(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월14일
(11) 등록번호 10-2781619
(24) 등록일자 2025년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/337* (2006.01)
A61K 33/243 (2019.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 31/337 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7013452
(22) 출원일자(국제) 2018년11월15일
심사청구일자 2021년08월03일
(85) 번역문제출일자 2020년05월11일
(65) 공개번호 10-2020-0088811
(43) 공개일자 2020년07월23일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/081364
(87) 국제공개번호 WO 2019/096900
국제공개일자 2019년05월23일
(30) 우선권주장
62/586,224 2017년11월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2016073845 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이나뜨 파르마 에스.에이.
프랑스 에프-13009 마르세유 아베뉘 드 루미니 117
오레가 바이오테크 에스에이에스
프랑스 69130 에뀔리 슈맹 뒤 사뀌앵 15 레스빠스 유로펜 바띠멍 지
(72) 발명자
샹뙤 스테빠니
프랑스 13009 마르세유 아브뉘 장 드 라뜨르 드 따시니 430 레지덩스 발몽 르동 바띠멍 레 로리에르
구르댕 니꼴라
프랑스 13008 마르세유 트라베르스 푸리에르 51 레지덩스 레 알리제 바띠멍 에이 아파트먼트 에이13
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

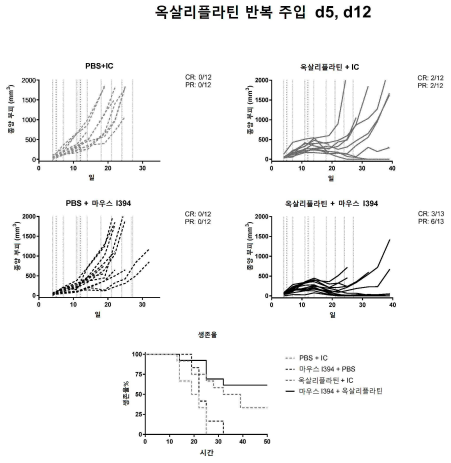
전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 **암의 치료를 위한 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 결합 및 저해하는 항체**

(57) 요 약

본 발명은 암의 치료에서 가용성 인간 CD39 의 효소 활성을 저해하는 화합물을 사용하여, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하고/하거나 종양 세포의 사망을 유도하는 작용제 또는 처치의 활성을 강화시키는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도13



(52) CPC특허분류
A61K 33/243 (2022.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2896 (2013.01)
C07K 16/40 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
C07K 2317/33 (2013.01)

(72) 발명자
파뛰렐 까린
프랑스 69280 마르시 레뚜알 알레 뒤 부아 411
페로 이반
프랑스 13260 까시스 앵빠스 데 브라예 레지덩스 레 브라예 바띠멍 라 샤꼰
로시 벤자맹
프랑스 13008 마르세유 아브뉘 다이파 70 레지덩스 라 팔메레 바띠멍 씨

(30) 우선권주장
62/686,149 2018년06월18일 미국(US)
62/733,175 2018년09월19일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

암을 치료하는데 사용하기 위한, 인간 CD39 (NTPDase1) 단백질의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있는 항체로서, 백금제와의 조합으로 투여되고,

SEQ ID NO: 5 에 제시된 HCDR1; SEQ ID NO: 6 에 제시된 HCDR2; SEQ ID NO: 7 에 제시된 HCDR3; SEQ ID NO: 8 에 제시된 LCDR1; SEQ ID NO: 9 에 제시된 LCDR2; 및 SEQ ID NO: 10 에 제시된 LCDR3 을 포함하는 항체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 백금제는 옥살리플라틴인 항체.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 백금제는 CD39 의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있는 항체의 투여 후 1 내지 48 시간에 투여되는 항체.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 암은 난소암인 항체.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 암은 위암 또는 식도암인 항체.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 암은 폐암인 항체.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 암은 대장암인 항체.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 암은 두경부암인 항체.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 암은 백금-저항성 암인 항체.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, CD39 의 ATPase 활성을 중화시키는 항체는 인간 CD16, CD32a, CD32b, 및 CD64 폴리펩티드로부터 선택되는 하나 이상에 대한 결합을 실질적으로 결여하는 항체.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 백금제는 백금제를 포함하는 조합 섭생법으로 투여되고, 백금제를 포함하는 조합 섭생법은 폴린산, 5-Fu 및 옥살리플라틴을 포함하는 항체.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원의 상호 참조**

[0002] 이 출원은 2017년 11월 15 일에 출원된 미국 가출원 No. 62/586,224, 2018년 6월 18일에 출원된 US 62/686,149 및 2018년 9월 19일에 출원된 US 62/733,175 의 우선권을 주장한다; 이들 문헌 모두 임의의 도면을 포함하여 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **서열 목록에 대한 언급**

[0004] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록은 크기 64 KB 의, 2018년 11월 14일 생성된, 파일명 "CD39-7_ST25" 의 파일로서 제공된다. 서열 목록의 전자 형식의 정보는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0005] **발명의 기술분야**

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

배 경 기 술

[0007] NTPDase 1 (엑토뉴클레오시드 트리포스페이트 디포스포히드롤라제 1) 은, CD39/ENTPD1 또는 혈관 CD39 로서도 알려져 있으며, 또다른 효소, CD73 (엑토-5'-뉴클레오티다제) 과 함께 기능하여, 세포외 아데노신 트리포스페이트 (ATP) 및 아데노신 디포스페이트 (ADP) 를 가수분해하여 아데노신을 생성하며, 아데노신은 아데노신 수용체에 결합하여 T-세포 및 자연 살해 (NK)-세포 응답을 저해하여, 면역계를 억제한다. CD73/CD39 경로를 통한 아데노신의 생성은 조절성 T 세포 (Treg) 면역억제 기능의 주요 메카니즘으로서 인식된다. CD39 는 N-말단부 및 C-말단부 근처에 2개의 경막 도메인, 짧은 세포질 N- 및 C-말단 분절, 및 활성 자리를 함유하는 큰 세포외 도메인을 갖는다. 그러나, CD39 는 전형적으로 분자의 2개의 단부에서 2개의 경막 도메인에 의해 막에 앵커링되지만, 최근에 또한 가용성 촉매 활성 형태의 CD39 가 인간 및 마우스의 순환계에 존재할 수 있다는 것이 보고된 바 있다 (Yegutkin et al., (2012) FASEB J. 26(9): 3875-3883).

[0008] 방사선요법 및 일부 화학치료제는 특이적 면역 응답을 유도하여 면역원성 암 세포 사망을 초래하는 것으로 밝혀졌다 (Martins et al. 2009 Cell Cycle 8(22): 3723-3728). 그러한 치료에 의해 유도되는 항-종양 면역 응답은 죽어 가는 암 세포로부터의 항원을 제시하고 종양-특이적 세포독성 T 림프구 (CTL) 를 프라이밍하는 수지상 세포 (DC) 의 능력에 따라 좌우된다. CTL 응답을 서서히 증가시키기 위해서, DC 는 스트레스 받은 또는 죽어 가는 세포로부터의 항원을 통합시키고, 성숙 단계에서 항원 가공의 능력을 획득하고, 특정 CTL 의 분화/활성화를 자극하는 사이토카인 및 동시자극성 신호의 맥락에서 MHC 분자에 결합된 항원성 펩티드를 제시할 것이다.

[0009] 그러나, 방사선요법 및 화학치료제를 포함하는, 암 세포를 제거하도록 디자인된 현재의 요법의 효능을 개선할 필요가 남아 있다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은, 특히, 유의한 농도의 ATP 의 존재 하에 CD39 단백질의 ATPase 활성을 중화시키는 항체는 외인성으로 첨가된 ATP 의 존재 하에 수지상 세포 (DC) 에서 CD39 의 면역억제 효과를 역전시킬 수 있다는 발견으로부터 비롯된다. 항체는 게다가 DC 와 공배양된 T 세포의 증식을 유도 또는 증가시킬 수 있다. DC 활성화의 CD39-매개되는 저해를 감소시키는 능력은 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치, 특히 면역원성 암 세포 사망을 유도하는 작용제 또는 처치, 예를 들어, 종양 세포의 사망을 유도하는 작용제 또는 처치 (특히, 화학치료제, 방사선요법) 와의 조합으로의 항체의 유리한 사용을 제공한다. ATP 방출은 면역원성이 되고 DC 활성화를 촉진할 잠재성을 갖지만, 그것은 또한 CD39 에 의한 이화작용에 적용될 수 있으며,

결국 세포외 ATP 의 면역원성 효과를 억제한다. 게다가, 화학요법 동안 증가된 수준의 ATP 는 DC 상에서의 CD39 의 더 높은 발현과 연관된다. ATP-풍부한 종양 미세환경 내에서, 침윤성 DC 는 CD39 발현을 조정함으로써 ATP 붕괴에 기여할 수 있으며, 결국 화학요법-유도되는 면역원성 종양 세포 사망을 감소시킨다. 항-CD39 항체와의 조합된 사용은 따라서 종양 세포의 사망 (예를 들어, 세포자멸사 또는 괴사) 을 유도하는 작용제 또는 처치의 면역원성 효과의 강화를 허용한다.

[0011] 따라서, 하나의 양태에서 본 발명은 종양 세포의 사망을 유도하는 작용제 또는 처치, 예를 들어, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제 또는 처치, 면역원성 암 세포 사망을 유도하는 작용제 또는 처치와의 조합으로, ATP 의 존재 하에 CD39 를 결합 및 중화시키는 항체의 사용을 통해, 항-종양 면역 응답을 증강시키는 개선된 방법을 제공한다. 하나의 양태에서 본 발명은 종양 세포의 사망을 유도하기 위한 수단, 예를 들어, 세포자멸사 및/또는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하기 위한 수단과의 조합으로, ATP 의 존재 하에 CD39 를 결합 및 중화시킬 수 있는 항체의 사용을 통해, 항-종양 면역 응답을 증강시키는 개선된 방법을 제공한다. 하나의 실시형태에서, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제 또는 처치 (또는 수단) 는 안트라사이클린, 옥살리플라틴, 시스플라틴, X-선, PARP 저해인자, 탁산, 안트라사이클린, DNA 손상제, 캄프토테신, 에포틸론, 마이토마이신, 콤브레타스타틴, 빈카 알칼로이드, 질소 머스타드, 메이탄시노이드, 칼리케아마이신, 듀오카르마이신, 튜불라이신, 돌라스타틴, 아우리스타틴, 에네디인, 아마톡신, 피롤로벤조디아제핀, 에틸렌이민, 방사선동위원소, 치료적 단백질 또는 펩티드 독소, 또는 종양 세포에 의해 발현되는 항원에 결합하고 ADCC 을 매개하는 항체를 포함한다. 하나의 실시형태에서, CD39 를 결합 및 중화시킬 수 있는 항체는 가용성 세포외 도메인 CD39 단백질 (sCD39) 및 막-결합된 CD39 단백질 (memCD39) 둘 모두의 활성을 중화시킬 수 있다. 본원에서 보여지는 바와 같이, 외인성으로 첨가된 ATP 의 존재 하에 수지상 세포 (DC) 에서 CD39 의 면역억제 효과를 역전시킬 수 있는 항체는 또한 가용성 세포외 도메인 CD39 단백질 (sCD39) 및 막-결합된 CD39 단백질 (memCD39) 둘 모두의 활성을 중화시킬 수 있는 것을 특징으로 한다. 특히, 외인성으로 ATP 의 존재 하에 수지상 세포 (DC) 에서 CD39 의 면역억제 효과를 역전시킬 수 없는 항체 BY40 는 또한 가용성 세포외 도메인 CD39 단백질 (sCD39) 의 ATPase 활성을 중화시킬 수 없고, 막-결합된 CD39 단백질 (memCD39) ATPase 활성의 더 낮은 최대 저해를 갖는다.

[0012] 이론에 국한되고 싶지 않지만, 세포 표면에서 막-결합된 CD39 를 중화시키는 항체는 막-결합된 CD39 (memCD39) 의 도메인 움직임을 저해함으로써 작용하지만, 가용성 CD39 단백질 (sCD39) 의 활성에는 유사하게 영향을 미치지 않는 것으로 여겨진다. memCD39 는 동종-다합체 (예를 들어, 단량체 형태 이외에, 사합체 및/또는 기타 다합체) 로서 존재하지만, sCD39 는 단량체이고, 더욱이 memCD39 의 경막 도메인은 활성 자리와의 기능적 관계의 기저를 이루는 동적 움직임을 겪는다는 것이 보고되었다 (Schulte am Esch et al. 1999 Biochem. 38(8):2248-58). 오직 memCD39 를 차단하는 항체는 효소 활성 자리의 외부에서 CD39 를 인지하고 다합체화를 방지하면서도 CD39 의 단량체 형태를 차단하지 않을 수 있다. 다합체화의 차단은 효소 활성을 감소시킬 수 있고, CD39 다합체화가 ATPase 활성을 실질적으로 증대시킨다는 것이 보고된 바 있다. 이와 대조적으로, sCD39 를 또한 차단하는 항체는 CD39 기질을 방해할 수 있고 효소의 단량체 형태를 저해할 수 있다. 이러한 항체는 또한 memCD39 의 다합체화를 방지할 수 있으며, 그에 따라 CD39 효소 활성의 저해의 제 2 메카니즘을 제공한다. ATP 의 존재 하에 (예를 들어, 종양 환경에서와 같이), sCD39 의 차단 없이 다합체화의 방지에 의한 CD39 의 부분적 저해는 DC 의 활성화에 대한 임의의 검출가능한 상가 효과를 방지하기에 충분한 잔여 AMP 를 초래할 수 있다. 결과적으로, 단량체성 및/또는 가용성 CD39 (예를 들어, 단량체성 sCD39) 의 ATPase 활성을 결합 및 저해하는 항체는 막-결합된 및 가용성 CD39 단백질 (용액 중 세포외 도메인 단백질) 둘 모두를 중화시킴으로써 개체에서 CD39 활성의 더 큰 중화를 달성하는데 유리하게 사용될 수 있다.

[0013] 하나의 양태에서, 본원에서 제공되는 것은 암의 치료에서 사용하기 위한, CD39 에 결합하고 인간 CD39 단백질의 효소적 (ATPase 활성) 활성을 저해하는 작용제이며, 여기에서 CD39 에 결합하는 작용제는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제, 임의로 종양 세포의 사망을 유도하는, 임의로 세포자멸사 및/또는 괴사를 유도하는 작용제와의 조합으로 투여된다. 또다른 양태에서, 본원에서 제공되는 것은 암의 치료에서 사용하기 위한, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제, 임의로 종양 세포의 사망을 유도하는, 임의로 세포자멸사 및/또는 괴사를 유도하는, 작용제이며, 여기에서 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제는 CD39 에 결합하고 인간 CD39 단백질의 효소적 (ATPase 활성) 활성을 저해하는 작용제와의 조합으로 투여된다.

[0014] 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 개체에서 암을 치료 또는 예방하는 방법이며, 방법은 개체에게 하기를 투여하는 것을 포함한다: (a) CD39 단백질의 ATPase 활성을 결합 및 저해하는 작용제, 및 (b) 종양 세포로부터

ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제.

[0015] 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 외인성으로 첨가된 ATP 의 존재 하에 CD39 의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있는 항체의 항-종양 효과를 강화하는 방법이며, 방법은 개체에게 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하고/하거나 종양 세포의 사망을 유도하는 작용제 또는 처치를 투여하는 것을 포함한다.

[0016] 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하고/하거나 종양 세포의 사망을 유도하는 작용제 또는 처치를 이용하는 치료에 대해 (항-CD39 항체를 이용하는 조합된 치료의 부재 하에) 불량한 응답, 또는 응답에 대한 예후를 갖는 개체에서 암을 치료하는 방법이며, 방법은 개체에게 외인성으로 첨가된 ATP 의 존재 하에 CD39 의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있는 항체를 투여하는 것을 포함한다.

[0017] 하나의 실시형태에서, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제는 종양 세포의 세포자멸사를 직접 유도한다. 하나의 실시형태에서, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제는 종양 세포의 괴사를 직접 유도한다. 하나의 실시형태에서, 작용제는 종양 세포의 사망을 직접 야기하는 세포독성제, 임의로 암의 치료에서 사용되는 화학치료제를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 작용제는 고갈성 항체를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 작용제는 종양 세포에 의해 발현되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 작용제는 종양 세포에 의해 발현되는 단백질에 특이적으로 결합하고 세포독성제에 접합되어 있지 않은 항체 (예를 들어, 네이키드 (naked) 항체) 를 포함한다. 임의로 항체는 종양 세포의 세포자멸사를 직접 유도할 수 있다.

[0018] 하나의 실시형태에서, CD39 에 결합하고 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 저해하는 작용제는 외인성으로 첨가된 ATP 의 존재 하에 CD39 의 ATPase 활성을 중화시킬 수 있다.

[0019] 하나의 실시형태에서, CD39 에 결합하고 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 저해하는 작용제는 가용성 세포외 도메인 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 중화시킬 수 있다. 임의로 작용제는 외인성으로 첨가된 ATP 의 존재 하에 가용성 세포외 도메인 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 중화시킬 수 있으며, 임의로 ATP 는 20 μM 의 농도로 첨가된다. 어세이는 예를 들어 본원의 실시예에서 보여지는 바와 같을 수 있으며, 예를 들어, 항-CD39 항체는 플레이트에서 가용성 재조합 인간 CD39 단백질과 함께 1h 동안 37℃ 에서 인큐베이션되고, 20 μM ATP 가 플레이트에 부가적 30 분 동안 37℃ 에서 첨가되고 그 후 CTG (Cell Titer Glo) 시약이 첨가되고, 암흑 속에서 5 min 의 짧은 인큐베이션 기간 후에 방출된 광은 Enspire™ 광도계를 사용하여 정량화된다.

[0020] 임의로, 항체는 용액 중 인간 세포외 도메인 CD39 단백질의 ATPase 활성의 감소를 50% 초과, 임의로 60%, 70%, 75% 또는 80% 초과 만큼 야기할 수 있다.

[0021] 하나의 실시형태에서, CD39 에 결합하는 작용제는, 임의로 추가로 인간에게의 항체의 투여와 상용성인 농도에서, 가용성 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성의 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80% 또는 90% 감소를 제공할 것이다 (예를 들어, 본원에 개시된 방법에 의해 평가됨).

[0022] 하나의 실시형태에서, CD39 에 결합하고 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 저해하는 작용제는 단핵구-유래 수지상 세포에서, 그러한 moDC 가 항체 및 ATP 와 함께 시험관내 (*in vitro*) 인큐베이션될 때, 활성화의 세포 표면 마커의 발현의 증가를 야기할 수 있으며, 임의로 외인성으로 첨가된 ATP 는 0.125 mM, 0.25 mM 또는 0.5 mM 로 제공된다.

[0023] 하나의 실시형태에서, CD39 에 결합하고 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 저해하는 작용제는 세포의 표면에서 인간 CD39 의 ATPase 활성을 결합 및 중화시킬 수 있다. 하나의 실시형태에서, 작용제는 ATP 의 존재 하에 수지상 세포의 활성화를 증가시킬 수 있다. 하나의 실시형태에서, 작용제는 단핵구-유래 수지상 세포에서, 그러한 moDC 가 항체 및 ATP 와 함께 시험관내 인큐베이션될 때, 활성화의 세포 표면 마커의 발현의 증가를 야기할 수 있다. 임의로, ATP 는 0.125 mM, 0.25 mM 또는 0.5 mM 로 제공되는 외인성으로 첨가된 ATP 이다.

임의로, 활성화의 세포 표면 마커의 발현의 증가는 moDC 를 ATP 의 존재 하에 24 시간 동안 인큐베이션하고 moDC 상의 CD80, CD83 및/또는 HLA-DR 의 세포 표면 발현을 유세포측정법에 의해 분석함으로써 평가된다. 임의로, 세포 표면 마커의 발현의 증가는 음성 대조군 (예를 들어, 배지) 과 비교하여 적어도 40%, 50%, 75% 또는 80% 이다.

[0024] 본원의 임의의 실시형태의 하나의 양태에서, CD39 단백질의 ATPase 활성을 저해 또는 중화시키는 작용제는 CD39 단백질에 결합하는 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, 단일특이적 항체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체) 이거나 또는 그것을 포함한다.

[0025] 작용제의 조합된 사용은 종양 미세환경에서 이용가능한 ATP 의 푸울을 증가시킴으로써 종양에 대한 적응성 면역 응답을 촉진시키는데 유용할 것이다. 이들 항체는 그러므로 DC 및/또는 T 세포의 활성에 대한 CD39 의 면역 억제 효과를 역전시키는데 유용할 것이다. 하나의 실시형태에서, 본 공개의 방법은 개체에서 항-종양 면역력을 증가 또는 증강시키거나, 면역억제를 감소키거나, 적응성 항-종양 면역 응답을 증강키거나, 또는 DC, T 세포, 종양-침윤성 및/또는 종양-특이적 T 세포의 활성을 활성화 및/또는 강화시키는데 유용하다.

[0026] 본원의 임의의 실시형태의 하나의 양태에서, sCD39 단백질은 막 결합된 CD39 에 존재하는 두 개의 경막 도메인 (즉, N- 및 C-말단 단부 근처의 경막 도메인) 을 결여하는 것을 특징으로 할 수 있다. 하나의 실시형태에서, sCD39 는 순환계에, 예를 들어, 인간 개체에 존재하는 비-막 결합된 sCD39 단백질이다. 하나의 실시형태에서, sCD39 는 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그것으로 이루어지며 (임의로 추가로 C-말단 태그 또는 또다른 비-CD39-유래 아미노산 서열을 포함함), 예를 들어 본원의 실시예에서 생산되는 바와 같은 sCD39 단백질이다. 하나의 실시형태에서, 단백질, 항체 또는 항체 단편은, 예를 들어, 본원에 개시된 방법에 따라 용액 중 sCD39 와 함께 인큐베이션될 때, sCD39 의 ATPase 활성을 저해 또는 중화시킨다. 하나의 실시형태에서, 단백질, 항체 또는 항체 단편은 인간 CD39 단백질의 가용성 형태 (세포외 도메인 단백질) 및 막-결합된 형태 둘 모두에 특이적으로 결합한다.

[0027] 본원의 임의의 실시형태의 하나의 양태에서, 개체는 인간으로 특정될 수 있다.

[0028] 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 치료적 유효량으로 투여된다.

[0029] 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 암을 갖는 개체에게 주변부에서 및/또는 종양 미세환경에서 CD39 (sCD39 및/또는 memCD39) 의 활성을 중화시키기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 하나의 실시형태에서, 항체는 종양 미세환경에서 ATP 의 이화작용을 감소시키기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 임의로, 항체는, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제의 2 회 연속적 투여 사이의 시간의 지속시간 동안, 주변부에서 및/또는 종양 미세환경에서 CD39 (sCD39 및/또는 memCD39) 의 활성의 지속적인 저해, 및/또는 종양 미세환경에서 ATP 의 이화작용의 지속적인 감소를 제공하기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다.

[0030] 하나의 실시형태에서, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제는 치료적 유효량으로 투여된다. 하나의 실시형태에서, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제는 암을 갖는 개체에게 종양 세포의 사망, 세포자멸사 및/또는 괴사를 유도하기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다. 하나의 실시형태에서, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제는 암을 갖는 개체에게 종양 미세환경에서 ATP 의 세포외 방출을 유도하기에 충분한 양 및 빈도로 투여된다.

[0031] 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체 및 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제는 각각 적어도 하나의 투여 사이클 동안 투여되며, 투여 사이클은 항-CD39 항체 및 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제의 적어도 제 1 및 제 2 (및 임의로 3^{rd}, 4^{th}, 5^{th}, 6^{th}, 7^{th} 및/또는 8^{th} 또는 그 이상) 투여를 포함한다.

[0032] 하나의 실시형태에서, 암은 백혈병, 신경아교종 또는 교모세포종, 또는 방광, 유방, 대장, 식도, 신장, 간, 폐, 난소, 자궁, 전립선, 췌장, 위장, 자궁경부, 갑상선, 두경부 (두경부 편평상피 세포 암종), 및 피부 (예를 들어, 흑색종) 의 암이다. 하나의 실시형태에서 암은 진행성 및/또는 난치성 고형 종양이다. 하나의 실시형태에서 암은 진행성 및/또는 난치성 고형 종양이다. 하나의 비제한적 실시형태에서, 암 (예를 들어, 진행성 난치성 고형 종양) 은 비-소세포 폐암 (NSCLC), 신장 암, 췌장 또는 식도 선암종, 유방암, 신세포 암종 (RCC), 흑색종, 대장직장암, 및 난소암 (및 임의로 본원에 추가로 기재된 암 유형) 으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0033] 특정 임의적 양태에서 항-CD39 작용제는 면역억제, 임의로 종양에서 면역 침윤물의 결여 또는 불충분, 임의로 항-종양 면역력의 결여 또는 불충분을 특징으로 하는 암 또는 종양을 갖는 개체에서 암을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0034] 특정 임의적 양태에서 본원에 개시된 치료는 불량한 질환 예후, 특히 항암제, 예를 들어, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제, 세포독성제, 화학치료제, 또는 CD39 의 효소 활성을 저해하는 작용제를 이용하는 치료에 대한 응답에 관해 불량한 예후를 갖는 개체에서 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 불량한 질환 예후를 갖는 개체는, 예를 들어, 하나 이상의 예측 인자에 기반하여, 진행의 더 높은 위험에 처해 있다. 하나의 실시형태에서, 예측 인자(들)은 하나 이상의 유전자에서 돌연변이의 존재 또는 부재를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 예측 인자(들)은 하나 이상의 유전자 또는 단백질, 또는 예를 들어 면역 효과기

세포 상의 저해성 또는 활성화 수용체의 발현의 수준(들)을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 예측 인자(들)은 순환계에서 또는 CD39 를 발현하는 종양 환경에서 세포의 존재 (예를 들어, 수), 및/또는 순환계에서 또는 종양 환경에서 세포의 표면 상의 CD39 의 발현 수준을 포함한다; 하나의 실시형태에서, 세포는 종양 세포이다; 하나의 실시형태에서 세포는 백혈구, 예를 들어, B 세포, 조절성 T 세포 (Treg) 이다; 하나의 실시형태에서 세포는 수지상 세포이다. CD39 의 상승된 발현, 및/또는 CD39 발현 세포의 상승된 수의 존재는 개체가 CD39 를 중화시키는 항체를 이용하는 치료에 대한 응답에 관해 불량한 예후를 갖는다는 것을 시사할 수 있다.

[0035] 본원의 임의의 양태에서, 개체는 비-응답자이거나, 또는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제를 이용하는 치료에 대해 부분적 또는 불완전한 응답을 경험했거나, 또는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제를 이용하는 치료 후에 질환이 재발 또는 진행된 개체일 수 있다.

[0036] 하나의 양태에서, 제공되는 것은 비-응답자이거나, 또는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제를 이용하는 치료에 대해 부분적 또는 불완전한 응답을 경험했거나, 또는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제를 이용하는 치료 후에 질환이 재발 또는 진행된 개체에서 암 치료에서 사용하기 위한 항-CD39 작용제이다. 하나의 실시형태에서, 항-CD39 작용제는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 처치 (예를 들어, 작용제) 와의 조합으로 투여된다. 임의로, 항-CD39 작용제는 ATP 의 존재하에 CD39 의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있고/있거나 가용성 세포외 도메인 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있다.

[0037] 하나의 실시형태에서, 항-CD39 작용제는 CD39 상의 에피토프 또는 결정인자에 대한 결합에 대해 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399 와 경쟁한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD39 작용제는 CD39 에 대한 결합에 대해 SEQ ID NOs: 37 및 38 의 중쇄 및 경쇄 각각을 갖는 항체와 경쟁한다. 작용제는, 예를 들어, 인간 또는 인간화된 항-CD39 항체일 수 있다. 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 37 의 중쇄의 중쇄 CDR 및 SEQ ID NO: 37 의 경쇄의 경쇄 CDR 각각을 포함하는 항체이다. 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 37 의 중쇄 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NO: 38 의 경쇄 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 각각을 포함한다.

[0038] 특정 임의적 양태에서, 환자가 항암제 (예를 들어, 세포독성 화합물, 화학치료제, 고갈성 항체를 포함하는 조성물) 에 관해 불량한 응답자인지 (응답에 관해 불량한 예후를 갖는지) 여부를 평가함으로써, 개체는 CD39-중화제 및 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제를 이용하는 치료에 관해 확인될 수 있다. 불량한 응답자는 CD39-중화제 및 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제의 조합으로 치료될 수 있다.

[0039] 특정 임의적 양태에서, 종양 샘플 (예를 들어, 종양 조직 및/또는 종양 인접 조직) 중 세포외 ATP 의 존재를 평가함으로써, 환자는 CD39-중화제를 이용하는 치료에 관해 확인될 수 있으며, 임의로 ATP 의 미리 결정된 농도는 개체가 항-CD39 작용제를 이용하는 치료에 적합하다는 것을 시사하며, 임의로 세포외 ATP 의 농도는 적어도 0.01 mM, 0.02 mM, 0.05 mM, 0.125 mM, 0.25 mM 또는 0.5 mM 이다.

[0040] 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 치료 방법은 임의의 기타 적합한 치료와의 조합으로 사용될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 치료 방법은 개체에게 인간 PD-1 의 저해 활성을 중화시키는 작용제, 임의로 항체를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 본원에 기재된 치료 방법은 개체에게 인간 CD73 단백질의 5'-엑토뉴클레오티다아제 활성을 중화시키는 작용제, 임의로 항체를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0041] 다른 실시형태에서, 약학적 조성물 및 키트, 뿐만 아니라 그들을 사용하는 방법이 제공된다. 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 인간 CD39 폴리펩티드의 ATPase 활성을 중화시키는 화합물 및 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제를 포함하는 약학적 조성물이다. 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 인간 CD39 폴리펩티드의 저해 활성을 중화시키는 화합물 및 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도할 수 있는 작용제를 포함하는 키트이다.

[0042] 다른 실시형태에서, 제공되는 것은 가용성 세포외 도메인 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있는 항체와의 조합된 사용에 관해 항암제의 효능 또는 적합성을 예측 또는 평가하는 방법이며, 방법은 항암제가 세포 (예를 들어 종양 세포) 로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는지 여부를 확인 또는 평가하는 것 (예를 들어, 시험관내에서) 을 포함하며, 항암제가 세포 (예를 들어 종양 세포) 로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도한

다는 확인은 작용제가 암의 치료를 위해 가용성 세포외 도메인 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있는 상기 항체와의 조합으로 사용될 수 있다는 것을 시사한다. 항암제가 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는지 여부를 확인 또는 평가하는 것은, 예를 들어, 세포 (예를 들어 종양 세포) 를 작용제와 시험관내에서 접촉시키는 것 및 ATP 의 세포외 방출을 평가하는 것을 포함할 수 있다.

[0043] 이들 양태는 본원에서 제공되는 본 발명의 상세한 설명에서 더욱 완전히 기재되고, 그로부터 부가적 양태, 특색, 및 이점이 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1 은 양성 대조군 I-394 항체와 비교된 항체 I-397, I-398 및 I-399 를 보여주는 대표적인 스크리닝 결과를 보여준다.

도 2A 는 항체 BY40, I-394, I-395 및 I-396 이 세포-막 결합된 CD39 를 저해하고, I-394 및 I-395 둘 모두는 BY40 과 비교하여 모든 농도에서 더 큰 역가를 보일뿐만 아니라 세포 CD39 의 더 큰 최대 저해를 보인다는 것을 보여준다. 도 2B 는 항체 I-395 및 I-396 둘 모두는 음성 대조군 (BY40) 및 양성 대조군 (I-394) 항체와 비교하여 가용성 CD39 를 저해한다는 것을 보여준다.

도 3A 는 CD39 단백질의 표면 상에서 돌연변이체 5 (M5), 15 (M15) 및 19 (M19) 의 돌연변이된 잔기의 위치를 보여준다. 도 3B 는 상이한 항체에 대한 돌연변이체 5, 15 및 19 의 결합 결과를 보여준다.

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

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

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

도 7 은 ELISA 어세이로 평가시에 항체 I-394 가 인간 CD39 에는 결합하지만 임의의 인간 아이소형 CD39-L1, CD39-L2, CD39-L3 또는 CD39-L4 에는 결합하지 않는다는 것을 보여준다.

도 8 은 CD4 T 세포 활성화에 대한 ATP-매개되는 DC 활성화의 효과를 평가하기 위한 실험 절차를 보여주며, ATP-활성화된 DC 를 세척했고 그 후 5 일 동안 혼합 림프구 반응 (MLR) 을 위해 동종이계 CD4 T 세포와 함께 인큐베이션했다 (1 MoDC / 4 T 세포 비). T 세포 활성화 및 증식은 유세포측정에 의해 CD25 발현 및 Cell Trace Violet 희석을 통해 분석했다.

