

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2022-0100929
(43) 공개일자 2022년07월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7019869
- (22) 출원일자(국제) 2020년11월13일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년06월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2020/060434
- (87) 국제공개번호 WO 2021/097223
국제공개일자 2021년05월20일
- (30) 우선권주장
62/936,119 2019년11월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
젠자임 코포레이션
미국 메사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트 450
- (72) 발명자
로드, 다나
미국 02142 메사추세츠주 캠브릿지 비니 스트리트 50
라도세빅, 카타리나
프랑스 93110 로니 쉰 부아 뒤 감베따 5
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 임근실

전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 이중파라토프성 CD73 항체

(57) 요약

항-CD73 항원-결합 단백질이 제공된다. 이중파라토프성(biparatopic) 항-CD73 항원-결합 단백질이 제공된다. CD73 활성을 저해하는 방법 및 CD73-매개 질병 및 장애를 치료하는 방법도 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/32 (2013.01)
C07K 2317/522 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

스테파노, 제임스 이.

미국 02142 매사추세츠주 캠프릿지 비니 스트리트
50 젠자임 코포레이션 내

저우, 옌팡

미국 02142 매사추세츠주 캠프릿지 비니 스트리트
50 젠자임 코포레이션 내

(30) 우선권주장

63/023,542 2020년05월12일 미국(US)
63/086,982 2020년10월02일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

CD73 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항원-결합 단백질 또는 이의 단편으로서,

(a) GGSIRNNY(SEQ ID NO: 1) 또는 GFTFSSYG(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1 서열, IYISGTT(SEQ ID NO: 2) 또는 FWYDGSNK(SEQ ID NO: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 서열, 및 AREHYVSGTSLDN(SEQ ID NO: 3) 또는 ARAPNWDDAFDI(SEQ ID NO: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변(VH) 도메인; 및

(b) QSVNTNY(SEQ ID NO: 4) 또는 SGSVSTSY(Y) (SEQ ID NO: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1 서열, GTS(SEQ ID NO: 5) 또는 STN(SEQ ID NO: 11)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2 서열, 및 QQDYNLPYT(SEQ ID NO: 6) 또는 VLFMGSGLI(W) (SEQ ID NO: 12)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3 서열을 포함하는 항체 경쇄 가변(VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, VH 도메인은 SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하고, VL 도메인은 SEQ ID NO: 14 또는 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 17, 18, 20, 또는 21의 아미노산 서열을 포함하고, 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 19 또는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 4

제2항에 있어서, SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하거나 적어도 약 95% 동일한 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 14 또는 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하거나 적어도 약 95% 동일한 VL 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 5

제3항에 있어서, SEQ ID NO: 17, 18, 20, 또는 21의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하거나 적어도 약 95% 동일한 항체 중쇄, 및 SEQ ID NO: 19 또는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하거나 적어도 약 95% 동일한 항체 경쇄를 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) VH 도메인은 GGSIRNNY(SEQ ID NO: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1 서열, IYISGTT(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 서열, 및 AREHYVSGTSLDN(SEQ ID NO: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3 서열을 포함하고;

(b) VL 도메인은 QSVNTNY(SEQ ID NO: 4)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1 서열, GTS(SEQ ID NO: 5)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2 서열, 및 QQDYNLPYT(SEQ ID NO: 6)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 7

제6항에 있어서, VH 도메인은 SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하고, VL 도메인은 SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 8

제6항에 있어서, 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 17 또는 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하고, 항체 경쇄는 SEQ

ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) VH 도메인은 GFTFSSYG(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1 서열, FWYDGSNK(SEQ ID NO: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 서열, 및 ARAPNWDDAFDI(SEQ ID NO: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3 서열을 포함하고;

(b) VL 도메인은 SGSVSTSY(SEQ ID NO: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1 서열, STN(SEQ ID NO: 11)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2 서열, 및 VLFMGSIGIWV(SEQ ID NO: 12)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 10

제9항에 있어서, VH 도메인은 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하고, VL 도메인은 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 11

제9항에 있어서, 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 20 또는 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하고, 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드에 결합하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 13

제1항 내지 제8항 및 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 N96, G97, V98, E99, K121, P123, P156, F157, S159, N160, G162, T163, N164, L165, V166, F167, E168, R491, 및 D496을 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드의 에피토프에 결합하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 14

제1항 내지 제5항 및 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 P112, K119, A125, S126, S129, G130, L133, P134, Y135, K136, K180, L184, 및 N185를 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드의 에피토프에 결합하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질은 키메라 또는 인간화 항체인, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질은 인간 항체인, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질은 단일클론 항체인, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질은 Fc 영역을 포함하는 하나 이상의 전장 항체 중쇄를 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 19

제18항에 있어서, Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 영역인, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 20

제19항에 있어서, 인간 IgG1 Fc 영역은 EU 색인에 따라 인간 IgG1의 위치 405 및 409에 상응하는 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 아미노산 치환은 F405L 및 K409R인, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 인코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 23

제22항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 24

제23항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 25

제1 CD73 에피토프 및 제2 CD73 에피토프에 대한 결합 특이성을 포함하는 이중과라토프성(biparatopic) 항원-결합 단백질.

청구항 26

제25항에 있어서,

(a) GGSIRNNY(SEQ ID NO: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1 서열, IYISGTT(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 서열, 및 AREHYVSGTSLDN(SEQ ID NO: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3 서열을 포함하는 제1 CD73 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제1 VH 도메인;

(b) QSVNTNY(SEQ ID NO: 4)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1 서열, GTS(SEQ ID NO: 5)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2 서열, 및 QQDYNLPYT(SEQ ID NO: 6)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3 서열을 포함하는 제1 CD73 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제1 VL 도메인;

(c) GFTFSSYG(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1 서열, FWYDGSNK(SEQ ID NO: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 서열, 및 ARAPNWDDAFDI(SEQ ID NO: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3 서열을 포함하는 제2 CD73 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제2 VH 도메인; 및

(d) SGSVSTSY(Y)(SEQ ID NO: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1 서열, STN(SEQ ID NO: 11)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2 서열, 및 VLFMGGI(W)(SEQ ID NO: 12)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3 서열을 포함하는 제2 CD73 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제2 VL 도메인을 포함하는, 이중과라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 27

제25항에 있어서,

제1 VH 도메인은 SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하며;

제2 VH 도메인은 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하고;

제1 VL 도메인은 SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함하며;

제2 VL 도메인은 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함하는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 28

제25항에 있어서,

- (a) 제1 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 17 또는 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 제2 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 20 또는 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하며;
- (c) 제1 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하고;
- (d) 제2 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 29

제28항에 있어서,

- (a) 제1 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 제2 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하며;
- (c) 제1 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하고;
- (d) 제2 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 30

제28항에 있어서,

- (a) 제1 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하고;
- (b) 제2 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하며;
- (c) 제1 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하고;
- (d) 제2 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함하는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 31

제25항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

- (a) 제1 VH 및 VL 도메인은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 N96, G97, V98, E99, K121, P123, P156, F157, S159, N160, G162, T163, N164, L165, V166, F167, E168, R491, 및 D496을 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드의 제1 에피토프에 결합하고;
- (b) 제2 VH 및 VL 도메인은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 P112, K119, A125, S126, S129, G130, L133, P134, Y135, K136, K180, L184, 및 N185를 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드의 제2 에피토프에 결합하는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 32

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 단일특이적 모항체(parental antibody) 중 하나 또는 둘 모두와 비교하여 CD73의 더 높은 저해 활성을 포함하는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 33

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 단일특이적 모항체의 조합과 비교하여 CD73의 더 높은 저해 활성을 포함하는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 34

제25항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 VH 및 VL 도메인은 제1 CD73 이량체 분자 상의 제1 CD73 에피토프에 결합하고, 제2 VH 및 VL 도메인은 제2 CD73 이량체 분자 상의 제2 CD73 에피토프에 결합하는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 35

제25항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 항원-결합 단백질은 2개 이상의 CD73 이량체 분자를 가교시킬 수 있는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 36

제25항에 있어서, Fab 아암 교환에 의해 생성되는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 37

제36항에 있어서, Fab 아암 교환은

(a) EU 색인에 따라 아미노산 치환 F405L을 포함하는 IgG1 Fc 영역을 포함하는 제1 모 단일특이적 항원-결합 단백질을 EU 색인에 따라 아미노산 치환 K409R을 포함하는 IgG1 Fc 영역을 포함하는 제2 모 단일특이적 항원-결합 단백질과 혼합하여, 혼합물을 생성하는 단계;

(b) 단계 (a)의 혼합물을 환원 조건 하에 정치시켜, 이중파라토프성 이중특이적 항원-결합 단백질을 함유하는 환원된 항원-결합 단백질 혼합물을 생성하는 단계;

(c) 단계 (b)의 혼합물을 산화 조건 하에 정치시켜, 이중파라토프성 이중특이적 항원-결합 단백질의 중쇄 사이의 이황화 결합을 재형성하는 단계; 및

(d) 이중파라토프성 이중특이적 항원-결합 단백질을 분리하는 단계에 따라 수행되는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 38

제36항에 있어서, 제1 모 단일특이적 항원-결합 단백질과 제2 모 단일특이적 항원-결합 단백질은 등몰량으로 혼합되는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 39

제36항에 있어서, 환원 조건은 환원제를 첨가함으로써 생성되는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 40

제39항에 있어서, 환원제는 머캅토에틸아민(MEA)을 포함하는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 41

제36항에 있어서, 단계 (a)의 혼합물은 환원 조건 하에 약 18°C 내지 약 30°C의 온도에서 약 3시간 내지 약 6시간 동안 정치되는, 이중파라토프성 항원-결합 단백질.

청구항 42

대상체에서 CD73-매개 질병 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, CD73-매개 질병 또는 장애는 암인, 방법.

청구항 44

하나 이상의 단일특이적 모항체와 비교하여 CD73의 더 높은 저해 활성을 포함하는 이중파라토프성 항원-결합 단백질을 선택하는 방법으로서,

a) 이중파라토프성 항원-결합 단백질을 형성하는 조건 하에 2개의 모항체를 조합하는 단계;

b) CD73 활성 검정에서 이중파라토프성 항원-결합 단백질 및 2개의 모항체 중 하나 또는 둘 모두를 시험하는 단계;

- c) 이중과라토프성 항원-결합 단백질을 이용한 CD73 활성을 2개의 모항체 중 하나 또는 둘 모두를 이용한 CD73 활성과 비교하는 단계; 및
- d) CD73 활성이 2개의 모항체 중 하나 또는 둘 모두의 CD73 활성보다 더 작다면, 이중과라토프성 항원-결합 단백질을 선택하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, CD73 활성 검정은 아데노신 형성을 측정하는, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 아데노신 형성은 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LC/MS)에 의해 정량화되는, 방법.

청구항 47

제44항에 있어서, CD73 활성 검정은 인간 CD73을 발현시키는 COR-L23 폐 암종 세포로 수행되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 2019년 11월 15일에 출원된 미국 가출원 제62/936,119호, 2020년 5월 12일에 출원된 미국 가출원 제 63/023,542호, 및 2020년 10월 2일에 출원된 미국 가출원 제63/086,982호에 대한 우선권을 주장하며, 각각의 출원의 내용은 모든 목적을 위해 참조로 본원에 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자 제출된 서열 목록을 포함하고, 그 전문은 참조로 본원에 포함된다. 2020년 11월 5일에 생성된 상기 ASCII 복사본은 711174_SA9-282PC_ST25.txt로 명명되고 35,615 바이트 크기이다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 게시내용은 이중특이적 항원-결합 단백질을 제조하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] CD73(엑토-5'-뉴클레오티다제, NT5E)은 세포외 환경에서 아데노신 모노포스페이트(AMP)를 아데노신(ADO)으로 탈인산화시키는 글리코실화된 125 kDa 동종이량체성 막 결합된 효소이다(Allard et al. 2016. Immunotherapy 8:145-163). 아데노신은 종양 미세환경에서 강력한 면역저해 효과를 갖고, 그로 인해 CD73은 암 요법에 대한 표적으로 광범위한 관심을 끌었다(Allard et al. 2017. Immunological reviews 276:121-144; Allard et al. 2019. Immunology letters 205:31-39; Kats et al. 2018. International journal of molecular sciences 156:451-457; Sek et al. 2018. Int J Mol Sci. 19(12) pii: E3837; Yang et al. 2018. Current medicinal chemistry. 25:2260-2271). CD73 발현은 항-HER2 요법에 대한 내성(Turcotte et al. 2017. Cancer research. 77:5652-5663), 여러 종양 유형에서 감소된 항-종양 면역 반응과 함께 불량한 예후(상기 Allard 2016) 및 시험관내에서 종양 세포의 증가된 성장, 이동 및 침범 (Zhi et al. 2007. Clinical & experimental metastasis. 24:439-448)과 관련이 있다. 다수의 임상 연구가, CD73-특이적 항체(Siu et al. 2018. Cancer research. 78:CT180-CT180) 및 소분자 저해제(Overman et al. 2018. Journal of Clinical Oncology. 36(15):4123)를 단독으로 또는 A2a 아데노신 수용체 길항제 및 다른 표적, 특히 PD-1/PD-L1 축에 대한 항체와 조합하여 이용함으로써 진행되고 있는 중이다(Leone et al. 2018. Journal for immunotherapy of cancer. 6:57). 효소 활성의 중등 저해를 갖는 CD73 특이적 내재화 항체인 MEDI9447(올레클루맷(oleclumab))은 단일요법으로서 그리고 PD-L1 차단제 더발루맷(durvalumab)과 조합되어 어느 정도의 임상 효능을 나타내었다(Hay et al. 2016. Oncoimmunology. 5: e1208875). 그렇지만, 단일요법으로서 그리고 다른 치료법과 조합되어 더 큰 임상 효능을 갖는 CD73 항체에 대한 필요성이 당업계에 존재한다.

[0008] 또한, CD73 항체가 아데노신 생성과는 무관하게 효과를 발휘할 수 있는 것으로 나타났다. 한 연구는, 면역 반응의 증강이 마우스에서 Fc γ RIV-관여(engagement)를 통해 매개되었음을 나타내었고(Vijayan et al. 2017.

Oncoimmunology. 6(5):e1312044), 다른 작업은 전이를 억제할 시 CD73 내재화에 대한 역할을 시사하였다(상기 Overman 2018; 상기 Hay 2016; Terp et al. 2013. Journal of immunology. 191:4165-4173). 그렇지만, 종양에서의 아데노신 수준은 마이크로몰 농도에 도달할 수 있으며, 따라서 CD73 활성의 불완전한 저해는 현재의 CD73-표적화 치료법의 효능에 대한 제한 요인일 수 있다(Blay et al. 1997. Cancer research. 57:2602-2605). 그러므로, CD73이 암 진행에 영향을 미치는 기전은 복잡할 수 있으며, 이는 최적의 효능을 달성하기 위해서는 효소 활성의 매우 강력한 저해 또는 기전의 조합에 대한 필요성이 있음을 시사한다.

[0009] 종래의 단일특이적 CD73 항체에 의한 CD73 효소 활성(예를 들어, 높은 백분율의 저해와 낮은 EC50 둘 모두)의 강력한 저해를 달성하는 것은 난해할 수 있다(Geoghegan et al. 2016. mAbs. 8:454-467; WO2016055609A1; WO2017118613). 따라서, CD73 효소 활성의 효과적인 저해를 달성하는 항-CD73 항체를 식별할 필요성이 당업계에 존재한다. 이러한 항-CD73 항체는 CD73-매개 질병 및 장애의 치료에 유용할 수 있다.

발명의 내용

[0010] CD73 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합하고 CD73 활성의 강력한 저해를 달성할 수 있는 이중파라토프성(bi-paratopic) 결합 단백질이 본원에 개시된다. 본 발명의 결합 단백질은 특히 CD73-매개 질병 및 장애를 치료하는데 적합하다.

[0011] 일 양태에서, 본 개시내용은 CD73 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항원-결합 단백질 또는 이의 단편으로서, (a) GGSIRNNY(SEQ ID NO: 1) 또는 GFTFSSYG(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1 서열, IYISGTT(SEQ ID NO: 2) 또는 FWYDGSNK(SEQ ID NO: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 서열, 및 AREHYVSGTSLDN(SEQ ID NO: 3) 또는 ARAPNWDDAFDI(SEQ ID NO: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3 서열을 포함하는 항체 중쇄 가변(VH) 도메인; 및 (b) QSVNTNY(SEQ ID NO: 4) 또는 SGSVSTSY(Y) (SEQ ID NO: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1 서열, GTS(SEQ ID NO: 5) 또는 STN(SEQ ID NO: 11)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2 서열, 및 QQDYNLPYT(SEQ ID NO: 6) 또는 VLFMGGIIVW(SEQ ID NO: 12)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3 서열을 포함하는 항체 경쇄 가변(VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 제공한다.

[0012] 소정의 구현예에서, VH 도메인은 SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하고, VL 도메인은 SEQ ID NO: 14 또는 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 소정의 구현예에서, 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 17, 18, 20, 또는 21의 아미노산 서열을 포함하고, 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 19 또는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함한다.

[0014] 소정의 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 SEQ ID NO: 13 또는 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하거나 적어도 약 95% 동일한 VH 도메인, 및 SEQ ID NO: 14 또는 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하거나 적어도 약 95% 동일한 VL 도메인을 포함한다.

[0015] 소정의 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 SEQ ID NO: 17, 18, 20, 또는 21의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하거나 적어도 약 95% 동일한 항체 중쇄, 및 SEQ ID NO: 19 또는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일하거나 적어도 약 95% 동일한 항체 경쇄를 포함한다.

[0016] 소정의 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 하기를 포함한다: (a) VH 도메인은 GGSIRNNY(SEQ ID NO: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1 서열, IYISGTT(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 서열, 및 AREHYVSGTSLDN(SEQ ID NO: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3 서열을 포함하고; (b) VL 도메인은 QSVNTNY(SEQ ID NO: 4)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1 서열, GTS(SEQ ID NO: 5)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2 서열, 및 QQDYNLPYT(SEQ ID NO: 6)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3 서열을 포함한다.

[0017] 7 소정의 구현예에서, VH 도메인은 SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하고, VL 도메인은 SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함한다.

[0018] 소정의 구현예에서, 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 17 또는 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하고, 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함한다.

[0019] 소정의 구현예에서, 항원 결합 단백질 또는 이의 단편은 하기를 포함한다: (a) VH 도메인은 GFTFSSYG(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1 서열, FWYDGSNK(SEQ ID NO: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 서열, 및 ARAPNWDDAFDI(SEQ ID NO: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3 서열을 포함하고; (b) VL 도메인은 SGSVSTSY(Y) (SEQ ID NO: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1 서열, STN(SEQ ID NO: 11)의 아미노산 서열을

포함하는 CDR-L2 서열, 및 VLFMGSIGIWW(SEQ ID NO: 12)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3 서열을 포함한다.

- [0020] 소정의 구현예에서, VH 도메인은 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하고, VL 도메인은 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0021] 소정의 구현예에서, 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 20 또는 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하고, 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0022] 소정의 구현예에서, 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드에 결합한다.
- [0023] 소정의 구현예에서, 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 N96, G97, V98, E99, K121, P123, P156, F157, S159, N160, G162, T163, N164, L165, V166, F167, E168, R491, 및 D496을 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드의 에피토프에 결합한다.
- [0024] 소정의 구현예에서, 항원 결합 단백질은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 P112, K119, A125, S126, S129, G130, L133, P134, Y135, K136, K180, L184, 및 N185를 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드의 에피토프에 결합한다.
- [0025] 소정의 구현예에서, 항원 결합 단백질은 키메라 또는 인간화 항체이다. 소정의 구현예에서, 항원 결합 단백질은 인간 항체이다.
- [0026] 소정의 구현예에서, 항원 결합 단백질은 단일클론 항체이다.
- [0027] 소정의 구현예에서, 항원 결합 단백질은 Fc 영역을 포함하는 하나 이상의 전장 항체 중쇄를 포함한다. 소정의 구현예에서, Fc 영역은 인간 IgG1 Fc 영역이다.
- [0028] 소정의 구현예에서, 인간 IgG1 Fc 영역은 EU 색인에 따라 인간 IgG1의 위치 405 및 409에 상응하는 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 아미노산 치환은 F405L 및 K409R이다.
- [0029] 일 양태에서, 본 개시내용은 상기 언급된 항원 결합 단백질 또는 이의 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0030] 일 양태에서, 본 개시내용은 상기 언급된 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 인코딩하는 단리된 핵산 분자를 제공한다.
- [0031] 일 양태에서, 본 개시내용은 상기 언급된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.
- [0032] 일 양태에서, 본 개시내용은 상기 언급된 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0033] 일 양태에서, 본 개시내용은 제1 CD73 에피토프 및 제2 CD73 에피토프에 대한 결합 특이성을 포함하는 이중과라토프성 항원-결합 단백질을 제공한다.
- [0034] 소정의 구현예에서, 이중과라토프성 항원-결합 단백질은 (a) GGSIRNNY(SEQ ID NO: 1)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1 서열, IYISGTT(SEQ ID NO: 2)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 서열, 및 AREHYVSGTSLDN(SEQ ID NO: 3)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3 서열을 포함하는 제1 CD73 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제1 VH 도메인; (b) QSVNTNY(SEQ ID NO: 4)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1 서열, GTS(SEQ ID NO: 5)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2 서열, 및 QQDYNLPYT(SEQ ID NO: 6)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3 서열을 포함하는 제1 CD73 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제1 VL 도메인; (c) GFTFSSYG(SEQ ID NO: 7)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1 서열, FWYDGSNK(SEQ ID NO: 8)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2 서열, 및 ARAPNWDDAFDI(SEQ ID NO: 9)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3 서열을 포함하는 제2 CD73 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제2 VH 도메인; 및 (d) SGSVSTSY(Y) (SEQ ID NO: 10)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1 서열, STN(SEQ ID NO: 11)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2 서열, 및 VLFMGSIGIWW(SEQ ID NO: 12)의 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3 서열을 포함하는 제2 CD73 에피토프에 대한 특이성을 갖는 제2 VL 도메인을 포함한다.
- [0035] 소정의 구현예에서, 제1 VH 도메인은 SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열을 포함하며; 제2 VH 도메인은 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열을 포함하고; 제1 VL 도메인은 SEQ ID NO: 14의 아미노산 서열을 포함하며; 제2 VL 도메인은 SEQ ID NO: 16의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0036] 소정의 구현예에서, 이중과라토프성 항원-결합 단백질은 하기를 포함한다: (a) 제1 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 17 또는 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하고; (b) 제2 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 20 또는 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하며; (c) 제1 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하고; (d) 제2 항체 경

쇄는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0037] 소정의 구현예에서, 이중파라토프성 항원-결합 단백질은 하기를 포함한다: (a) 제1 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열을 포함하고; (b) 제2 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하며; (c) 제1 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하고; (d) 제2 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0038] 소정의 구현예에서, 이중파라토프성 항원-결합 단백질은 하기를 포함한다: (a) 제1 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 18의 아미노산 서열을 포함하고; (b) 제2 항체 중쇄는 SEQ ID NO: 20의 아미노산 서열을 포함하며; (c) 제1 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하고; (d) 제2 항체 경쇄는 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0039] 소정의 구현예에서, 이중파라토프성 항원-결합 단백질은 하기를 포함한다: (a) 제1 VH 및 VL 도메인은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 N96, G97, V98, E99, K121, P123, P156, F157, S159, N160, G162, T163, N164, L165, V166, F167, E168, R491, 및 D496을 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드의 제1 에피토프에 결합하고; (b) 제2 VH 및 VL 도메인은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 P112, K119, A125, S126, S129, G130, L133, P134, Y135, K136, K180, L184, 및 N185를 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드의 제2 에피토프에 결합한다.
- [0040] 소정의 구현예에서, 이중파라토프성 항원-결합 단백질은 단일특이적 모항체(parental antibody) 중 하나 또는 둘 모두와 비교하여 CD73의 더 높은 저해 활성을 포함한다.
- [0041] 소정의 구현예에서, 이중파라토프성 항원-결합 단백질은 단일특이적 모항체의 조합과 비교하여 CD73의 더 높은 저해 활성을 포함한다.
- [0042] 소정의 구현예에서, 제1 VH 및 VL 도메인은 제1 CD73 이량체 분자 상의 제1 CD73 에피토프에 결합하고, 제2 VH 및 VL 도메인은 제2 CD73 이량체 분자 상의 제2 CD73 에피토프에 결합한다.
- [0043] 소정의 구현예에서, 항원-결합 단백질은 2개 이상의 CD73 이량체 분자를 가교시킬 수 있다.
- [0044] 소정의 구현예에서, 이중파라토프성 항원-결합 단백질은 Fab 아암 교환에 의해 생성된다.
- [0045] 소정의 구현예에서, Fab 아암 교환은 하기 단계에 따라 수행된다: (a) EU 색인에 따라 아미노산 치환 F405L을 포함하는 IgG1 Fc 영역을 포함하는 제1 모 단일특이적 항원-결합 단백질을 EU 색인에 따라 아미노산 치환 K409R을 포함하는 IgG1 Fc 영역을 포함하는 제2 모 단일특이적 항원-결합 단백질과 혼합하여, 혼합물을 생성하는 단계; (b) 단계 (a)의 혼합물을 환원 조건 하에 정치시켜, 이중파라토프성 이중특이적 항원-결합 단백질을 함유하는 환원된 항원-결합 단백질 혼합물을 생성하는 단계; (c) 단계 (b)의 혼합물을 산화 조건 하에 정치시켜, 이중파라토프성 이중특이적 항원-결합 단백질의 중쇄 사이의 이황화 결합을 재형성하는 단계; 및 (d) 이중파라토프성 이중특이적 항원-결합 단백질을 단리하는 단계.
- [0046] 소정의 구현예에서, 제1 모 단일특이적 항원-결합 단백질과 제2 모 단일특이적 항원-결합 단백질은 등몰량으로 혼합된다.
- [0047] 소정의 구현예에서, 환원 조건은 환원제를 첨가함으로써 생성된다. 소정의 구현예에서, 환원제는 머캅토에틸아민(MEA)을 포함한다.
- [0048] 소정의 구현예에서, 단계 (a)의 혼합물은 환원 조건 하에 약 18°C 내지 약 30°C의 온도에서 약 3시간 내지 약 6시간 동안 정치된다.
- [0049] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 CD73-매개 질병 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 본 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 상기 언급된 항원 결합 단백질 또는 이의 단편을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0050] 소정의 구현예에서, CD73-매개 질병 또는 장애는 암이다.
- [0051] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 단일특이적 모항체와 비교하여 CD73의 더 높은 저해 활성을 포함하는 이중파라토프성 항원-결합 단백질을 선택하는 방법을 제공하며, 하기 단계를 포함한다: a) 이중파라토프성 항원-결합 단백질을 형성하는 조건 하에 2개의 모항체를 조합하는 단계; b) CD73 활성 검정에서 이중파라토프성 항원-결합 단백질 및 2개의 모항체 중 하나 또는 둘 모두를 시험하는 단계; c) 이중파라토프성 항원-결합 단백질을 이용한 CD73 활성을 2개의 모항체 중 하나 또는 둘 모두를 이용한 CD73 활성과 비교하는 단계; 및 d) CD73 활성이 2개의 모항체 중 하나 또는 둘 모두의 CD73 활성보다 더 작다면, 이중파라토프성 항원-결합 단백질을 선

택하는 단계.

