRI, TGFβRII 또는 TGFβRIII)에 결합하는 작용제로 이루어진 군으로부터 선택된 TGFβ의 길항제이다.

[0090] 분자가 TGFβ의 발현 (전사 또는 번역 수준에서의 발현) 수준 또는 활성의 유의한 감소를 유발하는 경우에, 분자는 TGFβ의 발현 수준 또는 활성을 억제하는 것으로 간주된다. 유사하게, 분자가 TGFβ와 그의 수용체 사이의 결합의 유의한 감소를 유발하여, 이것이 TGFβ에 의해 매개되는 하류 신호전달 및 기능의 유의한 감소를 유발하는 경우에, 분자는 TGFβ와 그의 수용체 (예를 들어 TGFβRI, TGFβRII 또는 TGFβRIII) 사이의 결합을 억제하는 것으로 간주된다. 예를 들어, 감소가 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%이면, 감소가 유의한 것으로 간주된다.

[0091] TGFβ-결합제 (길항제)는 2가지 방식으로 작용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 TGFβ-결합제는 TGFβ와 경쟁하여 그의 수용체에 결합함으로써 TGFβ가 그의 수용체에 결합하는 것을 방해하거나, 차단하거나 또는 달리 방지할 수 있다. 수용체에 결합하지만 예상되는 신호 전달을 촉발하지 않는 이러한 유형의 길항제는 또한 "경쟁적 길항제"로 공지되어 있다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 TGFβ-결합제는 TGFβ의 그의 수용체에 대한 결합을 실질적으로 방해하거나, 차단하거나 또는 달리 방지하기에 충분한 친화도 및 특이성으로 TGFβ에 결합하여 그를 격리할 수 있다. 이러한 유형의 길항제는 또한 "중화 길항제"로 공지되어 있고, 예를 들어 TGFβ에 특이적으로 결합하는 TGFβ에 대해 지시된 항체 또는 압타머를 포함할 수 있다.

[0092] 특정 실시양태에서, TGFβ-결합제는 TGFβ를 특이적으로 인식하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 TGFβ에 결합하는 소분자 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0093] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 TGFβ-결합 도메인에 연결된 CD39-결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이다.

[0094] 본원에 사용된 용어 "결합 도메인"은 표적 분자 또는 복합체에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 모이어티를 지칭한다. 결합 도메인은 소분자, 펩티드, 변형된 펩티드 (예를 들어 비-천연 아미노산 잔기를 갖는 펩티드), 폴리펩티드, 단백질, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 리간드, 핵산, 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 용어 "CD39-결합 도메인"은 CD39 (예를 들어 인간 및/또는 마우스 CD39)에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 모이어티를 지칭하고; 용어 "TGFβ-결합 도메인"은 TGFβ 패밀리의 1종 이상의 패밀리 구성원 또는

이소형 (예를 들어 TGFβ1, TGFβ2 또는 TGFβ3)에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 모이어티를 지칭한다. "TGFβ-결합 도메인"은 본 개시내용에서 "TGFβ 트랩"으로 또한 지칭될 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 TGFβ-결합 도메인에 연결된 CD39-결합 도메인을 포함하는 단백질은 또한 본 개시내용에서 "항-CD39/TGFβ 트랩"으로 지칭될 수 있다.

[0095] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 인간 TGFβ1, 인간 TGFβ2 및/또는 인간 TGFβ3에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 인간 TGFβ1 및 마우스 TGFβ1에 유사한 친화도로 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 ELISA 검정에 의해 측정 시 3 x 10^{-11} M 이하 (예를 들어 2 x 10^{-11} M 이하, 1 x 10^{-11} M 이하, 0.9 x 10^{-11} M 이하, 0.8 x 10^{-11} M 이하, 0.7 x 10^{-11} M 이하, 0.6 x 10^{-11} M 이하, 0.5 x 10^{-11} M 이하)의 EC_{50}으로 인간 TGFβ1에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 차단 검정에 의해 측정 시 4 x 10^{-10} M 이하 (예를 들어 3 x 10^{-10} M 이하, 2 x 10^{-10} M 이하, 1 x 10^{-10} M 이하, 0.5 x 10^{-10} M 이하)의 IC_{50}으로 인간 TGFβ1 및 TGFβRII 결합을 차단할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 FACS 검정에 의해 측정 시 용량-의존성 방식으로 인간 CD39에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 ELISA 검정 또는 FACS 검정에 의해 측정 시 CD39 및 TGFβ에 동시에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 TGF-β SMAD 리포터 검정에 의해 측정 시 4 x 10^{-11} 이하의 IC_{50}으로 TGFβ 신호를 억제할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 ATPase 활성 검정에 의해 측정 시 7 x 10^{-10} M 이하 (예를 들어 6 x 10^{-10} M 이하, 5 x 10^{-10} M 이하, 4 x 10^{-10} M 이하, 3 x 10^{-10} M 이하, 2 x 10^{-10} M 이하, 1 x 10^{-10} M 이하, 0.5 x 10^{-10} M 이하)의 IC_{50}으로 CD39 발현 세포에서 ATPase 활성을 억제할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 옥텟 검정에 의해 측정 시 4 x 10^{-10} M 이하 (예를 들어 3 x 10^{-10} M 이하, 2 x 10^{-10} M 이하, 1 x 10^{-10} M 이하, 또는 0.5 x 10^{-10} M 이하)의 K_D 값으로 인간 CD39에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 옥텟 검정에 의해 측정 시 4 x 10^{-11} M 이하 (예를 들어 3 x 10^{-11} M 이하, 2 x 10^{-11} M 이하, 1 x 10^{-11} M 이하, 또는 0.5 x 10^{-11} M 이하)의 K_D 값으로 인간 TGFβ1에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 Treg 억제 검정에 의해 측정 시 T 세포 기능을 회복시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 용량-의존성 방식으로 인간 T 세포 아폽토시스를 억제할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 인간 T 세포 생존 및 자극에 걸친 활성화를 촉진할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 총 T 세포 상에서의 TGFβ 유도 Foxp3 발현을 차단할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 분자는 인간 T 세포 증식에 대한 ATP 유도 억제를 회복시킬 수 있다.

[0096] TGFβ-결합 도메인

[0097] 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 인간 및/또는 마우스 TGFβ에 결합한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ 신호전달 경로를 길항하고/거나 억제할 수 있다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ를 길항하고/거나 억제할 수 있다. 본 개시내용에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ 패밀리의 1종 이상의 패밀리 구성원 또는 이소형에 특이적으로 결합하는 임의의 모이어티일 수 있다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ1 (예를 들어 인간 TGFβ1), TGFβ2 (예를 들어 인간 TGFβ2), 및/또는 TGFβ3 (예를 들어 인간 TGFβ3)에 결합하는 단백질, 또는 유사하거나 개선된 TGFβ 결합 친화도를 갖는 그의 변이체를 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ1 (예를 들어 인간 TGFβ1)에 결합한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ2 (예를 들어 인간 TGFβ2)에 결합한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ3 (예를 들어 인간 TGFβ3)에 결합한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ1 (예를 들어 인간 TGFβ1) 및 TGFβ2 (예를 들어 인간 TGFβ2)에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ1 (예를 들어 인간 TGFβ1) 및 TGFβ3 (예를 들어 인간 TGFβ3)에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ2 (예를 들어 인간 TGFβ2) 및 TGFβ3 (예를 들어 인간 TGFβ3)에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ1 (예를 들어 인간 TGFβ1), TGFβ2 (예를 들어 인간 TGFβ2), 및 TGFβ3 (예를 들어 인간 TGFβ3)에 특이적으로 결합한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 TGFβ 패밀리의 한 패밀리 구성원 또는 이소형에 결합하는 TGFβ-결합 도메인이 TGFβ 패밀리의 1종 이상의 다

른 패밀리 구성원 또는 이소형에 유사하거나 또는 보다 높은 친화도로 결합할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0098] 본 개시내용의 TGFβ-결합 도메인은 항-TGFβ 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편일 수 있다. 예시적인 항-TGFβ 항체 모이어티는 프레솔리무맙 및 메텔리무맙, 뿐만 아니라 예를 들어 US7494651B2, US8383780B2, US8012482B2, WO 2017141208A1 (이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 항-TGFβ 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0099] 본 개시내용의 TGFβ-결합 도메인은 또한 TGFβ 수용체 (예를 들어 TGFβRI, TGFβRII, TGFβRIII) 또는 그의 단편일 수 있다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 가용성 TGFβ 수용체 (예를 들어 가용성 인간 TGFβ 수용체), 또는 그의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ 수용체 (예를 들어 인간 TGFβ 수용체)의 세포외 도메인 (ECD)을 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ 수용체는 TGFβ 수용체 I (TGFβRI), TGFβ 수용체 II (TGFβRII), TGFβ 수용체 III (TGFβRIII), 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, TGFβ 수용체는 TGFβRI (예를 들어 인간 TGFβRI)이다. 특정 실시양태에서, TGFβ 수용체는 TGFβRII (예를 들어 인간 TGFβRII)이다. 특정 실시양태에서, TGFβ 수용체는 TGFβRIII (예를 들어 인간 TGFβRIII)이다.

[0100] 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβRI (예를 들어 인간 TGFβRI)의 ECD, TGFβRII (예를 들어 인간 TGFβRII)의 ECD, TGFβRIII (예를 들어 인간 TGFβRIII)의 ECD, 또는 그의 임의의 조합을 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβRI (예를 들어 인간 TGFβRI)의 ECD를 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβRII (예를 들어 인간 TGFβRII)의 ECD를 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβRIII (예를 들어 인간 TGFβRIII)의 ECD를 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβRI (예를 들어 인간 TGFβRI)의 ECD 및 TGFβRII (예를 들어 인간 TGFβRII)의 ECD를 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβRI (예를 들어 인간 TGFβRI)의 ECD 및 TGFβRIII (예를 들어 인간 TGFβRIII)의 ECD를 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβRII (예를 들어 인간 TGFβRII)의 ECD 및 TGFβRIII (예를 들어 인간 TGFβRIII)의 ECD를 포함한다.

[0101] 특정 실시양태에서, 특정 실시양태에서, TGFβ 수용체의 ECD는 서열식별번호: 163, 서열식별번호: 164 또는 서열식별번호: 165의 아미노산 서열, 또는 TGFβ에 대한 결합 특이성을 보유하면서도 그의 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진다.

[0102] 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 TGFβ 수용체의 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 등)의 ECD를 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 동일한 TGFβ 수용체로부터 유래된다. 예를 들어, 2개 이상의 ECD는 TGFβRI (예를 들어 인간 TGFβRI)로부터 유래되고, 본 개시내용에서 "TGFβRI ECD" 또는 "TGFβRI ECD"로 또한 지칭된다. 또 다른 예로, 2개 이상의 ECD는 TGFβRII (예를 들어 인간 TGFβRII)로부터 유래되고, 본 개시내용에서 "TGFβRII ECD" 또는 "TGFβRII ECD"로 또한 지칭된다. 또 다른 예를 들어, 2개 이상의 ECD는 TGFβRIII (예를 들어 인간 TGFβRIII)으로부터 유래되고, 본 개시내용에서 "TGFβRIII ECD" 또는 "TGFβRIII ECD"로 또한 지칭된다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD의 아미노산 서열은 동일하다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD의 아미노산 서열은 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1개 이하의 아미노산이 상이하다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD의 아미노산 서열은 상이하지만, 서로 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD의 아미노산 서열은 상이하지만, 각각은 서열식별번호: 163-165 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 갖지만 TGFβ에 대한 결합 특이성을 보유한다.

[0103] 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 적어도 2개의 상이한 TGFβ 수용체로부터 유래된다. 예를 들어, 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 등)의 ECD는 TGFβRI (예를 들어 인간 TGFβRI), TGFβRII (예를 들어 인간 TGFβRII), 및 TGFβRIII (예를 들어 인간 TGFβRIII)으로부터 선택된 적어도 2개 (예를 들어 2, 3개)의 상이한 TGFβ 수용체로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 TGFβRI (예를 들어 인간 TGFβRI)로부터 유래된 제1 ECD 및 TGFβRII (예를 들어 인간 TGFβRII)로부터 유래된 제2 ECD를 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 TGFβRI (예를 들어 인간 TGFβRI)로부터 유래된 제1 ECD 및 TGFβRIII (예를 들어 인간 TGFβRIII)으로부터 유래된 제2 ECD를 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 TGFβRII

(예를 들어 인간 TGFβRII)로부터 유래된 제1 ECD 및 TGFβRIII (예를 들어 인간 TGFβRIII)으로부터 유래된 제2 ECD를 포함한다.

[0104] 특정 실시양태에서, TGFβ 및 TGFβ 수용체 상호작용을 차단하는 데 있어서의 항-CD39/TGFβ 트랩의 능력은 TGFβ 수용체 ECD의 증가에 따라 증가된다. 예를 들어, 4개의 TGFβRII ECD가 있는 항-CD39/TGFβ 트랩이 TGFβ와 TGFβRII 사이의 상호작용을 차단하는 데 있어서 2개의 TGFβRII ECD가 있는 항-CD39/TGFβ 트랩보다 더 강력하다.

[0105] 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 직렬로 작동가능하게 연결된다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 서로 공유 또는 비공유 연결된다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 서로 직접 연결되거나 또는 링커를 통해 서로 연결된다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 ECD는 제1 링커를 통해 연결된다.

[0106] 본원에 사용된 용어 "링커"는 펩티드 결합에 의해 연결된 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 잔기, 또는 5 내지 15, 20, 30, 50개 또는 그 초과의 아미노산 잔기의 길이를 갖는 인공 아미노산 서열을 지칭하고, 1개 이상의 폴리펩티드를 연결하는 데 사용된다. 링커는 2차 구조를 갖거나 갖지 않을 수 있다. 링커 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993); Poljak et al., Structure 2:1121-1123 (1994)]을 참조한다.

[0107] 특정 실시양태에서, 제1 링커는 절단가능한 링커, 비-절단가능한 링커, 펩티드 링커, 가요성 링커, 강성 링커, 나선형 링커, 및 비-나선형 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 링커가 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제1 링커는 펩티드 링커를 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용에서 유용한 링커는 글리신 및 세린 잔기가 풍부할 수 있다. 예는 트레오닌/세린 및 글리신을 포함하는 단일 또는 반복 서열을 갖는 링커, 예컨대 TGGGG (서열식별번호: 172), GGGGS (서열식별번호: 173) 또는 SGGGG (서열식별번호: 174) 또는 그의 탠덤 반복부 (예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 반복부)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 사용된 제1 링커는 GGGGSGGGGSGGGGS (서열식별번호: 175)를 포함한다. 대안적으로, 링커는 GAPGGGGGAAAAAGGGGG (서열식별번호: 176)의 아미노산 서열의 1개 이상의 순차적 또는 탠덤 반복부를 함유하는 긴 펩티드 쇄일 수 있다. 특정 실시양태에서, 제1 링커는 서열식별번호: 176의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 순차적 또는 탠덤 반복부를 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 링커는 GS 링커를 포함한다. 특정 실시양태에서, GS 링커는 GGGS (서열식별번호: 177) 또는 서열식별번호: 173의 1개 이상의 반복부를 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 링커는 GGGGSGGGGSGGGGSG (서열식별번호: 182)의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 링커는 서열식별번호: 172-177, 182 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 상기 제1 링커의 설명은 하기 제1 링커에 적용가능하다.

[0108] 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 서열식별번호: 166, 서열식별번호: 167, 서열식별번호: 168, 서열식별번호: 169, 서열식별번호: 170, 서열식별번호: 171, 또는 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0109] TGFβ 수용체(들)의 여러 예시적인 ECD의 아미노산 서열이 하기 표 30에서 제시된다. 제1 링커는 밑줄표시된다.

[0110] 표 30. TGFβ 수용체의 예시적인 ECD의 아미노산 서열

명칭	아미노산 서열	SEQ ID NO
TGFβRI ECD	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSM CIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCN KIELPTTVKSSPGLGPVEL	163
TGFβRII ECD	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD	164
TGFβRIII ECD	GPEPGALCELSPVSASHPVQALMESFTVLSGCASRGT TGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVTLHLNPISSVH IHHKSVVFLLNSPHPLVWHLKTERLATGVSRLFLVSE GSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEY GAVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFLS LNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELITPNS NPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCKKSV NWVIKSFDVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSI RDDIPSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHL RLENNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPP IRGGEGQNGGLPFPFPDISRRVWNEEGEDGLPRPKDP VIPSIQLFPGLREPEEVQGSVDIALSVKCDNEKMIVA VEKDSFQASGYSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLESP LNGCGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGDSSGWPD GYEDLESGDNGFPGDMDEGDASLFTRPEIVVFNCSLQ QVRNPSSFQEQPHGNITFNMELYNTDLFLVPSQGVFS VPENGHVYVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSNPDR MSHYTIIENICPKDESVKFYSPKRVHFPIPQADMDKK RFSFVFKPVFNTSLLFLQCELTLCTKMEKHPQKLPKC VPPDEACTSLDASIIWAMMQNKKTFTKPLAVIHHEAE SKEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLTV	165
TGFβRI-TGFβRI ECD	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSM CIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCN KIELPTTVKSSPGLGPVELGGGGSGGGGSGGGGSLQC FCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIA EIDLIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCNKIE LPTTVKSSPGLGPVEL	166
TGFβRII-TGFβRII ECD	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGG GGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVR FSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDEN	167

[0111]

	ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGE TFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD	
TGFβRIII- TGFβRIII ECD	GPEPGALCELSPVSASHPVQALMESFTVLSGCASRGT TGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVTLHLNPISSVH IHHKSVVFLLNSPHPLVWHLKTERLATGVSRLFLVSE GSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEY GAVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFLS LNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELITPNS NPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCKKSV NWVIKSFDVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSI RDDIPSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHL RLENNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPP IRGGEGQNGGLPFPFPDISRRVWNEEGEDGLPRPKDP VIPSIQLFPGLREPEEVQGSVDIALSVKCDNEKMIVA VEKDSFQASGYSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLESP LNGCGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGDSSGWPD GYEDLESGDNGFPGDMDEGDASLFTRPEIVVFNCSLQ QVRNPSSFQEQPHGNITFNMELYNTDLFLVPSQGVFS VPENGHVYVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSNPDR MSHYTIIENICPKDESVKFYSPKRVHFPIPQADMDKK RFSFVFKPVFNTSLLFLQCELTLCTKMEKHPQKLPKC VPPDEACTSLDASIIWAMMQNKKTFTKPLAVIHHEAE SKEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLTVGGGGSGGGGS GGGGSGPEPGALCELSPVSASHPVQALMESFTVLSGC ASRGTTGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVTLHLNP ISSVHIHHKSVVFLLNSPHPLVWHLKTERLATGVSRL FLVSEGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNW ARKEYGAVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIG KNFLSLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIEL ITPNSNPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILK CKKSVNWVIKSFDVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMT MTKSIRDDIPSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVA NRFHLRLENNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALPA LQNPPIRGGEGQNGGLPFPFPDISRRVWNEEGEDGLP RPKDPVIPSIQLFPGLREPEEVQGSVDIALSVKCDNE KMIVAVEKDSFQASGYSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHF VLESPLNGCGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGDS SGWPDGYEDLESGDNGFPGDMDEGDASLFTRPEIVVF NCSLQQVRNPSSFQEQPHGNITFNMELYNTDLFLVPS QGVFSVPENGHVYVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPY SNPDRMSHYTIIENICPKDESVKFYSPKRVHFPIPQA	168

[0112]

	DMDKKRFSFVFKPVFNTSLLFLQCELTLCTKMEKHPQ KLPKCVPPDEACTSLDASIIWAMMQNKKTFTKPLAVI HHEAESKEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLTV	
TGFβRI-TGFβRII ECD	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSM CIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCN KIELPTTVKSSPGLGPVELGGGGSGGGGSGGGGSIPP HVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN QKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITLETV CHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCS CSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD	169
TGFβRI-TGFβRIII ECD	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSM CIAEIDLIPRDRPFVCAPSSKTGSVTTTYCCNQDHCN KIELPTTVKSSPGLGPVELGGGGSGGGGSGGGGSGPE PGALCELSPVSASHPVQALMESFTVLSGCASRGTTGL PQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVTLHLNPISSVHIHH KSVVFLLNSPHPLVWHLKTERLATGVSRLFLVSEGSV VQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEYGAV TSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKNFLSLNY LAEYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELITPNSNPY SAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCKKSVNWV IKSFDVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDD IPSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHLRLE NNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALPALQNPPIRG GEGQNGGLPFPFPDISRRVWNEEGEDGLPRPKDPVIP SIQLFPGLREPEEVQGSVDIALSVKCDNEKMIVAVEK DSFQASGYSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLESPLNG CGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGDSSGWPDGYE DLESGDNGFPGDMDEGDASLFTRPEIVVFNCSLQQVR NPSSFQEQPHGNITFNMELYNTDLFLVPSQGVFSVPE NGHVYVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSNPDRMSH YTIIENICPKDESVKFYSPKRVHFPIPQADMDKKRFS FVFKPVFNTSLLFLQCELTLCTKMEKHPQKLPKCVPP DEACTSLDASIIWAMMQNKKTFTKPLAVIHHEAESKE KGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLTV	170
TGFβRII-TGFβRIII ECD	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFST CDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITL ETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGG GGSGPEPGALCELSPVSASHPVQALMESFTVLSGCAS RGTTGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQLQREVTLHLNPIS SVHIHHKSVVFLLNSPHPLVWHLKTERLATGVSRLFL VSEGSVVQFSSANFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWAR KEYGAVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIGKN FLSLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQNEEVHIIELIT	171

[0113]

	PNSNPYSAFQVDITIDIRPSQEDLEVVKNLILILKCK KSVNWVIKSFDVKGSLKIIAPNSIGFGKESERSMTMT KSIRDDIPSTQGNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANR FHLRLENNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALPALQ NPPIRGGEGQNGGLPFPFPDISRRVWNEEGEDGLPRP KDPVIPSIQLFPGLREPEEVQGSVDIALSVKCDNEKM IVAVEKDSFQASGYSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVL ESPLNGCGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGDSSG WPDGYEDLESGDNGFPGDMDEGDASLFTRPEIVVFNC SLQQVRNPSSFQEQPHGNITFNMELYNTDLFLVPSQG VFSVPENGHVYVEVSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSN PDRMSHYTIIENICPKDESVKFYSPKRVHFPIPQADM DKKRFSFVFKPVFNTSLLFLQCELTLCTKMEKHPQKL PKCVPPDEACTSLDASIIWAMMQNKKTFTKPLAVIHH EAESKEKGPSMKEPNPISPPIFHGLDTLTV	

[0114]

[0115] CD39-결합 도메인

[0116] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 CD39-결합 도메인은 CD39 (예를 들어 인간 CD39, 시노몰구스 CD39 또는 마우스 CD39)에 결합한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 CD39-결합 도메인은 인간 CD39에 결합한다.

[0117] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 CD39-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티를 포함한다. 예시적인 항-CD39 항체 모이어티는, 예를 들어 US10556959B2, US20200277394A1, EP3429692A1, WO2018065552A1 (이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 항-CD39 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 예시적인 항-CD39 항체 모이어티는 본 개시내용의 섹션 항-CD39 항체 모이어티 및 섹션 예시적인 항-CD39 항체 모이어티에 개시되어 있다.

[0118] 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티는 1개 이상의 CDR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티는 본 개시내용의 섹션 예시적인 항-CD39 항체 모이어티에 기재된 1개 이상의 CDR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티는 본 개시내용의 섹션 예시적인 항-CD39 항체 모이어티에 개시된 바와 같은 항-CD39 항체의 VH 및 VL을 포함한다.

[0119] 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티는 중쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 부착된 중쇄 불변 도메인을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM으로 이루어진 군으로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 또는 IgM으로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1 (서열식별번호: 178) 또는 IgG4 (서열식별번호: 179)로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티는 경쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 부착된 경쇄 불변 도메인을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 카파 경쇄 또는 람다 경쇄로부터 유래된다. 카파 경쇄 불변 영역 및 람다 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열은 각각 서열식별번호: 180 및 서열식별번호: 181에 제시된다. 여러 예시적인 불변 영역의 아미노산 서열이 하기 표 31에서 제시된다.

[0120] 표 31. 예시적인 불변 영역의 아미노산 서열

명칭	아미노산 서열	SEQ ID NO
인간 IgG1 불변 영역	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	178
인간 IgG4 불변 영역	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	179
경쇄 불변 영역 (카파)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	180
경쇄 불변 영역 (람다)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	181

[0121]

[0122] TGFβ-결합 도메인과 CD39-결합 도메인 사이의 연결

[0123] 본 개시내용에서, TGFβ-결합 도메인은 CD39-결합 도메인의 임의의 부분 (예를 들어 항-CD39 항체 모이어티)에 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 1) 중쇄 가변 영역의 아미노 말단, 2) 경쇄 가변 영역의 아미노 말단, 3) 중쇄 가변 영역의 카르복실 말단; 4) 경쇄 가변 영역의 카르복실 말단; 5) 중쇄 불변 영역의 카르복실 말단; 및 6) 경쇄 불변 영역의 카르복실 말단으로 이루어진 군으로부터

선택된 위치에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결된다.

[0124] TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 임의의 부분 (예를 들어 이뮤노글로불린 쇄의 아미노 말단 또는 카르복실 말단)에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) (공유 또는 비-공유) 연결될 수 있다. 공유 연결은 화학적 연결 또는 유전자 연결일 수 있다. 특정 실시양태에서, 제2 링커는 절단가능한 링커, 비-절단가능한 링커, 펩티드 링커, 가요성 링커, 강성 링커, 나선형 링커, 및 비-나선형 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 링커가 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제2 링커는 펩티드 링커를 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용에서 유용한 링커는 글리신 및 세린 잔기가 풍부할 수 있다. 예는 트레오닌/세린 및 글리신으로 구성된 단일 또는 반복 서열을 갖는 링커, 예컨대 TGGGG (서열식별번호: 172), GGGGS (서열식별번호: 173) 또는 SGGGG (서열식별번호: 174) 또는 그의 탠덤 반복부 (예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 반복부)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 사용된 제2 링커는 GGGGSGGGGSGGGGS (서열식별번호: 175)를 포함한다. 대안적으로, 링커는 GAPGGGGGAAAAAGGGGG (서열식별번호: 176)의 아미노산 서열의 1개 이상의 순차적 또는 탠덤 반복부를 함유하는 긴 펩티드 쇄일 수 있다. 특정 실시양태에서, 제2 링커는 서열식별번호: 176의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 순차적 또는 탠덤 반복부를 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 링커는 GS 링커를 포함한다. 특정 실시양태에서, GS 링커는 GGGS (서열식별번호: 177) 또는 서열식별번호: 173의 1개 이상의 반복부를 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 링커는 GGGGSGGGGSGGGGSG (서열식별번호: 182)의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 링커는 서열식별번호: 172-177, 182 중 어느 하나에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 상기 제2 링커의 설명은 하기 제2 링커에 적용가능하다.

[0125] 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역에 연결된다. TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역의 아미노 말단 (N-말단) 또는 카르복실 말단 (C-말단) 아미노산 잔기를 포함한 중쇄 가변 영역의 임의의 부분에 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역의 아미노 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된다.

[0126] 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역 각각의 아미노 말단에 연결된 2개의 TGFβRII ECD를 포함하는 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 개략적 도면이 본 개시내용의 도 24c에서 제시된다.

[0127] 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역에 연결된다. TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역의 아미노 말단 또는 카르복실 말단 아미노산 잔기를 포함한 경쇄 가변 영역의 임의의 부분에 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역의 아미노 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된다.

[0128] 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역 각각의 아미노 말단에 연결된 2개의 TGFβRII ECD를 포함하는 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 개략적 도면이 본 개시내용의 도 24d에서 제시된다.

[0129] 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역에 연결된다. TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역의 아미노 말단 또는 카르복실 말단 아미노산 잔기를 포함한 중쇄 불변 영역의 임의의 부분에 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역의 아미노 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역의 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된다.

[0130] 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역 각각의 카르복실 말단에 연결된 1개의 TGFβRII ECD를 포함하는 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 개략적 도면이 본 개시내용의 도 24a에서 제시된다. 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역 각각의 카르복실 말단에 연결된 2개의 TGFβRII ECD를 포함하는 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 개략적 도면이 본 개시내용의 도 24b에서 제시된다.

[0131] 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역에 연결된다. TGFβ-결합 도

메인은 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역의 아미노 말단 또는 카르복실 말단 아미노산 잔기를 포함한 경쇄 불변 영역의 임의의 부분에 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역의 아미노 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된다. 특정 실시양태에서, TGFβ-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역의 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된다.

[0132] 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역 각각의 카르복실 말단에 연결된 2개의 TGFβRII ECD를 포함하는 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 개략적 도면이 본 개시내용의 도 24f에서 제시된다.

[0133] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역의 아미노 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 각각 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역의 아미노 말단 및 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인은 서로 직접적으로 또는 제1 링커를 통해 연결된다.

[0134] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역의 아미노 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 CD39 및 TGFβ 둘 다를 표적화하는 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 각각 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역의 아미노 말단 및 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인은 서로 직접적으로 또는 제1 링커를 통해 연결된다.

[0135] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 CD39 및 TGFβ 둘 다를 표적화하는 단백질은 각각 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인, 및 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인, 및 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인, 및 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역의 카르복실 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인, 및 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역의 아미노 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다.

[0136] 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역 각각의 아미노 말단에 연결된 1개의 TGFβRII ECD, 및 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 가변 영역 각각의 아미노 말단에 연결된 1개의 TGFβRII ECD를 포함하는 예시적인 항-CD39/TGF

β 트랩 분자의 개략적 도면이 본 개시내용의 도 24e에서 제시된다.

[0137] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 CD39 및 TGFβ 둘 다를 표적화하는 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역의 아미노 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역의 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 각각 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역의 아미노 말단 및 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인은 서로 직접적으로 또는 제1 링커를 통해 연결된다.

[0138] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 CD39 및 TGFβ 둘 다를 표적화하는 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 CD39 및 TGFβ 둘 다를 표적화하는 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역의 아미노 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 모두 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역의 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 각각 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역의 아미노 말단 및 카르복실 말단에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상 (예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인은 서로 직접적으로 또는 제1 링커를 통해 연결된다.

[0139] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 각각 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄 불변 영역에 (예를 들어 직접적으로 또는 제2 링커를 통해) 연결된 2개 이상의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역의 아미노 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인, 및 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역의 아미노 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역의 카르복실 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인, 및 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역의 카르복실 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역의 아미노 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인, 및 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역의 카르복실 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 단백질은 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 불변 영역의 카르복실 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인, 및 항-CD39 항체 모이어티의 경쇄 불변 영역의 아미노 말단에 연결된 적어도 1개 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과)의 TGFβ-결합 도메인을 포함한다.

[0140] 항-CD39 항체 모이어티의 각각의 중쇄 불변 영역의 카르복실 말단에 연결된 1개의 TGFβRII ECD, 및 항-CD39 항체 모이어티의 각각의 경쇄 불변 영역의 카르복실 말단에 연결된 2개의 TGFβRII ECD를 포함하는 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 개략적 도면이 본 개시내용의 도 24g에서 제시된다.

[0141] 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 (예를 들어 중쇄 가변 영역, 중쇄 불변 영역) 또는 경쇄 (예를 들어 경쇄 가변 영역, 경쇄 불변 영역)의 C-말단에 연결된 TGFβ-결합 도메인(들)을 포함하는 항-CD39/TGFβ 트랩 분자는 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 (예를 들어 중쇄 가변 영역, 중쇄 불변 영역) 또는 경쇄 (예를 들어 경쇄 가변 영역, 경쇄 불변 영역)의 N-말단에 연결된 TGFβ-결합 도메인(들)을 포함하는 항-CD39/TGFβ 트랩 분자보다 CD39 및/또는 TGFβ에 대한 결합에 더 효과적이다. 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 (예를 들어 중쇄 가변 영역, 중쇄 불변 영역) 또는 경쇄 (예를 들어 경쇄 가변 영역, 경쇄 불변 영역)의 N-말단

에 연결된 TGFβ-결합 도메인(들)을 포함하는 항-CD39/TGFβ 트랩 분자는 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 (예를 들어 중쇄 가변 영역, 중쇄 불변 영역) 또는 경쇄 (예를 들어 경쇄 가변 영역, 경쇄 불변 영역)의 C-말단에 연결된 TGFβ-결합 도메인(들)을 포함하는 항-CD39/TGFβ 트랩 분자보다 CD39 및/또는 TGFβ에 대한 결합에 더 효과적이다.

[0142] 항-CD39 항체 모이어티

[0143] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 접합체 분자의 CD39-결합 도메인은 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 CD39에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0144] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 비아코어 검정에 의해 10^{-7} M 이하, 8 x 10^{-8} M 이하, 5 x 10^{-8} M 이하, 2 x 10^{-8} M 이하, 8 x 10^{-9} M 이하, 5 x 10^{-9} M 이하, 2 x 10^{-9} M 이하, 10^{-9} M 이하, 8 x 10^{-10} M 이하, 7 x 10^{-10} M 이하, 또는 6 x 10^{-10} M 이하의 K_D 값으로 인간 CD39에 특이적으로 결합한다. 비아코어 검정은 표면 플라즈몬 공명 기술에 기초하며, 예를 들어 문헌 [Murphy, M. et al., Current protocols in protein science, Chapter 19, unit 19.14, 2006]을 참조한다. 특정 실시양태에서, K_D 값은 본 개시내용의 실시예 5.1에 기재된 방법에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, K_D 값은 약 25℃에서, 또는 약 37℃에서 측정된다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 37℃에서 측정된 것과 대등한 25℃에서 측정된 K_D 값, 예를 들어 37℃에서 측정된 것의 약 80% 내지 약 150%, 약 90% 내지 약 130%, 또는 약 90% 내지 약 120%, 약 90% 내지 약 110%를 갖는다.

[0145] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 옥텟 검정에 의해 10^{-8} M 이하, 8 x 10^{-9} M 이하, 5 x 10^{-9} M 이하, 4 x 10^{-9} M 이하, 3 x 10^{-9} M 이하, 2 x 10^{-9} M 이하, 1 x 10^{-9} M 이하, 9 x 10^{-10} M 이하, 8 x 10^{-10} M 이하, 7 x 10^{-10} M 이하, 또는 6 x 10^{-10} M 이하의 K_D 값으로 인간 CD39에 특이적으로 결합한다. 옥텟 검정은 생물-층 간섭측정 기술에 기초하며, 예를 들어 문헌 [Abdiche, Yasmina N., et al. Analytical biochemistry 386.2 (2009): 172-180, 및 Sun Y S., Instrumentation Science & Technology, 2014, 42(2): 109-127]을 참조한다. 특정 실시양태에서, K_D 값은 본 개시내용의 실시예 5.1에 기재된 방법에 의해 측정된다.

[0146] 본원에 제공된 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편의 인간 CD39에 대한 결합은 또한 "반수 최대 유효 농도" (EC_{50}) 값으로 나타낼 수 있으며, 이는 그의 최대 결합의 50%가 관찰되는 항체 모이어티의 농도를 지칭한다. EC_{50} 값은 관련 기술분야에 공지된 결합 검정, 예를 들어 직접 또는 간접 결합 검정, 예컨대 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA), FACS 검정 및 다른 결합 검정에 의해 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 FACS (형광 활성화 세포 분류) 검정에 의해 측정 시 10^{-7} M 이하, 8 x 10^{-8} M 이하, 5 x 10^{-8} M 이하, 2 x 10^{-8} M 이하, 10^{-8} M 이하, 8 x 10^{-9} M 이하, 5 x 10^{-9} M 이하, 2 x 10^{-9} M 이하, 10^{-9} M 이하, 8 x 10^{-10} M 이하, 7 x 10^{-10} M 이하, 또는 6 x 10^{-10} M 이하의 EC_{50} (즉, 50% 결합 농도)으로 인간 CD39에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 결합은 ELISA 또는 FACS 검정에 의해 측정된다.

[0147] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 인간 CD39 (즉, ENTPDase 1)에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 ENTPDase 패밀리의 다른 구성원에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은, 예를 들어 ELISA 검정에 의해 측정된 바와 같이, 인간 CD39에는 특이적으로 결합하지만, ENTPDase 2, 3, 5, 6에는 특이적으로 결합하지 않는다.

[0148] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은, 예를 들어 FACS 검정에 의해 측정된 바와 같이, 인간 CD39에는 특이적으로 결합하지만 마우스 CD39에는 특이적으로 결합하지 않는다.

[0149] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 FACS 검정에 의해 10^{-7} M 이하, 8 x 10^{-8} M 이하, 5 x 10^{-8} M 이하, 2 x 10^{-8} M 이하, 10^{-8} M 이하, 8 x 10^{-9} M 이하, 5 x 10^{-9} M 이하, 2 x

10^{-9} M 이하, 10^{-9} M 이하, 8 x 10^{-10} M 이하, 7 x 10^{-10} M 이하, 또는 6 x 10^{-10} M 이하의 EC_{50}으로 시노몰구스 CD39에 특이적으로 결합한다.

[0150] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 ATPase 활성 검정에 의해 측정 시, 50 nM 이하, 40 nM 이하, 30 nM 이하, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 8 nM 이하, 5 nM 이하, 3 nM 이하, 1 nM 이하, 0.9 nM 이하, 0.8 nM 이하, 0.7 nM 이하, 0.6 nM 이하, 0.5 nM 이하, 0.4 nM 이하, 0.3 nM 이하, 0.2 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.09 nM 이하, 0.08 nM 이하, 0.07 nM 이하, 0.06 nM 이하 또는 0.05 nM 이하의 IC_{50}으로 CD39 발현 세포에서 ATPase 활성을 억제한다. ATPase 활성 검정은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여, 예를 들어 ATPase 활성의 결과로서 방출된 포스페이트의 비색 검출에 의해 결정될 수 있다. 특정 실시양태에서, ATPase 활성은 본 개시내용의 실시예 3.3에 기재된 방법에 의해 결정된다.

[0151] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 FACS 검정에 의한 CD80, CD86 및/또는 CD40 발현의 분석에 의해 측정 시, 50 nM 이하 (예를 들어, 40 nM 이하, 30 nM 이하, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 5 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 1 nM 이하, 0.5 nM 이하, 또는 0.2 nM 이하)의 농도에서 ATP 매개 단핵구 활성화를 증진시킬 수 있으며, 여기서 CD80, CD86 및/또는 CD40의 상향조절은 단핵구 활성화를 나타낸다. ATP 매개 단핵구의 활성은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여, 예를 들어 본 개시내용의 실시예 5.5에 기재된 바와 같은 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0152] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은, 예를 들어 본 개시내용의 실시예 5.5에 기재된 바와 같은 방법에 의해 IL-2 분비, 또는 IFN-γ 분비, 또는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포 증식에 의해 측정 시, 25 nM 이하, 20 nM 이하, 15 nM 이하, 10 nM 이하, 9 nM 이하, 8 nM 이하, 7 nM 이하, 6 nM 이하, 5 nM 이하, 4 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 또는 1 nM 이하의 농도에서 PBMC에서의 ATP 매개 T 세포 활성화를 증진시킬 수 있다.

[0153] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 FACS 검정에 의한 CD83 발현의 분석에 의해 측정 시 25 nM 이하 (또는 10 nM 이하, 또는 5 nM 이하, 또는 1 nM 이하, 또는 0.5 nM 이하)의 농도에서 ATP 매개 수지상 세포 (DC) 활성화를 증진시킬 수 있다.

[0154] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 T 세포 증식을 촉진하는 활성화된 DC의 능력에 의해 측정 시 25 nM 이하 (또는 10 nM 이하, 또는 5 nM 이하, 또는 1 nM 이하, 또는 0.5 nM 이하)의 농도에서 ATP 매개된 DC 활성화를 증진시킬 수 있다.

[0155] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 혼합-림프구 반응 (MLR) 검정에서 IFN-γ 생산을 촉진하는 활성화된 DC의 능력에 의해 측정 시 25 nM 이하 (또는 10 nM 이하, 또는 5 nM 이하, 또는 1 nM 이하, 또는 0.5 nM 이하)의 농도에서 ATP 매개된 DC 활성화를 증진시킬 수 있다.

[0156] ATP 매개된 DC 성숙의 활성은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 본 개시내용의 실시예 5.5에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0157] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 FACS 검정에 의해 측정 시 1 nM 이하 (예를 들어 0.1 nM 이하, 0.01 nM 이하)의 농도에서 아데노신 (ATP로부터 가수분해됨)에 의해 유도된 $CD4^+$ T 세포 증식의 억제를 차단할 수 있다. T 세포 증식은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 본 개시내용의 실시예 3.4에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0158] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 NK 세포 또는 대식세포 세포 의존성 방식으로 포유동물에서 종양 성장을 억제할 수 있다.

[0159] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 T 세포 증식, $CD25^+$ 세포, 및 살아있는 세포 집단에 의해 측정 시 eATP에 의해 억제된 인간 $CD8^+$ T 세포 증식을 역전시킬 수 있다. T 세포 증식 (%), $CD25^+$ 세포 (%), 및 살아있는 세포 (%)는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 본 개시내용의 실시예 3.4에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0160] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 ELISA 검정에 의해 측정 시 50 nM 이하 (또는 12.5 nM 이하, 또는 3.13 nM 이하, 또는 0.78 nM 이하, 또는 0.2 nM 이하, 또는 0.049 nM

이하, 또는 0.012 nM 이하, 또는 0.003 nM 이하, 또는 0.0008 nM 이하)의 농도에서 LPS 자극에 의해 유도된 인간 대식세포 IL1β 방출을 증진시킬 수 있다. 대식세포 IL-1β 방출은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 본 개시내용의 실시예 5.5.4에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0161] 예시적인 항-CD39 항체 모이어티

[0162] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 (예를 들어 항-인간 CD39 항체 모이어티) 및 그의 항원-결합 단편은 NYGMN (서열식별번호: 1), KYWMN (서열식별번호: 2), NYWMN (서열식별번호: 3), DTFLH (서열식별번호: 4), DYNMY (서열식별번호: 5), DTYVH (서열식별번호: 6), LINTYTGEPTYADDFKD (서열식별번호: 7), EIRLKSNKYGTHYAESVKG (서열식별번호: 8), QIRLNPDNYATHX_1AESVKG (서열식별번호: 9), X_{58}IDPA$X_{59}X_{60}$NIKYDPKFQG (서열식별번호: 151), FIDPYNGYTSYNQKFKG (서열식별번호: 11), RIDPAIDNSKYDPKFQG (서열식별번호: 12), KGIYYDYVWFFDV (서열식별번호: 13), QLDLYWFFDV (서열식별번호: 14), HGX_2RGFAY (서열식별번호: 15), SPYYYGSGYRIFDV (서열식별번호: 16), IYGYDDAYYFDY (서열식별번호: 17), YYCALYDGYNVYAMDY (서열식별번호: 18), KASQDINRYIA (서열식별번호: 19), RASQSISDYLH (서열식별번호: 20), KSSQSLLDSDGRTHLN (서열식별번호: 21), SAFSSVNYMH (서열식별번호: 22), SATSSVSYMH (서열식별번호: 23), RSSKNLLHSNGITYLY (서열식별번호: 24), YTSTLLP (서열식별번호: 25), YASQSIS (서열식별번호: 26), LVSKLDS (서열식별번호: 27), TTSNLAS (서열식별번호: 28), STSNLAS (서열식별번호: 29), RASTLAS (서열식별번호: 30), LQYSNLLT (서열식별번호: 31), QNGHSLPLT (서열식별번호: 32), WQGTLFPWT (서열식별번호: 33), QQRSTYPFT (서열식별번호: 34), QQRITYPFT (서열식별번호: 35), 및 AQLLELPHT (서열식별번호: 36)로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 1개 이상 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 CDR을 포함하며, 여기서 X_1은 Y 또는 F이고, X_2는 S 또는 T이고, X_{58}은 R 또는 K이고, X_{59}는 N, G, S 또는 Q이고, X_{60}은 G, A 또는 D이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원 결합 단편은 서열식별번호: 1-9, 11-36, 및 151 중 임의의 것에 대해 1, 2 또는 3개 이하의 아미노산 잔기 치환을 갖는다.

[0163] 본원에 사용된 항체 "mAb13"은 서열식별번호: 42의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 51의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0164] 본원에 사용된 항체 "mAb14"는 서열식별번호: 43의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 52의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0165] 본원에 사용된 항체 "mAb19"는 서열식별번호: 44의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 53의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0166] 본원에 사용된 항체 "mAb21"은 서열식별번호: 45의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 54의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0167] 본원에 사용된 항체 "mAb23"은 서열식별번호: 47의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 56의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0168] 본원에 사용된 항체 "mAb34"는 서열식별번호: 49의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 58의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0169] 본원에 사용된 항체 "mAb35"는 서열식별번호: 50의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 59의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 항체를 지칭한다.