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

도 11 은 CD25 발현을 보여주며, MLR 어세이에서 ATP 의 존재 하에서 활성화된 MoDC 가 T 세포 활성화 및 증식을 유도할 수 있었고, 항-CD39 차단 항체 I-394 에 의한 ATP-매개되는 MoDC 활성화의 증강은 더 높은 T 세포 증식 및 활성화를 초래했다는 것을 보여준다. 위에서 아래로 범례는 좌측에서 우측으로 그래프의 막대에 상응한다.

도 12 는 종양 세포 이식 후 제 5 일에 대조군 (1 개의 군) PBS, 또는 옥살리플라틴 화학요법 (2 개의 군) 으로 처리된 마우스에서의 종양 성장 및 생존율을 보여준다. 병행하여, 옥살리플라틴으로 처리된 마우스의 1 개 군에 항-CD39 항체를 1 주 2 회 주입했으며, 항-CD39 항체 처리는 옥살리플라틴 처리 전 1 일에 (제 4 일에) 시작했다. 이는 CD39 가 이미 그리고 완전히 저해되었고, 따라서 종양내 CD39 에 의한 ATP 붕괴의 최적 방지를 제공하는 종양 환경에서 옥살리플라틴이 ATP 방출을 유도하는 것을 보장했다.

도 13 은 종양 세포 이식 후 제 5 일에 대조군 (1 군) PBS, 항-CD39 항체, 옥살리플라틴, 또는 옥살리플라틴과 항-CD39 항체의 조합으로 처리된 마우스에서의 종양 성장 및 생존율을 보여줬다. 옥살리플라틴 주입을 제 1

옥살리플라틴 주입 후 1 주에 반복했으며, 다시 I-394 항체로 처리 후 1 일에 반복하여, ATP 붕괴의 최적 저해를 제공했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] **상세한 설명**

[0046] **정의**

[0047] 본 명세서에서 사용되는 "한" 또는 "하나" 는 하나 이상을 의미할 수 있다. 청구항(들)에서 사용시, "포함하는" 이라는 단어와 함께 사용될 때, 단어 "한" 또는 "하나" 는 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "다른" 은 적어도 제 2 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0048] "포함하는" 이 사용될 때, 이것은 임의로는 "본질적으로 이루어지는" 또는 " 이루어지는" 으로 대체될 수 있다.

[0049] 인간 CD39 는, 또한 NTPdase1, ENTPD1, ATPDase 및 혈관 ATP 디포스포히드롤라제로서도 알려져 있으며, ATPase 활성을 나타낸다. CD39 는 세포외 ATP 및 ADP 를 AMP 로 가수분해하는 막결합 단백질로서, AMP 는 또다른 효소, 5-프라임 뉴클레오티다제에 의해 아데노신으로 추가로 전환된다. 인간 CD39 성숙한 폴리펩티드 사슬의 아미노산 서열은 수탁 번호 P49961 하에 Genbank 에서 확인되며, 그 전체 개시 내용은 본원에 참조로 포함되고, 다음과 같다:

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

[0050] (SEQ ID NO: 1).

[0051] 본원의 맥락에서, CD39 폴리펩티드를 언급할 때 "저해하다", "저해하는", "중화시키다" 또는 "중화시키는" (예를 들어, "CD39 를 중화시키다", "CD39 의 활성을 중화시키다" 또는 "CD39 의 효소 활성을 중화시키다" 등) 은 CD39 의 ATP 가수분해 (ATPase) 활성을 저해하는 과정을 의미한다. 이것은 특히 AMP 및/또는 ADP 의 CD39-매개되는 생성의 저해, 즉 ATP 의 AMP 및/또는 ADP 로의 CD39-매개되는 이화작용의 저해를 포함한다. 이것은 예를 들어 직접적으로 또는 간접적으로, ATP 의 AMP 및/또는 ADP 로의 전환을 저해하는 시험 화합물의 능력을 측정하는 세포 어세이에서 측정할 수 있다. 예를 들어, ATP 의 소멸 및/또는 AMP 의 생성은 본원에 기재된 바와 같이 평가될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 항체 조제물은 예를 들어 본원에 기재된 어세이 (예를 들어, ATP 의 소멸 및/또는 AMP 의 생성) 를 참조하여, ATP 의 AMP 로의 전환의 적어도 60% 감소, ATP 의 AMP 로의 전환의 적어도 70% 감소, 또는 ATP 의 AMP 로의 전환의 적어도 80% 또는 90% 감소를 야기한다.

[0052] 작용제 및 특정한 활성 (예를 들어, 세포에 대한 결합, 효소 활성의 저해, 면역 세포의 활성화 또는 저해) 에 관한 "EC_{50}" 은 그러한 활성에 관해 그것의 최대 응답 또는 효과의 50% 를 낳는 작용제의 효율적 농도를 의미한다. 작용제 및 특정한 활성에 관한 "EC_{100}" 은 그러한 활성에 관해 실질적으로 그것의 최대 응답을 낳는 작용제의 효율적 농도를 의미한다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체" 는 다클론 및 단일클론 항체를 의미한다. 중쇄의 불변 도메인의 유형에 따라서, 항체는 5종의 주요 클래스: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM 중 하나로 지정된다. 이들 중 몇몇은 서브클래스 또는 이소타입, 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 등으로 더욱 분류된다. 예시적인 면역글로불린 (항체) 구조 유닛은 사합체를 포함한다. 각각의 사합체는 폴리펩티드 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 구성되고, 각각의 쌍은 하나의 "경" 쇄 (약 25 kDa) 및 하나의 "중" 쇄 (약 50-70 kDa) 를 갖는다. 각각의 사슬의 N-말단은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100개 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 한정한다. 용어 가변 경쇄 (V_L) 및 가변 중쇄 (V_H) 는 각각 이들 경쇄 및 중쇄를 의미한다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 해당되는 중쇄 불변 도메인은 각각 "알파", "델타", "엡실론", "감마" 및 "뮤" 라고 한다. 상이한 클래스의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3차 입체형태는 잘 알려져 있다. IgG 는 그들이 생리학적 상황에서 가장 일반적인 항체이기 때문에 그리고 그들이 실험실 상황에서 가장 쉽게 만들어지기 때문에 본

명세서에서 적용되는 예시적인 클래스의 항체이다. 임의로는 항체는 단일클론 항체이다. 항체의 특정한 예는 인간화된, 키메라, 인간, 또는 아니면-인간-적합화 항체이다. "항체" 는 또한 본원에 기재된 임의의 항체의 임의의 단편 또는 유도체를 포함한다.

[0054] 용어 "특이적으로 결합하다" 는 바람직하게는 항체가 단백질의 재조합 형태, 그 안의 에피토프, 또는 단리된 표적 세포의 표면 상에 존재하는 천연 단백질을 사용하여 평가하게 되는, 결합 파트너, 예를 들어 CD39 와의 경쟁적 결합 어세이에서 결합할 수 있다는 것을 의미한다. 경쟁적 결합 어세이 및 특이적 결합을 결정하기 위한 다른 방법은 당분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들어 결합은 방사성표지, 물리적 방법 예컨대 질량 분광법, 또는 예를 들어, 세포형광계측 분석 (예를 들어, FACScan) 을 사용해 검출된 직접 또는 간접 형광 표지를 통해서 검출할 수 있다. 대조군, 비특이적 작용제에 의해 확인되는 양을 초과하는 결합은 작용제가 표적에 결합한다는 것을 의미한다.

[0055] 항체가 특정한 모노클로날 항체 "와 경쟁한다" 라고 할 때, 이것은 항체가 재조합 분자 (예를 들어, CD39) 또는 표면 발현된 분자 (예를 들어, CD39) 를 사용하는 결합 어세이에서 모노클로날 항체와 경쟁한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 시험 항체가 결합 어세이에서 SEQ ID NO: 3 의 중쇄 및 SEQ ID NO: 4 의 경쇄를 갖는 항체의 CD39 폴리펩티드 또는 CD39-발현 세포에 대한 결합을 감소시키는 경우에, 그 항체는 각각 그러한 항체와 "경쟁한다" 라고 한다.

[0056] 본 명세서에서 사용하는 용어 "친화도" 는 항체의 에피토프에 결합하는 강도를 의미한다. 항체의 친화도는 [Ab]×[Ag]/[Ab-Ag] 로서 정의된 해리 상수 Kd로 제공되고, 여기서 [Ab-Ag] 는 항체-항원 복합체의 몰 농도이고, [Ab] 는 미결합된 항체의 몰 농도이고 [Ag] 는 미결합된 항원의 몰 농도이다. 친화도 상수 K_a 는 1/Kd 로 정의된다. mAb 의 친화도를 확인하기 위한 방법은 Harlow, et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), 및 Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983) 에서 확인할 수 있고, 이들은 전체로 참조하여 본 명세서에 포함된다. mAb 의 친화도를 확인하기 위해 당분야에 잘 알려진 하나의 표준 방법은 표면 플라스몬 공명 (SPR) 스크리닝 (예컨대 BIAcore™ SPR 분석 장치를 사용한 분석에 의함) 의 사용이다.

[0057] 본 명세서에 문맥 내에서, "결정인자" 는 폴리펩티드 상의 상호작용 또는 결합의 부위를 표시한다.

[0058] 용어 "에피토프" 는 항원성 결정인자를 의미하고, 항체가 결합하는 항원 상의 면적 또는 영역이다. 단백질 에피토프는 결합에 직접적으로 관여되는 아미노산 잔기를 비롯하여 특이적 항원 결합 항체 또는 펩티드에 의해 효과적으로 차단되는 아미노산 잔기, 즉 항체의 "풋프린트" 내 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 이것은 예를 들어 항체 또는 수용체와 조합될 수 있는 복합체 항원 분자 상의 가장 단순한 형태 또는 가장 작은 구조적 영역이다. 에피토프는 선형일 수 있거나 또는 입체형태/구조일 수 있다. 용어 "선형 에피토프" 는 아미노산의 선형 서열 (1차 구조) 상에서 인접하는 아미노산 잔기로 구성된 에피토프로서 정의된다. 용어 "입체형태적 또는 구조적 에피토프" 는 모두 인접하는 것은 아니고 따라서 분자의 폴딩에 의해서 서로 인접하게 되는 아미노산의 선형 서열의 분리된 부분을 나타내는 아미노산 잔기로 구성된 에피토프로서 정의된다 (2차, 3차 및/또는 4차 구조). 입체형태 에피토프는 3차 구조에 의존적이다. 그러므로 용어 "입체형태적" 은 종종 "구조적"과 상호교환적으로 사용된다.

[0059] 종양 세포에 대한 용어 "고갈시키다" 또는 "고갈성" 은 샘플 또는 대상체에 존재하는 그러한 종양 세포의 개수에 부정적인 영향을 미치도록, 사멸, 제거, 용해 또는 이러한 사멸, 제거 또는 용해의 유도를 초래하는 과정, 방법 또는 화합물을 의미한다.

[0060] "세포내 내재화" 와 상호교환적으로 사용되는 용어 "내재화" 는 세포의 세포외 표면으로부터 세포의 세포내 표면으로 분자의 전좌 과정과 연관된 분자적, 생화학적 및 세포적 사건을 의미한다. 분자의 세포내 내재화를 담당하는 과정은 잘 알려져 있고, 특히 세포외 분자 (예컨대 호르몬, 항체 및 소형 유기 분자); 막-연합된 분자 (예컨대 세포-표면 수용체); 및 세포외 분자에 결합된 막-연합된 분자의 복합체 (예를 들어, 경막 수용체에 결합된 리간드 또는 막-연합된 분자에 결합된 항체) 의 내재화를 포함할 수 있다. 따라서, "내재화의 유도 및/또는 증가 " 는 세포내 내재화가 개시되고/되거나 세포내 내재화의 속도 및/또는 정도가 증가되는 사건을 포함한다.

[0061] 용어 "작용제" 는 본 명세서에서 화학적 화합물, 화학적 화합물의 혼합물, 생물학적 거대 분자, 또는 생물학적 재료로부터 만들어진 추출물을 의미하고자 사용된다. 용어 "치료제" 는 생물학적 활성을 갖는 작용제를 의

미한다.

[0062] 본 명세서의 목적을 위해서, "인간화된" 또는 "인간" 항체는 하나 이상의 인간 면역글로불린의 불변 및 가변 골격 영역이 동물 면역글로불린의 결합 영역, 예를 들어 CDR 과 융합된 항체를 의미한다. 이러한 항체는 결합 영역이 유래되는 비인간 항체의 결합 특이성을 유지하지만, 비인간 항체에 대한 면역 반응은 피하도록 디자인된다. 이러한 항체는 항원성 공격에 대응하여 특이적 인간 항체를 생성하도록 "조작된" 유전자이식 마우스 또는 다른 동물로부터 수득될 수 있다 (참고, 예를 들어, Green et al. (1994) Nature Genet 7:13; Lonberg et al. (1994) Nature 368:856; Taylor et al. (1994) Int Immun 6:579, 이들의 전체 교시 내용은 본원에 참조로 포함됨). 완전한 인간 항체는 또한 유전자 또는 염색체 형질감염 방법을 비롯하여, 파지 디스플레이 기술에 의해 구축될 수 있고, 이들 기술 모두는 당분야에 공지되어 있다 (참고, 예를 들어, McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-553). 인간 항체는 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수도 있다 (참고, 예를 들어, 미국 특허 Nos. 5,567,610 및 5,229,275, 이들은 그들 전문이 본원에 참조로 포함됨).

[0063] "키메라 항체" 는 (a) 불변 영역, 또는 이의 일부분이 변경, 치환 또는 교환되어서 항원 결합 부위 (가변 영역)가 상이하거나 또는 변경된 클래스, 이펙터 기능 및/또는 종의 불변 영역, 또는 키메라 항체에 새로운 특성을 부여하는 전체적으로 상이한 분자, 예를 들어 효소, 독소, 호르몬, 성장 인자, 약물 등에 연결되거나; 또는 (b) 가변 영역, 또는 이의 일부분이 상이하거나 또는 변경된 항원 특이성을 갖는 가변 영역으로 변경, 치환 또는 교환된 항원 분자이다.

[0064] 본 명세서에서 사용시 용어 "과가변 영역" 은 항원 결합을 담당하는 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 일반적으로 과가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR" 유래 아미노산 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 중쇄 가변 도메인의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); Kabat et al. 1991) 및/또는 "과가변 루프" 유래 잔기 (예를 들어, 경쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및 중쇄 가변 도메인의 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol 1987;196:901-917), 또는 항원 결합을 담당하는 필수 아미노산을 결정하기 위한 유사한 시스템을 포함한다. 전형적으로, 이 영역 내 아미노산 잔기의 넘버링은 상기 Kabat et al. 에 기술된 방법으로 수행된다. 본 명세서에서 "카밧 위치", "카밧에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 및 카밧에 따른" 과 같은 어구는 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대한 이러한 넘버링 체계를 의미한다. 카밧 넘버링 체계를 사용하여, 펩티드의 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR 의 단축 또는 그로의 삽입에 상응하는 소수의 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 CDR H2 의 잔기 52 이후에 단일 아미노산 삽입 (카밧에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 이후에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카밧에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등) 를 포함할 수 있다. 잔기의 카밧 넘버링은 "표준" 카밧 넘버링 서열과 항체의 서열의 상동성 영역에서의 정렬에 의해 소정 항체에 대해 확인될 수 있다.

[0065] 본 명세서에서 "골격" 또는 "FR" 잔기란 CDR 로서 정의된 그들 영역을 제외한 항체 가변 도메인의 영역을 의미한다. 각각의 항체 가변 도메인 골격은 CDR에 의해 분리되어진 인접된 영역으로 더욱 세분될 수 있다 (FR1, FR2, FR3 및 FR4).

[0066] 용어 "Fc 도메인", "Fc 부분" 및 "Fc 영역" 은 항체 중쇄의 C-말단 단편, 예를 들어, 인간 γ (감마) 중쇄의 대략 아미노산 (aa) 230 내지 대략 aa 450 또는 다른 유형의 항체 중쇄 (예를 들어, 인간 항체의 경우 α, δ, ε 및 μ) 또는 이의 천연 발생 알로타입에서의 이의 대응 서열을 의미한다. 다르게 명시하지 않으면, 면역글로불린에 대해 일반적으로 허용되는 카밧 아미노산 넘버링이 본 개시 내용 전반에서 사용된다 (참고, Kabat et al. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

[0067] 용어 "단리된", "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한" 은 이의 천연 상태에서 존재하는 대로 정상적으로 이것을 수반하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 의미한다. 순도 및 균질성은 전형적으로 분석 화학 기술 예컨대 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액상 크로마토그래피를 사용하여 결정된다. 조제물에 존재하는 우세한 종의 단백질이 실질적으로 정제된다.

[0068] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질" 은 아미노산 잔기의 중합체를 의미하기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 이 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 천연 발생 아미노산의 인공 화학 모방체인 아미노산 중합체를 비롯하여, 천연 발생 아미노산 중합체 및 비천연 발생 아미노산 중합체에 적용된다.

[0069] 예를 들어, 세포, 또는 핵산, 단백질, 또는 벡터에 대해서 사용시 용어 "재조합" 은 세포, 핵산, 단백질 또는

벡터가 이종성 핵산 또는 단백질의 도입 또는 천연 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유래된다는 것을 의미한다. 따라서, 예를 들어, 재조합 세포는 세포의 천연 (비재조합) 형태 내에 존재하지 않는 유전자를 발현하거나, 또는 그렇지 않으면 비정상적으로 발현되거나, 과소 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 천연 유전자를 발현한다.

[0070] 본 명세서의 문맥 내에서, 폴리펩티드 또는 에피토프에 "결합하는" 용어 항체는 특이성 및/또는 친화도로 상기 결정인자에 결합하는 항체를 의미한다.

[0071] 2개 이상의 폴리펩티드의 서열 간 관련성에 대해 사용될 때 용어 "동일성" 또는 "동일한" 은 둘 이상의 아미노산 잔기의 스트링 간 일치부의 개수에 의해 결정되는, 폴리펩티드간 서열 관련성의 정도를 의미한다. "동일성" 은 특정한 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램 (즉, "알고리즘") 에 의해 처리되는 (존재한다면) 갭 정렬된 둘 이상의 서열 중 보다 작은 서열 사이의 동일한 일치부의 백분율을 측정한다. 관련 폴리펩티드의 동일성은 공지된 방법으로 쉽게 계산할 수 있다. 이러한 방법은 제한 없이, 다음의 문헌들에 기술된 것들을 포함한다: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; 및 Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

[0072] 동일성을 확인하기 위한 방법은 시험되는 서열 간 최대 일치성을 제공하도록 디자인된다. 동일성을 확인하는 방법은 공공으로 입수가능한 컴퓨터 프로그램에 기술되어 있다. 2개 서열 간 동일성을 확인하기 위한 컴퓨터 프로그램 방법은 GAP 를 포함하는 GCG 프로그램 패키지 (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, 및 FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)) 를 포함한다. BLASTX 프로그램은 국립 생명공학 정보 센터 (National Center for Biotechnology Information) (NCBI) 및 기타 공급처 (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., 상기) 로부터 공개적으로 입수가능하다. 잘 알려진 스미스 워터만 (Smith Waterman) 알고리즘이 또한 동일성을 확인하는데 사용될 수 있다.

[0073] **CD39 를 저해하는 작용제**

[0074] 본원에 따라 사용하기 위한 CD39 를 결합 및 저해하는 작용제는 임의로, 예를 들어, 세포의 표면에서 발현되는, CD39 단백질, 예를 들어, 가용성 CD39 단백질 (sCD39), 단량체성 CD39 단백질, 막 결합된 CD39 단백질 (memCD39) 의 ATPase 활성을 결합 및 저해 또는 중화시키는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 항원 결합 도메인 또는 단백질일 수 있다.

[0075] 하나의 실시형태에서 sCD39 단백질은 막 결합된 CD39 에 존재하는 두 개의 경막 도메인 (즉, N- 및 C-말단 단부 근처의 경막 도메인) 을 결여하는 CD39 단백질이다. 하나의 실시형태에서, sCD39 는 순환계에, 예를 들어, 인간 개체에 존재하는 비-막 결합된 sCD39 단백질이다. 하나의 실시형태에서, sCD39 는 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그것으로 이루어진다 (임의로 C-말단 태그 또는 또다른 비-CD39-유래 아미노산 서열을 추가로 포함함). 하나의 실시형태에서, 단백질, 항체 또는 항체 단편은, 예를 들어, 본원에 개시된 방법에 따라 용액 중 sCD39 와 함께 인큐베이션될 때, sCD39 의 ATPase 활성을 저해한다. 하나의 실시형태에서, 단백질, 항체 또는 항체 단편은 인간 CD39 단백질의 가용성 형태 (세포외 도메인 단백질) 및 막-결합된 형태 둘 모두에 특이적으로 결합한다.

[0076] 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 세포 표면-발현되는 CD39 의 세포내 내재화, 또는 더욱 일반적으로는 하향-조정을 증가 또는 유도하지 않고/않거나, 그것의 CD39 저해 활성에 관해 그에 의존하지 않는다.

[0077] 하나의 양태에서, 항-CD39 항체는 (a) 세포의 표면에서 발현되는 막-결합된 CD39 단백질 (예를 들어, SEQ ID NO: 1 의 아미노산 서열을 포함함) 의 효소 활성을 저해할 수 있고, (b) 가용성 CD39 단백질 (예를 들어, SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열을 갖는 CD39 단백질, 그것의 경막 도메인을 결여하는 CD39 단백질) 의 효소 활성을 저해할 수 있다.

[0078] 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 인간 Fcγ 수용체 (예를 들어, CD16, CD32a, CD32b, CD64) 및/또는 C1q 에 (예를 들어, 그것의 Fc 도메인을 통해) 실질적으로 결합하지 않고/않거나, ADCC 및/또는 CDC 를 CD39-발현 세포를 향하여 실질적으로 유도하지 않는다. 임의로, 항체는 Fc 도메인 (예를 들어, 인간 IgG

아이소타입의) 을 보유하고, 인간 FcRn 에 대한 결합성을 보유한다.

[0079] 하나의 실시형태에서, CD39 중화 항체는 sCD39 폴리펩티드 및/또는 단량체성 CD39 폴리펩티드의 ATPase 활성의 감소를 야기할 수 있으며, 임의로 가용성 단량체성 인간 CD39 단백질, 예를 들어, SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열로 이루어지는 CD39 단백질에 의해, AMP 생성의 감소를 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 만큼 야기할 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0080] 하나의 실시형태에서, CD39 중화 항체는 CD39 의 세포의 ATPase 활성의 감소를 야기할 수 있으며, 임의로 CD39-발현 세포에 의해 AMP 생성의 감소를, 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 만큼 야기할 수 있는 것을 특징으로 할 수 있다. 하나의 실시형태에서, CD39-중화 항체는 1 ㎍/㎖ 이하, 임의로 0.5 ㎍/㎖ 이하, 임의로 0.2 ㎍/㎖ 이하의 세포에 의해 발현되는 CD39 의 ATPase 활성의 저해에 관한 EC_{50} (예를 들어, CD39-발현 세포에 의한 AMP 생성의 저해에 관한 EC_{50}) 을 특징으로 할 수 있다.

[0081] 하나의 실시형태에서, CD39 중화 항체는 인간 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC) 에서, 그러한 moDC 가 항체 및 ATP 와 함께 시험관내 인큐베이션될 때, 활성화의 세포 표면 마커의 발현의 증가를 야기할 수 있으며, 임의로 ATP 는 외인성으로 첨가된 ATP 이며, 임의로 추가로 첨가된 ATP 는 0.125 mM, 0.25 mM 또는 0.5 mM 로 제공되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0082] 항원-결합 화합물은 본원에 추가로 기재된 바와 같이 생산될 수 있고, 임의의 요망되는 시기에 CD39 의 효소 활성을 저해하고, 특히 sCD39 의 ATPase 활성을 차단하고 가용성 CD39 단백질에 의한 및 임의로 추가로 CD39-발현 세포에 의한 ADP 및 AMP (및, CD73, 아데노신과 함께) 의 생산을 감소시키고, 결국 수지상 세포 활성의 ATP-매개되는 활성화 및/또는 T 세포 증식을 복원시키는 그것의 능력에 관해 평가될 수 있다.

[0083] 항체의 저해 활성 (예를 들어, 면역 증강 잠재성) 은 또한, 예를 들어, ATP 의 소멸 (가수분해) 및/또는 AMP 의 생성을 검출하는 어세이에서 평가될 수 있다.

[0084] 가용성 재조합 인간 CD39 단백질을 저해하는 항체의 능력은 가용성 CD39 단백질 (예를 들어, 실시예 1 에서 생산된 바와 같은, 임의로 정제 태그 또는 기타 기능적 또는 비기능적 비-CD39-유래 아미노산 서열을 추가로 포함하는, SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열을 갖는 CD39 단백질) 과 함께 시험 항체를 인큐베이션한 후에 ATP 를 검출함으로써 시험될 수 있다. 예를 들어, 실시예를 참조한다. 간략히, ATP 는 시험 항체의 용량 범위를 실시예에 기재된 바와 같은 가용성 재조합 인간 CD39 단백질과 함께 1 시간 동안 37℃ 에서 인큐베이션하는 어세이에서, Cell Titer Glo™ (Promega) 를 사용하여 정량화될 수 있다. 20 μM ATP 가 플레이트에 부가적 30 분 동안 37℃ 에서 첨가되고, 그 후 CTG 시약이 첨가된다. 암흑 속에서 5 min 의 짧은 인큐베이션 기간 후에 방출된 광은 Enspire™ 광도계를 사용하여 정량화된다.

[0085] CD39 단백질을 발현하는 세포를 저해하는 항체의 능력은 시험 항체를 세포 (예를 들어, Ramos 세포, CD39 로 형질감염된 세포 등) 와 함께 인큐베이션한 후에 ATP 를 검출함으로써 시험될 수 있다. 예를 들어, 실시예를 참조한다. 세포는 1 시간 동안 37℃ 에서 시험 항체와 함께 인큐베이션될 수 있다. 그 후 세포는 20 μM ATP 와 함께 추가 1 시간 동안 37℃ 에서 인큐베이션된다. 플레이트는 2 분 동안 400g 에서 원심분리되고, 세포 상청액은 발광 마이크로플레이트 (흰색 웰) 에 옮겨진다. CTG 가 상청액에 첨가되고, 암흑 속에서 5 min 인큐베이션 후에 Enspire™ 광도계를 사용하여 방출된 광이 정량화된다. 항-CD39 항체 효능은 ATP 단독의 경우 (최대 광 방출) 및 ATP 와 세포 함께의 경우 (최소 광 방출) 의 항체의 존재 하에서 방출된 광을 비교함으로써 확인된다.

[0086] 항체의 존재 하에서, ATP 의 AMP 로의 가수분해의 감소, 및/또는 ATP 의 증가 및/또는 AMP 생성의 감소는 항체가 CD39 를 저해한다는 것을 시사한다. 하나의 실시형태에서, 예를 들어 실시예 1 에서와 같이, CD39 폴리펩티드를 발현하는 세포 (예를 들어, Ramos 세포) 를 시험 항체와 함께 인큐베이션한 후에 Cell Titer Glo™ (Promega) 을 사용하여 ATP 를 검출함으로써 평가시에, 항체 조제물은 세포에 의해 발현되는 CD39 폴리펩티드의 효소 활성에서 적어도 60% 감소를 야기할 수 있고, 바람직하게 항체는 세포에서 CD39 폴리펩티드의 효소 활성에서 적어도 70%, 80% 또는 90% 감소를 야기한다.

[0087] 하나의 실시형태에서, 예를 들어, 실시예 1 에서와 같이, 가용성 재조합 CD39 폴리펩티드를 시험 항체와 함께 인큐베이션한 후에, Cell Titer Glo™ (Promega) 를 사용하여 ATP 를 검출함으로써 평가시에, 항체 조제물은 가용성 재조합 CD39 폴리펩티드의 효소 활성에서 적어도 60% 감소를 야기할 수 있고, 바람직하게는 가용성 재조합 CD39 폴리펩티드의 효소 활성에서 적어도 70%, 80%, 또는 90% 감소를 야기할 수 있다.

[0088] 하나의 예에서, 제공되는 것은 본 공개의 방법에서 사용될 수 있는 (예를 들어, 종양 세포로부터 ATP 의 방출을 유도하는 작용제와의 조합으로 사용하기 위한) 항-CD39 항체 또는 항원 결합 도메인을 생산 또는 식별하기 위한 시험관내 방법이며, 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0089] (a) 인간 CD39 폴리펩티드에 결합하는 복수의 항체를 제공하는 단계,

[0090] (b) ATP 의 존재 하에, 각각의 항체를 인간 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC) 와 접촉시키는 단계로서, 임의로 ATP 는 외인성으로 첨가된 ATP 인 단계, 및

[0091] (c) moDC 에서 활성화의 세포 표면 마커의 발현의 증가를 초래하는 단계 (b) 의 항체를 선별하는 단계.

[0092] 임의로, 본원의 임의의 실시형태에서, 중화 항-CD39 항체는 sCD39 및 세포 표면에서 발현되는 CD39 (memCD39) 둘 모두에 존재하는 항원 결정인자에 결합한다.

[0093] 임의로, 본원의 임의의 실시형태에서, 중화 항-CD39 항체는 항체 I-394 에 의해 결합되는 CD39 상의 에피토프에 대한 결합에 대해 경쟁한다 (예를 들어, CD39 폴리펩티드 상의 에피토프에 대한 결합에 대해 임의의 I-394 의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 갖는 항체와 경쟁한다).

[0094] 임의로, 본원의 임의의 실시형태에서, 중화 항-CD39 항체는 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 CD39 폴리펩티드에 대한 결합에 대해 모노클로날 항체 I-394 와 경쟁한다 (예를 들어, CD39 폴리펩티드에 대한 결합에 대해 I-394 의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 가변 영역을 갖는 항체와 경쟁한다). 하나의 실시형태에서, 중화 항-CD39 항체는 동일한 에피토프에 결합하고/하거나 CD39 폴리펩티드에 대한 결합에 대해 SEQ ID NOs: 3 및 4 의 VH 및 VL 영역 각각을 갖는 항체와 경쟁한다.

[0095] 임의로, 본원의 임의의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 I-394 에 의해 결합되는 CD39 상의 아미노산 잔기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1, 2 또는 3 개 아미노산 잔기를 포함하는 에피토프에 결합한다.

[0096] 임의로, 본원의 임의의 실시형태에서, 결합 분자 (예를 들어, 항-CD39 항체) 는 본원에 기재된 바와 같은 경쇄 CDR1, 2 및 3 을 포함하는 가변 중쇄 도메인 (V_H), 및 본원에 기재된 바와 같은 중쇄 CDR1, 2 및 3 을 포함하는 가변 경쇄 도메인 (V_L), 또는 CDR (또는 중쇄 및/또는 경쇄 CDR 의 세트) 이 상기 CDR (또는 상기 중쇄 및/또는 경쇄 CDR 의 세트) 과 적어도 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

본원의 임의의 실시형태의 하나의 양태에서, 항체는 항체 I-394 의 중쇄 가변 영역 (VH) 의 세 개의 CDR 을 포함하는 중쇄 및 항체 I-394 의 경쇄 가변 영역 (VL) 의 세 개의 CDR 을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있다.

[0097] 임의로, 본원의 임의의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 Fc 도메인과 인간 CD16A, CD16B, CD32A, CD32B 및/또는 CD64 폴리펩티드 사이의 결합을 감소시키도록 변형된 (동일한 아이소타입의 야생형 Fc 도메인과 비교하여) Fc 도메인을 포함하며, 임의로 항체는 하기를 포함한다: (i) SEQ ID NO: 3 의 중쇄 가변 영역의 CDR 1, 2 및 3 을 포함하는 중쇄 및 (ii) SEQ ID NO: 4 의 경쇄 가변 영역의 CDR 1, 2 및 3 을 포함하는 경쇄. 하나의 양태에서, Fc 도메인은 Fc 도메인과 인간 C1q 폴리펩티드 사이의 결합을 감소시키도록 변형된다 (동일한 아이소타입의 야생형 Fc 도메인과 비교하여). 하나의 실시형태에서, 항체는 중쇄 불변 영역에서 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 잔기 중 임의의 1, 2, 3, 4, 5 개 또는 그 이상에서 아미노산 치환을 포함한다: 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 243, 264, 268, 297, 298, 299, 309, 310, 318, 320, 322, 327, 330 및 331 (Kabat EU 넘버링). 하나의 실시형태에서, 항체는 중쇄 불변 영역에서 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 잔기 중 임의의 3, 4, 5 개 또는 그 이상에서 아미노산 치환을 갖는다: 234, 235, 237, 322, 330 및 331. 하나의 실시형태에서, 항체는 아래 제시된 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인을 포함한다.