[0052] 소정의 구현예에서, CD73 활성 검정은 아테노신 형성을 측정한다. 소정의 구현예에서, 아테노신 형성은 액체 크로마토그래피-질량 분광법(LC/MS)에 의해 정량화된다.

[0053] 소정의 구현예에서, CD73 활성 검정은 인간 CD73을 발현시키는 COR-L23 폐 암종 세포로 수행된다.

도면의 간단한 설명

[0054] 본 발명의 상기 및 다른 특징 및 이점은 첨부된 도면과 함께 예시적인 구현예의 하기 상세한 설명으로부터 더 완전히 이해될 것이다. 특허 또는 출원 파일은 컬러로 완성된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)과 함께 이러한 특허 또는 특허 출원 공보의 복사본은 요청 및 필요한 비용의 지불 시 특허청에 의해 제공될 것이다.

도 1은 COR-L23 세포 상의 CD73에 대한 저해 활성의 스크린을 도시한다. CD73 활성(%)의 저해는, 항체에 4시간 동안 노출시킨 후 중-동위원소 AMP 기질과 함께 LC/MS 기반 검정을 사용하여 결정되었다(백색 음영: 1 µg/ml에서 0% 내지 49% 저해, 밝은 회색: 50% 내지 69% 저해, 회색: 70% 내지 89% 저해, 및 짙은 회색: 90% 내지 100% 저해). 각각의 열에서 가장 우측을 제외하고 각각의 정사각형은 수평축 및 수직축 상에 나타난 모항체의 조합에 의해 생성된 이중파라토프성 항체를 나타낸다. 각각의 열에서 가장 우측의 정사각형은 Fab-아암 교환을 사용하여 제작된 모 2가 항-CD73 항체를 나타낸다. 하단의 열("AS30")은 모항체의 1가 버전을 생성하기 위해, 무관한 항체 AS30과의 쌍형성(pairing)을 나타낸다.

도 2는 CD73에 대한 모항체 및 이중파라토프성 항체의 상대 친화도를 도시한다. 항체(무관한 AS30 아암을 함유하는 1가 형태의 각각의 모항체 및 이중파라토프성 항체)는 고정되었고 유동 중 가용성 CD73에 노출되었다.

도 3은 모세관 등전점 집속법(cIEF: capillary isoelectric focusing)에 의한 이중파라토프성 항체 형성의 확인을 도시한다. 듀오바디(duobody) 생성물 및 모항체(각각 4 µg)는 IdeZ로 분해되어 F(ab')₂ 및 Fc를 수득하고, cIEF에 의해 분리되었다. pI 9.0과 9.5 사이의 피크에 대해: 우측 피크: E3.2(F405L) 모, 좌측 피크: H19(K409R) 모, 중간 피크: Fab-아암 교환 반응(cFAE) 생성물 E3.2/H19. F(ab')₂ 단편은 8.5 초과의 pI 값을 갖는다. pI 7.5와 8 사이의 피크는 Fc를 나타낸다. 7.1에서의 피크는 IdeZ이다.

도 4는 11개의 이중파라토프성 항체, 모항체 및 모항체의 혼합물에 대한 역가 용량-반응을 도시한다. COR-L23 세포는 항체와 함께 3시간 동안 인큐베이션된 다음, CD73 활성이 LS/MS-기반 검정에 의해 결정되었다. 활성(무항체 대조군의 분율)은 이중파라토프성 항체(밝은 회색 원형)에 대해 플롯팅되고, 모 혼합물(검정색) 및 2개의 모항체(짙은 회색 원형 및 정사각형) 각각은 총 항체 농도와 비교하여 제시된다.

도 5a 내지 도 5d는 생물층 간섭계(biolayer interferometry)(옥텟(Octet))에 의한 에피토프 비닝(binning)를 도시한다. CD73과 몰 과량의 Fab의 혼합물은 고체 지지체 상에 고정된 1가 모항체와 함께 인큐베이션되었다. **도 5a**는 비-중첩 에피토프 및 비-차단(상단 패널) 또는 포착의 완전 차단을 생성하는 중첩 에피토프(하단 패널)의 조건을 보여주는 검정 포맷의 개략도를 도시한다. **도 5b**는 고정된 항체에 의한 CD73/Fab 복합체의 포착을 도시한다. 포착은 Fab의 부재 하에 CD73 단독으로부터의 신호로 정규화되었다. **도 5c**는 포착의 저해에 기반한 에피토프 비닝을 도시한다. **도 5d**는 COR-L23 세포 상에서 CD73 활성의 저해 대 시험관내에서 CD73/Fab 복합체를 포착하는 항체의 능력을 도시한다. 회색으로 채워진 원형: 지지체 상에서 동일한 항체의 CD73/Fab 복합체의 포착(모쌍(parental pair)).

도 6a 내지 도 6c는 CD73과 함께 TB19의 구조를 도시한다. **도 6a**는 CD73의 상이한 입체배좌 상태들의 개략적인 표현을 도시한다. CD73의 CD73 N-말단 도메인 및 C-말단 도메인은 각각 "N" 및 "C"로 표지되어 있다. 2개의 도메인을 연결하는 링커는 회색 코일로 표시된다. 아연 보조인자는 N-말단 도메인에서 작은 회색 구체로 제시되어 있다. 기질은 "S"로 도시되어 있다. **도 6b**는 2개의 상이한 각도로부터 중간 입체배좌에서 하나의 CD73 이량체를 결합하는 2개의 TB19 Fv 도메인을 도시한다. CD73은 **도 6a**에서와 같이 컬러로 표시되어 있으며, 아연 및 포스페이트 분자는 검정색 원형으로 나타나 있다. TB19 Fab는 밝은 회색의 개략적인 표현으로 제시되어 있다. **도 6c**는 CD73 상에서의 TB19 에피토프 잔기의 맵핑을 도시한다. 동일한 컬러 개략도는 **도 6b**와 동일한 컬러의 개략도가 이용되며 CD73 에피토프 잔기는 밝은 회색으로 제시된 TB19에 의해 인식된다.

도 7a 및 도 7b는 TB19 Fv와 함께 CD73 단량체의 공간 배열을 도시한다. **도 7a**는 부분-개방형 입체배좌에서 CD73에 결합된 TB19를 도시한다. 촉매 중심에서 아연 및 무기 포스페이트는 각각 "Zn" 및 "Pi"로 표지되어 있다. TB19 Fv 및 N-말단 도메인에서 상호작용 잔기(4Å 내)는 스틱 형태로 제시되어 있다. 예시를 위해, 폐쇄

형 이형태체 구조 4H2I의 C-말단 도메인에 의해 결합된 기질 유사체 AMPCP(스틱 형태)는 TB19:CD73 구조 상에서 겹쳐져 이의 위치 및 상호작용성 CD73 잔기 Phe417 및 Phe500을 보여준다. AMPCP는 TB19 구조에 존재하지 않음에 주목한다. **도 7b**는 2개 구조의 CD73 N-말단 도메인을 겹침으로써 폐쇄형 입체배좌 구조 4H2I 상으로의 TB19의 모델링을 도시한다. 4H2I에서 AMPCP의 아연 이온 및 β-포스포네이트는 TB19-결합 CD73 구조의 아연 및 무기 포스페이트와 동일한 위치를 차지한다. TB19 가변 영역은 4H2I에서 C-말단 도메인과 충돌한다.

도 8a 내지 도 8c는 CD73과 함께 TB38의 구조를 도시한다. CD73 N-말단 도메인은 "N"으로 표시되며, CD73 C-말단 도메인은 "C"로 표시되고, 회색 코일은 링커이다. **도 8a**는 개방형 입체배좌에서 CD73과 함께 TB38 Fab::CD73 구조를 도시한다. TB38 Fab가 제시되고 표시된다. **도 8b**는 개방형/폐쇄형 하이브리드 입체배좌에서 CD73과 함께 TB38 Fv::CD73 구조를 도시한다. TB38 Fv가 제시되고 표시된다. **도 8c**는 제시되고 표시된 CD73(개방형/폐쇄형 하이브리드 입체배좌) 상에서의 TB38 에피토프 잔기의 맵핑을 도시한다.

도 9a 및 도 9b는 TB19/TB38 이중과라토프성 항체에 의한 CD73의 잠재적인 공동-관여 방식을 도시한다. 이중특이적 항체는 TB19:CD73, TB38:CD73, 및 완전-IgG1(PDB 1ZHZ) 구조에 기반하여 모델링된다. **도 9a**는 TB19/TB38 이중과라토프성 항체의 표면 표현을 도시한다. CH1 도메인에서 마지막 잔기들 사이의 거리는 검정색 선으로 제시된다. TB19 Fab, TB38 Fab, 및 Fc가 표시되어 있다. **도 9b**는 부분-개방형 배치로 CD73에 의해 결합된 4개의 TB19/TB38 이중과라토프성 항체에 대한 모델을 도시한다. CD73 N-말단 도메인 및 C-말단 도메인이 제시된다. CH1 도메인의 마지막 잔기를 분리하는 거리는 검정색 선으로 제시된다.

도 10은 TB19 공결정 구조에서와 같이 부분 개방형 배치로 제시된 CD73 동종이량체의 하나의 하위단위 상으로 맵핑된 TB19 및 TB38에 대한 에피토프를 도시한다(질은 회색/밝은 회색).

도 11a 내지 도 11c는 상기 도 6의 컨셉 카툰(concept cartoon)과 관련된 CD73 이형태체 구조를 도시한다. **도 11a**는 도 6에 제시된 것과 유사한 CD73 입체배좌의 표현을 도시하며, 이는 각각의 이형태체의 핵심 특징을 반영한다. **도 11b**는 **도 11a**에서의 다이어그램 표현에 대한 실제 구조적 등가물을 도시한다. 우측 상의 N-말단 도메인은 개방형 배치, TB19 배치, 및 폐쇄형 배치 사이에서 페이지의 평면 안쪽으로 다시 회전함에 주목한다. **도 11c**는 하기 3개의 입체배좌 각각에서 N-말단 도메인의 회전을 제시하는 정렬된 C-말단 도메인과 함께 CD73 단량체의 구조를 도시한다: 개방형, TB-19 및 폐쇄형. TB19 Fab는 명료성을 위해 제시되지 않는다. 시점은 N-말단 도메인의 회전 평면에 수직인, **도 11b**와 비교하면 아래로부터의 시점이다. 세포의 도메인의 C-말단 잔기, 폐쇄형 이형태체 구조 4H2I의 아연 원자, 및 4H2I의 기질 유사체 AMPCP가 제시된다.

도 12는 5 시그마에서 TB19와 함께 N-말단 도메인 구조 중 아연 및 포스페이트에 대한 Fo-Fc 생략 맵(omit map)을 도시한다. 볼(ball): 아연; 스틱: 포스페이트 이온의 인 및 산소.

도 13a 및 도 13b는 상기 **도 2**에 제시된 바와 같이, 이중과라토프성 항체에 의한 단일 CD73에 대한 2가 결합을 평가하기 위해 동역학 반응 데이터에 대한 원(raw) Biacore 센서그램 피트(fit)를 도시한다. 피트는 1:1 랭뮤어 결합 모델에 기반한다. 이들 피트에 기반한 동역학 값은 **표 6**에 제시된다. 2상(biphasic) 회합 및 해리 동역학은 다수의 항체에서 관찰되었다. 그러한 경우, (별표로 나타낸) 피트는 회합 및 해리 동안 각각의 구성요소들에 대한 존재비 및 속도 상수를 획득하기 위한 반복 과정을 이용하여 CD73의 2개 농도(32 nM 및 12 nM)에서 수행되었다. **도 13a**는 1가 모항체에 대한 데이터를 도시한다. **도 13b**는 이중과라토프성 항체에 대한 데이터를 도시한다.

도 14a 및 도 14b는 사전 혼합 경쟁 접근법에 의한 에피토프 맵핑을 도시한다. 단백질 A 바이오센서 팁 상에서 1가 CD73 항체에 의한 용액 중 Fab:CD73 복합체의 포착에 이어 옥텟이 뒤따랐다. 표제: 팁 상에 로딩된 항체의 명칭. 센서그램 컬러는 CD73과 함께 사전 인큐베이션된 Fab를 식별한다(범례 참조). 청색 트레이스(trace): CD73 단독. 300초 동안의 초기 상승은 팁 상에서의 IgG의 로딩을 반영한다. 세척 후, 과량의 Fab와 사전 혼합된 CD73이 적용되었다. 더 높은 반응은 더 큰 질량 포착을 반영한다. 중첩 에피토프와 함께 Fab와의 사전인큐베이션은 포착을 차단하고 센서그램에서 어떠한 변화도 생성하지 않을 것임에 주목한다. 비-중첩 에피토프에 대한 Fab에 의해 결합된 CD73의 포착은 복합체의 더 큰 크기로 인하여 CD73 단독보다 더 높은 신호를 생성할 것이다. CD73으로 정규화된 결합 이동 값은 **도 5b**에 제시된다.

도 15a 및 도 15b는 고정된 1가 모항체 및 이중과라토프성 항체로부터의 CD73의 해리에 대한 반감기를 도시한다. 제시된 반감기는 **표 6**에 제시된 1차 속도 상수에 기반한다. 2상 동역학이 관찰되는 경우 주 구성요소와 부 구성요소 및 각각의 분율(이텔릭체)이 제시된다. nd: 검출 불가능함.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] 항-CD73 모 단일특이적 항원-결합 단백질이 제공된다. 모 항원-결합 단백질로부터 유래된 이중과라토프성 항-CD73 항원-결합 단백질도 제공된다. CD73 활성을 저해하는 방법 및 CD73-매개 질병 및 장애를 치료하는 방법도 제공된다.
- [0056] 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양과 관련하여 사용된 명명법, 분자생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질과 핵산 화학 및 혼성화는 잘 알려져 있고 당업계에서 보편적으로 사용되는 것이다. 본원에 제공된 방법 및 기법은 달리 지시되지 않는 한 일반적으로 당업계에 잘 알려져 있고 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의된 다양한 일반 및 더 구체적인 참조문헌에 기재된 바와 같이 종래의 방법에 따라 수행된다. 효소 반응 및 정제 기법은 당업계에서 보편적으로 달성된 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 제조업체의 설명서에 따라 수행된다. 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의학적 및 약학적 화학과 관련하여 사용된 명명법 및 이의 실험 절차와 기법은 당업계에 잘 알려져 있고 보편적으로 사용되는 것이다. 표준 기법은 화학적 합성, 화학적 분석, 약학적 제조, 제형화, 및 전달, 및 환자의 치료를 위해 사용된다.
- [0057] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 과학적 및 기술적 용어는 당업자가 보편적으로 이해하는 의미를 갖는다. 임의의 잠재적 모호함이 있는 경우, 본원에 제공된 정의가 임의의 사전적 또는 비본질적 정의보다 우선한다. 문맥상 달리 필요하지 않는 한, 단수형 용어는 복수형을 포함할 것이며 복수형 용어는 단수형을 포함할 것이다. "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 용어 "포함하는(including)", 뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대 "포함한다(includes)" 및 "포함된(included)"의 사용은 제한적이지 않다.
- [0058] 본 발명을 보다 쉽게 이해할 수 있도록 소정의 용어가 먼저 정의된다.
- [0059] CD73
- [0060] 가요성 α-나선 링커를 통해 연결되는 N-말단 도메인 및 C-말단 도메인을 갖는 CD73 단량체는 C-말단 GPI 앵커에 부착된 세포 표면에서 발현된다. 생리학적 형태에서, 2개의 단량체는 C-말단 도메인 사이의 광범위한 비공유 접촉을 통해 회합되어 이량체를 형성한다(Heuts et al. 2012. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*. 13:2384-2391; Knapp et al. 2012. *Structure (London, England:1993)* 20:2161-2173). CD73의 각각의 단량체의 활성 부위는 N-말단 도메인에 의해 결합된 아연 보조인자 외에 N-말단 도메인과 C-말단 도메인 둘 모두에서 기질 접촉 잔기로 이루어진다(상기 Knapp 2012). AMP 기질이 C-말단 도메인에 결합한 후, N-말단 도메인 및 아연 보조인자는, 촉매작용이 발생하여 아데노신 생성물을 생성하는 "폐쇄형" CD73 입체배좌에서 AMP와 함께 정렬된다. 그 후에, "개방형" 이형태체에서 기질 결합 부위를 재노출시키기 위한 N-말단 도메인의 큰 측면(lateral) 회전은 생성물이 방출되게 한다(상기 Knapp 2012). 폐쇄형 이형태체에서 활성 부위에 대한 제한된 용매 접근은, 2개의 형태 사이의 사이클링이 기질 결합 및 생성물 방출, 즉, 효율적인 효소 활성에 필요함을 나타낸다(상기 Knapp 2012).
- [0061] 항원-결합 단백질
- [0062] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체" 또는 "항원-결합 단백질"은 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합하거나 이와 면역학적으로 반응하는 면역글로불린 분자를 지칭하고, 다중클론 항체와 단일클론 항체 둘 모두, 뿐만 아니라 단편 항원-결합(Fab) 단편, F(ab')₂ 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 재조합 IgG(rIgG) 단편, 단일 사슬 가변 단편(scFv) 및 단일 도메인 항체(예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디) 단편을 포함하지만 이로 제한되지 않는 기능성 항체 단편을 포함한다. 용어 "항체"는 유전적으로 조작된 또는 달리 변형된 형태의 면역글로불린, 예컨대 인트라바디, 캅티바디, 키메라 항체, 완전 인간 항체, 인간화 항체, 메디토프-가능(meditope-enabled) 항체, 헤테로접합체 항체(예를 들어, 이중특이적 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 탠덤 디-scFv, 탠덤 트리-scFv) 등을 포함한다. 달리 언급되지 않는 한, 용어 "항체"는 이의 기능성 항체 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0063] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항원 특이성 및 결합 친화도를 부여하는, 항체 가변 영역 내의 아미노산의 비-인접 서열을 지칭한다. 일반적으로는, 각각의 중쇄 가변 영역에 3개의 CDR(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) 및 각각의 경쇄 가변 영역에 3개의 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)이 존재한다. "프레임워크 영역" 또는 "FR"은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 비-CDR 부분을 지칭하는 것으로 당업계에 알려져 있다. 일반적으로는, 각각의 중쇄 가변 영역에 4개의 FR(FR-H1, FR-H2, FR-H3, 및 FR-H4) 및 각각의 경쇄 가변 영역에 4개의 FR(FR-L1, FR-L2, FR-L3, 및 FR-L4)이 존재한다.

[0064] 주어진 CDR 또는 FR의 정확한 아미노산 서열 경계는 문헌[Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.]("카바트(Kabat)" 넘버링 체계), 문헌[Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948]("초티아(Chothia)" 넘버링 체계), 문헌[MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745]("컨택트(Contact)" 넘버링 체계), 문헌[Lefranc M P et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 January; 27(1):55-77]("IMGT" 넘버링 체계), 및 문헌[Honegger A and Pluckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun. 8; 309(3):657-70](아호(AHo) 넘버링 체계)에 기재된 것을 포함하여, 임의의 다수의 잘 알려진 체계를 사용하여 쉽게 결정될 수 있다.

[0065] 주어진 CDR 또는 FR의 경계는 식별을 위해 사용되는 체계에 따라 다양할 수 있다. 예를 들어, 카바트 체계는 구조적 정렬에 기반하는 한편, 초티아 체계는 구조적 정보에 기반한다. 카바트 체계와 초티아 체계 둘 모두에 대한 넘버링은 가장 보편적인 항체 영역 서열 길이에 기반하며, 삽입은 삽입 글자, 예를 들어, "30a"에 의해 동반되고 결실은 일부 항체에서 나타난다. 2개의 체계는 소정의 삽입 및 결실("인텔")을 상이한 위치에 두어, 차별적인 넘버링을 초래한다. 컨택트 체계는 복잡한 결정 구조의 분석에 기반하고 많은 측면에서 초티아 넘버링 체계와 유사하다.

[0066] 그러므로, 달리 명시되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예컨대 이의 가변 영역의 "CDR" 또는 "상보성 결정 영역," 또는 개별적인 명시된 CDR(예를 들어, "CDR-H1", "CDR-H2")은 임의의 알려진 체계에 의해 정의된 바와 같이 하나의(또는 구체적인) 상보성 결정 영역을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 마찬가지로, 달리 명시되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예컨대 이의 가변 영역의 "FR" 또는 "프레임워크 영역," 또는 개별적인 명시된 FR(예를 들어, "FR-H1," "FR-H2")은 임의의 알려진 체계에 의해 정의된 바와 같이 하나의(또는 구체적인) 프레임워크 영역을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 경우, 특정 CDR 또는 FR의 식별을 위한 체계는 명시되며, 예컨대 CDR은 카바트, 초티아, 또는 컨택트 방법에 의해 정의된다. 다른 경우, CDR 또는 FR의 특정 아미노산 서열이 주어진다.

[0067] 항-CD73 항원-결합 단백질

[0068] 일 양태에서, 본 개시내용은 CD73에 대한 결합 특이성을 갖는 항원 결합 단백질을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, "CD73"은 CD73 단량체 단백질 또는 2개의 비-공유적으로 회합된 CD73 단량체 단백질에 의해 형성된 CD73 동중이량체 복합체를 둘 모두 지칭할 수 있다.

[0069] 예시적인 항-CD73 항원 결합 단백질 CDR은 아래의 표 1에 언급된다. 예시적인 항-CD73 항원 결합 단백질 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 도메인은 아래의 표 2에 언급된다. 예시적인 항-CD73 항원 결합 단백질 전장 중쇄 및 경쇄는 아래의 표 3에 언급된다.

[0070] [표 1]

[0071] 항-CD73 항원 결합 단백질 CDR 서열.