[0170] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 항체 mAb13, mAb14, mAb19, mAb21, mAb23, mAb34 또는 mAb35의 1개 이상 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 CDR 서열을 포함한다.

[0171] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 1-6으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 7-9, 11-12 및 151로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 13-18로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3, 및/또는 서열식별번호: 19-24로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 25-30으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 31-36으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0172] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 1의 서열을

포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 7의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR3, 및/또는 서열식별번호: 19의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 25의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 31의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0173] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 8의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 14의 서열을 포함하는 HCDR3, 및/또는 서열식별번호: 20의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 32의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0174] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 37의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 40의 서열을 포함하는 HCDR3, 및/또는 서열식별번호: 21의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 27의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 33의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0175] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 38의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 41의 서열을 포함하는 HCDR3, 및/또는 서열식별번호: 21의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 27의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 33의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0176] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 HCDR3, 및/또는 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0177] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 HCDR3, 및/또는 서열식별번호: 23의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 29의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 35의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0178] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 18의 서열을 포함하는 HCDR3, 및/또는 서열식별번호: 24의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 30의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 36의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0179] 하기 표 1은 항체 모이어티 mAb13, mAb14, mAb19, mAb21, mAb23, mAb34 및 mAb35의 CDR 아미노산 서열을 보여준다. CDR 경계는 카바트의 규정에 의해 정의되거나 확인되었다. 하기 표 2는 항체 모이어티 mAb13, mAb14, mAb19, mAb21, mAb23, mAb34 및 mAb35의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 보여준다.

[0180] 표 1. 7종의 모노클로날 항체 모이어티의 CDR 아미노산 서열.

항체 모이어티		CDR1	CDR2	CDR3
mAb13	HCDR	SEQ ID NO: 1 NYGMN	SEQ ID NO: 7 LINTYTGEPTYADD FKD	SEQ ID NO: 13 KGIYYDYVWFF DV
	LCDR	SEQ ID NO: 19 KASQDINRYIA	SEQ ID NO: 25 YTSTLLP	SEQ ID NO: 31 LQYSNLLT
mAb14	HCDR	SEQ ID NO: 2 KYWMN	SEQ ID NO: 8 EIRLKSNKYGTHYA ESVKG	SEQ ID NO: 14 QLDLYWFFDV
	LCDR	SEQ ID NO: 20 RASQSISDYLH	SEQ ID NO: 26 YASQSIS	SEQ ID NO: 32 QNGHSLPLT
mAb19	HCDR	SEQ ID NO: 3 NYWMN	SEQ ID NO: 37 QIRLNPDNYATHY AESVKG	SEQ ID NO: 40 HGSRGFAY
	LCDR	SEQ ID NO: 21 KSSQSLLDSDG RTHLN	SEQ ID NO: 27 LVSKLDS	SEQ ID NO: 33 WQGTLFPWT
mAb21	HCDR	SEQ ID NO: 3 NYWMN	SEQ ID NO: 38 QIRLNPDNYATHFA ESVKG	SEQ ID NO: 41 HGTRGFAY
	LCDR	SEQ ID NO: 21 KSSQSLLDSDG RTHLN	SEQ ID NO: 27 LVSKLDS	SEQ ID NO: 33 WQGTLFPWT
mAb23	HCDR	SEQ ID NO: 4 DTFLH	SEQ ID NO: 10 RIDPANGNIKYDPK FQG	SEQ ID NO: 16 SPYYYGSGYRIF DV
	LCDR	SEQ ID NO: 22 SAFSSVNYMH	SEQ ID NO: 28 TTSNLAS	SEQ ID NO: 34 QQRSTYPFT
mAb34	HCDR	SEQ ID NO: 5 DYNMY	SEQ ID NO: 11 FIDPYNGYTSYNQK FKG	SEQ ID NO: 17 IYGYDDAYYFD Y
	LCDR	SEQ ID NO: 23 SATSSVSYMH	SEQ ID NO: 29 STSNLAS	SEQ ID NO: 35 QQRITYPFT
mAb35	HCDR	SEQ ID NO: 6 DTYVH	SEQ ID NO: 12 RIDPAIDNSKYDPK FQG	SEQ ID NO: 18 YYCALYDGYNV YAMDY
	LCDR	SEQ ID NO: 24 RSSKNLLHSNG ITYLY	SEQ ID NO: 30 RASTLAS	SEQ ID NO: 36 AQLLELPHT

[0181]

[0182] 표 2. 7종의 모노클로날 항체 모이어티의 가변 영역 아미노산 서열.

항체 모이어티	VH	VL
mAb13	SEQ ID NO: 42 QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYTFTNYGMNWVKQAPG KGLRWMGLINTYTGEPTYADD FKDRFAFSLETSASTAFLQINNL KDEDMATYFCARKGIYYDYV WFFDVWGAGTTVTVSS	SEQ ID NO: 51 DIQMTQSPSSLSTSLGGKVSI TCKASQDINRYIAWYQHKPG KGPRLLIHYTSTLLPGIPSRFS GSGSGRDYSFSISNLEPEDIA TYFCLQYSNLLTFGGGTKLEI K
mAb14	SEQ ID NO: 43 EVKLEESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSKYWMNWVRQSPE KGLEWVAEIRLKSNKYGTHYA ESVKGRFTISRDDSKNNVYLQ MNNLRPEDTGIYYCTTQLDLY WFFDVWGAGTTVTVSS	SEQ ID NO: 52 DIVMTQSPAILSVTPGDRVSL SCRASQSISDYLHWYQQKSH ESPRLLIKYASQSISGIPSRFS GSGSGSNFTLSINSVEPEDVG VYFCQNGHSLPLTFGAGTKL ELR
mAb19	SEQ ID NO: 44 EVKLEKSGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPE KGLEWVAQIRLNPDNYATHYA ESVKGRFTISRDDYKNSVYLQ MSSLRAEDSGIYYCTQHGSRGF AYWGQGTLVTVS	SEQ ID NO: 53 DVVMTQTPHTMSITIGQPASI SCKSSQSLLDSDGRTHLNWL FQRPGQSPKRLIYLVSKLDSG VPDRFTGSGSGTDFTLKISRV EAEDLGVYYCWQGTLFPWT FGGGTKLEIK
mAb21	SEQ ID NO: 45 EVKLEKSGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPE KGLEWVAQIRLNPDNYATHFAE SVKGRFTISRDDSKNSVYLQM NSLRAEDTGIYYCTEHGTRGFA YWGQGTLVTVSE	SEQ ID NO: 54 DVVMTQTPLTLSITIGQPASIS CKSSQSLLDSDGRTHLNWFF QRPGQSPKRLIYLVSKLDSG VPDRFTGSGSGTDFTLKISRV EAEDLGVYYCWQGTLFPWT FGGGTKLEIK
mAb23	SEQ ID NO: 47 EVQLQQSGAELLRPGASVKLSC TASGYNLKDTFLHWVKQRPEQ GLEWIGRIDPANGNIKYDPKFQ GKATLTADTSSNTAYLQLISLTS	SEQ ID NO: 56 QIVLTQSPAIMSASPGEKVTI TCSAFSSVNYMHWYQQKPG TSPKLLIYTTSNLASGVPTRF SGSGSGTSYSLTISRMEAEDA

[0183]

	EDTAVYYCANSPYYYGSGYRIF DVWGAGTTVTVSS	ATYYCQQRSTYPFTFGSGTK LEIQ
mAb34	SEQ ID NO: 49 EIQVQQSGPELVKPGASVKVSC KASGYSFTDYNMYWVKQSHG KSLEWIGFIDPYNGYTSYNQKF KGKATLTIDKSSSTAFMHLNSLT SEDSAVYYCAIYGYDDAYYFD YWGQGTTLTVSS	SEQ ID NO: 58 QIVLTQSPAIMSASPGEKVTI TCSATSSVSYMHWFRQKPGT SPKLWIYSTSNLASGVPARFS GSGSGTSYSLTISRMAAEDA ATYYCQQRITYPFTFGSGTK LEIT
mAb35	SEQ ID NO: 50 EVRLQQSGAELVKPGASVKLS CTASGFNIEDTYVHWMKQRPE QGLEWIGRIDPAIDNSKYDPKF QGKATITAVSSSNTAYLQLSSLT SEDTAVYYCALYDGYNVYAMD YWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO: 59 DIVMTQAAFSNPVTLGTSASI SCRSSKNLLHSNGITYLYWY LQRPGQSPQLLIYRASTLASG VPNRFSGSESGTDFTLRISRV EAEDVGVYYCAQLLELPHTF GGGTKLEIK

[0184]

[0185] 각각의 항체 모이어티 mAb13, mAb14, mAb19, mAb21, mAb23, mAb34 및 mAb35가 CD39에 결합할 수 있고 항원-결합 특이성이 주로 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역에 의해 제공된다는 것을 고려하면, 항체 모이어티 mAb13, mAb14, mAb19, mAb21, mAb23, mAb34 및 mAb35의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열은 "혼합 및 매칭"되어 (즉, 상이한 항체 모이어티로부터의 CDR이 혼합 및 매칭될 수 있지만, 각각의 항체 모이어티는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 함유해야 함) 본 개시내용의 항-CD39 결합 분자를 생성할 수 있다. 이러한 "혼합 및 매칭"된 항체의 CD39 결합은 상기 및 실시예에 기재된 결합 검정을 사용하여 시험될 수 있다. 바람직하게는, VH CDR 서열이 혼합 및 매칭되는 경우에, 특정한 VH 서열로부터의 HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3 서열은 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 마찬가지로, VL CDR 서열이 혼합 및 매칭되는 경우에, 특정한 VL 서열로부터의 LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3 서열은 바람직하게는 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 예를 들어, 항체 모이어티 mAb13 및 mAb19의 HCDR1은 일부 구조적 유사성을 공유하고, 따라서 혼합 및 매칭에 적용가능하다. 신규 VH 및 VL 서열은 1개 이상의 VH 및/또는 VL CDR 서열을 모노클로날 항체 모이어티 mAb13, mAb14, mAb19, mAb21, mAb23, mAb34 및 mAb35에 대해 본원에 개시된 CDR 서열로부터의 구조적으로 유사한 서열로 치환함으로써 생성될 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0186] CDR은 항원 결합을 담당하는 것으로 공지되어 있다. 그러나, 6개의 CDR 모두가 필수적이거나 또는 불변하는 것은 아니라는 것이 밝혀졌다. 다시 말해서, 항-CD39 항체 모이어티 mAb13, mAb14, mAb19, mAb21, mAb23, mAb34 및 mAb35에서 1개 이상의 CDR이 대체되거나 변화되거나 변형되지만 CD39에 대한 특이적 결합 친화도는 실질적으로 보유하는 것이 가능하다.

[0187] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편이 CD39에 특이적으로 결합할 수 있는 한 적합한 프레임워크 영역 (FR) 서열을 포함한다. 상기 표 1에 제공된 CDR 서열은 마우스 항체로부터 수득되지만, 이들은 관련 기술분야에 공지된 적합한 방법, 예컨대 재조합 기술을 사용하여 임의의 적합한 종, 예컨대 특히 마우스, 인간, 래트, 토끼의 임의의 적합한 FR 서열에 그라프팅될 수 있다.

[0188] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 인간화된 것이다. 그의 인간화 항체 모이어티 또는 항원-결합 단편은 인간에서의 그의 감소된 면역원성에 있어서 바람직하다. 인간화 항체 모이어티는 비-인간 CDR 서열이 인간 또는 실질적으로 인간 FR 서열에 그라프팅되기 때문에 그의 가변 영역에 있어서 키메라이다. 항체 모이어티 또는 항원-결합 단편의 인간화는 비-인간 (예컨대 뮤린) CDR 유전자를 인간 이뮤노글로불린 유전자에서의 상응하는 인간 CDR 유전자로 치환시킴으로써 본질적으로 수행될 수 있다 (예를 들어 문헌 [Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536] 참조).

[0189] 이러한 목적을 달성하기 위해 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 적합한 인간 중쇄 및 경쇄 가변 도메인이 선택될 수 있다. 예시적인 예에서, "최적-피트" 접근법이 사용될 수 있으며, 여기서 비-인간 (예를 들어 설치류) 항체 가변 도메인 서열이 공지된 인간 가변 도메인 서열의 데이터베이스에 대해 스크리닝되거나 BLAST 검색되고, 비-인간 질의 서열에 가장 가까운 인간 서열이 비-인간 CDR 서열을 그라프팅하기 위한 인간 스캐폴드로서 확인되고 사용된다 (예를 들어 문헌 [Sims et al., (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia et al. (1987) J. Mot. Biol. 196:901] 참조). 대안적으로, 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크가 비-인간 CDR의 그라프팅을 위해 사용될 수 있다 (예를 들어 문헌 [Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol.,151:2623] 참조).

[0190] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 c14의 16종의 인간화 항체 모이어티를 제공하며, 이들은 각각 hu14.H1L1, hu14.H2L1, hu14.H3L1, hu14.H4L1, hu14.H1L2, hu14.H2L2, hu14.H3L2, hu14.H4L2, hu14.H1L3, hu14.H2L3, hu14.H3L3, hu14.H4L3, hu14.H1L4, hu14.H2L4, hu14.H3L4 및 hu14.H4L4로 지정된다. c14의 각각의 인간화 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열식별번호는 실시예 5.1의 표 16에 제시된다. c14의 16종의 인간화 항체 모이어티 각각은 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 8의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 14의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 20의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 32의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다. CDR 경계는 카바트의 규정에 의해 정의되거나 확인되었다.

[0191] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 c23의 31종의 인간화 항체 모이어티를 제공하며, 이들은 각각 hu23.H1L1, hu23.H2L1, hu23.H3L1, hu23.H4L1, hu23.H1L2, hu23.H2L2, hu23.H3L2, hu23.H4L2, hu23.H1L3, hu23.H2L3,

hu23.H3L3, hu23.H4L3, hu23.H1L4, hu23.H2L4, hu23.H3L4, hu23.H4L4, hu23.H5L1, hu23.H6L1, hu23.H7L1, hu23.H1L5, hu23.H5L5, hu23.H6L5, hu23.H7L5, hu23.H1L6, hu23.H5L6, hu23.H6L6, hu23.H7L6, hu23.H1L7, hu23.H5L7, hu23.H6L7, 및 hu23.H7L7로 지정된다. c23의 각각의 인간화 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열식별번호는 실시예 5.1의 표 13 및 표 14에 제시된다. 상기 항체 모이어티 c23에 대한 31종의 인간화 항체 모이어티 각각은 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다. CDR 경계는 카바트의 규정에 의해 정의되거나 확인되었다.

[0192] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 HCDR2의 아미노산 서열이 상이한 것을 제외하고는 c23과 동일한 CDR을 갖는 6종의 인간화 항체 모이어티를 제공한다. 일부 실시양태에서, 이들 c23 변이체의 인간화 항체 모이어티 (c23')의 HCDR2의 아미노산 서열은 X_{58}IDPA$X_{59}X_{60}$NIKYDPKFQG (서열식별번호: 151)의 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 X_{58}은 R 또는 K이고, X_{59}는 N, G, S 또는 Q이고, X_{60}은 G, A 또는 D이다. 일부 실시양태에서, 이들 c23 변이체의 인간화 항체 모이어티 (c23')의 HCDR2의 아미노산 서열은 RIDPAGGNIKYDPKFQG (서열식별번호: 134), RIDPASGNIKYDPKFQG (서열식별번호: 135), RIDPAQGNIKYDPKFQG (서열식별번호: 136), RIDPANANIKYDPKFQG (서열식별번호: 137), RIDPANDNIKYDPKFQG (서열식별번호: 138), 및 KIDPANGNIKYDPKFQG (서열식별번호: 139)로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. CDR 경계는 카바트의 규정에 의해 정의되거나 확인되었다.

[0193] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 효모 디스플레이에 의해 c23 변이체에 대한 4종의 인간화 항체를 제공하며, 이들은 hu23.201, hu23.203, hu23.207 및 hu23.211로 지정된다. 인간화 항체 모이어티 hu23.201, hu23.203, hu23.207 및 hu23.211의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역이 실시예 5.1의 표 15에 제시된다. 4종의 인간화 항체 모이어티 hu23.201, hu23.203, hu23.207 및 hu23.211 각각은 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 LCDR2 및 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다. CDR 경계는 카바트의 규정에 의해 정의되거나 확인되었다.

[0194] 하기 표 3은 인간화 c14 중쇄 가변 영역의 4종의 변이체 (즉, hu14.VH_1, hu14.VH_2, hu14.VH_3, 및 hu14.VH_4) 및 인간화 c14 경쇄 가변 영역의 4종의 변이체 (즉, hu14.VL_1, hu14.VL_2, hu14.VL_3, 및 hu14.VL_4)를 보여준다. 하기 표 4는 인간화 c14 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 대한 FR의 아미노산 서열을 보여준다. 하기 표 5는 키메라 항체 모이어티 c14에 대한 16종의 인간화 항체 모이어티의 각각의 중쇄 및 경쇄에 대한 FR 아미노산 서열을 보여주며, 이들은 각각 hu14.H1L1, hu14.H2L1, hu14.H3L1, hu14.H4L1, hu14.H1L2, hu14.H2L2, hu14.H3L2, hu14.H4L2, hu14.H1L3, hu14.H2L3, hu14.H3L3, hu14.H4L3, hu14.H1L4, hu14.H2L4, hu14.H3L4, hu14.H4L4로 지정된다. 이들 16종의 인간화 항체 모이어티의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 실시예 5.1의 표 16에 제시된다.

[0195] 표 3. c14의 인간화 항체 모이어티에 대한 인간화 가변 영역의 아미노산 서열.

항체 모이어티	VH	VL
hu14.H1L1	hu14.VH_1; SEQ ID NO: 68 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSKYWMNWVRQA PGKGLEWVGEIRLKSNKYGT HYAESVKGRFTISRDDSKNTL YLQMNSLKTEDTAVYYCTTQ LDLYWFFDVWGQGTTVTVSS	hu14.VL_1; SEQ ID NO: 69 EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSISDYLHWYQQKPG QAPRLLIYYASQSISGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQNGHSLPLTFGGGTKLE IK
hu14.H2L2	hu14.VH_2; SEQ ID NO: 70 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSKYWMNWVRQSP GKGLEWVGEIRLKSNKYGTH YAESVKGRFTISRDDSKNTLY LQMNSLKTEDTAVYYCTTQL DLYWFFDVWGQGTTVTVSS	hu14.VL_2; SEQ ID NO: 71 EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSISDYLHWYQQKPG QSPRLLIYYASQSISGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YFCQNGHSLPLTFGGGTKLEI K
hu14.H3L3	hu14.VH_3; SEQ ID NO: 72 EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSKYWMNWVRQSP GKGLEWVAEIRLKSNKYGTH YAESVKGRFTISRDDSKNTVY LQMNSLKTEDTAVYYCTTQL DLYWFFDVWGQGTTVTVSS	hu14.VL_3; SEQ ID NO: 73 EIVLTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSISDYLHWYQQKPG QSPRLLIYYASQSISGIPARFS GSGSGTDFTLTISSVEPEDFA VYFCQNGHSLPLTFGGGTKL EIK
hu14.H4L4	hu14.VH_4; SEQ ID NO: 74 EVQLVESGGGLVKPGGSMRL SCAASGFTFSKYWMNWVRQS PGKGLEWVAEIRLKSNKYGT HYAESVKGRFTISRDDSKNTV YLQMNSLKTEDTAVYYCTTQ LDLYWFFDVWGQGTTVTVSS	hu14.VL_4; SEQ ID NO: 75 EIVMTQSPATLSVSPGERVTL SCRASQSISDYLHWYQQKPG QSPRLLIYYASQSISGIPARFS GSGSGTDFTLTISSVEPEDFA VYFCQNGHSLPLTFGGGTKL EIK

[0196]

[0197] 표 4. c14의 인간화 항체 모이어티에 대한 인간화 FR의 아미노산 서열.

SEQ ID NO.	서열
79	WGQGTTVTVSS
98	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
104	WYQQKPGQAPRLLIY
106	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
119	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
120	EVQLVESGGGLVKPGGSMRLSCAASGFTFS
121	WVRQAPGKGLEWVG
122	WVRQSPGKGLEWVG
123	WVRQSPGKGLEWVA
124	RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
125	RFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCTT
127	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSC
128	EIVMTQSPATLSVSPGERVTLSC
130	WYQQKPGQSPRLLIY
132	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYFC
133	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYFC
153	FGGGTKLEIK

[0198]

[0199] 표 5. c14의 인간화 항체 모이어티에 대한 각각의 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 대한 FR 아미노산 서열.

VH 또는 VL 명칭	FR1 (SEQ ID NO.)	FR2 (SEQ ID NO.)	FR3 (SEQ ID NO.)	FR4 (SEQ ID NO.)
hu14.VH_1	119	121	124	79
hu14.VH_2	119	122	124	79
hu14.VH_3	119	123	125	79
hu14.VH_4	120	123	125	79
hu14.VL_1	98	104	106	153
hu14.VL_2	98	130	132	153
hu14.VL_3	127	130	133	153
hu14.VL_4	128	130	133	153

[0200]

[0201] 하기 표 6은 인간화 c23 중쇄 가변 영역의 7종의 변이체 (즉, hu23.VH_1, hu23.VH_2, hu23.VH_3, hu23.VH_4, hu23.VH_5, hu23.VH_6, 및 hu23.VH_7) 및 인간화 c23 경쇄 가변 영역의 7종의 변이체 (즉, hu23.VL_1, hu23.VL_2, hu23.VL_3, hu23.VL_4, hu23.VL_5, hu23.VL_6, 및 hu23.VL_7)를 보여준다. 하기 표 7은 효모 디스플레이에 의해 수득된 키메라 항체 모이어티 c23에 대한 4종의 인간화 항체 모이어티의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 보여준다. 하기 표 8은 c23의 35종의 인간화 항체 모이어티의 FR 아미노산 서열을 보여준다. 하기 표 9는 c23의 35종의 인간화 항체 모이어티의 각각의 중쇄 및 경쇄에 대한 FR 아미노산 서열을 보여준다.

[0202] 표 6. c23의 인간화 항체 모이어티에 대한 가변 영역의 아미노산 서열.

항체 모이어티	VH	VL
hu23.H1L1	hu23.VH_1, SEQ ID NO: 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYNLKDTFLHWVRQA PGQRLEWMGRIDPANGNIKY DPKFQGRVTITRDTSASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARSPYY YGSGYRIFDVWGQGTTVTVS S	hu23.VL_1, SEQ ID NO: 61 EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CSAFSSVNYMHWYQQKPGQ APRLLIYTTSNLASGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQRSTYPFTFGQGTKLE IK
hu23.H2L2	hu23.VH_2, SEQ ID NO: 62 QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYNLKDTFLHWVRQA PGQGLEWMGRIDPANGNIKY DPKFQGRVTITADTSASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCANSPYY YGSGYRIFDVWGQGTTVTVS S	hu23.VL_2, SEQ ID NO: 63 EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CSAFSSVNYMHWYQQKPGQ APRLLIYTTSNLASGIPARFS GSGSGTDYTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSTYPFTFGQGTKL EIK
hu23.H3L3	hu23.VH_3, SEQ ID NO: 64 QVQLVQSGAEVKKPGASVKL SCKASGYNLKDTFLHWVRQA PGQGLEWIGRIDPANGNIKYD PKFQGRATITADTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCANSPYYY GSGYRIFDVWGQGTTVTVSS	hu23.VL_3, SEQ ID NO: 65 EIVLTQSPATLSASPGERATLS CSAFSSVNYMHWYQQKPGQ APRLLIYTTSNLASGIPARFS GSGSGTDYTLTISSMEPEDFA VYYCQQRSTYPFTFGQGTKL EIK
hu23.H4L4	hu23.VH_4, SEQ ID NO: 66 QVQLVQSGAEVKKPGASVKL SCKASGYNLKDTFLHWVKQA PGQGLEWIGRIDPANGNIKYD PKFQGRATLTADTSASTAYLEL SSLRSEDTAVYYCANSPYYYG SGYRIFDVWGQGTTVTVSS	hu23.VL_4, SEQ ID NO: 67 EIVLTQSPATLSASPGERVTIS CSAFSSVNYMHWYQQKPGQ APRLLIYTTSNLASGIPARFS GSGSGTDYTLTISSMEPEDFA VYYCQQRSTYPFTFGQGTKL EIK
hu23.H5L5	hu23.VH_5, SEQ ID NO: 140 QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYNLKDTFLHWVRQA PGQGLEWMGRIDPANGNIKY DPKFQGRVTITADTSANTAYM ELISLRSEDTAVYYCANSPYY	hu23.VL_5, SEQ ID NO: 143 QIVLTQSPATLSLSPGERATLS CSAFSSVNYMHWYQQKPGQ APRLLIYTTSNLASGIPTRFS GSGSGTSYTLTISSLEPEDFAV YYCQQRSTYPFTFGQGTKLE

[0203]

	YGSGYRIFDVWGQGTTVTVS S	IK
hu23.H6L6	hu23.VH_6, SEQ ID NO: 141 EVQLVQSGAEVKKPGASVKL SCKASGYNLKDTFLHWVRQA PGQGLEWIGRIDPANGNIKYD PKFQGRATITADTSANTAYME LISLRSEDTAVYYCANSPYYY GSGYRIFDVWGQGTTVTVSS	hu23.VL_6, SEQ ID NO: 144 QIVLTQSPATLSASPGERATLS CSAFSSVNYMHWYQQKPGQ APKLLIYTTSNLASGVPTRFS GSGSGTSYTLTISSMEPEDFA VYYCQQRSTYPFTFGQGTKL EIK
hu23.H7L7	hu23.VH_7, SEQ ID NO: 142 EVQLVQSGAEVKKPGASVKL SCKASGYNLKDTFLHWVKQA PGQGLEWIGRIDPANGNIKYD PKFQGKATLTADTSANTAYLE LISLRSEDTAVYYCANSPYYY GSGYRIFDVWGQGTTVTVSS	hu23.VL_7, SEQ ID NO: 145 QIVLTQSPATLSASPGERVTIT CSAFSSVNYMHWYQQKPGQ APKLLIYTTSNLASGVPTRFS GSGSGTSYTLTISSMEPEDFA VYYCQQRSTYPFTFGQGTKL EIK

[0204]

[0205] 표 7. 효모 디스플레이에 의해 수득된 c23의 인간화 항체 모이어티에 대한 인간화 가변 영역의 아미노산 서열.

항체 모이어티	VH	VL
hu23.201	SEQ ID NO: 146 QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTLKDTFLHWVRQA PGQRLEWMGRIDPANGNIKY DPKFQGRVTLTADTSSNTAYM ELSSLRSEDTAVYYCANSPYY YGSGYRIFDVWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 111 EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CSAFSSVNYMHWYQQKPGQ SPRLLIYTTSNLASGIPARFSG SGSGTDYTLTISSLEPEDFAV YYCQQRSTYPFTFGQGTKLE IK
hu23.203	SEQ ID NO: 146 QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTLKDTFLHWVRQA PGQRLEWMGRIDPANGNIKY DPKFQGRVTLTADTSSNTAYM ELSSLRSEDTAVYYCANSPYY YGSGYRIFDVWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 112 EIVLTQSPATLTLSPGERATLS CSAFSSVNYMHWYQQKPGQ APRLLIYTTSNLASGIPARFS GSGSGTDYTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSTYPFTFGQGTKL EIK
hu23.207	SEQ ID NO: 147 EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTLKDTFLHWVRQA PGQRLEWMGKIDPANGNIKY DPKFQGRVTLTADTSSNTAYM ELSSLRSEDTAVYYCANSPYY YGSGYRIFDVWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 111 EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CSAFSSVNYMHWYQQKPGQ SPRLLIYTTSNLASGIPARFSG SGSGTDYTLTISSLEPEDFAV YYCQQRSTYPFTFGQGTKLE IK
hu23.211	SEQ ID NO: 39 EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTLKDTFLHWVRQA PGQRLEWMGRIDPANGNIKY DPKFQGRVTITADTSSNTAYM ELSSLRSEDTAVYYCANSPYY YGSGYRIFDVWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 63 EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CSAFSSVNYMHWYQQKPGQ APRLLIYTTSNLASGIPARFS GSGSGTDYTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSTYPFTFGQGTKL EIK

[0206]

[0207] 표 8. c23의 인간화 항체 모이어티에 대한 인간화 FR의 아미노산 서열.

SEQ ID NO.	서열
79	WGQGTTVTVSS
83	FGQGTKLEIK
84	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNLK
85	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYNLK
86	EVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYNLK
87	WVRQAPGQRLEWMG
88	WVRQAPGQGLEWMG
89	WVRQAPGQGLEWIG
90	WVKQAPGQGLEWIG
91	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
92	RVTITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAN
93	RATITADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAN
94	RATLTADTSASTAYLELSSLRSEDTAVYYCAN
95	RVTITADTSANTAYMELISLRSEDTAVYYCAN
96	RATITADTSANTAYMELISLRSEDTAVYYCAN
97	KATLTADTSANTAYLELISLRSEDTAVYYCAN
98	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
99	EIVLTQSPATLSASPGERATLSC
100	EIVLTQSPATLSASPGERVTISC
101	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
102	QIVLTQSPATLSASPGERATLSC
103	QIVLTQSPATLSASPGERVTITC
104	WYQQKPGQAPRLLIY
105	WYQQKPGQAPKLLIY
106	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC
107	GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC

[0208]

108	GIPARFSGSGSGTDYTLTISSMEPEDFAVYYC
109	GIPTRFSGSGSGTSYTLTISSLEPEDFAVYYC
110	GVPTRFSGSGSGTSYTLTISSMEPEDFAVYYC
115	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLK
116	RVTLTADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAN
117	RVTITADTSSNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAN
118	WGQGTLVTVSS
129	EIVLTQSPATLTLSPGERATLSC
130	WYQQKPGQSPRLLIY
131	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLK

[0209]

[0210] 표 9. c23의 인간화 항체 모이어티에 대한 각각의 인간화 중쇄 및 경쇄 가변 영역에 대한 FR 아미노산 서열.

VH 또는 VL 명칭	FR1 (SEQ ID NO.)	FR2 (SEQ ID NO.)	FR3 (SEQ ID NO.)	FR4 (SEQ ID NO.)
hu23.VH_1	84	87	91	79
hu23.VH_2	84	88	92	79
hu23.VH_3	85	89	93	79
hu23.VH_4	85	90	94	79
hu23.VH_5	84	88	95	79
hu23.VH_6	86	89	96	79
hu23.VH_7	86	90	97	79
hu23.VH_201	131	87	116	118
hu23.VH_207	115	87	116	118
hu23.VH_211	115	87	117	118
hu23.VL_1	98	104	106	83
hu23.VL_2	98	104	107	83
hu23.VL_3	99	104	108	83
hu23.VL_4	100	104	108	83
hu23.VL_5	101	104	109	83
hu23.VL_6	102	105	110	83
hu23.VL_7	103	105	110	83
hu23.VL_201	98	130	107	83
hu23.VL_203	129	104	107	83
hu23.VL_211	98	104	107	83

[0211]

[0212] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 비-인간인 CDR 서열을 제외하고는 실질적으로 모든 인간 서열로 구성된다. 일부 실시양태에서, 가변 영역 FR 및 불변 영역은 존재하는 경우 완전히 또는 실질적으로 인간 이뮤노글로불린 서열로부터의 것이다. 인간 FR 서열 및 인간 불변 영역 서열은 상이한 인간 이뮤노글로불린 유전자로부터 유래될 수 있고, 예를 들어 FR 서열은 하나의 인간 항체로부터 유래되고 불변 영역은 또 다른 인간 항체로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 인간 중쇄 HFR1-4 및/또는 경쇄 LFR1-4를 포함한다.

[0213] 일부 실시양태에서, 인간으로부터 유래된 FR 영역은 그것이 유래된 인간 이뮤노글로불린과 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 FR의 1개 이상의 아미노산 잔기는 모 비-인간 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환된다. 이는 특정 실시양태에서 결합 특징을 최적화하기 위해 (예를 들어, 결합 친화도를 증가시키기 위해) 인간화 항체 또는 그의 단편을 비-인간 모 항체 구조에 매우 근접하게 만드는 데 바람직할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 각각의 인간 FR 서열에 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환, 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 모든 FR에 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 잔기의 이러한 변화는 중쇄 FR 영역에서만, 경쇄 FR 영역에서만, 또는 둘 다의 쇄에서 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 인간 FR 서열의 1개 이상의 아미노산은 결합 친화도를 증가시키기 위해 무작위로 돌연변이된다. 특정 실시양태에서, 인간 FR 서열의 1개 이상의 아미노산은 결합 친화도를 증가시키기 위해 모 비-인간 항체의 상응하는 아미노산(들)으로 복귀 돌연변이된다.

[0214] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인간화 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은

X_{19}VQLVX_{20}SG$X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$KPGX_{25}S$X_{26}X_{27}X_{28}$SCX_{29}ASG$X_{30}X_{31}X_{32}X_{33}$ (서열식별번호: 76)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR1, WVX_{34}QX_{35}PG$X_{36}X_{37}$LEW$X_{38}X_{39}$ (서열식별번호: 77)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR2, $X_{40}X_{41}$T$X_{42}X_{43}X_{44}$DX_{45}S$X_{46}X_{47}$TX_{48}Y$X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}$SL$X_{53}X_{54}$EDTAVYYC$X_{55}X_{56}$ (서열식별번호: 78)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR3, 및 WGQGTX_{57}VTVSS (서열식별번호: 126)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR4를 포함하며, 여기서 X_{19}는 Q 또는 E이고; X_{20}은 E 또는 Q이고; X_{21}은 G 또는 A이고; X_{22}는 G 또는 E이고; X_{23}은 L 또는 V이고; X_{24}는 V 또는 K이고; X_{25}는 G 또는 A이고; X_{26}은 L, M 또는 V이고; X_{27}은 R 또는 K이고; X_{28}은 V 또는 L이고; X_{29}는 A 또는 K이고; X_{30}은 F 또는 Y이고; X_{31}은 N 또는 T이고; X_{32}는 F 또는 L이고; X_{33}은 S 또는 K이고; X_{34}는 R 또는 K이고; X_{35}는 A 또는 S이고; X_{36}은 K 또는 Q이고; X_{37}은 R 또는 G이고; X_{38}은 M, I 또는 V이고; X_{39}는 G 또는 A이고; X_{40}은 R 또는 K이고; X_{41}은 V, A 또는 F이고; X_{42}는 I 또는 L이고; X_{43}은 S 또는 T이고; X_{44}는 R 또는 A이고; X_{45}는 D 또는 T이고; X_{46}은 K, A 또는 S이고; X_{47}은 S 또는 N이고; X_{48}은 L, V 또는 A이고; X_{49}는 M 또는 L이고; X_{50}은 Q 또는 E이고; X_{51}은 M 또는 L이고; X_{52}는 S, I 또는 N이고; X_{53}은 R 또는 K이고; X_{54}는 S 또는 T이고; X_{55}는 A 또는 T이고; X_{56}은 R, N 또는 T이고; X_{57}은 T 또는 L이다.

[0215] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인간화 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 X_3IVX_4TQSPATLX$_5$X$_6$SPGERX$_7$TX_8X_9C (서열식별번호: 80)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR1, WYQQKPGQX$_{10}$PX11LLIY (서열식별번호: 81)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR2, GX_{12}PX_{13}RFSGSGSGTX$_{14}$X$_{15}$TLTISSX$_{16}$EPEDFAVYX$_{17}$C (서열식별번호: 82)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR3, 및 FGX$_{18}$GTKLEIK (서열식별번호: 152)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR4를 포함하며, 여기서 X_3은 E 또는 Q이고; X_4는 L 또는 M이고; X_5는 S 또는 T이고; X_6은 L, V 또는 A이고; X_7은 A 또는 V이고; X_8은 L 또는 I이고; X_9는 S 또는 T이고; X_{10}은 A 또는 S이고; X_{11}은 R 또는 K이고; X_{12}는 I 또는 V이고; X_{13}은 A 또는 T이고; X_{14}는 D 또는 S이고; X_{15}는 F 또는 Y이고; X_{16}은 L, M 또는 V이고; X_{17}은 Y 또는 F이고; X_{18}은 G 또는 Q이다.

[0216] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인간화 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 EVQLVESGGGLVKPGGSX$_{61}$RLSCAASGFTFS (서열식별번호: 154)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR1; WVRQX$_{62}$PGKGLEWVX$_{63}$ (서열식별번호: 155)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR2; RFTISRDDSKNTX$_{64}$YLQMNSLKTEDTAVYYCTT (서열식별번호: 156)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR3; WGQGTTVTVSS (서열식별번호: 79)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR4를 포함하며, 여기서 X_{61}은 L 또는 M이고, X_{62}는 A 또는 S이고, X_{63}은 G 또는 A이고, X_{64}는 L 또는 V이다.

[0217] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인간화 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 EIVX$_{65}$TQSPATLSX$_{66}$SPGERX$_{67}$TLSC (서열식별번호: 157)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR1; WYQQKPGQX$_{68}$PRLLIY (서열식별번호: 158)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR2; GIPARFSGSGSGTDFTLTISSX$_{69}$EPEDFAVYX$_{70}$C (서열식별번호: 159)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR3, 및 FGGGTKLEIK (서열식별번호: 153)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR4를 포함하며, 여기서 X_{65}는 L 또는 M이고; X_{66}은 L 또는 V이고; X_{67}은 A 또는 V이고; X_{68}은 A 또는 S이고; X_{69}는 L 또는 V이고; X_{70}은 Y 또는 F이다.

[0218] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인간화 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 X_{71}VQLVQSGAEVKKPGASVKX$_{72}$SCKASGYX$_{73}$LK (서열식별번호: 160)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR1; WVX$_{74}$QAPGQX$_{75}$LEWX$_{76}$G (서열식별번호: 161)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일

성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR2; $X_{77}X_{78}TX_{79}TX_{80}DTSX_{81}X_{82}TAYX_{83}ELX_{84}SLRSEDTAVYYCAX_{85}$ (서열식별번호: 149)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR3; $WGQGTX_{57}VTVSS$ (서열식별번호: 126)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR4를 포함하며, 여기서 X_{57}은 상기 정의된 바와 같고, X_{71}은 Q 또는 E이고; X_{72}는 V 또는 L이고; X_{73}은 N 또는 T이고; X_{74}는 R 또는 K이고; X_{75}는 R 또는 G이고; X_{76}은 M 또는 I이고; X_{77}은 R 또는 K이고; X_{78}은 V 또는 A이고; X_{79}는 I 또는 L이고; X_{80}은 R 또는 A이고; X_{81}은 A 또는 S이고; X_{82}는 S 또는 N이고; X_{83}은 M 또는 L이고; X_{84}는 S 또는 I이고; X_{85}는 R 또는 N이다.

[0219] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인간화 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 $X_{86}IVLTQSPATLX_{87}X_{88}SPGERX_{89}TX_{90}X_{91}C$ (서열식별번호: 150)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR1; $WYQQKPGQX_{10}PX_{11}LLIY$ (서열식별번호: 81)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR2; $GX_{92}PX_{93}RFSGSGSGTX_{94}X_{95}TLTISSX_{96}EPEDFAVYYC$ (서열식별번호: 148)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR3; 및 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 83)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR4를 포함하며, 여기서 X_{10} 및 X_{11}은 상기 정의된 바와 같고, X_{86}은 E 또는 Q이고; X_{87}은 S 또는 T이고; X_{88}은 L 또는 A이고; X_{89}는 A 또는 V이고; X_{90}은 L 또는 I이고; X_{91}은 S 또는 T이고; X_{92}는 I 또는 V이고; X_{93}은 A 또는 T이고; X_{94}는 D 또는 S이고; X_{95}는 F 또는 Y이고; X_{96}은 L 또는 M이다.

[0220] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인간화 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 84-86, 115, 119-120, 및 131로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 HFR1, 서열식별번호: 87-90, 및 121-123의 서열을 포함하는 중쇄 HFR2, 서열식별번호: 91-97, 116-117, 및 124-125로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 HFR3, 및 서열식별번호: 79 및 118로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 HFR4; 및/또는 서열식별번호: 98-103 및 127-129로 이루어진 군으로부터의 서열을 포함하는 경쇄 LFR1, 서열식별번호: 104, 105 및 130으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 LFR2, 서열식별번호: 106-110 및 132-133으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 LFR3, 및 서열식별번호: 83 및 153으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 LFR4를 포함한다.

[0221] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인간화 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 hu14.VH_1 (서열식별번호: 68), hu14.VH_2 (서열식별번호: 70), hu14.VH_3 (서열식별번호: 72), hu14.VH_4 (서열식별번호: 74), hu23.VH_1 (서열식별번호: 60), hu23.VH_2 (서열식별번호: 62), hu23.VH_3 (서열식별번호: 64), hu23.VH_4 (서열식별번호: 66), hu23.VH_5 (서열식별번호: 140), hu23.VH_6 (서열식별번호: 141), hu23.VH_7 (서열식별번호: 142), hu23.201H (서열식별번호: 146), hu23.207H (서열식별번호: 147) 및 hu23.211H (서열식별번호: 39)로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역에 함유된 HFR1, HFR2, HFR3 및/또는 HFR4 서열을 포함한다.

[0222] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인간화 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 hu14.VL_1 (서열식별번호: 69), hu14.VL_2 (서열식별번호: 71), hu14.VL_3 (서열식별번호: 73), hu14.VL_4 (서열식별번호: 75), hu23.VL_1 (서열식별번호: 61), hu23.VL_2 (서열식별번호: 63), hu23.VL_3 (서열식별번호: 65), hu23.VL_4 (서열식별번호: 67), hu23.VL_5 (서열식별번호: 143), hu23.VL_6 (서열식별번호: 144), hu23.VL_7 (서열식별번호: 145), hu23.201L (서열식별번호: 111), hu23.203L (서열식별번호: 112), 및 hu23.211L (서열식별번호: 63)로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역에 함유된 LFR1, LFR2, LFR3, 및/또는 LFR4 서열을 포함한다.

[0223] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 39, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 140, 141, 142, 146, 147로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인 서열; 및/또는 서열식별번호: 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 111, 112, 143, 144 및 145로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0224] 본 개시내용의 키메라 항체 모이어티 c14의 예시적인 인간화 항체 모이어티는 하기를 포함한다:

[0225] 1) hu14.VH_1의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 68) 및 hu14.VL_1의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 69)을 포함하는 "hu14.H1L1";

[0226] 2) hu14.VH_2의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 70) 및 hu14.VL_1의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 69)을 포함하는 "hu14.H2L1";

[0227] 3) hu14.VH_3의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 72) 및 hu14.VL_1의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 69)을 포함하는 "hu14.H3L1";

[0228] 4) hu14.VH_4의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 74) 및 hu14.VL_1의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 69)을 포함하는 "hu14.H4L1";

[0229] 5) hu14.VH_1의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 68) 및 hu14.VL_2의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 71)을 포함하는 "hu14.H1L2";

[0230] 6) hu14.VH_2의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 70) 및 hu14.VL_2의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 71)을 포함하는 "hu14.H2L2";

[0231] 7) hu14.VH_3의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 72) 및 hu14.VL_2의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 71)을 포함하는 "hu14.H3L2";

[0232] 8) hu14.VH_4의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 74) 및 hu14.VL_2의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 71)을 포함하는 "hu14.H4L2";

[0233] 9) hu14.VH_1의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 68) 및 hu14.VL_3의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 73)을 포함하는 "hu14.H1L3";

[0234] 10) hu14.VH_2의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 70) 및 hu14.VL_3의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 73)을 포함하는 "hu14.H2L3";

[0235] 11) hu14.VH_3의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 72) 및 hu14.VL_3의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 73)을 포함하는 "hu14.H3L3";

[0236] 12) hu14.VH_4의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 74) 및 hu14.VL_3의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 73)을 포함하는 "hu14.H4L3";

[0237] 13) hu14.VH_1의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 68) 및 hu14.VL_4의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 75)을 포함하는 "hu14.H1L4";

[0238] 14) hu14.VH_2의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 70) 및 hu14.VL_4의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 75)을 포함하는 "hu14.H2L4";

[0239] 15) hu14.VH_3의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 72) 및 hu14.VL_4의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 75)을 포함하는 "hu14.H3L4";

[0240] 16) hu14.VH_4의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 74) 및 hu14.VL_4의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 75)을 포함하는 "hu14.H4L4".