[0098] 하나의 실시형태에서, 항체는 하기 아미노산 서열, 또는 그와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일한 그러나 Kabat 위치 234, 235 및 331 (밑줄쳐짐) 에서 아미노산 잔기를 유지하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 또는 Fc 도메인을 포함한다:

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E **A** **E** G G P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A **S** I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO : 44)

[0099]

[0100] 하나의 실시형태에서, 항체는 하기 아미노산 서열, 또는 그와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일한 그러나 Kabat 위치 234, 235 및 331 (밑줄쳐짐) 에서 아미노산 잔기를 유지하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 또는 Fc 도메인을 포함한다:

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E **F** **E** G G P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A **S** I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO : 45)

[0101]

[0102] 하나의 실시형태에서, 항체는 하기 아미노산 서열, 또는 그와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일한 그러나 Kabat 위치 234, 235, 237, 330 및 331 (밑줄쳐짐) 에서 아미노산 잔기를 유지하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 또는 Fc 도메인을 포함한다:

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E **A** **E** G **A** P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P **S** **S** I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO : 46)

[0103]

[0104] 하나의 실시형태에서, 항체는 하기 아미노산 서열, 또는 그와 적어도 90%, 95% 또는 99% 동일한 그러나 Kabat 위치 234, 235, 237 및 331 (밑줄쳐짐) 에서 아미노산 잔기를 유지하는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 또는 Fc 도메인을 포함한다 :

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E **A** **E** G **A** P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A **S** I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO : 47)

[0105]

[0106] 하나의 양태에서, 항-CD39 항체는 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399 와 동일한 에피토프에 결합한다. 하나의 실시형태에서, 항체는 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399 에 의해 결합되는 에피토프와 적어도 부분적으로 중복되거나, 또는 그 에피토프의 적어도 하나의 잔기를 포함하는 CD39 의 에피토프에 결합된다. 항체에 의해 결합되는 잔기는 CD39 폴리펩티드의 표면 상에, 예를 들어, 세포의 표면 상에 발현되는 CD39 폴리펩티드에 존재한다고 명시될 수 있다.

[0107] CD39 돌연변이체로 형질감염된 세포에 대한 항-CD39 항체의 결합이 측정되고 야생형 CD39 폴리펩티드 (예를 들어, SEQ ID NO: 1) 에 결합하는 항-CD39 항체의 능력과 비교될 수 있다. 항-CD39 항체 및 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 (예를 들어, 표 1 의 돌연변이체) 간 결합의 감소는 결합 친화도의 감소 (예를 들어, 특정한 돌연변이체를 발현하는 세포의 FACS 시험과 같은 기지 방법에 의해, 또는 돌연변이체 폴리펩티드와의 결합의 Biacore 시험에 의해 측정) 및/또는 항-CD39 항체의 전체 결합 능력의 감소 (예를 들어, 폴리펩티드 농도에 따른 항-CD39 항체의 그래프에서 Bmax 의 감소로 입증) 가 존재한다는 것을 의미한다. 결합의 유의한 감소는 돌연변이된 잔기가 항-CD39 항체와의 결합에 직접적으로 관여하거나 또는 항-CD39 항체가 CD39 에 결합될 때 결합 단백질과 가까이 근접해 존재한다는 것을 의미한다.

[0108] 일부 실시형태에서, 결합의 유의한 감소는 항-CD39 항체 및 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 간 결합 친화도 및/또는 능력이 항체 및 야생형 CD39 폴리펩티드 간 결합에 비해서 40% 초과, 50% 초과, 55% 초과, 60% 초과, 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과 또는 95% 초과까지 감소된다는 것을 의미한다. 일정 실시형태에서, 결합은 검출가능한 한계치 미만으로 감소된다. 일부 실시형태에서, 결합의 유의한 감소는 돌연변이체 CD39 폴리펩티드에 대한 항-CD39 항체의 결합이 항-CD39 항체와 야생형 CD39 폴리펩티드 간에 관찰된 결합의 50% 미만 (예를 들어, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% 또는 10% 미만)일 때 입증된다.

[0109] 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399 에 의해 결합되는 아미노산 잔기를 포함하는 절편 내 잔기가 상이한 아미노산으로 치환된 것인 돌연변이체 CD39 폴리펩티드에 대해 유의하게 더 낮은 결합을 나타낸다.

[0110] 일부 실시형태에서, 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399 에 의해 결합되는 CD39 상의 에피토프에 결합하는 항-CD39 항체 (예를 들어, I-394 이외) 가 제공된다.

[0111] 하나의 양태에서, 항체는 R138, M139 및 E142 (SEQ ID NO: 1 참조) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 (예를 들어, 잔기 중 1 개, 2 개 또는 3 개) 를 포함하는 CD39 상의 에피토프에 결합된다.

[0112] 하나의 양태에서, 항-CD39 항체는 야생형 CD39 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 1 의 CD39 폴리펩티드) 와 비교하여, R138, M139 및 E142 (SEQ ID NO: 1 참조) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1 개, 2 개 또는 3 개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드에 대해 감소된 결합 (예를 들어, 실질적으로 완전한 결합 상실) 을 나타내고; 임의로, 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: R138A, M139A 및 E142K를 갖는다. 선택적인 하나의 양태에서, 항체는 돌연변이체 19 이외의 표 1 의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 중 어느 하나에 대해 결합 상실을 갖지 않는다. 다른 선택적 양태에서, 항-CD39 항체는 야생형 CD39 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 1 의 CD39 폴리펩티드) 와 비교하여, Q96, N99, E143 및 R147 (SEQ ID NO: 1 참조) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1 개, 2 개, 3 개 또는 4 개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드에 대해 감소된 결합 (임의로 감소지만 실질적으로 완전한 결합 상실은 아니거나; 또는 임의로 실질적으로 완전한 결합 상실) 을 나타내고; 임의로, 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: Q96A, N99A, E143A 및 R147E 를 갖는다.

[0113] 하나의 양태에서, 항체는 Q96, N99, E143 및 R147 (SEQ ID NO: 1 참조) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미

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

[0114] 하나의 양태에서, 항체는 (a) R138, M139 및 E142 (SEQ ID NO: 1 참조) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 (예를 들어, 잔기 중 1 개, 2 개 또는 3 개), 및 (b) Q96, N99, E143 및 R147 로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 (예를 들어, 잔기 중 1 개, 2 개, 3 개 또는 4 개) 를 포함하는 CD39 상의 에피토프에 결합한다.

[0115] 하나의 양태에서, 항-CD39 항체는 각 경우에 야생형 CD39 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 1 의 CD39 폴리펩티드) 에 비해서, (a) Q96, N99, E143 및 R147 (SEQ ID NO: 1 참조) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1 개, 2 개, 3 개 또는 4 개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드, 및 (b) R138, M139 및 E142 (SEQ ID NO: 1) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1 개, 2 개 또는 3 개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드 둘 모두에 대해 감소된 (예를 들어, 실질적으로 완전한 상실의) 결합을 나타낸다. 임의로, (a) 의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: Q96A, N99A, E143A 및 R147E 를 갖는다. 임의로, (b) 의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: R138A, M139A 및 E142K 를 갖는다. 임의로 항체는 돌연변이체 5 및 19 이외의 표 1 의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 중 어느 하나에 대해 결합 상실을 갖지 않는다.

[0116] 하나의 양태에서, 항체는 K87, E100 및 D107 (SEQ ID NO: 1 참조) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 (예를 들어, 잔기 중 1 개, 2 개, 3 개 또는 4 개) 를 포함하는 CD39 상의 에피토프에 결합한다.

[0117] 하나의 양태에서, 항-CD39 항체는 야생형 CD39 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 1 의 CD39 폴리펩티드) 와 비교하여, K87, E100 및 D107 (SEQ ID NO: 1 참조) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1 개, 2 개, 3 개 또는 4 개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드에 대해 감소된 결합 (예를 들어, 실질적으로 완전한 결합 상실) 을 나타내고, 임의로, 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: K87A, E100A 및 D107A 를 갖는다. 임의로 항체는 돌연변이체 15 이외의 표 1 의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 중 어느 하나에 대해 결합 상실을 갖지 않는다.

[0118] 하나의 양태에서, 항체는 N371, L372, E375, K376 및 V377 (SEQ ID NO: 1 참조) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 잔기 (예를 들어, 잔기 중 1 개, 2 개, 3 개 또는 4 개) 를 포함하는 CD39 상의 에피토프에 결합한다.

[0119] 하나의 양태에서, 항-CD39 항체는 야생형 CD39 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 1 의 CD39 폴리펩티드) 와 비교하여, N371, L372, E375, K376 및 V377 (SEQ ID NO: 1 참조) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 중 1 개, 2 개, 3 개, 4 개 또는 5 개에 돌연변이를 갖는 CD39 폴리펩티드에 대해 감소된 (예를 들어, 실질적으로 완전한 상실의) 결합을 나타내고, 임의로, 돌연변이체 CD39 폴리펩티드는 돌연변이: N371K, L372K, E375A, K376G 및 V377S, 및 잔기 376 및 377 사이에 발린의 삽입을 갖는다. 임의로 항체는 돌연변이체 11 이외의 표 1 의 돌연변이체 CD39 폴리펩티드 중 어느 하나에 대해 결합 상실을 갖지 않는다.

[0120] 항-CD39 항체는 예를 들어 아미노산 서열: DYNMH (SEQ ID NO: 5), 또는 이의 적어도 4 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR1; 아미노산 서열: YIVPLNGGSTFNQKFKG (SEQ ID NO: 6), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR2; 아미노산 서열: GGTRFAY (SEQ ID NO: 7), 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR3; 아미노산 서열: RASESVDNFGVSFMY (SEQ ID NO: 8), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR1; 아미노산 서열: GASNQGS (SEQ ID NO: 9) 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR2; 및/또는 아미노산 서열: QQTKEVPYT (SEQ ID NO: 10), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7 또는 8 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산이 결실될 수 있거나 또는 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-394 의 LCDR3 영역을 포함할 수 있다. CDR 위치는 카밧 넘버링에 따를 수 있다.

[0121] 인간 sCD39 단백질의 효소 활성을 저해하는 항체의 예시적 항-CD39 VH 및 VL 쌍은 항체 I-394 의 것이고, 이의

중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 3) 에 열거되고, 이의 경쇄 가변 영역의 아미노산은 하기 (SEQ ID NO: 4) 에 열거된다. 카밧 넘버링에 따른 CDR은 SEQ ID NO: 3 및 4 에서 밑줄표시된다. 임의로, VH 및 VL 은 인간 억셉터 골격을 포함한다 (예를 들어, 도입하도록 변형됨). 하나의 실시형태에서, 본 개시의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 3 의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 VH CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 넘버링에 따름) 을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 본 개시의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 4 의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 넘버링에 따름) 을 포함한다.

[0122] I-394 VH:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT**DYNMH**WVKQSHGRTLEWIG**YIVPLNGGSTF**
NQKFKGRATLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCAR**GGTRFAY**WGQGTLVTVSA (SEQ

[0123] ID NO: 3).

[0124] I-394 VL:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC**RASESVDNFGVSFMY**WFQQKPGQPPNLLIY**GASNQGS**G
VPARFRGSGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFC**QQTKEVPYT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:

[0125] 4).

[0126] 본 공개에 따른 또다른 예시적 항-CD39 VH 및 VL 쌍은 항체 I-395 의 것이고, 이의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 11) 에 열거되고, 이의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 12) 에 열거된다. 카밧 넘버링에 따른 CDR은 SEQ ID NO: 11 및 12 에서 밑줄로 표시된다. 임의로, VH 및 VL 은 인간 억셉터 골격을 포함한다 (예를 들어, 통합하도록 변형됨). 하나의 실시형태에서, 본 공개의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 11 의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 VH CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 넘버링에 따름) 을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 본 공개의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 12 의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 넘버링에 따름) 을 포함한다.

[0127] I-395 VH:

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKASGYTFT**DYNMH**WVKKNHGKGLEWIG**YINPNNGGTT**
YNQKFKGKATLTVNTSSKTAYMELRSLTSEDSAVYYCTR**GGTRFAS**WGQGTLVTVSA

[0128] (SEQ ID NO: 11).

[0129] I-395 VL:

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISC**RASESVDNYGISFMY**WFQQKPGQPPKLLIY**AASTQGS**G
VPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC**QQSKEVPFT**FGSGTKLEIK

[0130] (SEQ ID NO: 12).

[0131] 항-CD39 항체는 예를 들어 아미노산 서열: DYNMH (SEQ ID NO: 13), 또는 이의 적어도 4 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395 의 HCDR1; 아미노산 서열: YINPNNGGTTYNQKFKG (SEQ ID NO: 14), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395 의 HCDR2; 아미노산 서열: GGTRFAS (SEQ ID NO: 15), 또는 이의 적어도 4, 5, 6 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395 의 HCDR3; 아미노산 서열: RASESVDNYGISFMY (SEQ ID NO: 16), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395 의 LCDR1; 아미노산 서열: AASTQGS (SEQ ID NO: 17) 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395 의 LCDR2 영역; 및/또는 아미노산 서열: QQSKEVPFT (SEQ ID NO: 18), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7 또는 8 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 결실될 수 있거나 또는 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-395 의 LCDR3 영역을 포함할 수 있다. CDR 위치는 카밧 넘버링에 따를 수 있다.

[0132] 본 공개에 따른 또다른 예시적 항-CD39 VH 및 VL 쌍은 항체 I-396 의 것이고, 이의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 19) 에 열거되고, 이의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 20) 에 열거된다. 카밧 넘버링에 따른 CDR은 SEQ ID NO: 19 및 20 에 밑줄로 표시된다. 임의로, VH 및 VL 은 인간 억셉터 골격을 포함한다 (예를 들어, 도입하도록 변형됨). 하나의 실시형태에서, 공개의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 19 의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 VH CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 넘버링에 따름) 을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 본 공개의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 20 의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 넘버링에 따름) 을 포함한다.

[0133] I-396 VH:

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCIVSGFNIK**DTYIN**WVKQRPEQGLEWIG**RIDPANGNTKYD**
PKFQGKATMTSDTSSNTAYLHLSSLTSDDSAVYYCAR**WGYDDEEADYFDS**WGQGTTLTV
SS

[0134] (SEQ ID NO: 19).

[0135] I-396 VL:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC**RASESVDNYGISFMN**WFQQKPGQPPKLLIY**AASNQGS**G
VPARFSGSGSGTDFSLNILPMEEVDAAMYFC**HQSKEVPWT**FGGGTKLEIK

[0136] (SEQ ID NO: 20).

[0137] 항-CD39 항체는 예를 들어 아미노산 서열: DTYIN (SEQ ID NO: 21), 또는 이의 적어도 4 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR1; 아미노산 서열: RIDPANGNTKYDPKFQG (SEQ ID NO: 22), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR2; 아미노산 서열: WGYDDEEADYFDS (SEQ ID NO: 23), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR3; 아미노산 서열: RASESVDNYGISFMN (SEQ ID NO: 24), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR1; 아미노산 서열: AASNQGS (SEQ ID NO: 25) 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR2 영역; 및/또는 아미노산 서열: HQSKEVPWT (SEQ ID NO: 26), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7 또는 8 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 결실될 수 있거나 또는 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-396 의 LCDR3 영역을 포함할 수 있다. CDR 위치는 카밧 넘버링에 따를 수 있다.

[0138] 본 공개에 따른 또다른 예시적 항-CD39 VH 및 VL 쌍은 항체 I-399 의 것이고, 이의 중쇄 가변 영역의 아미노산은 하기 (SEQ ID NO: 27) 에 열거되고, 이의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 하기 (SEQ ID NO: 28) 에 열거된다. 카밧 넘버링에 따른 CDR은 SEQ ID NO: 27 및 28 에서 밑줄로 표시된다. 임의로, VH 및 VL 은 인간 억셉터 골격을 포함한다 (예를 들어, 도입하도록 변형됨). 하나의 실시형태에서, 본 공개의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 27 의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역의 VH CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 넘버링에 따름) 을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 본 공개의 항-CD39 항체는 SEQ ID NO: 28 의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역의 VL CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 (예를 들어, 카밧 넘버링에 따름) 을 포함한다.

[0139] I-399 VH:

PVQLQQPGAEVVMPGASVKLSCKASGYTFT**SFWMN**WMRQRPGQGLEWIG**EIDPSDFYTN**
SNQRFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR**GDFGWYFDV**WGTGTSVTVSS

[0140] (SEQ ID NO: 27).

[0141] I-399 VL:

EIVLTQSPTTMTSSPGEKITFTC**SASSSINSNYLH**WYQQKPGFSPKLLIY**RTSNLAS**GVPTRF
SGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYC**QQGSSLPRT**FGGGTKLEIK

[0142] (SEQ ID NO: 28).

[0143] 항-CD39 항체는 예를 들어 아미노산 서열: SFWMN (SEQ ID NO: 29), 또는 이의 적어도 4 개의 인접한 아미노산의

서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR1; 아미노산 서열: EIDPSDFYTNSNQRFKG (SEQ ID NO: 30), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR2; 아미노산 서열: GDFGWYFDV (SEQ ID NO: 31), 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 HCDR3; 아미노산 서열: SASSSINSNYLH (SEQ ID NO: 32), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR1; 아미노산 서열: RTSNLAS (SEQ ID NO: 33) 또는 이의 적어도 4, 5 또는 6 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 LCDR2 영역; 및/또는 아미노산 서열: QQGSSLPRT (SEQ ID NO: 34), 또는 이의 적어도 4, 5, 6, 7 또는 8 개의 인접한 아미노산의 서열을 포함하고, 임의로 하나 이상의 이들 아미노산은 결실될 수 있거나 또는 상이한 아미노산으로 치환될 수 있는 것인 I-399 의 LCDR3 영역을 포함할 수 있다. CDR 위치는 카밧 넘버링에 따를 수 있다.

[0144] I-394, I-395, I-396 및 I-399 항체 중 어느 하나에서, HCDR 1, 2, 3 및 LCDR 1, 2, 3 서열 (각각의 CDR 독립적으로, 또는 모든 CDR) 은 카밧 넘버링 시스템 (밑줄로 VH 및 VL 서열에 표시된 바와 같음), 코티아 (Chothia) 넘버링 시스템, 또는 IMGT 넘버링 시스템, 또는 임의의 다른 적합한 넘버링 시스템의 것으로서 명시될 수 있다.

[0145] 임의의 양태에서, 명시된 가변 영역, FR 및/또는 CDR 서열은 하나 이상의 서열 변형, 예를 들어, 치환 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이상의 서열 변형) 을 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서 치환은 보존적 변형이다.

[0146] 또다른 양태에서, 항-CD39 화합물은 본원에 개시된 항체의 VH 도메인과 적어도 약 60%, 70% 또는 80% 서열 동일성, 임의로 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VH 도메인을 포함한다. 다른 양태에서, 항-CD39 항체는 본원에 개시된 항체의 VL 도메인과 적어도 약 60%, 70% 또는 80% 서열 동일성, 임의로 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함한다.

[0147] 임의로, 본원의 임의의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 본원에 기재된 임의의 항체의 기능-보존적 변이체, 중쇄 및/또는 경쇄, CDR 또는 그의 가변 영역인 것을 특징으로 할 수 있다. "기능-보존적 변이체" 는 제한 없이, 유사한 성질 (예컨대, 예를 들어 극성, 수소 결합 잠재성, 산성, 염기성, 소수성, 방향족 등) 을 갖는 것으로 아미노산의 치환을 포함하여, 폴리펩티드의 전반적인 입체형태 및 기능을 변경시키지 않고 변화된 것이다. 보존된 것으로 표시된 것 이외의 아미노산은 단백질에서 상이할 수 있어서 유사한 기능의 임의의 2종 단백질 간 단백질 또는 아미노산 서열 유사성 백분율은 다양할 수 있고, 예를 들어 Cluster 방법과 같은 정렬 계획에 따라 확인시 70% 내지 99% 일 수 있고, 여기서 유사성은 MEGALIGN 알고리즘을 기반으로 한다. "기능-보존적 변이체" 는 또한 BLAST 또는 FASTA 알고리즘으로 확인시 적어도 60%의 아미노산 동일성, 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 여전히 바람직하게는 적어도 90%, 및 보다 더 바람직하게는 적어도 95% 아미노산 동일성을 갖고, 그것과 비교되는 천연 또는 부모 단백질 (예를 들어 중쇄 또는 경쇄, 또는 CDR 또는 그의 가변 영역) 과 동일하거나 또는 실질적으로 유사한 성질 또는 기능을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항체는 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399 의 중쇄 가변 영역의 기능-보존적 변이체인 중쇄 가변 영역, 및 당해 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399 의 경쇄 가변 영역의 기능-보존적 변이체인 경쇄 가변 영역을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항체는 본원에 개시된 인간 중쇄 불변 영역, 임의로 SEQ ID NOs: 44-47 중 임의의 것의 불변 영역에 융합된 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399 의 중쇄 가변 영역의 기능-보존적 변이체인 중쇄, 및 인간 Ckappa 경쇄 불변 영역에 융합된 당해 항체 I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 또는 I-399 의 경쇄 가변 영역의 기능-보존적 변이체인 경쇄를 포함한다.

[0148] *항체의 생산*

[0149] 항-CD39 항체는 당해 기술분야에 알려진 임의의 다양한 기술에 의해 생산될 수 있다. 전형적으로, 항-CD39 항체는, 각각, CD39 폴리펩티드를 포함하는 면역원으로 비-인간 동물, 예를 들어 마우스를 면역화하거나, 또는 CD39 폴리펩티드로 후보 결합 도메인의 라이브러리를 스크리닝하여 생산된다. CD39 폴리펩티드는, 각각, 인간 CD39 폴리펩티드의 전장 서열 또는 그의 단편 또는 유도체, 전형적으로 면역원성 단편, 즉, CD39 폴리펩티드를 발현하는 세포의 표면 상에 노출된 에피토프를 포함하는 폴리펩티드의 일부분을 포함할 수 있다. 그러한 단편은 전형적으로 성숙한 폴리펩티드 서열의 적어도 약 7 개의 연속적인 아미노산, 더욱더 바람직하게는 그의 적어도 약 10 개의 연속적인 아미노산을 함유한다. 단편은 전형적으로 수용체의 세포외 도메인으로부터 본

질적으로 유래된다. 하나의 실시형태에서, 면역원은 전형적으로 세포 표면에서, 지질막에 야생형 인간 CD39 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 면역원은 온전한 세포, 특히 온전한 인간 세포, 임의로 처리 또는 용해된 것을 포함한다. 또다른 실시형태에서, 폴리펩티드는 재조합 CD39 폴리펩티드이다.

[0150] 비-인간 포유동물을 항원으로 면역화하는 단계는 마우스에서 항체의 생산을 자극하기 위한 당해 기술분야에 잘 알려진 임의의 방식으로 수행될 수 있다 (참고, 예를 들어, E. Harlow and D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988), 이의 전체 공개내용은 본원에서 참조로 포함됨). 면역원은 임의로 보강제, 예컨대 완전 또는 불완전 프로인트 보강제와 함께, 완충액에 현탁 또는 용해된다. 면역원의 양, 완충액의 유형, 및 보강제의 양을 확인하기 위한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있고 임의의 방식으로 제한되지 않는다. 이들 매개변수는 상이한 면역원에 따라 상이할 수 있지만, 쉽게 설명된다.

[0151] 유사하게, 항체의 생산을 자극하기에 충분한 면역화의 위치 및 빈도가 역시 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 전형적인 면역화 프로토콜에서, 비-인간 동물은 1 일 및 다시 약 1 주 후에 항원이 복강내로 주입된다. 이후에 임의로 불완전 프로인트 보강제와 같은 보강제와 함께, 대략 20 일에 항원의 리콜 주입이 후속된다. 리콜 주입은 정맥내로 수행되고 며칠 연속으로 반복될 수 있다. 이어서 전형적으로 보강제 없이, 정맥내로 또는 복강내로, 40 일에 부스터 주입이 후속된다. 이러한 프로토콜은 약 40 일 이후에 항원 특이적 항체-생산 B 세포의 생산을 초래한다. 다른 프로토콜은 그들이 면역화에 사용되는 항원에 대해 유도된 항체를 발현시키는 B 세포의 생산을 초래한다면 역시 사용될 수 있다.

[0152] 모노클로날 항체의 경우, 비장세포는 항체-생산 하이브리도마를 형성시키기 위해서 면역화된 비-인간 포유동물로부터 단리되고 이들 비장세포와 불멸화 세포를 후속 융합시킨다. 비-인간 포유동물로부터 비장세포의 단리는 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며 전형적으로 마취시킨 비-인간 포유동물로부터 비장을 제거하는 단계, 이것을 작은 조각으로 절단하는 단계 및 비장 피막으로부터 비장세포를 세포 스트레이터의 나일론 메쉬를 통해서 적절한 완충액으로 압착하여 단일 세포 현탁액을 생산하는 단계를 포함한다. 세포를 세척하고, 원심분리시키고 임의의 적혈 세포를 용해시키는 완충액에 재현탁시킨다. 그 용액을 다시 원심분리시키고 펠렛에 남은 림프구를 최종적으로 신선한 완충액에 재현탁시킨다.

[0153] 단일 세포 현탁액으로 단리되어 존재하면, 림프구는 불멸 세포주에 융합시킬 수 있다. 이것은 전형적으로 마우스 골수종 세포주이지만, 하이브리도마를 생성시키는데 유용한 많은 다른 불멸 세포주가 당해 기술분야에 공지되어 있다. 뮤린 골수종 세포주는 제한 없이, 미국, 샌디에고 소재, Salk Institute Cell Distribution Center 에서 입수가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양 유래의 것, X63 Ag8653 및 미국, 메릴랜드, 록빌 소재 American Type Culture Collection에서 입수가능한 SP-2 세포를 포함한다. 융합은 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용해 실시된다. 그 후 최종 하이브리도마는 비융합된, 부모 골수종 세포의 성장 또는 생존율을 저해하는 하나 이상의 물질을 함유하는 선별 배지에서 성장시킨다. 예를 들어, 부모 골수종 세포가 효소 히포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 가 결여되면, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 히포잔틴, 아미놉테린 및 티미딘 (HAT 배지) 을 포함하게 될 것이고, 이러한 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0154] 하이브리도마는 전형적으로 마크로파지의 피더층 상에서 성장된다. 마크로파지는 바람직하게는 비장세포를 단리하는데 사용된 비-인간 포유동물의 한배새끼 유래이고 전형적으로 하이브리도마를 플레이팅하기 전에 수일 동안 불완전 프로인트 보강제 등으로 프라이밍된다. 융합 방법은 Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pp. 59-103 (Academic Press, 1986) 에 기재되어 있고, 이의 공개 내용은 본원에서 참조로 포함된다.

[0155] 세포는 콜로니 형성 및 항체 생산에 충분한 시간 동안 선별 배지에서 성장될 수 있게 한다. 일반적으로 이는 약 7 일 내지 약 14 일이다.

[0156] 하이브리도마 콜로니는 그 후 CD39 폴리펩티드 유전자 생성물에 특이적으로 결합하는 항체의 생성에 대해 어세이된다. 전형적으로 어세이는 비색 ELISA-유형 어세이이지만, 하이브리도마가 성장되는 웰에 적합화시킬 수 있는 임의의 어세이를 적용해도 된다. 다른 어세이는 방사성면역어세이 또는 형광 활성화 세포 분류법을 포함한다. 바람직한 항체 생성에 양성인 웰은 하나 이상의 별개 콜로니가 존재하는가를 확인하기 위해 조사된다. 하나 초과의 콜로니가 존재하면, 세포는 오직 단일 세포에서 바람직한 항체를 생성하는 콜로니가 생성되는 것을 보장하기 위해 재클로닝하고 성장시킬 수 있다. 전형적으로, 항체는 또한 CD39 폴리펩티드, 예를 들어, CD39-발현 세포에 결합하는 능력에 대해 시험될 것이다.

[0157] 모노클로날 항체를 생산하는 것으로 확인된 하이브리도마는 DMEM 또는 RPMI-1640 과 같은 적절한 배지에서 더 많은 양으로 성장시킬 수 있다. 대안적으로, 하이브리도마 세포는 동물에서 복수 종양으로서 생체내에서 성장시킬 수 있다.

[0158] 바람직한 모노클로날 항체를 생성시키도록 충분한 성장 이후에, 모노클로날 항체를 함유하는 성장 배지 (또는 복수액) 를 세포와 분리시키고 그에 존재하는 모노클로날 항체를 정제한다. 전형적으로 정제는 겔 전기영동, 투석, 단백질 A 또는 단백질 G-세파로스, 또는 고형 지지체 예컨대 아가로스 또는 세파로스 비드에 연결된 항-마우스 Ig를 사용한 크로마토그래피를 통해 달성된다 (모두 예를 들어 Antibody Purification Handbook, Biosciences, publication No. 18-1037-46, Edition AC 에 기술되어 있으며, 이의 공개 내용은 본원에 참조로 포함됨). 결합된 항체는 전형적으로 항체-함유 분획의 즉시 중화와 함께 낮은 pH 완충액 (pH 3.0 이하의 글리신 또는 아세테이트 완충액) 을 사용하여 단백질 A/단백질 G 컬럼으로부터 용리된다. 이들 분획을 모아서, 투석하고 필요에 따라 농축한다.

[0159] 전형적으로 분명한 단일 콜로니가 존재하는 양성 웰은 오직 하나의 모노클로날 항체가 검출되고 생성되는 것을 보장하기 위해 재클로닝하고 재어세이된다.

[0160] 항체는 또한 예를 들어 그 전체 공개 내용이 본원에 참조로 포함되는 Ward et al. Nature, 341 (1989) p. 544 에 공개된 바와 같이, 면역글로불린의 조합 라이브러리의 선별을 통해 생산될 수 있다.

[0161] 관심의 항원, 즉, CD39, 특히 또는 본질적으로 모노클로날 항체 I-394, I-395, I-396 또는 I-399 와 동일한 영역, 결정인자 또는 에피토프에 결합하는 하나 이상의 항체의 식별은, 항체 경쟁을 평가할 수 있는 다양한 면역학적 스크리닝 어세이 중 어느 하나를 사용하여 쉽게 확인될 수 있다. 많은 그러한 어세이는 통상적으로 수행되고, 당해 기술분야에 잘 알려져 있다 (참고, 예를 들어, 본원에 구체적으로 참조로 포함되는 1997년 8월 26일 공표된 미국 특허 No. 5,660,827).

[0162] 예를 들어, 조사하려는 시험 항체가 상이한 출처의 동물로부터 수득되거나, 또는 상이한 Ig 아이소타입인 경우에, 대조군 (예를 들어, I-394, I-395, I-396 또는 I-399) 및 시험 항체가 혼합 (또는 사전흡착)되고 CD39 폴리펩티드를 함유하는 샘플에 적용되는 단순 경쟁 어세이가 적용될 수 있다. 웨스턴 블롯 및 BIACORE 분석의 사용을 기반으로 하는 프로토콜이 이러한 경쟁 연구에서 사용하기에 적합하다.

[0163] 특정 실시형태에서, CD39 항원 샘플에 적용하기 전에 대조군 항체 (예를 들어, I-394, I-395, I-396 또는 I-399) 를 다양한 양의 시험 항체 (예를 들어, 약 1:10 또는 약 1:100) 와 일정 기간 동안 사전 혼합한다. 다른 실시형태에서, 대조군 및 다양한 양의 시험 항체는 CD39 항원 샘플에 노출 동안 단순하게 혼합될 수 있다. (예를 들어, 미결합된 항체를 제거하기 위한 분리 또는 세척 기술을 사용하여) 결합된 것과 유리 항체를 구별할 수 있고 (예를 들어, 종-특이적 또는 아이소타입-특이적 2차 항체를 사용하거나 또는 검출가능한 표지로 I-394, I-395, I-396 또는 I-399 를 특이적으로 표지하여) I-394 를 시험 항체와 구별할 수 있는 한, 시험 항체가 항원에 대한 I-394, I-395, I-396 또는 I-399 의 결합을 감소시키는지 여부를 확인할 수 있다. 완전히 무관한 항체의 부재 하에서 (표지된) 대조군 항체의 결합은 높은 값의 대조군으로서 제공될 수 있다. 낮은 값의 대조군은 표지된 (I-394, I-395, I-396 또는 I-399) 항체를 정확하게 동일한 유형 (I-394, I-395, I-396 또는 I-399) 의 미표지된 항체와 함께 인큐베이션시켜 수득될 수 있고, 여기서 경쟁이 일어나서 표지된 항체의 결합을 감소시키게 된다. 시험 어세이에서, 시험 항체의 존재 하에서 표지된 항체 반응의 유의한 감소는 표지된 (I-394, I-395, I-396 또는 I-399) 항체와 "교차-반응" 또는 경쟁하는 시험 항체를 의미한다. 약 1:10 내지 약 1:100 의 I-394, I-395, I-396 또는 I-399:시험 항체의 임의의 비율에서, CD39 항원에 대한 I-394, I-395, I-396 또는 I-399 의 결합을 적어도 약 50%, 예컨대 적어도 약 60%, 또는 보다 바람직하게 적어도 약 80% 또는 90% (예를 들어, 약 65-100%) 만큼 감소시키는 임의의 시험 항체가 선별될 수 있다. 바람직하게, 그러한 시험 항체는 CD39 항원에 대한 I-394, I-395, I-396 또는 I-399 의 결합을 적어도 약 90% (예를 들어, 약 95%) 만큼 감소시킬 것이다.