SEQ ID NO:	서열	주석
1	GG SIRNNY	TB19.3 CDR-H1
2	IYISGTT	TB19.3 CDR-H2
3	AREHYVSGTSLDN	TB19.3 CDR-H3
4	QSVNTNY	TB19.3 CDR-L1
5	GTS	TB19.3 CDR-L2
6	QQDYNLPYT	TB19.3 CDR-L3
7	GFTFSSYG	TB38.8 CDR-H1
8	FWYDGSNK	TB38.8 CDR-H2
9	ARAPNWDDAFDI	TB38.8 CDR-H3
10	SGSVSTSY	TB38.8 CDR-L1
11	STN	TB38.8 CDR-L2
12	VLFMGSGIWV	TB38.8 CDR-L3

[0072]

[0073] [표 2]

[0074] 항-CD73 항원 결합 단백질 VH / VL 서열.

SEQ ID NO:	서열	주석
13	QEQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRN NYYNWIRQPAGKGLEWIGRIYISGTTNSNP SLKSRVTMSIDTSKNQFSLKLSVTAADTAI YYCAREHYVSGTSLDNWGQGTLTVSS	TB19.3 VH
14	EIVMTQSPPTLTLSPGERATLSCRASQSVNT NYFSWYQQKPGLTPLRLIYGTSTRATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFGIYYCQQD YNLPYTFGQGTYLEIK	TB19.3 VL
15	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVFWYDGSN KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL SAEDTAVYYCARAPNWDDAFDIWGQGTMT VTVSS	TB38.8 VH
16	QTVVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVST SYYPNWWYQQTPGQAPRTLIYSTNTRSSGVP DRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCV LFMGSGIWFVGGGTKLTVL	TB38.8 VL

[0075]

[0076] [표 3]

[0077] 항-CD73 항원 결합 단백질 서열.

SEQ ID NO:	서열	주석
17	QEQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSI RNNYYNWIRQPAGKGLEWIGRIYISGTT NSNPSLKSRVTMSIDTSKNQFSLKLSV TAADTAIYYCAREHYVSGTSLDNWGQ GTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT	TB19.3_huIgG1_ K409R - 중쇄

[0078]

	SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS LGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPG	
18	QEQLQESGPGLVKPSSETLSLCTVSGGSI RNNYYNWIRQPAGKGLEWIGRIYISGTT NSNPSLKSRVTMSIDTSKNQFSLKLSV TAADTAIYCAREHYVSGTSLDNWGO GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSS LGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPG	TB19.3_huIgG1_ F405L - 중쇄
19	EIVMTQSPITLSLSPGERATLSCRASQS VNTNYFSWYQKQPLTPRLLIYGTSTR ATGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQPEDF GIYYCQQDYNLPYTFGQGTYLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	TB19.3_huIgG1_ - 경쇄
20	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSLCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVFW YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNLSAEDTAVYYCARAPNWDDA FDIWGOGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT	TB38.8_huIgG1_ K409R - 중쇄

[0079]

	LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKLSLSLSPG	
21	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSLCAASGF TFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVFW YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNLSAEDTAVYYCARAPNWDDA FDIWGOGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFL LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKLSLSLSPG	TB38.8_huIgG1_ F405L - 중쇄
22	QTVVTEQEPFSVSPGGTVTLTCGLSSGS VSTSYYPNWWYQTPGQAPRTLIYSTNT RSSGVPDFRSGSILGNKAALITGAQAD DESDYYCVLFMGSGIWFVGGGTKLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLYC LISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWQKSH RSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS	TB38.8_huIgG1_ - 경쇄

[0080]

[0081]

소정의 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD73 항원 결합 단백질은 표 1, 표 2, 또는 표 3의 임의의 서열과 적어도

약 80%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100%의 서열 유사성 또는 동일성을 포함한다.

[0082] 소정의 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD73 항원 결합 단백질은 아래의 표 4에 제시된 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드에 결합한다.

[0083] 소정의 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD73 항원 결합 단백질은 아래의 표 4에 제시된 SEQ ID NO: 23의 아미노산 N96, G97, V98, E99, K121, P123, P156, F157, S159, N160, G162, T163, N164, L165, V166, F167, E168, R491, 및 D496을 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드의 에피토프에 결합한다.

[0084] 소정의 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD73 항원 결합 단백질은 아래의 표 4에 제시된 SEQ ID NO: 24의 아미노산 P112, K119, A125, S126, S129, G130, L133, P134, Y135, K136, K180, L184, 및 N185를 포함하는 인간 CD73 폴리펩타이드의 에피토프에 결합한다.

[0085] [표 4]

[0086] 인간 CD73 및 에피토프.

SEQ ID NO:	서열	주석
23	WELTILHTNDVHSRLEQTS EDSSKCV NASRCMGGVARLFTKVQ QIRRAEPN VLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGA EVA HFMNALRYDAMALGNHEFD NGVEG LIEPLLKEAKFPILSANIK AKGPLASQI SGLYLPYK VLPV GDEVVGVYTSKE TPFLSNPGTNLVFE DEITALQPEVDK LKT LN VNKIIALGHSGFEMDKLIAQK VRGVDVVVGGHSNTFLYTG NPPSKE VPAGKYPFI VTSDDGRKVPVQ AYA FGKYLGYLKIEFDERGNVISSHG NPIL LNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYST QELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMG NLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVS MCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENL AAVLPFGGTFDLVQLK GSTL KKAFE HSVHRYGQSTGEFLQVGGI HVVYDL SRKPGDRVVKLDVLC TKCRVPSYDP LKMDEVYK VILPNFLANGGDGFQMI KDELLR HDSGDQ DINVVSTYISKMK VIYPAVEGR IKFS	인간 CD73 TB19.3 에피토프 (볼드체 및 밑줄표시) 잔기 N96, G97, V98, E99, K121, P123, P156, F157, S159, N160, G162, T163, N164, L165, V166, F167, E168, R491, D496
24	WELTILHTNDVHSRLEQTS EDSSKCV NASRCMGGVARLFTKVQ QIRRAEPN VLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGA EVA HFMNALRYDAMALGNHEFD NGVEG LIEPLLKEAKFPILSANI AKAGPLASQI SGLYLPYK VLPVGVDEVVGVYTSK ETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVD K LKT LN VNKIIALGHSGFEMDKLIAQK VRGVDVVVGGHSNTFLYTG NPPSKE VPAGKYPFI VTSDDGRKVPVQ AYA FGKYLGYLKIEFDERGNVISSHG NPIL LNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYST QELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMG NLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVS MCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENL AAVLPFGGTFDLVQLK GSTL KKAFE HSVHRYGQSTGEFLQVGGI HVVYDL SRKPGDRVVKLDVLC TKCRVPSYDP LKMDEVYK VILPNFLANGGDGFQMI	인간 CD73 TB38.8 에피토프 (볼드체 및 밑줄표시) 잔기 P112, K119, A125, S126, S129, G130, L133, P134, Y135, K136, K180, L184, N185

[0087]

	KDELLR HDSGDQ DINVVSTYISKMK VIYPAVEGR IKFS	
--	---	--

[0088]

[0089] 이중과라토프성 항-CD73 항원 결합 단백질

[0090] 일 양태에서, 본 개시내용은 제1 CD73 에피토프 및 제2 CD73 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 이중과라토프성 항원 결합 단백질을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, "이중과라토프성" 항원 결합 단백질은 동일한 분자 표적 상의 2개의 상이한 에피토프에 결합한다(즉, 이중과라토프성). 본 개시내용에서, 이중과라토프성 항-CD73

항원 결합 단백질은 2개의 모 단일특이적 CD73 항원 결합 단백질로부터 유래된다. 2개의 모 항원 결합 단백질은 각각 CD73 분자 상의 상이한 에피토프에 결합한다.

- [0091] 본 개시내용의 이중과라토프성 항원 결합 단백질은 항체 특이성을 조합하는 잠재적인 상가적 또는 상승작용적 효과로 인해 단일특이적 항원 결합 단백질을 능가하는 이점을 가질 수 있다. 본 개시내용의 이중과라토프성 항원 결합 단백질은 이중과라토프성 변이체에서 조합될 때 이러한 변이체가 CD73 상의 비-중첩 에피토프에 결합한다면 강력한 CD73 저해를 실증할 수 있다. 이중과라토프성 항원 결합 단백질은 추가로, CD73 활성을 저해하는 다수의 기전을 제공할 수 있다. CD73 저해 기전은 촉매적-활성 CD73 이형태체의 형성의 차단, 중간적인 부분-개방형 비활성 CD73 이형태체의 결합, 개방형, 폐쇄형 및 하이브리드 입체배좌의 결합, 및 2개 이상의 CD73 이량체의 가교를 포함할 수 있으나 이들로 제한되지 않는다. CD73 하이브리드 이형태체는, 하나의 CD73 단량체가 개방형 입체배좌로 존재하고 다른 CD73 단량체가 폐쇄형 입체배좌로 존재하는 것이다.
- [0092] 소정의 구현예에서, 본 개시내용의 이중과라토프성 항원-결합 단백질은 각각의 이중과라토프성 항원-결합 단백질을 생성하는 데 사용되는 단일특이적 모항체 중 하나 또는 둘 모두와 비교하여 CD73의 더 높은 저해 활성을 포함한다. 소정의 구현예에서, 본 개시내용의 이중과라토프성 항원-결합 단백질은 각각의 이중과라토프성 항원-결합 단백질을 생성하는 데 사용되는 단일특이적 모항체의 조합과 비교하여 CD73의 더 높은 저해 활성을 포함한다. CD73 활성의 저해는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 결정될 수 있다. 소정의 구현예에서, CD73 활성은 아래의 실시예 1 및 문헌[McManus et al. 2018. SLAS discovery: advancing life sciences R & D 23, 264-273]에 기재된 바와 같이 CD73을 발현시키는 COR-L23 세포를 사용하여 결정된다.
- [0093] 소정의 구현예에서, 본 개시내용의 이중과라토프성 항-CD73 항원-결합 단백질은 동일한 CD73 분자 상의 2개의 상이한 CD73 에피토프에 결합한다. 이중과라토프성 항-CD73 항원-결합 단백질은 동일한 CD73 단량체 단백질 상의 2개의 상이한 CD73 에피토프에 결합할 수 있다. 이중과라토프성 항-CD73 항원-결합 단백질은 동일한 CD73 동종이량체 단백질 상의 2개의 상이한 CD73 에피토프에 결합할 수 있다.
- [0094] 소정의 구현예에서, 본 개시내용의 이중과라토프성 항-CD73 항원-결합 단백질은 2개의 별개의 CD73 분자 상의 2개의 상이한 CD73 에피토프에 결합한다. 소정의 구현예에서, 이중과라토프성 항-CD73 항원-결합 단백질의 제1 VH 및 VL 도메인은 제1 CD73 이량체 또는 동종이량체 분자 상의 제1 CD73 에피토프에 결합하고, 제2 VH 및 VL 도메인은 제2 CD73 이량체 또는 동종이량체 분자 상의 제2 CD73 에피토프에 결합한다.
- [0095] 소정의 구현예에서, 본 개시내용의 이중과라토프성 항-CD73 항원-결합 단백질은 2개 이상의 CD73 이량체 분자를 가교시킬 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 항체와의 "가교"는, 다가 항체 상의 제1 결합 부위가 제1 표적 분자 상의 제1 에피토프에 결합하는 한편 다가 항체 상의 제2 결합 부위가 제2 표적 분자 상의 제2 에피토프에 결합할 때 발생할 수 있다. 다수의 2가 항체의 결합을 통한 다수의 표적 분자의 가교는 증강된 안정성을 갖는 고차 구조를 형성할 수 있다. 이는 가교된 항원-결합 단백질의 k_{off} 속도를 비-가교된 항원-결합 단백질과 비교하여 감소시킬 수 있다. 항원-결합 단백질 가교를 증강시킴으로써, 약한 항원-결합 친화도를 갖는 항원-결합 단백질이 이용될 수 있다. 표적 항원에 대해 약한 결합 친화도를 소유하는 소정의 항원-결합 단백질은 일반적으로 제한된 활용성을 갖는다. 약한 결합 친화도를 갖는 항원-결합 단백질을 조합함으로써, 본 개시내용의 가교 효과는 k_{off} 속도의 감소를 통해 이의 효능을 증강시킬 수 있다.
- [0096] 항원-결합 단백질의 헤테로이량체화 방법
- [0097] 본 개시내용의 이중과라토프성 CD73 항원 결합 단백질은 2개의 모 CD73 항원 결합 단백질의 헤테로이량체화를 통해 형성될 수 있다. 당업계에 알려진 임의의 헤테로이량체화 방법은 이중과라토프성 CD73 항원 결합 단백질을 형성하는 데 사용될 수 있다.
- [0098] 소정의 예시적인 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 2개의 Fc 도메인은 Fab 아암 교환(FAE)을 통해 헤테로이량체화된다. 소정의 예시적인 구현예에서, 인간 비-IgG4 CH3 서열은, CH3 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩타이드와 이황화 결합이나 공유 또는 안정한 비-공유 중쇄간 결합의 형성에 참여하는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형된다. 이러한 변형된 CH3 서열은 IgG4-유사일 수 있다. 소정의 구현예에서, 항체는 IgG1이고 IgG4-유사하도록 변형된다.
- [0099] FAE의 예시적인 방법은 하기를 포함하는 단계를 포함할 수 있다: a) 제1 결합 특이성을 갖고 IgG4-유사 CH3 영역을 포함하는 제1 항원-결합 작제물을 제공하는 단계; b) 상기 제1 결합 특이성과는 상이한 제2 결합 특이성을 갖고 IgG4-유사 CH3 영역을 포함하는 제2 항원-결합 작제물을 제공하는 단계; c) 상기 제1 항원-결합 작제물 및 제2 항원-결합 작제물을 환원 조건 하에 함께 인큐베이션시켜, 코어 힌지 영역 내 시스템인이 이황화-결합 이성

질체화를 거치게 하는 단계; 및 d) 이중특이적 항원-결합 작제물을 수득하는 단계.

- [0100] 용어 "IgG4-유사 CH3 영역"은 IgG4, 예를 들어 인간 IgG4의 CH3과 동일한 CH3 영역, 또는 IgG4 CH3 영역과 기능적으로 등가인 CH3 영역을 지칭한다. 이러한 맥락에서 기능적으로 등가라는 말은, IgG4의 CH3 영역과 유사한 CH3 영역이 안정한 반분자간(inter-half-molecule) 상호작용을 형성하지 않음을 의미한다. 주어진 CH3 영역에 의한 안정한 반분자간의 형성은 예를 들어 IgG4의 CH3을 해당 CH3 영역으로 대체하고 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제9,212,230호에 기재된 조건 하에 교환에 대해 시험함으로써 시험될 수 있다. 교환이 관찰된다면, 어떠한 안정한 반분자간 상호작용도 형성되지 않는다. 예를 들어, IgG4-유사 CH3 영역은 IgG4로부터의 CH3 영역으로서 반분자 교환을 가능하게 하는 데 동일하게 효율적인 CH3 영역일 수 있다. 따라서, IgG4-유사 CH3 영역은 IgG4의 CH3 영역과 구조적으로 유사할 수 있으며, 예를 들어 IgG4의 CH3 영역의 서열과 75% 넘게, 예컨대 90% 넘게 동일할 수 있다. 그러나, 본 맥락에서 IgG4-유사 CH3 영역은 추가적으로 또는 대안적으로, IgG4의 CH3 영역에 구조적으로 근접하지 않지만, 이것이 CH3 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩타이드와의 이황화 결합이나 공유 또는 안정한 비-공유 중쇄간 결합, 예컨대 염 브릿지의 형성에 참여하는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않는다는 점에서 유사한 기능적 특징을 갖는 CH3 영역일 수 있다. 예를 들어, IgG4-유사 CH3 영역은, 반분자간 CH3-CH3 상호작용에 관여하는 하나 이상의 아미노산 잔기가 변화되거나 결실되어 있는 돌연변이화된 IgG1 CH3 영역일 수 있다.
- [0101] 예시적인 아미노산 잔기 변형은 R238Q, D239E, K292R, K292Y, K292F, K292W, Q302E, 및 P328L을 포함한다. 추가의 예시적인 아미노산 잔기 변형은 P228S 한지 돌연변이를 포함한다. 추가의 아미노산 잔기 변형은 F405L 또는 K409R CH3 도메인 돌연변이를 포함한다. 2개의 항체와 환원제의 혼합은 FAE를 야기한다. 예를 들어, 비제한적으로, F405L 변형을 포함하는 제1 모 단일특이적 항체는 K409R 변형을 포함하는 제2 모 단일특이적 항체와 FAE를 거칠 수 있다. 이러한 기술은 미국 특허 제9,212,230호 및 문헌[Labrijn A. F. PNAS (2013) 110(13):5145-5150]에 기재되어 있다.
- [0102] 소정의 예시적인 구현예에서, 항원-결합 작제물의 2개의 Fc 도메인은 노브-인투-홀(knobs-into-hole) 쌍형성을 통해 헤테로이량체화된다. 이러한 이량체화 기법은 CH3 도메인의 계면 내로 조각된 "캐비티(cavity)" 또는 "홀"과 함께 "융기부(protuberance)" 또는 "노브"를 활용한다. 적합하게 위치되고 치수가 정해진 노브 또는 홀이 제1 또는 제2 CH3 도메인의 계면에 존재하는 경우, 단지, 인접 계면에서 상응하는 홀 또는 노브를 각각 조각하여 CH3/CH3 도메인 계면에서의 Fc 도메인 쌍형성을 촉진하고 강화시키는 것이 필요하다. VHH에 융합되는 IgG Fc 도메인에는 노브가 제공되고, 종래의 항체의 IgG Fc 도메인에는 노브를 수용하도록 설계된 홀이 제공되거나, 그 반대의 경우도 가능하다. "노브"는 제1 Fc 도메인의 CH3 부분의 계면으로부터 돌출된 적어도 하나의 아미노산 측쇄, 전형적으로 더 큰 측쇄를 지칭한다. 돌출은 "노브"를 형성하며, 이러한 노브는 제2 Fc 도메인의 CH3 부분 내 "홀"에 상보적이고 이에 의해 수용된다. "홀"은 제2 Fc 도메인의 CH3 부분의 계면으로부터 뒤로 들어간 적어도 하나의 아미노산 측쇄, 전형적으로 더 작은 측쇄이다. 이러한 기술은 미국 특허 제5,821,333호; 문헌[Ridgway et al. Protein Engineering (1996) 9:617-621]; 및 문헌[Carter P. J. Immunol. Methods (2001) 248: 7-15]에 기재되어 있다.
- [0103] 노브로서 작용할 수 있는 예시적인 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 티로신(Y) 및/또는 트립토판(W)을 포함한다. CH3 도메인 내의 기존 아미노산 잔기는 노브 아미노산 잔기로 대체되거나 치환될 수 있다. 치환될 예시적인 아미노산은 작은 측쇄를 갖는 임의의 아미노산, 예컨대 알라닌(A), 아스파라긴(N), 아스파르트산(D), 글리신(G), 세린(S), 트레오닌(T), 및/또는 발린(V)을 포함할 수 있다.
- [0104] 홀로서 작용할 수 있는 예시적인 아미노산 잔기는 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌 (T), 또는 발린(V)을 포함한다. CH3 도메인 내의 기존 아미노산 잔기는 홀 아미노산 잔기로 대체되거나 치환될 수 있다. 치환될 예시적인 아미노산은 큰 측쇄를 갖는 임의의 아미노산, 예컨대 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 티로신(Y) 및/또는 트립토판(W)을 포함할 수 있다.
- [0105] 소정의 예시적인 구현예에서, CH3 도메인은 인간 IgG1 항체로부터 유래된다. CH3 도메인에 대한 예시적인 아미노산 치환은 T366Y, T366W, F405A, F405W, Y407T, Y407A, Y407V, T394S, 또는 이들의 조합을 포함한다. 특히 예시적인 조합은 제1 CH3 도메인 상의 노브 돌연변이에 대해 T366Y 또는 T366W, 및 제2 CH3 도메인 상의 홀 돌연변이에 대해 Y407T 또는 Y407V이다.
- [0106] 소정의 예시적인 구현예에서, 항원-결합 작제물의 2개의 Fc 도메인은 정전기 스티어링(electrostatic steering) 효과를 통해 헤테로이량체화된다. 이러한 이량체화 기법은 CH3/CH3 도메인 계면에서 Fc 도메인 쌍형성을 촉진하고 강화시키기 위해 정전기 스티어링을 활용한다. 2개의 CH3 도메인 사이의 전하 상보성은 동종이량체화(동일한

전하 쌍형성)를 증가하여 헤테로이량체화(반대되는 전하 쌍형성)를 선호하도록 변경된다. 이러한 방법에서, 정전기 척력은 동종이량체화를 방지한다.

- [0107] 예시적인 아미노산 잔기 치환은 제1 CH3 도메인에 K409D, K392D, 및/또는 K370D, 및 제2 CH3 도메인에 D399K, E356K, 및/또는 E357K를 포함할 수 있다. 이러한 기술은 미국 특허 공보 제2014/0154254 A1호 및 문헌 [Gunasekaran K. JBC (2010) 285(25):19637-19646]에 기재되어 있다.
- [0108] 소정의 예시적인 구현예에서, 항원-결합 작제물의 2개의 Fc 도메인은 소수성 상호작용 효과를 통해 헤테로이량체화된다. 이러한 이량체화 기법은 CH3/CH3 도메인 계면에서 Fc 도메인 쌍형성을 촉진하고 강화시키기 위해 정전기 상호작용 대신에 소수성 상호작용을 활용한다. 예시적인 아미노산 잔기 치환은 제1 CH3 도메인에 K409W, K360E, Q347E, Y349S, 및/또는 S354C, 및 제2 CH3 도메인에 D399V, F405T, Q347R, E357W, 및/또는 Y349C를 포함할 수 있다. 제1 CH3 도메인과 제2 CH3 도메인 사이의 아미노산 잔기 치환의 예시적인 쌍은 K409W:D399V, K409W:F405T, K360E:Q347R, Y349S:E357W, 및 S354C:Y349C를 포함한다. 이러한 기술은 미국 특허 공보 제 2015/0307628 A1호에 기재되어 있다.
- [0109] 항원-결합 단백질의 발현
- [0110] 일 양태에서, 본원에 개시된 결합 단백질(예를 들어, 항원-결합 단백질)을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다. 이러한 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 단계를 포함하는 결합 단백질의 제조 방법도 제공된다.
- [0111] 본원에 개시된 결합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로, 요망되는 양의 청구된 항체, 또는 이의 단편을 생성하는 데 사용될 수 있는 숙주 세포 내로 도입되기 위해 발현 벡터에 삽입된다. 따라서, 소정의 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 및 이러한 벡터와 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0112] 용어 "벡터" 또는 "발현 벡터"는 본원에서 본 발명에 따라 세포 내로 도입되고 세포에서 요망되는 유전자를 발현시키기 위한 비히클로서 사용되는 벡터를 의미하는 데 사용된다. 당업자에게 알려진 바와 같이, 이러한 벡터는 플라스미드, 파지, 바이러스 및 레트로바이러스로 이루어진 군으로부터 쉽게 선택될 수 있다. 일반적으로, 본 발명과 양립 가능한 벡터는 선택 마커, 요망되는 유전자의 클로닝을 용이하게 하기 위한 적절한 제한 부위 및 진핵 또는 원핵 세포에 진입하고/하거나 복제하는 능력을 포함할 것이다.
- [0113] 수많은 발현 벡터 시스템이 본 발명의 목적에 이용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 부류의 벡터는 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시나 바이러스, 바쿠로바이러스, 레트로바이러스(RSV, MMTV 또는 MOMLV), 또는 SV40 바이러스와 같은 동물 바이러스로부터 유래되는 DNA 요소를 활용한다. 다른 것은 내부 리보솜 결합 부위와 함께 다시스트론성 시스템의 사용을 수반한다. 추가로, DNA를 이의 염색체 내로 통합시킨 세포는 형질주입된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 마커를 도입함으로써 선택될 수 있다. 마커는 영양요구성 숙주에 원형양성(protothrophy), 살생물제 내성(예를 들어, 항생제) 또는 구리와 같은 중금속에 대한 내성을 제공할 수 있다. 선택 마커 유전자는 발현될 DNA 서열에 직접 연결되거나, 공동-형질전환에 의해 동일한 세포 내로 도입될 수 있다. 또한 mRNA의 최적의 합성에 추가의 요소가 필요할 수 있다. 이러한 요소는 신호 서열, 스플라이스 신호, 뿐만 아니라 전사 프로모터, 인핸서, 및 종결 신호를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 클로닝된 가변 영역 유전자는 상기 논의된 바와 같이 합성된 중쇄 및 경쇄 불변 영역 유전자(예를 들어, 인간 불변 영역 유전자)와 함께 발현 벡터 내로 삽입된다.
- [0114] 다른 구현예에서, 결합 폴리펩타이드는 다시스트론성 작제물을 사용하여 발현될 수 있다. 이러한 발현 시스템에서, 항체의 중쇄 및 경쇄와 같은 다수의 관심 유전자 생성물은 단일 다시스트론성 작제물로부터 생성될 수 있다. 이러한 시스템은 유리하게는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 사용하여 진핵 숙주 세포에서 상대적으로 높은 수준의 폴리펩타이드를 제공한다. 양립 가능한 IRES 서열은 미국 특허 제6,193,980호에 개시되어 있고, 이는 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다. 당업자는, 이러한 발현 시스템이 본 출원에 개시된 전체 범위의 폴리펩타이드를 효과적으로 생성하는 데 사용될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0115] 더 일반적으로, 일단 항체, 또는 이의 단편을 인코딩하는 벡터 또는 DNA 서열이 제조되면, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 다시 말해, 숙주 세포는 형질전환될 수 있다. 숙주 세포 내로의 플라스미드의 도입은 당업자에게 잘 알려진 다양한 기법에 의해 달성될 수 있다. 이는 형질주입(전기영동 및 전기천공 포함), 원형질 융합, 칼슘 포스페이트 침전, 외피보유 DNA와의 세포 융합, 미세주입, 및 무손상 바이러스에 의한 감염을 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 문헌[Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988)]을 참조한다. 숙주

내로의 플라스미드 도입은 전기천공에 의해 이루어질 수 있다. 형질전환된 세포는 경쇄 및 중쇄의 생성에 적절한 조건 하에 성장되고, 중쇄 및/또는 경쇄 단백질 합성에 대해 검정된다. 예시적인 검정 기법은 효소-연결 면역흡착 검정(ELISA), 방사성면역검정(RIA), 또는 형광-활성화된 세포 분류기 분석(FACS), 면역조직화학 등을 포함한다.