[0241] 본 개시내용의 키메라 항체 모이어티 c23의 예시적인 인간화 항체 모이어티는 하기를 포함한다:

[0242] 1) hu23.VH_1의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 60) 및 hu23.VL_1의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 61)을 포함하는 "hu23.H1L1";

[0243] 2) hu23.VH_2의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 62) 및 hu23.VL_1의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 61)을 포함하는 "hu23.H2L1";

[0244] 3) hu23.VH_3의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 64) 및 hu23.VL_1의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 61)을 포함하는 "hu23.H3L1";

[0245] 4) hu23.VH_4의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 66) 및 hu23.VL_1의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 61)을 포함하는 "hu23.H4L1";

[0246] 5) hu23.VH_1의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 60) 및 hu23.VL_2의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 63)을 포함하는 "hu23.H1L2";

[0247] 6) hu23.VH_2의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 62) 및 hu23.VL_2의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 63)을 포함하는 "hu23.H2L2";

[0248] 7) hu23.VH_3의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 64) 및 hu23.VL_2의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 63)을 포함

하는 "hu23.H3L2";

[0249] 8) hu23.VH_4의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 66) 및 hu23.VL_2의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 63)을 포함하는 "hu23.H4L2";

[0250] 9) hu23.VH_1의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 60) 및 hu23.VL_3의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 65)을 포함하는 "hu23.H1L3";

[0251] 10) hu23.VH_2의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 62) 및 hu23.VL_3의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 65)을 포함하는 "hu23.H2L3";

[0252] 11) hu23.VH_3의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 64) 및 hu23.VL_3의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 65)을 포함하는 "hu23.H3L3";

[0253] 12) hu23.VH_4의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 66) 및 hu23.VL_3의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 65)을 포함하는 "hu23.H4L3";

[0254] 13) hu23.VH_1의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 60) 및 hu23.VL_4의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 67)을 포함하는 "hu23.H1L4";

[0255] 14) hu23.VH_2의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 62) 및 hu23.VL_4의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 67)을 포함하는 "hu23.H2L4";

[0256] 15) hu23.VH_3의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 64) 및 hu23.VL_4의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 67)을 포함하는 "hu23.H3L4";

[0257] 16) hu23.VH_4의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 66) 및 hu23.VL_4의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 67)을 포함하는 "hu23.H4L4";

[0258] 17) hu23.VH_5의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 140) 및 hu23.VL_1의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 61)을 포함하는 "hu23.H5L1";

[0259] 18) hu23.VH_6의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 141) 및 hu23.VL_1의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 61)을 포함하는 "hu23.H6L1";

[0260] 19) hu23.VH_7의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 142) 및 hu23.VL_1의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 61)을 포함하는 "hu23.H7L1";

[0261] 20) hu23.VH_1의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 60) 및 hu23.VL_5의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 143)을 포함하는 "hu23.H1L5";

[0262] 21) hu23.VH_5의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 140) 및 hu23.VL_5의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 143)을 포함하는 "hu23.H5L5";

[0263] 22) hu23.VH_6의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 141) 및 hu23.VL_5의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 143)을 포함하는 "hu23.H6L5";

[0264] 23) hu23.VH_7의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 142) 및 hu23.VL_5의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 143)을 포함하는 "hu23.H7L5";

[0265] 24) hu23.VH_1의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 60) 및 hu23.VL_6의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 144)을 포함하는 "hu23.H1L6";

[0266] 25) hu23.VH_5의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 140) 및 hu23.VL_6의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 144)을 포함하는 "hu23.H5L6";

[0267] 26) hu23.VH_6의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 141) 및 hu23.VL_6의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 144)을 포함하는 "hu23.H6L6";

[0268] 27) hu23.VH_7의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 142) 및 hu23.VL_6의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 144)을 포함하는 "hu23.H7L6";

[0269] 28) hu23.VH_1의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 60) 및 hu23.VL_7의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 145)을

포함하는 "hu23.H1L7";

[0270] 29) hu23.VH_5의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 140) 및 hu23.VL_7의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 145)을 포함하는 "hu23.H5L7";

[0271] 30) hu23.VH_6의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 141) 및 hu23.VL_7의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 145)을 포함하는 "hu23.H6L7";

[0272] 31) hu23.VH_7의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 142) 및 hu23.VL_7의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 145)을 포함하는 "hu23.H7L7";

[0273] 32) hu23.201H의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 146) 및 hu23.201L의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 111)을 포함하는 "hu23.201";

[0274] 33) hu23.201H의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 146) 및 hu23.203L의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 112)을 포함하는 "hu23.203";

[0275] 34) hu23.207H의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 147) 및 hu23.201L의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 111)을 포함하는 "hu23.207";

[0276] 35) hu23.211H의 중쇄 가변 영역 (서열식별번호: 39) 및 hu23.211L의 경쇄 가변 영역 (서열식별번호: 63)을 포함하는 "hu23.211".

[0277] 이들 예시적인 인간화 항-CD39 항체 모이어티는 CD39에 대한 특이적 결합 능력 또는 친화도를 보유하였고, 그 측면에서 모 마우스 항체 모이어티 mAb14 또는 mAb23에 적어도 필적하거나 또는 그보다 훨씬 더 우수하다.

[0278] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 항원-결합 단편은 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부분 및/또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부분을 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 본원에 제공된 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부분으로 이루어진 단일 도메인 항체이다. 이러한 단일 도메인 항체에 대한 보다 많은 정보가 관련 기술분야에서 이용가능하다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,248,516 참조).

[0279] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 이뮤노글로불린 (Ig) 불변 영역을 추가로 포함하고, 이는 임의로 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 CH1, 힌지 및/또는 CH2-CH3 영역 (또는 임의로 CH2-CH3-CH4 영역)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 또는 IgM의 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 Cκ 또는 Cλ를 포함한다. 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편의 불변 영역은 야생형 불변 영역 서열과 동일하거나 또는 1개 이상의 돌연변이에서 상이할 수 있다.

[0280] 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 Fc 영역을 포함한다. Fc 영역은 항체의 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC) 및 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 매개하는 것으로 공지되어 있다. 상이한 Ig 이소형의 Fc 영역은 이펙터 기능을 유도하는 상이한 능력을 갖는다. 예를 들어, IgG1 및 IgG3의 Fc 영역은 IgG2 및 IgG4의 것보다 더 효과적으로 ADCC 및 CDC 둘 다를 유도하는 것으로 인식되었다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 ADCC 또는 CDC를 유도할 수 있는 IgG1 또는 IgG3 이소형의 Fc 영역; 또는 대안적으로, 감소 또는 고갈된 이펙터 기능을 갖는 IgG4 또는 IgG2 이소형의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG1로부터 유래된 Fc 영역은 감소된 이펙터 기능을 갖는다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG1로부터 유래된 Fc 영역은 L234A 및/또는 L235A 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 야생형 인간 IgG4 Fc 영역 또는 다른 야생형 인간 IgG4 대립유전자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 S228P 돌연변이 및/또는 L235E 돌연변이, 및/또는 F234A 및 L235A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 IgG4로부터 유래된 Fc 영역은 S228P 돌연변이 및/또는 F234A 및 L235A 돌연변이를 포함한다.

[0281] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 진단 및/또는 치료 용도를 제공하기에 충분한 인간 CD39에 대한 특이적 결합 친화도를 갖는다.

[0282] 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 인간화

항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 이중특이적 항체, 다중-특이적 항체, 표지된 항체, 2가 항체, 항-이디오타입 항체 또는 융합 단백질일 수 있다. 재조합 항체는 재조합 방법을 사용하여 동물에서가 아니라 시험관내에서 제조된 항체이다.

[0283] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 CD39에의 결합에 대해 본원에 제공된 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편과 경쟁하는 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 43의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 52의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 모이어티와 인간 CD39에의 결합에 대해 경쟁하는 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 44의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 53의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 모이어티와 인간 CD39에의 결합에 대해 경쟁하는 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 45의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 54의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 모이어티와 인간 CD39에의 결합에 대해 경쟁하거나, 또는 서열식별번호: 47의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 56의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 모이어티와 인간 CD39에의 결합에 대해 경쟁하는 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0284] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 CD39의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서 에피토프는 Q96, N99, E143, R147, R138, M139, E142, K5, E100, D107, V81, E82, R111 및 V115로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기를 포함한다.

[0285] 일부 실시양태에서, 에피토프는 Q96, N99, E143 및 R147로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 잔기 Q96, N99, E143 및 R147 모두를 포함한다.

[0286] 일부 실시양태에서, 에피토프는 R138, M139 및 E142로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 잔기 R138, M139, 및 E142 모두를 포함한다.

[0287] 일부 실시양태에서, 에피토프는 K5, E100 및 D107로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 잔기 K5, E100 및 D107 모두를 포함한다.

[0288] 일부 실시양태에서, 에피토프는 V81, E82, R111 및 V115로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 잔기 V81, E82, R111 및 V115 모두를 포함한다.

[0289] 일부 실시양태에서, CD39는 인간 CD39이다. 일부 실시양태에서, CD39는 서열식별번호: 162의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD39이다.

[0290] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 항체 9-8B, 항체 T895, 및 항체 I394 중 어느 것도 아니다.

[0291] 본원에 사용된 "9-8B"는 서열식별번호: 46의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 48의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0292] 본원에 사용된 "T895"는 서열식별번호: 55의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 57의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0293] 본원에 사용된 "I394"는 서열식별번호: 113의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 114의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0294] 항체 변이체

[0295] 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 또한 본원에 제공된 항체 서열의 다양한 변이체를 포괄한다.

[0296] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 상기 표 1에 제공된 1개 이상의 CDR 서열, 상기 표 4, 5, 8 및 9에 제공된 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 1개 이상의 비-CDR 서열, 및/또는 불변 영역 (예를 들어 Fc 영역)에서 1개 이상의 변형 또는 치환을 포함한다. 이러한 변이체는 그의 모 항체의 CD39에 대한 결합 특이성을 보유하지만, 변형(들) 또는 치환(들)에 의해 부여되는 1개 이상의 바람직한 특성을 갖는다. 예를 들어, 항체 변이체는 개선된 항원-결합 친화도, 개선된 글리코실화 패턴, 감소된 글리코실화 위험, 감소된 탈아미노화, 감소된 또는 고갈된 이펙터 기능(들), 개선된 FcRn 수용체 결합, 증가된 약동학적 반감기, pH 감수성, 및/또는 접합에 대한 상용성 (예를 들어 1개 이상의 도입된 시스테인 잔기)을 가질 수 있다.

[0297] 모 항체 서열은 변형 또는 치환될 적합한 또는 바람직한 잔기를 확인하기 위해, 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"을 사용하여 스크리닝될 수 있다 (예를 들어 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085] 참조). 간략하게, 표적 잔기 (예를 들어 하전된 잔기, 예컨대 Arg, Asp, His, Lys 및 Glu)가 확인되고 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해 대체될 수 있으며, 변형된 항체가 생산되고 관심 특성에 대해 스크리닝될 수 있다. 특정한 아미노산 위치에서의 치환이 관심 기능적 변화를 나타내는 경우에, 위치는 변형 또는 치환을 위한 잠재적 잔기로서 확인될 수 있다. 잠재적 잔기는 상이한 유형의 잔기 (예를 들어 시스테인 잔기, 양으로 하전된 잔기 등)로 치환시킴으로써 추가로 평가될 수 있다.

[0298] 친화성 변이체

[0299] 항체의 친화성 변이체는 상기 표 1에 제공된 1개 이상의 CDR 서열, 상기 표 4, 5, 8, 및 9에 제공된 1개 이상의 FR 서열, 또는 상기 표 2, 3, 6 및 7에 제공된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열에 변형 또는 치환을 함유할 수 있다. FR 서열은 상기 표 1의 CDR 서열 및 상기 표 2, 3, 6 및 7의 가변 영역 서열에 기초하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 확인될 수 있으며, 이는 CDR 영역이 가변 영역에서 2개의 FR 영역에 의해 플랭킹된다는 것이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있기 때문이다. 친화성 변이체는 모 항체의 CD39에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하거나 또는 심지어 모 항체에 비해 개선된 CD39 특이적 결합 친화도를 갖는다. 특정 실시양태에서, CDR 서열, FR 서열 또는 가변 영역 서열 내의 치환(들) 중 적어도 1개 (또는 모두)는 보존적 치환을 포함한다.

[0300] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 표 1에 제공된 CDR 서열, 및 상기 표 2, 3, 6 및 7에 제공된 가변 영역 서열에서, 1개 이상의 아미노산 잔기가 치환될 수 있지만, 생성된 항체 또는 항원-결합 단편은 CD39에 대한 결합 친화도 또는 결합 능력을 보유하거나, 또는 심지어 개선된 결합 친화도 또는 능력을 갖는다는 것을 이해할 것이다. 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법을 사용하여 이러한 목적을 달성할 수 있다. 예를 들어, 항체 변이체 (예컨대 Fab 또는 scFv 변이체)의 라이브러리를 생성하고, 파지 디스플레이 기술에 의해 발현시킨 다음, 인간 CD39에 대한 결합 친화도에 대해 스크리닝할 수 있다. 또 다른 예로, 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 인간 CD39에 대한 항체의 결합을 실질적으로 시뮬레이션하고, 결합 계면을 형성하는 항체 상의 아미노산 잔기를 확인할 수 있다. 이러한 잔기는 결합 친화도의 감소를 방지하도록 치환 시에 피할 수 있거나 또는 보다 강한 결합을 제공하기 위해 치환의 표적으로 할 수 있다.

[0301] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 CDR 서열 중 1개 이상 및/또는 FR 서열 중 1개 이상에서 1개 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 친화성 변이체는 CDR 서열 및/또는 FR 서열에 총 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 치환을 포함한다.

[0302] 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 상기 표 1에 열거된 것 (또는 것들)에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖지만 CD39에 대한 특이적 결합 친화도를 그의 모 항체와 유사하거나 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준으로 보유하는 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함한다.

[0303] 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 상기 표 2, 3, 6 및 7에 열거된 것 (또는 것들)에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖지만 CD39에 대한 특이적 결합 친화도를 그의 모 항체와 유사하거나 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준으로 보유하는 1개 이상의 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 표 2, 3, 6 및 7에 열거된 가변 영역 서열에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (예를 들어 FR에서) 발생한다.

[0304] 글리코실화 변이체

[0305] 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 또한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 글리코실화 정도를 증가 또는 감소시키기 위해 수득될 수 있는 글리코실화 변이체를 포괄한다.

[0306] 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원 결합 단편은 글리코실화 부위를 도입하거나 제거하는 1개 이상의 변형을 포함할 수 있다. 글리코실화 부위는 탄수화물 모이어티 (예를 들어 올리고사카라이드 구조)가 부착될 수 있는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기이다. 항체의 글리코실화는 전형적으로, N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기, 예를 들어 트리펩티드 서열, 예컨대 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레

오닌 (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)에서의 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 지칭한다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착된 것을 지칭한다. 천연 글리코실화 부위의 제거는, 예를 들어 서열 중에 존재하는 상기 기재된 트리펩티드 서열 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우) 또는 세린 또는 트레오닌 잔기 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우) 중 1개가 치환되도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성될 수 있다. 새로운 글리코실화 부위는 이러한 트리펩티드 서열 또는 세린 또는 트레오닌 잔기를 도입함으로써 유사한 방식으로 생성될 수 있다.

[0307] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 항원-결합 단편은 1개 이상의 탈아미드화 부위를 제거하기 위해 N55, G56 및 N297로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 1개 이상의 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 항원-결합 단편은 N55에서의 돌연변이 (예를 들어, N55G, N55S 또는 N55Q), 및/또는 G56에서의 돌연변이 (예를 들어, G56A, G56D), 및/또는 N297에서의 돌연변이 (예를 들어, N297A, N297Q, 또는 N297G)를 포함한다. 이들 돌연변이를 시험하였고, 이는 본원에 제공된 항체 모이어티의 결합 친화도에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다.

[0308] 시스테인-조작된 변이체

[0309] 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 또한 1개 이상의 도입된 유리 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 시스테인-조작된 변이체를 포괄한다.

[0310] 유리 시스테인 잔기는 디술피드 가교의 일부가 아닌 것이다. 시스테인 조작된 변이체는 조작된 시스테인의 부위에서, 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통해, 예를 들어 특히 세포독성 및/또는 영상화 화합물, 표지 또는 방사성동위원소와의 접합에 유용하다. 유리 시스테인 잔기를 도입하기 위해 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 조작하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 WO2006/034488을 참조한다.

[0311] Fc 변이체

[0312] 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 또한, 예를 들어 변경된 이펙터 기능, 예컨대 ADCC 및 CDC를 제공하기 위해 Fc 영역 및/또는 힌지 영역에서 1개 이상의 아미노산 잔기 변형 또는 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포괄한다. 항체 조작에 의해 ADCC 활성을 변경시키는 방법은 관련 기술분야에 기재되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Shields RL. et al., J Biol Chem. 2001. 276(9): 6591-604; Idusogie EE. et al., J Immunol. 2000.164(8):4178-84; Steurer W. et al., J Immunol. 1995, 155(3): 1165- 74; Idusogie EE. et al., J Immunol. 2001, 166(4): 2571-5; Lazar GA. et al., PNAS, 2006, 103(11): 4005-4010; Ryan MC. et al., Mol. Cancer Ther., 2007, 6: 3009-3018; Richards JO,. et al., Mol Cancer Ther. 2008, 7(8): 2517-27; Shields R. L. et al., J. Biol. Chem, 2002, 277: 26733-26740; Shinkawa T. et al., J. Biol. Chem, 2003, 278: 3466-3473]을 참조한다.

[0313] 본원에 제공된 항체 모이어티 또는 항원-결합 단편의 CDC 활성은 또한, 예를 들어 C1q 결합 및/또는 CDC를 개선 또는 감소시킴으로써 변경될 수 있다 (예를 들어, Fe 영역 변이체의 다른 예에 관한 WO99/51642; 문헌 [Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO94/29351 참조). Fc 영역의 아미노산 잔기 329, 331 및 322로부터 선택된 1개 이상의 아미노산이 상이한 아미노산 잔기로 대체되어 C1q 결합을 변경시키고/거나 보체 의존적 세포독성 (CDC)을 감소 또는 무효화할 수 있다 (미국 특허 번호 6,194,551 (Idusogie et al.) 참조). 1개 이상의 아미노산 치환(들)이 또한 도입되어 보체를 고정시키는 항체의 능력을 변경시킬 수 있다 (PCT 공개 WO94/29351 (Bodmer et al.) 참조).

[0314] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 감소된 이펙터 기능을 갖고, 234, 235, 237, 238, 268, 297, 309, 330 및 331로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 IgG1 내에 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG1 이소형의 것이고, N297A, N297Q, N297G, L235E, L234A, L235A, L234F, L235E, P331S 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG1 이소형의 것이고, L234A 및 L235A 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG2 이소형의 것이고, H268Q, V309L, A330S, P331S, V234A, G237A, P238S, H268A 및 그의 임의의 조합 (예를 들어 H268Q/V309L/A330S/P331S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티

또는 그의 항원-결합 단편은 IgG4 이소형의 것이고, S228P, N297A, N297Q, N297G, L235E, F234A, L235A 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG2/IgG4 교차 이소형의 것이다. IgG2/IgG4 교차 이소형의 예는 문헌 [Rother RP et al., Nat Biotechnol 25:1256-1264 (2007)]에 기재되어 있다.

[0315] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 그의 항원-결합 단편은 IgG4 이소형의 것이고, 228, 234 및 235 중 1개 이상의 지점에서 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 및 항원-결합 단편은 IgG4 이소형의 것이고, Fc 영역에서 S228P 돌연변이 및/또는 L235E 돌연변이 및/또는 F234A 및 L235A 돌연변이를 포함한다.

[0316] 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 pH-의존성 결합을 개선시키는 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 이러한 변이체는 연장된 약동학적 반감기를 가질 수 있는데, 이는 그것이 리소솜에서의 분해를 피한 다음 전위되어 세포 밖으로 방출되도록 하는 산성 pH에서 FcRn에 결합하기 때문이다. FcRn과의 결합 친화도를 개선시키기 위해 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 조작하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Vaughn, D. et al., Structure, 6(1): 63-73, 1998; Kontermann, R. et al., Antibody Engineering, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK, published by Springer, 2010; Yeung, Y. et al., Cancer Research, 70: 3269-3277 (2010); and Hinton, P. et al., J. Immunology, 176:346-356 (2006)]을 참조한다.

[0317] 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 이종이량체화를 용이하게 하고/거나 촉진하기 위해 Fc 영역의 계면 내에 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 이들 변형은 제1 Fc 폴리펩티드 내로의 돌출부 및 제2 Fc 폴리펩티드 내로의 공동의 도입을 포함하며, 여기서 돌출부는 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 상호작용을 촉진하여 이종이량체 또는 복합체를 형성하도록 공동 내에 위치될 수 있다. 이들 변형을 갖는 항체를 생성하는 방법은 예를 들어 미국 특허 번호 5,731,168에 기재된 바와 같이 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0318] 항원-결합 단편

[0319] 또한 항-CD39 항원-결합 단편이 본원에 제공된다. 다양한 유형의 항원-결합 단편이 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 CDR이 상기 표 1에 제시되고 가변 서열이 표 2, 3, 6 및 7에 제시된 예시적인 항체 모이어티, 및 그의 상이한 변이체 (예컨대 친화성 변이체, 글리코실화 변이체, Fc 변이체, 시스테인-조작된 변이체 등)를 포함한 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티에 기초하여 개발될 수 있다.

[0320] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항원-결합 단편은 디아바디, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv 단편, 디술피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), $(dsFv)_2$, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디술피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), 단일-쇄 항체 분자 (scFv), scFv 이량체 (2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체이다.

[0321] 다양한 기술이 이러한 항원-결합 단편의 생산을 위해 사용될 수 있다. 예시적인 방법은 무손상 항체의 효소적 소화 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조), 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이(*E. Coli*)에 의한 재조합 발현 (예를 들어, Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편의 경우), 상기 논의된 바와 같은 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 스크리닝 (예를 들어, ScFv의 경우), 및 $F(ab')_2$ 단편을 형성하기 위한 2개의 Fab'-SH 단편의 화학적 커플링 (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))을 포함한다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0322] 특정 실시양태에서, 항원-결합 단편은 scFv이다. scFv의 생성은 예를 들어 WO93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 5,587,458에 기재되어 있다. ScFv는 이펙터 단백질에 아미노 또는 카르복실 말단에서 융합되어 융합 단백질을 제공할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck] 참조).

[0323] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 2가, 4가, 6가 또는 다가이다. 2가 초과의 임의의 분자는 예를 들어 3가, 4가, 6가 등을 포괄하는 다가로 간주된다.

[0324] 2가 분자는 2개의 결합 부위가 동일한 항원 또는 동일한 에피토프에 대한 결합에 대해 둘 다 특이적인 경우에 단일특이적일 수 있다. 이는, 특정 실시양태에서, 1가 대응물보다 항원 또는 에피토프에 대한 더 강한 결합을

제공한다. 유사하게, 다가 분자는 또한 단일특이적일 수 있다. 특정 실시양태에서, 2가 또는 다가 항원-결합 모이어티에서, 결합 부위의 제1 가수 및 결합 부위의 제2 가수는 구조적으로 동일하거나 (즉, 동일한 서열을 가짐), 또는 구조적으로 상이하다 (즉, 동일한 특이성을 갖지만 상이한 서열을 가짐).

[0325] 2개의 결합 부위가 상이한 항원 또는 에피토프에 대해 특이적인 경우, 2가는 또한 이중특이적일 수 있다. 이는 또한 다가 분자에 적용된다. 예를 들어, 3가 분자는 2개의 결합 부위가 제1 항원 (또는 에피토프)에 단일특이적이고 제3 결합 부위가 제2 항원 (또는 에피토프)에 특이적인 경우에 이중특이적일 수 있다.

[0326] 이중특이적 항체

[0327] 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 이중특이적이다. 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 상기 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원 결합 단편과 상이한 결합 특이성을 갖는 제2 기능적 모이어티에 추가로 연결된다.

[0328] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 CD39 이외의 제2 항원, 또는 CD39 상의 제2 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제2 항원은 TGF베타, CD73, PD1, PDL1, 4-1BB, CTLA4, TIGIT, GITA, VISTA, TIGIT, B7-H3, B7-H4, B7-H5, CD112R, Siglec-15, LAG3, SIRPα, CD47 및 TIM-3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0329] 접합체

[0330] 일부 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 1개 이상의 접합체 모이어티를 추가로 포함한다. 접합체 모이어티는 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편에 연결될 수 있다. 접합체 모이어티는 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편에 부착될 수 있는 모이어티이다. 다양한 접합체 모이어티가 본원에 제공된 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편에 연결될 수 있는 것으로 고려된다 (예를 들어, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989) 참조). 이들 접합체 모이어티는 다른 방법들 중에서 공유 결합, 친화성 결합, 층간 삽입, 배위 결합, 복합체화, 회합, 블렌딩 또는 부가에 의해 항체 모이어티 또는 항원-결합 단편에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 링커를 통해 1종 이상의 접합체에 연결될 수 있다.

[0331] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 1개 이상의 접합체 모이어티에의 결합에 이용될 수 있는 에피토프 결합 부분 외부의 특이적 부위를 함유하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 이러한 부위는 1개 이상의 반응성 아미노산 잔기, 예컨대 예를 들어 시스테인 또는 히스티딘 잔기를 포함하여, 접합체 모이어티와의 공유 연결을 용이하게 할 수 있다.

[0332] 특정 실시양태에서, 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 접합체 모이어티에 간접적으로, 또는 또 다른 접합체 모이어티를 통해 연결될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 비오틴에 접합된 다음, 아비딘에 접합된 제2 접합체에 간접적으로 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합체 모이어티는 클리어런스-변형제 (예를 들어 반감기를 연장하는 중합체, 예컨대 PEG), 화학요법제, 독소, 방사성 동위원소, 란타나이드, 검출가능한 표지 (예를 들어 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지), DNA-알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜불린-결합제, 정제 모이어티 또는 다른 항암 약물을 포함한다.

[0333] "독소"는 세포에 유해하거나 세포를 손상 또는 사멸시킬 수 있는 임의의 작용제일 수 있다. 독소의 예는 비제한적으로 탁솔, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 브로민화에티듐, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, MMAE, MMAF, DM1, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신 및 그의 유사체, 항대사물 (예를 들어 메토트렉세이트, 6-메르캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예를 들어 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린 (예를 들어 다우노루비신 (이전에 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들어 닥티노마이신 (이전에 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)), 항유사분열제 (예를 들어 빈크리스틴 및 빈블라스틴), 토포이소머라제 억제제, 및 튜불린-결합제를 포함한다.

[0334] 검출가능한 표지의 예는 형광 표지 (예를 들어 플루오레세인, 로다민, 단실, 피코에리트린, 또는 텍사스 레드), 효소-기질 표지 (예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 루시페라제, 글루코아밀라제, 리소자

임, 사카라이드 옥시다제 또는 β-D-갈락토시다제), 방사성동위원소 (예를 들어 ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, ^{3}H, ^{111}In, ^{112}In, ^{14}C, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{86}Y, ^{88}Y, ^{90}Y, ^{177}Lu, ^{211}At, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, 및 ^{32}P, 다른 란타나이드), 발광 표지, 발색단 모이어티, 디곡시게닌, 비오틴/아비딘, DNA 분자 또는 검출용 금을 포함할 수 있다.

[0335] 특정 실시양태에서, 접합체 모이어티는 항체의 반감기를 증가시키는 것을 돕는 클리어런스-변형제일 수 있다. 예시적인 예는 수용성 중합체, 예컨대 PEG, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체 등을 포함한다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있고, 1개 초과의 중합체가 부착되는 경우에, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다.

[0336] 특정 실시양태에서, 접합체 모이어티는 정제 모이어티, 예컨대 자기 비드일 수 있다.

[0337] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39 항체 모이어티 또는 그의 항원-결합 단편은 접합체를 위한 베이스로서 사용된다.

[0338] 폴리뉴클레오티드 및 재조합 방법

[0339] 본 개시내용은 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본원에 사용된 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 및 그의 중합체를 지칭한다. 달리 나타내지 않는 한, 특정한 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 명시적으로 나타낸 서열뿐만 아니라 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어 축중성 코돈 치환), 대립유전자, 오르토로그, SNP 및 상보적 서열을 함축적으로 포괄한다. 구체적으로, 축중성 코돈 치환은 1개 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다 (문헌 [Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 및 Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)]).

[0340] 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써), 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA가 용이하게 단리되고 서열분석된다. 코딩 DNA는 또한 합성 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0341] 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드는 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해, 관련 기술분야에 공지된 재조합 기술을 사용하여 벡터 내로 삽입될 수 있다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 (예를 들어 SV40, CMV, EF-1α), 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0342] 본 개시내용은 본원에 제공된 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드는 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터 (예를 들어 SV40, CMV, EF-1α), 및 적어도 하나의 선택 마커를 코딩한다. 벡터의 예는 레트로바이러스 (렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스 (예를 들어 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바큘로바이러스, 유두종바이러스, 파포바바이러스 (예를 들어 SV40), 람다 파지 및 M13 파지, 플라스미드 pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0343] 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터는 클로닝 또는 유전자 발현을 위해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 본원에서 벡터에 DNA를 클로닝하거나 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵세포는 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세아에(*Enterobacteriaceae*), 예컨대 에스케리키아(*Escherichia*), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 및 시겔라(*Shigella*), 뿐만 아니라 바실루스(*Bacilli*), 예컨대 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*), 및 스트렙토미세

스(*Streptomyces*)를 포함한다.

[0344] 원핵생물 이외에도, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모가 항-CD39/TGFβ 트랩을 코딩하는 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미세스 세레비지아에 (*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 통상적인 제빵 효모가 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 수많은 다른 속, 종 및 균주, 예컨대 쉬조사카로미세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로미세스(*Kluyveromyces*) 숙주, 예컨대 예를 들어 케이. 락티스(*K. lactis*), 케이. 프라길리스(*K. fragilis*, ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*, ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(*K. wickeramii*, ATCC 24,178), 케이. 왈티이(K. waltii, ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸(*K. drosophilarum*, ATCC 36,906), 케이. 써모톨레란스(*K. thermotolerans*), 및 케이. 마르시아누스(*K. marxianus*); 야로위아(*yarrowia*, EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*, EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리코더마 레에시아(*Trichoderma reesia*, EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*); 슈완니오미세스(*Schwanniomyces*), 예컨대 슈완니오미세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상 진균, 예컨대 예를 들어 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 숙주, 예컨대 에이. 니둘란스(*A. nidulans*) 및 에이. 니거(*A. niger*)가 흔히 입수가능하며 본원에서 유용하다.

[0345] 본원에 제공된 글리코실화 항체 또는 그의 항원-단편의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 수많은 바큘로바이러스 균주 및 변이체, 및 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*, 모충), 아에데스 아에깁티(*Aedes aegypti*, 모기), 아에데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*, 모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*, 초파리), 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터의 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 확인된 바 있다. 다양한 형질감염용 바이러스 균주, 예를 들어 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하고, 이러한 바이러스들은, 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해, 본 발명에 따라 본원에서 바이러스로 사용될 수 있다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 이용될 수 있다.

[0346] 그러나, 척추동물 세포가 가장 흥미롭고, 배양물 (조직 배양물)에서의 척추동물 세포의 증식은 통상적인 절차가 되어 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293 또는 현탁 배양에서의 성장을 위해 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 (sertoli) 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트(buffalo rat) 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2)이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 포유동물 배양 세포주, 예컨대 CHO, BHK, NS0, 293 및 그의 유도체이다.

[0347] 숙주 세포는 항-CD39/TGFβ 트랩 생산을 위해 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터의 유도, 형질전환체의 선택 또는 목적하는 서열을 코딩하는 유전자의 증폭에 적절하도록 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다. 또 다른 실시양태에서, 항-CD39/TGFβ 트랩은 관련 기술분야에 공지된 상동 재조합에 의해 생산될 수 있다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩을 생산할 수 있다.

[0348] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 벡터가 발현되는 조건 하에 본원에 제공된 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩을 발현시키는 방법을 제공한다. 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩을 생산하는 데 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 배지, 예컨대 햄 (Ham) F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM, 시그마), RPMI-1640 (시그마), 및 둘베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM, 시그마)가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 임의의 배지가 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 임의의 이들 배지는 필요에 따라, 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대, HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대, 아데노신 및 티

미딘), 항생제 (예컨대, 겐타마이신(GENTAMYCIN)™ 약물), 미량 원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 등가 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충물이 또한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0349] 재조합 기술을 사용하는 경우, 항-CD39/TGFβ 트랩은 세포 내에서 생산되거나, 주변세포질 공간 내에서 생산되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항-CD39/TGFβ 트랩이 세포내에서 생산되는 경우, 제1 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 단편인 미립자 파편을 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]은 이. 콜라이의 주변세포질 공간으로 분비되는 항체를 단리하는 절차를 기재한다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸술포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐 해동시켰다. 세포 파편은 원심분리에 의해 제거될 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 일반적으로 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 상업적으로 입수가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 먼저 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예컨대 PMSF를 임의의 이전 단계에 포함시킬 수 있고, 우발적 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

[0350] 세포로부터 제조된 항-CD39/TGFβ 트랩은, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, DEAE-셀룰로스 이온 교환 크로마토그래피, 황산암모늄 침전, 염석 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있으며, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다.

[0351] 특정 실시양태에서, 고체 상에 고정화된 단백질 A가 항-CD39/TGFβ 트랩의 면역친화성 정제에 사용된다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A는 인간 감마1, 감마2 또는 감마4 중쇄를 기반으로 하는 항체를 정제하는 데 사용될 수 있다 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 감마3에 대해 권장된다 (Guss et al., EMBO J. 5:1567 1575 (1986)). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 제어된 기공 유리 또는 폴리 (스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 더 빠른 유량 및 더 짧은 가공 시간을 가능하게 한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 회수될 항체에 따라 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스(SEPHAROSE)™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대 폴리아스파르트산 칼럼) 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전이 또한 이용가능하다.

[0352] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 pH가 약 2.5-4.5인 용리 완충제를 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어, 약 0-0.25 M 염)에서 수행되는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용될 수 있다.

[0353] 제약 조성물

[0354] 본 개시내용은 항-CD39/TGFβ 트랩 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 추가로 제공한다.

[0355] 본원에 개시된 제약 조성물에 사용하기 위한 제약상 허용되는 담체는, 예를 들어 제약상 허용되는 액체, 겔 또는 고체 담체, 수성 비히클, 비수성 비히클, 항미생물제, 등장화제, 완충제, 항산화제, 마취제, 현탁화제/분산제, 격리제 또는 킬레이트화제, 희석제, 아주반트, 부형제, 또는 비-독성 보조 물질, 관련 기술분야에 공지된 다른 성분, 또는 그의 다양한 조합을 포함할 수 있다.

[0356] 적합한 성분은, 예를 들어 항산화제, 충전제, 결합제, 붕해제, 완충제, 보존제, 윤활제, 향미제, 증점제, 착색제, 유화제 또는 안정화제, 예컨대 당 및 시클로덱스트린을 포함할 수 있다. 적합한 항산화제는, 예를 들어 메티오닌, 아스코르브산, EDTA, 티오황산나트륨, 백금, 카탈라제, 시트르산, 시스테인, 티오글리세롤, 티오글리콜산, 티오소르비톨, 부틸화 히드록사니솔, 부틸화 히드록시톨루엔 및/또는 프로필 갈레이트를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩 및 접합체를 포함하는 조성물 중 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌의 포함은 항-CD39/TGFβ 트랩의 산화를 감소시킨다. 이러한 산화의 감소는 결합 친화도의 손실을 방지하거나 감소시킴으로써, 항체 안정성을 개선시키고 보관-수명을 최대화한다. 따라서, 특정 실시

양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 1종 이상의 항-CD39/TGFβ 트랩 및 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌을 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 항-CD39/TGFβ 트랩을 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌과 혼합함으로써 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩의 산화를 방지하고/거나, 그의 보관-수명을 연장시키고/거나, 그의 효능을 개선시키는 방법이 추가로 제공된다.

[0357] 추가로 예시하기 위해, 제약상 허용되는 담체는, 예를 들어 수성 비히클, 예컨대 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 등장성 덱스트로스 주사액, 멸균수 주사액, 또는 덱스트로스 및 락테이트화 링거 주사액, 비수성 비히클, 예컨대 식물성 기원의 고정 오일, 목화씨 오일, 옥수수 오일, 참깨 오일, 또는 땅콩 오일, 정박테리아 또는 정진균 농도의 항미생물제, 등장화제, 예컨대 염화나트륨 또는 덱스트로스, 완충제, 예컨대 포스페이트 또는 시트레이트 완충제, 항산화제, 예컨대 중황산나트륨, 국부 마취제, 예컨대 프로카인 히드로클로라이드, 현탁화제 및 분산제, 예컨대 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 또는 폴리비닐피롤리돈, 유화제, 예컨대 폴리소르베이트 80 (트윈-80), 격리제 또는 킬레이트화제, 예컨대 EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 또는 EGTA (에틸렌 글리콜 테트라아세트산), 에틸 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 수산화나트륨, 염산, 시트르산, 또는 락트산을 포함할 수 있다. 담체로서 사용되는 항미생물제는 페놀 또는 크레졸, 수은, 벤질 알콜, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-히드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 벤즈알코늄 클로라이드 및 벤제토늄 클로라이드를 포함하는 다중-용량 용기 내의 제약 조성물에 첨가될 수 있다. 적합한 부형제는, 예를 들어 물, 염수, 덱스트로스, 글리세롤 또는 에탄올을 포함할 수 있다. 적합한 비-독성 보조 물질은, 예를 들어 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제, 용해도 증진제, 또는 작용제, 예컨대 아세트산나트륨, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트 또는 시클로덱스트린을 포함할 수 있다.

[0358] 제약 조성물은 액체 용액, 현탁액, 에멀젼, 환제, 캡슐, 정제, 지속 방출 제제, 또는 분말일 수 있다. 경구 제제는 표준 담체, 예컨대 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 사카린나트륨, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등을 포함할 수 있다.

[0359] 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 주사가능한 조성물로 제제화된다. 주사가능한 제약 조성물은 임의의 통상적인 형태, 예컨대 예를 들어 액체 용액, 현탁액, 에멀젼, 또는 액체 용액, 현탁액 또는 에멀젼을 생성하는 데 적합한 고체 형태로 제조될 수 있다. 주사용 제제는 즉시 주사용 멸균 및/또는 비-발열성 용액, 멸균 건조 가용성 생성물, 예컨대 사용 직전에 용매와 조합될 준비가 된 동결건조된 분말, 예컨대 피하 정제, 즉시 주사용 멸균 현탁액, 사용 직전에 비히클과 조합될 준비가 된 멸균 건조 불용성 생성물, 및 멸균 및/또는 비-발열성 에멀젼을 포함할 수 있다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0360] 특정 실시양태에서, 단위-용량 비경구 제제는 앰플, 바이알 또는 바늘을 갖는 시린지 내에 포장된다. 비경구 투여를 위한 모든 제제는 관련 기술분야에 공지되고 실시되는 바와 같이 멸균성이고 발열성이 아니어야 한다.

[0361] 특정 실시양태에서, 멸균, 동결건조 분말은 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 항원-결합 단편을 적합한 용매 중에 용해시킴으로써 제조된다. 용매는 분말, 또는 분말로부터 제조된 재구성된 용액의 안정성 또는 다른 약리학적 요소를 개선시키는 부형제를 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는 물, 덱스트로스, 소르비톨, 프룩토스, 옥수수 시럽, 크실리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스 또는 다른 적합한 작용제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 용매는 완충제, 예컨대 시트레이트, 인산나트륨 또는 인산칼륨, 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 이러한 완충제를 함유할 수 있다 (한 실시양태에서, 대략 중성 pH). 용액의 후속 멸균 여과에 이어서 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 조건 하의 동결건조는 바람직한 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 생성된 용액은 동결건조를 위해 바이알에 배분될 것이다. 각각의 바이알은 단일 투여량 또는 다중 투여량의 항-CD39/TGFβ 트랩 또는 그의 조성물을 함유할 수 있다. 정확한 샘플 회수 및 정확한 투여를 용이하게 하기 위해, 용량 또는 용량 세트에 필요한 것보다 조금 더 많게 (예를 들어, 약 10%) 바이알을 과충전하는 것이 허용된다. 동결건조된 분말은 적절한 조건 하에, 예컨대 약 4℃ 내지 실온에서 저장될 수 있다.

[0362] 동결건조된 분말을 주사용수로 재구성하여 비경구 투여에 사용되는 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 멸균 및/또는 비-발열성 물 또는 다른 액체로 재구성하기 위해, 적합한 담체가 동결건조된 분말에 첨가된다. 정확한 양은 주어지는 선택된 요법에 따르고, 경험적으로 결정될 수 있다.

[0363] 키트

[0364] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩 및 제2 치료제

를 포함하는 키트를 제공한다. 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 화학요법제, 항암 약물, 방사선 요법, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적화 요법, 세포 요법, 유전자 요법, 호르몬 요법, 항바이러스제, 항생제, 진통제, 항산화제, 금속 킬레이트화제 및 시토카인으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0365] 이러한 키트는, 원하는 경우에, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백한 바와 같이, 다양한 통상적인 제약 키트 성분 중 1종 이상, 예컨대 예를 들어 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 갖는 용기, 추가의 용기 등을 추가로 포함할 수 있다. 투여될 성분의 양, 투여를 위한 가이드라인 및/또는 성분 혼합을 위한 가이드라인을 나타내는 삽입물 또는 라벨로서의 지침서가 또한 키트에 포함될 수 있다.

[0366] 사용 방법

[0367] 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩, 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 CD39 관련 및/또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화시키는 방법을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 본 발명자들은 예상외로 아데노신 경로 (CD39의 억제를 통함)를 차단함과 동시에 TGFβ 신호전달 경로 (TGFβ 트랩을 통함)를 차단함으로써 대상체에서 CD39 관련 및/또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화시키는 데 상승작용적 효과가 달성될 수 있다는 것을 발견하였다.

[0368] 일부 실시양태에서, CD39 관련 질환, 장애 또는 상태는 CD39의 발현 또는 과다발현을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태는 TGFβ의 발현 또는 과다발현을 특징으로 한다.

[0369] 특정 실시양태에서, CD39 관련 질환, 장애 또는 상태는 암이다. 특정 실시양태에서, 암은 CD39-발현 암이다. 본원에 사용된 "CD39-발현" 암은 암 세포, 종양 침윤 면역 세포 또는 면역 억제 세포에서 CD39 단백질을 발현하거나, 또는 암 세포, 종양 침윤 면역 세포 또는 면역 억제 세포에서 정상 세포에서 예상되는 것보다 유의하게 더 높은 수준으로 CD39를 발현하는 것을 특징으로 하는 암을 지칭한다. 대상체로부터의 시험 생물학적 샘플에서 CD39의 존재 및/또는 양을 결정하기 위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 시험 생물학적 샘플은 발현된 CD39 단백질에 결합하고 이를 검출하는 항-CD39 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 노출될 수 있다. 대안적으로, CD39는 또한 qPCR, 리버스 트랜스크립타제 PCR, 마이크로어레이, SAGE, FISH 등과 같은 방법을 사용하여 핵산 발현 수준에서 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시험 샘플은 암 세포 또는 조직, 또는 종양 침윤 면역 세포로부터 유래된다. 참조 샘플은 건강한 또는 비-이환 개체로부터 수득된 대조군 샘플, 또는 시험 샘플이 수득된 동일한 개체로부터 수득된 건강한 또는 비-이환 샘플일 수 있다. 예를 들어, 참조 샘플은 시험 샘플 (예를 들어, 종양)에 인접하거나 그 근처에 있는 비-이환 샘플일 수 있다.

[0370] 특정 실시양태에서, TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태는 암이다. 특정 실시양태에서, 암은 TGFβ-발현 암이다. 본원에 사용된 "TGFβ-발현" 암은 암 세포, 종양 침윤 면역 세포 또는 면역 억제 세포에서 TGFβ 단백질을 발현하거나, 또는 암 세포, 종양 침윤 면역 세포 또는 면역 억제 세포에서 정상 세포에서 예상되는 것보다 유의하게 더 높은 수준으로 TGFβ를 발현하는 것을 특징으로 하는 암을 지칭한다.

[0371] 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 TGFβ의 증가된 수준 및/또는 활성과 연관된 질환을 치료, 예방 또는 완화시키는 방법을 또한 제공한다.