[0164] 경쟁은 또한 예를 들어 유세포측정 시험으로 평가할 수 있다. 이러한 시험에서, 소정 CD39 폴리펩티드를 보유하는 세포는 예를 들어 먼저 I-394 와 함께 인큐베이션할 수 있고, 그 후 형광색소 또는 바이오틴으로 표지된 시험 항체와 함께 인큐베이션할 수 있다. 항체는 I-394 의 포화량과 사전인큐베이션시에 수득된 결합이 I-394 와 사전인큐베이션하지 않은 항체에 의해 수득된 (형광을 통해 측정된) 결합의 약 80%, 바람직하게 약 50%, 약 40% 이하 (예를 들어, 약 30%, 20% 또는 10%) 라면 I-394 와 경쟁한다고 한다. 대안적으로, 항체는 시험 항체의 포화량과 사전인큐베이션된 세포 상에서 (형광색소 또는 바이오틴으로) 표지된 I-394 항체에 의해 수득된 결합이 시험 항체와 사전인큐베이션하지 않고 수득된 결합의 약 80%, 바람직하게 약 50%, 약 40% 이하 (예를

들어, 약 30%, 20% 또는 10%)라면 I-394 와 경쟁한다고 한다.

[0165] 항체가 에피토프 영역 내에 결합하는지 여부의 확인은 당업자에게 공지된 방식으로 수행될 수 있다. 이러한 맵핑/특징규명 방법의 일례로서, 항-CD39 항체에 대한 에피토프 영역은 각각의 CD39 단백질에서 노출된 아민/카르복실의 화학적 변형을 사용하는 에피토프 "풋-프린팅"을 통해 확인될 수 있다. 이러한 풋-프린팅 기술의 일 특정 예는 HXMS (질량 분광법으로 검출된 수소-중수소 교환) 의 사용이고, 여기서 수용체 및 리간드 단백질 아미드 양자의 수소/중수소 교환, 결합, 및 역교환이 생성되고, 단백질 결합에 참여한 골격 아미드 기는 역교환으로부터 보호되므로 중수소화된 채로 남게 될 것이다. 관련 영역은 이 시점에 펩티드 단백질가수분해, 고속 소구경 고성능 액상 크로마토그래피 분리, 및/또는 전자분무 이온화 질량 분광법을 통해 확인될 수 있다. 예를 들어, Ehring H, Analytical Biochemistry, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999), Engen, J. R. and Smith, D. L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265A 를 참조한다. 적합한 에피토프 확인 기술의 다른 예는 핵자기 공명 에피토프 맵핑 (NMR)이고, 여기서는 전형적으로 항원 결합 펩티드, 예컨대 항체와 복합체를 형성한 항원 및 유리 항원의 2차원 NMR 스펙트럼에서 신호의 위치를 비교한다. 전형적으로 항원은 15N으로 선택적으로 동위원소 표지되어서 NMR-스펙트럼에서 항원에 상응하는 신호만이 확인되고 항원 결합 펩티드로부터의 신호는 보이지 않는다. 전형적으로 항원 결합 펩티드와의 상호작용에 관여하는 아미노산으로부터 기원된 항원 신호는 유리 항원의 스펙트럼과 비교된 복합체의 스펙트럼에서 위치가 이동하게 되며, 결합에 관여된 아미노산이 이러한 방식으로 확인될 수 있다. 예를 들어, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang et al., Journal of Molecular Biology, Vol. 281 (1) pp. $6_{1-6}7$ (1998); 및 Saito and Patterson, Methods. 1996 Jun; 9 (3): 516-24 를 참조한다.

[0166] 에피토프 맵핑/특징규명은 또한 질량 분광 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, Downard, J Mass Spectrom. 2000 Apr; 35 (4): 493-503 및 Kiselar and Downard, Anal Chem. 1999 May 1; 71 (9): 1792-1801 을 참조한다. 프로테아제 분해 기술은 또한 에피토프 맵핑 및 확인에서 유용할 수 있다. 항원확인인자-관련 영역/서열은 프로테아제 분해, 예를 들어 CD39 에 대해 약 1:50 의 비율로 트립신을 사용하거나 또는 pH 7-8 에서 o/n 분해를 사용한 후에, 펩티드 확인을 위한 질량 분광법 (MS) 분석에 의해 확인될 수 있다. 항-CD39 결합제에 의한 트립신 절단으로부터 보호된 펩티드는 이후에 트립신 분해를 겪은 샘플 및 항체와 함께 인큐베이션된 후에 예를 들어 트립신으로 분해된 샘플의 비교에 의해 확인될 수 있다 (그리하여 결합제에 대한 풋프린트를 밝힘). 키모트립신, 펩신 등과 같은 다른 효소가 역시 또는 대안적으로 유사한 에피토프 특징규명 방법에서 사용될 수 있다. 게다가, 효소 분해는 잠재적인 항원 확인인자 서열이 표면 노출되지 않은 CD39 폴리펩티드의 영역 내에 존재하는 지 여부, 및 따라서 아마도 면역원성/항원성 관점에서 관련이 없는지 여부를 분석하기 위한 신속한 방법을 제공할 수 있다.

[0167] 부위-지정 돌연변이유발법은 결합 에피토프의 해명에 유용한 다른 기술이다. 예를 들어, "알라닌-스캐닝"에서, 단백질 절편 내 각각의 잔기는 알라닌 잔기로 치환되고, 결합 친화도에 대한 결과가 측정된다. 돌연변이가 결합 친화도에 유의한 감소를 야기시키면, 이것은 아마도 결합에 관여될 것이다. 구조적 에피토프에 특이적인 모노클로날 항체 (즉, 언폴딩된 단백질에 결합하지 않는 항체) 는 알라닌-치환이 단백질의 전체 폴드에 영향을 및지 않는다는 것을 검증하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, Clackson and Wells, Science 1995; 267:383-386; 및 Wells, Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:1-6 을 참조한다.

[0168] 전자 현미경이 또한 에피토프 "풋-프린팅" 에 사용될 수 있다. 예를 들어, Wang et al., Nature 1992; 355:275-278 은 천연 동부 모자이크 바이러스의 캡시드 표면 상의 Fab-단편의 물리적 풋프린트를 확인하기 위해 저온 전자 현미경, 3차원 영상 재구성법, 및 X-선 확인학의 공동 적용을 사용했다.

[0169] 에피토프 평가를 위한 "표지-무함유" 어세이의 다른 형태는 표면 플라스몬 공명법 (SPR, BIACORE) 및 반사계 간섭 분광법 (RifS) 을 포함한다. 예를 들어, Fagerstam et al., Journal Of Molecular Recognition 1990;3:208-14; Nice et al., J. Chroma-togr. 1993; 646:159-168; Leipert et al., Angew. Chem. Int. Ed. 1998; 37:3308-3311; Kroger et al., Biosensors and Bioelectronics 2002; 17:937-944 를 참조한다.

[0170] 항체와 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 에피토프와의 항체 결합은 본원에 기재된 예시적 경쟁 어세이 중 하나 이상에서 확인될 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0171] 전형적으로, 본원에 제공되는 항-CD39 항체는 각각 CD39 폴리펩티드에 대해 약 10^4 내지 약 10^{11} M^{-1} (예를 들어, 약 10^8 내지 약 10^{10} M^{-1}) 의 범위의 친화도를 갖는다. 예를 들어, 특정한 양태에서 항-CD39 항체는 CD39 각각에 대해서, 예를 들어, 표면 플라스몬 공명 (SPR) 스크리닝 (예컨대 BIAcore™ SPR 분석 장치를 사용한 분석

에 의함)으로 확인된, 1 x 10^{-9} M 미만의 평균 해리 상수 (K_D) 를 갖는다. 보다 특정한 예시적 양태에서, 항-CD39 항체는 각각 CD39 에 대해서, 약 1 x 10^{-8} M 내지 약 1 x 10^{-10} M, 또는 약 1 x 10^{-9} M 내지 약 1 x 10^{-11} M 의 KD 를 갖는다. 하나의 실시형태에서, 결합은 1가 결합이다. 하나의 실시형태에서, 결합은 2가 결합이다.

[0172] 항체는 예를 들어 약 100, 60, 10, 5, 또는 1 나노몰 이하 (즉, 더 양호한 친화도), 바람직하게는 나노몰 이하 또는 임의로 약 500, 200, 100 또는 10 피코몰 이하의 평균 KD 를 특징으로 할 수 있다. KD 는 예를 들어 재조합적으로 생산된 인간 CD39 단백질을 칩 표면 상에 고정시킨 후에, 용액 중에 시험하려는 항체를 도포하여 확인될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 방법은 (b) CD39 와의 결합에 대해 항체 I-394 와 경쟁할 수 있는 항체를 선별하는 단계를 추가로 포함한다.

[0173] 임의의 실시형태의 하나의 양태에서, 본 방법에 따라 제조된 항체는 모노클로날 항체이다. 다른 양태에서, 본원의 방법에 따라 항체를 생성시키는데 사용되는 비-인간 동물은 포유동물, 예컨대 설치류, 소, 돼지, 가금류, 낙타과, 말, 토끼, 염소 또는 양이다.

[0174] CD39 폴리펩티드 상에 존재하는 에피토프에 결합하는 항체를 코딩하는 DNA 를 하이브리도마로부터 단리하고 적절한 숙주에 형질감염을 위한 적절한 발현 벡터에 위치시킨다. 그 후 숙주는 항체, 또는 이의 변이체, 예컨대 모노클로날 항체의 인간화 버전, 항체의 활성 단편, 항체의 항원 인식 부분을 포함하는 키메라 항체, 또는 검출가능한 모이어티를 포함하는 버전의 재조합 생산에 사용된다.

[0175] 본 공개의 모노클로날 항체, 예를 들어, 항체 I-394 를 코딩하는 DNA 는 통상의 절차를 사용하여 (예를 들어, 뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 쉽게 단리할 수 있고 시퀀싱할 수 있다. 단리되면, DNA 는 발현 벡터에 위치시킬 수 있고, 이것을 다르게 면역글로불린 단백질을 생성시키지 않는 숙주 세포 예컨대 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 골수종 세포에 형질감염시켜서, 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성을 수득한다. 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 이러한 DNA 서열은 임의의 다수 목적을 위해서, 예를 들어 항체의 인간화된, 단편 또는 유도체의 생산, 또는 예를 들어 항체의 결합 특이성의 최적화를 위해 항원 결합 부위에서, 항체의 서열 변형을 위해, 변형될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 코딩하는 단리된 핵산 서열, 뿐만 아니라 그러한 핵산을 (예를 들어, 그것의 게놈에) 포함하는 재조합 숙주 세포이다. 항체를 코딩하는 DNA 의 박테리아에서의 재조합 발현은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다 (참고, 예를 들어, Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5, pp. 256 (1993); 및 Pluckthun, Immunol. 130, p. 151 (1992)).

[0176] 항체의 단편 및 유도체 (이 용어는 다르게 명시하거나 문맥에서 명확하게 반박하지 않으면, 본 출원에서 사용시 용어 "항체" 또는 "항체들" 에 포괄됨)는 당해 기술분야에 공지된 기술로 제조될 수 있다. "단편" 은 온전한 항체의 일부분, 일반적으로 항원 결합 부위 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', Fab'-SH, F (ab')2, 및 Fv 단편; 디아바디; 제한 없이 (1) 단일-사슬 Fv 분자 (2) 회합된 중쇄 모이어티 없이, 오직 하나의 경쇄 가변 도메인, 또는 경쇄 가변 도메인의 3 개 CDR 을 함유하는 이의 단편을 함유하는 단일-사슬 폴리펩티드 및 (3) 회합된 경쇄 모이어티 없이, 오직 하나의 중쇄 가변 영역, 또는 중쇄 가변 영역의 3 개 CDR 을 함유하는 이의 단편을 함유하는 단일-사슬 폴리펩티드를 포함하는, 인접한 아미노산 잔기의 하나의 미개재 서열로 이루어진 1차 구조를 갖는 폴리펩티드인 임의의 항체 단편 (본원에서는 "단일-사슬 항체 단편" 또는 "단일-사슬 폴리펩티드" 라고 함); 및 항체 단편으로 형성된 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항체를 포함한다. 특히, 나노바디, 도메인 항체, 단일 도메인 항체 또는 "dAb" 를 포함한다.

[0177] 하나의 양태에서, 작용제는 완전한 인간 항체, 인간화 항체, 및 키메라 항체로부터 선택되는 항체이다.

[0178] 하나의 양태에서, 작용제는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로부터 선택된 불변 도메인을 포함하는 항체의 단편이다. 하나의 양태에서, 작용제는 Fab 단편, Fab' 단편, Fab'-SH 단편, F(ab)2 단편, F(ab')2 단편, Fv 단편, 중쇄 Ig (라마 또는 낙타 Ig), V_{HH} 단편, 단일 도메인 FV, 및 단일-사슬 항체 단편으로부터 선택된 항체 단편이다.

하나의 양태에서, 작용제는 scFV, dsFV, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 카파 바디, IgNAR; 및 다중특이적 항체로부터 선택된 합성 또는 반합성 항체-유도 분자이다. 하나의 양태에서, 항체는 적어도 부분적으로 정제된 형태이다. 하나의 양태에서, 항체는 본질적으로 단리된 형태이다.

[0179] 항-CD39 작용제 예컨대 항체는 약학적 제형에 도입되어 1 mg/mℓ 내지 500 mg/mℓ 의 농도로 포함되고, 여기서 상

기 제제는 2.0 내지 10.0 의 pH 를 갖는다. 제제는 완충제 시스템, 보존제(들), 등장화제(들), 킬레이트화제(들), 안정화제 및 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 약학적 제형은 수성 제제, 즉 물을 포함하는 제제이다. 이러한 제제는 전형적으로 용액 또는 현탁액이다. 추가 실시형태에서, 약학적 제형은 수성 용액이다. 용어 "수성 제제" 는 적어도 50 %w/w 의 물을 포함하는 제제로서 정의된다. 유사하게, 용어 "수성 용액" 은 적어도 50 %w/w 의 물을 포함하는 용액으로서 정의되고, 용어 "수성 현탁액" 은 적어도 50 %w/w 의 물을 포함하는 현탁액으로서 정의된다.

[0180] 다른 실시형태에서, 약학적 제형은 동결-건조된 제제이고, 여기에 의사 또는 환자가 사용 전에 용매 및/또는 희석제를 첨가한다.

[0181] 다른 실시형태에서, 약학적 제형은 임의의 사전 용해 없이 사용을 위해 준비된 건조 제제 (예를 들어, 동결-건조 또는 분무-건조) 이다.

[0182] 추가의 양태에서, 약학적 제형은 이러한 항체의 수성 용액, 및 완충제를 포함하고, 여기서 항체는 1 mg/mℓ 이상의 농도로 존재하고, 상기 제제는 약 2.0 내지 약 10.0 의 pH 를 갖는다.

[0183] 또다른 실시형태에서, 제제의 pH는 약 2.0 내지 약 10.0, 약 3.0 내지 약 9.0, 약 4.0 내지 약 8.5, 약 5.0 내지 약 8.0, 및 약 5.5 내지 약 7.5 로 이루어지는 목록으로부터 선택되는 범위이다.

[0184] 추가 실시형태에서, 완충제는 소듐 아세테이트, 소듐 카보네이트, 시트레이트, 글리실글리신, 히스티딘, 글리신, 리신, 아르기닌, 소듐 디히드로겐 포스페이트, 디소듐 히드로겐 포스페이트, 소듐 포스페이트, 및 트리스(히드록시메틸)-아미노메탄, 비신, 트리신, 말산, 숙시네이트, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 아스파르트산 또는 이의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 이들 특별한 완충제의 각각의 하나가 본 발명의 대안적인 실시형태를 구성한다.

[0185] 추가의 실시형태에서, 제형은 약학적으로 허용가능한 보존제를 추가로 포함한다. 추가의 실시형태에서, 제형은 등장화제를 추가로 포함한다. 추가의 실시형태에서, 제형은 또한 킬레이트화제를 포함한다. 추가의 실시형태에서 제형은 안정화제를 추가로 포함한다. 추가의 실시형태에서, 제형은 계면활성제를 추가로 포함한다. 편의를 위해 Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th edition, 1995 를 참조한다.

[0186] 다른 성분들이 퀩티드 약학적 제형에 존재하는 것이 가능하다. 이러한 추가의 성분은 습윤제, 유화제, 항산화제, 증량제, 등장성 개질제, 킬레이트화제, 금속 이온, 유성 비히클, 단백질 (예를 들어, 인간 혈청 알부민, 젤라틴 또는 단백질) 및 쌍성이온 (예를 들어, 아미노산 예컨대 베타인, 타우린, 아르기닌, 글리신, 리신 및 히스티딘) 을 포함할 수 있다. 물론, 이러한 추가 성분은 본 발명의 약학적 제형의 전반적인 안정성에 부정적으로 영향을 미쳐서는 안된다.

[0187] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여는 몇몇 투여 경로, 예를 들어, 정맥내를 통해서일 수 있다. 적합한 항체 제형은 또한 이미 개발된 다른 치료적 모노클로날 항체에 대한 경험을 조사하여 확인할 수 있다. 몇몇 모노클로날 항체가 임상적 상황에서 효율적인 것으로 확인되었는데, 예컨대 리툭산 (리툭시맙), 허셉틴 (트라스투주맙), 졸레어 (오말리주맙), 벡사 (토시투모맙), 캄파트 (알렘투주맙), 제발린, 온코림 및 유사한 제형가 본 발명의 항체와 사용될 수 있다.

[0188] 또한 제공되는 것은 상기 방법에서 사용하기 위해 적합화된 치료적 유효량으로 항-CD39 항체, 및 종양 세포로부터 ATP 방출을 유도하는 작용제, 및 약학적으로-허용가능한 담체를 함유하는 약학적 조성물을 포함하는 키트이다. 키트는 임의로 또한 예를 들어 전문가 (예를 들어, 의사, 간호사, 또는 환자) 가 암 (예를 들어, 고형 종양) 을 갖는 환자에게 조성물을 투여하기 위해서 그에 함유된 조성물을 투여할 수 있도록, 투여 스케줄을 포함하는 설명서를 포함할 수 있다. 키트는 또한 시린지를 포함할 수 있다.

[0189] 임의로, 키트는 상기 제공된 방법에 따른 단일 투여를 위한 항-CD39 항체 또는 종양 세포로부터 ATP 방출을 유도하는 작용제 각각의 유효량을 함유하는 단일 용량 약학적 조성물의 다중 패키지를 포함한다. 약학 조성물(들)을 투여하는데 필요한 장비 또는 장치가 또한 키트에 포함될 수도 있다. 예를 들어, 키트는 항-CD39 항체 및 종양 세포로부터 ATP 방출을 유도하는 작용제의 일정량을 함유하는 하나 이상의 사전 충전된 시린지를 제공할 수 있다.

[0190] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 인간 환자에서 암을 치료하기 위한 키트를 제공하며, 키트는 하기를 포함한다:

[0191] (a) sCD39 의 활성을 중화시키는 항-CD39 항체의 1회 용량, 여기에서 임의로 항체는 항체 I-394 의 중쇄 가변 영역의 과가변 영역 (예를 들어, CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인), 및 항체 I-394 의 경쇄 가변 영역의 과가변 영역 (예를 들어, CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인) 을 포함함;

[0192] (b) 종양 세포로부터 ATP 방출을 유도하는 작용제의 1회 용량; 및

[0193] (c) 임의로, 본원에 기재된 임의의 방법에서 항-CD39 항체 및 종양 세포로부터 ATP 방출을 유도하는 작용제를 사용하는 것에 관한 지침.

[0194] **악성종양의 진단, 예후 및 치료**

[0195] 본원에 기재되는 것은 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제의 활성을 강화시키기 위한 항-CD39 항체의 사용을 통해 개체에서 암의 진단, 예후, 모니터링, 치료 및 예방에 유용한 방법이다.

[0196] 세포외 ATP 는 스트레스 (기계적, 저장성 또는 저산소성) 의 경우에 또는 세포 사멸의 경우에 종양 세포로부터 방출된다. 괴사는 전체 세포 내용물의 방출을 통한 ATP 의 수동 방출을 선호하는 반면, 세포자멸사는 파넥신1 (ATP 수송체) 을 절단 및 활성화시키는 캐스파제 3 및 9 의 활성화를 통한 ATP 의 방출을 선호한다. 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제의 예는 화학요법, 방사선요법, 및 보다 일반적으로, 세포자멸사를 유도하여 ATP 방출을 촉진하는 작용제를 포함할 수 있다. ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제는 면역원성 세포 사망을 유도하는 것이 밝혀졌다. 예를 들어, 실질적 ATP 방출은 안트라사이클린, 옥살리플라틴, 시스플라틴 및 X-선, PARP 저해인자, 탁산, 안트라사이클린, DNA 손상제, 캄프토테신, 에포틸론, 마이토마이신, 콤브레타스타틴, 빈카 알칼로이드, 질소 머스타드, 메이탄시노이드, 칼리케아마이신, 듀오카르마이신, 튜불라이신, 돌라스타틴 및 아우리스타틴, 에네디인, 아마톡신, 피롤로벤조디아제핀, 에틸렌이민, 방사선동위원소, 치료적 단백질 및 펩티드, 및 독소 또는 그의 단편에 의해 유도될 수 있다.

[0197] ATP 는 또한 암 세포의 표면에서 발현되는 항원 (예를 들어 종양 항원) 에 결합하는 고갈성 항체, 예를 들어 ATP 방출을 유도하는 화학치료제와 커플링된 항체, 세포자멸사를 매개할 수 있는 항체 또는 암 세포를 향해 항체-의존적 세포-매개되는 세포독성 (ADCC) 을 유도하는 항체 (예를 들어 ADCC 를 매개하기 위해서 항체는 인간 IgG1 아이소타입의 Fc 도메인을 갖는다) 의 투여를 통해 방출될 수 있다.

[0198] 안트라사이클린은, 예를 들어 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신 또는 이다루비신, 임의로 그의 리포솜 제형, 예를 들어 리포솜 다우노루비신 예컨대 DaunoXome™ 또는 Vyxeos™ 또는 CPX-351 (시타라빈 및 다우노루비신의 조합) 을 포함한다. 안트라사이클린은, 예를 들어 급성 골수성 백혈병 (AML), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 및 카포시 육종을 포함하는, 고형 및 혈액 악성종양을 치료하는데 널리 사용된다. 독소루비신 및 그것의 유도체, 에피루비신은 유방암, 소아기 고형 종양, 연조직 육종, 및 침습 림프종에서 사용된다. 다우노루비신은t 급성 림프모구 또는 골수모구 백혈병을 치료하는데 사용되고, 그것의 유도체, 이다루비신은 다발성 골수종, 비-호지킨 림프종, 및 유방암에서 사용된다. 네모루비신은 간세포 암종의 치료에 사용되고, 픽산트론은 비-호지킨 림프종의 제 2 선 치료로서 사용된다. 사바루비신은 비-소세포 폐암, 호르몬 난치성 전이성 전립선 암, 및 백금- 또는 탁산-저항성 난소암에 사용된다. 발루비신은 방광암의 국소 치료에 사용된다.

[0199] 백금제는, 예를 들어, 옥살리플라틴, 시스플라틴, 카르보플라틴, 네다플라틴, 페난트리플라틴, 피코플라틴, 사트라플라틴을 포함한다.

[0200] 탁산은, 예를 들어, 파클리탁셀 (Taxol) 및 도세탁셀 (Taxotere) 을 포함한다.

[0201] DNA 손상제는, 예를 들어, DNA 중격제, 예를 들어 세포의 DNA 구조 내로 자신을 삽입하고 DNA 에 결합하여, 결국 DNA 손상을 야기하는 작용제 (예를 들어 다우노루비신) 를 포함한다. 화합물은 국소이성질화효소 저해인자, 국소이성질화효소 (국소이성질화효소 I 및 II) 의 작용을 차단하는 화학적 화합물을 포함한다. 그러한 화합물은 광범위한 고형 종양 및 혈액 악성종양, 특히 림프종에 사용된다. 국소이성질화효소 I 저해인자는 캄프토테신, 예를 들어 이리노테칸 (대장암의 치료에 대해 승인됨), 토포테칸 (난소암 및 폐암의 치료에 대해 승인됨), 캄프토테신, 라멜라린 D, 인데노이소퀴놀린, 인디미테칸을 포함한다. 추가로 캄트프테신은 실라테칸, 코시테칸, 엑사테칸, 루르토테칸, 기마테칸, 벨로테칸, 및 루비테칸을 포함한다. 국소이성질화효소 II 저해인자는 예를 들어 에토포시드 (VP-16), 테니포시드, 독소루비신, 다우노루비신, 미토크산트론, 암사크린, 엘립티신, 아우린트리카르복시산, 및 HU-331, 칸나비디올로부터 합성된 퀴놀린을 포함한다.

[0202] PARP 저해인자는 암 세포에서 세포 사망을 괴사로부터 카스파아제-독립적 세포자멸사로 기울어지게 하는 것으로

보고된 바 있다. PARP 의 저해는 세포내 ATP 의 증가를 초래하며, 이는 결국 세포자멸사에서 ATP 의 세포외 방출을 초래하는 것으로 여겨진다. 폴리(ADP-리보오스) 중합효소 (PARP) 패밀리의 효소는 NAD+ 를 니코틴아미드 및 ADP-리보오스로 전환시켜, 크로마틴과 통상적으로 연합되는 다수의 수용체 단백질의 글루탐산 잔기 상에 긴 분지형 (ADP-리보오스) 중합체를 형성한다. PARP-1, 가장 풍부한 PARP, 은 NAD+ 를 기질로서 사용하여 그것의 표적 단백질 상에서 폴리 (ADP-리보오스) 의 형성을 촉매작용하는 핵 효소이다. PARP 저해인자는 전형적으로 핵심 약물 분자 구조로서 벤족사졸 또는 벤즈아미드 모이어티를 함유하고, 다양한 벤즈아미드-유도체가 보고되었다. 본 공개에 따라 사용될 수 있는 승인된 PARP 저해인자의 예는 올라파립 (AZD-2281, Lynparza®, Astra Zeneca, 난소암에 대해 승인됨, 또한 유방암, 전립선암 및 대장직장암의 치료에 효과적임), 루카파립 (PF-01367338, Rubraca®, Clovis Oncology, 난소암에 대해 승인됨), 니라파립 (MK-4827, Zejula®, Tesaro, 상피, 난소, 나팔관, 및 원발 복막 암에 대해 승인됨) 을 포함한다. 본 공개에 따라 사용될 수 있는 PARP 저해인자의 추가 예는 탈라조파립 (BMN-673, BioMarin Pharmaceutical Inc., Pfizer, 혈액 및 진행성 또는 재발성 고형 종양을 위함), 벨리파립 (ABT-888, AbbVie 에 의해 개발됨, 난소암, 삼중-음성 유방암 및 비-소세포 폐암 (NSCLC), 흑색종을 위함), CEP 9722 (비-소세포 폐암 (NSCLC) 을 위함), E7016 (Eisai 에 의해 개발됨, 흑색종을 위함), 및 파미파립 (BGB-290) (Beigene 에 의해 개발됨, 다양한 고형 종양 악성종양을 위함) 을 포함한다.

[0203] 에포틸론은 예를 들어, 에포틸론 B 및 그것의 다양한 유사체, 예를 들어 익사베필론 (BMS-247550) (유방암의 치료에 대해 승인됨) 을 포함한다. 빈카 알칼로이드는, 예를 들어, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 및 비노렐빈을 포함한다. 질소 머스타드는, 예를 들어, 시클로포스파미드, 클로람부실, 우라무스틴, 이포스파미드, 멜팔란, 및 벤다무스틴을 포함한다. 메이탄시노이드는, 예를 들어, 안사미토신, 또는 메르탄신 (DM1) 또는 DM4 (Immunogen Inc 에 의해 개발됨) 를 포함한다.

[0204] 작용제는 임의의 적합한 구성 또는 제형으로 존재할 수 있으며, 예를 들어 유리 화합물로서 또는 접합체의 일부로서, 캡슐화된 (예를 들어 리포솜에), 나노입자-제형을 포함하며, 각 경우에 임의로 추가로 부가적 약학적으로 활성제와 조합된다. 작용제는 간편하게는 표적화 모이어티에, 예컨대 면역접합체에 접합될 수 있다. 용어 "면역접합체" 및 "항체 접합체" 는 호환되게 사용되고, 항원 결합제, 예를 들어, 항체 결합 단백질 또는 또 다른 모이어티 (예를 들어, 세포독성제, 본원에 기재된 ATP 방출을 유도하는 화학치료제) 에 접합된 항체를 나타낸다. 세포독성제에 접합된 항원 결합제를 포함하는 면역접합체는 또한 "항체 약물 접합체" 또는 "ADC" 로서 언급될 수 있다.

[0205] 본원에 기재된 치료 섭생법 및 방법이 고형 종양의 치료에 특히 유용하지만, 본원에 기재된 치료 섭생법 및 방법은 또한 다양한 혈액학적 암에도 사용할 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물은 예를 들어 제한 없이 방광, 유방, 결장, 신장, 간, 폐, 난소, 자궁, 전립선, 췌장, 위, 자궁경부, 갑상선, 두경부 (두경부 편평상피세포 암종), 및 피부 (예를 들어, 흑색종) 의 암을 포함하는, 암종; 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 모발세포 림프종 및 버킷 림프종, 및 다발성 골수종을 포함한, 림프 계통의 조혈 종양; 급성 및 만성 골수성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 및 골수이형성 증후군을 포함한, 골수 계통의 조혈 종양; 섬유육종 및 횡문근육종을 포함한, 중간엽 기원의 종양; 흑색종, 정상피종, 기형-암종, 신경아세포종 및 신경교종을 포함하는, 기타 종양; 성상세포종, 신경아세포종, 신경교종, 및 신경초종을 포함한, 중추 및 말초 신경계의 종양; 섬유육종, 횡문근육종, 및 골육종을 포함한, 중간엽 기원의 종양; 및 흑색종, 색소성 건피증, 각질가시세포종, 정상피종, 및 갑상선 여포암을 포함한 기타 종양을 포함한 다양한 암 및 다른 증식성 질환의 치료에 이용된다.

[0206] 본원에서 제공되는 암의 치료를 위한 조합 요법은 암에 걸린 대상체를 치료하기 위한 중화 항-CD39 작용제 (예를 들어, 항체) 및 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제의 투여를 수반한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명은 고형 종양 (예를 들어, 고형 종양, 진행성 난치성 고형 종양) 을 갖는 대상체 또는 혈액 종양을 갖는 대상체를 치료하기 위해, 조합으로 사용하기 위한, 항-CD39 항체 및 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 처치 (예를 들어, 작용제) 를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 암을 갖는 개체를 치료하는데 사용하기 위한, 항-CD39 항체 (예를 들어 본원에 기재된 추가의 특징을 가짐) 이며, 치료는 개체에게 항-CD39 항체를 암성 세포에서 세포자멸사를 유도하기 위한 수단과의 조합으로 투여하는 것을 포함한다 (예를 들어, 암성 세포에서 ATP 의 세포외 방출를 유도하기 위해서). 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 암을 갖는 개체를 치료하는데 사용하기 위한, 항-CD39 항체 (예를 들어 본원에 기재된 추가의 특징을 가짐) 이며, 치료는 개체에게 항-CD39 항체를 (a) 암성 세포의 세포자멸사를 유도하기 위한 수단 (예를 들어 작용제 또는 처치) 및 (b) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물과의 조합으로 투여하는 것을 포함한다. 하나의

실시형태에서, 제공되는 것은 암을 갖는 개체를 치료하는데 사용하기 위한, 항-CD39 항체 (예를 들어 본원에 기재된 추가의 특징을 가짐) 이며, 치료는 개체에게 항-CD39 항체를 (a) 암성 세포에서 ATP 의 세포외 방출을 유도하기 위한 수단 (예를 들어 및 작용제 또는 처치) 및 (b) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물과의 조합으로 투여하는 것을 포함한다.

[0207] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 고형 종양을 갖는 개체를 치료하기 위한 백금제 (예를 들어 옥살리플라틴, 시스플라틴, 카르보플라틴, 네다플라틴, 페난트리플라틴, 피코플라틴, 사트라플라틴, 또는 백금제를 포함하는 조합 섭생법) 와의 조합으로 사용하기 위한 항-CD39 항체를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 고형 종양은 폐암, 편평상피 폐암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 난소암, 암종, 두경부 편평상피 세포 암종 (HNSCC), 대장직장암, 요로상피암, 방광암, 자궁경부 암, 위암, 식도암 또는 유방암이다. 하나의 실시형태에서, 백금제를 포함하는 조합 섭생법은 FOLFOX (폴린산, 5-Fu 및 옥살리플라틴) 이다. 하나의 실시형태에서, 백금제를 포함하는 조합 섭생법은 카르보플라틴 및 탁산 (예를 들어 파클리탁셀) 을 포함한다.