[0116] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "형질전환"은 넓은 의미에서, 유전자형을 변화시키고 결과적으로 수혜자 세포에서 변화를 초래하는, 수혜자 숙주 세포 내로의 DNA의 도입을 지칭하는 데 사용될 것이다.

[0117] 이러한 동일한 선상에서, "숙주 세포"는 재조합 DNA 기법을 사용하여 작제되고 적어도 하나의 이중성 유전자를 인코딩하는 벡터로 형질전환된 세포를 지칭한다. 재조합 숙주로부터 폴리펩타이드의 단리 과정의 설명에서, 용어 "세포" 및 "세포 배양물"은 이것이 달리 명확하게 명시되지 않는 한 항체의 공급원을 의미하기 위해 상호 교환적으로 사용된다. 다시 말해, "세포"로부터 폴리펩타이드의 회수는 회전 침강된(spun down) 전체 세포로부터의 회수, 또는 배지와 현탁된 세포를 둘 모두 함유하는 세포 배양물로부터의 회수를 의미할 수 있다.

[0118] 일 구현예에서, 항체 발현을 위해 사용되는 숙주 세포주는 포유류 기원이다. 당업자는 요망되는 유전자 생성물이 발현되기에 가장 적합한 특정 숙주 세포주를 결정할 수 있다. 예시적인 숙주 세포주는 DG44 및 DUXB11(차이 니즈 햄스터 난소주, DHFR 마이너스), HELA(인간 자궁경부암종), CV-1(원숭이 신장주), COS(SV40 T 항원을 갖는 CV-1의 유도체), R1610(차이 니즈 햄스터 섬유아세포) BALBC/3T3(마우스 섬유아세포), HAK(햄스터 신장주), SP2/0(마우스 골수종), BFA-1c1BPT(소 내피 세포), RAJI(인간 림프구), 293(인간 신장)을 포함하지만 이로 제한 되지 않는다. 일 구현예에서, 세포주는 이로부터 발현되는 항체의 변경된 글리코실화, 예를 들어, 아푸코실화 (afucosylation)를 제공한다(예를 들어, PER.C6®(CruceCell) 또는 FUT8-넉아웃 CHO 세포주(Potelligent® 세포)(Biowa, Princeton, N.J.)). 일 구현예에서, NSO 세포가 사용될 수 있다. CHO 세포가 특히 유용하다. 숙주 세포주는 전형적으로 상업적인 서비스, 예를 들어, American Tissue Culture Collection, 또는 공개된 문헌으로부터 입수 가능하다.

[0119] 시험관내 생성은 다량의 요망되는 폴리펩타이드를 제공하기 위해 스케일-업(scale-up)을 가능하게 한다. 조직 배양 조건 하에서의 포유류 세포 배양 기법은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어 공수 반응기(airlift reactor)에 또는 연속 교반기 반응기에 균질한 현탁 배양물을 포함하거나, 예를 들어 중공 섬유, 미세캡슐에, 아가로스 마이크로비드 또는 세라믹 카트리지 상에 고정되거나 포집된 세포 배양물을 포함한다. 필요하다면 그리고/또는 요망된다면, 폴리펩타이드의 용액은 통상적인 크로마토그래피 방법, 예를 들어 겔 여과, 이온-교환 크로마토그래피, DEAE-셀룰로스에 걸친 크로마토그래피 및/또는 (면역-)친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다.

[0120] 본 발명에서 특징화된 결합 폴리펩타이드를 인코딩하는 유전자는 또한, 박테리아 또는 효모와 같은 비-포유류 세포 또는 식물 세포에서 발현될 수 있다. 이러한 측면에서, 박테리아와 같은 다양한 단세포성 비-포유류 미생물은 또한 형질전환될 수 있으며, 즉, 배양물에서 성장되거나 발효될 수 있음이 이해될 것이다. 형질전환되기 쉬운 박테리아는 엔테로박테리아세아(enterobacteriaceae)의 구성원, 예컨대 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 또는 살모넬라(*Salmonella*); 바실라세아(*Bacillaceae*), 예컨대 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*); 뉴모코커스(*Pneumococcus*); 스트렙토코커스(*Streptococcus*), 및 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)의 균주를 포함한다. 추가로, 박테리아에서 발현될 때, 폴리펩타이드는 봉입체의 일부가 될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 폴리펩타이드는 단리되고, 정제된 다음, 기능성 분자로 조립되어야 한다.

[0121] 원핵생물 외에, 진핵생물 미생물도 사용될 수 있다. 사카로미세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 보편적인 빵 효모는 진핵생물 미생물 중에서 가장 보편적으로 사용되지만, 다수의 다른 균주가 보편적으로 이용 가능하다. 사카로미세스에서의 발현을 위해, 예를 들어 플라스미드 YRp7(Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980))이 보편적으로 사용된다. 이러한 플라스미드는, 트립토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주에 대한 선택 마커를 제공하는 TRP1 유전자, 예를 들어 ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1을 이미 함유하고 있다(Jones, Genetics, 85:12 (1977)). 그 후에, 효모 숙주 세포 계놈의 특징으로서 trp1 병변의 존재는 트립토판의 부재 하에서의 성장에 의해 형질전환을 검출하기 위한 효과적인 환경을 제공한다.

[0122] 항원-결합 단백질의 투여 방법

[0123] 결합 단백질(예를 들어, 본원에 개시된 항원-결합 단백질)을 제조하고 대상체에게 투여하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있거나 당업자에 의해 쉽게 결정된다. 본 개시내용의 결합 단백질의 투여 경로는 경구, 비경구, 흡입 또는 국소적일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "비경구"는 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 피하, 직

장 또는 질 투여를 포함한다. 이러한 투여의 형태 모두가 본 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 명확하게 고려되는 한편, 투여 형태는 주사, 특히 정맥내 또는 동맥내 주사 또는 점적을 위한 용액일 것이다. 통상, 주사에 적합한 약학적 조성물은 완충제(예를 들어 아세트이트, 포스페이트 또는 시트레이트 완충제), 계면활성제(예를 들어 폴리소르베이트), 선택적으로 안정화제(예를 들어 인간 알부민) 등을 포함할 수 있다. 그러나, 본원의 교시와 양립 가능한 다른 방법에서, 변형된 항체는 유해 세포 집단의 부위에 직접 전달되어, 치료제에 대한 이병 조직의 노출을 증가시킬 수 있다.

[0124] 비경구 투여를 위한 조제물은 멸균 수용액 또는 비-수용액, 현탁액, 및 에멀전을 포함한다. 비-수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예컨대 올리브 오일, 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트이다. 수성 담체는 식염수 및 완충 배지를 포함한 물, 알코올성/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액을 포함한다. 본 개시내용의 조성물 및 방법에서, 약학적으로 허용 가능한 담체는 0.01 내지 0.1 M 또는 0.05 M 포스페이트 완충제, 또는 0.8% 식염수를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 다른 보편적인 비경구 비히클은 소듐 포스페이트 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 소듐 클로라이드, 락테이트화된 링거, 또는 고정유를 포함한다. 정맥내 비히클은 유체 및 영양소 보충제, 전해질 보충제, 예컨대 링거 텍스트로스에 기반한 것 등을 포함한다. 예를 들어, 항미생물제, 항산화제, 킬레이트제, 및 불활성 가스 등과 같은 보존제 및 다른 첨가제가 또한 존재할 수 있다. 더 구체적으로, 주사용 용도에 적합한 약학적 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 이러한 경우, 조성물은 멸균되어야 하고, 용이하게 주사기에 주입할 수 있을 정도로 유체여야 한다. 이는 제조 및 저장 조건 하에 안정해야 하고, 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균류의 오염 작용에 대해서도 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적당한 유통성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0125] 미생물의 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 소듐 클로라이드가 또한 조성물에 포함될 수 있다. 주사용 조성물의 장기적 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 유도될 수 있다.

[0126] 임의의 경우, 멸균 주사용 용액은 필요한 양의 활성 화합물(예를 들어, 변형된 결합 폴리펩타이드 그 자체 또는 다른 활성제와 조합되어)을 본원에 나열된 성분 중 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매에 혼입시키고, 필요하다면 뒤이어 멸균 여과시킴으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을, 기본 분산 배지 및 상기 나열된 것으로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 전형적으로 진공 건조 및 동결-건조를 포함하며, 이는 활성 성분 + 이의 이전의 멸균-여과된 용액으로부터의 임의의 추가의 요망되는 성분의 분말을 산출한다. 주사용 조제물은 가공되며, 앰플, 백, 병, 시린지 또는 바이알과 같은 용기 내로 충전되고, 당업계에 알려진 방법에 따라 무균 조건 하에 밀봉된다. 추가로, 조제물은 동시계류중인 U.S.S.N. 09/259,337호 및 U.S.S.N. 09/259,338호(이들 각각은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것과 같은 키트의 형태로 포장되고 판매될 수 있다. 이러한 제조 물품은, 관련 조성물이 자가면역 또는 신생물 장애를 앓고 있거나 그에 취약한 대상체를 치료하는 데 유용함을 나타내는 라벨 또는 포장 삽입물을 포함할 수 있다.

[0127] 상기 기재된 질환의 치료를 위한 본 개시내용의 조성물의 유효 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간 또는 동물인지의 여부, 투여되는 다른 약물, 및 치료가 예방적 또는 치료적인지의 여부를 포함한 많은 상이한 요인에 따라 다양하다. 통상, 환자는 인간이지만, 유전자이식 포유류를 포함한 비-인간 포유류가 또한 치료될 수 있다. 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 당업자에게 알려진 일상적인 방법을 사용하여 적정될 수 있다.

[0128] 결합 폴리펩타이드를 이용한 수동 면역화를 위해, 투여량은 예를 들어, 숙주 체중 1 kg 당 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 보다 통상적으로는 0.01 내지 5 mg/kg(예를 들어, 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg 등) 범위일 수 있다. 예를 들어, 투여량은 체중 1 kg 당 1 mg/kg 또는 10 mg/kg 또는 1 내지 10 mg/kg 범위 내, 예를 들어, 적어도 1 mg/kg일 수 있다. 상기 범위 내의 중간 용량 또한, 본 개시내용의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 대상체는 이러한 용량을 매일, 격일로, 매주 또는 경험적 분석에 의해 결정된 임의의 다른 스케줄에 따라 투여 받을 수 있다. 예시적인 치료는 예를 들어, 적어도 6개월의 장기간에 걸쳐 다수의 투여량으로 투여하는 것을 수반한다. 추가의 예시적인 치료 계획은 2주마다 1회 또는 1개월마다 1회 또는 3개월 내지 6개월마다 1회의 투여를 수반한다. 예시적인 투여량 스케줄은 매일 1 내지 10 mg/kg 또는 15 mg/kg, 격일

로 30 mg/kg 또는 매주 60 mg/kg을 포함한다. 일부 방법에서, 상이한 결합 특이성을 갖는 2개 이상의 결합 단백질은 동시에 투여되며, 이러한 경우 투여되는 각각의 항체의 투여량은 지시된 범위 내에 속한다.

[0129] 본원에 기재된 결합 단백질은 다수의 때에 투여될 수 있다. 단일 투여량 사이의 간격은 매주, 매달 또는 매년일 수 있다. 간격은 또한 변형된 결합 폴리펩타이드 또는 항원의 혈액 수준을 환자에서 측정함으로써 지시된 바와 같이 불규칙할 수 있다. 일부 방법에서, 투여량은 혈장 변형된 결합 폴리펩타이드 농도를 1 내지 1000 µg/ml, 일부 방법에서 25 내지 300 µg/ml로 달성하기 위해 조정된다. 대안적으로, 결합 폴리펩타이드는 치료성 제형으로서 투여될 수 있으며, 이러한 경우 덜 빈번한 투여가 필요하다. 항체에 대해, 투여량 및 빈도는 환자에서 항체의 반감기에 따라 다양하다. 일반적으로, 인간화 항체는 가장 긴 반감기를 보여주며, 키메라 항체 및 비인간 항체가 그 뒤를 잇는다.

[0130] 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방적 또는 치료적인지의 여부에 따라 다양할 수 있다. 예방적 적용에서, 본 항체 또는 이의 콕테일을 함유하는 조성물은 환자의 내성을 증강시키기 위해 아직 질병 상태에 있지 않은 환자에게 투여된다. 이러한 양은 "예방적 유효 용량"인 것으로 정의된다. 이러한 용도에서, 정확한 양은 또한 환자의 건강 상태 및 일반적 면역력에 좌우되지만, 일반적으로 용량당 0.1 내지 25 mg, 특히 용량당 0.5 내지 2.5 mg의 범위이다. 상대적으로 낮은 투여량은 장기간에 걸쳐 상대적으로 덜 빈번한 간격으로 투여된다. 일부 환자는 이의 일생의 나머지 동안 계속 치료를 받는다. 치료적 적용에서, 상대적으로 짧은 간격에서 상대적으로 높은 투여량(예를 들어, 용량당 약 1 내지 400 mg/kg의 항체이며, 5 내지 25 mg의 투여량이 방사성면역 접합체에 더 보편적으로 사용되고 세포독소-약물 변형된 항체에는 더 높은 용량이 사용됨)은 때때로, 질병의 진행이 감소되거나 종료될 때까지 또는 환자가 질병 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 보여줄 때까지 필요하다. 이후에, 환자는 예방적 계획을 투여받을 수 있다.

[0131] 본원에 기재된 결합 폴리펩타이드는 선택적으로, 치료(예를 들어, 예방적 또는 치료적)를 필요로 하는 장애 또는 질환을 치료하는 데 효과적인 다른 제제와 조합되어 투여될 수 있다. 유효 단일 치료 투여량(즉, 치료적 유효량)의 본 개시내용의 ⁹⁰Y-표지 변형된 항체는 약 5 내지 약 75 mCi, 예컨대 약 10 내지 약 40 mCi 범위이다. ¹³¹I-변형된 항체의 유효 단일 치료 비-골수 파괴(non-marrow ablative) 투여량은 약 5 내지 약 70 mCi, 예컨대 약 5 내지 약 40 mCi 범위이다. ¹³¹I-표지 항체의 유효 단일 치료 파괴 투여량(즉, 자가유래 골수 이식을 필요로 할 수 있음)은 약 30 내지 약 600 mCi, 예컨대 약 50 내지 약 500 mCi 미만의 범위이다. 키메라 항체와 함께, 무린 항체에 관하여 더 긴 순환 반감기로 인해, ¹³¹I-표지 키메라 항체의 유효 단일 치료 비-골수 파괴 투여량은 약 5 내지 약 40 mCi, 예를 들어, 약 30 mCi 미만의 범위이다. 예를 들어, ¹¹¹In 표지에 대한 이미징 기준은 전형적으로 약 5 mCi 미만이다.

[0132] 결합 폴리펩타이드가 바로 앞에서 기재된 바와 같이 투여될 수 있는 한편, 다른 구현예에서 결합 폴리펩타이드는 다르게는 제1선 요법으로서 건강한 환자에게 투여될 수 있음이 강조되어야 한다. 이러한 구현예에서, 결합 폴리펩타이드는 정상적인 또는 평균 적색 골수 비축물을 갖는 환자에게 및/또는 하나 이상의 다른 요법을 갖지 않고 거치고 있지 않은 환자에게 투여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 부가(adjunct) 요법과 함께 또는 조합되어 변형된 항체 또는 이의 단편의 투여는 요법 및 개시된 항체의 순차적인, 동시, 동연(coextensive), 병행(concurrent), 동반(concomitant), 또는 동시발생적(contemporaneous) 투여 또는 적용을 의미한다. 당업자는, 조합된 치료 계획의 다양한 구성요소의 투여 또는 적용 시간이 치료의 전체 효과성을 증강시키기 위해 조정될 수 있음을 이해할 것이다. 당업자(예를 들어 경험이 풍부한 종양학자)는 선택된 부가 요법 및 본 명세서의 교시에 기반하여 과도한 실험 없이 효과적인 조합된 치료 계획을 쉽게 인식할 것이다.

[0133] 이전에 논의된 바와 같이, 본 개시내용의 결합 폴리펩타이드, 이의 면역반응 단편 또는 재조합물은 포유류 장애의 생체내 치료를 위해 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 이러한 측면에서, 개시된 결합 폴리펩타이드는 활성제의 투여를 용이하게 하고 안정성을 촉진하기 위해 제형화될 것임이 이해될 것이다.

[0134] 본 개시내용에 따른 약학적 조성물은 전형적으로 약학적으로 허용 가능한, 무독성, 멸균 담체, 예컨대 생리 식염수, 무독성 완충제, 보존제 등을 포함한다. 본 출원의 목적을 위해, 치료제에 접합되거나 비접합된, 변형된 결합 폴리펩타이드, 이의 면역반응 단편 또는 재조합물의 약학적 유효량은 항원에 대한 효과적인 결합을 달성하고 이익을 달성하기 위해, 예를 들어, 질병 또는 장애의 증상을 개선하기 위해 또는 성분 또는 세포를 검출하기 위해 충분한 양을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 종양 세포의 경우, 변형된 결합 폴리펩타이드는 전형적으로, 신생물 또는 면역반응 세포 상의 선택된 면역반응 항원과 상호작용을 할 수 있고 이러한 세포의 사멸 증가를 제

공할 것이다. 당연하게도, 본 개시내용의 약학적 조성물은 약학적 유효량의 변형된 결합 단백질을 제공하기 위해 단일 또는 다수의 용량으로 투여될 수 있다.

[0135] 본 개시내용의 범위와 일관되게, 본 개시내용의 결합 단백질은 치료적 또는 예방적 효과를 일으키기에 충분한 양으로 상기 언급된 치료 방법에 따라 인간 또는 다른 동물에게 투여될 수 있다. 본 개시내용의 결합 폴리펩타이드는 본 개시내용의 항체를 종래의 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제와 알려진 기법에 따라 조합함으로써 제조되는 종래의 투여량 형태로 이러한 인간 또는 다른 동물에게 투여될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제의 형태 및 특징은 그와 조합될 활성 성분의 양, 투여 경로 및 다른 잘 알려진 변수에 좌우되는 것으로 당업자는 인식할 것이다. 당업자는 추가로, 본 개시내용에 기재된 결합 폴리펩타이드의 하나 이상의 종을 포함하는 콕테일이 특히 효과적인 것으로 입증될 수 있음을 이해할 것이다.

[0136] 본원에 기재된 방법의 다른 적합한 변형 및 개조는 본원에 개시된 구현예의 범위로부터 벗어나지 않으면서 적합한 등가물을 사용하여 이루어질 수 있음이 당업자에게 쉽게 분명할 것이다. 이제 소정의 구현예가 상세히 기재되어 하기 실시예를 참조함으로써 더 명확하게 이해될 것이며, 이러한 실시예는 단지 예시 목적을 위해 포함되고 제한적인 것으로 의도되지 않는다.

[0137] **실시예**

[0138] **실시예 1 - 실험 절차**

[0139] 이중과라토프성 항체의 생성

[0140] 보편적인 마우스 면역화 및 가용성 인간 CD73을 항원으로서 사용하는 파지 디스플레이 접근법을 사용하여 CD73-특이적 단일클론 항체를 단리하였다(데이터는 제시되지 않음). 1 내지 25 nM 범위의 IC50을 갖고, 포화 농도의 항체에서 세포 기반 검정 시 CD73의 적어도 50% 저해를 갖는 12개의 서열-무관 모항체를 연구를 위해 선택하였다.

[0141] 공개된 듀오바디 절차의 변형을 이용하되, 생성물 정제를 위해 미세투석법을 사용한다는 점은 제외하고 이중특이적 변이체를 생성하였다(Gramer et al. 2013. mAbs 5, 962-973). 각각의 모 huIgG1(각각 25 내지 50 µg)의 등몰량의 F405L 및 K409R Fc 변이체를 90 µL PBS의 총 부피로 조합하고, 여기에 10 µL 7.5 M 메캅토에틸아민(MEA) pH 7.4를 첨가하였다. 혼합물을 강제-공기 인큐베이터에서 30°C에서 4시간 동안 인큐베이션시키고, 96-웰 투석 플레이트 스트립(Pierce)으로부터 취한 개별 카세트에 옮기고, 실온에서 3회의 투석(1시간, 1.5시간, 및 밤새)을 거치게 하였다. 6개 조과의 샘플에 대해, 반응물을 캐리어 플레이트 상에 장착된 투석 카세트 스트립으로 옮겼다. 플레이트를 저장소 전체에 걸쳐 현탁시키고, 각각의 횟수의 투석 후에 신선한 PBS를 함유하는 저장소 사이로 옮겼다. 제2 투석 후, 잔류물 중 총 유리 티올은 DTNB를 사용한 검출 한계 미만이었다. 최종 생성물을 4°C에서 저장하였다. 생성물 형성을 cIEF에 의해 결정하였다. 시험 듀오바디와 동일한 방식으로 F405L 모(parent)와 K409R 모를 교차시킴으로써 분석을 위한 모항체를 재조합하였다.

[0142] 이중과라토프성 항체의 특징화

[0143] 모세관 등전점 집속법(cIEF)(Maurice, Protein Simple, San Jose CA)을 사용하여 Fab-아암 교환 반응(cFAE)의 듀오바디 생성물의 형성을 결정하였다. 이중특이적 딸분자의 pI가 2개의 모 각각의 pI 사이에 속할 것으로 예상되었으므로 이러한 접근법을 선택하였다. CDR과 프레임워크의 전하 차이의 상대 기여를 증가시키기 위해, cFAE 생성물의 IdeZ 분해에 의해 수득된 F(ab')₂ 단편 상에서 cIEF를 수행하였다. cFAE 생성물(4 µL, 1 mg/mL)을 물에서 4 µL 1U/µL IdeZ(Fabricator Z, Genovis)와 혼합하고, 분쇄에 의해 혼합하였다. 튜브를 공기 인큐베이터에서 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션시키고, 뒤이어 36 µL 1.1x 과말라이트(Pharmalyte) 메틸셀룰로스/암폴린 혼합물을 첨가하고, 혼합하고, 13 kG로 4분 동안 원심분리하였다. 상층액(30 µL)을 분석을 위해 96-웰 플레이트로 옮겼다. 샘플을 cIEF 카세트 상에 55초 동안 로딩하고, 1.5 kV로 1.5분 동안, 그 후에 3 kV로 6분 동안 집속시켰다. 분리된 생성물을 형광에 의해 검출하였다. 요망되는 듀오바디 생성물의 형성을, 모항체 F(ab')₂ 피크의 소멸 및 약 pI 7.6에서 F405L 모 Fc 피크의 부재와 더불어 2개의 모 F(ab')₂의 평균 주변의 pI를 갖는 F(ab')₂ 피크의 형성에 의해 평가하였다. 두 돌연변이(F405L:K409R) 모두를 갖는 듀오바디 Fc 단편은 아마도 아르기닌 주변의 환경에서 이 잔기의 pKa의 제한된 변화로 인해 모 K409R로부터 분리되지 않았다. IdeZ는 pI 7.14 이하에서 집속되었다. 실시예 결과는 도 3에 제시되어 있다.