[0372] 대상체로부터의 시험 생물학적 샘플에서 TGFβ의 존재 및/또는 양을 결정하기 위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 시험 생물학적 샘플은 발현된 TGFβ 단백질에 결합하고 이를 검출하는 항-TGFβ 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 노출될 수 있다. 대안적으로, TGFβ는 또한 qPCR, 리버스 트랜스크립타제 PCR, 마이크로어레이, SAGE, FISH 등과 같은 방법을 사용하여 핵산 발현 수준에서 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시험 샘플은 암 세포 또는 조직, 또는 종양 침윤 면역 세포로부터 유래된다. 참조 샘플은 건강한 또는 비-이환 개체로부터 수득된 대조군 샘플, 또는 시험 샘플이 수득된 동일한 개체로부터 수득된 건강한 또는 비-이환 샘플일 수 있다. 예를 들어, 참조 샘플은 시험 샘플 (예를 들어, 종양)에 인접하거나 그 근처에 있는 비-이환 샘플일 수 있다.

[0373] 특정 실시양태에서, 상기 질환, 장애 또는 상태는 암, 췌장 위축 또는 섬유증이다.

[0374] 특정 실시양태에서, 암은 항문암, 충수암, 성상세포종, 기저 세포 암종, 담낭암, 위암, 폐암, 기관지암, 골암, 간 및 담관암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 신우 및 요관암, 타액선암, 소장암, 요도암, 방광암, 두경부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 항문암, 식도암, 위장암, 피부암, 전립선암, 뇌하수체암, 질암, 갑상선암, 인후암, 교모세포종, 흑색종, 골수이형성 증

후군, 육종, 기형종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, T 또는 B 세포 림프종, GI 기관 간질종, 연부 조직 종양, 간세포성 암종 및 선암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종, 방광암, 신경교종, 교모세포종, 난소암, 흑색종, 전립선암, 갑상선암, 식도암 또는 유방암이다.

[0375] TGFβ는 만성 신장 질환 (CKD)의 전부는 아니지만 대부분의 형태에서 섬유증을 유도하는 주요 인자이다. TGF-β 이소형, TGF-β1 또는 그의 하류 신호전달 경로의 억제는 광범위한 질환 모델에서 신섬유증을 실질적으로 제한하는 반면, TGF-β1의 과다발현은 신섬유증을 유도한다. TGF-β1은 정규 (Smad-기반) 및 비-정규 (비-Smad-기반) 신호전달 경로 둘 다의 활성화를 통해 섬유증을 유도할 수 있으며, 이는 근섬유모세포의 활성화, 세포외 매트릭스 (ECM)의 과도한 생산 및 ECM 분해의 억제를 유발한다. 섬유증의 조절에서의 Smad 단백질의 역할은, 경쟁하는 섬유화유발 및 항섬유화 작용 (중간엽 이행의 조절 포함), 및 TGF-β/Smad와 다른 신호전달 경로 사이의 복잡한 상호작용과 복합적이다. 연구는 짧은 및 긴 비코딩 RNA 분자 및 DNA 및 히스톤 단백질의 후성적 변형을 포함한, 섬유증에서 TGF-β1/Smad 신호전달의 작용을 조절하는 추가의 메카니즘을 확인하였다. TGF-β1의 직접적 표적화는 다른 과정에서의 TGF-β1의 수반으로 인해 실행가능한 항섬유화 요법을 생성할 가능성이 없지만, TGF-β1이 섬유증을 제어하는 다양한 경로의 보다 큰 이해는 CKD에서 이러한 가장 손상되는 과정을 중단시키는 신규 치료제의 개발을 위한 대안적 표적을 확인하였다.

[0376] 아데노신은 염증 및 조직 재형성에서 중요한 역할을 하고, 아데노신 수용체 (A2AR) 활성화에 의해 피부 섬유증을 촉진한다. 엑토-효소 CD39 및 CD73에 의해 탠덤으로 생성된 세포외 아데노신은 피부 섬유생성을 촉진한다. 아데노신 축은 신허혈 재관류 손상 (IRI)에 수반되고, CD39 및 CD73의 작용에 의한 아데노신의 생성은 보호적이다. 그러나, 아데노신의 만성 상승은 신섬유증의 발생과 연관되었다. 증거는 CD39 및/또는 CD73의 결실이 콜라겐 함량을 감소시키고, 블레오마이신 챌린지 후 피부 비후화 및 인장 강도 증가를 방지하였음을 보여주었다. 감소된 피부 섬유화 특색은 CD39- 및/또는 CD73-결핍 마우스에서 섬유화유발 매개체, 형질전환 성장 인자-β1 및 결합 조직 성장 인자의 감소된 발현, 및 감소된 근섬유모세포 집단과 연관되었다.

[0377] 본 발명자들은 CD39 및 TGF-β의 억제가 경피증, 간 섬유증 및 신섬유증과 같은 질환에서의 섬유증의 치료에서 유망할 수 있다고 가정하였다.

[0378] 특정 실시양태에서, 섬유증은 경피증, 신섬유증, 폐 섬유증 (예를 들어 낭성 섬유증, 특발성 폐 섬유증), 간 섬유증 (예를 들어 가교 섬유증, 간경변증), 뇌 섬유증, 관절섬유증, 종격 섬유증, 골수섬유증, 신원성 전신 섬유증, 복막후 섬유증, 및 심근 섬유증 (예를 들어 간질성 섬유증, 대체 섬유증)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 CD39 및/또는 TGFβ를 발현하는 암 세포 또는 종양 침윤 면역 세포 또는 면역 억제 세포를, 임의로 비-암 세포 또는 비-면역 억제 세포 상에서 정상적으로 발견되는 수준보다 유의하게 더 높은 수준으로 갖는 것으로 확인되었다.

[0379] 일부 실시양태에서, 면역 억제 세포는 조절 T 세포이다. 조절 T 세포 ("Treg")는 시험관내에서 반응자 T 세포의 증식을 우세하게 억제하고 생체내에서 자가면역 질환을 억제하는 능력을 갖는 T 림프구의 별개의 집단이다. 본 개시내용의 Treg는 억제 특성이 있는 $CD4^+$ $CD25^+$ $FoxP3^+$ T 세포일 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 Treg는 $CD4^+$ Treg, 특히 CD39를 과다발현하는 $CD4^+$ Treg이다.

[0380] 일부 실시양태에서, 대상체는 대조군 대상체에서 정상적으로 발견되는 조절 T 세포의 활성과 비교하여 종양 미세환경에서 과다활성 조절 T 세포를 갖는 것으로 확인되었다. 종양 미세환경에서의 조절 T 세포의 활성은 관련 기술분야의 통상적인 방법, 예를 들어 T 세포 상에서의 $CD25^+Foxp3^+$의 상향조절, TGFβ 및 IL-10의 분비, CTL 세포독성의 억제 등에 의해 결정될 수 있다.

[0381] 일부 실시양태에서, 대상체는 면역억제의 복귀, 또는 기능장애성 소진된 T 세포의 복귀로부터 유익할 것으로 예상된다.

[0382] 일부 실시양태에서, 질환, 장애 또는 상태는 자가면역 질환 또는 감염이다. 일부 실시양태에서, 자가면역 질환은 면역 혈소판감소증, 전신 경피증, 경화증, 성인 호흡 곤란 증후군, 습진, 천식, 쇼그렌 증후군, 애디슨병, 거대 세포 동맥염, 면역 복합체 신염, 면역 혈소판감소성 자반증, 자가면역 혈소판감소증, 복강 질환, 건선, 피부염, 결장염 또는 전신 홍반성 루푸스이다. 일부 실시양태에서, 감염은 바이러스 감염 또는 박테리아 감염이다. 일부 실시양태에서, 감염은 HIV 감염, HBV 감염, HCV 감염, 염증성 장 질환 또는 크론병이다.

[0383] 또 다른 측면에서, CD39 활성 및/또는 TGFβ 활성의 조정으로부터 이익을 얻을 질환, 장애 또는 상태의 치료, 예방 또는 완화를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 상기 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화시키는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 질환, 장애 또는 상태는 상기 정의된 CD39 관련 및/또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태이다.

[0384] 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩의 치료 유효량은 관련 기술분야에 공지된 다양한 인자, 예컨대 예를 들어 대상체의 체중, 연령, 과거 병력, 현재 의약, 건강 상태 및 교차-반응, 알레르기, 과민증 및 유해 부작용의 가능성, 뿐만 아니라 투여 경로 및 질환 발달 정도에 좌우될 것이다. 투여량은 이들 및 다른 상황 또는 요건에 의해 지시되는 바와 같이 관련 기술분야의 통상의 기술자 (예를 들어 의사 또는 수의사)에 의해 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다.

[0385] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩은 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 치료 유효 투여량으로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여 용량을 치료 과정에서 변화시킬 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 초기 투여 용량이 후속 투여 용량보다 더 많을 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여 용량을 대상체의 반응에 따라 치료 과정에서 변화시킬 수 있다.

[0386] 투여 요법을 최적의 목적하는 반응 (예를 들어 치료 반응)을 제공하도록 조정할 수 있다. 예를 들어, 단일 용량을 투여할 수 있거나, 또는 여러 분할된 용량을 시간 경과에 따라 투여할 수 있다.

[0387] 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩은 관련 기술분야에 공지된 임의의 경로, 예컨대 예를 들어 비경구 (예를 들어 피하, 복강내, 정맥내, 예컨대 정맥내 주입, 근육내 또는 피내 주사) 또는 비-비경구 (예를 들어 경구, 비강내, 안내, 설하, 직장 또는 국소) 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0388] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩은 단독으로 또는 치료 유효량의 제2 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 항-CD39/TGFβ 트랩은 제2 치료제, 예를 들어 화학요법제, 항암 약물, 방사선 요법제, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적화 요법제, 세포 요법제, 유전자 요법제, 호르몬 요법제, 항바이러스제, 항생제, 진통제, 항산화제, 금속 킬레이트화제 또는 시토카인과 조합하여 투여될 수 있다.

[0389] 본원에 사용된 용어 "면역요법"은 질환, 예컨대 암과 싸우기 위해 면역계를 자극하거나 또는 일반적인 방식으로 면역계를 부스팅하는 요법의 유형을 지칭한다. 면역요법의 예는, 비제한적으로, 체크포인트 조정제, 입양 세포 전달, 시토카인, 종양용해 바이러스 및 치료 백신을 포함한다.

[0390] "표적화 요법"은 암과 연관된 특이적 분자, 예컨대 암 세포에 존재하지만 정상 세포에는 존재하지 않거나 또는 암 세포에 보다 풍부한 특이적 단백질, 또는 암 성장 및 생존에 기여하는 암 미세환경 내의 표적 분자에 대해 작용하는 요법의 유형이다. 표적화 요법은 치료제를 종양에 표적화함으로써, 정상 조직이 치료제의 효과를 받지 않는다.

[0391] 이들 특정한 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 치료제와 조합하여 투여되는 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩은 1종 이상의 추가의 치료제와 동시에 투여될 수 있고, 특정한 이들 실시양태에서 항-CD39/TGFβ 트랩 및 추가의 치료제(들)는 동일한 제약 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 그러나, 또 다른 치료제와 "조합하여" 투여되는 항-CD39/TGFβ 트랩은 상기 치료제와 동시에 또는 그와 동일한 조성물로 투여될 필요는 없다. 또 다른 작용제 이전에 또는 이후에 투여되는 항-CD39/TGFβ 트랩은, 심지어 상기 항-CD39/TGFβ 트랩 및 제2 작용제가 상이한 경로를 통해 투여되더라도, 상기 어구가 본원에 사용된 바와 같이 상기 작용제와 "조합하여" 투여되는 것으로 간주된다. 가능한 경우, 본원에 개시된 항-CD39/TGFβ 트랩과 조합하여 투여되는 추가의 치료제(들)는 추가의 치료제의 제품 정보 시트에 열거된 스케줄에 따라, 또는 문헌 [Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002))] 또는 관련 기술분야에 공지된 프로토콜에 따라 투여된다.

[0392] 본 개시내용은 CD39-양성 세포를 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩에 노출시키는 것을 포함하는, CD39-양성 세포에서 CD39 활성을 조정하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, CD39-양성 세포는 면역 세포이다.

[0393] 본 개시내용은 TGFβ-양성 세포를 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩에 노출시키는 것을 포함하는, TGFβ-양성 세포에서 TGFβ 활성을 조정하는 방법을 추가로 제공한다.

[0394] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 샘플을 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물과 접촉시키는 단계, 및 샘플에서 CD39 및/또는 TGFβ의 존재 또는 양을 결정하는 단계를 포함하는, 샘플에서

CD39 및/또는 TGFβ의 존재 또는 양을 검출하는 방법을 제공한다.

[0395] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 a) 대상체로부터 수득된 샘플을 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물과 접촉시키는 단계; b) 샘플에서 CD39 및/또는 TGFβ의 존재 또는 양을 결정하는 단계; 및 c) CD39 및/또는 TGFβ의 존재 또는 양을 대상체에서의 CD39 관련 및/또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태의 존재 또는 상태와 상호연관시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 CD39 관련 및/또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태를 진단하는 방법을 제공한다.

[0396] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 CD39 관련 및/또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태를 검출하는 데 유용한 검출가능한 모이어티와 임의로 접합된, 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 사용에 대한 지침서를 추가로 포함할 수 있다.

[0397] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 CD39 관련 및/또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화시키기 위한 의약의 제조에서의, CD39 관련 및/또는 TGFβ 관련 질환, 장애 또는 상태를 진단하기 위한 진단 시약의 제조에서의 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물의 용도를 제공한다.

[0398] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 CD39의 ATPase 활성을 감소시킴으로써 치료가능한 질환을 치료, 예방 또는 완화시키는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩은 CD39를 발현하는 암 세포, 종양 침윤 면역 세포, 면역 억제 세포의 ATPase 활성을 감소시키기 위해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암, 췌장 위축, 섬유증, 자가면역 질환 및 감염으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환, 장애 또는 상태를 갖는다.

[0399] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항-CD39/TGFβ 트랩 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 T 세포, 단핵구, 대식세포, DC, APC, NK 및/또는 B 세포 활성의 아데노신-매개 억제와 연관된 질환을 치료, 예방 또는 완화시키는 방법을 제공한다.

[0400] 하기 실시예는 청구된 발명을 보다 잘 예시하기 위해 제공되며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 하기 기재된 모든 구체적 조성물, 물질 및 방법은, 전체적으로 또는 부분적으로, 본 발명의 범주 내에 속한다. 이들 구체적 조성물, 물질 및 방법은 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않으며, 단지 본 발명의 범주 내에 속하는 구체적 실시양태를 예시하기 위한 것이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 발명의 능력을 행사하지 않고 본 발명의 범주로부터 벗어나지 않으면서 등가의 조성물, 물질 및 방법을 개발할 수 있다. 본 발명의 범주 내에서 유지되는한 본원에 기재된 절차에서 여러 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 변형이 본 발명의 범주 내에 포함됨이 본 발명자들의 의도이다.

[0401] 실시예

[0402] 실시예 1. 물질 생성

[0403] 1.1. 참조 항체 생성

[0404] 항-CD39 참조 항체를 공개된 서열에 기초하여 생성하였다. 항체 9-8B는 특허 출원 WO2016/073845A1에 개시되었고, 그의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 각각 서열식별번호: 46 및 48로서 본원에 포함된다. 항체 T895는 특허 출원 WO2019/027935A1에서 항체 31895로서 개시되었고, 그의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 각각 서열식별번호: 55 및 57로서 본원에 포함된다. 항체 I394는 특허 출원 WO2018/167267A1에 개시되었고, 그의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 각각 서열식별번호: 113 및 114로서 본원에 포함된다. 항체 9-8B, T895, 및 I394의 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 하기 표 10에서 제시된다. 참조 항체를 코딩하는 DNA 서열을 클로닝하고, Expi293 세포(인비트로젠(Invitrogen))에서 발현시켰다. 세포 배양 배지를 수집하고, 원심분리하여 세포 펠릿을 제거하였다. 수거된 상청액을 단백질 A 친화성 크로마토그래피 칼럼 (맙셀렉트 슈어(Mabselect Sure), 지이 헬스케어(GE Healthcare))을 사용하여 정제하여 참조 항체 제제를 수득하였다.

[0405] 표 10. 3종의 참조 항체의 가변 영역 아미노산 서열.

항체	VH	VL
9-8B	SEQ ID NO: 46 QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYTFTHYGMNWVKQAPG KGLKWMGWINTYTGELTYAD DFKGRFAFSLETSASTAYLQIN NLKNEDTATYFCARRAYYRYD YVMDYWGQGTSVTVSS	SEQ ID NO: 48 DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSV TCKASHNVGTNVAWYQQKPG QSPKALIYSASYRYSGVPGRFT GSGSGTDFTLTISNVQSEDLAE YFCHQYNNYPYTFGGGTKLEI K
T895	SEQ ID NO: 55 EVQLQQSGPELVKPGASVKMS CKASGYTFTDYNMHWVKQSH GRTLEWIGYIVPLNGGSTFNQK FKGRATLTVNTSSRTAYMELRS LTSEDSAAYYCARGGTRFAYW GQGTLVTVSA	SEQ ID NO: 57 DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS CRASESVDNFGVSFMYWFQQ KPGQPPNLLIYGASNQGSGVP ARFRGSGSGTDFSLNIHPMEA DDTAMYFCQQTKEVPYTFGG GTKLEIK
I394	SEQ ID NO: 113 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFKSYEMHWVRQAP GQGLEWMGRINPSVGSTWYA QKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARGKREG GTEYLRKWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 114 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVASSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASNRHTGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYHNAITFGGGTKVEIK

[0406]

[0407] 1.2. 인간, 시노몰구스 원숭이, 및 마우스 CD39 안정한 발현 세포주의 생성

[0408] 각각 전장 인간 CD39 (NP_001767.3), 시노 CD39 (XP_015311944.1) 및 마우스 CD39 (NP_033978.1)를 코딩하는 DNA 서열을 발현 벡터 내로 클로닝한 후, 형질감염시키고, HEK293 세포에서 발현시켰다. 각각 인간 CD39, 시노 CD39 및 마우스 CD39를 발현하는 형질감염된 세포를 선택 배지에서 배양하였다. 인간 CD39, 시노 CD39 또는 마우스 CD39를 안정하게 발현하는 단세포 클론을 한계 희석에 의해 단리하였다. 후속적으로, 세포를 항-인간 CD39 항체 (BD, Cat#555464), 항-시노 CD39 (9-8B), 항-마우스 CD39 (바이오레전드(Biolegend), Cat#143810)를 사용하여 FACS에 의해 스크리닝하였다.

[0409] 유사한 방식으로, 인간 CD39, 시노 CD39 또는 마우스 CD39 발현 플라스미드로 형질감염된 CHOK1 세포 (인비트로젠)를 선택 배지에서 배양하였다. 인간 CD39, 시노 CD39 또는 마우스 CD39를 안정하게 발현하는 단세포 클론을 한계 희석에 의해 단리하고, 후속적으로 항-인간 CD39 항체, 항-시노 CD39 항체 또는 항-마우스 CD39 항체를 사용하여 FACS에 의해 스크리닝하였다.

[0410] 안정한 세포주를 각각 HEK293-hCD39, HEK293-cynoCD39, HEK293-mCD39, CHOK1-hCD39, CHOK1-cynoCD39, 및 CHOK1-mCD39로 지정하였으며, 이들 모두는 높은 발현 및 ATPase 활성을 나타냈다.

[0411] 1.3. 재조합 단백질 생성

[0412] 인간 CD39의 세포외 도메인 (ECD)을 코딩하는 DNA 서열을 발현 벡터 내로 클로닝하고, HEK293 세포 내로 형질감염시켜 재조합 ECD 단백질의 발현을 가능하게 하였다.

[0413] 실시예 2. 항체 생성

[0414] 2.1. 면역화 및 하이브리도마 생성 및 스크리닝

[0415] CD39에 대한 항체를 생성하기 위해, Balb/c 및 SJL/J 마우스 (SLAC)를 재조합적으로 발현된 인간 CD39 항원 또는 그의 단편, 또는 전장 인간 CD39를 코딩하는 DNA 및/또는 인간 CD39를 발현하는 세포로 면역화시켰다. 면역 반응을 혈장으로 면역화 프로토콜의 과정에 걸쳐 모니터링하고, 혈청 샘플을 꼬리 정맥 또는 안와후 채혈에 의해 수득하였다. 충분한 역가의 항-CD39 항체를 갖는 마우스를 융합에 사용하였다. 면역화된 마우스로부터의 비장세포 및/또는 림프절 세포를 단리하고, 마우스 골수종 세포주 (SP2/0)에 융합시켰다. 생성된 하이브리도마를 인간 CD39 ECD 재조합 단백질을 사용한 ELISA 검정에 의해, 또는 인간 CD39를 안정하게 발현하는 CHOK1-hCD39 세포를 사용한 아큐멘(Acumen) 검정 (티티피 랩테크(TTP Labtech))에 의해 CD39-특이적 항체의 생산에 대해 스크리닝하였다. hCD39에 특이적인 하이브리도마 클론을 FACS 및 효소 활성 차단 검정에 의해 확인하고, 서브클로닝하여 안정한 하이브리도마 클론을 수득하였다. 1-2 라운드의 서브클로닝 후에, 하이브리도마 모노클로날을 항체 생산을 위해 확장시키고, 스톡으로서 동결시켰다.

[0416] 항체 분비 하이브리도마를 한계 희석에 의해 서브클로닝하였다. 특징화를 위해 안정한 서브클론을 시험관내에서 배양하여 조직 배양 배지 내에 항체를 생성하였다. 1-2 라운드의 서브클로닝 후에, 하이브리도마 모노클로날을 항체 생산을 위해 확장시켰다.

[0417] 약 14일의 배양 후에, 하이브리도마 세포 배양 배지를 수집하고, 단백질 A 친화성 크로마토그래피 칼럼 (지이(GE))에 의해 정제하였다. 하이브리도마 항체 클론을 각각 mAb13, mAb14, mAb19, mAb21, mAb23, mAb34 및 mAb35로 지정하였다.

[0418] 실시예 3. 항체 특징화

[0419] 3.1. 항체

[0420] 하이브리도마 항체 클론 mAb13, mAb14, mAb19, mAb21, mAb23, mAb34 및 mAb35를 하기 기재된 바와 같은 일련의 결합 및 기능적 검정에서 특징화하였다.

[0421] 3.2. 인간 CD39, 시노몰구스 CD39 및 마우스 CD39에 대한 결합 친화도

[0422] FACS를 사용하여 자연적으로 (SK-MEL-28) 또는 재조합적으로 (CHOK1-hCD39, CHOK1-cynoCD39, 및 CHOK1-mCD39) CD39를 발현하는 세포주, 또는 음성 대조군으로서 CD39 발현이 결여된 세포 (CHOK1-블랭크)에 대한 항체의 결합을 결정하였다.

[0423] CHOK1-hCD39, CHOK1-cCD39, CHOK1-mCD39 및 CHOK1-블랭크 세포를 ATCC 절차에 따라 배양 배지에서 유지하였다. 세포를 수집하고, 차단 완충제 중에 3 x 10^6개 세포/ml의 밀도로 재현탁시켰다. 세포를 96 웰 FACS 플레이트로 100 μl/웰 (3 x 10^5개 세포/웰)로 옮기고, 플레이트를 원심분리하고, FACS 완충제 (PBS, 1% FBS, 0.05% 트윈-20)로 2회 세척하였다. 항-CD39 항체의 4배 연속 희석물을 30 μg/ml로부터 시작하여 FACS 완충제 중에서 제조하였다. 참조 항체 9-8B 및 마우스/인간 대조군 IgG를 각각 양성 및 음성 대조군으로서 사용하였다. 세포를 100 μL/웰 희석된 항체 중에 재현탁시키고, 플레이트를 4℃에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 FACS 완충제로 세척하고, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)® 488-표지된 2차 항체 (FACS 완충제 중 1:1000)를 각 웰에 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 FACS 완충제로 세척하고, 세포를 100 μL/웰의 PBS 중에 재현탁시켰다. 이어서, 세포를 FACSVerse™로 분석하고, 평균 형광 강도를 결정하였다. 다양한 항체 농도를 시험함으로써 CD39 발현 세포에 대한 완전 결합 곡선을 생성하였다. 각각의 항체에 대해 겉보기 친화도를 프리즘(Prism) 소프트웨어를 사용하여 결정하였다.

[0424] 유사하게, 인간 CD39 발현 세포 SK-MEL-5, SK-MEL-28 또는 MOLP-8을 구배 농도의 항-CD39 항체와 함께 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 세포를 FACS 완충제를 사용하여 3회 세척하고, 이어서 형광 표지된 2차 항체 (염소-항-마우스 IgG 또는 염소 항-인간 IgG)와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 3회 세척한 다음, FACS 완충제 중에 재현탁시키고, 비디 셀레스타(BD Celesta) 상에서 유동 세포측정 분석에 의해 분석하였다. 데이터를 그래프패드(GraphPad) 프리즘 8.02를 사용하여 플롯팅하고 분석하였다.

[0425] 7종의 정제된 하이브리도마 항체의 결합 친화도를 공지된 항-CD39 항체 9-8B와 비교하여 표 11에 요약한다. 모든 하이브리도마 항체는 용량-의존성 방식으로 인간 및 시노몰구스 CD39에 결합하였지만, 어떠한 것도 FACS 연구에서 마우스 CD39를 인식하지 않았다.

[0426] 표 11. 항-CD39 하이브리도마 항체 특징화 요약.

ES-번호	결합 친화도 EC_{50} (M)				SK-MEL-28 세포 기반ATPase 억제 %		T 세포 증식 억제 검정		옥텟 결합 친화도			에피토프
	인간	시노몰구스	마우스	SK-MEL-28	10 nM	EC_{50}	100nM	EC_{50}	KD	K-off		
mAb13	3.0E-08	2.1E-08	–	1.1E-08	43%	3.5E-10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.
mAb14	2.5E-09	3.4E-09	–	2.8E-08	57%	4.5E-09	++	n.d.	2.4E-10	2.2E-04		IV
mAb19	4.5E-09	5.8E-09	–	4.6E-08	65%	4.0E-09	++	n.d.	2.6E-10	1.5E-04		I
mAb21	6.7E-09	1.1E-08	–	9.0E-08	70%	1.5E-09	++	1.4E-10	4.4E-10	2.2E-04		I
mAb23	1.7E-09	2.3E-09	–	1.6E-09	75%	6.0E-11	++	~1.0E-10	8.2E-10	3.6E-04		II
mAb34	4.4E-09	3.1E-09	–	4.7E-09	72%	1.3E-10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.
mAb35	5.2E-09	5.3E-09	–	1.8E-09	56%	1.6E-09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.
9-8B	1.7E-09	1.6E-09	–	8.0E-10	21%	5.0E-11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		III

-: 음성
++: $p<0.01$
n.d.: 아직 결정되지 않음

[0427]

[0428] 3.3. ATPase 억제 검출

[0429] CD39 발현 세포, SK-MEL-5 및 MOLP-8을 PBS 완충제로 세척하고, 37℃에서 30분 동안 항체의 구배와 함께 인큐베이션하였다. 50 mM ATP를 각각의 웰에 첨가하고, 세포와 함께 16시간 동안 인큐베이션하였다. 상청액을 수집하고, ATP 분해로부터의 오르토포스페이트 생성물을 말라카이트 그린 포스페이트 검출 키트 (알앤디 시스템즈, 카탈로그# DY996)에 의해 제조업체의 매뉴얼에 따라 측정하였다. 이소형 및/또는 9-8B를 대조군으로서 사용하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘 8.02를 사용하여 플롯팅하고 분석하였다. EC_{50}은 본 검정에서 신호의 50%에 도달하는 표시된 항체의 농도이다.

[0430] 표 11에 요약된 바와 같이, 모든 7종의 정제된 하이브리도마 항체는 참조 항체 9-8B와 비교하여 우수한 ATPase 억제 활성을 가졌다.

[0431] 3.4. ATP-매개 T 세포 증식 억제 검정

[0432] CSFE로 표지되고 항-CD3 및 항-CD28로 자극된 인간 T 세포를 ATP의 존재 하에 항-CD39 항체 또는 이소형 대조군과 함께 인큐베이션하였다. T 세포의 증식을 FACS에서 CSFE 희석에 의해 분석하였다. mIgG2a를 이소형 대조군

으로서 사용하였다.

[0433] 선택된 항-CD39 항체 mAb21 및 mAb23의 T 세포 증식 활성을 도 1에 제시하고, 표 11에 요약하였다. EC_{50}은 본 검정에서 신호의 50%에 도달하는 표시된 항체의 농도이다. 둘 다의 항체는 용량-의존성 방식으로 T 세포 증식을 증진시켰으며, 즉 둘 다의 항체는 T 세포 증식에 대한 ATP-매개 억제를 차단하였다.

[0434] 3.5. 에피토프 비닝

[0435] 항-CD39 항체를 알렉사488 표지화 키트를 사용하여 표지하고, 일련의 농도로 희석한 후, CHOK1-hCD39 세포와 혼합하여 FACS를 사용하여 결합 EC_{80}을 시험하였다. 비-표지된 항체를 표지된 것에 대한 그의 차단 효능에 대해 시험하였다. 간단히 설명하면, 단핵 CHOK1-hCD39 세포를 2 x 10^6개/ml로 제조하고, 96 웰 내에 50 μl/웰로 플레이팅한 후, 항체 구배와 함께 100 μl의 최종 부피로 혼합한 후, 동일 부피의 알렉사488 표지 항체를 2배 EC_{80} 농도로 첨가하였다. 96 웰 플레이트를 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 회전 침강시키고, 200 μl FACS 완충제로 3회 세척하였다. FACS 분석을 FACSCelesta) 기계 상에서 수행하고, 데이터를 플로우조(Flowjo) 소프트웨어에 의해 분석하였다. 차단 백분율을 계산하고, 비-경쟁 웰 (알렉사488 표지된 항체 단독)과 비교하여 80% 초과의 경쟁률을 갖는 것을 1개의 에피토프 군에 할당하였다.

[0436] 경쟁 결과를 표 12에 제시한다. 경쟁 결과에 기초하여, 4종의 항-CD39 하이브리도마 항체 (mAb14, mAb19, mAb21, mAb23)는 표 11에 제시된 바와 같이 4종의 상이한 에피토프 군으로 분류될 수 있다. 구체적으로, 항-CD39 항체 mAb19 및 mAb21은 표 11에 제시된 바와 같이 고도로 유사한 에피토프에 대해 경쟁하고, 에피토프 군 I로 분류된다. mAb14는 시험된 바와 같이 임의의 다른 항체와 경쟁하지 않았고, 표 11에 제시된 바와 같이 에피토프 군 IV로 분류되었다. mAb23은 mAb19 및 mAb21과 교차-경쟁을 보여주었고, 표 11에서 에피토프 군 II로 분류되었다.

[0437] 표 12. 항-CD39 하이브리도마 항체 에피토프 비닝 요약.

	mAb19-알렉사488	**mAb21-알렉사488**	**mAb23-알렉사488**	**9-8B-알렉사488**	**mAb14-알렉사488**
mAb19	96%	83%	91%	6%	23%
mAb21	98%	90%	97%	20%	24%
mAb23	98%	93%	100%	98%	86%
9-8B	19%	16%	100%	98%	55%
mAb14	6%	10%	-26%	-11%	98%

[0438]

[0439] 3.6. 하이브리도마 서열분석

[0440] RNA를 모노클로날 하이브리도마 세포로부터 단리하고, 상업용 키트를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. 이어서, cDNA를 주형으로서 사용하여 마우스 Ig-프라이머 세트 (노바젠(Novagen))의 프라이머로 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 증폭시켰다. 정확한 크기를 갖는 PCR 산물을 수집하고, 정제한 후, 적합한 플라스미드 벡터로 라이게이션하였다. 라이게이션 산물을 DH5α 적격 세포 내로 형질전환시켰다. 클론을 선택하고, 삽입된 단편을 DNA 서열분석에 의해 분석하였다.

[0441] 하이브리도마 항체의 가변 영역 서열은 본원에서 표 2에 제공된다.

[0442] 실시예 4. 키메라 항체 생성 및 특징화

[0443] 4.1. 키메라 항체 생성 및 생산

[0444] 4종의 선택된 하이브리도마 항체 (mAb14, mAb19, mAb21 및 mAb23)의 가변 영역을 코딩하는 DNA를 합성하고, 인간 IgG 불변 유전자가 미리 포함된 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. 벡터를 재조합 단백질 발현을 위해 포유동물 세포 내로 형질감염시키고, 발현된 항체를 단백질 A 친화성 크로마토그래피 칼럼을 사용하여 정제하였다.

생성된 키메라 항체는 본원에서 c14, c19, c21 및 c23으로 지칭되며, 여기서 접두어 "c"는 "키메라"를 나타내고, 숫자는 하이브리도마 항체 클론을 나타내고, 예를 들어 숫자 "14"는 하이브리도마 항체 mAb14로부터의 것임을 나타낸다.

[0445] 4.2. 키메라 항체 특징화

[0446] 정제된 4종의 키메라 항체를 T 세포 증식에 대한 ATP-매개 억제를 차단하는 활성에 대해 시험하였다 (실시예 3.4에 기재된 방법과 유사함). 도 2에 제시된 바와 같이, 항-CD39 키메라 항체 c14, c19, c21 및 c23은 용량-의존성 방식으로 (100 nM, 10 nM, 1 nM, 0.1 nM, 0.01 nM 및 0.001 nM 범위의 농도에서) $CD4^+$ T 세포 증식에 대한 억제를 차단하였다. CFSE-$CD4^+$ T 및 hIgG4를 ATP-매개 T 세포 증식에 대한 양성 및 음성 대조군으로서 각각 사용하였다.

[0447] 정제된 4종의 키메라 항체를 ATP의 존재 하에 ATP 유도된 수지상 세포 (DC) 활성화 및 성숙을 증진시키는 능력에 대해 추가로 시험하였다. ATP는 단핵구-유래 수지상 세포 상의 P2Y11 수용체의 자극을 통해 DC 성숙을 유도한다.

[0448] 간략하게, 인간 단핵구를 인간 건강한 혈액으로부터 단리하고, GM-CSF 및 IL-4의 존재 하에 6일 동안 MoDC로 분화시켰다. 이어서, 분화된 MoDC를 상이한 용량으로 4종의 항-CD39 키메라 항체를 사용하여 ATP의 존재 하에 추가로 24시간 동안 처리하였다. 이어서, FACS 검정에 의해 CD86, CD83 및 HLA-DR 발현을 분석함으로써 DC 성숙을 평가하였다.

[0449] 도 3은 FACS에 의한 DC 표면 상의 CD39의 수준을 보여준다. 도 4a 내지 4c는 항체 처리 후의 CD86 (도 4a), CD83 (도 4b) 및 HLA-DR (도 4c) 발현을 각각 보여준다. ATP 유도된 DC 성숙은 비히클 처리와 비교하여 CD86, CD83 및 HLA-DR의 증가된 발현에 의해 나타났다. 모든 4종의 항-CD39 항체 c14, c19, c21 및 c23은 ATP 유도된 DC 성숙을 증진시키는 데 유의한 효과를 나타냈다.

[0450] 키메라 항체를 또한 항종양 활성에 대해 생체내에서 시험하였다. NOD-SCID 마우스에 종양 발생을 위해 매트리겔 혼합된 PBS (1:1) 0.1 ml 중 종양 세포 (10×10^6개)를 우측 후방 측복부 영역에 피하 접종하였다. 평균 종양 크기가 대략 80 mm^3에 도달할 때 마우스를 군으로 무작위화하였다. 치료는 30 mg/kg으로 무작위화와 동일한 날에 개시하여 매주 2회 투여하였다. 종양 부피를 캘리퍼를 사용하여 2차원으로 무작위화 후 1주에 2회 측정하고, 부피를 하기 식을 사용하여 mm^3로 나타냈다: $V = (L \times W \times W)/2$, 여기서 V는 종양 부피이고, L은 종양 길이 (최장 종양 치수)이고, W는 종양 폭 (L에 수직인 최장 종양 치수)이다. 투여뿐만 아니라 종양 및 체중 측정을 층류 캐비닛에서 수행하였다. 그래프패드 프리즘에 의해 이원 ANOVA를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0451] 키메라 항-CD39 항체 c23의 종양 성장 결과를 도 5에 제시하였다. c23의 인간 IgG1 이소형 및 IgG4 이소형 둘 다를 수득하고 시험하였다. c23-hIgG4 및 c23-hIgG1 키메라 항체 둘 다는 비히클 군과 비교하여 항종양 효능을 입증하였고, c23-hIgG4와 c23-hIgG1 사이에 유의한 차이는 확인되지 않았다.

[0452] 실시예 5. 항체 인간화 및 친화도 성숙

[0453] 5.1. 인간화

[0454] 키메라 항체 c23 및 c14를 인간화를 위한 클론으로서 선택하였다. 항체 서열을 인간 배선 서열과 정렬하여 최적 피트 모델을 확인하였다. 가장 잘 매칭되는 인간 배선 서열을 원래의 마우스 항체 서열에 대한 상동성에 기초하여 인간화를 위한 주형으로서 선택하였다. 이어서, 마우스 항체 서열로부터의 CDR을 항체의 상부 및 중심 코어 구조를 유지하기 위해 잔기와 함께 주형 상에 그라프팅하였다. 최적화된 돌연변이를 프레임워크 영역에 도입하여 인간화 중쇄 가변 영역의 변이체 및 인간화 경쇄 가변 영역의 변이체를 생성하고, 이를 혼합하고 매칭하여 다중 인간화 항체 클론을 제공하였다. 그라프팅 및 돌연변이 후에, 인간화 항체는 인간 CD39 발현 세포에 대해 유사한 결합 친화도를 보유하였다. 인간화 항체를 CD39 ATPase 억제 검정 및 시험관내 면역 세포 활성화 검정에 의해 추가로 평가하였다. 생체내 연구를 또한 인간화 항체의 일부에 대해 수행하였다.

[0455] c23에 대해 인간화 c23 중쇄 가변 영역의 7종의 변이체 (즉, hu23.VH_1, hu23.VH_2, hu23.VH_3, hu23.VH_4, hu23.VH_5, hu23.VH_6, 및 hu23.VH_7) 및 인간화 c23 경쇄 가변 영역의 7종의 변이체 (즉, hu23.VL_1, hu23.VL_2, hu23.VL_3, hu23.VL_4, hu23.VL_5, hu23.VL_6, 및 hu23.VL_7)를 혼합하고 매칭시켜 총 31종의 인간화 항체 클론을 수득하였다. 31종의 인간화 항체 클론을 상기 표 9 및 하기 표 13, 14 및 15에 제시된 바와 같

이 hu23.H1L1, hu23.H1L2 등으로 지정하였으며, 여기서 접두어 "hu"는 "인간화"를 나타내고, 접미어 "H1L1"은 예를 들어 hu23.VH_1 변이체 및 hu23.VL_1 변이체 가변 영역을 갖는 c23 인간화 항체 클론의 일련번호를 나타낸다.

[0456] 표 13. c23에 대한 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역.

	hu23.VL_1 (SEQ ID NO: 61)	hu23.VL_2 (SEQ ID NO: 63)	hu23.VL_3 (SEQ ID NO: 65)	hu23.VL_4 (SEQ ID NO: 67)
hu23.VH_1 (SEQ ID NO: 60)	hu23.H1L1 (SEQ ID NO: 60/61)	hu23.H1L2 (SEQ ID NO: 60/63)	hu23.H1L3 (SEQ ID NO: 60/65)	hu23.H1L4 (SEQ ID NO: 60/67)
hu23.VH_2 (SEQ ID NO: 62)	hu23.H2L1 (SEQ ID NO: 62/61)	hu23.H2L2 (SEQ ID NO: 62/63)	hu23.H2L3 (SEQ ID NO: 62/65)	hu23.H2L4 (SEQ ID NO: 62/67)
hu23.VH_3 (SEQ ID NO: 64)	hu23.H3L1 (SEQ ID NO: 64/61)	hu23.H3L2 (SEQ ID NO: 64/63)	hu23.H3L3 (SEQ ID NO: 64/65)	hu23.H3L4 (SEQ ID NO: 64/67)
hu23.VH_4 (SEQ ID NO: 66)	hu23.H4L1 (SEQ ID NO: 66/61)	hu23.H4L2 (SEQ ID NO: 66/63)	hu23.H4L3 (SEQ ID NO: 66/65)	hu23.H4L4 (SEQ ID NO: 66/67)

[0457]

[0458] 표 14. c23에 대한 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역.

	hu23.VL_1 (SEQ ID NO: 61)	hu23.VL_5 (SEQ ID NO: 143)	hu23.VL_6 (SEQ ID NO: 144)	hu23.VL_7 (SEQ ID NO: 145)
hu23.VH_1 (SEQ ID NO: 60)	hu23.H1L1 (SEQ ID NO: 60/61)	hu23.H1L5 (SEQ ID NO: 60/143)	hu23.H1L6 (SEQ ID NO: 60/144)	hu23.H1L7 (SEQ ID NO: 60/145)
hu23.VH_5 (SEQ ID NO: 140)	hu23.H5L1 (SEQ ID NO: 140/61)	hu23.H5L5 (SEQ ID NO: 140/143)	hu23.H5L6 (SEQ ID NO: 140/144)	hu23.H5L7 (SEQ ID NO: 140/145)
hu23.VH_6 (SEQ ID NO: 141)	hu23.H6L1 (SEQ ID NO: 141/61)	hu23.H6L5 (SEQ ID NO: 141/143)	hu23.H6L6 (SEQ ID NO: 141/144)	hu23.H6L7 (SEQ ID NO: 141/145)
hu23.VH_7 (SEQ ID NO: 142)	hu23.H7L1 (SEQ ID NO: 142/61)	hu23.H7L5 (SEQ ID NO: 142/143)	hu23.H7L6 (SEQ ID NO: 142/144)	hu23.H7L7 (SEQ ID NO: 142/145)

[0459]

[0460] 표 15. c23에 대한 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역.

	hu23.VL_201 (SEQ ID NO: 111)	hu23.VL_203 (SEQ ID NO: 112)	hu23.VL_211 (SEQ ID NO: 63)
hu23.VH_201 (SEQ ID NO: 146)	hu23.201 (SEQ ID NO: 146/111)	hu23.203 (SEQ ID NO: 146/112)	-
hu23.VH_207 (SEQ ID NO: 147)	hu23.207 (SEQ ID NO: 147/111)	-	-
hu23.VH_211 (SEQ ID NO: 39)	-	-	hu23.211 (SEQ ID NO: 39/63)

[0461]

[0462] 유사하게, c14에 대해 인간화 c14 중쇄 가변 영역의 4종의 변이체 (즉, hu14.VH_1, hu14.VH_2, hu14.VH_3, 및 hu14.VH_4) 및 인간화 c14 경쇄 가변 영역의 4종의 변이체 (즉, hu14.VL_1, hu14.VL_2, hu14.VL_3, 및 hu14.VL_4)를 혼합하고 매칭시켜 총 16종의 인간화 항체를 수득하였다. 16종의 인간화 항체 클론을 동일한 이유로 하기 표 16에 제시된 바와 같이 hu14.H1L1, hu14.H1L2 등으로 지정하였다.

[0463] 표 16. c14에 대한 16종의 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역

	hu14.VL_1 (SEQ ID NO: 69)	hu14.VL_2 (SEQ ID NO: 71)	hu14.VL_3 (SEQ ID NO: 73)	hu14.VL_4 (SEQ ID NO: 75)
hu14.VH_1 (SEQ ID NO: 68)	hu14.H1L1 (SEQ ID NO: 68/69)	hu14.H1L2 (SEQ ID NO: 68/71)	hu14.H1L3 (SEQ ID NO: 68/73)	hu14.H1L4 (SEQ ID NO: 68/75)
hu14.VH_2 (SEQ ID NO: 70)	hu14.H2L1 (SEQ ID NO: 70/69)	hu14.H2L2 (SEQ ID NO: 70/71)	hu14.H2L3 (SEQ ID NO: 70/73)	hu14.H2L4 (SEQ ID NO: 70/75)
hu14.VH_3 (SEQ ID NO: 72)	hu14.H3L1 (SEQ ID NO: 72/69)	hu14.H3L2 (SEQ ID NO: 72/71)	hu14.H3L3 (SEQ ID NO: 72/73)	hu14.H3L4 (SEQ ID NO: 72/75)
hu14.VH_4 (SEQ ID NO: 74)	hu14.H4L1 (SEQ ID NO: 74/69)	hu14.H4L2 (SEQ ID NO: 74/71)	hu14.H4L3 (SEQ ID NO: 74/73)	hu14.H4L4 (SEQ ID NO: 74/75)

[0464]

[0465] 또한 c23에 대한 여러 인간화 항체 클론을 효모 디스플레이에 의해 수득하였다. 간략하게, 마우스 중쇄 및 경쇄 서열을 인간 항체 서열의 사내 데이터베이스와 정렬하였다. 최고 상동성을 갖는 주형, IGHV1-3*01 및 IGKV3-11*01을 각각 중쇄 및 경쇄 CDR 그라프팅을 위해 선택하였다. 효모 디스플레이를 사용하는 고처리량 방법에 의해 복귀 돌연변이를 확인하였다. 구체적으로, CDR 입체형태에 기여하는 위치 (버니어(Vernier) 구역 잔기)를 확인하고, DNA 합성 동안 각각의 위치에 주형 및 마우스 잔기 둘 다를 혼입시킴으로써 복귀 돌연변이의 라이브러리를 생성하였다. 최종 후보를 인간 CD39 단백질에 대한 상위 결합제의 서열분석에 의해 확인하였다. 효모 디스플레이를 통해 수득된 c23에 대한 인간화 항체는 hu23.201 (서열식별번호: 146/111의 VH/VL을 가짐), hu23.203 (서열식별번호: 146/112의 VH/VL을 가짐), hu23.207 (서열식별번호: 147/111의 VH/VL을 가짐), 및 hu23.211 (서열식별번호: 39/63의 VH/VL을 가짐)로 지정된다.