[0208] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 고형 종양, 예를 들어 난소암, 유방암을 갖는 개체를 치료하기 위한, 탁산제 (예를 들어 파클리탁셀 (Taxol™) 또는 도세탁셀 (Taxotere™)) 과의 조합으로 사용하기 위한 항-CD39 항체를 제공한다.

[0209] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 고형 종양, 예를 들어 난소암을 갖는 개체를 치료하기 위한 겜시타빈과의 조합으로 사용하기 위한 항-CD39 항체를 제공한다.

[0210] 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 고형 종양, 예를 들어 난소암, 유방암, 비-소세포 폐암, 대장직장암, 전립선 암, 연조직 육종 또는 방광암을 갖는 개체를 치료하기 위한, 안트라사이클린제 (예를 들어 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신 또는 이다루비신) 와의 조합으로 사용하기 위한 항-CD39 항체이다. 하나의 실시형태에서, 본 발명은 혈액 종양, 예를 들어 AML, 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 림프종, 급성 림프모구, 골수모구 백혈병, 다발성 골수종 또는 비-호지킨 림프종을 갖는 개체를 치료하기 위한, 안트라사이클린제 (예를 들어 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신 또는 이다루비신) 와의 조합으로 사용하기 위한 항-CD39 항체를 제공한다.

[0211] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 고형 종양, 예를 들어 상피 암, 난소암, 유방암, 전립선 암, 대장직장암, 나팔관 암, 복막 암, 폐암, 비-소세포 폐암 (NSCLC) 또는 흑색종을 갖는 개체를 치료하기 위한, PARP 저해제 (예를 들어 PARP-1 저해인자, 올라파립, 루카파립, 니라파립, 탈라조파립, 벨리파립, CEP 9722, E7016 또는 파미파립) 와의 조합으로 사용하기 위한 항-CD39 항체를 제공한다.

[0212] 본원에 기재된 조합 치료는, 특히 난소암, 위암 및 식도암을 포함하는, CD39 의 높은 발현을 특징으로 하는 암의 치료 (개체에서 CD39 의 발현 또는 수준을 평가하는 사전 단계의 존재 또는 부재 하에) 에서 특히 효과적일 수 있다.

[0213] 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 난소암을 갖는 개체를 치료하기 위한, 백금제 (예를 들어 카르보플라틴) 와의 조합으로, 및 임의로 추가로 겜시타빈과의 조합으로 사용하기 위한 항-CD39 항체이다.

[0214] 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 위암 또는 식도암을 갖는 개체를 치료하기 위한, 백금제 (예를 들어 옥살리플라틴) 와의 조합으로 사용하기 위한 항-CD39 항체이며, 임의로 항-CD39 항체는 FOLFOX 섭생법 (폴린산, 5-Fu 및 옥살리플라틴) 과의 조합으로 사용된다.

[0215] 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 NSCLC 을 갖는 개체를 치료하기 위한, 백금제 (예를 들어 카르보플라틴) 와의 조합으로, 및 임의로 추가로 탁산 (예를 들어 파클리탁셀) 과의 조합으로 사용하기 위한 항-CD39 항체이며, 임의로 NSCLC 은 편평상피 세포 폐암이다.

[0216] 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 FOLFOX 와의 조합으로 사용하기 위한 항-CD39 항체이다.

[0217] 하나의 실시형태에서, 고형 종양은 난소암이고, 개체는 옥살리플라틴 또는 카르보플라틴과의 조합으로, 임의로 추가로 겜시타빈과의 조합으로 항-CD39 항체로 치료된다. 임의로, 본원의 임의의 실시형태에서, 난소암은 백금-저항성 난소암이다. 백금-저항성 난소암을 갖는 개체는 예를 들어 진행된, 재발된 또는 항-CD39 항체를 포함하지 않는 백금제 함유 치료적 섭생법을 이용하는 사전 치료에 응답하지 않은 암을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다. 또다른 실시형태에서, 난소암은 백금-민감성 난소암으로서 특징지어질 수 있다.

[0218] 항-CD39 항체를 수반하는 조합 요법은 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하고/하거나 종양 세포의 사망을 유도하는 작용제 또는 처치의 효과를 증강시키기 위해 유리하게 사용될 수 있다. 이는, 예를 들어, 종

양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하고/하거나 종양 세포의 사망을 유도하는 작용제 또는 처치에 저항성인 암 (예를 들어, 폐암, 난소암, 대장직장암, 위암, 식도암) 을 갖는 개체에서 유용할 수 있다. 작용제 또는 처치에 저항성인 암을 갖는 개체는 예를 들어 진행된, 재발된 또는 그러한 작용제 또는 처치를 이용하는 사전 치료에 응답하지 않은 암을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다 (또는 그러한 작용제 또는 처치를 포함하는 치료적 섭생법, 여기에서 섭생법은 항-CD39 항체를 포함하지 않는다).

[0219] 예를 들어, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 특정 클래스의 일원 (예를 들어 탁산, 백금제, PARP 저해인자, 또는 이를 포함하는 조합 섭생법) 에 저항성인 암 (예를 들어, 유방암, 난소암, 대장직장암, 위암, 식도암) 을 갖는 개체는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 상기 클래스의 작용제와의 조합으로 항-CD39 항체로 처리될 수 있다. 예를 들어, 하나의 실시형태에서, 탁산-저항성 암을 갖는 개체를 치료하기 위해, 항-CD39 항체는 탁산과의 조합으로 사용될 수 있다. 또다른 예에서, 백금제-저항성 암을 갖는 개체를 치료하기 위해, 항-CD39 항체는 백금제와의 조합으로 사용될 수 있다. 또다른 예에서, PARP 저해인자-저항성 암을 갖는 개체를 치료하기 위해, 항-CD39 항체는 PARP 저해인자와의 조합으로 사용될 수 있다.

[0220] 또다른 실시형태에서, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 특정 클래스의 일원 (예를 들어 탁산, 백금제, PARP 저해인자, 또는 이를 포함하는 조합 섭생법) 에 저항성인 암을 갖는 개체는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 상이한 클래스의 작용제와의 조합으로 항-CD39 항체로 처리될 수 있다. 예를 들어, 하나의 실시형태에서, 백금-저항성 암을 갖는 개체를 치료하기 위해, 항-CD39 항체는 탁산과의 조합으로 사용될 수 있다. 또다른 실시형태에서, 탁산-저항성 암을 갖는 개체를 치료하기 위해, 항-CD39 항체는 백금제와의 조합으로 사용될 수 있다 . 또다른 실시형태에서, 탁산-저항성 및/또는 백금 저항성 암을 갖는 개체를 치료하기 위해, 항-CD39 항체는 PARP 저해인자와의 조합으로 사용될 수 있다.

[0221] 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 개체에서 암을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 가용성 세포외 도메인 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있는 항체이며, 치료는 하기를 포함한다:

[0222] a) 개체가 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제를 이용하는 치료에 대한 응답에 관해 불량한 예후를 갖는지 여부를 확인하는 단계, 및

[0223] b) 개체가 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제를 이용하는 치료에 대한 응답에 관해 불량한 예후를 갖는다는 것을 확인한 경우에, 개체에게 외인성으로 첨가된 ATP 의 존재 하에 인간 CD39 단백질의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있는 항체를 투여하는 단계. 임의로, 개체는 백금-저항성 암, 탁산-저항성 암, 또는 PARP 저해인자-저항성 암을 갖는다. 임의로, 개체가 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제를 이용하는 치료에 대한 응답에 관해 불량한 예후를 갖는다는 것을 확인하는 단계는 개체로부터의 생물학적 샘플 중 면역 효과기 세포가 면역 억제 및/또는 소진의 하나 이상의 마커를 특징으로 하는지 여부를 평가하는 것을 포함하며, 면역 억제 및/또는 소진의 하나 이상의 마커를 특징으로 하는 면역 효과기 세포의 존재 또는 및/또는 상승된 수준은 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제를 이용하는 치료에 대한 응답에 관해 불량한 예후를 갖는다는 것을 시사한다.

[0224] 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하고/하거나 종양 세포의 사망을 유도하는 작용제 또는 처치의 효과를 증강시키기 위해 항-CD39 항체를 사용하는 이점은 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하고/하거나 종양 세포의 사망을 유도하는 작용제 또는 처치에 대해 민감성인 (예를 들어 민감성으로 예측된 또는 확인된) 암을 갖는 개체 (예를 들어, 폐암, 난소암, 대장직장암, 위암, 식도암) 에서 개선된 결과를 달성하기 위해 또한 이용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 실시형태에서, 탁산-민감성 암을 갖는 개체를 치료하기 위해, 항-CD39 항체는 탁산과의 조합으로 사용될 수 있다. 또다른 예에서, 백금제-민감성 암을 갖는 개체를 치료하기 위해, 항-CD39 항체는 백금제와의 조합으로 사용될 수 있다. 또다른 예에서, PARP 저해인자-민감성 암을 갖는 개체를 치료하기 위해, 항-CD39 항체는 PARP 저해인자의 조합으로 사용될 수 있다.

[0225] 본원에서 사용되는, 부가 또는 병용 투여 (공동-투여) 는 동일한 또는 상이한 투여 형태로의 화합물의 동시 투여, 또는 화합물의 별도의 투여 (예를 들어, 순차적 투여) 를 포함한다. 따라서, 항-CD39 및 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제는 단일 제형으로 동시에 투여될 수 있다. 대안적으로, 항-CD39 및 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제는 별도의 투여를 위해 제형화되고, 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0226] 암을 갖는 환자는 종양 ATPase 활성, 종양 ATP (예를 들어, 종양내 ATP 농도), 및/또는 세포 상의 CD39 발현을

평가하는 사전 검출 단계의 존재 또는 부재 하에 항-CD39 작용제 및 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제로 치료될 수 있다. 임의로, 치료 방법은 개체로부터의 종양의 생물학적 샘플에서 (예를 들어, 종양 또는 종양-침윤성 세포에서) CD39 핵산 또는 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0227] 임의로, 치료 방법은 개체로부터의 생물학적 샘플에서 CD39 핵산 또는 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 생물학적 샘플의 예는 임의의 적합한 생물학적 유체 (예를 들어 혈청, 림프, 혈액), 세포 샘플, 또는 조직 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플 중 세포 (예를 들어, 암 세포, 림프구, 예를 들어, TReg 세포, B 세포, T 세포) 가 CD39 를 높은 수준으로 발현하거나, 또는 샘플 중 많은 수의 세포가 CD39-양성이거나, 또는 레퍼런스에 비해 높은 강도의 항-CD39 항체에 의한 염색을 보인다는 임의의 확인은 개체가 종양 세포로부터 ATP 방출을 유도하는 작용제와의 조합으로 CD39 를 저해하는 작용제를 이용하는 치료로부터 큰 유익을 얻을 수 있는 암을 갖는다는 것을 시사할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 치료 방법은 개체로부터의 종양의 생물학적 샘플에서 (예를 들어, 종양-침윤성 세포에서) CD39 핵산 또는 폴리펩티드를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0228] 치료 방법에서, 항-CD39 항체 및 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치는 별도로, 함께 또는 순차적으로, 또는 칵테일로 (적절한 경우에) 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치는 항-CD39 항체의 투여 전에 투여된다. 바람직한 실시형태에서, 항-CD39 항체는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여 전에 또는 그와 동시에 투여된다. 하나의 유리한 실시형태에서, 항-CD39 항체는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치를 이용하는 치료의 과정 또는 사이클과 동시에 또는 0 내지 15 일 전에 투여된다. 예를 들어, 항-CD39 항체는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여 전 대략 0 내지 15 일에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여 전 적어도 1 시간, 12 시간, 24 시간 또는 48 시간에 투여된다. 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여 전 적어도 1 시간, 12 시간, 24 시간 또는 48 시간에, 그러나 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여 전 1 주 이하에 투여된다. 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여 전 0 내지 48 시간, 또는 1 내지 48 시간에 투여된다. 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여 전 약 30 분 내지 약 2 주, 약 30 분 내지 약 1 주, 약 1 시간 내지 약 2 주, 약 1 시간 내지 약 1 주, 약 1 시간 내지 약 2 시간, 약 2 시간 내지 약 4 시간, 약 4 시간 내지 약 6 시간, 약 6 시간 내지 약 8 시간, 약 8 시간 내지 1 일, 약 24 또는 48 시간 내지 약 5, 6 또는 7 일, 약 1 시간 내지 약 5, 6 또는 7 일, 약 1 시간 내지 약 15 일, 약 24 또는 48 시간 내지 약 15 일, 약 3 내지 7 일, 또는 약 1 내지 5 일에 투여된다. 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여와 동시에 투여된다. 일부 유리한 실시형태에서, ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치는 항-CD39 항체의 투여 후 15 일 또는 약 2 주의 기간 내에 적어도 2 회 투여된다. 다른 실시형태에서, 항-CD39 항체는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여 후에 투여된다. 일부 실시형태에서, 항-CD39 항체는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여 후 약 30 분 내지 약 2 주, 약 30 분 내지 약 1 주, 약 1 시간 내지 약 24, 36 또는 48 시간, 약 1 시간 내지 약 2 시간, 약 2 시간 내지 약 4 시간, 약 4 시간 내지 약 6 시간, 약 6 시간 내지 약 8 시간, 약 8 시간 내지 1 일, 또는 약 1 일 내지 약 2, 3, 4 또는 5 일에 투여된다.

[0229] ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치는 치료되는 특정 질환 또는 상태를 위한 단일요법에서 작용제 또는 처치에 전형적으로 사용되는 양 및 치료 섭생법으로 투여될 수 있다.

[0230] 항-CD39 항체의 적합한 양의 예는 1 내지 20 mg/kg 체중일 수 있다. 하나의 실시형태에서, 양은 개체에게 매주, 2 주 마다, 매달 또는 2 달 마다 투여된다.

[0231] 하나의 실시형태에서 제공되는 것은 암을 갖는 인간 개체를 치료하는 방법으로서, 개체에게 본 공개의 항-CD39 항체의 유효량 및 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 유효량을 포함하는 적어도 하나의 투여 사이클을 투여하는 것을 포함하는 방법이다. 하나의 실시형태에서, 사이클은 8 주 이하의 기간 (예를 들어 2 주, 4 주, 8 주) 이다. 하나의 실시형태에서, 적어도 하나의 사이클 각각 동안, 항-CD39 항체의 1, 2, 3 또는 4 용량이, 임의로 1-20 mg/kg 체중의 용량으로 투여된다. 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 정맥내 주입에 의해 투여된다. 하나의 실시형태에서, 적어도 하나의 사이클 각각 동안, ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 1, 2, 3 또는 4 용량이 투여된다.

[0232] 본원에서 보여지는 바와 같이, 포화 농도의 항-CD39 항체의 존재 하의 화학치료제의 반복되는 투여가 효율적 항-종양 면역 응답을 증가시키는데 요구되는 전통적 2-주 기간 동안 ATP 축적 및 아데노신 (Ado) 저해가 일어나는

것을 허용했을 때 가장 강한 항-종양 응답이 관찰되었다. 따라서, 하나의 유리한 실시형태에서, 본 공개에 따른 치료는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 적어도 2 회 연속적 투여를 포함한다. 하나의 실시형태에서, ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치는 항-CD39 항체의 투여 후 15 일 또는 약 2 주의 기간 내에 적어도 2 회 투여된다. 항-CD39 항체는 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 2 회 연속적 투여 각각에서 관심의 순환계 및/또는 조직 (예를 들어 종양 조직) 중 항-CD39 항체의 농도가 CD39 의 ATPase 활성을 저해하게 하는 양 및/또는 스케줄로 투여될 수 있다 (예를 들어 CD39 단백질을 포화시키는 농도로). 예를 들어, 하나의 유리한 치료적 섭생법에서, 항-CD39 항체는 ATP 방출을 유도하는 화학치료제의 투여와 동시에, 또는 적어도 1-48 시간 전에 투여된다. 하나의 유리한 치료적 섭생법에서, 항-CD39 항체는 ATP 방출을 유도하는 화학치료제의 투여 전 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 일에 투여된다.

[0233] 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 인간 개체에서 종양을 치료하는데 사용하기 위한, 인간 CD39 (NTPDase1) 단백질의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있는 항체이며, 치료는 개체에게 항-CD39 항체 및 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치 각각의 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치는 적어도 2 회 투여되고 (예를 들어 제 1 및 제 2 연속적 투여), 항-CD39 항체는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 상기 2 회 투여 사이에 항-CD39 항체의 포화 농도를 달성 및/또는 유지하는데 효과적인 양 및/또는 스케줄로 투여된다. 항-CD39 항체는, 예를 들어, 1 회 또는 2 회 투여될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 2 회 투여는 2 주 이하 만큼 분리된다 (예를 들어 매일, 매주, 격주 투여된다). 하나의 실시형태에서, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치는 2 주 기간 동안 적어도 2, 3 또는 4 회 투여된다. 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 적어도 CD39 단백질을 실질적으로 완전히 (예를 들어 90%, 95%) 점유하는데 (포화시키는데) 요구되는 최소 농도인 농도를 초래하는 양으로 투여될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 상기 2 회 투여 사이에 CD39 단백질 항체를 실질적으로 완전히 (예를 들어 90%, 95%) 점유하는데 (포화시키는데) 요구되는 최소 농도인 농도를 초래하는 양으로 투여될 수 있다.

[0234] 항-CD39 항체로 인간을 치료하는 예시적 치료 프로토콜은, 예를 들어, 환자에게 항-CD39 항체 및 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치 각각의 유효량을 투여하는 것을 포함하며, 방법은 항-CD39 항체의 적어도 하나의 용량이 투여되고 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 2 용량이 투여되는 적어도 하나의 투여 사이클을 포함하며, ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 2 용량은 2 주 이하의 간격으로 투여된다. 하나의 실시형태에서, 투여 사이클은 2 주 내지 8 주이다. 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 순환계 및/또는 관심의 조직 (예를 들어 종양 조직) 중 항-CD39 항체의 의 농도가 CD39 의 ATPase 활성을 저해하게 되는 양 및/또는 스케줄로 투여될 수 있다. 임의로, 항-CD39 항체는 CD39 의 실질적으로 완전한 (예를 들어 90%, 95%) 점유 (포화) 를 제공하는 농도를 제공하는 양으로 투여된다. 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여와 동시에, 또는 1-48 시간 전에 투여된다.

[0235] 하나의 실시형태에서, 제공되는 것은 인간 개체에서 종양을 치료하는데 사용하기 위한, 인간 CD39 (NTPDase1) 단백질의 ATPase 활성을 결합 및 저해할 수 있는 항체이며, 치료는 개체에게 하기를 투여하는 것을 포함한다: (a) 적어도 1 주, 임의로 적어도 2 주 (예를 들어 2 주, 3 주, 4 주, 또는 그 이상) 동안 항-CD39 항체의 포화 농도를 달성 및/또는 유지하는데 효과저인 양 및 스케줄로의 항-CD39 항체, 및 (b) 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치, 여기에서 항-CD39 항체는 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치의 투여와 동시에, 또는 1-48 시간 전에 투여된다. 임의로, 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치는 항-CD39 항체의 투여 후 2 주 기간 내에 적어도 2 회 투여되며, 예를 들어 종양 세포로부터 ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치는 주 당 적어도 1 회 투여될 수 있다.

[0236] 임의의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 1 주 동안 CD39 단백질 항체를 실질적으로 완전히 (예를 들어 90%, 95%) 점유하는데 (포화시키는데) 요구되는 최소 농도 이상인 농도를 초래하는 양으로 투여될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 항-CD39 항체는 2 주 동안 CD39 단백질 항체를 실질적으로 완전히 (예를 들어 90%, 95%) 점유하는데 (포화시키는데) 요구되는 최소 농도 이상인 농도를 초래하는 양으로 투여될 수 있다.

[0237] ATP 의 세포외 방출을 유도하는 작용제 또는 처치와 조합된, 항-CD39 항체 조성물은, 항체를 투여하는 특정 치료적 목적에 통상적으로 이용되는 작용제를 포함하는, 하나 이상의 기타 처치 또는 치료제와의 조합된 (추가로 조합된) 치료일 수 있다. 부가적 치료제는 통상적으로 치료되는 특정 질환 또는 상태를 위한 단일요법에서

작용제에 전형적으로 사용되는 양 및 치료 섭생법으로 투여될 것이다. 하나의 실시형태에서, 부가적 치료제는 CTLA-4 또는 PD-1 축을 저해하는 (즉, PD-1 또는 PD-L1 을 저해하는) 작용제 (예를 들어, 항체) 이다. CTLA-4, PD1 또는 PD-L1 에 결합하는 항체는, 예를 들어, 아래 기재된 바와 같이, 예를 들어, 그러한 작용제가 단일요법으로서 사용되는 예시적 용량 및/또는 빈도로 사용될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 부가적 치료제는 인간 CD73 단백질 (예를 들어, 가용성 CD73 단백질, 세포에 의해 발현되는 CD73 단백질) 의 5'-엑토뉴클레오티다아제 활성을 결합 및 중화시키는 작용제 (예를 들어, 항체) 이다. NT5E 유전자에 의해 인코딩되는 인간 CD73 은, 또한 엑토-5'-뉴클레오티다아제로서 및 5-프라임-리보뉴클레오티드 포스포하이드롤라아제, EC 3.1.3.5 로서 알려져 있으며, 5'-뉴클레오티다아제, 특히 AMP-, NAD-, 및 NMN-뉴클레오시다아제, 활성을 나타낸다. CD73 은 중성 pH 에서 퓨린 5-프라임 모노뉴클레오티드의 뉴클레오시드로의 전환을 촉매작용하며, 바람직한 기질은 AMP 이다. 효소는 원형질 막의 외면에 글리코실 포스파티딜 이노시톨 연결기에 의해 결합된 2 개의 동일한 70-kD 서브유닛의 이합체로 이루어진다. 아미노산 1-26 에서의 신호 서열을 포함하여, 인간 CD73 전구단백질 (단량체) 의 아미노산 서열은 Genbank 에서 수탁 번호 NP_002517 (이의 전체 공개내용은 본원에 참조로 포함된다) 하에 제시되어 있으며, 다음과 같다:

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

[0238] (SEQ ID NO: 48).

[0239] 본원의 맥락에서, CD73 폴리펩티드를 언급할 때 "저해하다", "저해하는", "중화시키다" 또는 "중화시키는" (예를 들어, "CD73 을 중화시키다", CD73 의 활성을 중화시키다" 또는 "CD73 의 효소 활성을 중화시키다" 등) 은 CD73 의 5'-뉴클레오티다제 (5'-엑토뉴클레오티다제) 활성이 저해되는 과정을 의미한다. 이것은 특히 아데노신의 CD73-매개되는 생성의 저해, 즉 AMP 의 아데노신으로의 CD73-매개되는 이화작용의 저해를 포함한다. 이것은 예를 들어 직접적으로 또는 간접적으로, AMP 의 아데노신으로의 전환을 저해하는 시험 화합물의 능력을 측정하는 세포-무함유 어세이에서 측정할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 항체 조제물은 예를 들어 본원에 기재된 어세이를 참조하여, AMP 의 아데노신으로의 전환에서 적어도 50% 감소, AMP 의 아데노신으로의 전환에서 적어도 70% 감소, 또는 AMP 의 아데노신으로의 전환에서 적어도 80% 감소를 야기한다.

[0240] **실시예**

[0241] **방법**

[0242] *CD39 돌연변이체의 생성*

[0243] CD39 돌연변이체는 PCR 로 생성했다. 증폭된 서열을 아가로스 겔 상에서 러닝시켰고 Macherey Nagel PCR Clean-Up Gel Extraction kit (레퍼런스 740609) 를 사용하여 정제했다. 각 돌연변이체에 대해 생성된 정제된 PCR 생성물은 이후에 ClonTech InFusion 시스템을 사용하여 발현 벡터에 결찰시켰다. 돌연변이된 서열을 함유하는 벡터는 미니프렙으로 제조했고 서열분석했다. 서열분석 후, 돌연변이된 서열을 함유하는 벡터는 Promega PureYield™ 플라스미드 미디프렙 시스템을 사용하여 미디프렙으로 제조했다. HEK293T 세포는 DMEM 배지 (Invitrogen) 에서 성장시켰고, Invitrogen 의 Lipofectamine 2000 을 사용하여 벡터로 형질감염시켰으며, 이식유전자 발현을 시험하기 전에 48시간 동안 CO_2 인큐베이터에 37℃ 에서 인큐베이션했다. 돌연변이체는 하기 표에 표시된 바와 같이 Hek-293T 세포에 형질감염시켰다. 하기 표 1 에서 표적화된 아미노산 돌연변이는 SEQ ID NO: 1 의 넘버링을 사용하여 표시된다.

[0244] 표 1

돌연변이체	치환					
1	V77G	H79Q	Q444K	G445D		
2A	V81S	E82A	R111A	V115A		
2B	E110A	R113T	E114A			
3	R118A	S119A	Q120K	Q122H	E123A	
4	D150A	E153S	R154A	S157K	N158A	L278F
5	Q96A	N99A	E143A	R147E		
6	K188R	KTPGGS 에 의한 잔기 190 내지 207 의 대체				
7	A273S	N275A	I277S	R279A		
8	S294A	K298G	K303A	E306A	T308K	Q312A
9	K288E	K289A	V290A	E315R		
10A	Q354A	D356S	E435A	H436Q		
10B	H428A	T430A	A431D	D432A		
11	N371K	L372K	E375A	K376G	삽입377V	V377S
12	K388N	Q392K	P393S	E396A		
13	A402P	G403A	K405A	E406A		
15	K87A	E100A	D107A			
16	Q323A	Q324A	Q327A	E331K		
17	N334A	S336A	Y337G	N346A		
18	Q228A	I230S	D234A	Q238A		
19	R138A	M139A	E142K			

[0245]

[0246] *가용성 huCD39 의 클로닝, 생성 및 정제*

[0247] *분자 생물학*

[0248] huCD39 단백질은 하기의 프라이머를 사용하여 인간 PBMC cDNA로부터 클로닝되었다:

TACGACTCACAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGATACAAAGGAGTC (SEQ ID NO: 35) (정방향), 및
CCGCCCCGACTCTAGATCACTTGTCATCGTCATCTTTGTAATCGA CATAGGTGGAGTGGGAGAG (SEQ ID NO: 36) (역방향)

[0249]

[0250] 정제된 PCR 생성물은 InFusion 클로닝 시스템을 사용하여 발현 벡터에 클로닝되었다. M2 태그 (FLAG 태그, SEQ ID NO: 39 에 밑줄표시)는 정제 단계를 위해 단백질의 C-말단에 첨가되었고, CD39 세포외 도메인 단백질 (예를 들어, SEQ ID NO: 39) 은 임의의 실시형태에서, 임의로, M2 태그가 결여된 것으로 명시될 수 있다는 것을 이해하게 될 것이다.

[0251] *huCD39 단백질의 발현 및 정제*

[0252] 클로닝된 서열의 검증 이후에, CHO 세포는 핵도입되었고 생성된 풀은 서브클로닝하여 huCD39 단백질을 생성하는 세포 클론을 수득했다. 롤러에서 성장시킨 huCD30 클론 유래의 상층액을 회수했고 M2 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 정제하였으며 M2 펩티드를 사용하여 용리시켰다. 다음으로 정제된 단백질을 S200 크기 배제 크로마토그래피 컬럼 상에 로딩했다. 단량체에 상응하는 정제된 단백질은 TBS PH7.5 완충액에 배합시켰다. M2 태그가 없는 CD39-M2 세포외 도메인 재조합 단백질의 아미노산 서열은 다음과 같았다:

MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALLAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIY
KWPAEKENDTGVVHQVEECRVKGPGISKFVQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPV
YLGATAGMRLLRMESEELADRVLDVVERSLSNYPFDFQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGK
FSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNALQFRLYGKDYNVY
THSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCFHPGYKKVVNVSDLYKTPCTKRFEMTLP
FQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNL
TSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADS
WEHIHFIGKIQGSDAGWTLGYMLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYV
(SEQ ID NO: 2).

[0253]

[0254] M2 태그가 존재하는 CD39-M2 세포외 도메인 재조합 단백질의 최종 아미노산 서열은 다음과 같았다:

MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALLAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIY
KWPAEKENDTGVVHQVEECRVKGPGISKFVQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPV
YLGATAGMRLLRMESEELADRVLDVVERSLSNYPFDFQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGK
FSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNALQFRLYGKDYNVY
THSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCFHPGYKKVVNVSDLYKTPCTKRFEMTLP
FQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNL
TSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADS
WEHIHFIGKIQGSDAGWTLGYMLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYVDYKDDDDK
(SEQ ID NO: 39).

[0255]

[0256] *가용성 CD39 의 효소 활성의 저해*

[0257] 생산된 가용성 CD39 단백질의 효소 활성의 항체에 의한 저해는 존재하는 ATP 의 양에 비례하는 발광 신호를 생성하는 시약의 사용을 통해 ATP 가수분해의 평가를 허용하는 Cell Titer Glo™ (Promega, 레퍼런스 G7571) 를 사용하여 평가했다. 이러한 방식으로, 가용성-CD39-매개되는 ATP 가수분해의 저해를 평가할 수 있다. 간략히, 100 ㎍/㎖ 내지 $6x10^{-3}$ ㎍/㎖ 의 용량 범위의 항-CD39 항체를 방법 섹션에 기재된 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 39) 을 갖는 400 ng/㎖ 의 가용성 재조합 인간 CD39 단백질과 함께 1 시간 동안 37℃ 에서 인큐베이션했다. 20 μM ATP 가 플레이트에 추가 30 분 동안 37℃ 에서 첨가되고 그 후 CTG (Cell Titer Glo) 시약이 첨가되었다. 암흑 속에서 5 min 의 짧은 인큐베이션 기간 후에 방출된 광은 Enspire™ 광도계를 사용하여 정량화되었다. 항-CD39 항체 효능은 항체 존재 하에서 발출된 광을 ATP 단독 (최대 광 방출) 및 가용성 CD39 단백질과 함께한 ATP (최소 광 방출) 와 비교하여 확인했다.

[0258] *세포 CD39 의 효소 활성의 저해*

[0259] 항체에 의한 CD39-발현 세포에서 CD39 효소 활성의 저해는 존재하는 ATP 의 양에 비례하는 발광 신호를 생성하는 시약의 사용을 통해 ATP 가수분해의 평가를 허용하는 Cell Titer Glo™ (Promega, 레퍼런스 G7571) 를 사용하여 평가했다. 따라서, 어세이는 세포 배양 상청액 중 CD39 에 의해 가수분해된 ATP 의 저해의 평가가 가능하도록 설계되었다. 간략히, $5x10^{4}$ Ramos 인간 림프종 세포, $5x10^{3}$ 인간 CD39-발현 CHO 세포, 시노몰구스 CD39-발현 CHO 세포 및 마우스 CD39-발현 CHO 세포를 1 시간 동안 37℃ 에서 30 ㎍/㎖ 내지 $5x10^{-4}$ ㎍/㎖ 의 항-CD39 항체와 함께 인큐베이션했다. 그 후 세포를 20 μM ATP 와 추가 1 시간 동안 37℃ 에서 인큐베이션했다. 플레이트를 2 분 동안 400g 에서 원심분리했고 50 ㎕ 의 세포 상청액을 발광 마이크로플레이트 (흰색 웰) 로 옮겼다. 50 ㎕ 의 CellTiter-Glo® 시약 (CTG) 을 상청액에 첨가했고, 방출된 광을 5 min 인큐베이션 후에 암흑 속에서 Enspire™ 광도계를 사용하여 정량화했다. 항-CD39 항체 효능은 항체의 존재 하에서 발출된 광을 ATP 단독 (최대 광 방출) 및 세포와 함께한 ATP (최소 광 방출) 와 비교하여 확인했다.

[0260] *항체의 생성: 마우스에서 면역화 및 스크리닝*

[0261] 항-인간 CD39 항체를 수득하기 위해서, Balb/c 마우스를 상기 기술된 재조합 인간 CD39-M2 세포외 도메인 재조합 단백질로 면역화시켰다. 마우스는 50 ㎍ 의 CD39 단백질 및 완전 프로인트 보강제의 에멀션으로 1회 1차-면역접종을 받았고, 50 ㎍ 의 CD39 단백질 및 불완전 프로인트 보강제의 에멀션으로 2차 면역접종을 복강내로 받았으며, 최종적으로 정맥내로 10 ㎍ 의 CD39 단백질로 부스팅되었다. 면역 비장 세포는 부스팅 이후 3 일

에 X63.Ag8.653 불멸화 B 세포와 융합시켰고, 조사된 비장 세포의 존재 하에서 배양시켰다. 하이브리도마는 반고형 메틸셀룰로스-함유 배지에 플레이팅시켰고 성장된 클론은 clonepix 2 장비 (Molecular Devices) 를 사용하여 선택했다.

[0262] **실시예 1: 기지의 중화 CD39 mAb 의 에피토프 맵핑**

[0263] 항체가 어떻게 세포 CD39 의 효소 (ATPase) 활성을 저해할 수 있는가에 대한 통찰을 얻기 위해서, 우리는 세포 어세이에서 CD39 의 ATPase 활성을 저해하는 것으로 보고된 항체가 결합하는 에피토프를 조사했다: PCT 공개 특허 출원 번호 WO2009/095478 에 공개된 BY40.