[0144] 이중과라토프성 결합의 분석

[0145] 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 사용하여 이중과라토프성 항체의 친화도를 1가 항체와 비교함으로써, CD73과 2가적

으로(예를 들어, 2개의 에피토프에서) 관여하는, 이중과라토프성 항체의 능력을 결정하였다. 1가 항체를 사용하여, CD73과의 2가 상호작용을 방지하였다. 러닝 완충제로서 HBS-EP+(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% (v/v) 계면활성제 P20, pH 7.4) 및 단백질 A 시리즈 S 센서 칩(GE Healthcare)을 사용하여 25°C에서 Biacore T200 기기(GE Healthcare) 상에서 SPR을 수행하였다. 칩 상에서 별개의 1가 항체에 의한 CD73의 결합으로 인한 결합활성 효과를 최소화하기 위해, 결합을 매우 낮은 반응(10 RU 미만)에서 측정하였다. 항체를 희석시켜, 10 μ L/분으로 30초 주사하는 동안 포착을 5 내지 30 RU로 제한하였다. 그 후에, 다수의 농도의 CD73(32, 12, 및 3 nM)을 포착된 항체 전체에 걸쳐 30 μ L/분으로 5분 동안 통과시켰다. 해리를 30분 동안 측정하였다. 그 후에, 센서 표면을 10 mM 글리신-HCl pH 1.5로 30초 동안 20 μ L/분으로 재생시켰다. Biacore T200 평가 소프트웨어(GE Healthcare)를 사용하는 1:1 랭뮤어 결합 모델을 사용하여 동역학 상수를 계산하였다. BiaEvaluation 소프트웨어를 사용한 2가 피트(bivalent fit)가 2상 결합의 가능성을 상승시키는 더 낮은 겉보기 잔차(apparent residual)를 보여준 경우에는 1:1 랭뮤어 결합 모델을 사용하지 않았다. 그러한 경우, 더 긴 반감기 구성요소를 1000초 후 동역학에 의해 정의된 1차 분해에 피팅(fitting)시킴으로써 해리 동안 각각의 구성요소의 kd 값을 초기에 결정하였다. 100초에서 200초 사이에 해당 성분에 대한 잔차에 대한 지수 피트를 사용하여, 신속하게 해리되는 구성요소(들)에 대한 존재비 및 kd를 계산하였다. 더 느린 구성요소를 피팅시키는 데 사용된 간격은 신속하게 해리되는 구성요소의 t1/2의 최소 4배 후 시작된다는 기준을 적용하였다. 초기에 100초의 윈도우 내에서 포화에 대한 접근(RU최대)을 가졌던 RU최대 값의 범위에 대한 1차 반응으로서 RU최대로부터 최소 0.2 RU 지점까지 피팅시킴으로써 회합 구성요소를 별개로 유도하였다. 그 후에, 최적의 파라미터와 RU최대를 추가 개량을 위한 출발점으로서 사용하였다. 관찰된 RU와 더 이른 시간으로 확장된 이러한 피트 사이의 양의 잔차를 신속-결합 구성요소를 반영하는 독립적인 의사(pseudo) 1차 반응으로서 처리하였다. 300초 후 결합 수준(RU)에 따라 각각의 구성요소의 속도 상수 및 분율을 다양하게 하는 반복 과정을 사용하여, 관찰된 RU의 0.2 이내의 피트 및 300초 측정에 걸친 순 잔차(net residual)에 대한, 거의 0의 기울기를 획득하였다. 변형 시험은, 값이 전체 피트에 대한 실제 R² 최소값임을 보여주었다. RU최대는 각각의 구성요소의 속도 상수 또는 분율에 무시해도 될 정도의 영향을 미쳤다. 피트는 엑셀에서 수행하였다.

[0146] CD73 저해(역가) 세포-기반 검정

[0147] 이전에 개시된 방법의 변형을 사용하여 이중과라토프성 항체의 역가를 결정하였다(McManus et al. 2018. SLAS discovery: advancing life sciences R & D 23, 264-273). CD73을 발현시키는 COR-L23 세포(4x10³/웰)를 384-웰 투명-바닥 플레이트(Greiner Bio One)에서 L-글루타민 및 10% 열-비활성화 FBS와 함께 40 μ L 1640 배지에서 약 50% 컨플루언스(confluence)까지 밤새 성장시켰다. 1640 배지(10 μ L)에 희석된 항체를 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 3시간 동안 인큐베이션시켰다. 항체 희석 및 첨가를 Agilent Bravo 리퀴드 핸들러 상에서 수행하였다. 무활성(zero-activity) 대조군으로서 항체 대신 AMPCP(100 μ M)를 사용하였다(23,25). GNF 디스펜서 II(GNF Systems, San Diego CA)를 사용하여 기질(5 μ L 200 μ M ¹⁵N₅-AMP, Silantes GmbH Munich Germany)을 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후에, 반응물을 1640 배지에서 5 μ L 12% 포름산으로 켄칭시키고, 켄칭된 반응물(40 μ L) 중 일부를 10 kDa MWCO 한외여과 플레이트(Pall)를 통해 3.5 kG로 30분 동안 원심분리에 의해 여과하였다. 여액을 -80°C에서 저장하였다. 아데노신 생성물을 이전에 기재된 바와 같이 LC/MS/MS 분석에 의해 결정하였다(23). 데이터를 비선형 최소 제곱 피트(nonlinear least squares fit)(GraphPad Prism)에 의해 분석하였다. 동일한 플레이트 섹터에서 무-항체 대조군과 비교되고, 최소-제곱 피트 최대 활성(CNTL%)으로 정규화된 활성이 제시된다. 역가 결정의 결과(표 5)는 포화 항체 농도에서 투영된 최대 저해%로서 표현된다. 초기 스크리닝에서, 3개의 농도(0.25, 0.5 및 1 μ g/mL)를 4벌 희석 시리즈에서 시험하였고, 제시된 평균 저해%(도 1)는 단일 농도(1 μ g/ml)에서의 잔류 활성에 기반한다.

[0148] 에피토프 비닝

[0149] 이전에 기재된 방법의 변형을 사용하여 생물층 간섭계(BLI) 및 사전-혼합 포맷을 사용하여 항체의 하위세트의 에피토프 비닝을 수행하였다(Abdiche et al. 2009. Analytical biochemistry 386, 172-180). 이러한 포맷에서, 물 과량의 Fab와 사전-혼합된 항원의 결합을 항원 단독의 결합과 비교한다. 분석은 옥텟 QK384(Pall Life Sciences) 상에서 16-채널 모드로 수행하였다. 항체를 단백질 A 바이오센서에 의해 5분 동안 결합시키고, 기준선을 1분 동안 확립시킨 다음, 100 nM CD73 또는 4배 물 과량의 Fab와 함께 100 nM CD73으로 3분 동안 옮기고, 뒤이어 완충제로 옮겨 해리를 3분 동안 수행하였다. 0.1% (w/v) 소 혈청 알부민 및 0.01% (v/v) Tween 20을 함유하는 PBS pH 7.4에서 모든 샘플을 희석시키고, 30°C에서 검정을 수행하였다. 회합기의 종료 시 보고 지점을 취함으로써 ForteBio Data Analysis 7.1 소프트웨어(Pall Life Sciences)를 사용하여 데이터를 분석하였다. 신

호(nm)를 CD73 단독으로부터의 신호로 나누고, CD73::*(Fab)*2 복합체(0.56) 대비 CD73의 상대 질량을 곱하여 정규화된 포착값을 계산하였다.

[0150] 구조 결정

[0151] 제조합 TB19 및 TB38 Fab를 Expi293F 세포에서 발현시키고, CaptureSelect CH1-XL Affinity Matrix(ThermoFisher)에 의해 정제하고, 완충제를 PBS로 교환하였다. 인간 CD73 27-549를 C-말단 His6-태그로 클로닝하고, ExpiHEK293 세포에서 발현시켰다. 니켈 컬럼을 사용하여 CD73을 정제하고, 완충제를 PBS로 교환하고, PNGaseF로 밤새 탈글리코실화시키고, 크기-배제 크로마토그래피를 사용하여 추가로 정제하였다. 다각도 광산란(WYATT miniDAWN® Treos 및 Wyatt Optilab® T-rEX 온라인 굴절계)을 사용하여 150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.0에서 Superdex 200 컬럼 상에서 SEC에 의해 생성물의 몰 질량을 결정하였다. 데이터를 Wyatt ASTRA 6.1 소프트웨어를 사용하여 평가하였다. 그 후에, 각각의 Fab를 얼음 상에서 1시간 동안 CD73과 함께 인큐베이션시키고, 20 mM HEPES pH 7.0, 150 mM NaCl로 사전-평형화된 Superdex 200 10/300 GL 컬럼(GE Healthcare) 상에 로딩하였다. 용리된 복합체 피크에 상응하는 분획을 모으고, 결정화 실험을 위해 9 mg/ml로 농축시켰다. TB19 Fab::CD73을 4°C에서 0.1 M 소듐 포타슘 포스페이트 pH 6.2, 35% 5-메틸-2,4-펜탄디올, 및 2.5% 펜타에리스리톨 에톡실레이트에서 결정화하였다. 이러한 결정을 20% 에틸렌 글리콜 및 모액에서 동결보호하였다. X-선 회절 데이터를 Eiger 16M 검출기를 사용하여 EMBL Hamburg P14에서 수집하였다. XDS를 사용하여 데이터를 인덱싱/통합하고, Aimless를 사용하여 스케일링하였다(Evans et al. 2013. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 69, 1204-1214; Kabsch et al. 2010. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 125-132). Phaser(McCoy et al. 2007. *Journal of applied crystallography* 40, 658-674) 및 하기 3개의 검색 앙상블을 사용하여 분자 대체를 수행하였다: 분리된 CD73 N-말단 도메인 및 C-말단 도메인(PDB: 4H2I) 및 MOE에 의해 생성된 TB19.3 Fv 모델(Molecular Operating Environment(MOE) 2013.8 Ed., Chemical Computing Group). TB38 Fab::CD73은 4°C에서 1.6 M 소듐 포스페이트 1염기성 모노하이드레이트, 0.4 M 포타슘 포스페이트 2염기성, 및 0.1 M 소듐 포스페이트 시트레이트 pH 5.3에서 결정을 생성하였다. 결정을 동결보호제로서 모액 중 20% 글리세롤을 사용하여 액체 질소에서 급속 동결시켰다. X-선 회절 데이터를 Pilatus 3 6M 검출기를 사용하여 European Synchrotron Radiation Facility Beamline ID-30b에서 수집하였다. XDS를 사용하여 데이터를 인덱싱/통합하고, Aimless(상기 Evans; 상기 Kabsch)를 사용하여 스케일링하였다. Phaser(상기 McCoy)를 사용하여 분자 대체를 반복적으로 수행하였다. 1회째의 분자 대체를 위해, CD73 단량체(PDB: 4H2F) 및 TB38 Fab MOE-생성 모델을 MOE에 대한 검색 모델로 사용하였다. 2회째를 위해, 이전에 발견된 CD73 단량체를 이의 N-말단 도메인 및 C-말단 도메인으로 분리하였고, TB38의 Fv 도메인 단편과 함께 검색하였다. 두 구조 모두에 대해, Coot(Emsley et al. 2010. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 486-501)에서 모델 재건을 수행하고, Phenix(Adams et al. 2010. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 213-221)를 사용하여 개량을 완료하였다. 데이터 수집 및 개량 통계가 열거된다(표 7). 이 프로젝트에 사용된 소프트웨어는 SBGrid 컨소시엄을 통해 액세스되었다(Morin et al. 2013. *eLife* 2, e01456).

[0152] 실시예 2 - 이중파라토프성 항체의 생성

[0153] 서열과는 관련이 없고 이전에 세포-기반 검정에서 CD73 활성의 50% 초과를 보여준 11개의 모항체의 쌍별 조합을 나타내는 Fab-아암 교환(cFAE)을 사용하여 CD73에 대한 이중파라토프성 항체의 패널을 생성하였다. 각각의 Fab는 모 Fc를 탈안정화시키고 이중파라토프성 듀오바디 생성물의 Fc를 안정화시키는 F405L 또는 K409R 돌연변이를 함유하는 인간 IgG1 Fc와의 융합으로서 발현되었다(Gramer et al. 2013. *mAbs* 5, 962-973; Labrijn et al. 2013. *PNAS* 110, 5145-5150; Labrijn et al. 2014. *Nat. Protoc.* 9, 2450-2463). 모항체를 소규모 배양에서 발현시키고, 단백질 A를 사용하여 정제하고, cFAE에 의해 제조하였다. 요망되는 생성물의 생성을 cIEF에 의해 검증하였다(도 3). 121개(11x11)의 가능한 조합 중에서 88개의 이중파라토프성 변이체를 생성하였고, 이는 가능한 모든 조합을 적어도 하나의 배향으로 망라하였다. 항체 구조 및 기능에 대한 Fc 돌연변이의 가능한 효과를 제어하기 위해 모 F405L 및 K409R Fc 변이체를 조합함으로써 11개의 단일특이적 모항체를 또한 비교군으로서 제작하였다. 추가적으로, 돌연변이의 가능한 위치 효과를 제어하기 위해 2개의 Fc 배향 모두로 21개의 쌍형성을 생성하였다.

[0154] 실시예 3 - 세포성 CD73 효소 활성을 저해하기 위한 모항체 및 이중파라토프성 항체의 역할

[0155] 인간 CD73을 발현시키는 COR-L23 폐 암종 세포 및 LC/MS 기반 검정에 의해 정량화된 생성물 아데노신 상에서 1 µg/mL에서 역가에 대해, 정제된 모항체 및 이중파라토프성 항체를 시험하였다(McManus et al. 2018. *SLAS*

discovery: advancing life sciences R & D 23, 264-273). 1 nM에서 이중파라토프성 항체에 의한 CD73 효소 활성의 저해 백분율은 **도 1**에 제시된다. 저해 정도는 광범위하게 다양하였지만, 대부분의 이중파라토프성 조합이 듀오바디 형태의 어느 모항체보다도 더 높은 역가를 나타내었다. 다수의 모항체가 하나 초과와 다른 항체와 조합될 때 90% 이상의 저해를 보여주는 매우 강력한 딸 이중파라토프성 변이체를 산출하였다. 이들 중에서, TB19 및 E3.2는 90% 이상의 저해를 갖는 가장 많은 수의 변이체를 형성하였고, E3.2, H19, TB38 또는 TC29를 포함한 TB19 쌍 중 몇몇은 95% 이상의 저해를 달성하였다. TB19 및 E3.2 항체는 또한 몇몇 다른 항체와 조합되어 80% 이상의 저해를 달성하였다. 이들 항체 둘 모두는 이러한 불규칙한 쌍형성 능력을 보여주었지만, 이의 쌍형성 패턴의 상보성에 의해 서로 구별되었다. 두 Fc 배향 모두로(총 16개) 시험된 이중파라토프성 변이체 사이에서 저해 정도의 주요 차이는 관찰되지 않았으며, 이는 Fc에서 듀오바디 돌연변이의 위치가 성과에 유의한 영향을 미치지 않았음을 나타낸다(데이터는 제시되지 않음).

[0156] 두 모 Fab 모두가 역가에 필요한지의 여부를 평가하기 위해, 모항체를 또한 관련 없는 항체(AS30)와 교차시켜, CD73과 상호작용할 수 있는 단일 Fab만을 갖는 1가 변이체 IgG를 생성하였다. 이러한 항체 모두는 무시해도 될 정도의 역가를 보여주었으며, 이는 2개의 동족 모항체로부터의 Fab가 참여할 것임에 틀림없음을 실증한다(**도 1**). 이것이 더 낮은 친화도로 인한 것인지의 여부를 결정하기 위해, 가장 강력한 이중파라토프성 항체의 1가 분자의 친화도와, 이들이 일부인 이중파라토프성 변이체의 친화도를 비교하였다. 우선 항체를 고체 지지체에 결합시키고, 용액 중 가용성 CD73 이량체의 결합에 이어 SPR(상기 기재된 실험 절차)이 뒤따랐다. **도 2**에서 볼 수 있는 바와 같이, 대부분의 경우 이중파라토프성 변이체의 친화도(KD)는 친화도가 더 높은 모항체의 친화도와 유사하였으며, 이는 그 친화도가 해당 Fab 단독의 결합에 기인하였음을 나타낸다. 2가지 경우(H19/TB19 및 CL25/TB19)에서만 이중파라토프성 변이체가 두 모항체보다 유의하게 더 높은 친화도를 보여주었으며(두 경우 모두에서 약 15배 더 낮은 KD), 이는 잠재적으로 CD73 이량체에 대한 2가 결합 또는 결합을 촉진하는 입체배좌 효과로 인한 상승 효과를 시사한다. 그러나, 이러한 2가지 경우의 모항체 중 어느 것도 다른 항체와 조합될 때 유사한 증강을 일으키지 않았으며, 이는 입체배좌 효과가 있을 가능성이 낮음을 시사한다. 개별 CD73 이량체에 대한 대부분의 1가 항체의 친화도가 역가를 위해 필요함에도 불구하고 제2 동족 Fab의 첨가에 의해 증가되지 않았기 때문에, 강력한 저해를 위해서는 하나 초과와 CD73과 이중파라토프성 IgG의 상호작용이 필요함을 시사한다.

[0157] 이중파라토프성 포맷으로 이들 항체를 조합하는 것의 이점을 추가로 평가하기 위해, 포화 항체 농도에서의 최대 저해 및 EC50을 가장 활성인 이중파라토프성 항체에 대해, 단독으로 또는 COR-L23 세포 상의 혼합물에서 이의 모 mAb와 함께 결정하였다(**표 5, 도 4**). **도 1**의 결과와 일치하게, 각각의 이중파라토프성은 최대 10 nM의 부분 저해만 보여준 2개의 모항체 중 어느 것보다도 더 강력하였다. 모든 이중파라토프성 항체에 대한 EC50 값은 0.2 내지 0.8 nM 범위에 있었다. 대부분의 경우, 모항체의 혼합물은 이중파라토프성 항체와 유사한 최대 저해를 산출하였지만, 시험된 조합의 절반에서, 이중파라토프성 변이체 또한 더 낮은 EC50을 보여주었다. 가장 놀라운 경우(TB19/TC29), 이중파라토프는 더 친화적인 TC29 1가 모 및 CD73에 대한 이중파라토프의 친화도가 거의 동일함에도 불구하고 항체 혼합물보다 50배 더 낮은 EC50을 보여주었다(**도 2**). 단 하나의 경우(CL25/TA10)에만 혼합물이 더 강력하였으며(약 4배), 이는 해당 혼합물에 의해 제공되는 CD73과의 상호작용이 이중파라토프성 항체로 복제될 수 없음을 나타낸다.

[0158] [표 5]

[0159] COR-L23 세포 상에서 CD73에 대한 이중파라토프성 항체 및 모 혼합물의 역가. EC50 및 최대 저해 정도는 비선형 회귀 분석에 기반한다.

모항체	이중파라토프성		모 혼합물	
	EC50 (nM)	최대 저해	EC50 (nM)	최대 저해
TB19/ TB38	0.777	100%	0.841	106%†
H19/ TB19	0.382	98%	0.629	98%
E3.2/ TB19	0.443	97%	0.811	98%
CL25/ TB19	0.619	97%	0.636	109%†
H19/ E3.2	0.224	96%	0.283	99%
TB19/ TC29	0.264	95%	13.0	137%†
H7/ TB19	0.270	95%	0.541	95%
F1.2/ E3.2	0.305	93%	0.256	97%
H19/ C16	0.239	93%	0.863	77%
CL25/ TA10	0.266	91%	0.073	95%
TA9/ H7	0.229	66%	0.658	80%

* 최대 저해

† 외삽된 값

[0160]

[0161] CD73에 대한 이중과라토프성 항체의 친화도를 1가 형태의 모항체의 친화도와 비교하였다. 칩 표면 상의 별개의 항체에 의한 용액 중 CD73의 결합으로 인한 잠재적인 결합활성 효과를 피하기 위해, 동역학 상수를 신뢰 가능한 수준으로 평가하기에 충분한 최저 수준으로 모항체를 칩에 로딩하였다. 데이터를 도 2와 같이 군으로 나눈다. 다수의 이중과라토프성 항체 사이에 공유되는 모항체에 대한 동역학 파라미터가 용이한 비교를 위해 각각의 경우에 제시된다는 것에 주목한다. 값은 유동 시 3, 12 및 32 nM CD73으로 수득된 곡선에 대한 피트를 나타낸다. 2상 동역학의 경우 회합 속도 상수는 괄호 안의 300초 결합기 이후에 이의 존재비와 함께 제시된다. 해리 속도 상수 존재비는 각각의 구성요소에 대한 피트의 To 절편에 기반한다. 아래 표 6은 도 2를 생성하는 데 사용된 결합 데이터를 보여준다.

[0162] [표 6]

[0163] 단일 CD73의 2가 관여를 평가하기 위한 대표적인 SPR 동역학 데이터.

모	명칭	k _a (1/Ms)		kd (1/s)		K _D (M)*
		행유어 1:1	2상	행유어 1:1	2상	
모 1	TB19/AS30	1.65E+05	-	6.90E-04		4.18E-09
모 2	TB38/AS30	2.37E+05	-	1.87E-04		8.14E-10
이중과라토프성	TB19/TB38	1.84E+05	-	1.02E-04		5.55E-10
모 1	TB19/AS30	1.65E+05	-	6.90E-04		4.18E-09
모 2	H19/AS30	6.31E+05	-	5.23E-03		8.29E-09
이중과라토프성	TB19/H19	4.49E+05	2.81E+05 (65%) 1.38E+06 (35%)	1.12E-04	2.70E-05 (85%) 2.70E-03 (15%)	6.02E-11
모 1	E3.2/AS30	5.80E+05	3.34E+05 (60%) 1.22E+06 (40%)	1.72E-04	7.22E-05 (92%) 1.58E-03 (8%)	1.25E-10
모 2	TB19/AS30	1.65E+05	-	6.90E-04	-	4.18E-09
이중과라토프성	E3.2/TB19	3.64E+05	1.58E+05 (57%) 8.50E+05 (43%)	1.64E-04	1.28E-04 (91%) 4.06E-03 (9%)	3.52E-10
모 1	CL25/AS30	5.54E+05	-	3.06E-03		5.52E-09
모 2	TB19/AS30	1.65E+05	-	6.90E-04		4.18E-09
이중과라토프성	CL25/TB19	4.93E+05	3.24E+05 (70%) 1.50E+06 (30%)	1.30E-04	7.86E-05 (86%) 7.06E-03 (14%)	1.60E-10
모 1	H19/AS30	6.31E+05	-	5.23E-03		8.29E-09
모 2	E3.2/AS30	5.80E+05	3.34E+05 (60%) 1.22E+06 (40%)	1.72E-04	7.22E-05 (92%) 1.58E-03 (8%)	1.25E-10
이중과라토프성	H19/E3.2	5.74E+05	1.06E+06 (61%) 1.41E+05 (39%)	1.71E-04	1.30E-04 (85%) 9.98E-03 (15%)	2.26E-10
모 1	TB19/AS30	1.65E+05	-	6.90E-04		4.18E-09
모 2	TC29/AS30	7.59E+05	-	1.11E-04		1.47E-10
이중과라토프성	TB19/TC29	6.85E+05	1.19E+06 (55%) 1.16E+05 (45%)	8.96E-05	7.80E-05 (91%) 6.00E-03 (9%)	1.14E-10
모 1	TB19/AS30	1.65E+05	-	6.90E-04		4.18E-09
모 2	H7/AS30	6.89E+05	-	1.95E-04		2.83E-10
이중과라토프성	TB19/H7	7.52E+05	7.03E+05 (55%) 5.31E+06 (45%)	1.49E-04	2.46E-04 (100%)	3.28E-10
모 1	F1.2/AS30	9.26E+05	-	3.12E-04		3.36E-10
모 2	E3.2/AS30	5.80E+05	3.34E+05 (60%) 1.22E+06 (40%)	1.72E-04	7.22E-05 (92%) 1.58E-03 (8%)	1.25E-10
이중과라토프성	F1.2/E3.2	9.39E+05	1.60E+06 (60%) 4.09E+05 (40%)	1.24E-04	9.89E-05 (97%) 8.59E-04 (3%)	1.05E-10
모 1	H19/AS30	6.31E+05	-	5.23E-03		8.29E-09
모 2	C16/AS30	5.74E+05	3.54E+05 (57%) 1.26E+06 (44%)	3.93E-04	1.71E-04 (61%) 8.66E-03 (38%)	2.99E-10
이중과라토프성	H19/C16	4.54E+05	3.78E+05 (72%) 1.31E+06 (28%)	3.66E-04	1.23E-04 (69%) 3.48E-03 (31%)	2.70E-10
모 1	CL25/AS30	5.54E+05	-	3.06E-03		5.52E-09
모 2	TA10/AS30	3.40E+05	-	1.34E-04		3.92E-10
이중과라토프성	CL25/TA10	5.70E+05	8.44E+05 (65%) 1.88E+05 (35%)	2.20E-04	6.14E-05 (92%) 5.36E-03 (7%)	1.08E-10
모 1	TA9/AS30	5.21E+05	1.34E+06 (51%) 2.65E+05 (49%)	5.13E-04	2.70E-04 (73%) 1.29E-02 (25%)	5.18E-10
모 2	H7/AS30	6.89E+05	-	1.95E-04		2.83E-10
이중과라토프성	TA9/H7	5.97E+05	2.75E+05 (59%) 1.60E+06 (41%)	2.19E-04	1.80E-04 (91%) 1.86E-03 (9%)	3.01E-10

*주 구성요소 kd와 함께 행유어 ka

[0164]

[0165] 이중과라토프성 항체 11개 중 9개는 2상 해리 동역학을 나타내었지만(도 13a 및 도 13b), 대부분은 소량(15% 이하)의 더 신속한 해리 구성요소로 인한 것이었다. 하나의 경우(H19/C16), 이러한 구성요소의 존재비는 1가 모 C16/AS30의 존재비와 유사하였으며(31% 대 38%), 이는 둘 모두를 생성하는 데 사용된 C16 단일클론의 불균일성을 시사한다. TA9/AS30은 이중과라토프성 딸 TA9/H7에 반영되지 않은 유사한 불균일성(29% 더 낮은 안정성)을 보여주었다. 1가 모항체와 비교된 해리에 대한 반감기는 도 15a 및 도 15b에 제시되어 있다. 11개의 경우 중 8개에서, 주요 해리 구성요소의 kd는 가장 높은 안정성을 갖는 1가 모의 2.2배 이내였다. 대조적으로, 1가 모항체에 대한 kd 값 사이의 차이는 평균 15배(1.5배 내지 73배 범위, 중앙값 6.2)였으며, 이는 이러한 경우 CD73이, 고정된 항체 상의 단일 모 Fab 아암에 의해 결합됨을 시사한다. 그러나, 3가지 경우(E3.2/TB19, CL25/TB19 및 H19/TB19), 이중과라토프성 항체와의 상호작용은 어느 1가 모항체보다도 유의하게 더 안정적이었

으며(각각 5.4배, 8.8배 및 26배), 이는 이중파라토프성 항체와의 추가 접촉의 존재를 시사한다.