[0466] 표 13, 14, 15 및 16의 인간화 항체를 재조합적으로 생산한 후, 결합 친화도에 대해 시험하였고, 이는 특이적 결합 인간 CD39를 보유할 수 있는 것으로 나타났다. 비교적 더 높은 친화도를 갖는 것을 CD39 차단 검정 및 시험관내 면역 세포 활성화 검정을 포함한 기능적 검정에서 추가로 평가하였다.

[0467] 특히, 인간화 항체 hu23.H5L5, hu23.201, hu14.H1L1 및 참조 항체 I394 및 T895를 비아코어 (지이)를 사용하여 인간 CD39에 대한 결합 친화도에 대해 특징화하였다. 간략하게, 시험할 항체를 인간 항체 포획 키트 (지이)를 사용하여 CM5 칩 (지이)에 포획하였다. 6xHis 태그부착된 인간 CD39의 항원을 다중 용량을 위해 연속 희석하고, 180초 동안 30 μl/분으로 주사하였다. 완충제 유동을 400초의 해리 동안 유지하였다. 3 M $MgCl_2$를 칩 재생에 사용하였다. 회합 및 해리 곡선을 1:1 결합 모델로 피팅하고, 각각의 항체에 대한 Ka/Kd/K_D 값을 계산하였다. 시험된 항체의 친화도 데이터를 하기 표 17에 요약한다.

[0468] 표 17. 비아코어 검정에 의해 측정된 바와 같은 인간 CD39에 대한 항체의 결합 친화도.

항체	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D (M)
hu23.H5L5	8.22E+04	1.60E-03	1.95E-08
hu23.201	6.75E+04	1.62E-03	2.40E-08
hu14.H1L1	9.03E+05	4.55E-03	5.03E-09
I394	2.03E+05	1.26E-03	6.21E-09
T895	1.33E+05	1.39E-01	1.04E-06

[0469]

[0470] 또한, 인간화 항체 hu23.H5L5 및 hu14.H1L2, 뿐만 아니라 참조 항체 I394, T895, 및 9-8B를 제조업체의 매뉴얼에 따라 옥텟 검정 (크리에이티브 바이오랩스(Creative Biolabs))을 사용하여 인간 CD39에 대한 결합 친화도에 대해 특징화하였다. 간략하게, 항체를 센서 상에 커플링시킨 다음, 센서를 CD39 구배에 침지시켰다 (200 nM에

서 시작, 2-배 희석 및 총 8회 용량). 그의 결합 반응을 실시간으로 측정하고, 결과를 전반적으로 피팅하였다. 시험된 항체의 친화도 데이터를 하기 표 18에 요약한다.

[0471] 표 18. 옥텟 검정에 의해 측정된 바와 같은 인간 CD39에 대한 항체의 결합 친화도.

항체	K_D (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
hu23.H5L5	6.87E-10	1.36E+05	9.36E-05
hu14.H1L2	8.39E-10	3.89E+05	3.26E-04
I394	4.54E-10	2.56E+05	1.16E-04
T895	6.62E-09	6.71E+05	4.44E-03
9-8B	2.02E-08	1.20E+05	2.43E-03

[0472]

[0473] 또한, 탈아미드화되기 쉬운 1개의 NG 모티프 (N55G56)가 c23 항체에 대한 인간화 항체 클론의 HCDR2에서 확인되었다 (예를 들어 hu23.H5L5). 탈아미드화 부위를 제거하기 위해, 상이한 돌연변이를 N55 또는 G56에 도입하였으며, N55 및 G56은 각각 다양한 잔기로 돌연변이될 수 있지만 인간 CD39에 대한 특이적 결합을 여전히 보유한다는 것이 밝혀졌다. 예를 들어, N55가 G, S 또는 Q에 의해 단일점 대체된 경우에, 항체 결합 친화도가 유지되었고, 인간 CD39에 대한 그의 결합에 대해 부정적인 영향이 없었음이 밝혀졌다. 유사하게, G56이 A 또는 D에 의해 대체된 경우에, 돌연변이체 항체는 또한 인간 CD39에 대한 그의 특이적 결합 및 결합 친화도를 보유하였다. 다른 돌연변이가 또한 작용할 것으로 예상되었다.

[0474] 5.2. 결합 특이성 검출

[0475] ENTPDase 패밀리 구성원에 대한 정제된 인간화 항체 hu23.H5L5의 결합 특이성을 ELISA 검정에 의해 검출하였다. 간략하게, ENTPD1 (즉 CD39) 및 ENTPD 2/3/5/6 단백질을 96-웰 ELISA 플레이트 상에 4℃에서 밤새 코팅하고, 다음 날 ELISA 플레이트를 세척하고, 차단 완충제 (0.05% 트윈20을 함유하는 PBS 중 1% BSA) 200 μL/웰을 사용하여 2시간 동안 차단하였다. 이어서, hu23.H5L5 구배를 웰 내로 재현하고, 항-hIgG-HRP로 염색하였다. 플레이트 세척 후에, 플레이트를 TMB 기질로 발색시키고, 2 N HCl에 의해 정지시켰다. OD450을 플레이트 판독기를 사용하여 기록하고, 그래프패드 프리즘에 의해 도시하였다. hu23.H5L5의 결합 특이성 특성은 도 6에 제시된다. 인간화 항체 hu23.H5L5는 인간 CD39에 특이적으로 결합하지만, 임의의 ENTPD 2/3/5/6 단백질에는 결합하지 않는다는 것을 도 6a로부터 알 수 있다. 도 6b는 음성 대조군 hIgG4가 임의의 ENTPD 1/2/3/5/6 단백질에 결합하지 않는다는 것을 보여준다.

[0476] 5.3. 인간화 항체 특징화

[0477] c23에 대한 인간화 항체의 결합 친화도를 실시예 3.2에 기재된 바와 유사한 방법을 사용하여 FACS에 의해 결정하였다. 우수한 결합 친화도를 보여주는 c23 인간화 항체 클론은 하기 표 19 및 표 20에 열거되어 있고, 또한 도 7a, 7b 및 도 8에 제시되어 있다. EC_{50}은 본 검정에서 신호의 50%에 도달하는 표시된 항체의 농도이다.

[0478] 표 19. MOLP8 세포에 대한 c23 인간화 항체의 결합 활성.

항체	hu23.H1L1	hu23.H1L2	hu23.H1L3	hu23.H1L4	hu23.H2L1
EC_{50}(nM)	~77.07	1.158	2.775	1.498	65.91
항체	hu23.H2L2	hu23.H2L3	hu23.H2L4	c23	
EC_{50}(nM)	0.979	2.033	1.46	1.035	
항체	hu23.H3L1	hu23.H3L2	hu23.H3L3	hu23.H3L4	hu23.H4L1
EC_{50}(nM)	~15.40	1.341	3.29	1.612	ND
항체	hu23.H4L2	hu23.H4L3	hu23.H4L4	이소형	
EC_{50}(nM)	1.151	1.868	1.014	ND	
항체	hu23.H1L1	hu23.H1L5	hu23.H1L6	hu23.H1L7	hu23.H5L1
EC_{50}(nM)	~78.25	ND	ND	ND	0.262
항체	hu23.H5L5	hu23.H5L6	hu23.H5L7	c23	
EC_{50}(nM)	0.177	0.2021	0.179	0.3973	
항체	hu23.H6L1	hu23.H6L5	hu23.H6L6	hu23.H6L7	hu23.H7L1
EC_{50}(nM)	0.2459	0.593	0.237	0.122	0.366
항체	hu23.H7L5	hu23.H7L6	hu23.H7L7	이소형	
EC_{50}(nM)	0.25	0.271	0.25	ND	

[0479]

[0480] ND: 본 실험의 조건 하에 검출가능하지 않음.

[0481] 표 20. MOLP8 세포에 대한 c23 인간화 항체의 결합 활성.

항체	hu23.201	hu23.203	hu23.207	hu23.211	c23	hIgG4
EC_{50}(nM)	1.289	0.429	2.246	1.557	1.279	ND

[0482]

[0483] ND: 본 실험의 조건 하에 검출가능하지 않음.

[0484] c23에 대한 선택된 인간화 항체를 ATPase 억제 검정 (실시예 3.3에 기재된 바와 같음)을 위해 SK-MEL-28 세포 상에서 시험하였다. 도 9a 및 9b는 표시된 항체의 억제 플롯을 보여주며, 이는 표 21에 요약된 바와 같다. Hu23.H5L5 및 hu23.201을 추가의 검증을 위해 선택하였다.

[0485] 표 21. SK-MEL-28 세포에 대한 c23 인간화 항체의 ATPase 억제 활성.

항체	hu23.H7L1	hu23.H7L5	hu23.H7L6	hu23.H1L2	hu23.H1L4	hu23.H2L2	c23
IC_{50} (nM)	0.147	0.144	0.121	0.964	0.59	0.767	0.158
항체	hu23.H4L4	hu23.H5L5	hu23.H5L6	hu23.201	hu23.203	hu23.211	c23
IC_{50} (nM)	0.487	0.122	0.13	0.264	0.32	0.386	0.2092

[0486]

[0487] c14에 대한 인간화 항체의 결합 친화도를 실시예 3.2에 기재된 바와 유사한 방법을 사용하여 인간 CD39를 발현하는 MOLP-8 세포를 사용하여 FACS에 의해 결정하였다.

[0488] 우수한 결합 친화도를 나타내는 c14의 인간화 항체 클론을 도 10a, 10b 및 10c에 제시하였다. EC_{50}을 표 22에 요약하였다.

[0489] 표 22. MOLP8 세포에 대한 c14 인간화 항체의 결합 활성.

항체	hu14.H1L1	hu14.H2L2	hu14.H3L1	hu14.H3L3	hu14.H3L4	hu14.H4L4	c14
EC_{50} (nM)	7.212	6.908	5.952	6.088	6.046	5.459	17.52

[0490]

[0491] 5.4. 에피토프 비닝

[0492] 선택된 인간화 항체를 경쟁적 결합에 대해 시험하였다 (실시예 3.5에 기재된 바와 같은 방법). 인간화 항체 hu23.H5L5 및 hu14.H1L1과 참조 항체의 에피토프 비닝 결과를 도 19a에 제시하였다.

[0493] 경쟁 결과 (도 19a에 제시된 바와 같음)에 기초하여, 2종의 인간화 항-CD39 항체 hu23.H5L5 및 hu14.H1L1은 2종의 상이한 에피토프 군으로 분류될 수 있다 (도 19b 참조). 구체적으로, 항-CD39 항체 hu23.H5L5는 참조 항체 I394, T895 및 9-8B와 고도로 유사한 에피토프에 대해 경쟁하였고, 에피토프 군 I로 분류되었다. T895와 부분적으로 경쟁하는 것 이외에도, hu14.H1L1, c34 및 c35는 시험된 바와 같이 임의의 다른 항체와 경쟁하지 않았고, 에피토프 군 II로 분류되었다.

[0494] 5.5. 최적화된 인간화 항체 특징화

[0495] 5.5.1 hu23.H5L5에 의한 CD39 차단은 세포외 ATP (eATP)의 존재 하에 인간 T 세포 증식을 개선시켰다.

[0496] 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체로 자극된 인간 PBMC를 ATP의 존재 하에 각각 25 nM 인간화 항-CD39 항체 hu23.H5L5 및 비히클과 함께 인큐베이션하였다. 세포 배양 상청액을 각각 IL-2 및 IFN-γ 분비의 검출을 위해 수거하였다. $CD4^+$ T 및 $CD8^+$ T 세포의 증식을 제5일에 FACS에서 셀 트레이스 바이올렛(Cell Trace Violet) 염료 희석에 의해 분석하였다.

[0497] 도 11a 내지 11d에 나타낸 바와 같이, hu23.H5L5는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 증식 둘 다를 유의하게 증진시켰고, 25 nM의 농도에서 그의 IL-2 및 IFN-γ 생산을 활성화시켰다. 도 11a, 11b 및 11d에 나타낸 바와 같이, hu23.H5L5는 PBMC에서 T 세포 활성화를 증진시키는 데 있어서 I394보다 유의하게 더 높은 활성을 나타냈다.

[0498] 인간 $CD8^+$ T 세포를 또한 건강한 공여자 PBMC로부터 단리한 다음, 세포 증식 염료로 표지하고, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체로 활성화시키고, 인간화 항-CD39 항체 hu23.H5L5 또는 참조 항체 I394로 상이한 용량으로 총 5일의 처리 시간 동안 처리하고, 200 μM의 ATP를 CD39 차단 처리의 시작 후 제3일에 세포에 첨가하였다. $CD8^+$ T 세포의 증식 (%), $CD25^+$ 세포 (%) 및 살아있는 세포 (%)를 유동 세포측정법을 사용하여 제5일에 분석하였다.

[0499] 도 23a 내지 23c에 나타낸 바와 같이, hu23.H5L5는 eATP에 의해 억제된 인간 $CD8^+$ T 세포 증식을 유의하게 역전시켰다.

[0500] 인간화 항체 hu23.H5L5 및 hu14.H1L1의 결합 친화도를 실시예 3.2에 기재된 바와 유사한 방법에 따라 FACS에 의해 상이한 세포 상에서 시험하였다.

[0501] 도 12a 내지 12e는 각각 SK-MEL-5 (도 12a), SK-MEL-28 (도 12b), MOLP-8 (도 12c), CHOK1-cynoCD39 (도 12d) 및 CHOK1-mCD39 (도 12e)에 대한 항체 hu23.H5L5 및 hu14.H1L1의 결합 친화도를 보여준다. 참조 항체 T895 및 I394를 대조군 항체로서 동시에 시험하였다. 도 12에 제시되고 표 23에 요약된 바와 같이, 항체 hu23.H5L5 및 hu14.H1L1 둘 다는 인간 및 시노몰구스 CD39 발현 세포에 용량-의존성 방식으로 및 EC_{50}에 의한 유사한 친화도로 서브-나노몰 또는 나노몰 수준에서 결합하였다. 이들 중 어느 것도 FACS 연구에서 마우스 CD39를 인식하지 않았다. 각각의 항체에 대한 세포 사이에서 상이한 최대 신호 (평균 형광 강도, MFI)는 그의 상이한 발현 수준으로부터 기인한 것일 수 있다.

[0502] 표 23. FACS에 의해 EC_{50} (nM)으로서 측정된 항체 친화도.

[0503]

세포	hu23.H5L5	hu14.H1L1	T895	I394
SK-MEL-5	0.69	7.88	0.21	0.49
SK-MEL-28	0.99	29.14	0.36	0.94
MOLP-8	0.14	0.35	0.11	0.11
CHO-K1/cynoCD39	3.375	ND	4.192	2.708
CHO-K1/mCD39	ND	ND	ND	ND

[0504] ND: 본 실험의 조건 하에 검출가능하지 않음

[0505] 도 13은 참조 항체 T895 및 I394와 유사하게, hu23.H5L5가 SK-MEL-5 세포 (도 13a) 또는 MOLP-8 세포 (도 13b) 상에서 CD39 ATPase 활성을 차단하였음을 보여준다 (실시예 3.3에 기재된 바와 같은 방법). 결과를 표 24에 요약하였다.

[0506] hu23.H5L5는 SK-MEL-5 세포 상에서 70 pM 효소적 차단 IC_{50} 및 MOLP-8 세포 상에서 330 pM을 나타냈으며, 이는 참조 항체 T895 및 I394와 유사하거나 또는 그보다 약간 더 우수하였다. 9-8B는 본 검정에서 비-차단제로서 확인되었다.

[0507] 표 24. 인간화 항체의 ATPase 활성 억제 (IC_{50}) (nM)

[0508]

IC_{50} (nM)	hu23.H5L5	T895	I394	9-8B
SK-MEL-5	0.07	0.09	0.10	ND
MOLP-8	0.33	0.51	0.21	ND

[0509] ND: 본 실험의 조건 하에 검출가능하지 않음

[0510] 5.5.2 hu23.H5L5에 의한 CD39 차단은 ATP-매개 단핵구 활성화를 증진시켰다.

[0511] 인간화 항체 hu23.H5L5를 또한 ATP-매개 단핵구 활성화 검정에서 시험하였다. ATP-매개 염증유발 활성은 단핵구를 포함한 다중 면역 세포 유형의 기능을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. CD39 차단이 ATP-매개 단핵구 활성화를 증진시킬 수 있는지 여부를 평가하기 위해, 인간 단핵구를 인간 건강한 혈액으로부터 정제한 다음, ATP의 존재 하에 0.2 nM 내지 100 nM 범위의 다양한 농도의 항-CD39 항체와 함께 인큐베이션하였다. Hu23.H5L5는 0.2 nM, 즉 시험된 최저 농도에서 단핵구 활성화를 유도하는 데 효과적인 것으로 나타났다. 단핵구 활성화를 FACS 검정에 의해 CD80 (도 14a), CD86 (도 14b) 및 CD40 (도 14c) 발현을 분석함으로써 평가하였다 (hu23.H5L5의 농도는 50 nM임). 참조 항-CD39 항체 I394 및 T895를 대조군으로서 사용하고, hIgG4를 이소형 대조군으로서 사용하였다.

[0512] 결과를 도 14에 제시한다. ATP 단독의 자극은 CD80 및 CD86의 상향조절된 발현을 입증하였으며, 이는 단핵구 활성화를 나타낸다. 항-CD39 인간화 항체 hu23.H5L5는 참조 항체 I394와 대등한 수준에서 CD80, CD86 및 CD40의 상향조절에 의해 입증된 바와 같이 ATP-매개 단핵구 활성화를 추가로 증진시켰다. 참조 항체 T895는 ATP 유도된 활성화된 단핵구에 대해 유의한 효과를 나타내지 않았다.

[0513] 5.5.3 hu23.H5L5에 의한 CD39 차단은 ATP-매개 DC 활성화를 증진시켰다.

[0514] 선택된 인간화 항체 hu23.H5L5를 또한 ATP-매개 DC 활성화 검정에서 시험하였다 (실시예 4.2에 기재된 유사한 방법에 따름). 간략하게, DC 성숙을 FACS 검정에 의해 CD83 발현을 분석함으로써 평가하였다. ATP는 CD83의 증가된 발현을 나타냄으로써 DC 성숙을 유도하였다 (도 15a). Hu23.H5L5는 0.2 nM만큼 낮은 수준에서 시작하여 용량-의존성 방식으로 CD83 발현을 증가시켰고, 0.6 nM의 항체 수준에서 CD83 발현을 유의하게 증가시켰다. 이는 임의의 참조 항체 T895 및 I394보다 더 강력하다.

[0515] T 세포 활성화에 대한 ATP-매개 DC 활성화의 결과적인 효과를 추가로 평가하기 위해, ATP-활성화 DC를 세척한

다음, 혼합 림프구 반응 (MLR)을 위해 동종 T 세포와 함께 인큐베이션하였다. T 세포 증식 (도 15b) 및 활성화된 T 세포로부터의 IFN-γ 생산을 분석하였다 (도 15c).

[0516] 참조 항체 I394 및 T895와 비교하여, 항-CD39 항체 hu23.H5L5는 ATP 유도된 DC 성숙을 증진시키는 것에 대해 용량-의존성인 유의한 효과를 나타냈고, 참조 I394는 유사하지만 약간 더 약한 활성을 나타낸 반면, T895의 효과는 매우 경미하였다. 일관되게, 도 15b 및 15c에 제시된 바와 같이, 항-CD39 차단 항체 hu23.H5L5에 의한 증진된 ATP-매개 MoDC 성숙은 MLR 검정에서 보다 높은 T 세포 증식 및 IFN-γ 생산을 유발하였다.

[0517] 5.5.4 hu23.H5L5에 의한 CD39 차단은 LPS 자극에 의해 유도된 인간 대식세포 IL1β 방출을 촉진하였다.

[0518] 인간 $CD14^+$ T 세포를 인간 건강한 PBMC로부터 단리한 후, 농축된 $CD14^+$ 단핵구를 6-웰 플레이트에 웰당 2×10^6 개의 밀도로 시딩하고, 100 ng/mL 인간 GM-CSF와 함께 6일 동안 배양하여 M1-유사 대식세포를 생성하였다. 시험관내 분화된 대식세포를 증가하는 용량의 hu23.H5L5 또는 참조 항체 I394로 1시간 동안 처리하고, 후속적으로 10ng/mL LPS로 3시간 동안 자극한 후, 800 μM ATP를 2시간 동안 첨가하였다. 세포 배양 상청액 내의 IL-1β를 ELISA에 의해 정량하였다.

[0519] 결과를 도 20에 제시한다. 별표는 각각의 조건 사이의 유의한 차이를 나타낸다. 도 20에 제시된 바와 같이, hu23.H5L5는 LPS 자극에 의해 유도된 인간 대식세포 IL1β 방출을 유의하게 촉진하였고, hu23.H5L5는 LPS 자극에 의해 유도된 인간 대식세포 IL1β 방출을 촉진하는 데 있어서 참조 항체 I394보다 유의하게 더 높은 활성을 나타냈다.

[0520] 5.6. 생체내 연구

[0521] 인간화 항체 hu23.H5L5 및 hu14.H1L1의 효과를 실시예 4.2에 기재된 방법에 따라 MOLP-8 이종이식편 마우스에 대해 결정하였다.

[0522] 결과를 도 16에 제시하고, 모든 항-CD39 항체는 비히클 군에 비해 종양 성장을 억제하였다. I394에 대해 관찰된 효능은 hu23.H5L5 및 hu14.H1L1을 포함한 다른 항체보다 약간 더 약했다.

[0523] 인간화 항체 hu23.H5L5의 항종양 효능을 또한 실시예 4.2에 기재된 방법에 따라 다양한 상이한 투여량 (0.03 mg/kg, 0.3 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg, i.p., BIW x 6회 용량)을 시험함으로써 PBMC 채택 동물 모델 (NCG 마우스, MOLP-8 세포를 접종함, 5 M/마우스)에서 생체내 시험하였다.

[0524] 결과를 도 21에 제시한다. 도 21에 제시된 바와 같이, 인간화 항체 hu23.H5L5는 모든 시험된 투여량에서 종양 성장을 강력하게 억제한다.

[0525] 본 발명자들은 또한 항-CD39 항체의 항종양 효능이 NK 세포 또는 대식세포 세포에 의존성인지 여부를 결정하였다. 항-아시알로-GM1의 NK 고갈 치료를 제7일에 20 μl/마우스에서 5일마다 1회 복강내로 개시하였다. 클로드로네이트 리포솜의 대식세포 고갈 처리를 또한 제7일 및 제9일에 200 μl/마우스로 정맥내로, 1주에 1회 개시하였다. 혈액 샘플 분석 데이터는 단핵 식세포 또는 NK가 시약에 의해 유의하게 제거되었음을 입증하였다.

[0526] NK (도 17) 또는 대식세포 (도 18) 세포가 고갈된 모델에서, hu23.H5L5의 종양 성장 억제 효과는 무효화되었으며, 이는 항-CD39 항체의 항종양 효과가 NK 세포 및 대식세포에 의존성이었음을 시사한다.

[0527] 구체적으로, 도 17에 제시된 바와 같이, 항-아시알로-GM1은 비히클에 비해 후기 단계에서 종양 성장을 약간 증진시켰다. 그리고 hu23.H5L5 처리군과 비교하여, 그의 항-아시알로-GM1과의 조합은 hu23.H5L5 종양 성장 억제 효능을 완전히 무효화하였다. 도 18에 나타낸 바와 같이, 클로드로네이트 리포솜은 비히클과 비교하여 종양 성장에 대한 효과가 없었다. 그러나, 클로드로네이트 리포솜 처리는 hu23.H5L5의 종양 성장 억제 효능을 완전히 무효화하였다.

[0528] 실시예 6. 에피토프 맵핑

[0529] 항-CD39 항체의 에피토프를 규정하기 위해, 인간 CD39의 표면 상에서 분자 표면에 노출된 아미노산의 치환에 의해 CD39 돌연변이체를 설계하고 규정하였다. 하기 표 25에 제시된 바와 같이, 돌연변이체를 C-말단 EGFP 서열을 융합시킨 발현 벡터 내로 클로닝하고, HEK-293F 세포에서 형질감염시켰다. 표적화된 아미노산 돌연변이는 인간 CD39의 야생형 아미노산 서열인 유니프롯(UniProt)KB - P49961 (ENTP1_인간)의 넘버링을 사용하여 제시되고, 본원에서 서열식별번호: 162로 제시된다. 예를 들어, V77G는 서열식별번호: 162의 위치 77에서의 발린이 글리신에 의해 대체된 것을 의미한다.

[0530] 표 25. 인간 CD39 돌연변이체

돌연변이체 ID	치환
KW27-1	V77G, H79Q, Q444K, G445D
KW27-2	V81S, E82A, R111A, V115A
KW27-3	E110A, R113T, E114A
KW27-4	R118A, S119A, Q120K, Q122H, E123A
KW27-5	D150A, E153S, R154A, S157K, N158A, L278F
KW27-6	Q96A, N99A, E143A, R147E
KW27-7	K188R, KTPGGS에 의해 치환된 190-206(SQKTRWFSIVPYETNNQ)
KW27-8	A273S, N275A, I277S, R279A
KW27-9	S294A, K298G, K303A, E306A, T308K, Q312A
KW27-10	K288E, K289A, V290A, E315R
KW27-11	Q354A, D356S, E435A, H436Q
KW27-12	H428A, T430A, A431D, D432A
KW27-13	N371K, L372K, E375A, K376G, V377S
KW27-14	K388N, Q392K, P393S, E396A
KW27-15	A402P, G403A, K405A, E406A
KW27-16	K5A, E100A, D107A
KW27-17	Q323A, Q324A, Q327A, E331K
KW27-18	N334A, S336A, Y337G, N346A

[0531]

KW27-19	Q228A, I230S, D234A, Q238A
KW27-20	R138A, M139A, E142K
KW27	SEQ ID NO: 162 (야생형 인간 CD39) 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

[0532]

[0533] 간략하게, 인간 CD39 돌연변이체를 유전자 합성에 의해 생성한 다음, 발현 벡터 pCMV3-GFPSpark 내로 클로닝하였다. 검증된 돌연변이된 서열을 함유하는 벡터를 제조하고, HEK293F 세포 내로 형질감염시켰다. 형질감염 3일 후에, 세포를 수집하여 EGFP를 트랜스진 발현에 대해 시험하였다. 다양한 투여량의 항체 (100 nM에서 시작, 3배 희석, 11개 포인트)를 20종의 생성된 돌연변이체 상에서 시험하고, FACS에 의해 알렉사플루오르647 표지된 항-hIgG에 의해 염색하였다. 항체 결합은 알렉사플루오르647 강도를 GFP 강도로 나눈 것으로부터 유래된 상대 결합으로서 기재되었다. 결과를 도 22에 제시하였다.

[0534] 도 22에 제시된 바와 같이, 인간화 항체 hu23.H5L5는 돌연변이체 KW27-6 및 KW27-20에 대한 결합을 상실하였지만, 다른 돌연변이체에 대해서는 그렇지 않았다. 돌연변이체 KW27-6은 잔기 Q96, N99, E143 및 R147에서 아미노산 치환을 함유하며, 이는 돌연변이체의 잔기 중 1개 이상 또는 모두가 hu23.H5L5의 코어 에피토프에 중요하다는 것을 나타내고; 돌연변이체 KW27-20은 잔기 R138, M139 및 E142에서 아미노산 치환을 함유하며, 이는 돌연변이체의 잔기 중 1개 이상 또는 모두가 또한 hu23.H5L5의 코어 에피토프에 중요하다는 것을 나타낸다.

[0535] 도 22에 제시된 바와 같이, 키메라 항체 c34는 돌연변이체 KW27-16에 대한 결합을 상실하였지만, 임의의 다른 돌연변이체에 대해서는 그렇지 않았다. 돌연변이체 KW27-16은 잔기 K5, E100 및 D107에서 아미노산 치환을 함유하며, 이는 돌연변이체의 잔기 중 1개 이상 또는 모두가 c34의 코어 에피토프에 중요하다는 것을 나타낸다.

[0536] 도 22에 제시된 바와 같이, 키메라 항체 c35는 돌연변이체 KW27-2에 대한 결합을 상실하였지만, 임의의 다른 돌연변이체에 대해서는 그렇지 않았다. 돌연변이체 KW27-2는 잔기 V81, E82, R111 및 V115에서 아미노산 치환을 함유하며, 이는 돌연변이체의 잔기 중 1개 이상 또는 모두가 c35의 코어 에피토프에 중요하다는 것을 나타낸다.

[0537] 도 22에 제시된 바와 같이, 참조 항체 T895는 돌연변이체 KW27-20에 대한 결합을 상실하였지만, 임의의 다른 돌연변이체에 대해서는 그렇지 않았다. 돌연변이체 KW27-20은 잔기 R138, M139 및 E142에 아미노산 치환을 함유하며, 이는 돌연변이체의 잔기 중 1개 이상 또는 모두가 T895의 코어 에피토프에 중요하다는 것을 나타낸다.

[0538] 도 22에 제시된 바와 같이, 참조 항체 I394는 돌연변이체 KW27-6 및 KW27-20에 대한 결합을 상실하였지만, 다른 돌연변이체에 대해서는 그렇지 않았다. 돌연변이체 KW27-6은 잔기 Q96, N99, E143 및 R147에서 아미노산 치환을 함유하며, 이는 돌연변이체의 잔기 중 1개 이상 또는 모두가 I394의 코어 에피토프에 중요하다는 것을 나타내고; 돌연변이체 KW27-20은 잔기 R138, M139 및 E142에서 아미노산 치환을 함유하며, 이는 돌연변이체의 잔기 중 1개 이상 또는 모두가 또한 I394의 코어 에피토프에 중요하다는 것을 나타낸다.

[0539] 도 22에 제시된 바와 같이, 참조 항체 9-8B는 돌연변이체 KW27-6에 대한 결합을 상실하였지만, 임의의 다른 돌연변이체에 대해서는 그렇지 않았다. 돌연변이체 KW27-6은 잔기 Q96, N99, E143 및 R147에서 아미노산 치환을 함유하며, 이는 돌연변이체의 잔기 중 1개 이상 또는 모두가 9-8B의 코어 에피토프에 중요하다는 것을 나타낸다.

[0540] 실시예 7. 항-CD39/TGFβ 트랩 구축 및 발현

[0541] 항-CD39/TGFβ 트랩 분자는 항-CD39 항체 모이어티의 중쇄 및/또는 경쇄의 N-말단 또는 C-말단에서 TGFβ 수용체 II ECD (TGFβRII ECD)에 연결된 항-CD39 항체 모이어티로서 구축된다. 가요성 $(Gly_4Ser)_3$ 링커가 TGFβRII ECD의 N-말단에 유전자적으로 연결되었다. 항-CD39 항체 모이어티 상의 위치 및 TGFβRII ECD 몰비가 변화된 여러 항-CD39/TGFβ 트랩 분자가 구축되었고, 이들의 개략적 도면이 각각 도 24a-g에서 제시되었다. TGFβ 수용체 I ECD (TGFβRI ECD) 또는 TGFβ 수용체 III ECD (TGFβRIII ECD)에 연결된 항-CD39 항체 모이어티를 포함하는 항-CD39/TGFβ 트랩 분자가 유사한 방식으로 구축될 수 있고, 본원에서 제시되지 않았다.

[0542] 1개의 항-CD39 항체 모이어티 (즉, hu23.H5L5) 및 2개의 TGFβRII ECD (즉, 서열식별번호: 164)를 포함하고, 이때 1개의 TGFβRII ECD가 각각의 중쇄 불변 영역의 C-말단에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1 (도 24a).

[0543] 1개의 항-CD39 항체 모이어티 (즉, hu23.H5L5) 및 4개의 TGFβRII ECD (즉, 서열식별번호: 164)를 포함하고, 이때 2개의 TGFβRII ECD가 각각의 중쇄 불변 영역의 C-말단에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-2 (도 24b).

[0544] 1개의 항-CD39 항체 모이어티 (즉, hu23.H5L5) 및 4개의 TGFβII ECD (즉, 서열식별번호: 164)를 포함하고, 이때 2개의 TGFβRII ECD가 각각의 중쇄 가변 영역의 N-말단에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-3 (도 24c).

[0545] 1개의 항-CD39 항체 모이어티 (즉, hu23.H5L5) 및 4개의 TGFβII ECD (즉, 서열식별번호: 164)를 포함하고, 이때 2개의 TGFβRII ECD가 각각의 경쇄 가변 영역의 N-말단에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-4 (도 24d).

[0546] 1개의 항-CD39 항체 모이어티 (즉, hu23.H5L5) 및 4개의 TGFβII ECD (즉, 서열식별번호: 164)를 포함하고, 이때 1개의 TGFβII ECD가 각각의 중쇄 가변 영역의 N-말단에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결되고, 1개의 TGFβII ECD가 각각의 경쇄 가변 영역의 N-말단에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-5 (도 24e).

[0547] 1개의 항-CD39 항체 모이어티 (즉, hu23.H5L5) 및 4개의 TGFβII ECD (즉, 서열식별번호: 164)를 포함하고, 이때 2개의 TGFβRII ECD가 각각의 경쇄 불변 영역의 C-말단에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-6 (도 24f).

[0548] 1개의 항-CD39 항체 모이어티 (즉, hu23.H5L5) 및 6개의 TGFβII ECD (즉, 서열식별번호: 164)를 포함하고, 이때 1개의 TGFβRII ECD가 각각의 중쇄 불변 영역의 C-말단에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결되고, 2개의 TGFβRII ECD가 각각의 경쇄 불변 영역의 C-말단에서 항-CD39 항체 모이어티에 연결된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-7 (도 24g).

[0549] 발현을 위해, 동일한 발현 벡터 또는 별개의 발현 벡터 내의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA를 사용하여 형질감염을 위한 CHO 세포를 형질감염시켰다. 배양 배지를 수거하고, 융합 단백질을 단백질 A 세파로스 칼럼에 의해 정제하였다.

[0550] 실시예 8. ELISA에 의한 TGFβ에 대한 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 결합

[0551] 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 결합 능력 및 특이성을 결정하기 위해, ELISA 검정을 인간 TGFβ1, 인간 TGFβ2, 인간 TGFβ3 뿐만 아니라 마우스 TGFβ1을 사용하여 수행하였다. 시험된 항원을 눈크(NUNC) 96-웰 이뮤노플레이트 상에 1 μg/ml의 농도로 코팅하였다. 증가하는 농도의 항-CD39/TGFβ 트랩 분자와의 결합을 PBT 완충제 중에 희석된 항-인간 Fc 항체 양고추냉이 퍼옥시다제 접합체로 측정한 다음, TMB 기질로 발색시켰다. 가용성 TGFβ 트랩을 대조군으로서 사용하였다. 도 25a-25c에 제시된 바와 같이, 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1 및 ES014-2는 3가지 모든 TGFβ 상동체: 인간 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3에 결합한다. 다른 시험된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (ES014-3, ES014-4, ES014-5, ES014-6, ES014-7 포함)의 결합 검정 결과는 유사하였고, 본원에 제시되지 않았다. 인간 TGFβ1에 대한 EC_{50}을 하기 표 26에 열거하였다. 또한, 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1은 인간 TGFβ1에 대해서와 유사한 친화도로 마우스 TGFβ1에 결합한다 (도 25d).

[0552] 표 26. 인간 TGFβ1에 대한 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 결합 EC_{50}

항-CD39/TGFβ 트랩	ES014-1	ES014-2	ES014-3	ES014-4
EC_{50} (nM)	0.26	0.26	0.24	0.11
항-CD39/TGFβ 트랩	ES014-5	ES014-6	ES014-7	TGFβRII
EC_{50} (nM)	0.09	0.07	0.09	0.017

[0553]

[0554] 실시예 9. TGFβ 및 TGFβR 차단 검정

[0555] 차단 검정을 위해, TGFβ 펩티드 (TGFβ1)를 마이크로플레이트 상에 코팅하였다. 정제된 항체의 연속 희석물을 TGFβ1-코팅된 플레이트에서 1시간 동안 재조합 TGFβRII-His 단백질 (시노바이올로지칼(SinoBiological))과 함께 인큐베이션하였다. 세척 후, 남아있는 TGFβRII-His를 항-His-HRP 접합된 2차 항체에 의해 검출하였다. 450 nm에서의 흡광도의 값을 TGFβ1에 대한 TGFβRII-His 결합의 정량화를 위해 마이크로타이터 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시스 코포레이션(Molecular Devices Corp)) 상에서 판독하였다. 모든 시험된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (즉 ES014-1, ES014-2, ES014-3, ES014-6)는 인간 TGFβ1이 TGFβ 수용체 TGFβRII에 결합하는 것을 효과적으로 차단할 수 있었다 (도 26, 가용성 TGFβ 트랩 (즉 TGFβRII)이 대조군으로서 사용되었다). 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 IC_{50} 값을 그래프패드 프리즘을 사용하여 분석하였다. 4개 카피의 TGFβRII ECD가 있

는 항-CD39/TGFβ 트랩 분자, 예컨대 ES014-2, ES014-3 및 ES014-6이 ES014-1과 같이 2개 카피의 TGFβRII ECD가 있는 항-CD39/TGFβ 트랩 분자보다 더 강력하다 (표 27).

[0556] 표 27. 인간 TGFβ1 및 TGFβRII에 대한 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 차단 IC_{50}.

항-CD39/TGFβ 트랩	ES014-1	ES014-2	ES014-3	ES014-6	TGFβRII
IC_{50} (nM)	3.73	1.29	0.93	1.09	0.58

[0557]

[0558] 실시예 10. FACS에 의한 CD39에 대한 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 결합

[0559] CD39를 과다발현하는 약 100,000개의 MOLP-8 골수종 세포를 세척 완충제로 세척하고, 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 연속 희석물 100 μl와 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 세척 완충제로 2회 세척하고, 항-인간 Fc-PE 100 μl와 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 세척 완충제로 2회 세척하고, FACS 칸토(Canto) II 분석기 (비디 바이오사이언시스(BD Biosciences)) 상에서 분석하였다. 도 27a에 제시된 바와 같이, 시험된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (예를 들어 ES014-1, ES014-2, ES014-3, ES014-4, ES014-5, ES014-6, ES014-7) 모두가 용량-의존성 방식으로 MOLP-8 세포에 결합하였다. 도 27b에 제시된 바와 같이, ES014-1은 CHOK1/hCD39 세포에 용량-의존성 방식으로 결합하였다. 다른 시험된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (예를 들어 ES014-2, ES014-3, ES014-4, ES014-5, ES014-6, ES014-7)와 CHOK1/hCD39 세포의 결합 특색은 유사하였고, 본원에 제시되지 않았다.

[0560] 실시예 11. CD39 및 TGFβ1에 대한 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 동시 결합.

[0561] CD39/His 단백질 (시노 바이올로지칼(Sino Biological))-코팅된 플레이트 또는 CHO-K1/hCD39 세포를 ES014-1, 항-CD39 Ab 또는 TGFβ 트랩 대조군의 연속 희석물, 이어서 비오티닐화 TGFβ1과 함께 인큐베이션하였다. 결합을 스트렙타비딘-양고추냉이 퍼옥시다제 또는 스트렙타비딘-플루오레세인 이소티오시아네이트를 사용하여 평가하였다. 광학 밀도 (OD)를 450 nm에서 판독하였다. 데이터는 평균 ± SD이고, 비선형 최적 피트가 제시된다 (n = 2의 기술적 반복실험). 결과를 도 28에 제시하였다. 도 28에 제시된 바와 같이, 대표적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (ES014-1)는 각각 ELISA 검출 (도 28a) 및 FACS 검출 (도 28b)에 의해 CD39 및 TGFβ에 동시에 결합할 수 있었다. 다른 시험된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (예를 들어 ES014-2, ES014-3, ES014-4, ES014-5, ES014-6, ES014-7)의 결과는 유사하였고, 본원에서 제시되지 않았다.

[0562] 실시예 12. 항-CD39/TGFβ 트랩 분자는 TGFβ 신호를 억제한다

[0563] HEK-블루™ TGF-β 리포터 세포 검정 (인비보젠(InvivoGen))을 사용하여 정규 TGFβ 신호전달에 대한 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 효과를 평가하였다. 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 또는 항-CD39의 연속 희석물을 재조합 인간 TGF-β1 (5 ng/ml)의 존재 하에 24시간 동안 HEK-블루™ TGF-β 리포터 세포와 함께 인큐베이션하였다. 항-CD39/TGFβ 트랩 분자는 형질감염된 HEK293 세포에서의 TGF-β SMAD 리포터 검정에서 TGF-β 정규 신호전달 [절반-최대 억제 농도 (IC_{50}) = 32 pM]을 차단하였지만, 항-CD39는 그렇지 않았다 (도 29a). 추가로, 항-CD39/TGFβ 트랩 분자를 CD39 단백질과 함께 사전-인큐베이션하는 것은 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 TGF-β 중화 활성에 영향을 미치지 않았다 (도 29b). 도 29a 및 29b는 대표적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1의 결과를 보여준다. 다른 시험된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (예를 들어 ES014-2, ES014-3, ES014-4, ES014-5, ES014-6, ES014-7)의 결과는 유사하였고, 본원에서 제시되지 않았다.

[0564] 실시예 13. 악성 세포 상에서의 CD39 활성에 대한 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 효과

[0565] 악성 세포주 상에서의 CD39의 효소적 활성을 억제하는 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 능력을 셀-타이터 글로 (CTG) 검정을 사용하여 측정하였다. 간략하게, 세포를 60분 동안 항-CD39/TGFβ 트랩 분자, 항-CD39 항체 또는 대조군 항체 및 100 μM ATP로 처리하였다. 남아있는 ATP 수준을 셀타이터글로 발광 검정 키트 (프로메가(Promega))를 사용하여 측정하였다. MOLP-8 (인간 다발성 골수종 세포주) 또는 CHO/hCD39 세포를 본 검정에 사용하였다. 도 30a-b에 제시된 바와 같이, ATP의 존재 하에 MOLP-8 세포를 지시된 바와 같은 다양한 농도의 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 또는 대조군 항체로 처리하면, 시험된 분자 ES014-1, ES014-2 및 ES014-6에 의한 CD39 활성의 용량-의존성 억제가 발생되었다. CD39 활성의 억제를 남아있는 ATP의 정도에 의해 결정하고, % 억제로서 표현하였다. 하기 표 28에 열거된 IC_{50}과 같이, ES014-1, ES014-2 및 ES014-6이 나노몰 IC_{50}의 강한 억제 활성을 나타냈다. 도 30c에 제시된 바와 같이, ATP의 존재 하에, CHO/hCD39 세포를 지시된 바와 같은 다양한 농

도의 예시적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1 또는 대조군 항체로 처리하면, 시험된 모든 항체에 의한 CD39 활성의 용량-의존성 억제가 발생되었다. 다양한 농도의 다른 시험된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (예를 들어 ES014-2, ES014-3, ES014-4, ES014-5, ES014-6, ES014-7)에 의한 CHO/hCD39 세포의 처리 결과는 유사하였고, 본원에서 제시되지 않았다.