[0264] 항-CD39 항체의 에피토프를 정의하기 위해서, 우리는 CD39 의 표면 상의 분자 표면에 노출된 아미노산의 치환에 의해 정의되는 CD39 돌연변이체를 설계했다. 돌연변이체는 SEQ ID NO: 1 의 넘버링을 사용하여, 표 1 에 표시된 바와 같이, Hek-293T 세포에 형질감염시켰다.

[0265] I-394 의 용량 범위 (10 - 2.5 - 0.625 - 0.1563 - 0.0391 - 0.0098 - 0.0024 - 0.0006 ㎍/㎖) 를 유세포측정을 통해 20종의 생성된 돌연변이체에서 시험했다. BY40 항체 둘 모두는 임의의 다른 돌연변이체에 대한 결합의 소실 없이, CD39 의 돌연변이체 5 를 발현하는 세포에 대한 결합의 완전한 소실을 가졌다. 돌연변이체 5는 잔기 Q96, N99, E143 및 R147 에 아미노산 치환을 함유한다. CD39 의 표면 상에서 돌연변이체 5 의 위치는 **도 3A** 에 도시되어 있다.

[0266] **실시예 2: 기지의 중화 CD39 mAb 는 재조합 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성을 저해할 수 없다**

[0267] 세포 어세이에서 CD39 의 ATPase 활성을 저해하는 것으로 보고된 2종 항체 (BY40 및 BY12) 는 재조합 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성을 저해할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 평가되었다. 상기 기술된 바와 같이 생성된 가용성 CD39 단백질의 효소 활성의 항체에 의한 저해는 Cell Titer Glo™ (Promega, 레퍼런스 G7571) 를 사용하여 평가되었다. 세포 CD39 단백질의 효소 활성의 항체에 의한 저해는 상기 표시된 대로 평가되었다.

[0268] 예상한 바와 같이, BY40 은 세포에서 CD39 단백질의 ATPase 활성을 저해했다. 그러나, BY40 은 가용성 CD39 단백질의 효소 활성을 저해할 수 없었다. **도 2B** 는 본원에서 확인된 신규 항체와 BY40 의 비교를 보여준다.

[0269] **실시예 3: sCD39 활성을 차단하는 신규한 mAb에 대한 스크리닝**

[0270] 일련의 면역접종은 sCD39 의 ATPase 활성을 중화시키는 항체를 찾기 위해 수행되었다. 항-인간 CD39 항체를 수득하기 위해서, 상기 기술된 재조합 인간 CD39-M2 세포외 도메인 재조합 단백질로 동물을 면역화시켰다. 총 15회의 면역화가 상이한 프로토콜 및 상이한 동물을 사용하여 수행되었다. 상이한 마우스 품종, 래트 및 토끼가 포함되었다.

[0271] 초기 면역화 프로토콜에서, 1차 스크리닝은 야생형 CHO 및 huCD39 를 발현하는 CHO 세포주를 사용하여 유세포측정을 통해 성장하는 클론의 상청액 (SN) 을 시험하는 단계를 포함했다. 세포는 각각 0.1 μM 및 0.005 μM 의 CFSE로 염색시켰다. 유세포측정 스크리닝을 위해서, 모든 세포는 동일하게 혼합했고, 상청액 중 반응 항체의 존재는 APC로 표지된 염소 항-마우스 다클론 항체 (pAb) 로 확인했다. huCD39 에 결합된 항체의 경우, 상기 기술되고 개발된 스크리닝 어세이 (방법) 를 사용하여 가용성 CD39 의 효소 활성의 저해에 대해 상청액을 스크리닝했다.

[0272] 결과는 수많은 특이적 CD39-결합 항체를 수득할 수 있었지만, 임의의 이들 면역화에 의한 항체의 어떠한 것도 가용성 CD39 의 효소 활성의 저해를 보이지 않았다. 한가지 가능성은 CD39 상의 우성 에피토프가 CD39 의 촉매 부위에 또는 그 근처에 적합하게 위치된 임의의 에피토프를 포함하지 않는다는 것이다. 세포 CD39 를 저해하는 이용가능한 소수의 항체 및 항체를 사용하여 효소의 촉매 부위를 저해시 알려진 어려움의 관점에서, sCD39 를 중화시키는 항체의 부재는 가용성 (세포외 도메인) CD39 를 저해하는 항체를 수득하는 것이 가능하지 않다는 것을 의미할 수 있다. 다른 가능성은 특히 가용성 CD39 를 저해할 수 있는 임의의 항체의 결여가 sCD39 차단 어세이의 검증을 방해하므로, 비기능적 스크리닝 어세이 및/또는 부적절하게 폴딩되거나 또는 기능하는 가용성 CD39 단백질과 관련된다.

[0273] 가용성 CD39 를 저해할 수 있는 항체의 부재 관점에서, 항체 BY40 의 에피토프에 의해 확인시 CD39 의 활성 부위에 결합하는 항체의 생성을 촉진하도록 설계된 스크리닝 프로토콜을 사용하여 추가 면역화를 수행했다. 간략히, 1차 스크리닝은 이전 면역화에서처럼, 야생형 CHO 및 huCD39 를 발현하는 CHO 세포주를 사용하는 유세포측정에 의해 성장하는 클론의 상청액 (SN) 을 시험하고, 이후 표 1 에 표시된 바와 같이, 야생형 CD39 와 비

교하여, CD39 돌연변이체 5 를 발현하는 Hek-293T 세포와의 결합 소실에 대해 스크리닝하는 것을 포함한다. 돌연변이체 5는 잔기 Q96, N99, E143 및 R147 에 치환을 갖는다. 그러나, 역시 결과는 돌연변이체 5와의 결합 소실을 보이는 수많은 특이적 CD39-결합 항체를 수득할 수 있었지만, 임의의 초기 면역화에 의한 항체의 어떠한 것도 가용성 CD39 의 효소 활성의 임의의 저해를 보이는 것은 없었다는 것을 보여준다.

[0274] **실시예 4: 에피토프-지정 스크리닝의 일부로서 sCD39 활성을 저해하는 제1 항체의 확인**

[0275] BY40-유사 항체와 경쟁하지 않는 항체를 갖기 위해서 Q96, N99, E143 및 R147 영역 (돌연변이체 5에 의해 정의)에 결합하지 않는 항-CD39 항체를 확인하고자 했다. CD39 의 ATPase 활성을 차단하는 어떠한 능력도 가질 필요가 없는 이러한 항체는 예를 들어, 세포 CD39 를 저해하는 BY40 또는 BY40-유사 항체의 존재 하에서 세포 상의 유리 Cd39 단백질을 검출하고 정량하기 위해, BY40 결합 부위에 결합하는 세포 CD39 를 저해하는 항체의 약리학 실험에 유용할 수 있다.

[0276] 하이브리도마를 CD39 돌연변이체 5 와의 결합 소실에 대해 스크리닝한 실시예 3 의 면역화의 결과로부터 출발하여, CD39 돌연변이체 5 와의 결합 소실을 보이는 것이 아닌 하이브리도마를 선택했다. 이러한 하이브리도마 (I-394) 는 돌연변이체 5 와의 결합에서 가능한 부분 감소를 나타내는 미확정 데이타에 기인하여 광범위한 풀 중 하나였지만, 돌연변이체 5 와의 결합을 상실하지 않았고 따라서 초기에 보유되지 않았었다.

[0277] 가용성 CD39 의 효소 활성의 저해에 대한 추가 면역화로부터의 상청액의 진행중인 스크리닝의 상황에서, 클로닝되어 생성된 항체 I-394 가 대조군으로서 포함되었다. 놀랍게도, 항체 I-394 가 에피토프-지정 스크리닝에서 유지된 클론 중 하나가 아님에도 불구하고, 이 항체는 상기 기술된 어세이 (방법) 에서 가용성 CD39 의 효소 활성의 강력한 저해를 보였다

[0278] I-394 는 인간 Fcɣ 수용체 CD16A, CD16B, CD32A, CD32B 및 CD64 와의 결합 결여를 야기시키는 돌연변이 L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (카밧 EU 넘버링) 를 갖는 변형된 Fc 도메인을 갖는, IgG1 아이소타입의 인간 불변 영역을 갖게 생성되었다. 간략히, I-394 항체의 VH 및 Vk 서열 (각각 SEQ ID NO: 3 및 4 에 표시된 VH 및 Vk 가변 영역) 은 각각 상기 언급된 돌연변이를 보유하는 huIgG1 불변 도메인 및 huCk 불변 도메인을 함유하는 발현 벡터에 클로닝되었다. 2종의 수득된 벡터를 CHO 세포주에 공동 형질감염시켰다. 확립된 세포 풀을 사용하여 CHO 배지 중에서 항체를 생성했다. 그 후 항체는 단백질 A를 사용하여 정제되었다. I-394 의 각각의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열은 하기에 표시되어 있다 (카밧 CDR은 밑줄표시됨).

[0279] I-394 중쇄 가변 도메인 서열:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT**DYNMH**WVKQSHGRTLEWIG**YIVPLNGGSTFNQKFKG**RA

[0280] TLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCAR**GGTRFAY**WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 3).

[0281] I-394 경쇄 가변 도메인 서열:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC**RASESVDNFGVSFMY**WFQQKPGQPPNLLIY**GASNQGS**GVPARFRG

[0282] SGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFC**QQTKEVPYT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 4).

[0283] L234A/L235E/G237A/A330S/P331S 치환 (N297-연결된 글리코실화 보유) 을 갖는, 인간 IgG1 불변 영역을 가지는 I-394 의 중쇄 및 경쇄 서열은 하기에 표시된다:

[0284] I-394 중쇄 서열:

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

[0285] (SEQ ID NO: 37).

[0286] I-394 경쇄 서열:

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

[0287] (SEQ ID NO: 38).

[0288] 다음으로 항체 I-394 는 CD39 의 표면 상에 분자 표면에서 노출된 아미노산의 치환에 의해 정의되는 CD39 돌연변이체와의 결합 소실에 대해 시험되었다. 표 1 에 표시된 바와 같이, SEQ ID NO: 1 의 넘버링을 사용한 돌연변이체를 Hek-293T 세포로 형질감염시켰다. 항체 I-394 의 용량 범위는 유세포측정을 통해 20종 돌연변이체에 대해 시험되었다. **도 3B** 에 도시된 바와 같이, I-394 는 CD39 의 돌연변이체 19 를 발현하는 세포와의 결합의 완전한 소실을 보였다. 돌연변이체 19 는 잔기 R138, M139 및 E142에 치환을 포함한다. 따라서 I-394 의 코어 에피토프는 하나 이상 (또는 전부) 의 잔기 R138, M139 및 E142를 포함한다.

[0289] 돌연변이체 5 와의 결합을 상실하고 가용성 CD39 가 아닌 세포 CD39 를 저해하는 능력을 갖는 이전 항체 BY40 과 달리, 항체 I-394 는 인접한 돌연변이체 19 와의 결합을 상실했고, 돌연변이체 5 와의 결합은 강력하게 감소되었다 (그러나 돌연변이체 5 와의 일부 잔여 결합 존재). 흥미롭게도, 돌연변이체 19 의 잔기는 잔기 5 와 매우 근접하거나 또는 인접하여, I-394 는 BY40 과 비교해 에피토프의 이동을 나타낼 수 있다. 따라서 항체 I-394 는 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성의 저해를 가능하게 하는 항-CD39 항체에 대한 가치있는 신규 에피토프를 제시한다. 또한 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성을 중화하는 추가 항체를 검출하기 위한 스크리닝 어세이의 검증 및 시험을 가능하게 하는 특이적 양성 대조군을 제공한다.

[0290] **실시예 5: sCD39-중화 mAb에 대한 비-에피토프 지정 스크리닝**

[0291] 가용성 CD39 의 항체-매개되는 저해가 가능하다는 것을 의미하는 실시예 4 의 결과를 기반으로, sCD39 의 ATPase 활성을 중화시키는 항체를 찾기 위해서 실시예 3 의 상이한 프로토콜을 사용한 상이한 면역화로부터의 융합체가 고안되었다.

[0292] ATPase 저해에 대한 스크리닝을 위한 상이한 접근법이 평가되었다. 한 실험에서, I-394 항체는 가용성 CD39 의 ATPase 활성을 저해하는 능력에 대해 음성으로 확인된 실시예 3 의 면역화의 하이브리도마 유래의 상청액을 섞는데 사용되었다. 상청액에 I-394 의 이러한 첨가는 CD39 의 ATPase 활성을 저해하는 음성 상청액의 능력을 복원시키지 않았다. 다음으로 항체 I-394 는 단백질 A 코팅된 비드를 사용하여 음성 상청액으로부터 정제되었고, 우리는 정제된 I-394 가 다시 ATPase 활성을 저해할 수 있고 복원되었다는 것을 관찰했다.

[0293] 전술한 결과의 관점에서, 새로운 면역화 및 스크리닝 프로토콜은 신규 및 과거 면역화에 의해 성장하는 클론을 가용성 CD39 또는 세포 CD39 ATPase 활성의 저해의 평가 없이, 에피토프에 대한 스크리닝 편중 없이 야생형 CHO 및 huCD39 를 발현하는 CHO 세포주를 사용하여 유세포측정으로 스크리닝하는 것이 개발되었다. 돌연변이체 5 또는 19 에 대한 결합 소실과 관련된 데이타가 일부 하이브리도마로부터 입수가능하였지만, 이러한 데이타는 클론 선택을 위해 사용되지 않고 단지 ATPase 차단 어세이에서 음성 결과의 사건에서 클로닝의 하이브리도마를 구제하는 목적을 위해 보유되었다. CD39 에 결합하는 하이브리도마가 선택되었고 클로닝되었고, 하기 프로토콜에 따라 단백질 A를 사용하여 정제되었다:

[0294] - 300 ㎕ 의 하이브리도마 상청액에 10 ㎕ 의 단백질 A 비드를 첨가한다.

[0295] - NaCl 을 1.5 M 의 최종 농도로 첨가한다.

[0296] - 튜브를 3-4시간 동안 4℃ 에서 회전시킨다.

[0297] - 1 분간 1500 rpm 에서 원심분리한다.

[0298] - 상청액을 제거하고 3회 1 ㎖ 의 TBS 로 세척한다.

[0299] - 3차 세척 후 모든 TBS 를 제거한다.

[0300] - 50 ㎕ 의 시트레이트 0.1 M, pH 3 을 첨가하고, 균질화시키고 RT 에서 5분 동인 인큐베이션한다.

[0301] - 비드를 1 분 동안 1500 rpm 에서 원심분리한다.

[0302] - 50 ㎕ 의 용리액을 회수하고 신속하게 450 ㎕ 의 TBS 를 첨가하고 4℃ 에 보관한다.

[0303] 다음으로 수득된 항체는 I-394 와 유사한 정도로 CD39 의 ATPase 활성을 저해하는 능력에 대해 비교 어세이에서 스크리닝되었다. 가용성 및 세포 CD39 의 효소 활성의 저해에 사용된 어세이는 상기에 기재된 바와 같다 (방법). 놀랍게도, 이러한 방식으로 생성된 예시적 항체 중에서, 몇몇은 가용성 CD39 의 저해 (뿐만 아니라 세포 CD39 의 저해) 를 보였다. **도 1** 은 양성 대조군 I-394 항체와 비교하여 항체 I-397, I-398 및 I-399 를 보여주는 대표적인 스크리닝 결과이다. 유사하게, 상이한 면역화에 의한 항체 I-395 및 I-396 은 가용성 CD39 단백질의 효소 활성을 저해했다. **도 2A 및 2B** 는 더 많은 양의 항체가 가용성 및 세포 CD39 중화 둘 모두를 위한 추가 실험에 이용가능한 항체 I-395 및 I-396 에 대한 결과를 보여준다. **도 2A** 는 항체 I-395 및 I-396 둘 모두는 BY40 및 I-394 항체와 비교하여 세포-막 결합된 CD39 를 저해하고, I-394 및 I-395 둘 모두는 BY40 과 비교하여 세포 CD39 의 최대 저해 및 보다 큰 역가를 보인다는 것을 보여준다. **도 2B** 는 항체 I-395 및 I-396 둘 모두가 BY40 및 I-394 항체와 비교하여 가용성 CD39 를 저해한다는 것을 보여준다. BY40 이 임의의 농도에서 가용성 CD39 를 저해하지 않은데 반해서, I-394, I-395 및 I-396 은 모두가 가용성 CD39 를 저해하였는데 I-394 가 최대 역가를 보였고, 그 후 I-395 및 그 후 I-396 이 보다 낮은 역가를 보였다.

[0304] 수득된 결과는 하이브리도마 상청액 중 인자(들) 가 세포 배양 및 가용성 CD39 어세이 둘 모두에서 ATP 를 신속하게 가수분해하여, ATP 에 대한 신호가 통상의 방법을 사용하는 항체의 스크리닝에서 검출되지 않을 가능성을 제기한다. 가용성 인자는 예를 들어 융합 파트너에 의해 생성되는 CD39 또는 일부 다른 효소일 수 있다.

[0305] 다음으로, I-394 에 대해 본원에서 표시된 바와 동일한 방식으로, 인간 Fcɣ 수용체 CD16A, CD16B, CD32A, CD32B 및 CD64 와의 결합 결여를 야기하는 돌연변이 L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (카밧 EU 넘버링) 를 갖는 IgG1 Fc 도메인을 갖는 인간 불변 영역을 갖도록 변형된, 항체를 클로닝했다. 다음으로 최종 항체를 적정하고 역가에 따라 항체를 순위매기도록 EC_{50} 및 IC_{50} 확인을 평가하기 위해 실시예 7-9 (적정, ATPase 활성의 저해) 에 표시된 바와 같은 보다 상세한 활성 평가를 수행할 수 있다.

[0306] **실시예 6: sCD39 중화 mAb 의 에피토프 맵핑**

[0307] 실시예 4 에 표시된 바와 같이, I-394 는 CD39 의 돌연변이체 19 를 발현하는 세포와의 결합의 완전한 소실을 보였지만, 돌연변이체 5 와의 결합은 소실되지 않았다. 실시예 5 의 추가 항-CD39 항체의 에피토프를 정의하기 위해서, 그들을 실시예 1 및 표 1 에 기재된 바와 같은 CD39 돌연변이체의 패널과의 결합의 소실에 대해 시험했다. 돌연변이체는 SEQ ID NO: 1 의 넘버링을 사용하여 표 1 에 표시된 바와 같이, Hek-293T 세포에 형질감염시켰다. 용량 범위의 시험 항체 (10 - 2.5 - 0.625 - 0.1563 - 0.0391 - 0.0098 - 0.0024 - 0.0006 ㎍/㎖) 는 유세포측정에 의해 20 종의 생성된 돌연변이체에 대해 시험되었다.

[0308] 결과는 가용성 CD39 를 저해하는 능력에 대해 실시예 5 에서 선택된 항체가 몇몇 상이한 에피토프를 나타낸다는 것을 보여주었다. 실시예 5 에서 가용성 세포외 CD39 의 저해를 보여주는 항체 중에서, 항체 I-395 는 잔기 Q96, N99, E143 및 R147 에 치환을 갖는 돌연변이체 5 와의 결합 소실, 및 또한 잔기 R138, M139 및 E142 에 치환을 갖는 돌연변이체 19 와의 결합 소실을 보이는 항체의 예이다. 돌연변이체 19 는 잔기 R138, M139 및 E142 에 치환을 포함한다. 따라서 I-395 의 CD39 상의 코어 에피토프는 잔기 Q96, N99, E143 및 R147 중 1, 2, 3 또는 4 개를 비롯하여 잔기 R138, M139 및 E142 중 1, 2, 또는 3 개를 포함한다.

[0309] 다른 한편으로 항체 I-398 은 잔기 R138, M139 및 E142 에 치환을 갖는 돌연변이체 19 와의 결합의 소실을 보이지만, 잔기 Q96, N99, E143 및 R147 에 치환을 갖는 돌연변이체 5 와의 결합의 소실이나 또는 감소를 갖지 않는 항체의 예이다.

[0310] 실시예 5 에서 가용성 세포외 CD39 의 저해를 보인 다른 항체는 매우 상이한 에피토프를 가졌고, 돌연변이체 5 또는 19 와의 결합의 소실을 보이지 않아서, 가용성 CD39 가 또한 sCD39 상의 다른 부위와의 결합에 의해 저해될 수 있다는 것을 시사한다. 일부 항체의 경우에, 표 1 의 20 종 돌연변이체 중 하나와의 결합 소실은 CD39 상의 결합 부위의 국재화를 가능하게 하였지만, 나머지의 경우 임의의 20 종 돌연변이체와의 결합이 소실되지 않아서 결합 부위는 확인되어야 하는 채로 남아있다. 실시예 5 에서 가용성 CD39 의 ATPase 활성의 저해를 보이는 항체 중에서, 항체 I-396 은 임의의 다른 20 종 돌연변이체와의 결합 소실 없이, 치환 K87A, E100A 및 D107A을 갖는 돌연변이체 15 와의 결합 소실을 보였다. 따라서 이 항체의 CD39 상의 코어 에피토프는 잔기 K87, E100 및 D107 중 하나 이상 (또는 전부) 을 포함한다. 항체 I-399 는 임의의 다른 20 종 돌연변이체와의 결합 소실 없이, 치환 N371K, L372K, E375A, K376G, V377A 및 K376 내지 V377 사이에 발린의 삽입 (표 1 에서 "삽입 377V") 을 갖는 돌연변이체 11 과의 결합 소실을 보였다. 따라서 이 항체의 CD39 상의 코어

에피토프는 하나 이상 (또는 전체) 의 잔기 N371, L372, E375, K376 및 V377을 포함한다. **도 3A** 는 CD39 단백질의 표면 상에서 돌연변이체 5 (M5), 15 (M15) 및 19 (M19) 의 돌연변이된 잔기의 위치를 보여준다. **도 3B** 는 상이한 항체에 대한 돌연변이체 5, 15 및 19 의 결합 결과를 보여준다.

[0311] 따라서 결과는 가용성 CD39 를 저해하는 항체가 상이한 에피토프에 대해서 수득될 수 있다는 것을 보여준다. 에피토프는 가용성 CD39 는 저해하지 않고 오직 세포 CD39 를 저해하는 BY40 또는 BY40-유사 항체의 결합 부위에 인접하여 위치된 돌연변이체 19 의 하나 이상의 잔기에 의해 정의되는 에피토프 (돌연변이체 5 와의 결합은 소실), BY40 또는 BY40-유사 항체와 비교하여 가능하게 약간의 이동을 의미하는 돌연변이체 19 의 하나 이상의 잔기와 또한 부분적으로 돌연변이체 5 에 의해 정의되는 에피토프, 돌연변이체 5 의 잔기가 아닌 돌연변이체 19 의 하나 이상의 잔기에 의해 정의되는 에피토프를 비롯하여, 다른 에피토프 예컨대 돌연변이체 11 의 하나 이상의 잔기 또는 돌연변이체 15 의 하나 이상의 잔기, 또는 추가로 에피토프의 위치를 확인해야 되는 채로 남겨진 임의의 돌연변이체 5, 15 또는 10 와의 임의의 결합 감소를 갖지 않는 다른 항체에 의해 정의되는 것들을 포함한다.

[0312] **실시예 7: 유세포측정에 의한 CD39 발현 세포 상에서 항체 적정**

[0313] 항체 I-394 는 인간 CD39 를 발현하는 CHO 세포, 시노몰구스 (마카카 파시쿨라리스 (macaca fascicularis)) CD39 를 발현하는 CHO 세포, 뮤린 CD39 를 발현하는 CHO 세포, 및 인간 Ramos 림프종 세포 (ATCC™, 레퍼런스 CRL-1596) 와의 결합에 대해 2회 반복 실험에서 시험되었다. 세포는 30 ㎍/㎖ 내지 $5x10^{-4}$ ㎍/㎖ 의 다양한 농도의 미표지된 항-CD39 항체와 30 분 동안 4℃ 에서 인큐베이션되었다. 세척 후에, 세포는 염소 항-마우스 H+L 표지된 2차 항체와 30 분 동안 4℃ 에서 인큐베이션되었다.

[0314] 결과는 **도 4** 에 도시되어 있다. 항체 I-394 는 인간 CD39 를 발현하는 세포 (CHO-huCD39), 시노몰구스 CD39 를 발현하는 세포 (CHO-cyCD39) 및 Ramos 림프종 세포에 결합하였지만, 뮤린 CD39 를 발현하는 세포 (CHO-moCD39) 에는 결합하지 않았다. I-394 는 각각 제1 및 제 2 실험 세트에서 0.16 ㎍/㎖ 및 0.19 ㎍/㎖ 의 EC_{50} 값으로 Ramos 세포에 결합했다. 몇몇 다른 항-CD39 항체는 Ramos 세포와의 결합에 대해 비슷한 EC_{50} 값을 보였다.

[0315] **실시예 8: 세포 ATPase 활성의 저해를 위한 IC50 확인**

[0316] CD39-발현 세포에서 CD39 의 ATPase 활성의 항체 I-394 에 의한 저해는 상기 (방법) 에 기재된 바와 같이 세포 CD39 의 효소 활성의 저해에 사용되는 어세이를 사용하여 평가되었다.

[0317] 결과는 **도 5** 에 도시되어 있다. I-394 는 종양 (Ramos) 세포에서 CD39 효소 활성을 차단하는데서 고도로 강력하고, 시험된 모든 다른 항체와 비교하여 보다 큰 역가를 갖는다. I-394 는 또한 인간 CD39 를 발현하는 세포 (CHO-huCD39), 및 시노몰구스 CD39 를 발현하는 세포 (CHO-cyCD39) 에서 CD39 효소 활성을 차단한다. 뮤린 CD39 를 발현하는 세포 (CHO-moCD39) 는 음성 대조군으로서 표시된다. 계산된 IC_{50} (50,000 개 Ramos 세포에 의해 발현되는 CD39 의 효소 활성의 50%의 저해) 은 0.05 ㎍/㎖ 이다. 획득된 최대 저해는 81.6% 이다. 아이소타입 대조군은 효과가 없었다.

[0318] **실시예 9: 재조합 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성의 저해를 위한 IC50 확인**

[0319] 가용성 CD39 단백질의 ATPase 활성의 항체 I-394 에 의한 저해는 상기 (방법) 에 기재된 바와 같이 가용성 CD39 의 효소 활성의 저해에 사용된 어세이를 사용하여 평가했다. 결과는 **도 6** 에 도시되어 있다. I-394 는 가용성 CD39 단백질의 효소 활성을 저해한다. 비교 항체 BY40 은 가용성 CD39 단백질의 효소 활성을 저해하지 않았다. 계산된 IC_{50} 은 0.003 ㎍/㎖ 이었다. 획득된 최대 저해는 74.9% 이다.

[0320] **실시예 10: CD39-L1, L2, L3, L4 아이소형에 대한 ELISA 적정**

[0321] 항체 I-394 는 500 ng/㎖ 또는 1 ㎍/㎖ 로 PBS 1X 에 4℃ 에서 밤새 96웰 플레이트에 코팅시킨 하기 표시된 아미노산 서열을 갖는 재조합 인간 CD39 아이소형 (Rec-huCD39 아이소형) 과의 결합에 대해 시험되었다. 웰은 TBS Tween 20으로 세척했고, TBS 차단 완충액 중에 RT 에서 2시간 동안 더욱 포화시켰다. 용량 범위 농도의 1차 항체를 TBS 차단 완충액 중에 2시간 동안 RT 에서 인큐베이션했다. 웰은 TBS Tween 20 에서 세척했다. 2차 항체 (TBS 차단 완충액 중 GAM-HRP 또는 GAH-HRP) 는 1 시간 동안 RT 에서 인큐베이션시켰고, TMB 로 발색시켰다. 광학 밀도는 Enspire™ 상에서 OD=450 에서 측정했다.

[0322] *클로닝된 huCD39 의 아미노산 서열 (혈관 아이소형):*

[0323] 인간 CD39-L1, 또한 NTPDase2 또는 ENTPD2 로서 알려짐:

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

[0324] (SEQ ID NO: 40).

[0325] 인간 CD39-L2, 또한 NTPDase6 또는 ENTPD6 로서 알려짐:

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

[0326] (SEQ ID NO: 41).

[0327] 인간 CD39-L3, 또한 NTPDase3 또는 ENTPD3 로서 알려짐:

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

[0328] (SEQ ID NO: 42).

[0329] 인간 CD39-L4, 또한 NTPDase5 또는 ENTPD5 로서 알려짐:

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

[0330] (SEQ ID NO: 43).

[0331] I-394 는 CD39 에 결합하였지만 아이소형 CD39-L1, CD39-L2, CD39-L3 또는 CD39-L4 중 어떠한 것에도 결합하지 않았다. 아이소타입 대조군 항체 (IC) 는 임의의 CD39 또는 CD39-L 분자에 결합하지 않았다. 결과는 **도 7** 에 도시되어 있다.

[0332] **실시예 11: 수지상 세포의 활성화**

[0333] ATP 가 프로염증성 활성을 갖지만, ATP 의 CD39-매개되는 이화작용은 수지상 세포 (DC) 활성화를 손상시킬 수 있고, 결국 종양 항원에 대한 광범위한 획득 면역 반응을 변경시킬 수 있다고 여겨진다. 항-CD39 항체를 사용한 CD39 차단이 ATP 의 존재 하에서 수지상 세포 (DC) 활성화의 CD39-매개되는 변경을 극복할 수 있는지 여부를 평가하기 위해서, 우리는 ATP 의 존재 하에서 단핵구-유래 DC (moDC) 를 항-CD39 항체와 함께 인큐베이션했다.

[0334] 간략히, 인간 단핵구는 인간의 건강한 혈액으로부터 정제했고 6일 동안 GM-CSF 및 IL-4 의 존재 하에서 MoDC로 분화시켰다. 다음으로 MoDC 는 24시간 동안 ATP (Sigma, 0.25 - 1 mM) 의 존재 하에서 활성화되었고 DC 활성화는 유세포측정법을 통해 CD80, CD83 및 HLA-DR 발현을 분석하여 평가되었다. 일부 경우에서, MoDC 는 1 시간 동안 CD39 저해인자: ARL6716 (Tocris, 250 μM), CD73 저해인자: APCP (Tocris 50 μM), 항-CD39 차단 항체 I-394 또는 BY40 (BY40 의 경우 WO2009/095478 참조), 또는 항-CD73 차단 항체의 존재 하에서 사전인큐베

이션되었다. LPS (Invivogen, 10 ng/㎖) 는 양성 대조군으로서 사용되었다. CD4 T 세포 활성화에 대한 ATP-매개되는 DC 활성화의 최종 효과를 평가하기 위해서, ATP-활성화된 DC 를 세척시킨 후 5 일 동안 혼합 림프구 반응 (MLR) 을 위해 동종이계 CD4 T 세포 (1 MoDC / 4 T 세포 비) 와 함께 인큐베이션했다. T 세포 활성화 및 증식은 유세포측정법에 의한 Cell Trace Violet 희석 및 CD25 발현을 통해 분석되었다 (**도 8**).

[0335] 결과는 **도 9, 10 및 11** 에 도시되어 있다. 음성 대조군 (배지) 의 존재 하에서, moDC 활성화는 1 mM ATP 의 존재 하에서 관찰되었지만, 0.125 mM, 0.25 mM 또는 0.5 mM 의 ATP 는 moDC 활성화를 허용하지 않았다. 활성부위에 결합하여 CD39 효소 활성을 완전히 차단하는 것으로 여겨지는 CD39 의 화학적 저해인자의 첨가는 0.125 mM, 0.25 mM 또는 0.5 mM 각각에서 moDC 활성화를 야기시켰다. 그러나, 항-CD39 항체 예컨대 BY40 또는 항-CD73 항체는 수지상 세포 (CD) 의 ATP-유도되는 활성화를 촉진할 수 없었고, 항체가 ATP 이화작용을 피하도록 충분히 효소 활성을 차단할 수 없다는 것을 시사한다. 놀랍게도, CD39 의 ATPase 활성을 실질적으로 완전하게 차단하고 그에 따라 ATP 의 축적을 가능하게 할 수 있는 항-CD39 차단 항체 I-394 (농도 10 ㎍/㎖ 로도면에 도시) 는 각각 0.125 mM, 0.25 mM 또는 0.5 mM 에서 HLA-DR 또는 CD83 발현을 통해 평가 시 moDC 활성화를 가능하게 했다 (**도 9 및 10**). 흥미롭게도, ATP 의 존재 하에서 활성화된 MoDC 는 MLR 어세이에서 더 양호한 T 세포 활성화 및 증식을 유도할 수 있었다. 게다가, 항-CD39 차단 항체 I-394 에 의한 ATP-매개되는 MoDC 활성화의 증강은 그 결과로 더 높은 T 세포 증식 및 활성화를 일으켰다 (**도 11**).