[0166] 회합의 2가 동역학은 또한 주사 직후 RU의 급격한 증가에 이어 100초 후 속도의 유의한 감소로부터 분명해졌다. 의사 1차 동역학을 가정한 100초 후 동역학에서 초기에 예상 RU의 예측은 300초 후 RU의 유의한 분율에 기여하는 1차 동역학을 보여주는 신속-결합하는 구성요소와 일치하는 유의한 간차를 보여주었다(30% 내지 49%). 반복 과정에 의한 구성요소 둘 모두의 피팅은 결합 과정의 90%에 걸쳐 관찰된 RU의 ± 0.2 이내의 합계를 산출하였다(도 13a 및 도 13b). 해리의 경우와 유사하게, 2개의 구성요소 각각에 대해 계산된 k_a 값은 1가 모(2.04 ± 1.4 배, 범위 1.02 내지 2.71)의 3배 이내였으며, 그와는 대조적으로 이들 사이에는 평균 약 6배 차이(5.9 ± 2.1 , 표 6)가 있었고, 이는 이들이 각각의 모 Fab 아암에 의한 CD73에 대한 독립적인 결합을 반영함을 시사한다.

[0167] 회합을 위한 각각의 동역학 구성요소가 해리를 위한 특정한 하나에 명백하게 할당될 수 없기 때문에, CD73에 대한 이중파라토프성 항체 및 1가 모항체의 상대 친화도를 주요한 해리 구성요소의 k_d 값에 기반한 KD 값 및 랭뮤어 1:1 결합 모델에 기반한 k_a 값에 의해 비교하였다. 후자는 2상 결합의 경우 2개의 k_a 구성요소의 평균의 30% 이내였다(표 6). 해리 동역학에 대해 관찰된 패턴과 일관되게, 이중파라토프성 변이체의 겉보기 친화도(K_D)는 더 친화적인 1가 모항체의 친화도와 유사하였으며, 이는 이중파라토프성 항체의 상호작용이 주로 단일 Fab 아암의 결합에 기인할 수 있음을 나타낸다. 그러나, 2가지 경우(CL25/TB19 및 TB19/H19), 이중파라토프성 변이체는 두 1가 모항체를 능가하는 유의한 증가를 보여주었다(각각 26배 및 69배). 이러한 증가는, 모(TB19, H19, CL25)가 다른 파트너와 유사한 증강을 일으키지 않았기 때문에 그러한 조합에 특이적이었다. 이러한 증가는 2개의 동족 아암을 필요로 하기 때문에, 이는 CD73과 이러한 이중파라토프성 변이체의 아암 둘 모두의 상호작용을 반영하는 것으로 추론되었다. 그러나 대부분의 경우, CD73에 대한 친화도는 역가를 위해 필요함에도 불구하고 제2 동족 Fab 아암의 첨가에 의해 증가되지 않았으며, 이는 이중파라토프성 항체와 추가 CD73의 상호작용이 세포에 대한 강력한 저해에 필요함을 시사한다.

[0168] **실시에 4 - 에피토프 비닝**

[0169] 가장 높은 수의 고도로 강력한 조합(TB19, E3.2, TB38, H19 및 E3.2)을 갖는 모항체의 에피토프를 생물층 간섭계를 사용하여 비닝하였다(도 5a). 1가 IgG 항체를 경쟁자 Fab와의 혼합물로부터의 CD73의 포착을 위해 고체 지지체 상의 코팅에 사용하였다.

[0170] 모항체의 하위세트를 조사한 결과는 도 5b에 제시된다. 더 높은 값은 켈린지 Fab에 의해 결합된 CD73의 포착, 및 결합에 대한 경쟁이 없음/낮음(즉, Fab가, 코팅된 항체와 중첩되지 않는 CD73 에피토프에 결합함)을 나타내는 한편, 더 낮은 값은 고정된 항체에 의한 포착을 위해 결합된 Fab에 의한 에피토프의 차단을 반영한다. 이러한 결과에 기반한 상이한 에피토프 빈(bin)에 대한 항체의 할당은 도 5c에 제시된다. 빈 중 하나는 TB38, H19 및 대체로-중첩되는 TC29를 함유하였고, 이들 모두는 TB19를 제외한 Fab 각각에 대한 감수성을 보여주었다. 그러나, 이러한 3가지는 또한, 상이한 Fab에 의한 경쟁에 대한 이의 감수성의 차이를 보여주었다. 예를 들어, 1가 TB38 IgG에 의한 CD73의 포착은 TC29 또는 H19에 의한 포착보다 H19 Fab에 의한 경쟁에 대해 감수성이 더 높은 한편, TC29는 F1.2 Fab에 의한 경쟁에 대한 부분적 내성에 의해 다른 2가지와 구별되었고, 이는 모든 항체 중에서 독특하였다. 대부분의 경우 빈은 명확하게 묘사되었지만, 몇몇 경우(H19+H19, TC29+H19, TC29+F1.2, TB19+H19, F1.2+H19 및 F1.2+TB19)에는 중간 수준의 저해가 관찰되었고, 이는 부분적으로-중첩되는 에피토프(Abdiche et al. 2017. PloS one 12, e0169535) 및/또는 친화도의 유의한 차이를 반영할 가능성이 있다. E3.2는 고체 지지체와의 이의 비특이성 상호작용으로 인해 비닝될 수 없었다.

[0171] 모항체 사이의 경쟁의 결여를 반영하는 이러한 비닝 실험에서 항체에 의한 CD73::Fab 복합체의 포착은 상응하는 이중파라토프성 항체에 의한 세포성 CD73 효소 활성의 저해와 높은 상관관계를 보여주었다(도 5d). Fab의 35% 초과 포착이 검출된 항체의 쌍형성은 이중파라토프로서 $1 \mu\text{g/mL}$ 에서 85% 이상의 저해를 변함없이 일으켰고, 대조적으로 35% 미만의 포착을 갖는 조합은 이중파라토프로서 70% 미만의 저해를 달성하였다. 이러한 데이터는 높은 역가를 달성하기 위해 이중파라토프를 포함하는 두 항체 모두가 CD73 상의 비-중첩 에피토프에 결합할 필요가 있음을 나타낸다.

[0172] **실시에 5 - CD73과의 복합체에서 TB19 및 TB38 Fab의 구조**

[0173] TB19 항체가 가장 강력한 이중파라토프성 변이체에서 TB38을 포함한 다수의 다른 항체와 성공적으로 쌍을 형성하였기 때문에, 구조 분석에 의해 CD73과의 상호작용을 조사함으로써 작용 기전을 이해하는 것이 중요하였다. TB19 및 TB38 재조합 Fab로 복합체를 제조하기 전에, 인간 CD73의 세포외 도메인(잔기 27 내지 549)을 PNGaseF로 탈글리코실화시켰다. PNGaseF-처리 생성물은 SEC-MALS에 의해 118 kDa의 분자량(MW)을 보여주었으며, 이는

폴리펩타이드 MW(116 kDa)보다 약간 더 컸다. 이는 PNGase F 절단에 대해 감수성이 없는 위치 Asn311에서의 구조에서 관찰된 글리칸에 기인하였다. 결정화 파라미터는 아래의 표 7에 제시된다.

[표 7]

[0175] 결정학 파라미터

결정학 데이터 및 개량 통계	TB19 Fab:CD73	TB38 Fab:CD73
회절 데이터		
파장 (Å)	0.9762	0.9763
단위 세포 (Å)	118.31, 74.22, 148.33	236.91, 336.2, 222.15
공간군	I 1 2 1	C 2 2 2
분리 범위 (Å) ^a	59.04 - 2.25 (2.33 - 2.25)	78.61 - 3.73 (3.863 - 3.73)
데이터 완성도 (%)	99.6 (99.8)	99.9 (100)
중복성	3.8 (3.9)	6.6 (6.7)
평균 <i>I</i> (σ)	10.8 (2.1)	6 (0.6)
<i>R</i> _{int}	0.071 (0.093)	0.255 (3.599)
정제 통계		
<i>R</i> _{int} (%)	27.33	26.62
<i>R</i> _{σ0} (%)	31.62	31.48
원자의 수		
거대분자	5699	26275
리간드	35	81
B-인자(평균)		
거대분자	61.3	193.65
리간드	72.56	207.51
<i>r.m.s.d.</i>		
결합 길이 (Å)	0.009	0.003
결합각 (°)	1.2	0.62
라만찬드란 플롯 (%)		
선호	91.57	94.07
허용	8.29	5.75

^a 괄호 안의 값은 최고-분리 셀에 대한 것임.

[0177] TB19 Fab와의 복합체에서 CD73의 구조는 도 6a와 도 6b 및 도 7a와 도 7b에 제시된다. 결정 비대칭 단위에서, 하나의 TB19는 하나의 CD73 단량체에 결합되고, CH1/CL 도메인에서 약한 전자 밀도로 인해 Fab의 Fv만 구축될 수 있었다. 2배 결정학 대칭 작업을 통해 이량체성 CD73 복합체의 생물학적 조립체를 획득하였다. 생성된 구조에서, CD73은 C-말단 도메인 사이의 계면을 통해 이량체화되며(도 6b), 이는 공개된 구조와 근접하게 닮아 있다 (Heuts et al. 2012. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 13, 2384-2391; Knapp et al. 2012. *Structure (London, England: 1993)* 20, 2161-2173).

[0178] TB19와의 복합체의 CD73 내에서, N-말단 도메인 중 활성 부위에서 잘 정의된 양의 밀도가 관찰된다. 2개의 아연 이온 및 1개의 포스페이트가 이에 따라 구축되었고, TB19 복합체가 포스페이트의 존재 하에 결정화됨에 따라, 촉매 중심의 잔기 Asp36, His38, Asp85, Asn117, His118, His220 및 His243에 의해 배위되었다. 이러한 아연 이온 및 포스페이트는 CD73(PDB 4H2I)의 폐쇄형 이형태체에서 기질 유사체 AMPCP의 2개의 아연 이온 및 β-포스포네이트와 동일한 위치에 존재한다(도 7a 및 도 7b). 아연 및 포스페이트의 보존된 이량체화 계면 및 위치는, TB19와의 복합체에서 CD73 이량체의 구조가 생물학적으로 관련이 있음을 나타낸다.

[0179] CD73은 활성 부위 각각에서 기질의 부재 또는 존재에 따라 개방형 또는 폐쇄형 입체배좌로 이전에 보고된 바 있다(상기 Knapp)(도 6a). 그러나, TB19에 의해 결합될 때, CD73은 N-말단 도메인 및 C-말단 도메인이 이전에 개방형 및 폐쇄형 이형태체에 대해 보고된 것들 사이의 중간 위치에 있는 입체배좌를 취한다(도 6a와 도 6b 및 도 7a와 도 7b). 초기 구조의 C-말단 도메인과 TB19-결합된 CD73이 겹칠 때, N-말단 도메인에서 아연-배위 잔기 H220의 위치는 폐쇄형 이형태체(PDB 4H2I)에서의 위치로부터 대략 22 Å 떨어져 있고, 개방형 이형태체(PDB 4H2F)에서의 위치로부터 대략 27 Å 떨어져 있다.

[0180] CDRL2를 제외한 모든 TB19 CDR 루프는 아연 및 인산염 결합 부위에 인접한 N-말단 도메인의 일부와 접촉하지만(도 7a 및 도 7b), 항체 잔기 중 어느 것도 잔기를 형성하는 촉매 중심 중 어느 것과도 직접 상호작용하지 않는다. 추가적으로, TB19 CDRH2 잔기 Ser62 및 CDRL1 잔기 Ser26(도 6b, 도 6c)은 C-말단 도메인에 공간적으로 근접해 있지만, Arg354, Asn390, Arg395, Phe417, Phe500, 및 Asp506을 포함한 기질 결합 잔기로부터 20 Å 떨어져 있다. TB19의 존재 하에, 그러한 기질-결합 잔기는 촉매 중심 및 N-말단 도메인의 아연으로부터 멀리 떨어져 있다. 예를 들어, 아데닌 고리에 결합하는 잔기 Phe417 및 Phe500은 기질과의 폐쇄형 이형태체(PDB 4H2I)에서의 그의 위치로부터 11 Å 내지 13 Å 떨어져 있다.

[0181] TB19의 배향 및 이의 에피토프 위치때문에, 본 발명자들의 구조에서 CD73의 N-말단 도메인과 CD73의 폐쇄형 이형태체를 겹칠 때, C-말단 도메인과 TB19 사이의 충돌이 관찰된다(도 7a 및 도 7b). 그러므로, 결합된 TB19는 CD73에서 N-말단 도메인 및 C-말단 도메인의 정렬을 차단하고 폐쇄형 이형태체의 형성을 방지할 것이다. 그 결과, TB19 결합은 N-말단 도메인의 아연 이온 및 촉매 잔기를 기질의 인산무수 결합으로부터 분리하여, 효소 활

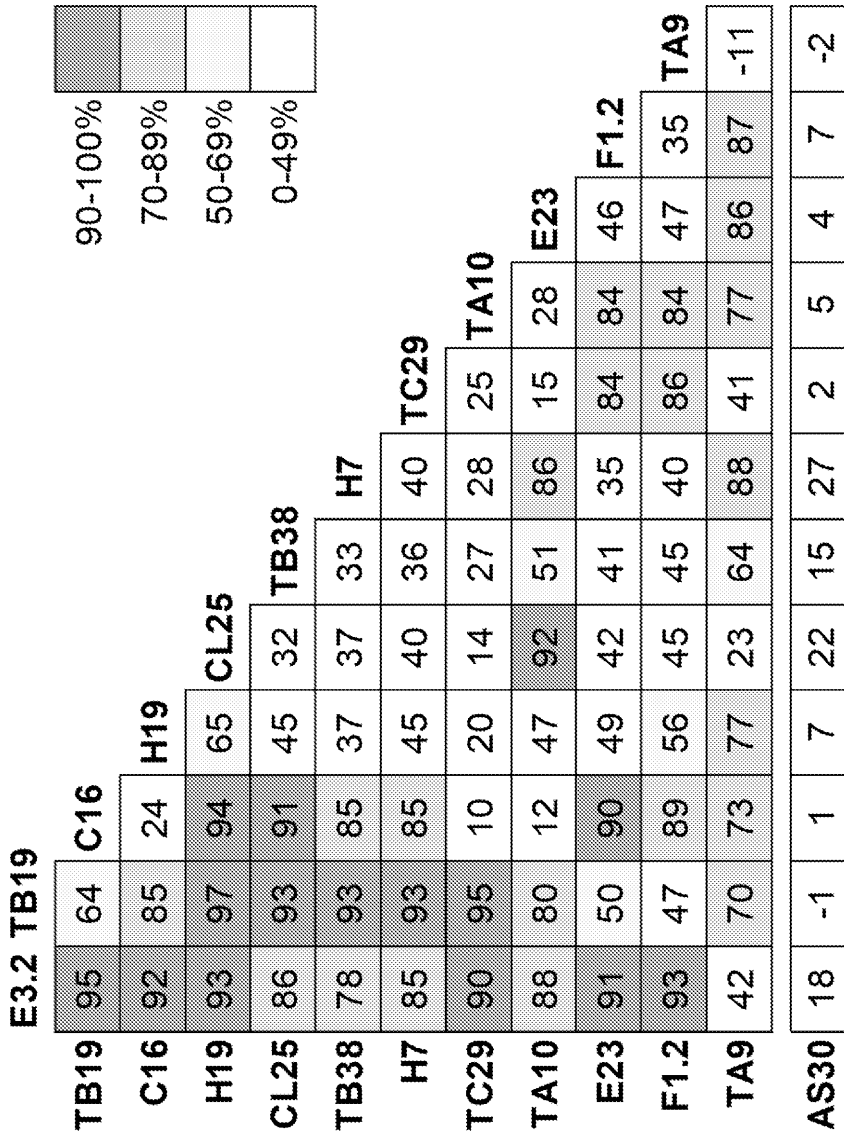
성을 차단할 것이다.

[0182] TB19와 대조적으로, TB38 Fab 및 CD73은 하나의 Fab에 의해 결합된 모든 단량체를 갖는 상이한 입체배좌의 2개의 CD73 이량체를 함유하는 각각의 비대칭 단위를 갖는 구조를 산출하였다(도 8a 내지 도 8c). 제1 구조(도 8a)에서는, CH1/CL 도메인에 대한 전자 밀도가 잘 정의되었고, 전체 Fab 구조가 구축될 수 있었다. 제2 구조(도 8b)에서는, 불변 도메인에 대한 약한 밀도가 관찰되어, Fv 도메인만 구축되었다. 놀랍게도, 2개의 구조에서 CD73의 입체배좌는 상이하다. 제1 구조에서, CD73은 1 Å의 제곱 평균 제곱근 편차 값을 사용하여 PDB 4H2F의 표준 개방형 이형태체 상에 겹쳐질 수 있는 대칭적인 개방형 입체배좌로 존재한다. 그러나, 제2 구조의 CD73 이량체는 이전에 보고된 적이 없는 비대칭 입체배좌로 존재하며, 여기서 단량체는 상이한 입체배좌로 존재한다. 이러한 하이브리드 구조에서, 하나의 단량체는 결합된 아데노신이 있는 결정(PDB 4H2F)에서 이전에 관찰된 개방형 입체배좌로 존재하는 한편, 다른 하나는 기질 유사체 AMPCP(PDB 4H2I)의 존재 하에 관찰되는 폐쇄형 입체배좌로 존재한다(상기 Knapp). 두 복합체 모두에서, TB38 Fab는 N-말단 도메인(Lys145, Ser152, Ser155, Gly156, Leu159-Lys162, Glu203, Lys206, Leu210 및 Asn211 포함)에서만 잔기와 접촉하고, 6개의 CDR 모두가 상호작용에 관여한다. CD73의 부분-개방형 구조에 대한 TB19 및 TB38의 에피토프 잔기의 맵핑(도 10) 및 서열 정렬은, 비닝 결과와 매우 근접하게 일치함에도 불구하고 에피토프가 비-중첩적임을 보여준다.

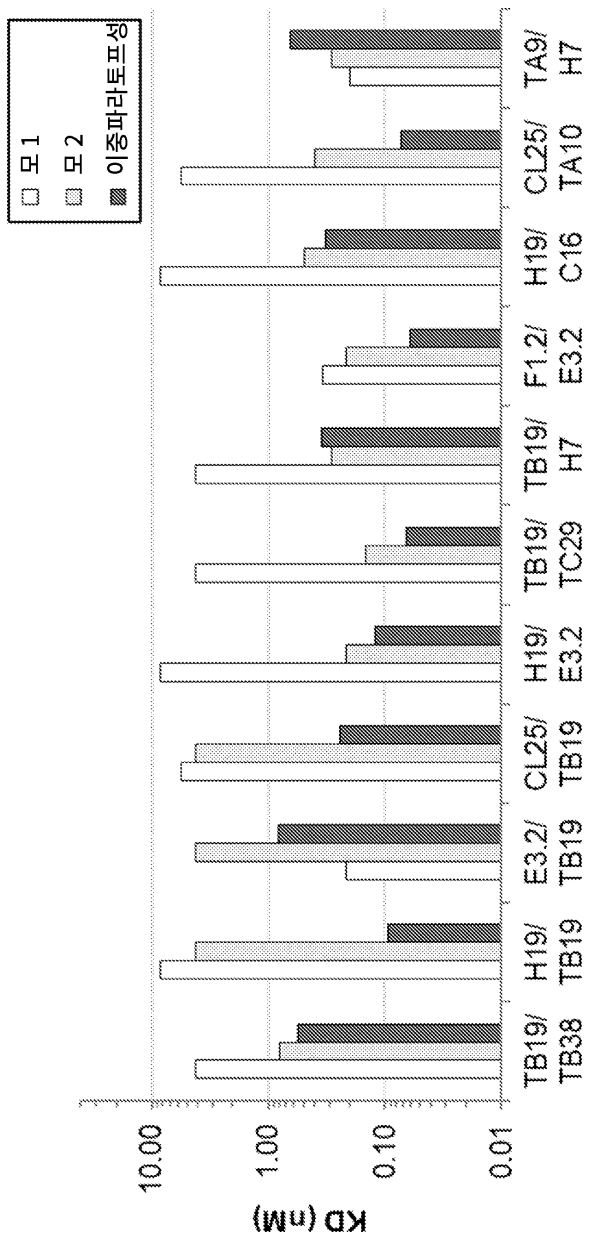
[0183] 이중특이적 TB19/TB38 항체에 의한 CD73 이량체의 가능한 관여를 평가하기 위해, 완전한 IgG 항체 구조(PDB 1HZH)의 Fv를 TB19 및 TB38의 Fv로 대체함으로써 IgG를 모델링하였다(도 9a 및 도 9b). 이 모델(도 9a)에서, TB19 및 TB38의 CH1 도메인 사이의 거리는 대략 40 Å이다(CH1 도메인의 Ala225의 C α 사이에서 측정됨). 이러한 이중과라토프에 의한 부분-개방형 입체배좌에서 CD73에 대한 2가 결합을 모델링하는 것은, 동일하거나 반대되는 단량체 상에서 2개의 에피토프를 결합하는 것에 의해서도 가능하지 않았지만, 각각의 CD73 단량체는 도 9b에 예시된 바와 같이 2개의 항체에 의해 1가적으로 결합될 수 있었다. 단일 항체가 CD73 이량체에 2가적으로 결합하기 위해서는, Fab CH1 도메인의 C-말단 잔기가, 약 120 Å 및 약 140 Å만큼 분리되어 동일한 또는 반대되는 단량체 상에서 에피토프에 각각 결합하는 것이 필요할 것이며, 이는 IgG에 의해 달성될 수 있는 것보다 훨씬 더 멀다. 이중과라토프성 TB19/TB38 항체는 단일 CD73 이량체에 2가 방식으로 결합할 수 없을 가능성이 있다는 결론이 나왔다.