[0566] 표 28. MOLP-8 세포 상에서의 CD39 ATPase 활성에 대한 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 IC_{50}

항-CD39/TGFβ 트랩	ES014-1	ES014-2	ES014-6	CD39
IC_{50} (nM)	1.21	3.42	6.9	0.2641

[0567]

[0568] 실시예 14. 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 결합 친화도

[0569] 대표적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1을 제조업체의 매뉴얼에 따라 옥텟(Octet) 검정 (포어바이오(ForeBio))을 개별적으로 사용하여 인간 TGFβ1 또는 CD39에 대한 결합 친화도에 대해 특징화하였다. 간략하게, 항체를 센서 상에 커플링시킨 다음, 센서를 TGFβ 또는 CD39 단백질 구배 (200 nM에서 시작, 2-배 희석 및 총 8회 용량)에 침지시켰다. 그의 결합 반응을 실시간으로 측정하고, 결과를 전반적으로 피팅하였다. 시험된 분자 ES014-1의 친화도 데이터를 하기 표 29에 요약한다. 다른 시험된 분자 (예를 들어 ES014-2, ES014-3, ES014-4, ES014-5, ES014-6, ES014-7)의 친화도 데이터는 유사하였고, 본원에 제시되지 않았다.

[0570] 표 29. 옥텟 검정에 의해 측정된 바와 같은 인간 TGFβ1 및 CD39에 대한 이중특이적 항체 ES014-1의 결합 친화도

결합 표적	**K_D (M)**	**kon (1/Ms)**	**kdis (1/s)**
TGFβ1	3.70E-11	6.32E+06	2.34E-04
CD39	3.76E-10	9.14E+04	3.44E-05

[0571]

[0572] 실시예 15. Treg 억제 검정

[0573] Treg가 TGFβ의 주요 분비 공급원이고, CD39가 Treg 및 DC 상에서 발현되기 때문에, T 세포의 Treg-매개 억제에 대항하는 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 상대적인 능력을 Treg 억제 검정을 사용하여 검사하였다. 간략하게, 인간 PBMC로부터 단리된 $CD3^+$ 총 T 세포를, PBMC로부터 단리된 자가 $CD4^+/CD25^+$ 천연 Treg (nTreg)의 존재 하에 IL-4 및 GM-CSF로 펄싱된 동종 DC에 첨가하고, 1:1:10의 비로 IL2, 항-CD3/CD28 및 라파마이신의 존재 하에 X-vivo 배지에서 확장시켰다.

[0574] 이들 혼합된 림프구를 3일 동안 항-CD39/TGFβ 트랩 분자, 항-CD39 항체, 가용성 TGFβ 트랩 또는 항-CD39 항체와 TGFβ 트랩의 조합물과 함께 배양한 후, CFSE 세포 추적자를 사용한 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 증식 및 HTRF (시스바이오)에 의한 IFNγ 분비를 측정하는 것을 통해 T 세포의 기능을 평가하였다. 예상된 바와 같이, 자가 Treg의 첨가는 동종 DC에 의해 촉발된 T 세포의 활성화를 억제하였다 (도 31a). 대표적인 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1은 자가 Treg의 존재 하에 Treg-매개 억제를 상쇄시키고 T 세포의 활성화를 회복시키는 데 있어서 항-CD39 항체, 가용성 TGFβ 트랩 또는 그의 조합보다 더 효과적이었다 (도 31b-d). 이들 데이터는 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1이 T 세포 기능의 회복에서 항-CD39 항체, 가용성 TGFβ 트랩 또는 그의 조합보다 더 효과적이라는 것을 입증한다. 다른 시험된 분자 (예를 들어 ES014-2, ES014-3, ES014-4, ES014-5, ES014-6, ES014-7)도 유사한 효과를 보였다 (데이터는 제시되지 않음).

[0575] 실시예 16. 항-CD39/TGFβ 트랩 분자는 자극 없이 인간 T 세포 아폽토시스를 억제한다

[0576] 인간 PBMC로부터의 2 x 10^4개의 정제된 총 $CD3^+$ T 세포를 밤새 배양하고, 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1 및 ES014-2, TGFβR 사멸 돌연변이체 ES014_v2, 항-CD39 사멸 돌연변이체 ES014_v1, 및 이중 음성 돌연변이체 ES014_v3과 함께 밤새 동일한 몰 농도로 인큐베이션하였다. 인간 T 세포의 아폽토시스를 제조업체의 지침서에

따라 유동 세포측정법에 의해 APC-표지된 아넥신 V 및 PI에 의해 측정하였다.

[0577] 도 32a 및 도 32b에 제시된 바와 같이, 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1 및 ES014-2는 TGFβR 사멸 돌연변이체 ES014_v2, 항-CD39 사멸 돌연변이체 ES014_v1, 및 이중 음성 돌연변이체 ES014_v3과 비교하여 용량-의존성 방식으로 인간 T 세포 아폽토시스를 억제하였다.

[0578] 실시예 17. 항-CD39/TGFβ 트랩 분자는 자극에 대한 인간 T 세포 생존 및 활성화를 촉진한다

[0579] 5 x 10^3개의 정제된 총 $CD3^+$ T 세포를 동일한 몰의 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1 및 ES014-2, 항-CD39 항체 ES014_v2, TGF-베타 트랩 ES014_v1, 콤보 (ES014_v2 및 ES014_v1) 및 대조군으로서의 이중 돌연변이체 항체 ES014_v3과 함께 4일 동안 항-CD3 및 항-CD28 비드 자극의 존재 하에 공동배양하였다. T 세포 기능을 생존-사멸 염색된 T 생존, 셀트레이스 표지에 의한 T 세포 증식, CD25 발현에 의한 T 활성화 및 시토카인 생산을 측정함으로써 정량화하였다.

[0580] 도 33a에 제시된 바와 같이, 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 군을 제외한 모든 군에서 항-CD3/CD28 자극으로 대부분의 세포가 사멸하였다. 또한, 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 군에서 살아있는 세포는 보다 높은 세포 증식 및 활성화 (도 33a), 및 IL-2 및 IFN-γ 생산 (도 33b)을 유지하였다. 이들 데이터는 항-CD39/TGFβ 트랩 분자가 T 세포 과다-활성화에서 항-CD39 항체, TGFβ 트랩 또는 그의 조합보다 더 효과적이라는 것을 입증한다.

[0581] 실시예 18. 항-CD39/TGFβ 트랩 분자는 총 T 세포 상에서의 TGF-베타 유도 Foxp3 발현을 차단한다

[0582] 5 x 10^4개의 정제된 T 세포를 항-CD3 및 항-CD28 비드 자극의 존재 하에 30분 동안 동일한 몰의 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (ES014-1 및 ES014-2), 항-CD39 항체 (ES014_v2), TGF-베타 트랩 (ES014_v1), 콤보 (ES014_v2+ ES014_v1) 및 대조군 항체 (ES014_v3)로 예비처리하고, 10 ng/ml TGF-베타를 첨가하였다. Treg 분화를 TGF-베타로 4일 동안 처리한 후에 측정하였다.

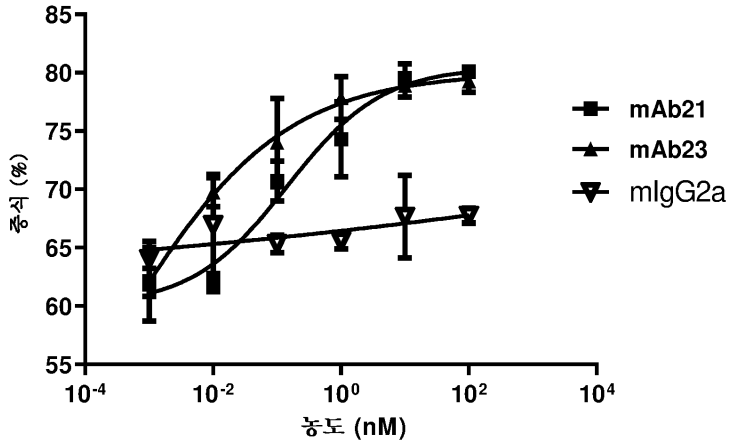
[0583] 도 34a 및 34b에 제시된 바와 같이, 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (ES014-1 및 ES014-2), TGF-베타 트랩 (ES014_v1) 및 콤보 (ES014_v2+ ES014_v1)로의 처리가 배지, 항-CD39 (ES014_v2) 및 대조군 항체 (ES014_v3)로 처리된 것과 비교하여 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 상에서의 TGF-베타 유도 Foxp3 발현을 차단할 수 있었다. 특히, 처리된 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 군, 특히 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 ES014-1에서의 차단 효과가 처리된 TGF-베타 트랩 (ES014_v1) 및 콤보 (ES014_v2+ ES014_v1) 군에서의 것보다 더 양호한 활성을 나타냈다.

[0584] 실시예 19. 항-CD39/TGFβ 트랩 분자는 인간 T 세포 증식에 대한 ATP 유도 억제를 회복시킨다

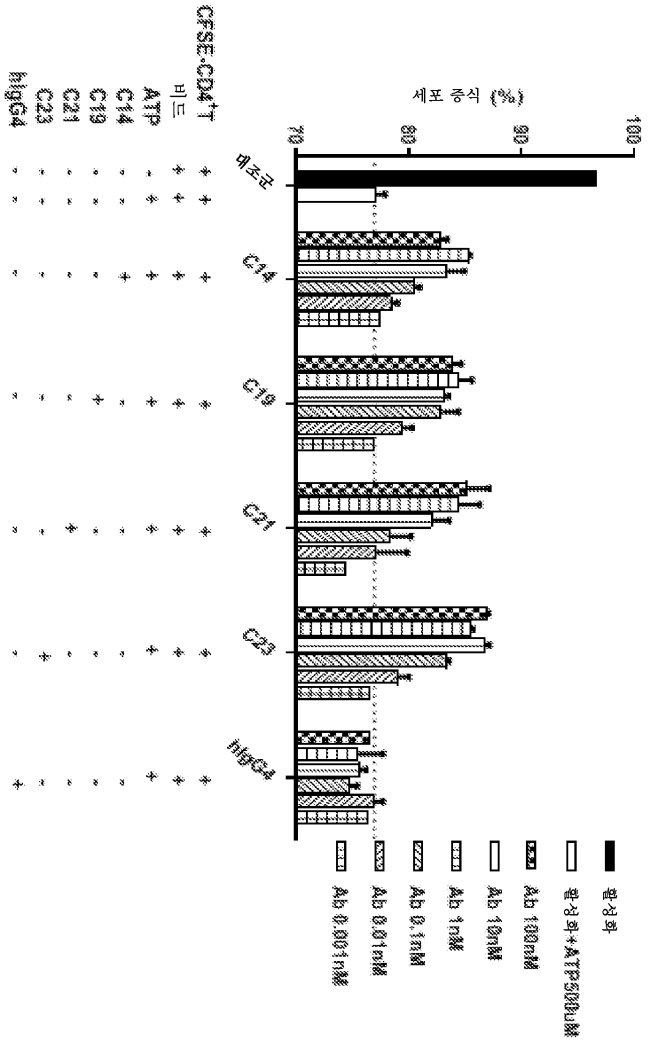
[0585] 5 x 10^4개의 정제된 T 세포를 셀트레이스 바이올렛으로 표지하고, 항-CD3 및 항-CD28 비드 자극의 존재 하에 밤새 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (ES014-1 및 ES014-2), 항-CD39 항체 (ES014_v2), TGF-베타 트랩 (ES014_v1), 콤보 (ES014_v2+ ES014_v1) 및 대조군 항체 (ES014_v3)로 예비처리하였다. 제1일에, 200 μM ATP를 첨가하고, ATP로 3일 동안 처리한 후에 T 증식을 측정하였다. 도 35a 및 35b에 제시된 바와 같이, 항-CD39/TGFβ 트랩 분자 (ES014-1 및 ES014-2), 항-CD39 항체 (ES014_v2) 및 콤보 (ES014_v2+ ES014_v1)로의 처리가 배지, TGF-베타 트랩 (ES014_v1) 및 대조군 항체 (ES014_v3)로 처리된 것과 비교하여 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 증식에 대한 ATP 유도 억제를 역전시킬 수 있었다. 회복된 T 세포 증식 결과는 CD39 활성의 차단에 대한 항-CD39/TGFβ 트랩 분자의 효과를 나타냈고, 이는 ATPase 억제 활성 결과와 일치하였다.

도면

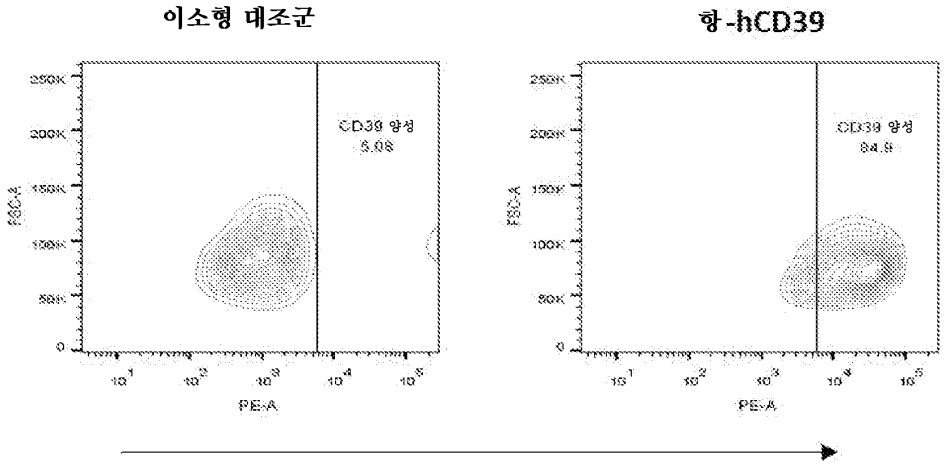
도면1


85
80
75
70
65
60
55
중식 (%)
10-4
10-2
100
102
104
농도 (nM)
mAb21
mAb23
mIgG2a

도면2

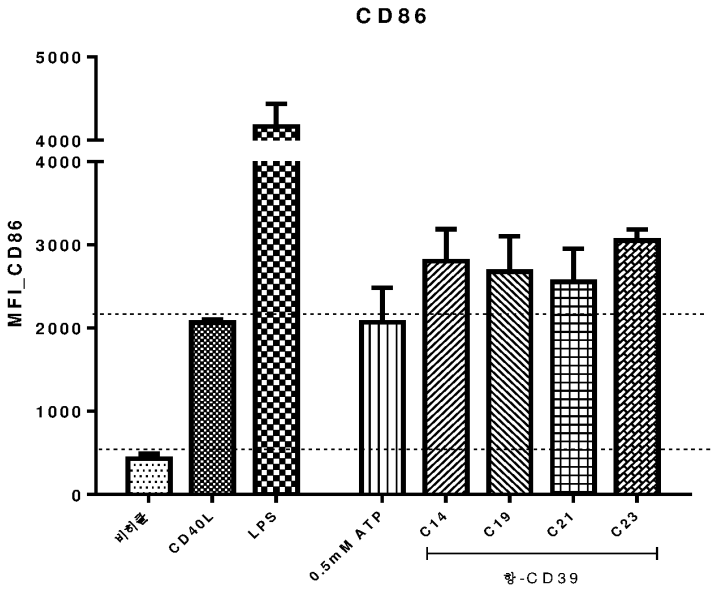

CFSE-CD4+T
비드
ATP
C14
C19
C21
C23
hIgG4
세포 증식 (%)
대조군
C14
C19
C21
C23
hIgG4
Ab 0.001nM
Ab 0.01nM
Ab 0.1nM
Ab 1nM
Ab 10nM
Ab 100nM
클라우+ATP500nM
클라우

도면3

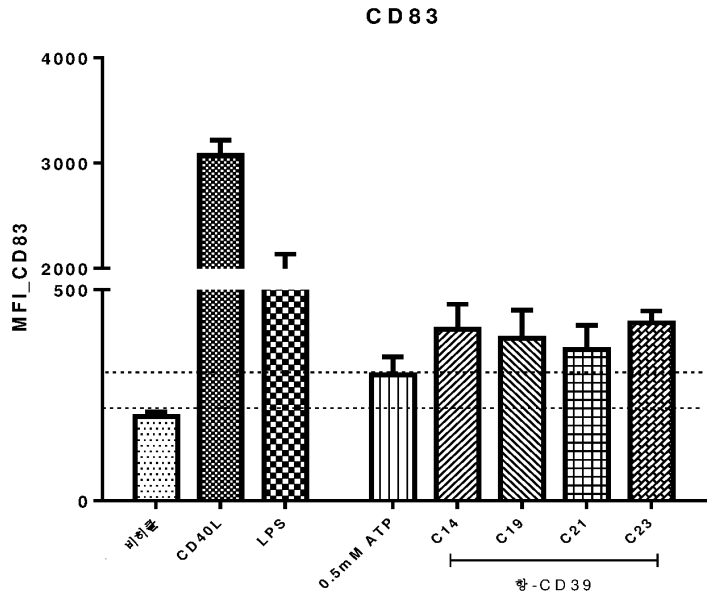


DC에서의 hCD39 발현

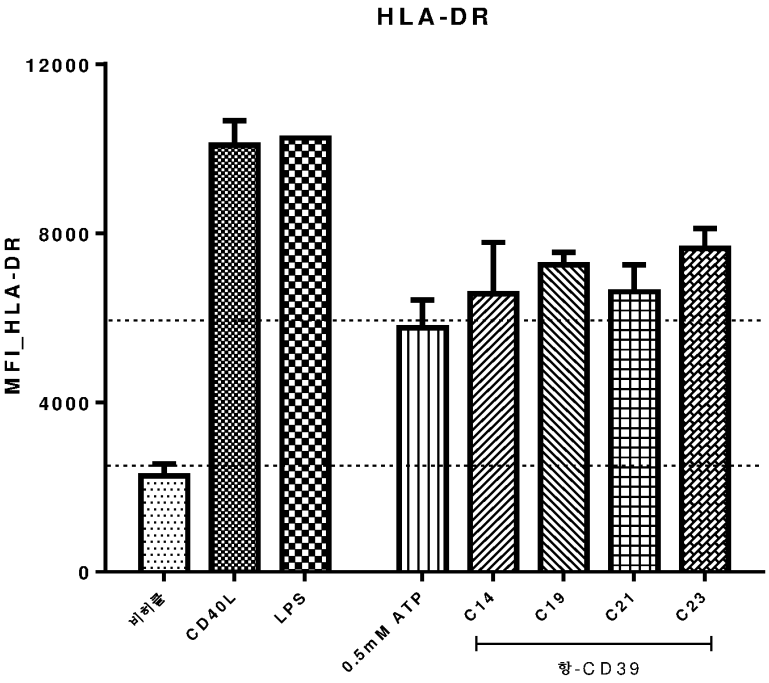
도면4a



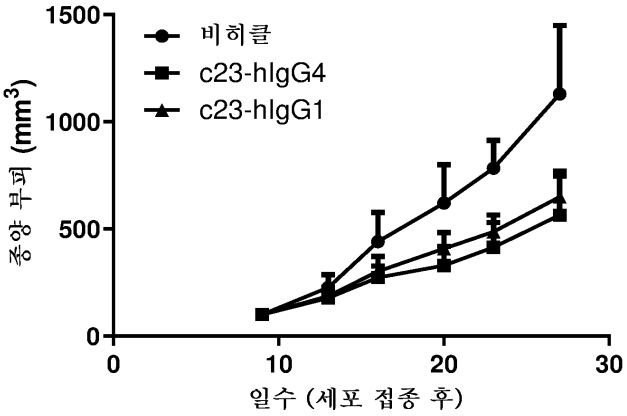
도면4b


CD83
MFI_CD83
4000
3000
2000
500
0
비처리
CD40L
LPS
0.5mM ATP
C14
C19
C21
C23
항-CD39

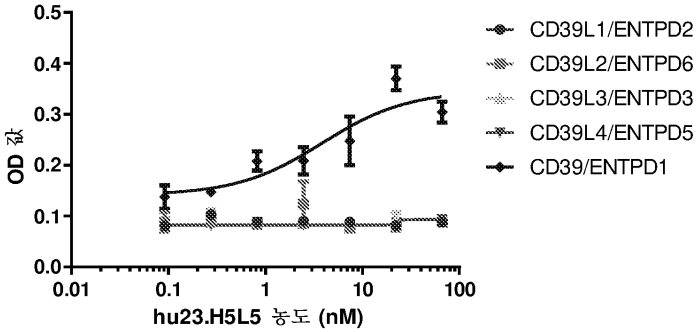
도면4c


HLA-DR
MFI_HLA-DR
12000
8000
4000
0
비처리
CD40L
LPS
0.5mM ATP
C14
C19
C21
C23
항-CD39

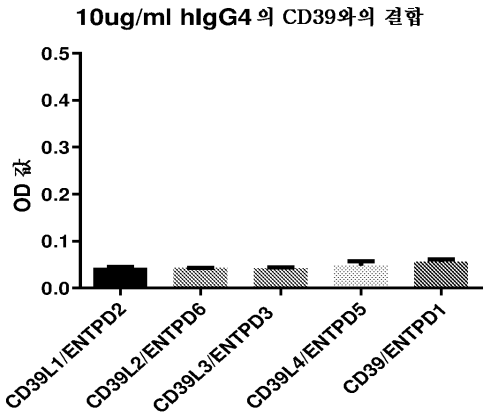
도면5



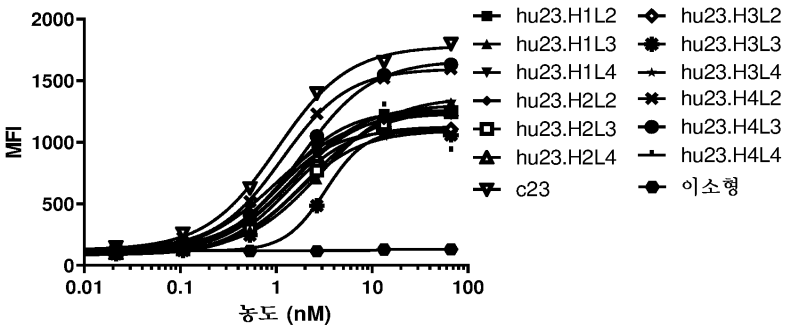
도면6a



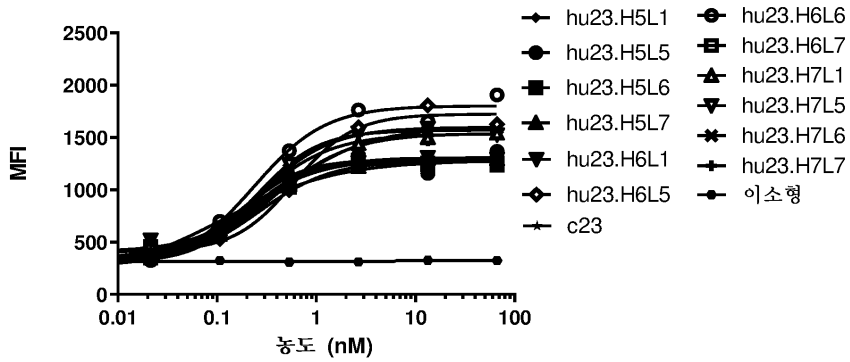
도면6b



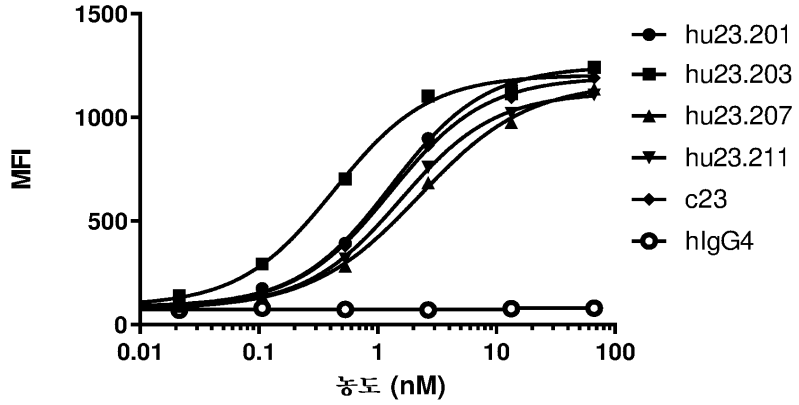
도면7a



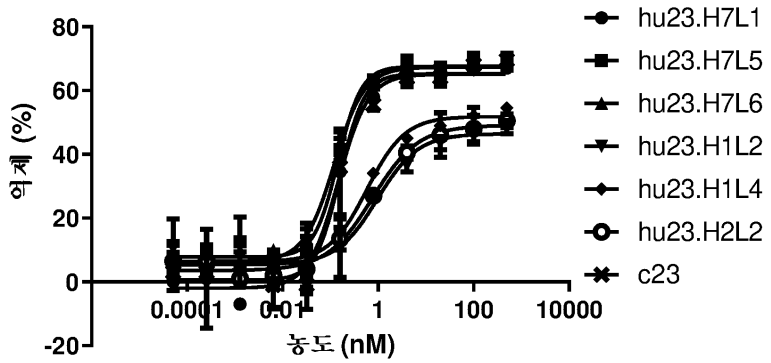
도면7b



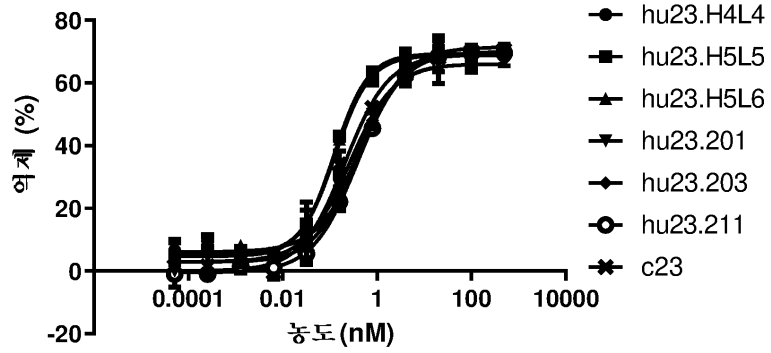
도면8



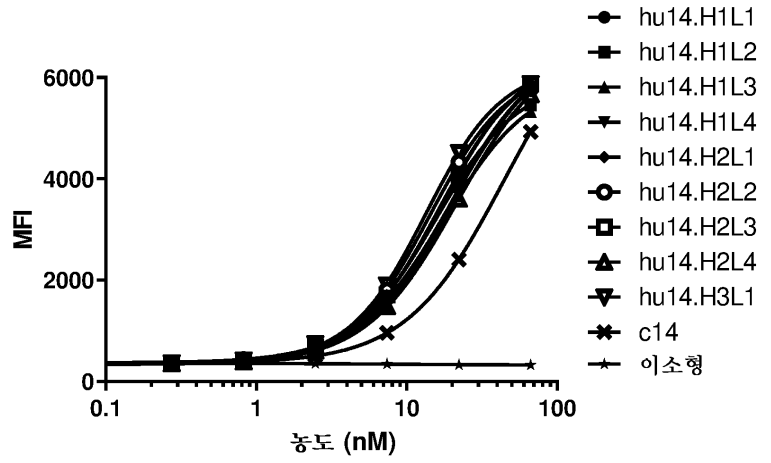
도면9a



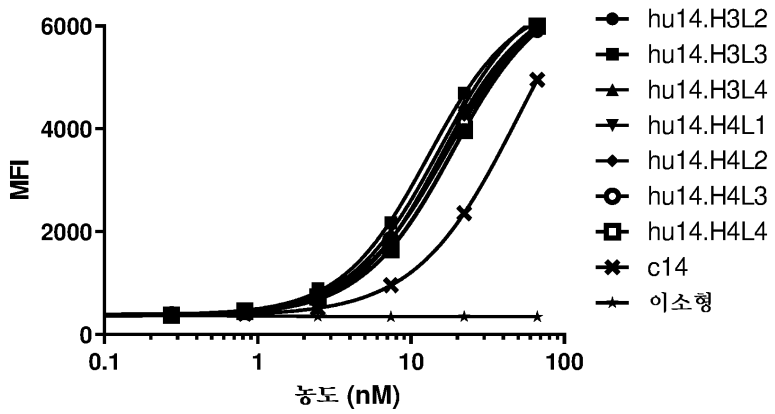
도면9b



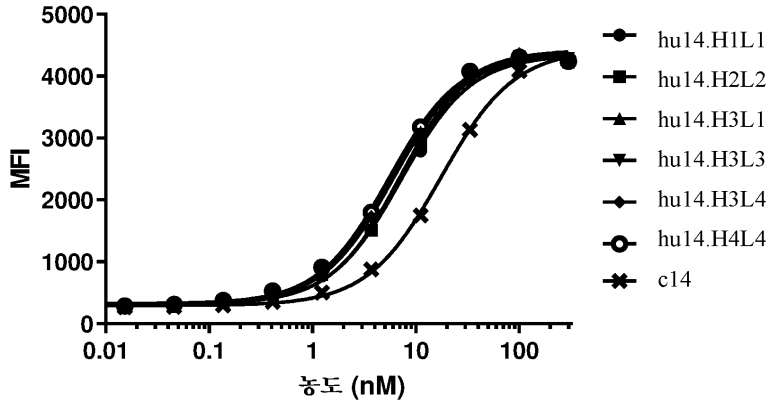
도면10a



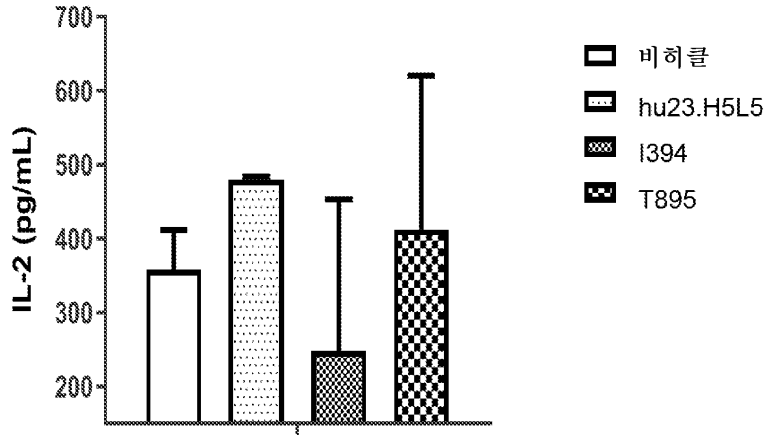
도면10b



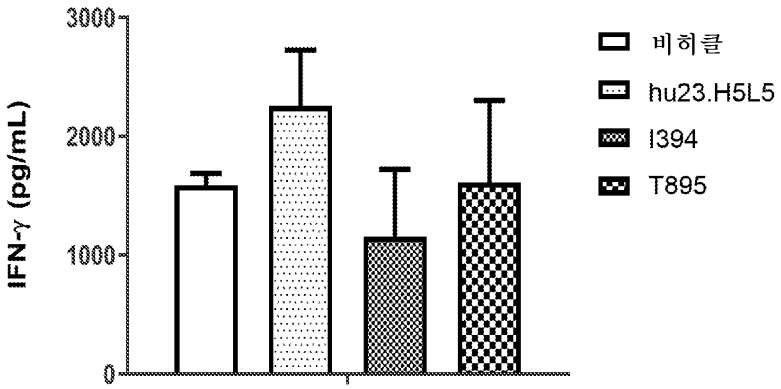
도면10c



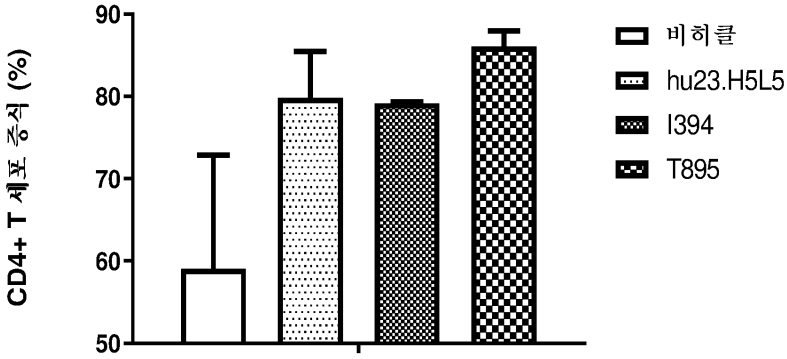
도면11a



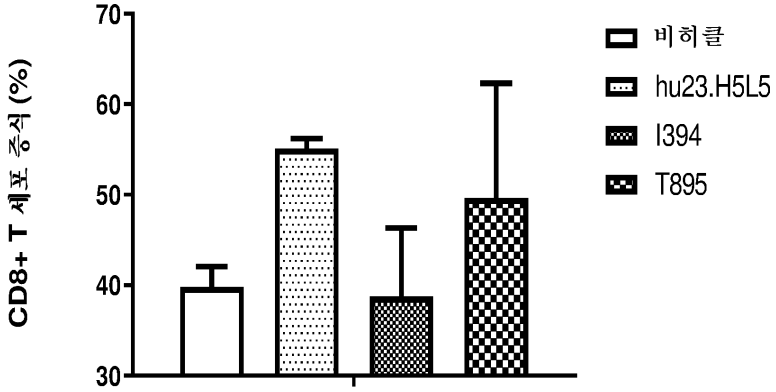
도면11b



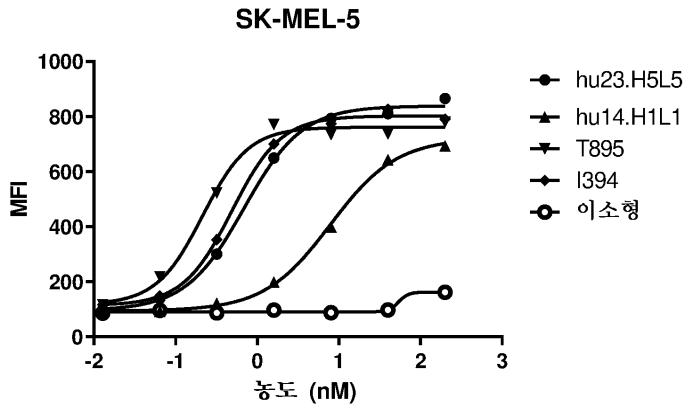
도면11c



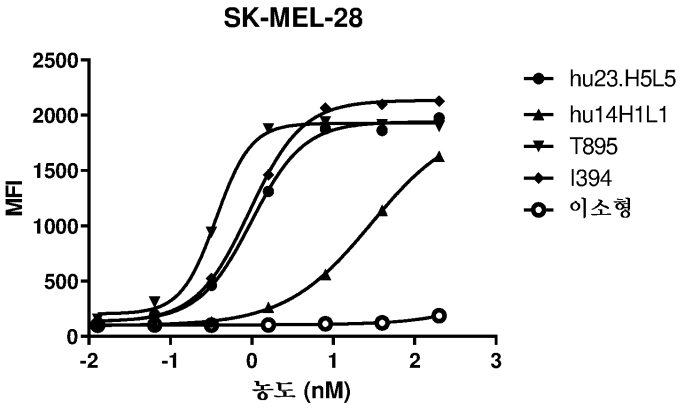
도면11d



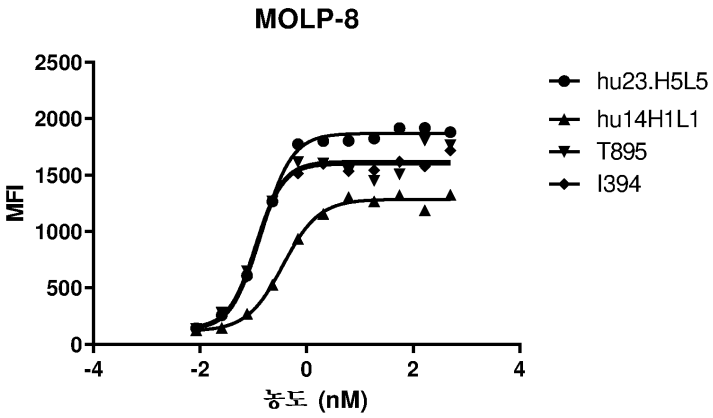
도면12a



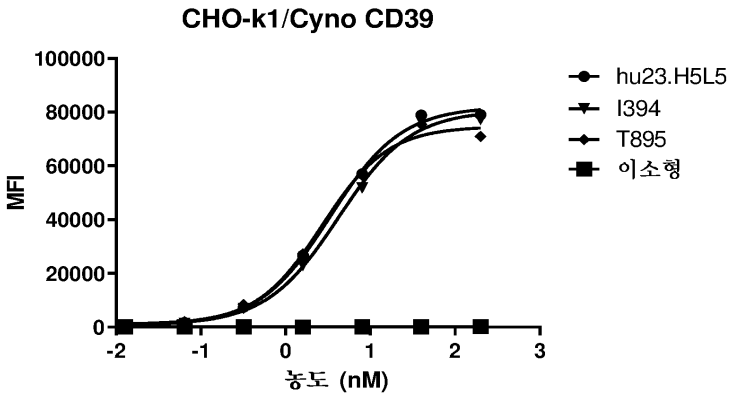
도면12b



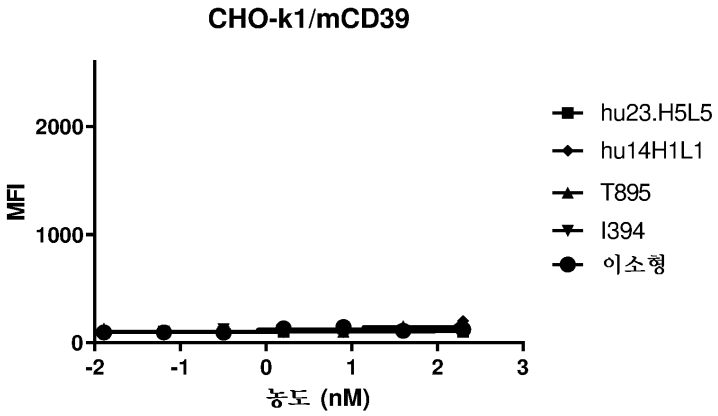
도면12c



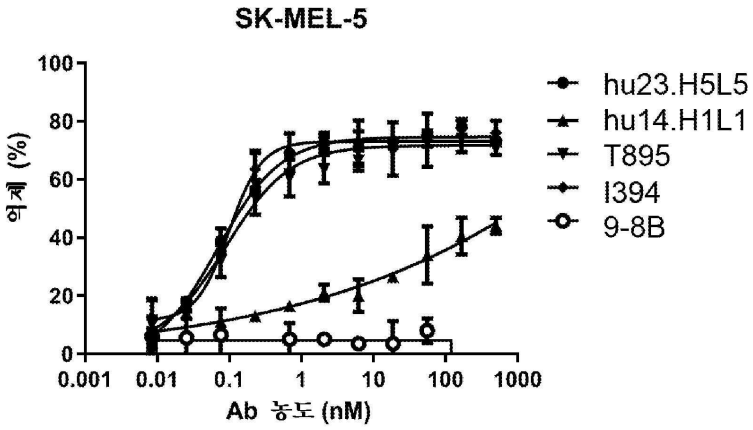
도면12d



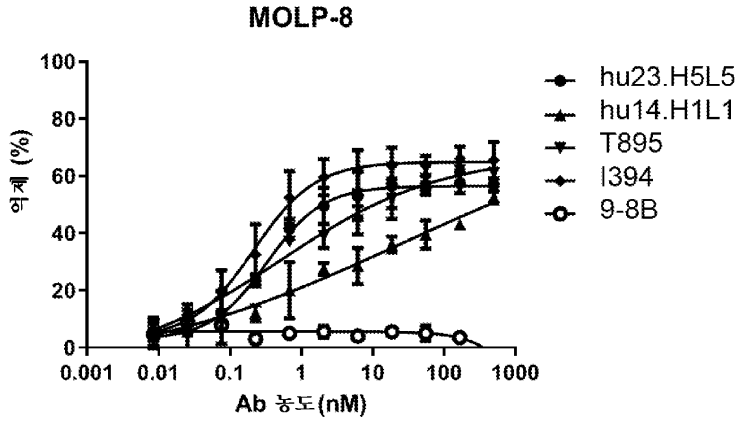
도면12e



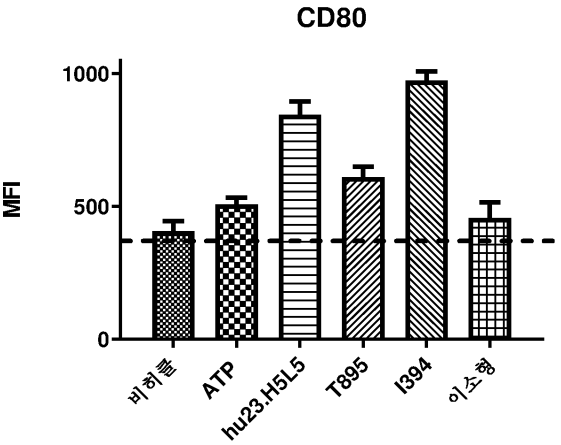
도면13a



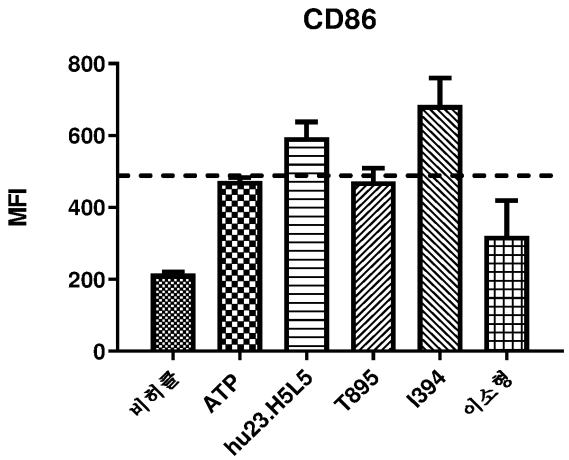
도면13b



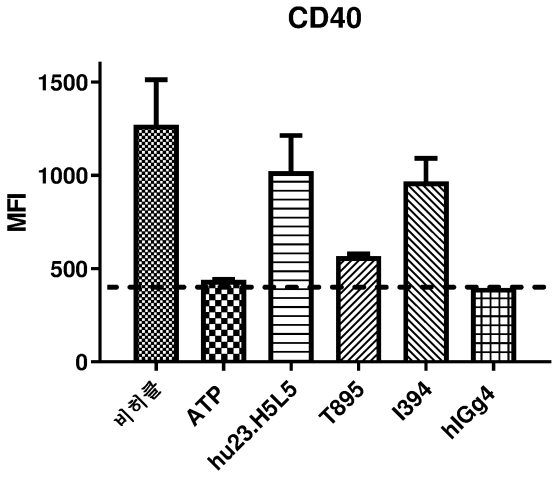
도면14a



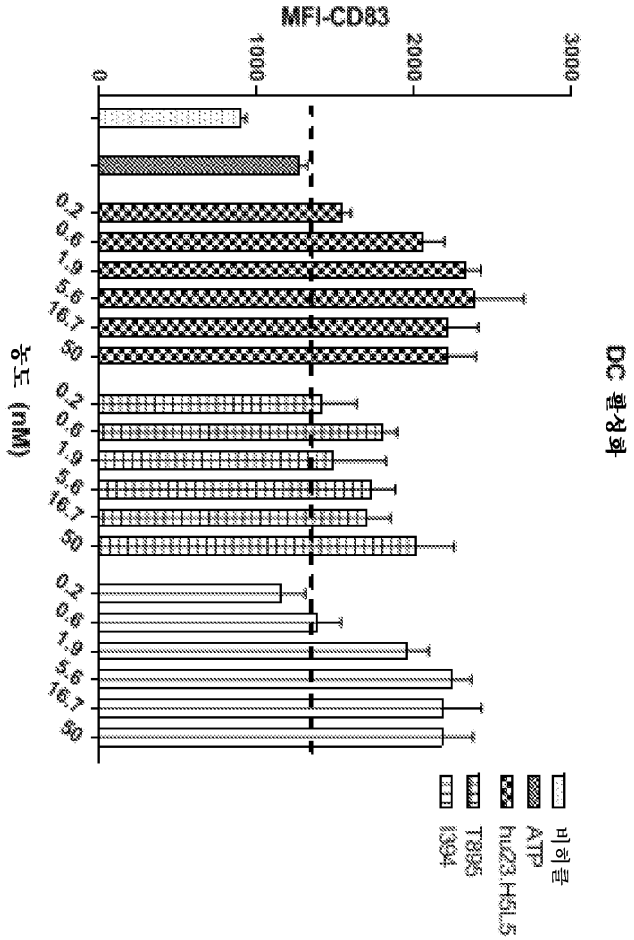
도면14b



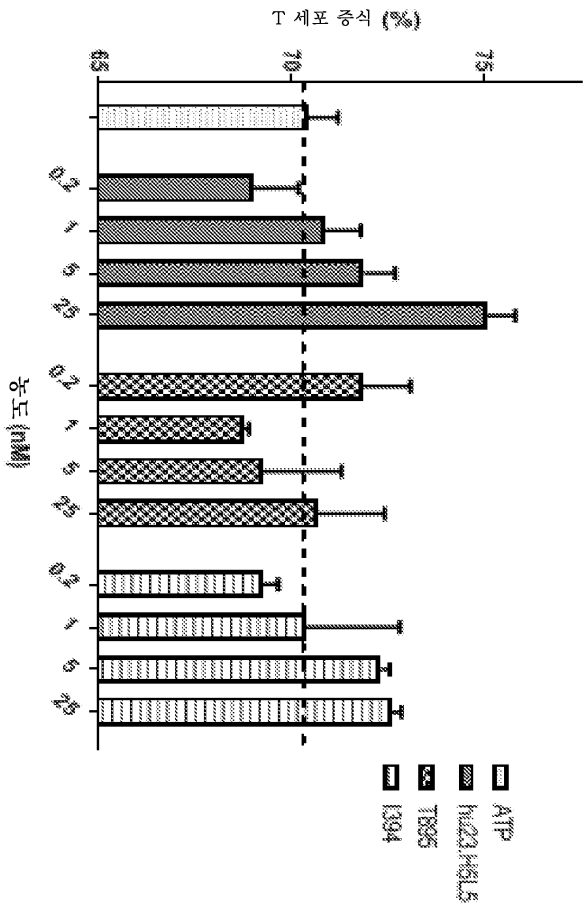
도면14c


CD40
MFI
1500
1000
500
0
비히클
ATP
hu23.H5L5
T895
I394
hIGg4

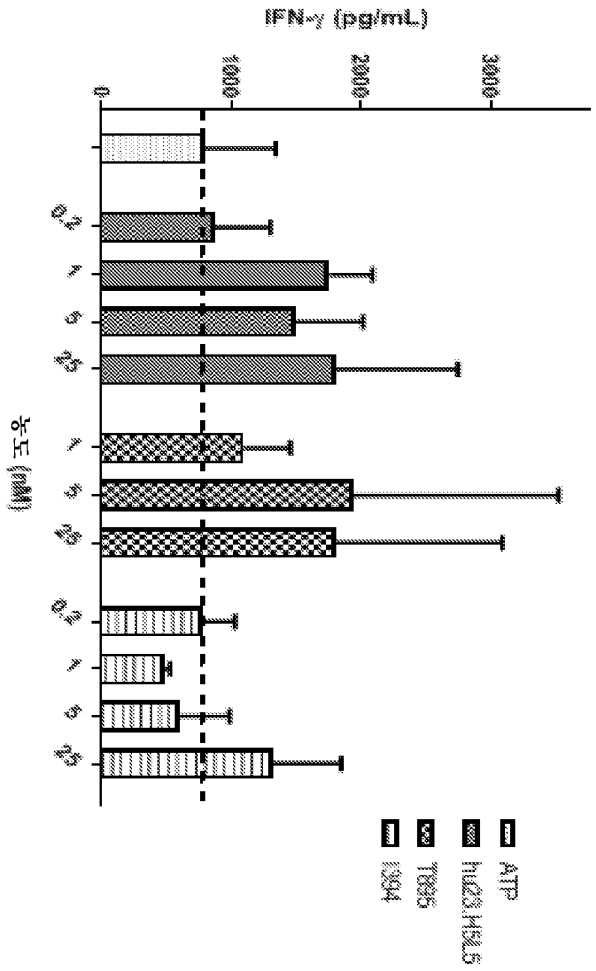
도면15a


MFI-CD83
0
1000
2000
3000
농도 (nM)
0.2
0.6
1.9
5.6
16.7
50
DC 활성화
비히클
ATP
hu23.H5L5
T895
I394