[0336] APT 의 존재 하에서 DC 를 활성화시키는 CD39 저해인자의 능력의 평가는 높은 정도의 CD39 의 저해를 획득할 수 있는 항-CD39 항체를 확인하고 평가하는 방법을 제공한다. 뿐만 아니라, DC에 대해 CD39 에 의해 발휘되는 면역저해 효과를 경감시키기 위해 항-CD39 항체를 사용하는 가능성은 특히 종양 세포 상의 항원에 대한 획득 면역 반응의 증강을 제공한다. 뿐만 아니라, 이러한 항-CD39 항체는 화학요법제의 면역원성 효과를 증강시키기 위해 사용될 때 특히 흥미로울 수 있다. 종양 세포의 괴사를 야기시키는 수많은 화학요법제는 ATP 를 유도시킬 수 있고, 항-CD39 항체와의 병용은 이들 상황에서 항종양 반응을 증가시키는데 특히 유용할 수 있다.

[0337] **실시예 12: ATP 방출을 유도하는 작용제의 항-CD39 항체를 이용하는 생체내 조합 치료**

[0338] 인간 CD39 를 발현하도록 유전자 조작된 마우스 (CD39KI 마우스) 의 오른쪽 옆구리에 $1x10^6$ MCA205 마우스 종양 세포 (육종) 를 피하 이식했다. 마우스 (n= 9 내지 13) 를 대조군, 옥살리플라틴 (10 mg/kg, 복강내, 제 5 일 및 제 12 일 또는 제 14 일), 뮤린 항-인간 CD39 항체 I-394 (제 1 주입은 20 mg/kg 및 그 후 10 mg/kg, 정맥내, 제 4 일로부터 3 또는 4 주 동안 1 주 2 회) 또는 둘 모두의 조합으로 처리했다. 종양을 1 주 2 회 칼리퍼 (L: 길이 및 w: 너비) 로 측정하고, 종양 부피를 식 (Lxw2)/2 으로 계산했다. 종양 부피가 1800 ㎣ 를 초과했을 때 또는 종양이 크게 괴사했을 때 마우스를 희생시켰다. 제 0 일에 인간 CD39 KI 마우스에 MCA205 종양 세포를 이식했다. 마우스 FcR 및 보체 결합을 방지하기 위해서, 사용된 뮤린 I-394 는 아글리코실화된 마우스 IgG1 아이소타입 (Kabat 중쇄 잔기 N297 에서 치환) 으로 조작되었으며, 그에 따라 관찰된 유일한 효과는 항체의 차단 특성과 연관되고, CD39+ 면역 억제인자 세포 또는 CD39+ 내피 세포의 ADCC 또는 CDC 용해와는 연관되지 않는다.

[0339] 제 1 실험 시리즈에서, 마우스를 종양 세포 이식 후 제 5 일에 대조군 (1 개의 군) PBS, 또는 옥살리플라틴 화학요법 (2 개의 군) 으로 처리했다. 병행하여, 옥살리플라틴으로 처리된 마우스의 1 개의 군에 항-CD39 항체를 1 주 2 회 주입했으며, 항-CD39 항체 처리는 옥살리플라틴 처리 전 1 일에 (제 4 일에) 시작했다. 이는 CD39 가 이미 그리고 완전히 저해되었고, 따라서 종양내 CD39 에 의한 ATP 붕괴의 최적 방지를 제공하는, 종양 환경에서 옥살리플라틴이 ATP 방출을 유도하는 것을 보장했다. 이 실험에서, 마우스 생존율 및 종양 성장의 지연이 옥살리플라틴 및 I-394 항체 군의 조합에서 관찰될 수 있었으며, 그러나, 대조군 또는 옥살리플라틴 단일 작용제 군에서 CR 이 관찰되지 않은 반면, 이 군에서 1 완전한 응답 (CR) 이 수득되었음에도, 지연은 상대적으로 보통으로 여겨졌다. 대조군의 생존율 중앙값은 20 일이고, 옥살리플라틴은 25 일이고, I-394 항체와 옥살리플라틴의 조합은 31 일이었다. 결과가 **도 12** 에서 보여진다.

[0340] 제 2 실험 시리즈에서 (둘 중 하나의 대표적인 실험이 보여진다), 옥살리플라틴 주입을 제 1 옥살리플라틴 주입 후 1 주에 반복했고, 다시 I-394 항체 처리 후 1 일에 반복하여, ATP 붕괴의 최적 저해를 저해했다. 단독으로 투여된 I-394 Ab 는 종양 성장에 대해 및 마우스 생존율에 대해 오직 미미한 효과를 가졌다. 단일 작용제로서 옥살리플라틴의 반복된 (2 회) 주입은 종양 부피의 일부 퇴행, 및 마우스 생존율의 증가를 유도했다. 그러나, 옥살리플라틴의 반복된 주입과 옥살리플라틴 전에 투여된 항체 I-394 와의 조합은 모든 마우스에서 종양 부피 퇴행을 유도했으며, 3 CR (옥살리플라틴 단독의 경우의 2 CR 과 비교됨), 및 6 부분적 응답 (PR) (옥살리플라틴 단독의 경우의 3 PR 과 비교됨) 이 관찰되었다. 조합은 또한 종양 이식 후 40 일에 마우스의 생

존율을 개선했으며, 4/13 종양 부재 마우스 (옥살리플라틴 단독 군의 경우의 2/12 와 비교됨) 가 관찰되었다. 결과가 **도 13** 에서 보여진다.

[0341] 이러한 상황에서 옥살리플라틴의 제 2 반복 주입은 효율적 항-종양 면역 응답을 증가시키는데 요구되는 전통적 2 주 기간 동안 차단 항-CD39 항체의 존재 하에 ATP 축적 및 아데노신 (Ado) 저해가 일어나는 것을 허용하는 것으로 여겨진다. 그 결과, 항-CD39 차단 항체와의 가장 강한 조합 효과를 보기 위해서, 인간에서 개선된 치료 섭생법은 화학요법 투여를 적어도 2 회 반복하는 것을 수반할 수 있다. 더욱이, 화학치료제가 ATP 방출을 유도하는 때에, 종양내 CD39 의 완전한 저해, 및 아데노신으로의 ATP 붕괴의 완전한 저해를 보장하기 위해서, 항-CD39 Ab 는 이상적으로는 ATP 방출을 유도하는 화학치료제 전 적어도 1-48 h 에 투여될 수 있다.

[0342] 본원에서 인용되는 출판물, 특허 출원 및 특허를 포함한 모든 참조 문헌은 본원의 다른 곳에서 임의의 별개로 제공되는 특정 문서의 포함과 무관하게, 각 참조 문헌이 참조로 포함시킨다고 개별적으로 특별히 표시하고 본원에 그 전문으로 기재된다고 한 바와 동일한 정도로 (법이 허용하는 최대 정도로) 그들 전문이 본원에 참조로 포함된다.

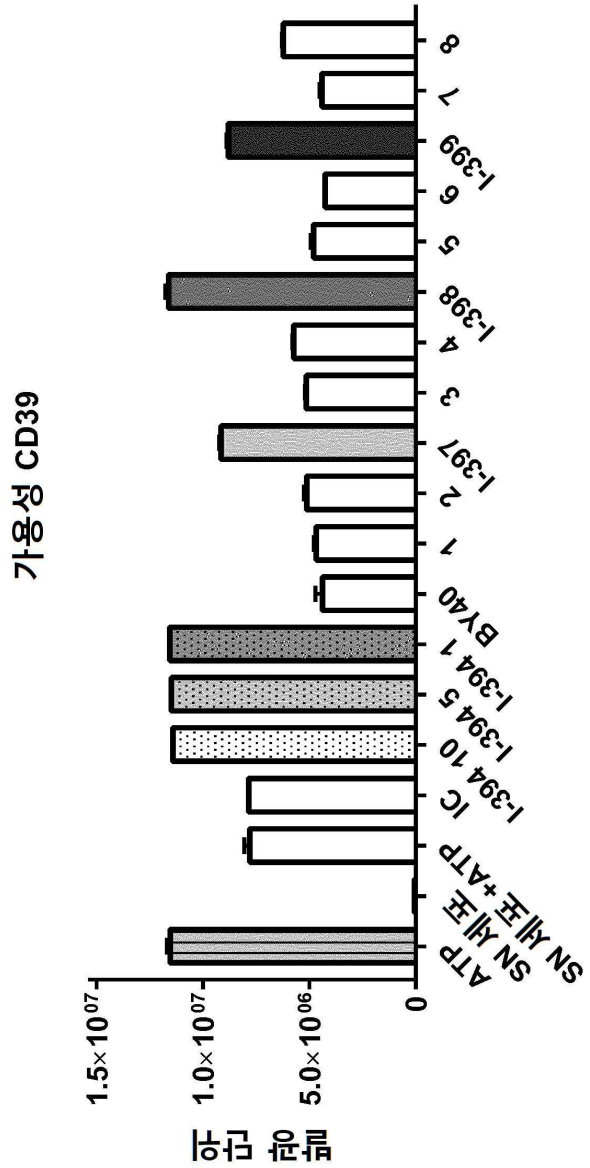
[0343] 달리 명시하지 않으면, 본원에서 제공되는 모든 정확한 값은 상응하는 근사값을 대표한다 (예를 들어, 특정한 인자 또는 측정치에 대하여 제공되는 모든 정확한 예시적 값은 또한 적절한 경우에 "약" 으로 변형된, 상응하는 근사 측정치를 제공하는 것을 고려할 수 있음). "약" 이 수치와 함께 사용되는 경우에, 이것은 명시된 수치의 +/-10% 에 해당하는 값을 포함하는 것으로 명시될 수 있다.

[0344] 요소 또는 요소들과 관련하여 "포함하는", "가지는", "포괄하는" 또는 "함유하는" 과 같은 용어를 사용하는 본 발명의 임의의 양태 또는 실시형태의 본원에서의 설명은 다르게 명시하지 않거나 또는 문맥에서 명백하게 반박하지 않으면, 특정한 요소 또는 요소들로 " 이루어지거나", "본질적으로 이루어지거나", 또는 "포함하는" 본 발명의 유사한 양태 또는 실시형태에 대한 뒷받침을 제공하고자 한다 (예를 들어, 특정한 효소를 포함하는 것으로 본원에서 기술된 조성물은 다르게 명시하지 않거나 또는 문맥에서 명백하게 반박하지 않으면, 그 요소로 이루어지는 조성물을 또한 설명하는 것으로 이해해야 함).

[0345] 본원에서 제공되는 임의의 모든 예, 또는 예시적 언어 (예를 들어, "예컨대") 의 사용은 단지 본 발명을 보다 잘 예시하려는 의도이고 다르게 청구하지 않으면 본 발명의 범주의 제한을 의미하는 것이 아니다. 명세서의 어떠한 언어도 임의의 비청구 요소를 본 발명의 실시에서 본질적인 것을 의미하는 것으로서 해석되어서는 안된다.

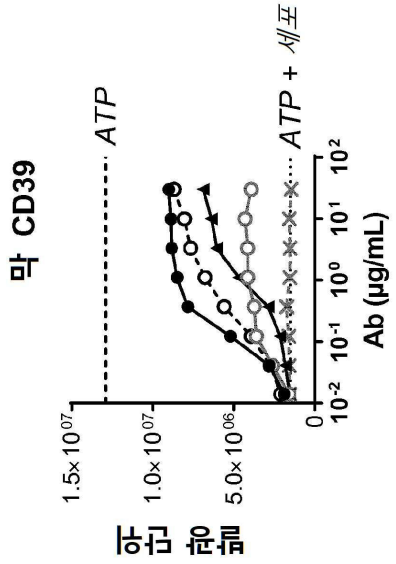
도면

도면1

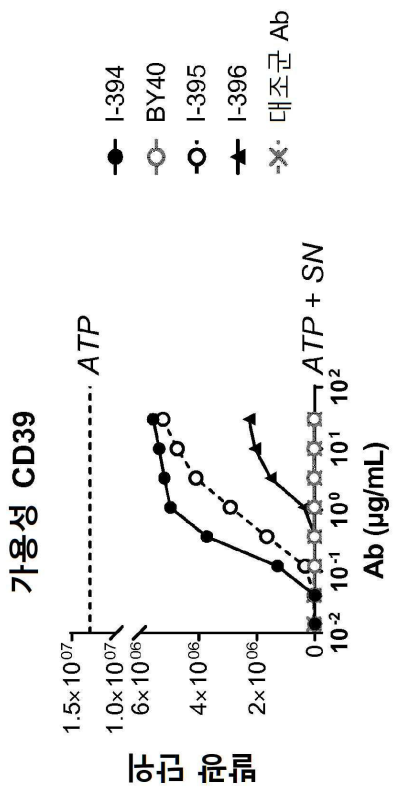

가용성 CD39
발광 단위
1.5×10^07
1.0×10^07
5.0×10^06
0
ATP
SN 세포
SN 세포 +ATP
IC
I-394 10
I-394 5
I-394 1
BY40
1
2
I-397
3
4
I-398
5
6
I-399
7
8

도면2

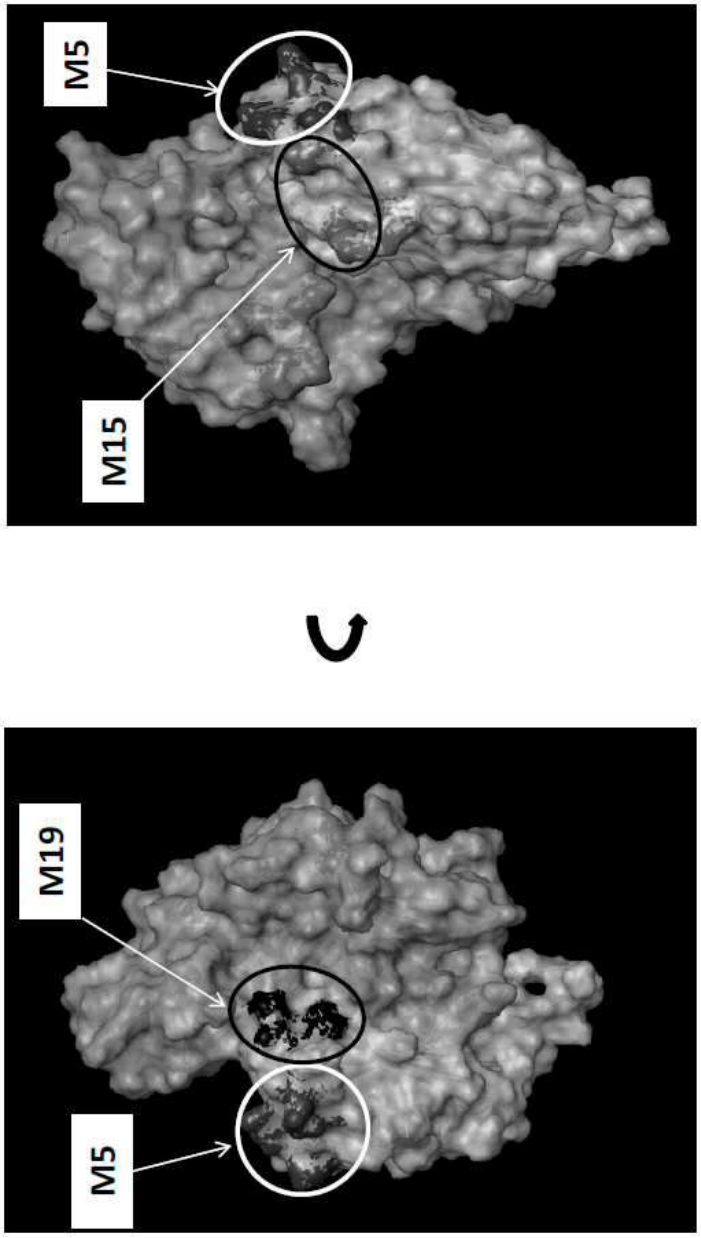
도 2A


막 CD39
ATP
ATP + 세포
발광 단위
1.5x10^07
1.0x10^07
5.0x10^06
0
10^-2 10^-1 10^0 10^1 10^2
Ab (μg/mL)

도 2B


가용성 CD39
ATP
ATP + SN
발광 단위
1.5x10^07
1.0x10^07
6x10^06
4x10^06
2x10^06
0
10^-2 10^-1 10^0 10^1 10^2
Ab (μg/mL)
I-394
BY40
I-395
I-396
대조군 Ab

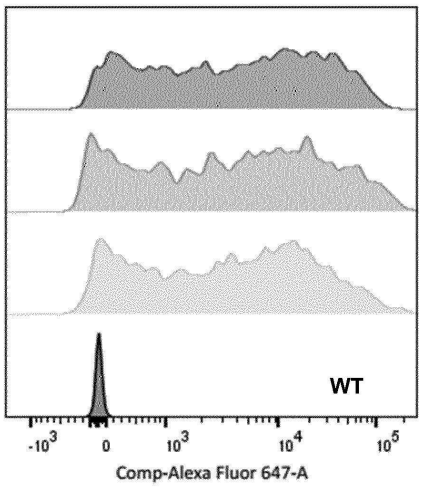
도면3a



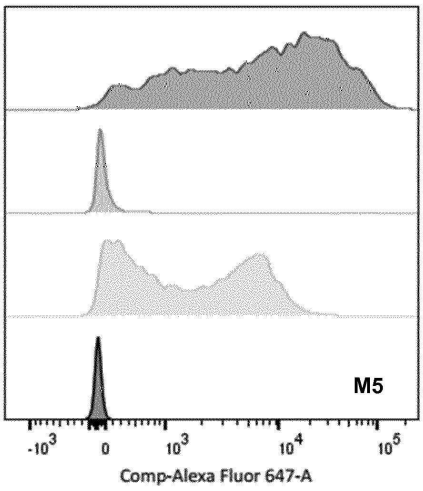
도 3A

도면3b

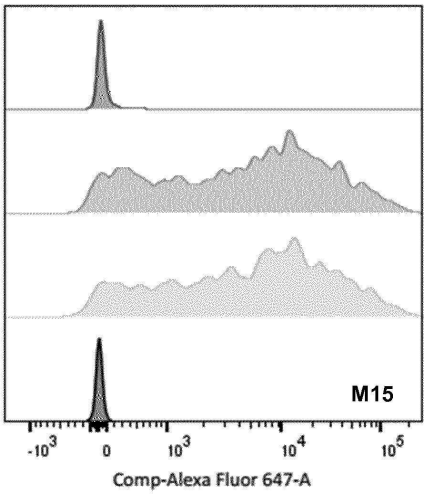
도 3B



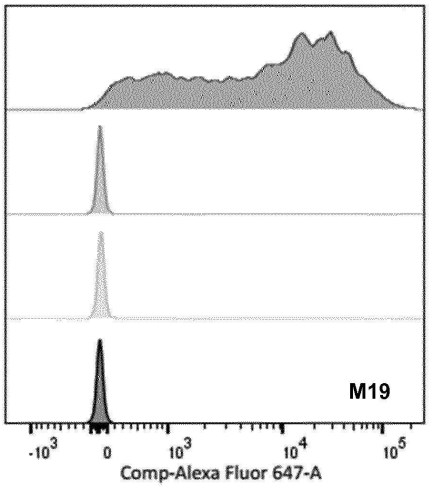
	튜브명	총수	중앙값 : Comp-Alexa Fluor 647-A
	I-396	2487	4343
	I-395	2565	4237
	I-394	2151	3716
	US	1942	10.3



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

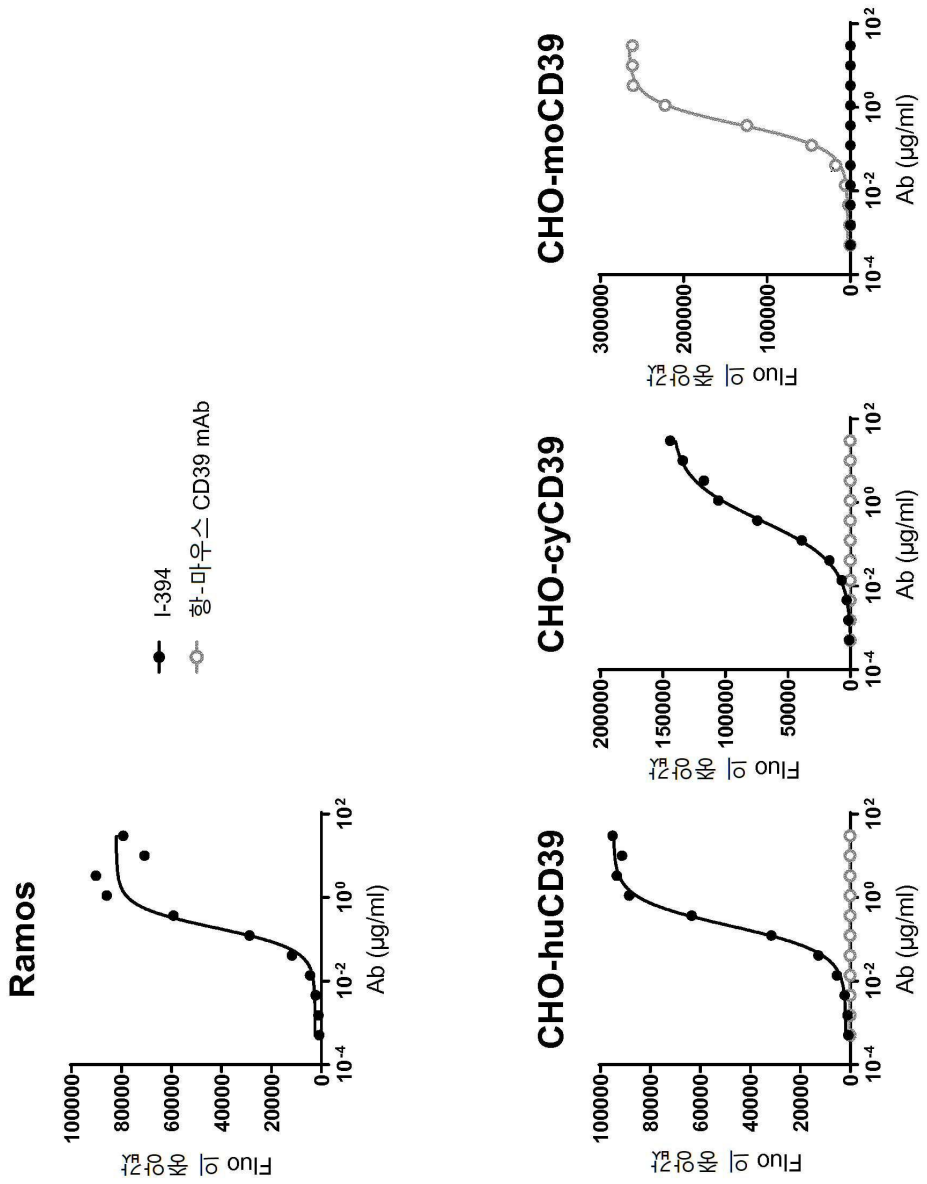


	튜브명	총수	중앙값 : Comp-Alexa Fluor 647-A
	I-396	2186	35.9
	I-395	2138	5750
	I-394	2014	6363
	US	1908	8.98

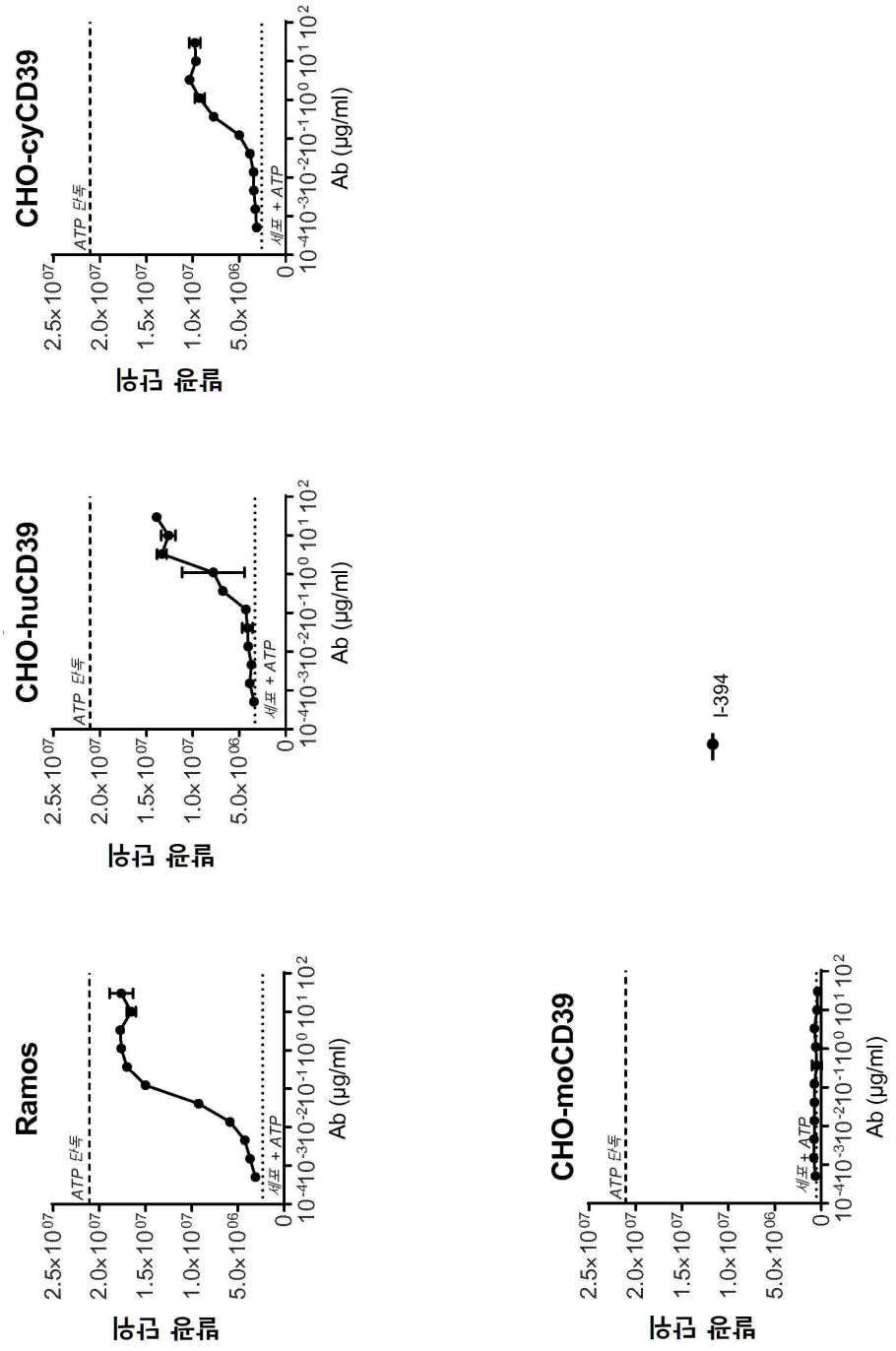


	튜브명	총수	중앙값 : Comp-Alexa Fluor 647-A
	I-396	2375	8893
	I-395	2698	15.4
	I-394	2611	24.4
	US	1879	8.98

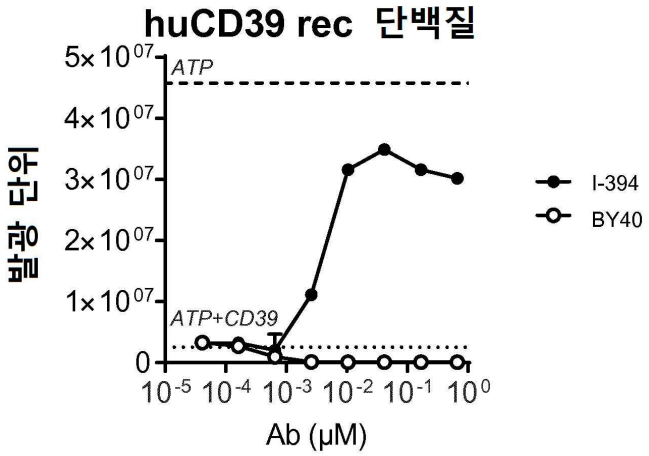
도면4


Ramos
CHO-huCD39
CHO-cyCD39
CHO-moCD39
I-394
항-마우스 CD39 mAb
Flu o l 중앙값
Ab (μg/ml)

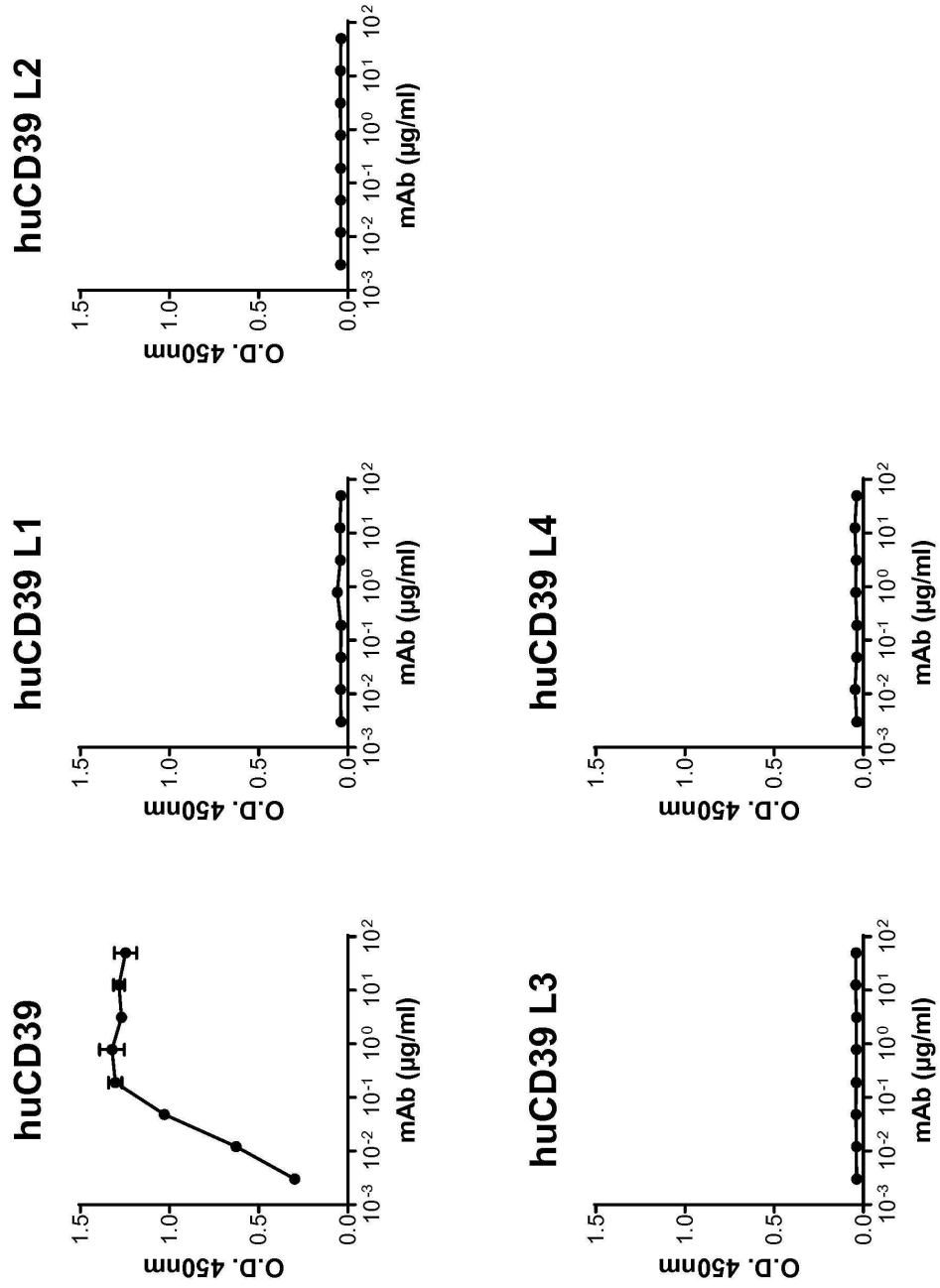
도면5


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

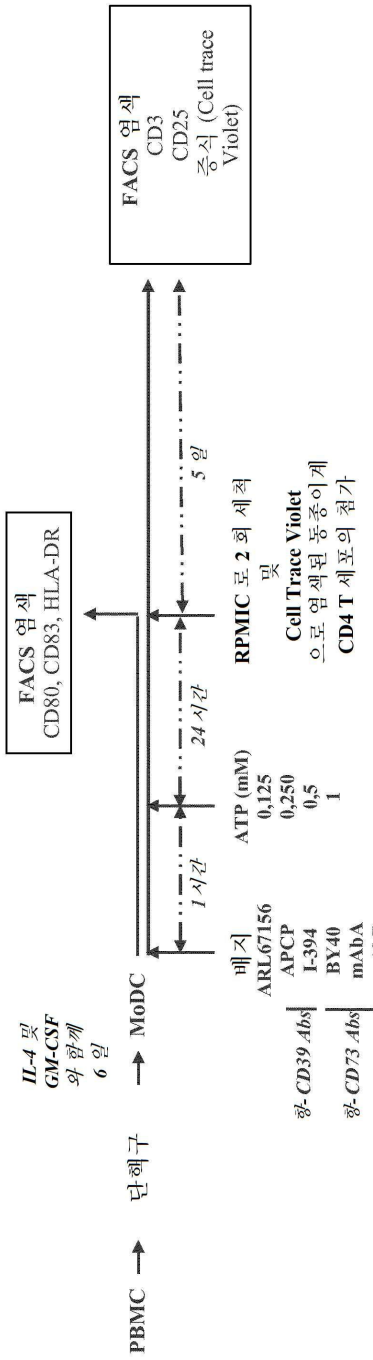
도면6


huCD39 rec 단백질
발광 단위
5×10^07
4×10^07
3×10^07
2×10^07
1×10^07
0
ATP
ATP+CD39
10^-5 10^-4 10^-3 10^-2 10^-1 10^0
Ab (μM)
I-394
BY40