도면

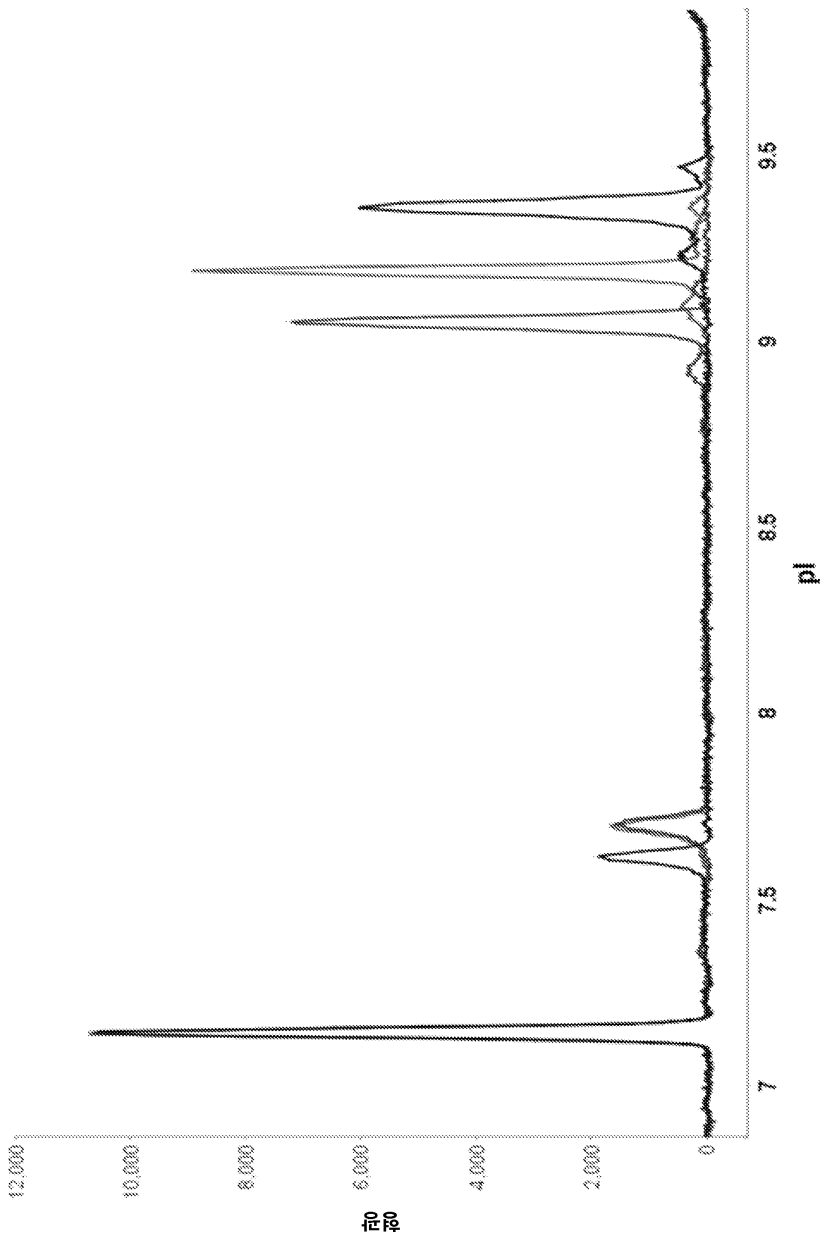
도면1



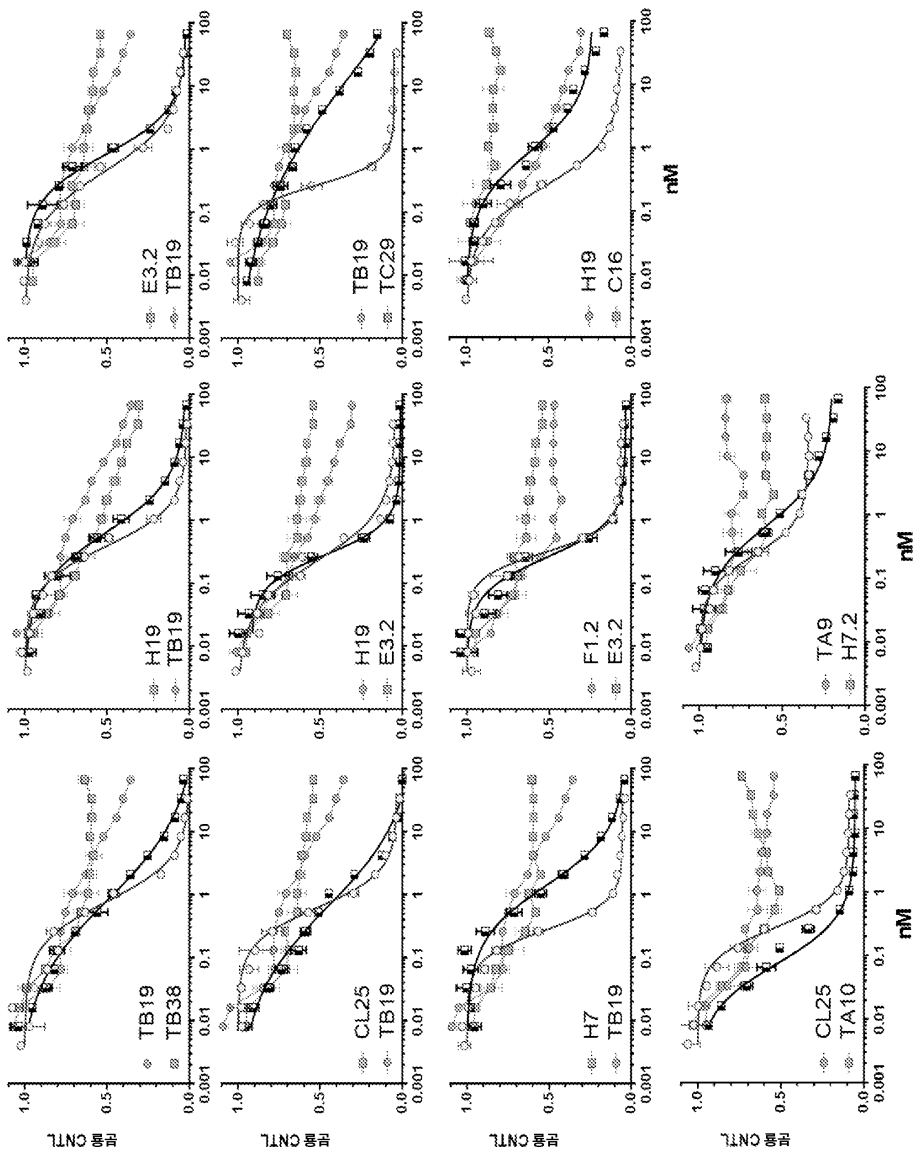
도면2



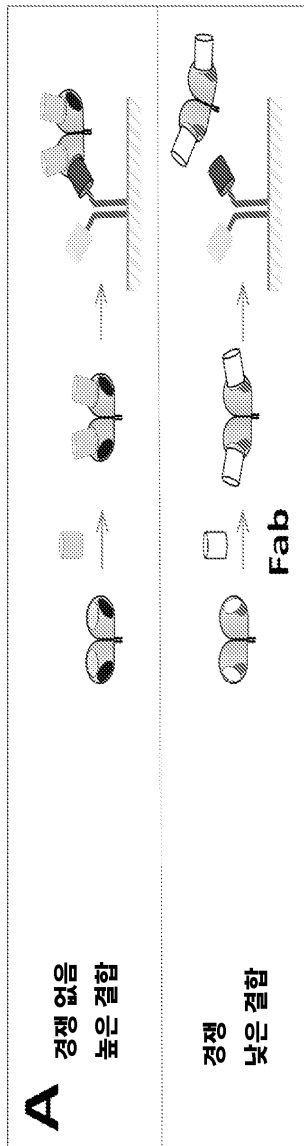
도면3



도면4



도면5a



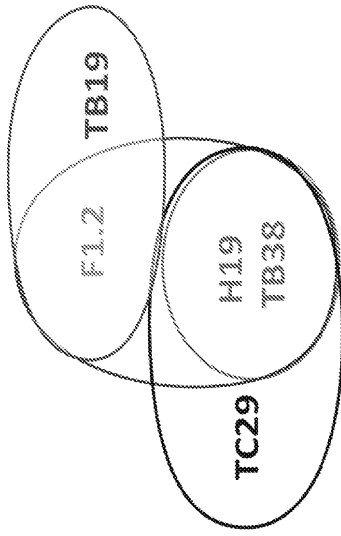
도면5b

B

용액 중 CD73 Fab					
	TB19	F1.2	TB38	H19	TC29
TB19	0.10	0.03	0.80	0.60	1.18
F1.2	0.57	0.04	0.13	0.42	0.93
TB38	0.42	0.04	0.02	0.10	0.02
H19	0.72	0.05	0.12	0.29	0.04
TC29	0.62	0.37	0.12	0.23	0.02