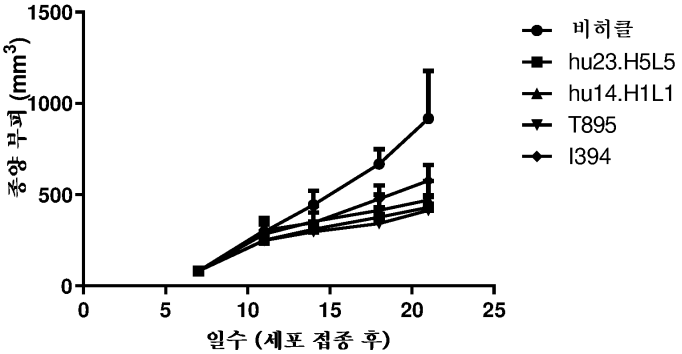
도면15b



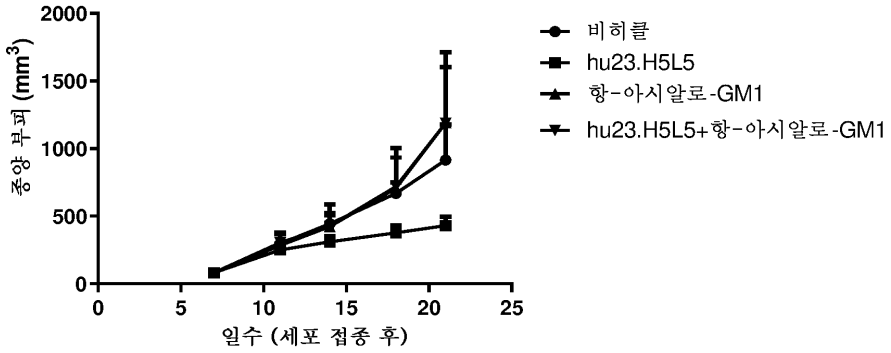
도면15c


IFN-γ (pg/mL)
0
1000
2000
3000
(μM) 조육
I394
T895
hu23.H5L5
ATP

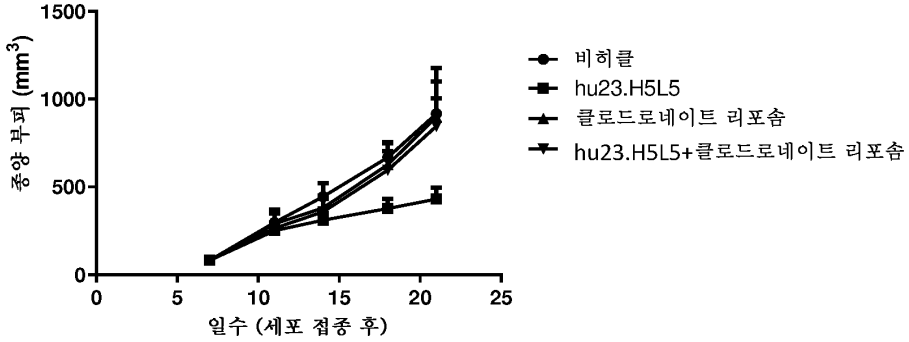
도면16


종양 부피 (mm3)
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
일수 (세포 접종 후)
비히클
hu23.H5L5
hu14.H1L1
T895
I394

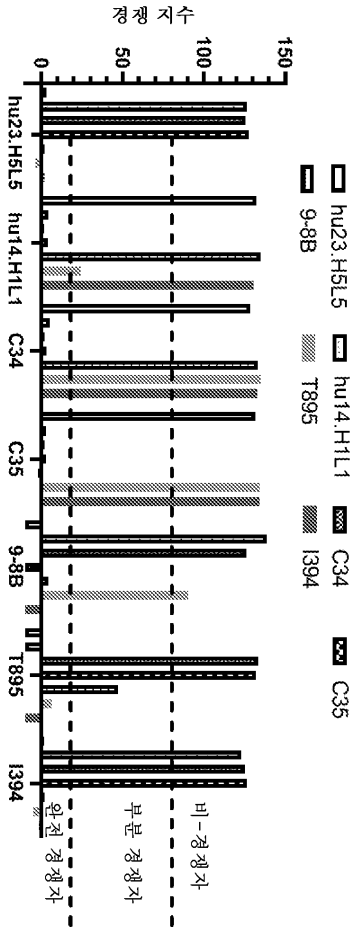
도면17


2000
1500
1000
500
0
종양 부피 (mm3)
0
5
10
15
20
25
일수 (세포 접종 후)
비히클
hu23.H5L5
항-아시알로-GM1
hu23.H5L5+항-아시알로-GM1

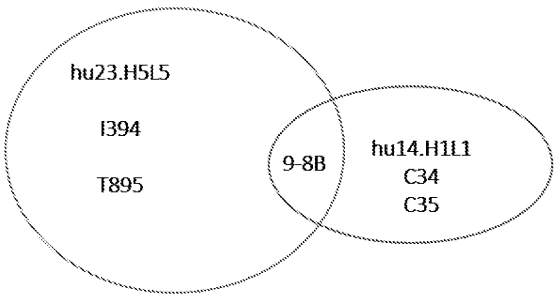
도면18


1500
1000
500
0
종양 부피 (mm3)
0
5
10
15
20
25
일수 (세포 접종 후)
비히클
hu23.H5L5
클로드로네이트 리포솜
hu23.H5L5+클로드로네이트 리포솜

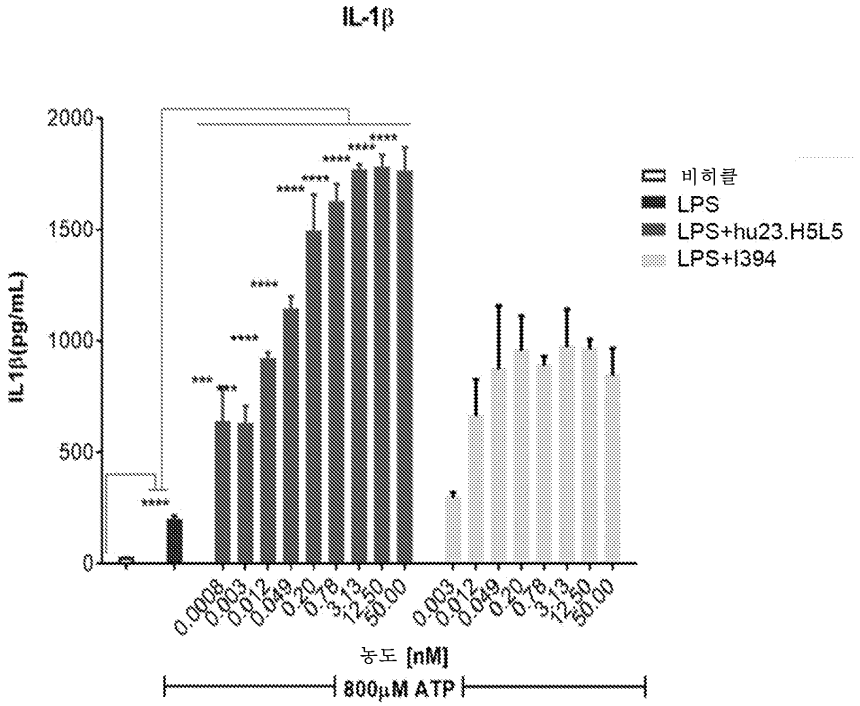
도면19a


경쟁 지수
0
50
100
150
hu23.H5L5
hu14.H1L1
C34
C35
9-8B
T895
I394
완전 경쟁자
부분 경쟁자
비-경쟁자
hu23.H5L5
hu14.H1L1
C34
C35
9-8B
T895
I394

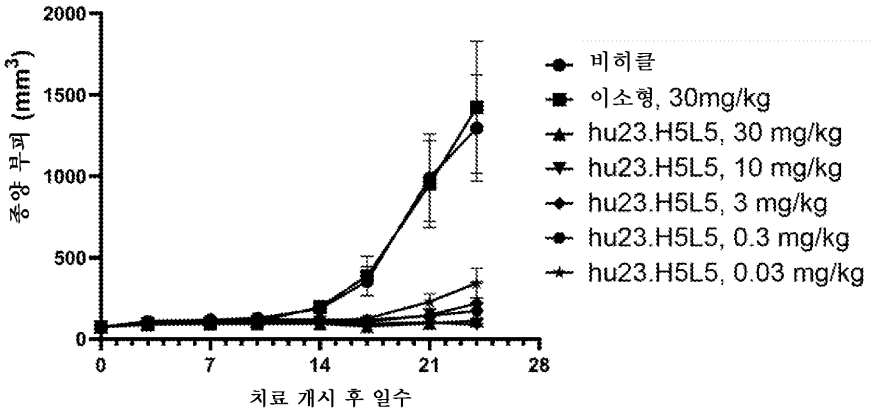
도면19b


hu23.H5L5
I394
T895
9-8B
hu14.H1L1
C34
C35

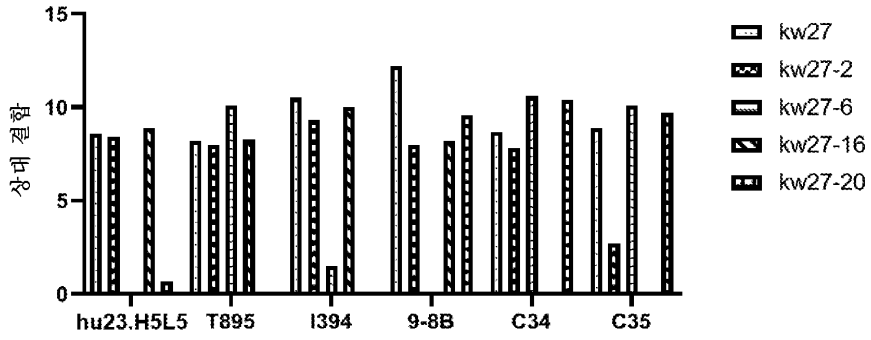
도면20



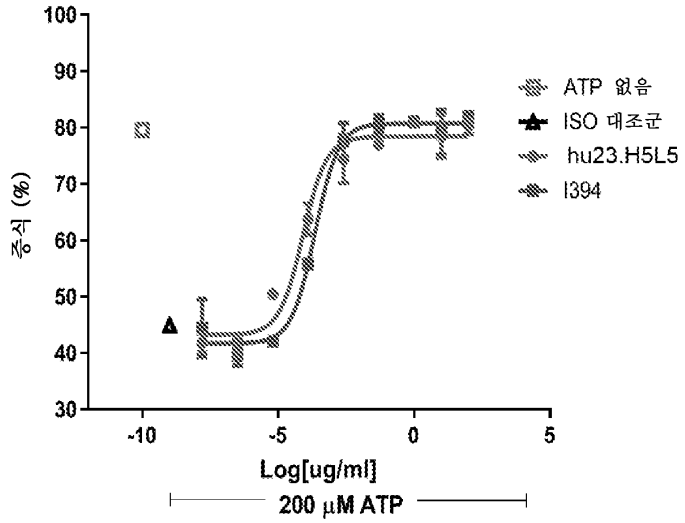
도면21



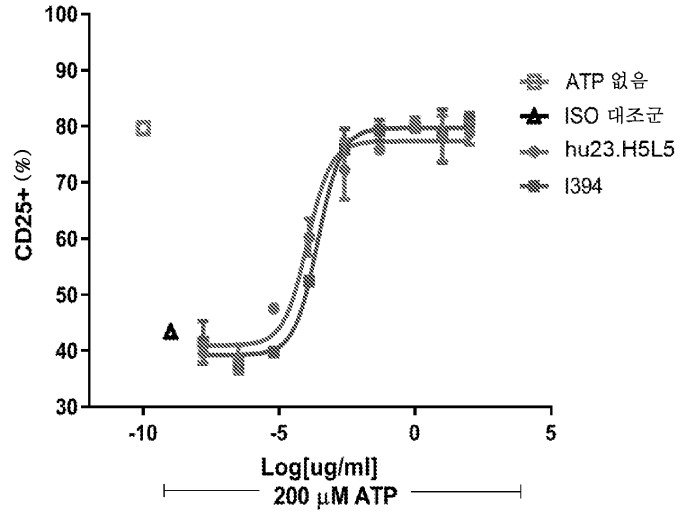
도면22



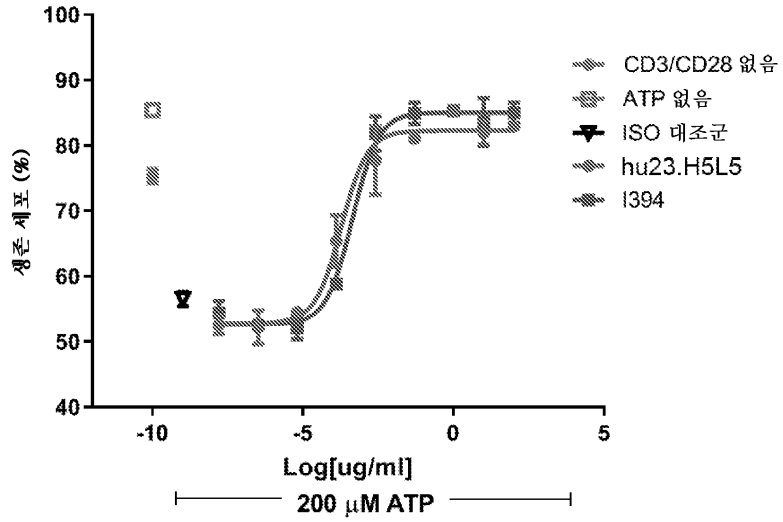
도면23a



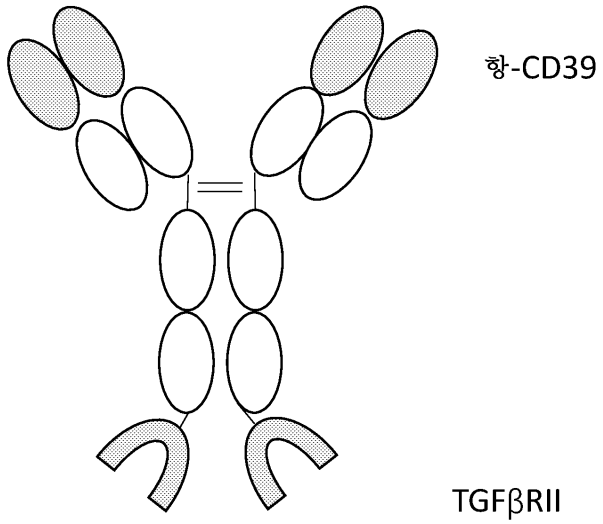
도면23b



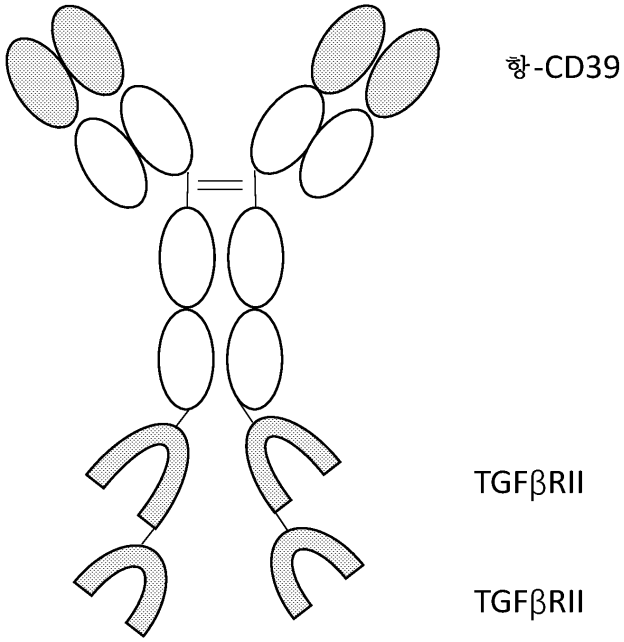
도면23c



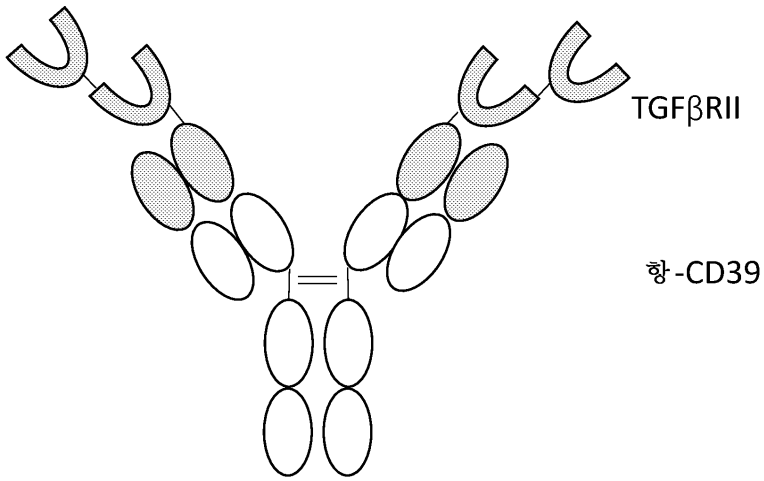
도면24a



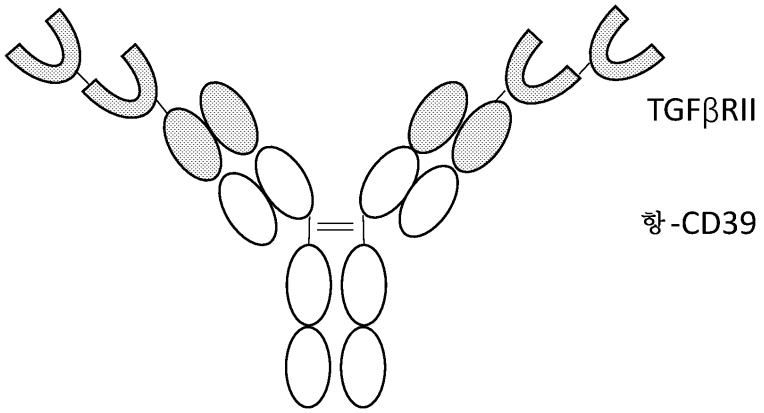
도면24b



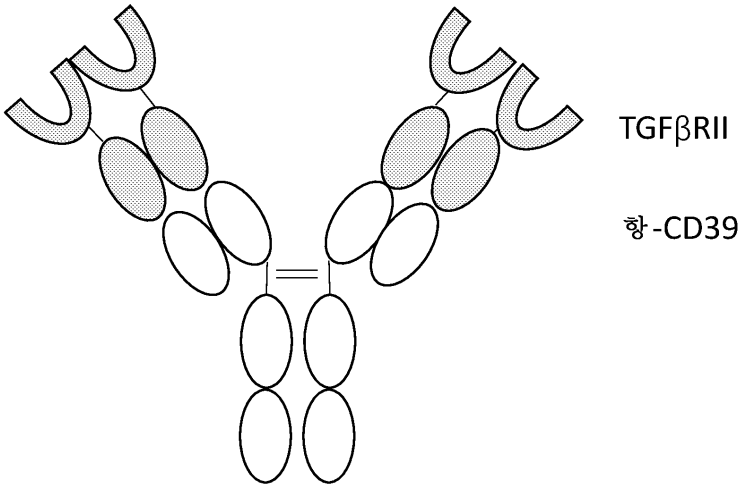
도면24c



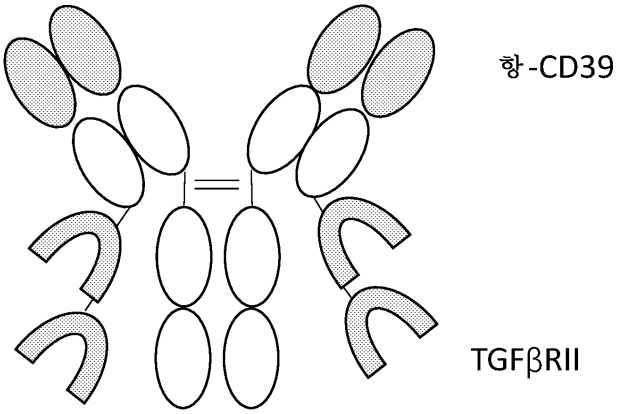
도면24d



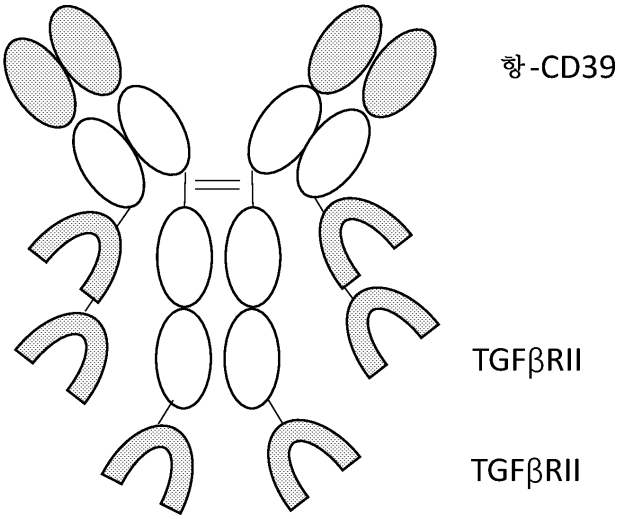
도면24e



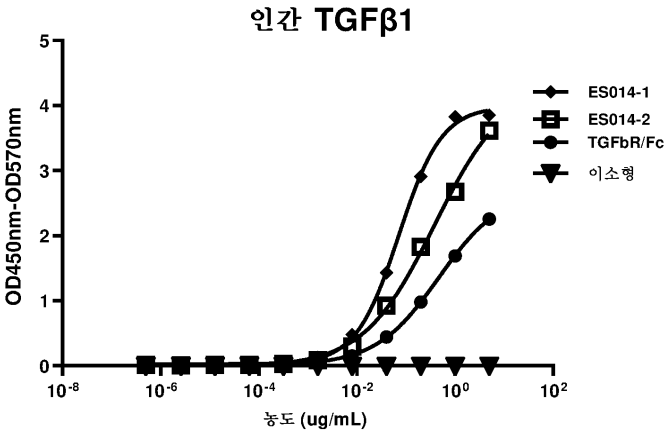
도면24f



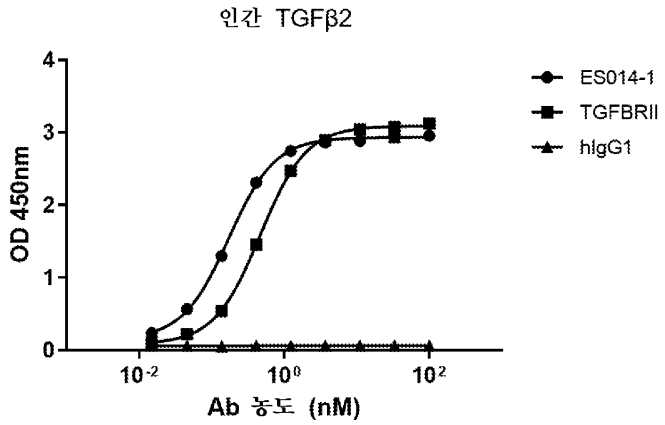
도면24g



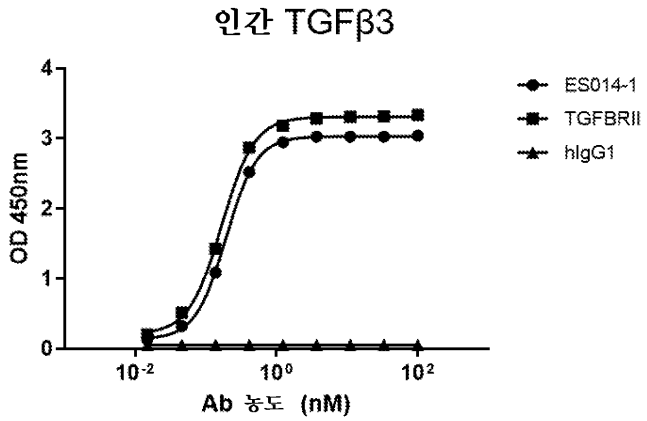
도면25a



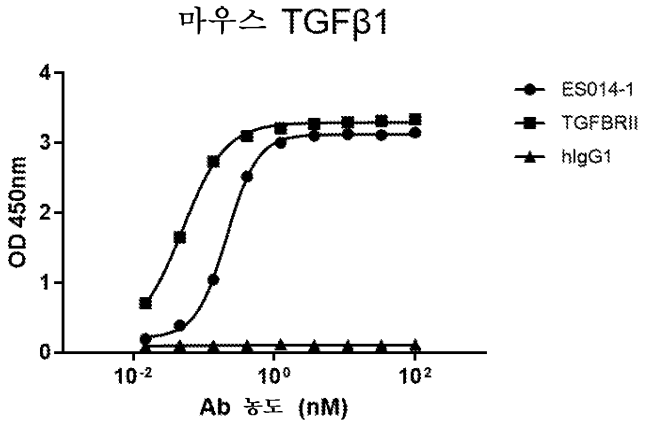
도면25b



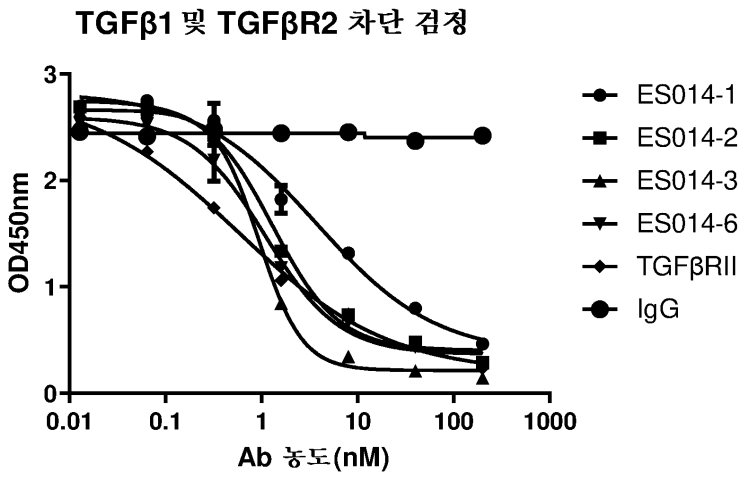
도면25c



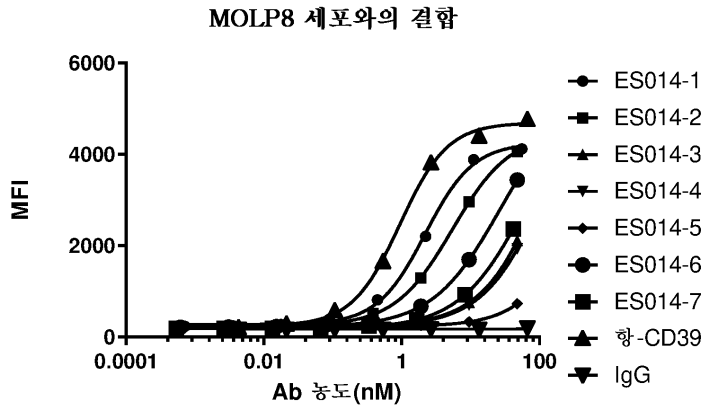
도면25d



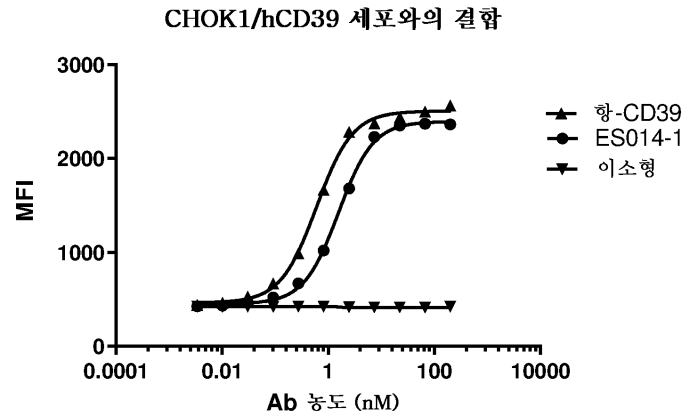
도면26



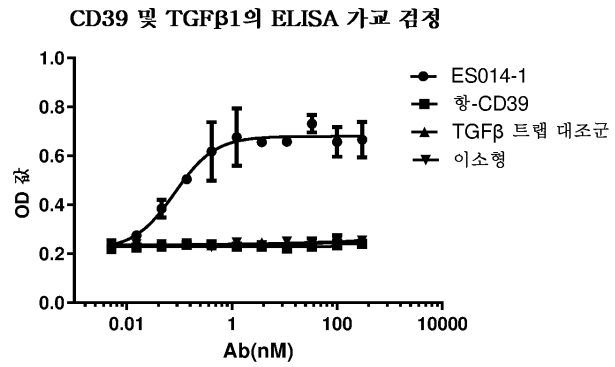
도면27a



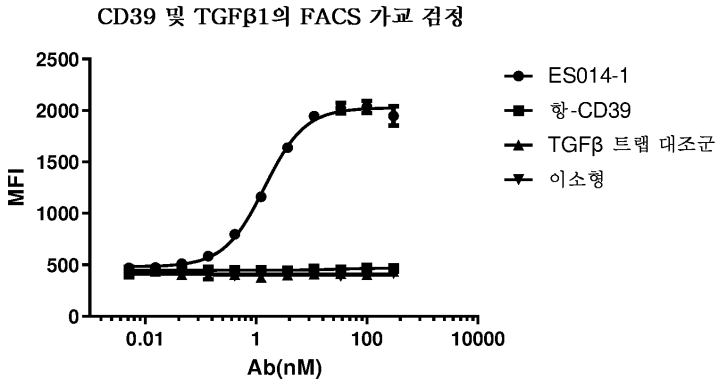
도면27b



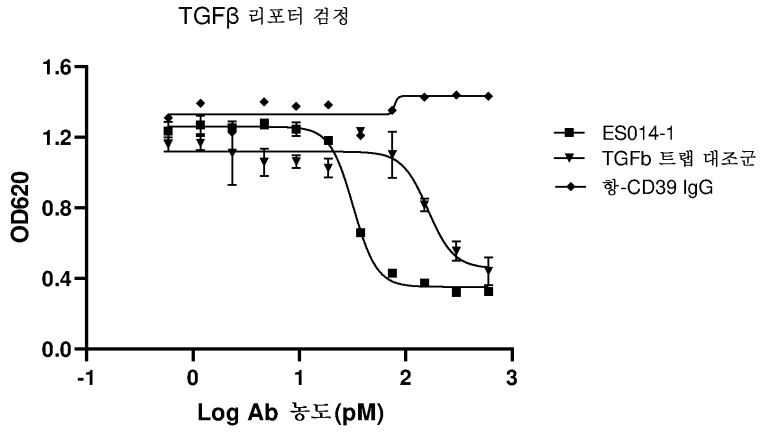
도면28a



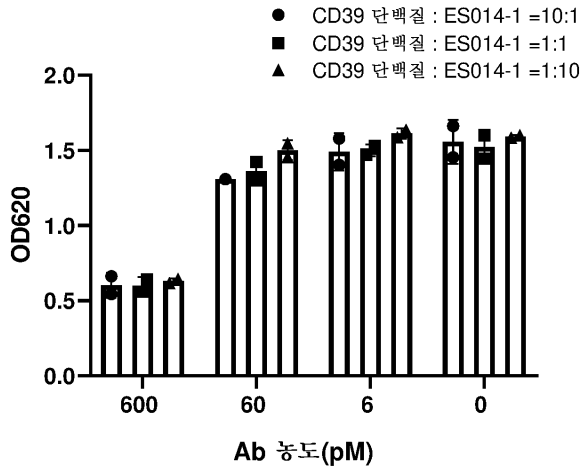
도면28b



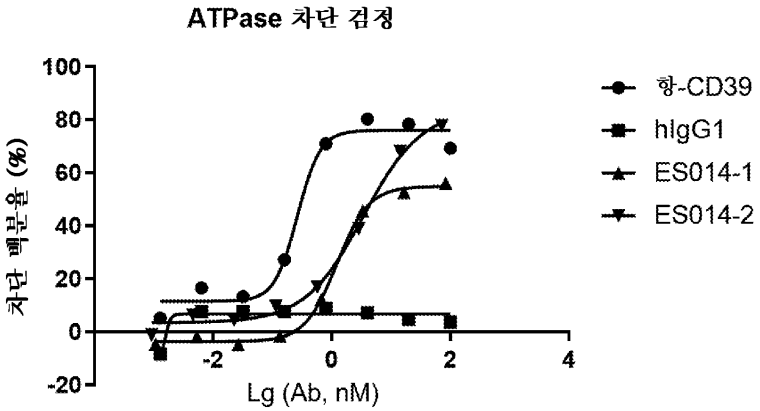
도면29a



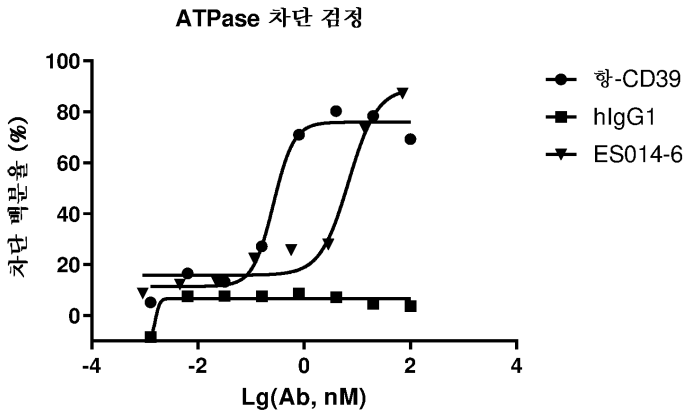
도면29b



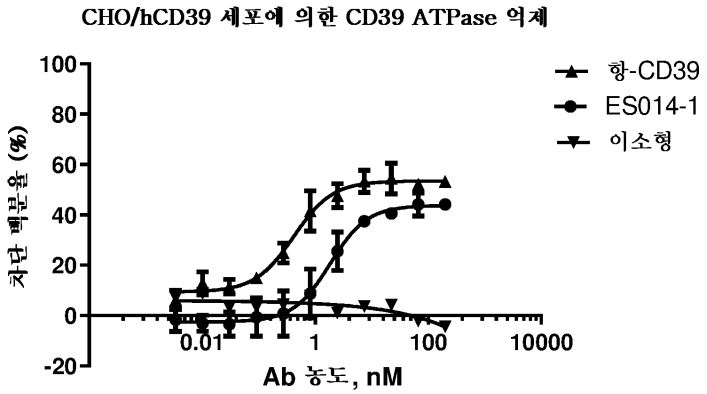
도면30a



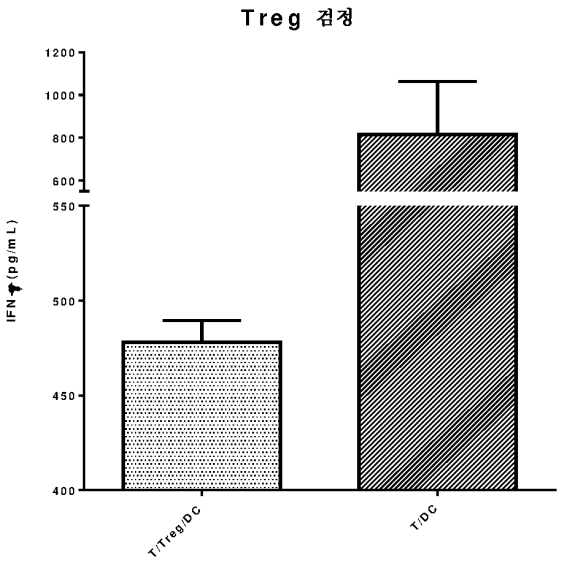
도면30b



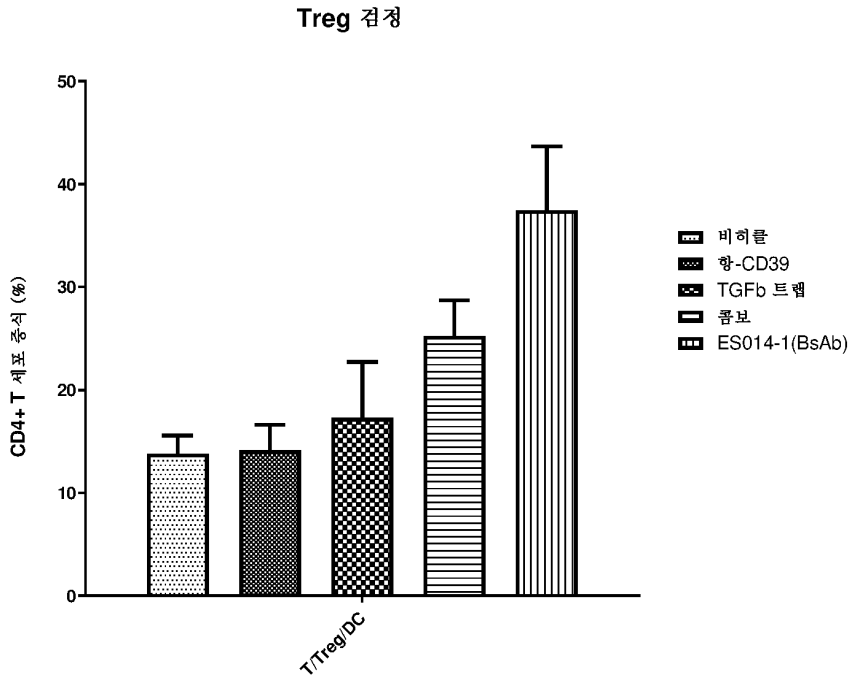
도면30c


CHO/hCD39 세포에 의한 CD39 ATPase 억제
100
80
60
40
20
0
-20
차단 백분율 (%)
0.01
1
100
10000
Ab 농도, nM
항-CD39
ES014-1
이소형

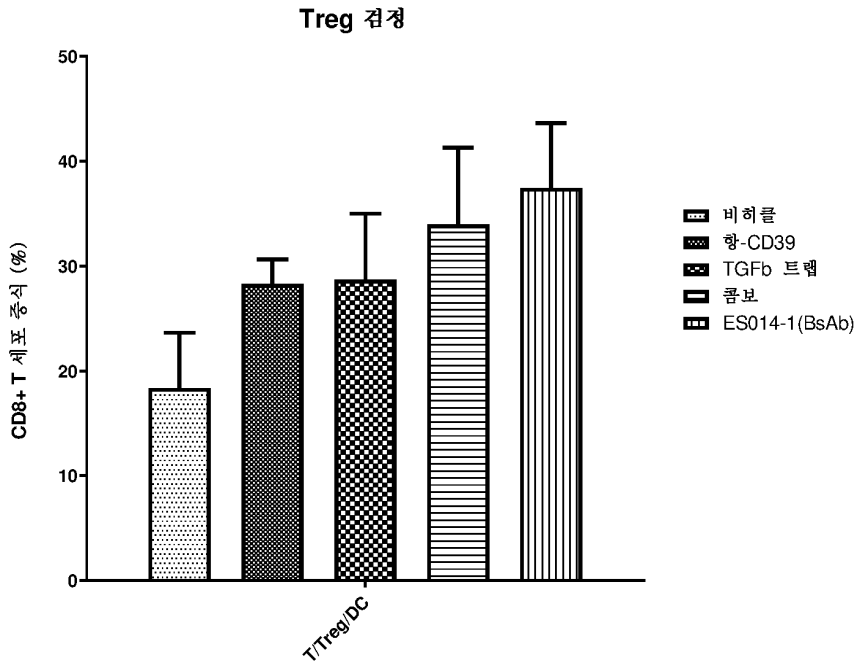
도면31a


Treg 검정
1200
1000
800
600
550
500
450
400
IFN-γ (pg/mL)
T/Treg/DC
T/DC

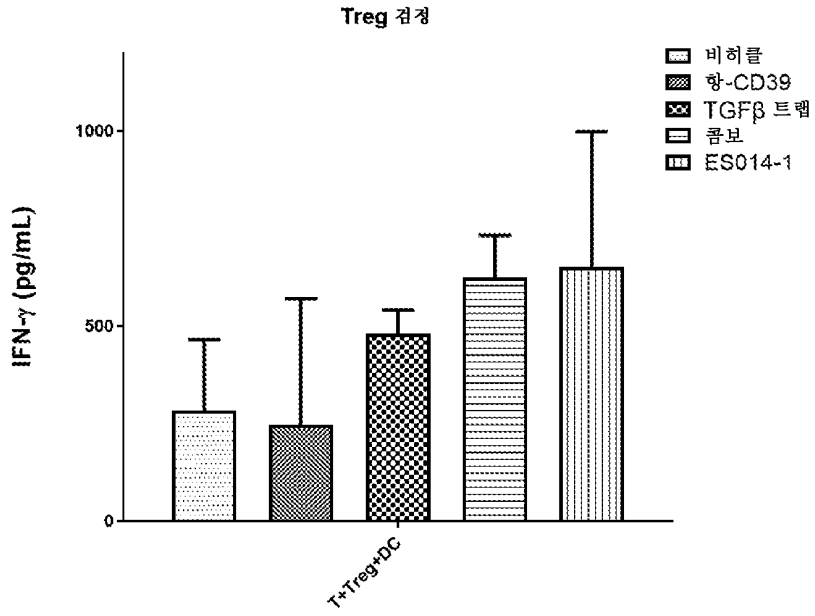
도면31b


Treg 검정
CD4+ T 세포 증식 (%)
50
40
30
20
10
0
T/Treg/DC
비히클
항-CD39
TGFb 트랩
콤보
ES014-1(BsAb)

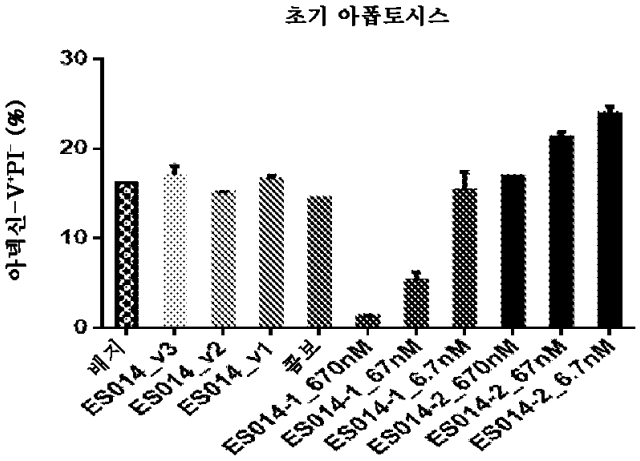
도면31c


Treg 검정
CD8+ T 세포 증식 (%)
50
40
30
20
10
0
T/Treg/DC
비히클
항-CD39
TGFb 트랩
콤보
ES014-1(BsAb)

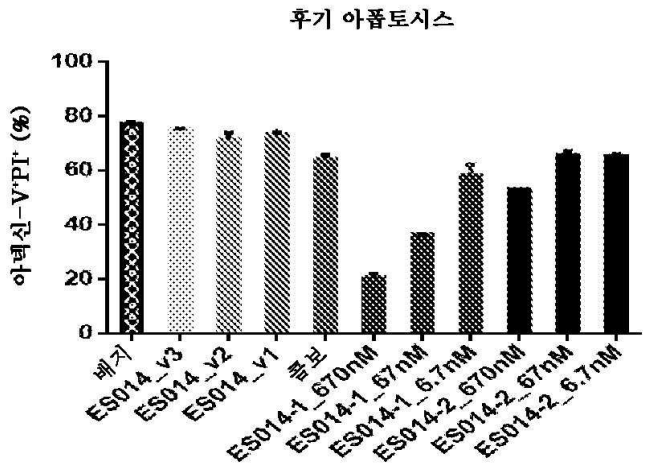
도면31d



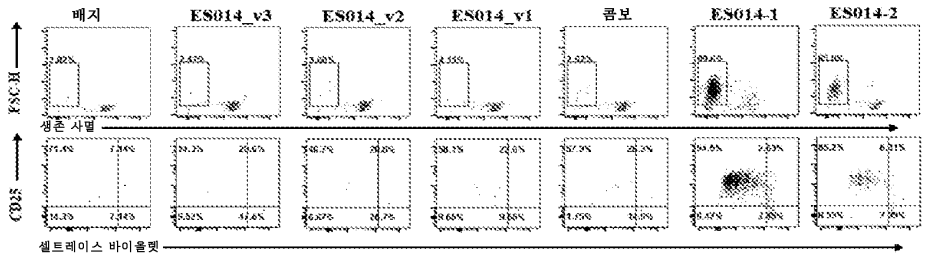
도면32a



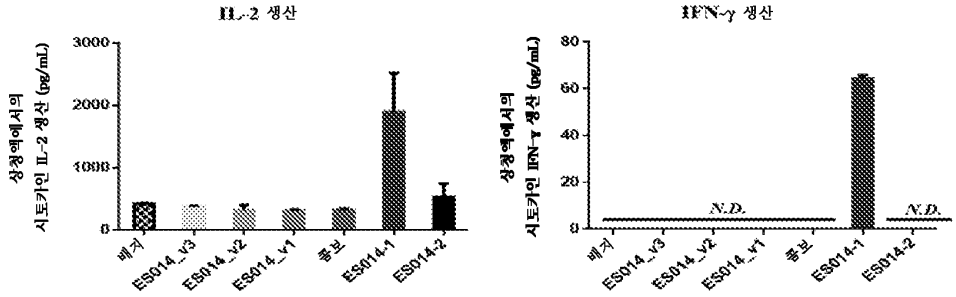
도면32b



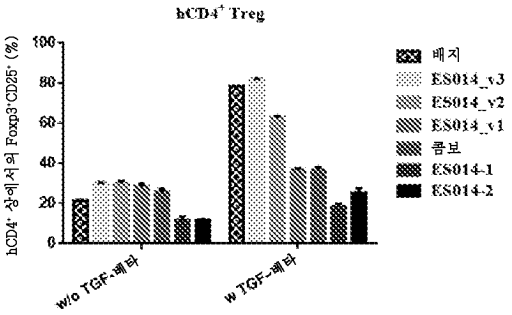
도면33a



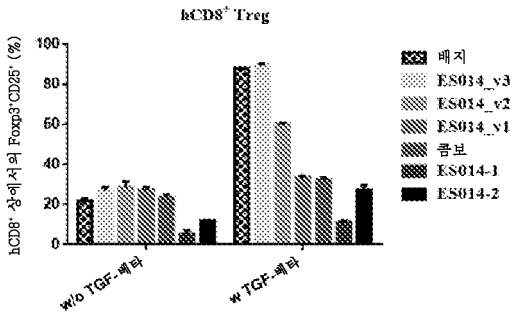
도면33b



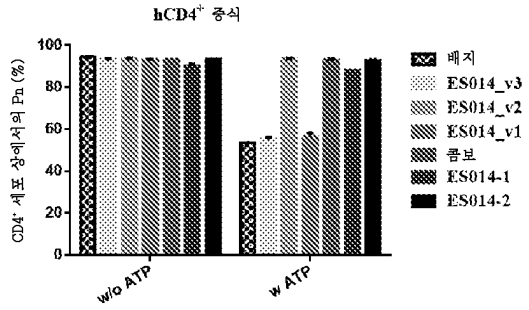
도면34a



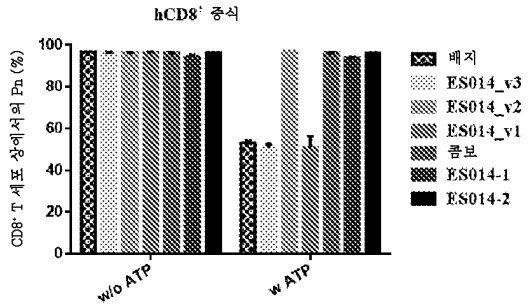
도면34b



도면35a



도면35b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Elpiscience (Suzhou) Biopharma, Ltd.