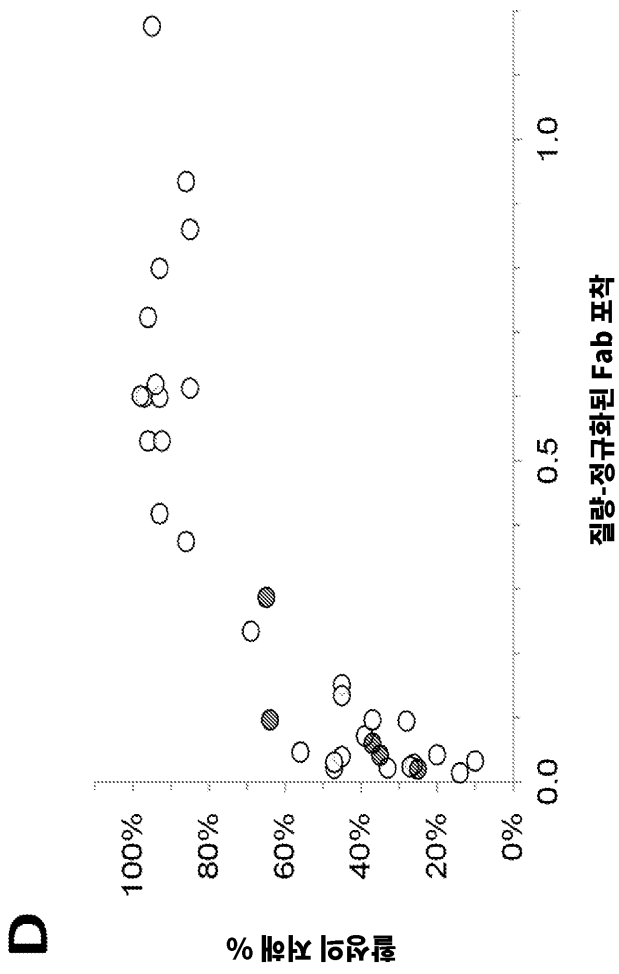
지지체 상 mAb

도면5c

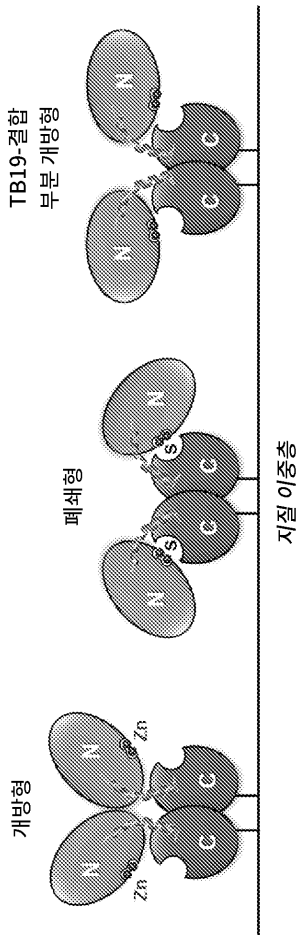


C

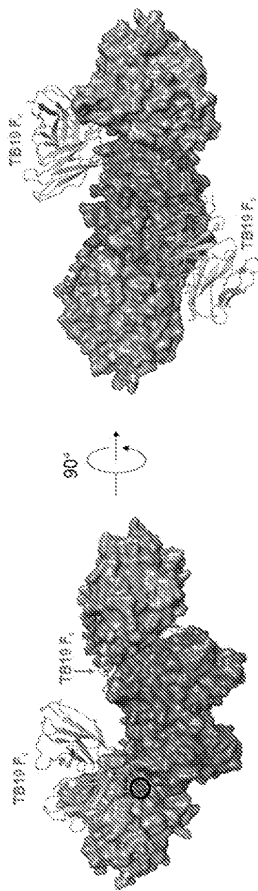
도면5d



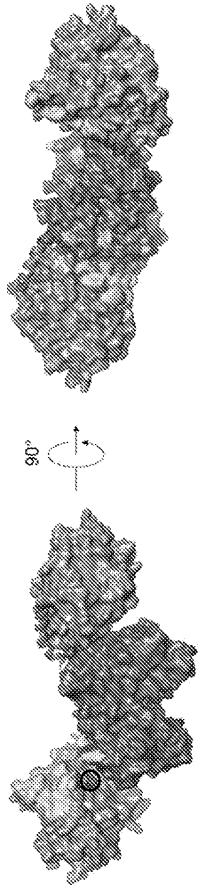
도면6a



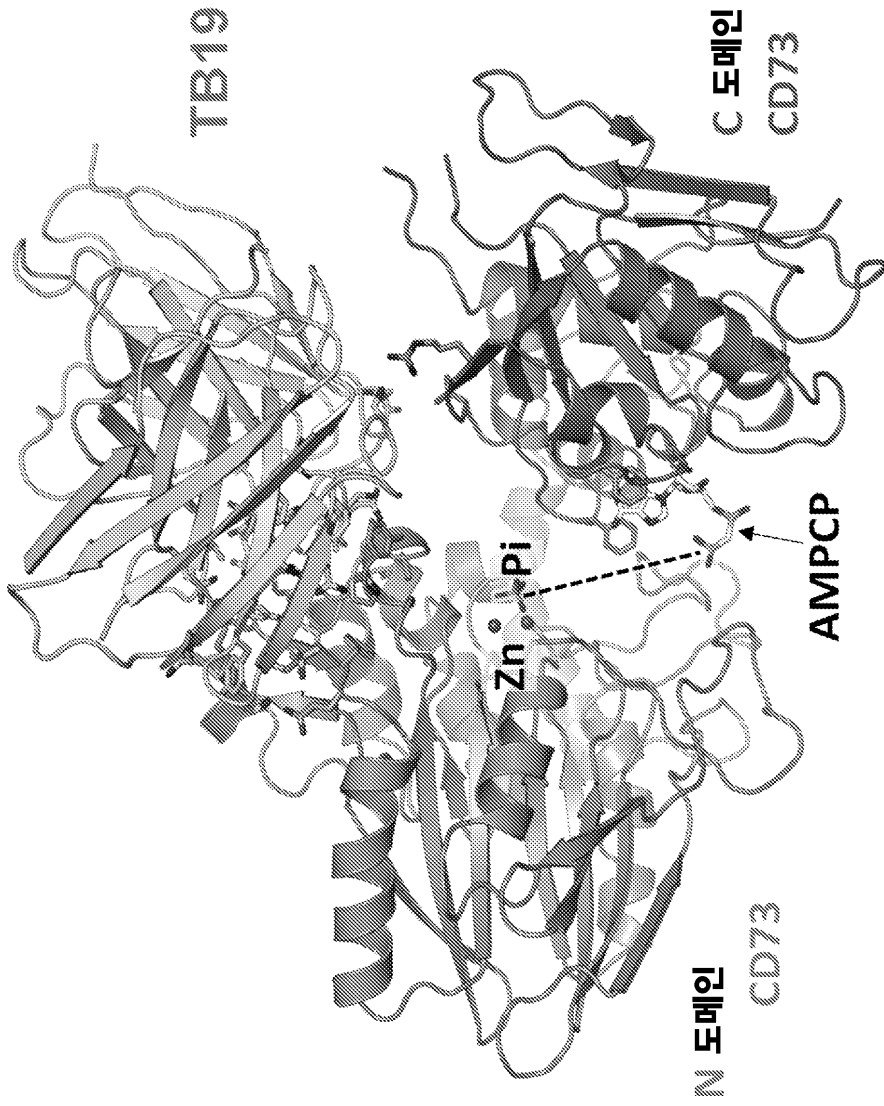
도면6b



도면6c



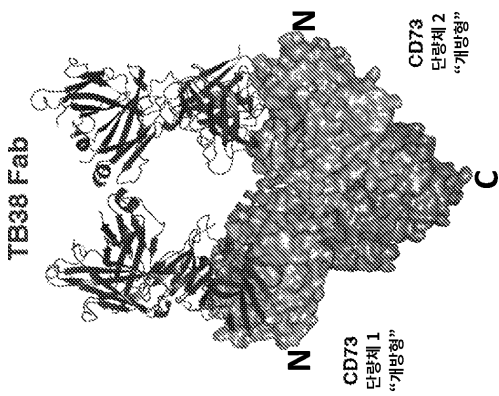
도면7a



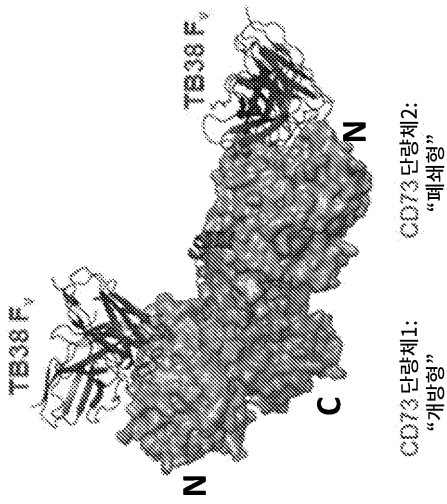
도면7b



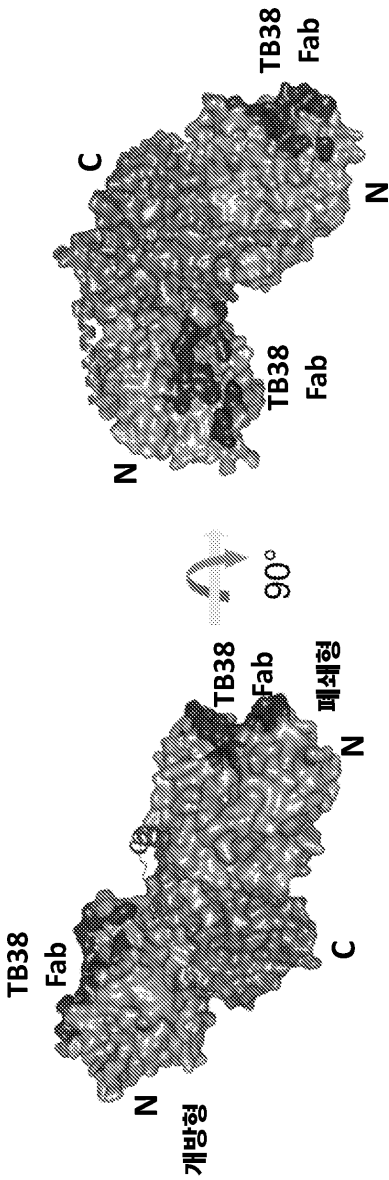
도면8a



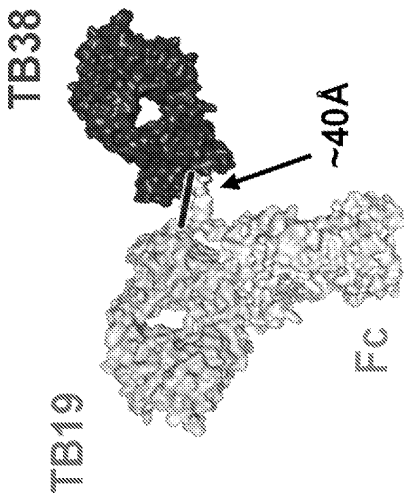
도면8b



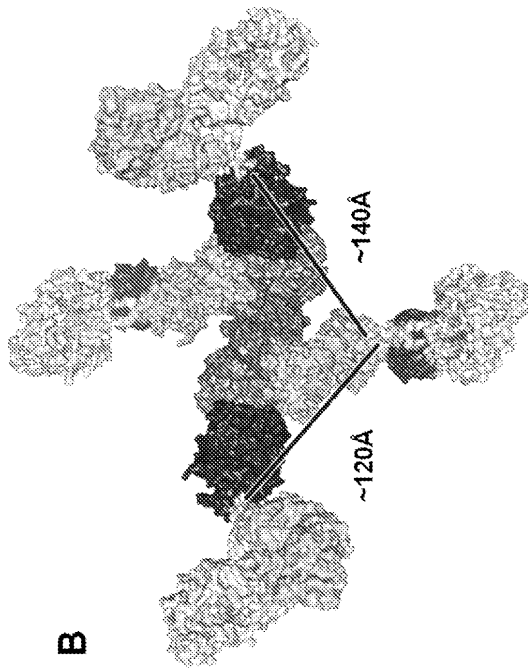
도면8c



도면9a

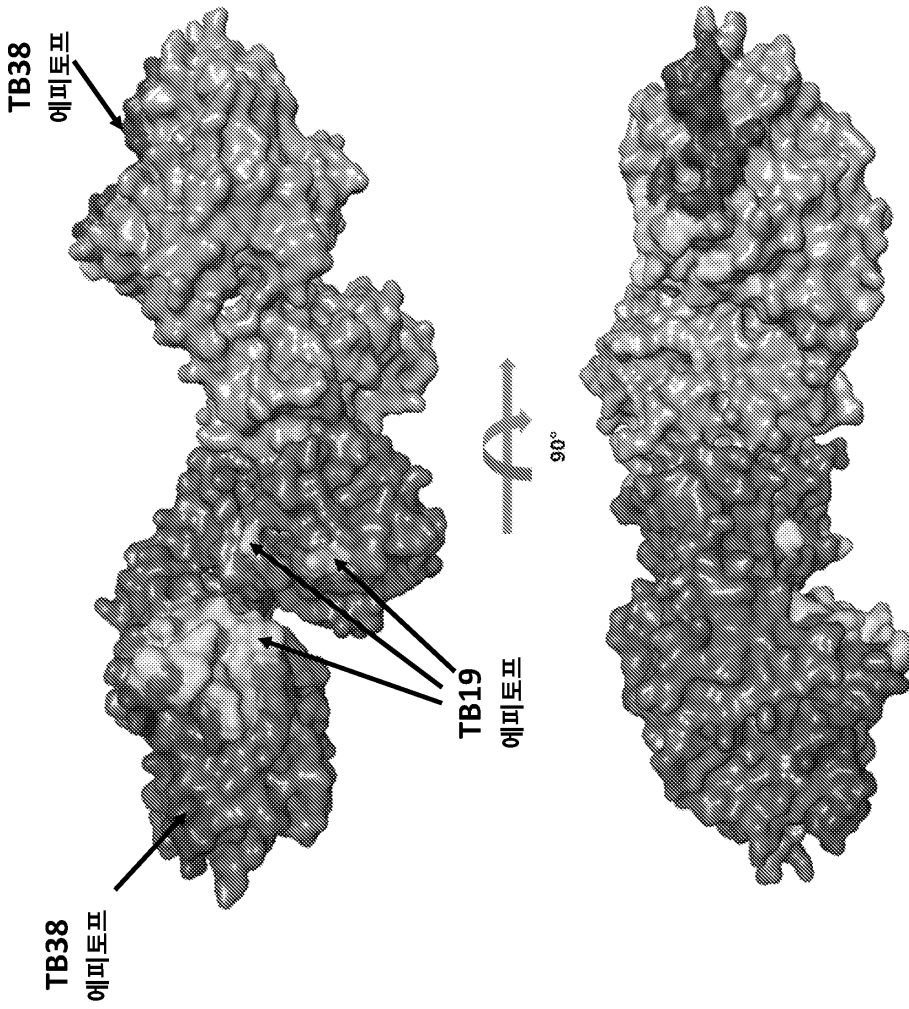


도면9b

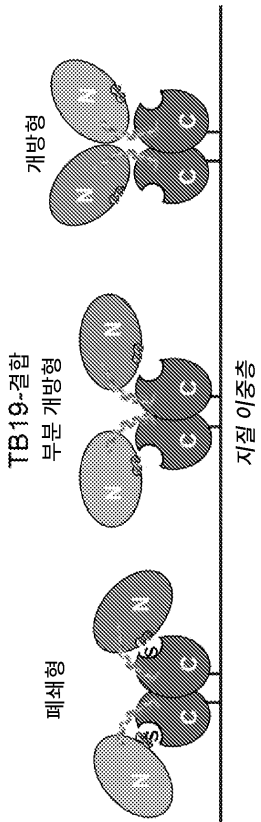


B

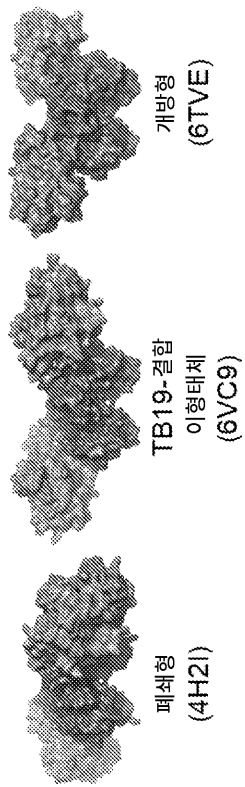
도면10



도면11a



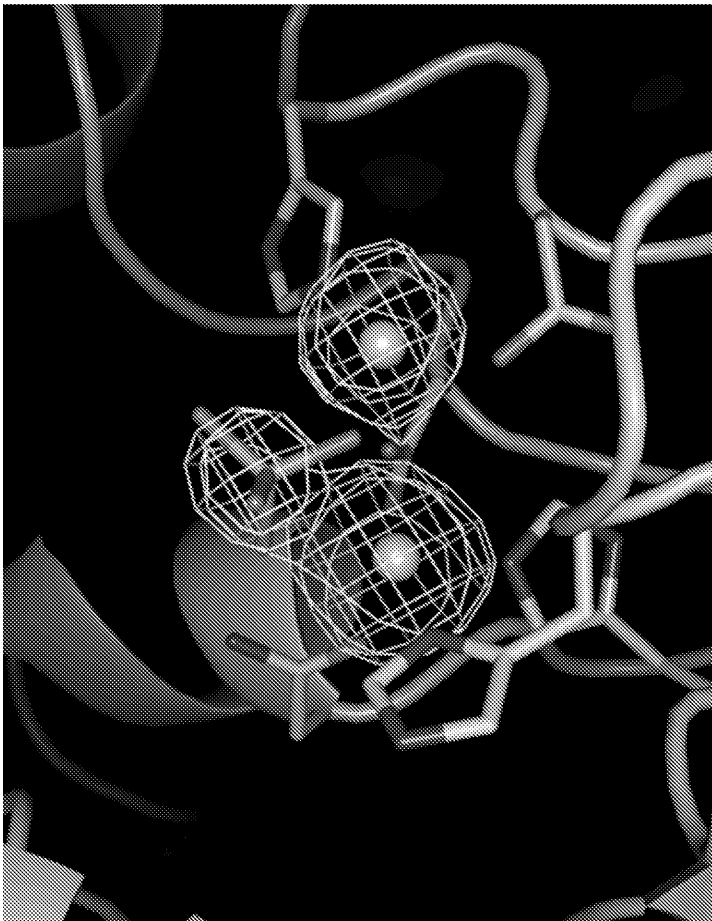
도면11b



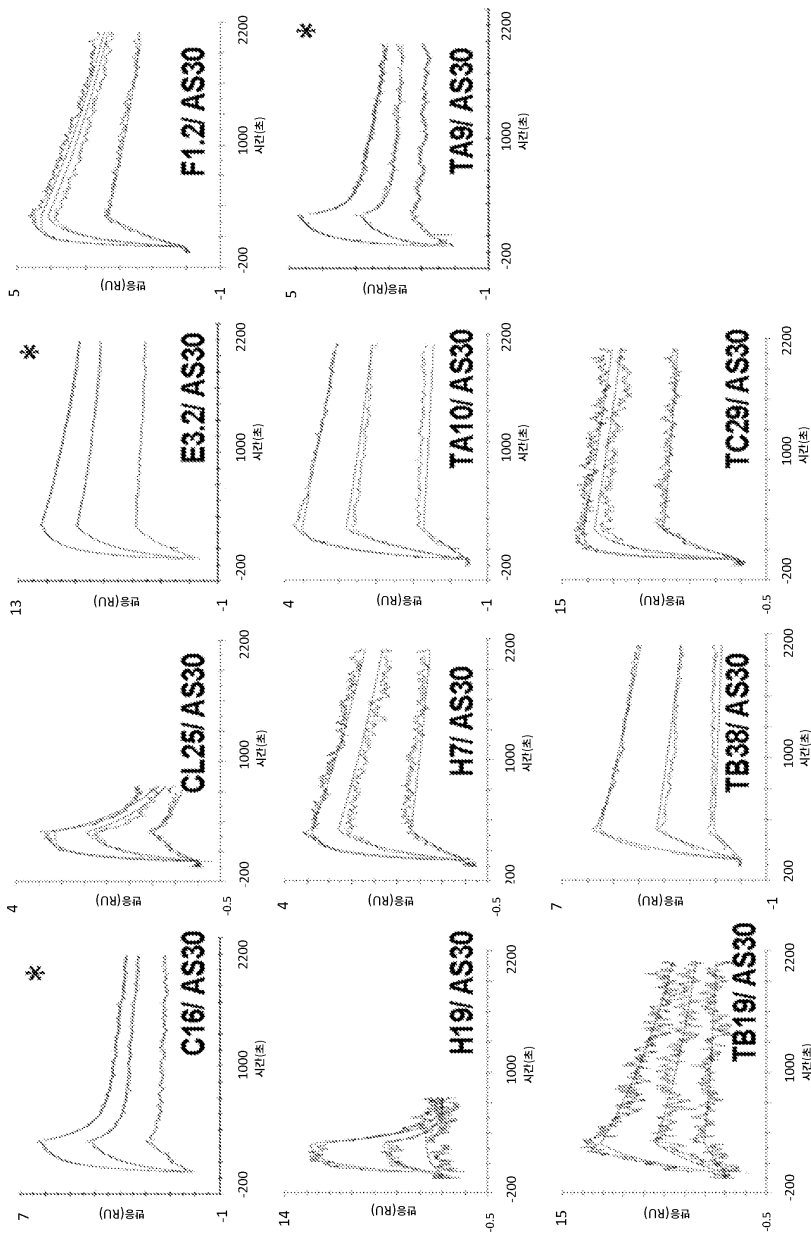
도면11c



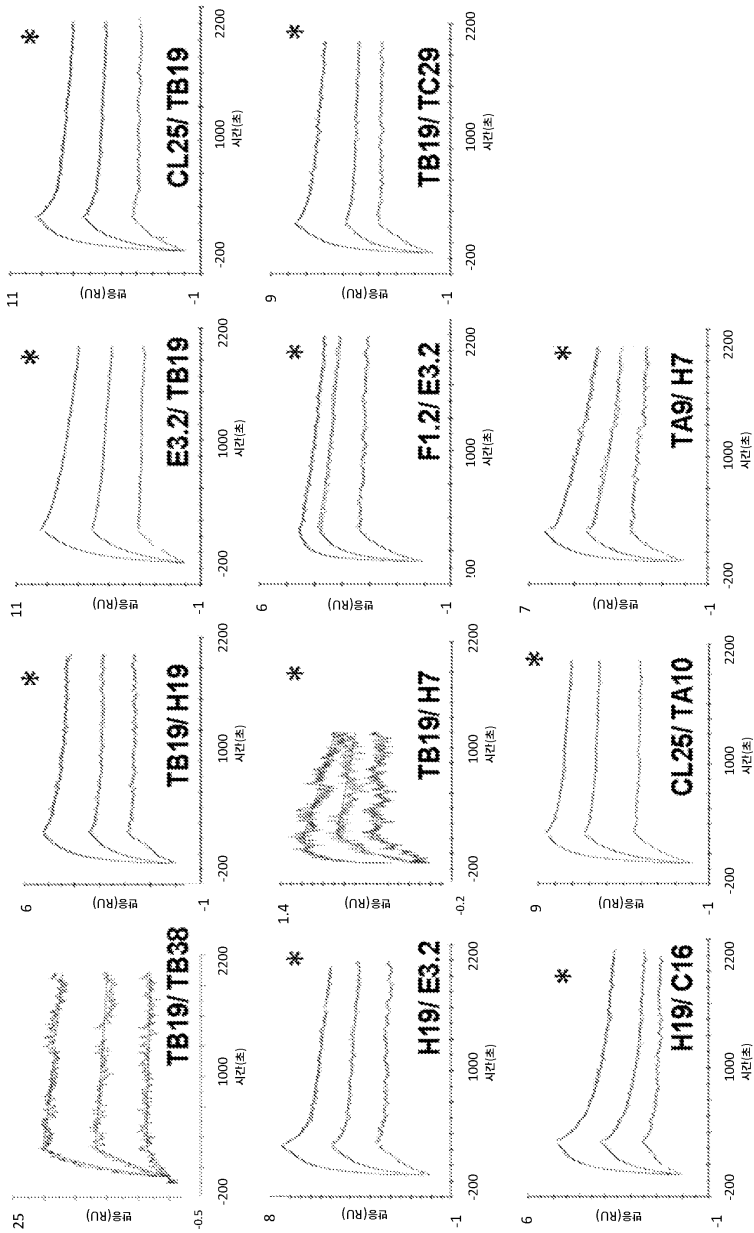
도면12



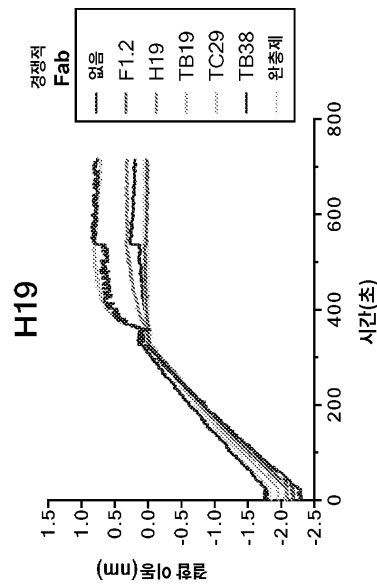
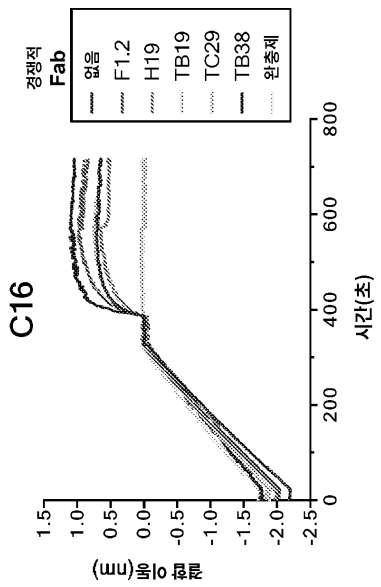
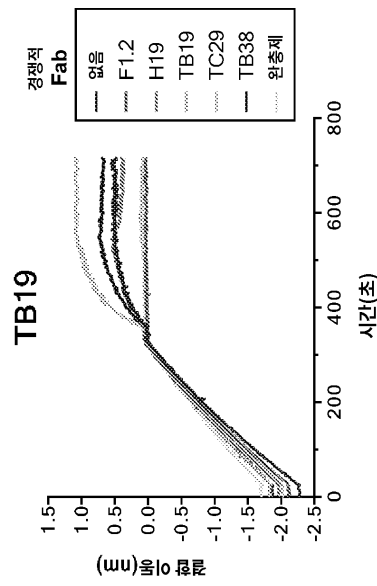
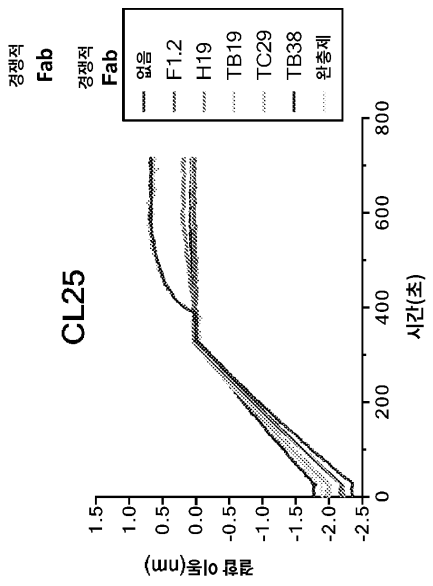
도면13a



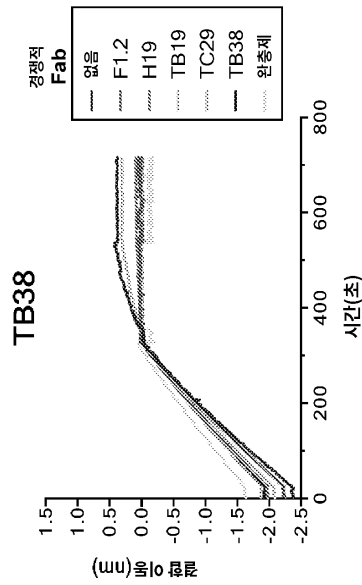
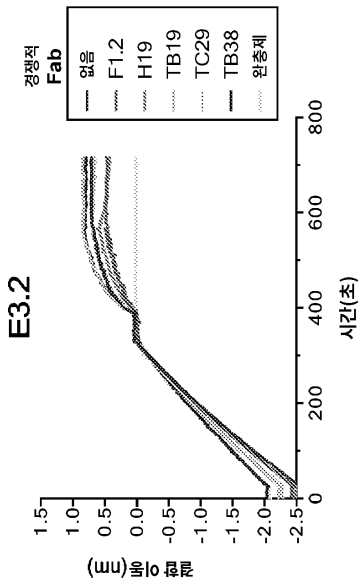
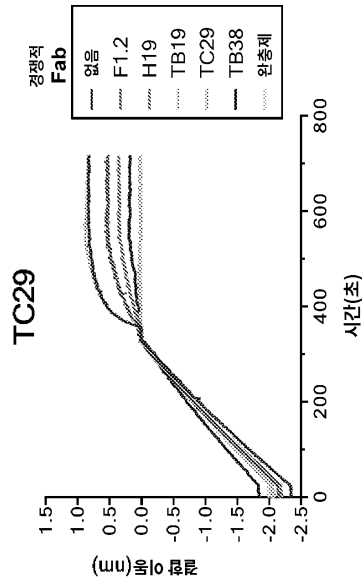
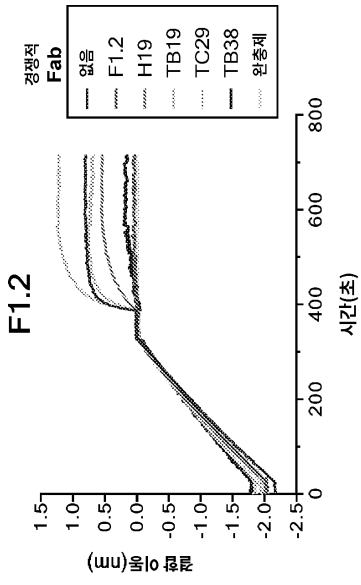
도면13b



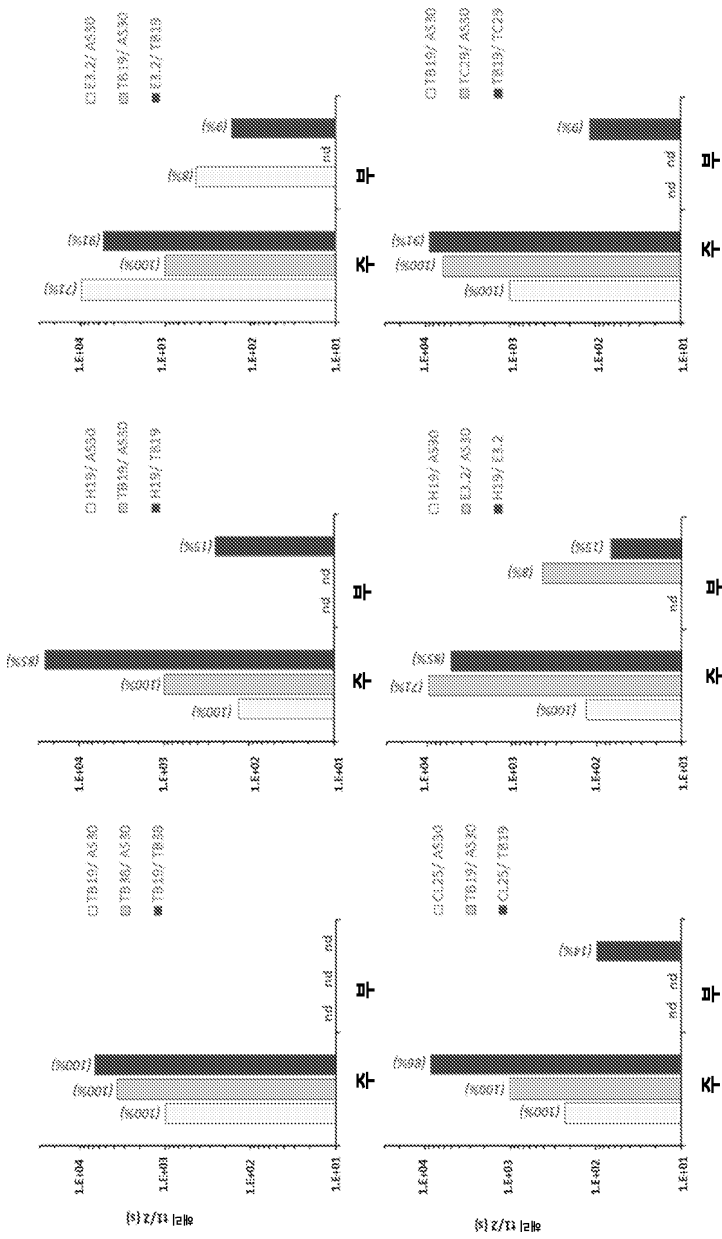
도면14a



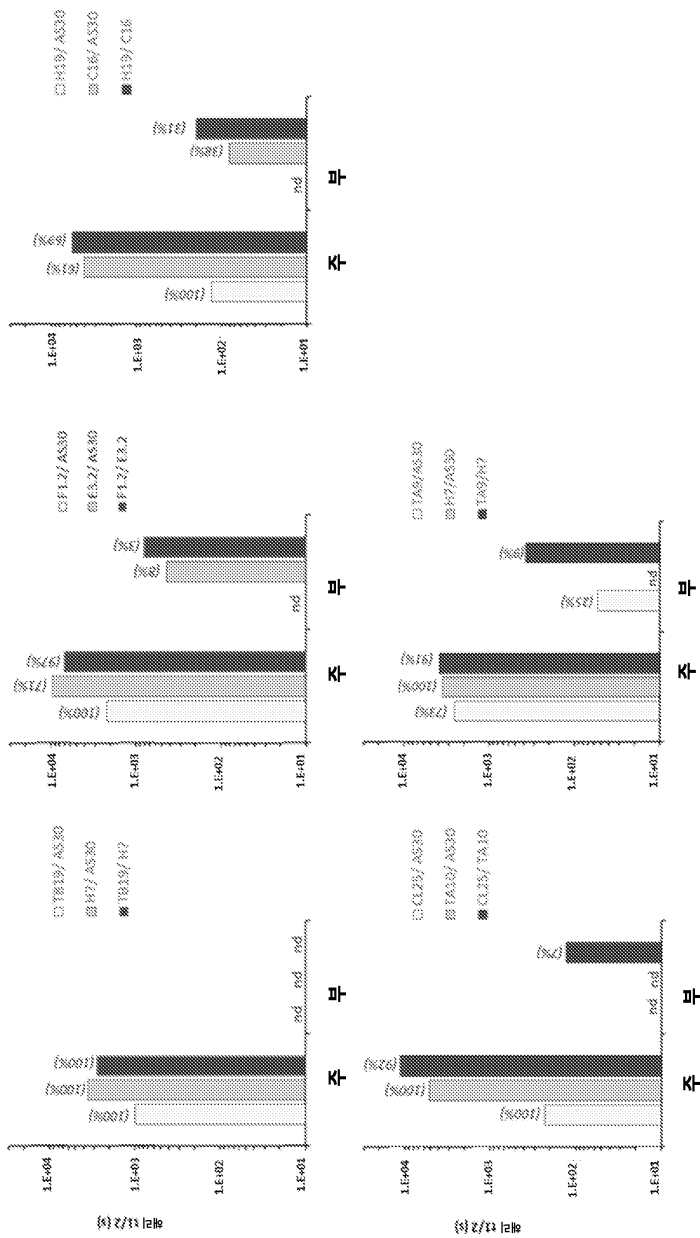
도면14b



도면15a



도면15b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENZYME CORPORATION

<120> BIPARATOPIC CD73 ANTIBODIES

<130> SA9-282PC: 711174

<150> 62/936,119

<151> 2019-11-15

<150> 63/023,542

<151> 2020-05-12

<150> 63/086,982

<151> 2020-10-02

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 1

Gly Gly Ser Ile Arg Asn Asn Tyr

1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 2

Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Thr

1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 3

Ala Arg Glu His Tyr Val Ser Gly Thr Ser Leu Asp Asn

1 5 10

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 4

Gln Ser Val Asn Thr Asn Tyr

1 5

<210> 5

<211

> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 5

Gly Thr Ser

1

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 6

Gln Gln Asp Tyr Asn Leu Pro Tyr Thr

1

5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1

5

<210> 8

<211> 8

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 8

Phe Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1

5

<210> 9

<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Polypeptide sequence
<400> 9
Ala Arg Ala Pro Asn Trp Asp Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Polypeptide sequence
<400> 10
Ser Gly Ser Val Ser Thr Ser Tyr Tyr

1 5
<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Polypeptide sequence
<400> 11
Ser Thr Asn

1
<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Polypeptide sequence
<400> 12
Val Leu Phe Met Gly Ser Gly Ile Trp Val
1 5 10

<210> 13
<211> 119
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 13

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

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Asn Asn

 20 25 30
 Tyr Tyr Asn Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys

 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Met Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

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

 85 90 95
 Arg Glu His Tyr Val Ser Gly Thr Ser Leu Asp Asn Trp Gly Gln Gly

 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 14

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

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Thr Asn

 20 25 30
 Tyr Phe Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Thr Pro Arg Leu Leu

 35 40 45
 Ile Tyr Gly Thr Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 16

Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Leu Ser Ser Gly Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

Tyr Tyr Pro Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

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

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

<210> 17

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 17

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Asn Asn
 20 25 30

Tyr Tyr Asn Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Met Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 19

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Phe Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Thr Pro Arg Leu Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

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

<210> 21

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 21

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Phe Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

<210> 23
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Polypeptide sequence
 <400> 23

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

Glu Pro Asn Val Leu Leu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr
 50 55 60
 Ile Trp Phe Thr Val Tyr Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn
 65 70 75 80
 Ala Leu Arg Tyr Asp Ala Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn
 85 90 95
 Gly Val Glu Gly Leu Ile Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro
 100 105 110
 Ile Leu Ser Ala Asn Ile Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile
 115 120 125
 Ser Gly Leu Tyr Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val
 130 135 140
 Val Gly Ile Val Gly Tyr Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn
 145 150 155 160
 Pro Gly Thr Asn Leu Val Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro
 165 170 175
 Glu Val Asp Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu
 180 185 190
 Gly His Ser Gly Phe Glu Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg
 195 200 205
 Gly Val Asp Val Val Val Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr
 210 215 220
 Gly Asn Pro Pro Ser Lys Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile
 225 230 235 240
 Val Thr Ser Asp Asp Gly Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala
 245 250 255
 Phe Gly Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly
 260 265 270
 Asn Val Ile Ser Ser His Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile
 275 280 285
 Pro Glu Asp Pro Ser Ile Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys

290 295 300
 Leu Asp Asn Tyr Ser Thr Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu
 305 310 315 320
 Asp Gly Ser Ser Gln Ser Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn
 325 330 335
 Leu Ile Cys Asp Ala Met Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Thr Asp Glu

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

 405 410 415
 Gly Gln Ser Thr Gly Glu Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val
 420 425 430
 Tyr Asp Leu Ser Arg Lys Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val
 435 440 445
 Leu Cys Thr Lys Cys Arg Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp
 450 455 460
 Glu Val Tyr Lys Val Ile Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp

 465 470 475 480
 Gly Phe Gln Met Ile Lys Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp
 485 490 495
 Gln Asp Ile Asn Val Val Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile
 500 505 510
 Tyr Pro Ala Val Glu Gly Arg Ile Lys Phe Ser
 515 520

<210> 24

<211> 523

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Polypeptide sequence

<400> 24

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

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

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

Gly His Ser Gly Phe Glu Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg
 195 200 205
 Gly Val Asp Val Val Val Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr
 210 215 220

Gly Asn Pro Pro Ser Lys Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile
 225 230 235 240

Val Thr Ser Asp Asp Gly Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala
 245 250 255

Phe Gly Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly
 260 265 270

Asn Val Ile Ser Ser His Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile
 275 280 285

Pro Glu Asp Pro Ser Ile Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys
 290 295 300

Leu Asp Asn Tyr Ser Thr Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu
 305 310 315 320

Asp Gly Ser Ser Gln Ser Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn
 325 330 335

Leu Ile Cys Asp Ala Met Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Thr Asp Glu
 340 345 350

Met Phe Trp Asn His Val Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile
 355 360 365

Arg Ser Pro Ile Asp Glu Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn
 370 375 380

Leu Ala Ala Val Leu Pro Phe Gly Gly Thr Phe Asp Leu Val Gln Leu
 385 390 395 400

Lys Gly Ser Thr Leu Lys Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr
 405 410 415

Gly Gln Ser Thr Gly Glu Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val
 420 425 430

Tyr Asp Leu Ser Arg Lys Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val
 435 440 445

Leu Cys Thr Lys Cys Arg Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp
 450 455 460

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