Elpiscience Biopharma, Ltd.

<120> NOVEL CONJUGATE MOLECULES TARGETING CD39 AND TGFBETA

<130> 075431-8005WO02

<160> 182

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asn Tyr Gly Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Lys Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Asn Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Thr Phe Leu His

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Asp Tyr Asn Met Tyr

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Asp Thr Tyr Val His

1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Leu Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Lys Tyr Gly Thr His Tyr Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa can be Tyr or Phe.

<400> 9

Gln Ile Arg Leu Asn Pro Asp Asn Tyr Ala Thr His Xaa Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

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

1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Arg Ile Asp Pro Ala Ile Asp Asn Ser Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Lys Gly Ile Tyr Tyr Asp Tyr Val Trp Phe Phe Asp Val

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Gln Leu Asp Leu Tyr Trp Phe Phe Asp Val

1 5 10

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be Ser or Thr.

<400> 15

His Gly Xaa Arg Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Ile Tyr Gly Tyr Asp Asp Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Tyr Tyr Cys Ala Leu Tyr Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Arg Tyr Ile Ala

1 5 10

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr Leu His

1 5 10

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Arg Thr His Leu Asn

1 5 10 15

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Ser Ala Phe Ser Ser Val Asn Tyr Met His

1 5 10

<

210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Arg Ser Ser Lys Asn Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Leu Gln Tyr Ser Asn Leu Leu Thr

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Gln Asn Gly His Ser Leu Pro Leu Thr

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Trp Gln Gly Thr Leu Phe Pro Trp Thr

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 35

Gln Gln Arg Ile Thr Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Ala Gln Leu Leu Glu Leu Pro His Thr

1 5

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Gln Ile Arg Leu Asn Pro Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 38

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Gln Ile Arg Leu Asn Pro Asp Asn Tyr Ala Thr His Phe Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 39

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

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

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

Phe Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Asn Ser Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Tyr Arg Ile Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

His Gly Ser Arg Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 41

His Gly Thr Arg Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 42

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Leu Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asp Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

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

100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 43

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Lys Tyr Gly Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Gln Leu Asp Leu Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly

100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 44

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gln Ile Arg Leu Asn Pro Asp Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Ser Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Gln His Gly Ser Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser

115

<210> 45

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Gln Ile Arg Leu Asn Pro Asp Asn Tyr Ala Thr His Phe Ala Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Cys Thr Glu His Gly Thr Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Glu

115

<210> 46

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Leu Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Ala Tyr Tyr Arg Tyr Asp Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 47

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Leu His 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 Ile Lys Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser His Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

Glu Ile Gln Val 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 Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

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

Ala Ile Tyr Gly Tyr Asp Asp Ala Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Glu Asp Thr
20 25 30

Tyr Val His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Val Ser Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Leu Tyr Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 51

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

His Tyr Thr Ser Thr Leu Leu Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Tyr Ser Asn Leu Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 52

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg

100 105

<210> 53

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Arg Thr His Leu Asn Trp Leu Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

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

<210> 54

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Arg Thr His Leu Asn Trp Phe Phe Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

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

<210> 55

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 55

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> 56
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 56
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Phe Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

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

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

<210> 57
<211> 111
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

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> 58

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 58

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

50 55 60

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ile Thr Tyr Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

100 105

<210> 59

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 59

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

1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Asn Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Leu

85 90 95

Leu Glu Leu Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 60

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 60

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

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

<210> 61
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 61

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

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

<210> 62

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 62

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

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

Phe Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Asn Ser Pro Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Tyr Arg Ile Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 63

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Phe Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

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

<210> 64
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 64
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Leu Lys Asp Thr
20 25 30
Phe Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ile Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

<210> 65

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 66

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Leu His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ile Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

<210> 67
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 67
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Ala Ser Pro Gly

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

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

<210> 68
<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 68

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Lys Tyr Gly Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Gln Leu Asp Leu Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 69

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

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

<210> 70
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 70
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr

20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Lys Tyr Gly Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95
Tyr Cys Thr Thr Gln Leu Asp Leu Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 71
<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 71

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

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

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

Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

<210> 72

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 72

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

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

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

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Lys Tyr Gly Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95
Tyr Cys Thr Thr Gln Leu Asp Leu Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 73
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 73
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

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

<210> 74
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 74

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

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

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

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Lys Tyr Gly Thr His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Thr Gln Leu Asp Leu Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 75

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

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

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

Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro
65 70 75 80

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

<210> 76
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be Gln or Glu.
<220><221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be Glu or Gln.
<220><221> misc_feature
<222> (9)..(12)

<223> Xaa in location 9 can be Gly or Ala, Xaa in location 10 can be Gly or Glu, Xaa in location 11 can be Leu or Val, Xaa in location 12 can be Val or Lys.
<220><221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> Xaa can be Gly or Ala.
<220><221> misc_feature
<222> (18)..(20)
<223> Xaa in location 18 can be Leu, Met or Val, Xaa in location 19 can be Arg or Lys, Xaa in location 20 can be Val or Leu.
<220><221> misc_feature
<222> (23)..(23)
<223> Xaa can be Ala or Lys.

<220><221> misc_feature

<222> (27)..(30)

<223> Xaa in location 27 can be Phe or Tyr, Xaa in location 28 can be Asn or Thr, Xaa in location 29 can be Phe or Leu, Xaa in location 30 can be Ser or Lys.

<400> 76

Xaa Val Gln Leu Val Xaa Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Pro Gly Xaa
1 5 10 15

Ser Xaa Xaa Xaa Ser Cys Xaa Ala Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

<210> 77

<211> 14

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be Arg or Lys.

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be Ala or Ser.

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> Xaa in location 8 can be Lys or Gln, Xaa in location 9 can be Arg or Gly.

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(14)

<223> Xaa in location 13 can be Met, Ile or Val, Xaa in location 14 can be Gly or Ala.

<400> 77

Trp Val Xaa Gln Xaa Pro Gly Xaa Xaa Leu Glu Trp Xaa Xaa
1 5 10

<210> 78

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Xaa in location 1 can be Arg or Lys, Xaa in location 2 can be Val, Ala or Phe.

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(6)

<223> Xaa in location 4 can be Ile or Leu, Xaa in location 5 can be Ser or Thr, Xaa in location 6 can be Arg or Ala.

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa can be Asp or Thr.

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> Xaa in location 10 can be Lys, Ala or Ser, Xaa in location 11 can be Ser or Asn.

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa can be Leu, Val or Ala.

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(18)

<223> Xaa in location 15 can be Met or Leu, Xaa in location 16 can be Gln or Glu, Xaa in location 17 can be Met or Leu, Xaa in location 18 can be Ser, Ile or Asn.

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> Xaa in location 21 can be Arg or Lys, Xaa in location 22 can be Ser or Thr.

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(32)

<223> Xaa in location 31 can be Ala or Thr, Xaa in location 32 can be Arg, Asn or Thr.

<400> 78

Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ser Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Ser Leu Xaa Xaa Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa
20 25 30

<210> 79

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 79

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 80

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be Glu or Gln.

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be Leu or Met.

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Xaa in location 12 can be Ser or Thr, Xaa in location 13 can be leu, Val or Ala.

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> Xaa can be Ala or Val.

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> Xaa in location 21 can be Leu or Ile, Xaa in location 22 can be Ser or Thr.

<400> 80

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

Glu Arg Xaa Thr Xaa Xaa Cys
20

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be Ala or Ser.

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa can be Arg or Lys.

<400> 81

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Xaa Pro Xaa Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 82

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be Ile or Val.

<220><221> misc_feature

<222

> (4)..(4)

<223> Xaa can be Ala or Thr.

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> Xaa in location 14 can be Asp or Ser, Xaa in location 15 can be Phe or Tyr.

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Xaa can be Leu, Met or Val.

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> Xaa can be Tyr or Phe.

<400> 82

Gly Xaa Pro Xaa Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Xaa Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Xaa Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Xaa Cys
20 25 30

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 83

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 84

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 84

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

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

20 25 30

<210> 85

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 85

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 86

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 87

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 87

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

1 5 10

<210> 88

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 88

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

1 5 10

<210> 89

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 89

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

1 5 10

<210> 90

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 90

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

1 5 10

<210> 91

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 91

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 92

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 92

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 93

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 93

Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 94

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 94

Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Glu
1 5 10 15

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

<210> 95

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 95

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 96

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 96

Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 97

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 97

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Leu Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 98

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 98

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 99

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 99

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 100

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 100

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 101

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 101

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 102

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 102

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 103

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 103

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 104

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

1 5 10 15

<210> 105

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic

<400> 105

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

1 5 10 15

<210> 106

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 106

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 107

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 107

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 108

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 108

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 109

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 109

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 110

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 110

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 111

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 111

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 112

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 112

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 113

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Ser Val Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Lys Arg Glu Gly Gly Thr Glu Tyr Leu Arg Lys Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 114

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 115

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 115

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

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

<210> 116

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 116

Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

<210> 117

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 117

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 118

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 119

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 119

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 120

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 120

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 121

<211> 14

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 121

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

1 5 10

<210> 122

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 122

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

1 5 10

<210> 123

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 123

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

1 5 10

<210> 124

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 124

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 125

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 125

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr
20 25 30

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be Thr or Leu.

<400> 126

Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 127

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 127

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

<210> 128

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 128

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys

20

<210> 129

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 129

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 130

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 130

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

1 5 10 15

<210> 131

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 131

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 132

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400>

132

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys

20 25 30

<210> 133

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 133

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys

20 25 30

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 134

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

1 5 10 15

Gly

<210> 135

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 135

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

Gly

<210> 136

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 136

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

<210> 137

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 137

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

<210> 138

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 138

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Ile Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 139

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

1 5 10 15

Gly

<210> 140

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 140

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 141
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 141
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Leu Lys Asp Thr
20 25 30
Phe Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ile Lys Tyr Asp Pro Lys Phe

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

<210> 142
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 142
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

<210> 143
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 143
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Phe Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 144

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400

> 144

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 145

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 145

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Phe Ser Ser Val Asn Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Thr Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu

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

<210> 146
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 146
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Lys Asp Thr
20 25 30
Phe Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ile Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

<210> 147

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 147

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 148

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be Ile or Val.

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be Ala or Thr.

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> Xaa in location 14 can be Asp or Ser, Xaa in location 15 can be Phe or Tyr.

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Xaa can be Leu or Met.

<400> 148

Gly Xaa Pro Xaa Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Xaa Xaa Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Xaa Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 149

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Xaa in location 1 can be Arg or Lys, Xaa in location 2 can be Val or Ala.

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be Ile or Leu.

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be Arg or Ala.

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> Xaa in location 10 can be Ala or Ser, Xaa in location 11 can be Ser or Asn.

<220><221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> Xaa can be Met or Leu.

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa can be Ser or Ile.

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> Xaa can be Arg or Asn.

<400> 149

Xaa Xaa Thr Xaa Thr Xaa Asp Thr Ser Xaa Xaa Thr Ala Tyr Xaa Glu
1 5 10 15

Leu Xaa Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Xaa
20 25 30

<210> 150

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be Glu or Gln.

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(13)

<223> Xaa in location 12 can be Ser or Thr, Xaa in location 13 can be Leu or Ala.

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> Xaa can be Ala or Val.

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> Xaa in location 21 can be Leu or Ile, Xaa in location 22 can be Ser or Thr.

<400> 150

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

1 5 10 15

Glu Arg Xaa Thr Xaa Xaa Cys

20

<210> 151

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be Arg or Lys.

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> Xaa in location 6 can be Asn, Gly, Ser or Gln, Xaa in location 7 can be Gly, Ala or Asp.

<400> 151

Xaa Ile Asp Pro Ala Xaa Xaa Asn Ile Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 152

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be Gly or Gln.

<400> 152

Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 153

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 153

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 154

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa can be Leu or Met.

<400> 154

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 155

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be Ala or Ser.

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> Xaa can be Gly or Ala.

<400> 155

Trp Val Arg Gln Xaa Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Xaa

1 5 10

<210> 156

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa can be Leu or Val.

<400> 156

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Xaa Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr
20 25 30

<210> 157

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be Leu or Met.

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa can be Leu or Val.

<220><221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> Xaa can be Ala or Val.

<400> 157

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

Glu Arg Xaa Thr Leu Ser Cys
20

<210> 158

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be Ala or Ser.

<400> 158

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

1 5 10 15

<210> 159

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> Xaa can be Leu or Val.

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> Xaa can be Tyr or Phe.

<400> 159

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Xaa Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Xaa Cys

20 25 30

<210> 160

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa can be Gln or Glu.

<220><221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Xaa can be Val or Leu.

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> Xaa can be Asn or Thr.

<400> 160

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

Ser Val Lys Xaa Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Xaa Leu Lys
20 25 30

<210> 161

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be Arg or Lys.

<220><221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa can be Arg or Gly.

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa can be Met or Ile.

<400> 161

Trp Val Xaa Gln Ala Pro Gly Gln Xaa Leu Glu Trp Xaa Gly
1 5 10

<210> 162

<211> 510

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

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> 163

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 163

Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val

1 5 10 15

Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val

20 25 30

Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp

35 40 45

Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90

<210> 164

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 164

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr

1 5 10 15

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp

20 25 30

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys

35 40 45

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

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
115 120 125
Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
130 135

<210> 165
<211> 767
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 165

Gly Pro Glu Pro Gly Ala Leu Cys Glu Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser
1 5 10 15
His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys
20 25 30

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

Glu Arg Leu Ala Thr Gly Val Ser Arg Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly
100 105 110
Ser Val Val Gln Phe Ser Ser Ala Asn Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr
115 120 125
Glu Glu Arg Asn Phe Pro His Gly Asn Glu His Leu Leu Asn Trp Ala
130 135 140
Arg Lys Glu Tyr Gly Ala Val Thr Ser Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala
145 150 155 160

Arg Asn Ile Tyr Ile Lys Val Gly Glu Asp Gln Val Phe Pro Pro Lys
165 170 175
Cys Asn Ile Gly Lys Asn Phe Leu Ser Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr
180 185 190
Leu Gln Pro Lys Ala Ala Glu Gly Cys Val Met Ser Ser Gln Pro Gln
195 200 205
Asn Glu Glu Val His Ile Ile Glu Leu Ile Thr Pro Asn Ser Asn Pro
210 215 220

Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Thr Ile Asp Ile Arg Pro Ser Gln
225 230 235 240
Glu Asp Leu Glu Val Val Lys Asn Leu Ile Leu Ile Leu Lys Cys Lys
245 250 255
Lys Ser Val Asn Trp Val Ile Lys Ser Phe Asp Val Lys Gly Ser Leu
260 265 270
Lys Ile Ile Ala Pro Asn Ser Ile Gly Phe Gly Lys Glu Ser Glu Arg
275 280 285

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

340 345 350

Glu Leu Arg Ile Leu Leu Asp Pro Gly Ala Leu Pro Ala Leu Gln Asn
355 360 365
Pro Pro Ile Arg Gly Gly Glu Gly Gln Asn Gly Gly Leu Pro Phe Pro
370 375 380
Phe Pro Asp Ile Ser Arg Arg Val Trp Asn Glu Glu Gly Glu Asp Gly
385 390 395 400
Leu Pro Arg Pro Lys Asp Pro Val Ile Pro Ser Ile Gln Leu Phe Pro
405 410 415

Gly Leu Arg Glu Pro Glu Glu Val Gln Gly Ser Val Asp Ile Ala Leu
420 425 430
Ser Val Lys Cys Asp Asn Glu Lys Met Ile Val Ala Val Glu Lys Asp
435 440 445
Ser Phe Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gly Met Asp Val Thr Leu Leu Asp
450 455 460
Pro Thr Cys Lys Ala Lys Met Asn Gly Thr His Phe Val Leu Glu Ser
465 470 475 480

Pro Leu Asn Gly Cys Gly Thr Arg Pro Arg Trp Ser Ala Leu Asp Gly
485 490 495
Val Val Tyr Tyr Asn Ser Ile Val Ile Gln Val Pro Ala Leu Gly Asp
500 505 510
Ser Ser Gly Trp Pro Asp Gly Tyr Glu Asp Leu Glu Ser Gly Asp Asn
515 520 525
Gly Phe Pro Gly Asp Met Asp Glu Gly Asp Ala Ser Leu Phe Thr Arg
530 535 540

Pro Glu Ile Val Val Phe Asn Cys Ser Leu Gln Gln Val Arg Asn Pro
545 550 555 560
Ser Ser Phe Gln Glu Gln Pro His Gly Asn Ile Thr Phe Asn Met Glu
565 570 575
Leu Tyr Asn Thr Asp Leu Phe Leu Val Pro Ser Gln Gly Val Phe Ser
580 585 590

Val Pro Glu Asn Gly His Val Tyr Val Glu Val Ser Val Thr Lys Ala
595 600 605

Glu Gln Glu Leu Gly Phe Ala Ile Gln Thr Cys Phe Ile Ser Pro Tyr
610 615 620
Ser Asn Pro Asp Arg Met Ser His Tyr Thr Ile Ile Glu Asn Ile Cys
625 630 635 640
Pro Lys Asp Glu Ser Val Lys Phe Tyr Ser Pro Lys Arg Val His Phe
645 650 655
Pro Ile Pro Gln Ala Asp Met Asp Lys Lys Arg Phe Ser Phe Val Phe
660 665 670

Lys Pro Val Phe Asn Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Cys Glu Leu Thr
675 680 685
Leu Cys Thr Lys Met Glu Lys His Pro Gln Lys Leu Pro Lys Cys Val
690 695 700
Pro Pro Asp Glu Ala Cys Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala
705 710 715 720
Met Met Gln Asn Lys Lys Thr Phe Thr Lys Pro Leu Ala Val Ile His
725 730 735

His Glu Ala Glu Ser Lys Glu Lys Gly Pro Ser Met Lys Glu Pro Asn
740 745 750
Pro Ile Ser Pro Pro Ile Phe His Gly Leu Asp Thr Leu Thr Val
755 760 765

<210> 166
<211> 201
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 166

Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val
1 5 10 15
Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val

20 25 30

Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp

35 40 45

Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Gln Cys Phe

100 105 110

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

115 120 125

Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser

130 135 140

Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val

145 150 155 160

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

165 170 175

Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr Thr Val Lys Ser

180 185 190

Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu

195 200

<210> 167

<211> 287

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 167

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr

1 5 10 15

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp

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

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

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

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro
        195                 200                 205
Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr
    210                 215                 220
Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile
225                 230                 235                 240
Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys
                245                 250                 255

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn
            260                 265                 270
```

Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
275 280 285

<210> 168

<211> 1549

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 168

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

His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys
20 25 30

Ala Ser Arg Gly Thr Thr Gly Leu Pro Gln Glu Val His Val Leu Asn
35 40 45

Leu Arg Thr Ala Gly Gln Gly Pro Gly Gln Leu Gln Arg Glu Val Thr
50 55 60

Leu His Leu Asn Pro Ile Ser Ser Val His Ile His His Lys Ser Val
65 70 75 80

Val Phe Leu Leu Asn Ser Pro His Pro Leu Val Trp His Leu Lys Thr
85 90 95

Glu Arg Leu Ala Thr Gly Val Ser Arg Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly
100 105 110

Ser Val Val Gln Phe Ser Ser Ala Asn Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr
115 120 125

Glu Glu Arg Asn Phe Pro His Gly Asn Glu His Leu Leu Asn Trp Ala
130 135 140

Arg Lys Glu Tyr Gly Ala Val Thr Ser Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala
145 150 155 160

Arg Asn Ile Tyr Ile Lys Val Gly Glu Asp Gln Val Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Cys Asn Ile Gly Lys Asn Phe Leu Ser Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr
180 185 190

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

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

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

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

405 410 415
Gly Leu Arg Glu Pro Glu Glu Val Gln Gly Ser Val Asp Ile Ala Leu
420 425 430
Ser Val Lys Cys Asp Asn Glu Lys Met Ile Val Ala Val Glu Lys Asp

435 440 445

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

450 455 460

Pro Thr Cys Lys Ala Lys Met Asn Gly Thr His Phe Val Leu Glu Ser

465 470 475 480

Pro Leu Asn Gly Cys Gly Thr Arg Pro Arg Trp Ser Ala Leu Asp Gly

485 490 495

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

500 505 510

Ser Ser Gly Trp Pro Asp Gly Tyr Glu Asp Leu Glu Ser Gly Asp Asn

515 520 525

Gly Phe Pro Gly Asp Met Asp Glu Gly Asp Ala Ser Leu Phe Thr Arg

530 535 540

Pro Glu Ile Val Val Phe Asn Cys Ser Leu Gln Gln Val Arg Asn Pro

545 550 555 560

Ser Ser Phe Gln Glu Gln Pro His Gly Asn Ile Thr Phe Asn Met Glu

565 570 575

Leu Tyr Asn Thr Asp Leu Phe Leu Val Pro Ser Gln Gly Val Phe Ser

580 585 590

Val Pro Glu Asn Gly His Val Tyr Val Glu Val Ser Val Thr Lys Ala

595 600 605

Glu Gln Glu Leu Gly Phe Ala Ile Gln Thr Cys Phe Ile Ser Pro Tyr

610 615 620

Ser Asn Pro Asp Arg Met Ser His Tyr Thr Ile Ile Glu Asn Ile Cys

625 630 635 640

Pro Lys Asp Glu Ser Val Lys Phe Tyr Ser Pro Lys Arg Val His Phe

645 650 655

Pro Ile Pro Gln Ala Asp Met Asp Lys Lys Arg Phe Ser Phe Val Phe

660 665 670

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

675 680 685

Leu Cys Thr Lys Met Glu Lys His Pro Gln Lys Leu Pro Lys Cys Val
690 695 700
Pro Pro Asp Glu Ala Cys Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala
705 710 715 720
Met Met Gln Asn Lys Lys Thr Phe Thr Lys Pro Leu Ala Val Ile His

725 730 735
His Glu Ala Glu Ser Lys Glu Lys Gly Pro Ser Met Lys Glu Pro Asn
740 745 750
Pro Ile Ser Pro Pro Ile Phe His Gly Leu Asp Thr Leu Thr Val Gly
755 760 765
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro
770 775 780
Glu Pro Gly Ala Leu Cys Glu Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser His Pro

785 790 795 800
Val Gln Ala Leu Met Glu Ser Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys Ala Ser
805 810 815
Arg Gly Thr Thr Gly Leu Pro Gln Glu Val His Val Leu Asn Leu Arg
820 825 830
Thr Ala Gly Gln Gly Pro Gly Gln Leu Gln Arg Glu Val Thr Leu His
835 840 845
Leu Asn Pro Ile Ser Ser Val His Ile His His Lys Ser Val Val Phe

850 855 860
Leu Leu Asn Ser Pro His Pro Leu Val Trp His Leu Lys Thr Glu Arg
865 870 875 880
Leu Ala Thr Gly Val Ser Arg Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly Ser Val
885 890 895
Val Gln Phe Ser Ser Ala Asn Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr Glu Glu
900 905 910
Arg Asn Phe Pro His Gly Asn Glu His Leu Leu Asn Trp Ala Arg Lys

915 920 925
Glu Tyr Gly Ala Val Thr Ser Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala Arg Asn

930 935 940

Ile Tyr Ile Lys Val Gly Glu Asp Gln Val Phe Pro Pro Lys Cys Asn

945 950 955 960

Ile Gly Lys Asn Phe Leu Ser Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr Leu Gln

965 970 975

Pro Lys Ala Ala Glu Gly Cys Val Met Ser Ser Gln Pro Gln Asn Glu

980 985 990

Glu Val His Ile Ile Glu Leu Ile Thr Pro Asn Ser Asn Pro Tyr Ser

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

Asp Leu Glu Val Val Lys Asn Leu Ile Leu Ile Leu Lys Cys Lys

1025 1030 1035

Lys Ser Val Asn Trp Val Ile Lys Ser Phe Asp Val Lys Gly Ser

1040 1045 1050

Leu Lys Ile Ile Ala Pro Asn Ser Ile Gly Phe Gly Lys Glu Ser

1055 1060 1065

Glu Arg Ser Met Thr Met Thr Lys Ser Ile Arg Asp Asp Ile Pro

1070 1075 1080

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

1085 1090 1095

Ser Pro Ile Thr Ser Tyr Thr Met Ala Pro Val Ala Asn Arg Phe

1100 1105 1110

His Leu Arg Leu Glu Asn Asn Ala Glu Glu Met Gly Asp Glu Glu

1115 1120 1125

Val His Thr Ile Pro Pro Glu Leu Arg Ile Leu Leu Asp Pro Gly

1130 1135 1140

Ala Leu Pro Ala Leu Gln Asn Pro Pro Ile Arg Gly Gly Glu Gly

1145 1150 1155

Gln Asn Gly Gly Leu Pro Phe Pro Phe Pro Asp Ile Ser Arg Arg

1160 1165 1170

Val Trp Asn Glu Glu Gly Glu Asp Gly Leu Pro Arg Pro Lys Asp
1175 1180 1185
Pro Val Ile Pro Ser Ile Gln Leu Phe Pro Gly Leu Arg Glu Pro
1190 1195 1200
Glu Glu Val Gln Gly Ser Val Asp Ile Ala Leu Ser Val Lys Cys
1205 1210 1215
Asp Asn Glu Lys Met Ile Val Ala Val Glu Lys Asp Ser Phe Gln

1220 1225 1230
Ala Ser Gly Tyr Ser Gly Met Asp Val Thr Leu Leu Asp Pro Thr
1235 1240 1245
Cys Lys Ala Lys Met Asn Gly Thr His Phe Val Leu Glu Ser Pro
1250 1255 1260
Leu Asn Gly Cys Gly Thr Arg Pro Arg Trp Ser Ala Leu Asp Gly
1265 1270 1275
Val Val Tyr Tyr Asn Ser Ile Val Ile Gln Val Pro Ala Leu Gly

1280 1285 1290
Asp Ser Ser Gly Trp Pro Asp Gly Tyr Glu Asp Leu Glu Ser Gly
1295 1300 1305
Asp Asn Gly Phe Pro Gly Asp Met Asp Glu Gly Asp Ala Ser Leu
1310 1315 1320
Phe Thr Arg Pro Glu Ile Val Val Phe Asn Cys Ser Leu Gln Gln
1325 1330 1335
Val Arg Asn Pro Ser Ser Phe Gln Glu Gln Pro His Gly Asn Ile

1340 1345 1350
Thr Phe Asn Met Glu Leu Tyr Asn Thr Asp Leu Phe Leu Val Pro
1355 1360 1365
Ser Gln Gly Val Phe Ser Val Pro Glu Asn Gly His Val Tyr Val
1370 1375 1380
Glu Val Ser Val Thr Lys Ala Glu Gln Glu Leu Gly Phe Ala Ile
1385 1390 1395
Gln Thr Cys Phe Ile Ser Pro Tyr Ser Asn Pro Asp Arg Met Ser

1400 1405 1410

His Tyr Thr Ile Ile Glu Asn Ile Cys Pro Lys Asp Glu Ser Val

1415 1420 1425

Lys Phe Tyr Ser Pro Lys Arg Val His Phe Pro Ile Pro Gln Ala

1430 1435 1440

Asp Met Asp Lys Lys Arg Phe Ser Phe Val Phe Lys Pro Val Phe

1445 1450 1455

Asn Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Cys Glu Leu Thr Leu Cys Thr

1460 1465 1470

Lys Met Glu Lys His Pro Gln Lys Leu Pro Lys Cys Val Pro Pro

1475 1480 1485

Asp Glu Ala Cys Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala Met

1490 1495 1500

Met Gln Asn Lys Lys Thr Phe Thr Lys Pro Leu Ala Val Ile His

1505 1510 1515

His Glu Ala Glu Ser Lys Glu Lys Gly Pro Ser Met Lys Glu Pro

1520 1525 1530

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

1535 1540 1545

Val

<210> 169

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 169

Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val

1 5 10 15

Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val

20 25 30

Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp

35 40 45

Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Pro Pro His

100 105 110

Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly

115 120 125

Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser

130 135 140

Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser

145 150 155 160

Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn

165 170 175

Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro

180 185 190

Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met

195 200 205

Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser

210 215 220

Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr

225 230 235 240

Ser Asn Pro Asp

<210> 170

<211> 875

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 170

Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val
1 5 10 15
Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val

20 25 30
Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp
35 40 45
Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr
50 55 60
Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr
65 70 75 80
Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu Leu Gly Gly Gly

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

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

210 215 220
Phe Ser Ser Ala Asn Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr Glu Glu Arg Asn
225 230 235 240

Phe Pro His Gly Asn Glu His Leu Leu Asn Trp Ala Arg Lys Glu Tyr
245 250 255
Gly Ala Val Thr Ser Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala Arg Asn Ile Tyr
260 265 270
Ile Lys Val Gly Glu Asp Gln Val Phe Pro Pro Lys Cys Asn Ile Gly

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

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

405 410 415
Lys Trp Ala Leu Asp Asn Gly Tyr Ser Pro Ile Thr Ser Tyr Thr Met
420 425 430
Ala Pro Val Ala Asn Arg Phe His Leu Arg Leu Glu Asn Asn Ala Glu
435 440 445
Glu Met Gly Asp Glu Glu Val His Thr Ile Pro Pro Glu Leu Arg Ile
450 455 460
Leu Leu Asp Pro Gly Ala Leu Pro Ala Leu Gln Asn Pro Pro Ile Arg

465 470 475 480
Gly Gly Glu Gly Gln Asn Gly Gly Leu Pro Phe Pro Phe Pro Asp Ile

485 490 495

Ser Arg Arg Val Trp Asn Glu Glu Gly Glu Asp Gly Leu Pro Arg Pro

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

Asp Asn Glu Lys Met Ile Val Ala Val Glu Lys Asp Ser Phe Gln Ala

545 550 555 560

Ser Gly Tyr Ser Gly Met Asp Val Thr Leu Leu Asp Pro Thr Cys Lys

565 570 575

Ala Lys Met Asn Gly Thr His Phe Val Leu Glu Ser Pro Leu Asn Gly

580 585 590

Cys Gly Thr Arg Pro Arg Trp Ser Ala Leu Asp Gly Val Val Tyr Tyr

595 600 605

Asn Ser Ile Val Ile Gln Val Pro Ala Leu Gly Asp Ser Ser Gly Trp

610 615 620

Pro Asp Gly Tyr Glu Asp Leu Glu Ser Gly Asp Asn Gly Phe Pro Gly

625 630 635 640

Asp Met Asp Glu Gly Asp Ala Ser Leu Phe Thr Arg Pro Glu Ile Val

645 650 655

Val Phe Asn Cys Ser Leu Gln Gln Val Arg Asn Pro Ser Ser Phe Gln

660 665 670

Glu Gln Pro His Gly Asn Ile Thr Phe Asn Met Glu Leu Tyr Asn Thr

675 680 685

Asp Leu Phe Leu Val Pro Ser Gln Gly Val Phe Ser Val Pro Glu Asn

690 695 700

Gly His Val Tyr Val Glu Val Ser Val Thr Lys Ala Glu Gln Glu Leu

705 710 715 720

Gly Phe Ala Ile Gln Thr Cys Phe Ile Ser Pro Tyr Ser Asn Pro Asp

725 730 735

Arg Met Ser His Tyr Thr Ile Ile Glu Asn Ile Cys Pro Lys Asp Glu
740 745 750

Ser Val Lys Phe Tyr Ser Pro Lys Arg Val His Phe Pro Ile Pro Gln
755 760 765

Ala Asp Met Asp Lys Lys Arg Phe Ser Phe Val Phe Lys Pro Val Phe
770 775 780

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

785 790 795 800

Met Glu Lys His Pro Gln Lys Leu Pro Lys Cys Val Pro Pro Asp Glu
805 810 815

Ala Cys Thr Ser Leu Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala Met Met Gln Asn
820 825 830

Lys Lys Thr Phe Thr Lys Pro Leu Ala Val Ile His His Glu Ala Glu
835 840 845

Ser Lys Glu Lys Gly Pro Ser Met Lys Glu Pro Asn Pro Ile Ser Pro

850 855 860

Pro Ile Phe His Gly Leu Asp Thr Leu Thr Val
865 870 875

<210> 171

<211> 918

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 171

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
1 5 10 15

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
20 25 30

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
35 40 45

Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val
50 55 60

Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp
65 70 75 80
Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro
85 90 95

Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met
100 105 110
Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
115 120 125
Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130 135 140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Pro Glu Pro Gly Ala Leu Cys Glu
145 150 155 160

Leu Ser Pro Val Ser Ala Ser His Pro Val Gln Ala Leu Met Glu Ser
165 170 175
Phe Thr Val Leu Ser Gly Cys Ala Ser Arg Gly Thr Thr Gly Leu Pro
180 185 190
Gln Glu Val His Val Leu Asn Leu Arg Thr Ala Gly Gln Gly Pro Gly
195 200 205
Gln Leu Gln Arg Glu Val Thr Leu His Leu Asn Pro Ile Ser Ser Val
210 215 220

His Ile His His Lys Ser Val Val Phe Leu Leu Asn Ser Pro His Pro
225 230 235 240
Leu Val Trp His Leu Lys Thr Glu Arg Leu Ala Thr Gly Val Ser Arg
245 250 255
Leu Phe Leu Val Ser Glu Gly Ser Val Val Gln Phe Ser Ser Ala Asn
260 265 270
Phe Ser Leu Thr Ala Glu Thr Glu Glu Arg Asn Phe Pro His Gly Asn
275 280 285

Glu His Leu Leu Asn Trp Ala Arg Lys Glu Tyr Gly Ala Val Thr Ser
290 295 300
Phe Thr Glu Leu Lys Ile Ala Arg Asn Ile Tyr Ile Lys Val Gly Glu

305 310 315 320

Asp Gln Val Phe Pro Pro Lys Cys Asn Ile Gly Lys Asn Phe Leu Ser

325 330 335

Leu Asn Tyr Leu Ala Glu Tyr Leu Gln Pro Lys Ala Ala Glu Gly Cys

340 345 350

Val Met Ser Ser Gln Pro Gln Asn Glu Glu Val His Ile Ile Glu Leu

355 360 365

Ile Thr Pro Asn Ser Asn Pro Tyr Ser Ala Phe Gln Val Asp Ile Thr

370 375 380

Ile Asp Ile Arg Pro Ser Gln Glu Asp Leu Glu Val Val Lys Asn Leu

385 390 395 400

Ile Leu Ile Leu Lys Cys Lys Lys Ser Val Asn Trp Val Ile Lys Ser

405 410 415

Phe Asp Val Lys Gly Ser Leu Lys Ile Ile Ala Pro Asn Ser Ile Gly

420 425 430

Phe Gly Lys Glu Ser Glu Arg Ser Met Thr Met Thr Lys Ser Ile Arg

435 440 445

Asp Asp Ile Pro Ser Thr Gln Gly Asn Leu Val Lys Trp Ala Leu Asp

450 455 460

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

465 470 475 480

Arg Phe His Leu Arg Leu Glu Asn Asn Ala Glu Glu Met Gly Asp Glu

485 490 495

Glu Val His Thr Ile Pro Pro Glu Leu Arg Ile Leu Leu Asp Pro Gly

500 505 510

Ala Leu Pro Ala Leu Gln Asn Pro Pro Ile Arg Gly Gly Glu Gly Gln

515 520 525

Asn Gly Gly Leu Pro Phe Pro Phe Pro Asp Ile Ser Arg Arg Val Trp

530 535 540

Asn Glu Glu Gly Glu Asp Gly Leu Pro Arg Pro Lys Asp Pro Val Ile

545 550 555 560

Pro Ser Ile Gln Leu Phe Pro Gly Leu Arg Glu Pro Glu Glu Val Gln
565 570 575

Gly Ser Val Asp Ile Ala Leu Ser Val Lys Cys Asp Asn Glu Lys Met
580 585 590

Ile Val Ala Val Glu Lys Asp Ser Phe Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gly
595 600 605

Met Asp Val Thr Leu Leu Asp Pro Thr Cys Lys Ala Lys Met Asn Gly
610 615 620

Thr His Phe Val Leu Glu Ser Pro Leu Asn Gly Cys Gly Thr Arg Pro
625 630 635 640

Arg Trp Ser Ala Leu Asp Gly Val Val Tyr Tyr Asn Ser Ile Val Ile
645 650 655

Gln Val Pro Ala Leu Gly Asp Ser Ser Gly Trp Pro Asp Gly Tyr Glu
660 665 670

Asp Leu Glu Ser Gly Asp Asn Gly Phe Pro Gly Asp Met Asp Glu Gly
675 680 685

Asp Ala Ser Leu Phe Thr Arg Pro Glu Ile Val Val Phe Asn Cys Ser
690 695 700

Leu Gln Gln Val Arg Asn Pro Ser Ser Phe Gln Glu Gln Pro His Gly
705 710 715 720

Asn Ile Thr Phe Asn Met Glu Leu Tyr Asn Thr Asp Leu Phe Leu Val
725 730 735

Pro Ser Gln Gly Val Phe Ser Val Pro Glu Asn Gly His Val Tyr Val
740 745 750

Glu Val Ser Val Thr Lys Ala Glu Gln Glu Leu Gly Phe Ala Ile Gln
755 760 765

Thr Cys Phe Ile Ser Pro Tyr Ser Asn Pro Asp Arg Met Ser His Tyr
770 775 780

Thr Ile Ile Glu Asn Ile Cys Pro Lys Asp Glu Ser Val Lys Phe Tyr
785 790 795 800

Ser Pro Lys Arg Val His Phe Pro Ile Pro Gln Ala Asp Met Asp Lys

805 810 815

Lys Arg Phe Ser Phe Val Phe Lys Pro Val Phe Asn Thr Ser Leu Leu

820 825 830

Phe Leu Gln Cys Glu Leu Thr Leu Cys Thr Lys Met Glu Lys His Pro

835 840 845

Gln Lys Leu Pro Lys Cys Val Pro Pro Asp Glu Ala Cys Thr Ser Leu

850 855 860

Asp Ala Ser Ile Ile Trp Ala Met Met Gln Asn Lys Lys Thr Phe Thr

865 870 875 880

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

885 890 895

Pro Ser Met Lys Glu Pro Asn Pro Ile Ser Pro Pro Ile Phe His Gly

900 905 910

Leu Asp Thr Leu Thr Val

915

<210> 172

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 172

Thr Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 173

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 173

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 174

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 174

Ser Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 175

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 175

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 176

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 176

Gly Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Gly

<210> 177

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 177

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 178

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 178

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu 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 Pro 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 Asp Glu
225 230 235 240

Leu 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> 179

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 179

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

165 170 175

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

180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260 265 270

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

275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

290 295 300

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

305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 180

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 180

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 181

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 181

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

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45

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

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 182
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 182
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15