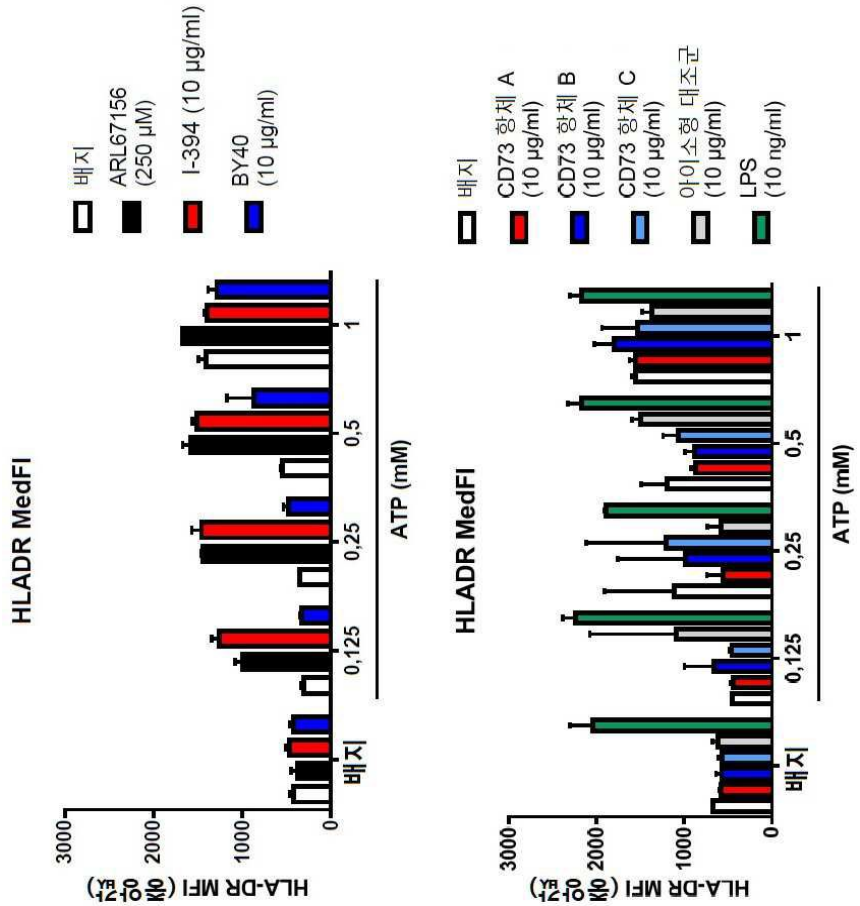
도면7


huCD39
huCD39 L1
huCD39 L2
huCD39 L3
huCD39 L4
O.D. 450nm
mAb (μg/ml)
0.0
0.5
1.0
1.5
10-3
10-2
10-1
100
101
102

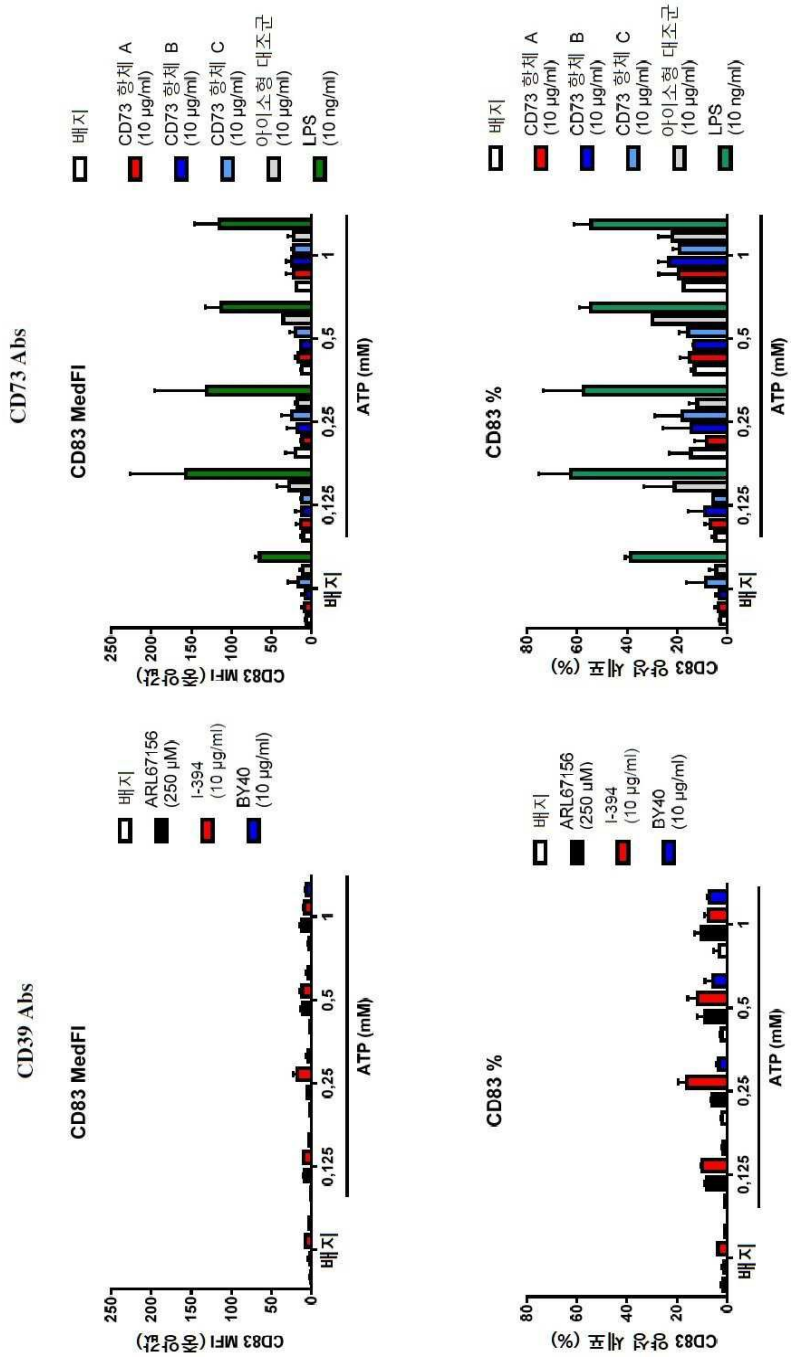
도면8


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

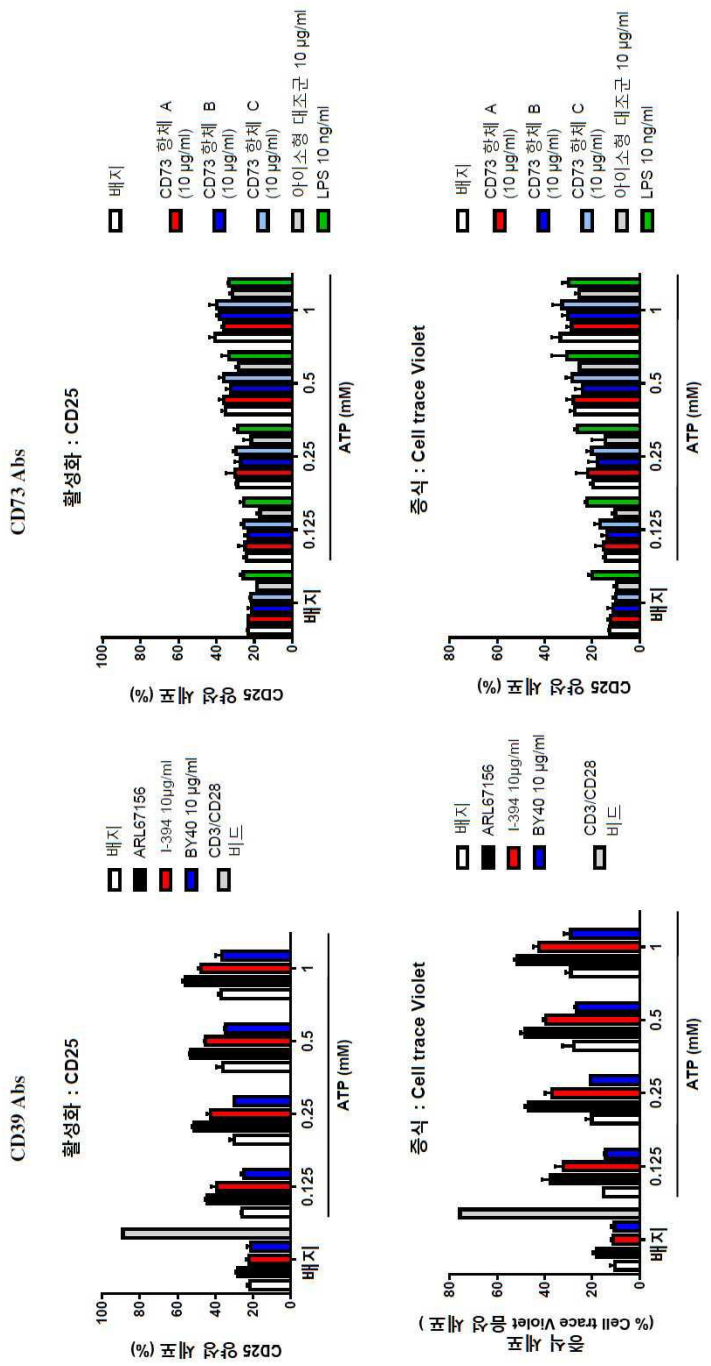
도면9


HLADR MedFI
HLA-DR MFI (예외값 제외)
3000
2000
1000
0
배지
0,125
0,25
0,5
1
ATP (mM)
배지
ARL67156 (250 μM)
I-394 (10 μg/ml)
BY40 (10 μg/ml)
HLADR MedFI
HLA-DR MFI (예외값 제외)
3000
2000
1000
0
배지
0,125
0,25
0,5
1
ATP (mM)
배지
CD73 항체 A (10 μg/ml)
CD73 항체 B (10 μg/ml)
CD73 항체 C (10 μg/ml)
아이소형 대조군 (10 μg/ml)
LPS (10 ng/ml)

도면10

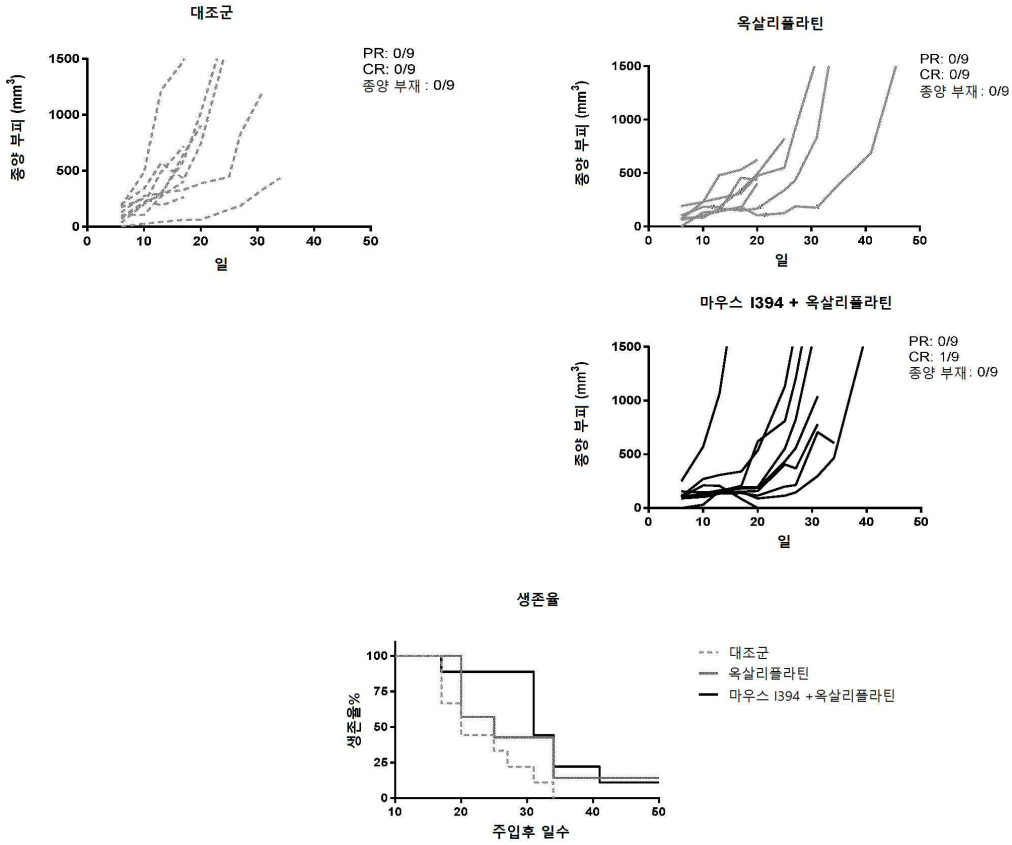

CD73 Abs
CD83 MedFI
CD83 MFI (중앙값)
배지
CD73 항체 A (10 μg/ml)
CD73 항체 B (10 μg/ml)
CD73 항체 C (10 μg/ml)
아이소형 대조군 (10 μg/ml)
LPS (10 ng/ml)
ATP (mM)
CD83 %
CD83 양성 세포 (%)
CD39 Abs
ARL67156 (250 μM)
I-394 (10 μg/ml)
BY40 (10 μg/ml)

도면11

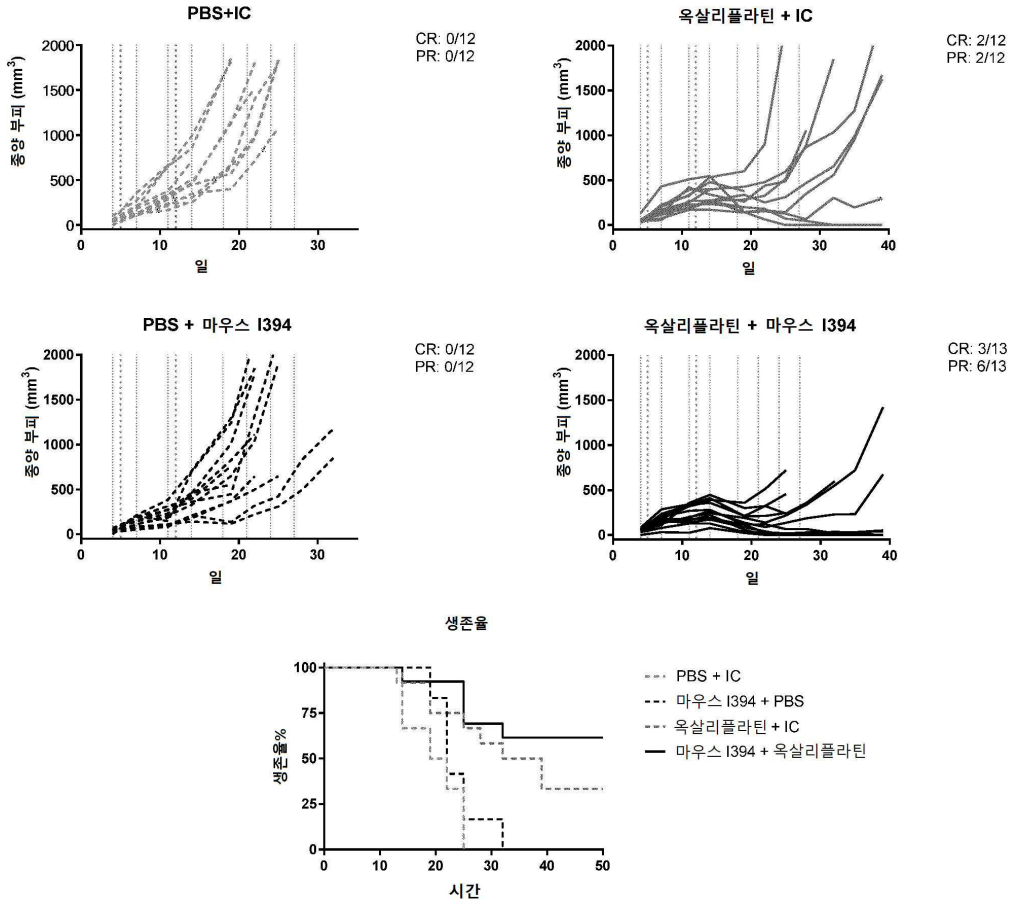

CD39 Abs
활성화 : CD25
CD25 양성 세포 (%)
배지
ARL67156
I-394 10μg/ml
BY40 10 μg/ml
CD3/CD28
비드
0.125
0.25
0.5
1
ATP (mM)
증식 : Cell trace Violet
증식 세포
(% cell trace Violet 음성 세포)
CD73 Abs
CD73 항체 A
(10 μg/ml)
CD73 항체 B
(10 μg/ml)
CD73 항체 C
(10 μg/ml)
아이소형 대조군 10 μg/ml
LPS 10 ng/ml

도면12

옥살리플라틴 단일 주입 제 5 일



도면13



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> INNATE PHARMA

<120> POTENTIATING THE EFFECT OF ATP RELEASE

<130> CD39-8

<150> US 62/586,224

<151> 2017-11-15

<150> US 62/733,175

<151> 2018-09-19

<150> US 62/686,149

<151> 2018-06-18

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 510

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 1

Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser Lys Asn
1 5 10 15
Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu

20 25 30
Leu Ala Val Gly Leu Thr Gln Asn Lys Ala Leu Pro Glu Asn Val Lys
35 40 45
Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu Tyr Ile
50 55 60
Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln
65 70 75 80
Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe Val Gln

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

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

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

210 215 220

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

275 280 285

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

340 345 350

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

405 410 415

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

450 455 460

Glu Gln Pro Leu Ser Thr Pro Leu Ser His Ser Thr Tyr Val Phe Leu

465 470 475 480

Met Val Leu Phe Ser Leu Val Leu Phe Thr Val Ala Ile Ile Gly Leu

485 490 495

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

500 505 510

<210> 2

<211> 478

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln

65 70 75 80

Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe Val Gln

85 90 95

Lys Val Asn Glu Ile Gly Ile Tyr Leu Thr Asp Cys Met Glu Arg Ala

100 105 110

Arg Glu Val Ile Pro Arg Ser Gln His Gln Glu Thr Pro Val Tyr Leu

115 120 125

Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu Arg Met Glu Ser Glu Glu Leu

130 135 140

Ala Asp Arg Val Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Pro

145 150 155 160

Phe Asp Phe Gln Gly Ala Arg Ile Ile Thr Gly Gln Glu Glu Gly Ala

165 170 175

Tyr Gly Trp Ile Thr Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Lys Phe Ser Gln Lys

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

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

<210> 3
<211> 116
<212> PRT
<213> MUS MUSCULUS
<400> 3
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Arg Thr Leu Glu Trp Ile

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

100 105 110
Thr Val Ser Ala
115
<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> MUS MUSCULUS

<400> 4

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

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

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

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

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

Pro Met Glu Ala Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys
85 90 95

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

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> MUS MUSCULUS

<400> 5

Asp Tyr Asn Met His
1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Tyr Ile Val Pro Leu Asn Gly Gly Ser Thr Phe Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gly Gly Thr Arg Phe Ala Tyr

1 5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

1 5 10 15

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 11

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ala

115

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 13
Asp Tyr Asn Met His
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 14
Tyr Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 15
Gly Gly Thr Arg Phe Ala Ser
1 5

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 16
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Tyr
1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr

1 5

<210> 19

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 20

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

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

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 21

Asp Thr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 22
<211> 17
<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

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

1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

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

1 5 10

<

210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

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

1 5 10 15

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

His Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 27

<211> 118

<212> PRT

<213

> Mus musculus

<400> 27

Pro Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Met Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Asn Trp Met Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Asp Phe Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr

100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<

400> 28

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

1 5 10 15

Glu Lys Ile Thr Phe Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

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

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 29
Ser Phe Trp Met Asn
1 5

<210> 30
<211> 17
<212> PRT

<213> Mus musculus
<400> 30
Glu Ile Asp Pro Ser Asp Phe Tyr Thr Asn Ser Asn Gln Arg Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 31
Gly Asp Phe Gly Trp Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 32
<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

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

1 5 10

<210> 33

<211

> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

Gln Gln Gly Ser Ser Leu Pro Arg Thr

1 5

<210> 35

<211> 45

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 35

tacgactcac aagcttgccg ccaccatgga agatacaaag gagtc 45

<210> 36

<211> 64

<212> DNA

<213> HOMO SAPIENS

<400> 36

ccgccccgac tctagatcac ttgtcatcgt catctttgta atcgacatag gtggagtggg 60

agag 64

<210> 37

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric homo sapiens mus musculus

<400> 37

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 38

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> Chimeric homo sapiens mus musculus

<400> 38

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

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

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

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

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

Pro Met Glu Ala Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys
85 90 95

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

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 39

<211> 486

<212

> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 39

Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser Lys Asn
1 5 10 15

Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu
20 25 30

Leu Ala Val Gly Leu Thr Gln Asn Lys Ala Leu Pro Glu Asn Val Lys
35 40 45

Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu Tyr Ile
50 55 60

Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln
65 70 75 80

Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe Val Gln
85 90 95

Lys Val Asn Glu Ile Gly Ile Tyr Leu Thr Asp Cys Met Glu Arg Ala
100 105 110

Arg Glu Val Ile Pro Arg Ser Gln His Gln Glu Thr Pro Val Tyr Leu
115 120 125

Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu Arg Met Glu Ser Glu Glu Leu
130 135 140

Ala Asp Arg Val Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Pro
145 150 155 160

Phe Asp Phe Gln Gly Ala Arg Ile Ile Thr Gly Gln Glu Glu Gly Ala
165 170 175

Tyr Gly Trp Ile Thr Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Lys Phe Ser Gln Lys
180 185 190

Thr Arg Trp Phe Ser Ile Val Pro Tyr Glu Thr Asn Asn Gln Glu Thr
195 200 205

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

Gly Lys Asp Gln Ala Leu Trp Gln Lys Leu Ala Lys Asp Ile Gln Val
260 265 270
Ala Ser Asn Glu Ile Leu Arg Asp Pro Cys Phe His Pro Gly Tyr Lys
275 280 285
Lys Val Val Asn Val Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Pro Cys Thr Lys Arg
290 295 300
Phe Glu Met Thr Leu Pro Phe Gln Gln Phe Glu Ile Gln Gly Ile Gly
305 310 315 320

Asn Tyr Gln Gln Cys His Gln Ser Ile Leu Glu Leu Phe Asn Thr Ser
325 330 335
Tyr Cys Pro Tyr Ser Gln Cys Ala Phe Asn Gly Ile Phe Leu Pro Pro
340 345 350
Leu Gln Gly Asp Phe Gly Ala Phe Ser Ala Phe Tyr Phe Val Met Lys
355 360 365
Phe Leu Asn Leu Thr Ser Glu Lys Val Ser Gln Glu Lys Val Thr Glu
370 375 380

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

Gly Trp Thr Leu Gly Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Met Ile Pro Ala

450 455 460

Glu Gln Pro Leu Ser Thr Pro Leu Ser His Ser Thr Tyr Val Asp Tyr

465 470 475 480

Lys Asp Asp Asp Asp Lys

485

<210> 40

<211> 472

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 40

Met Ala Gly Lys Val Arg Ser Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Ala Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Glu Pro Pro Ala Leu Lys Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser

35 40 45

Ser His Thr Ser Met Phe Ile Tyr Lys Trp Pro Ala Asp Lys Glu Asn

50 55 60

Asp Thr Gly Ile Val Gly Gln His Ser Ser Cys Asp Val Pro Gly Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Gly Cys Leu Glu Gln Ala Leu Gln Asp Val Pro Lys Glu Arg His

100 105 110

Ala Gly Thr Pro Leu Tyr Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu

115 120 125

Asn Leu Thr Asn Pro Glu Ala Ser Thr Ser Val Leu Met Ala Val Thr

130 135 140

His Thr Leu Thr Gln Tyr Pro Phe Asp Phe Arg Gly Ala Arg Ile Leu

145 150 155 160

Ser Gly Gln Glu Glu Gly Val Phe Gly Trp Val Thr Ala Asn Tyr Leu

165 170 175

Leu Glu Asn Phe Ile Lys Tyr Gly Trp Val Gly Arg Trp Phe Arg Pro
180 185 190
Arg Lys Gly Thr Leu Gly Ala Met Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln
195 200 205

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

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

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

Ile Phe Gln Lys Lys Ala Ala Asp Thr Ala Val Gly Trp Ala Leu Gly
405 410 415
Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Leu Ile Pro Ala Asp Pro Pro Gly Leu

420 425 430

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

435 440 445

Ala Ser Ala Leu Leu Ala Ala Leu Val Leu Leu Leu Arg Gln Val His

450 455 460

Ser Ala Lys Leu Pro Ser Thr Ile

465 470

<210> 41

<211> 484

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 41

Met Lys Lys Gly Ile Arg Tyr Glu Thr Ser Arg Lys Thr Ser Tyr Ile

1 5 10 15

Phe Gln Gln Pro Gln His Gly Pro Trp Gln Thr Arg Met Arg Lys Ile

20 25 30

Ser Asn His Gly Ser Leu Arg Val Ala Lys Val Ala Tyr Pro Leu Gly

35 40 45

Leu Cys Val Gly Val Phe Ile Tyr Val Ala Tyr Ile Lys Trp His Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Arg Trp Gly Gln Gln Ala His Ser Pro Leu Gly Thr Ala Ala Asp

85 90 95

Gly His Glu Val Phe Tyr Gly Ile Met Phe Asp Ala Gly Ser Thr Gly

100 105 110

Thr Arg Val His Val Phe Gln Phe Thr Arg Pro Pro Arg Glu Thr Pro

115 120 125

Thr Leu Thr His Glu Thr Phe Lys Ala Leu Lys Pro Gly Leu Ser Ala

130 135 140

Tyr Ala Asp Asp Val Glu Lys Ser Ala Gln Gly Ile Arg Glu Leu Leu

145 150 155 160

Asp Val Ala Lys Gln Asp Ile Pro Phe Asp Phe Trp Lys Ala Thr Pro
165 170 175

Leu Val Leu Lys Ala Thr Ala Gly Leu Arg Leu Leu Pro Gly Glu Lys
180 185 190
Ala Gln Lys Leu Leu Gln Lys Val Lys Glu Val Phe Lys Ala Ser Pro
195 200 205
Phe Leu Val Gly Asp Asp Cys Val Ser Ile Met Asn Gly Thr Asp Glu
210 215 220
Gly Val Ser Ala Trp Ile Thr Ile Asn Phe Leu Thr Gly Ser Leu Lys
225 230 235 240

Thr Pro Gly Gly Ser Ser Val Gly Met Leu Asp Leu Gly Gly Gly Ser
245 250 255
Thr Gln Ile Ala Phe Leu Pro Arg Val Glu Gly Thr Leu Gln Ala Ser
260 265 270
Pro Pro Gly Tyr Leu Thr Ala Leu Arg Met Phe Asn Arg Thr Tyr Lys
275 280 285
Leu Tyr Ser Tyr Ser Tyr Leu Gly Leu Gly Leu Met Ser Ala Arg Leu
290 295 300

Ala Ile Leu Gly Gly Val Glu Gly Gln Pro Ala Lys Asp Gly Lys Glu
305 310 315 320
Leu Val Ser Pro Cys Leu Ser Pro Ser Phe Lys Gly Glu Trp Glu His
325 330 335
Ala Glu Val Thr Tyr Arg Val Ser Gly Gln Lys Ala Ala Ala Ser Leu
340 345 350
His Glu Leu Cys Ala Ala Arg Val Ser Glu Val Leu Gln Asn Arg Val
355 360 365

His Arg Thr Glu Glu Val Lys His Val Asp Phe Tyr Ala Phe Ser Tyr
370 375 380
Tyr Tyr Asp Leu Ala Ala Gly Val Gly Leu Ile Asp Ala Glu Lys Gly
385 390 395 400
Gly Ser Leu Val Val Gly Asp Phe Glu Ile Ala Ala Lys Tyr Val Cys

405 410 415

Arg Thr Leu Glu Thr Gln Pro Gln Ser Ser Pro Phe Ser Cys Met Asp

420 425 430

Leu Thr Tyr Val Ser Leu Leu Leu Gln Glu Phe Gly Phe Pro Arg Ser

435 440 445

Lys Val Leu Lys Leu Thr Arg Lys Ile Asp Asn Val Glu Thr Ser Trp

450 455 460

Ala Leu Gly Ala Ile Phe His Tyr Ile Asp Ser Leu Asn Arg Gln Lys

465 470 475 480

Ser Pro Ala Ser

<210> 42

<211> 529

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 42

Met Phe Thr Val Leu Thr Arg Gln Pro Cys Glu Gln Ala Gly Leu Lys

1 5 10 15

Ala Leu Tyr Arg Thr Pro Thr Ile Ile Ala Leu Val Val Leu Leu Val

20 25 30

Ser Ile Val Val Leu Val Ser Ile Thr Val Ile Gln Ile His Lys Gln

35 40 45

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

50 55 60

Ser Ser Arg Thr Thr Val Tyr Val Tyr Gln Trp Pro Ala Glu Lys Glu

65 70 75 80

Asn Asn Thr Gly Val Val Ser Gln Thr Phe Lys Cys Ser Val Lys Gly

85 90 95

Ser Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Asn Asn Pro Gln Asp Val Pro Arg Ala

100 105 110

Phe Glu Glu Cys Met Gln Lys Val Lys Gly Gln Val Pro Ser His Leu

115 120 125

```
His Gly Ser Thr Pro Ile His Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu

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

        195                 200                 205
Pro His Gly Val Glu Thr Thr Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser
    210                 215                 220
Thr Gln Ile Ser Phe Val Ala Gly Glu Lys Met Asp Leu Asn Thr Ser
225                 230                 235                 240
Asp Ile Met Gln Val Ser Leu Tyr Gly Tyr Val Tyr Thr Leu Tyr Thr
                245                 250                 255
His Ser Phe Gln Cys Tyr Gly Arg Asn Glu Ala Glu Lys Lys Phe Leu

            260                 265                 270
Ala Met Leu Leu Gln Asn Ser Pro Thr Lys Asn His Leu Thr Asn Pro
        275                 280                 285
Cys Tyr Pro Arg Asp Tyr Ser Ile Ser Phe Thr Met Gly His Val Phe
    290                 295                 300
Asp Ser Leu Cys Thr Val Asp Gln Arg Pro Glu Ser Tyr Asn Pro Asn
305                 310                 315                 320
Asp Val Ile Thr Phe Glu Gly Thr Gly Asp Pro Ser Leu Cys Lys Glu

                325                 330                 335
Lys Val Ala Ser Ile Phe Asp Phe Lys Ala Cys His Asp Gln Glu Thr
            340                 345                 350
Cys Ser Phe Asp Gly Val Tyr Gln Pro Lys Ile Lys Gly Pro Phe Val
        355                 360                 365
Ala Phe Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Ala Ser Ala Leu Asn Leu Ser Gly
```

370 375 380

Ser Phe Ser Leu Asp Thr Phe Asn Ser Ser Thr Trp Asn Phe Cys Ser

385 390 395 400

Gln Asn Trp Ser Gln Leu Pro Leu Leu Leu Pro Lys Phe Asp Glu Val

405 410 415

Tyr Ala Arg Ser Tyr Cys Phe Ser Ala Asn Tyr Ile Tyr His Leu Phe

420 425 430

Val Asn Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Glu Thr Trp Pro Gln Ile His Phe

435 440 445

Glu Lys Glu Val Gly Asn Ser Ser Ile Ala Trp Ser Leu Gly Tyr Met

450 455 460

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

465 470 475 480

Pro Ile Glu Pro Pro Val Phe Val Gly Thr Leu Ala Phe Phe Thr Ala

485 490 495

Ala Ala Leu Leu Cys Leu Ala Phe Leu Ala Tyr Leu Cys Ser Ala Thr

500 505 510

Arg Arg Lys Arg His Ser Glu His Ala Phe Asp His Ala Val Asp Ser

515 520 525

Asp

<210> 43

<211> 428

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 43

Met Ala Thr Ser Trp Gly Thr Val Phe Phe Met Leu Val Val Ser Cys

1 5 10 15

Val Cys Ser Ala Val Ser His Arg Asn Gln Gln Thr Trp Phe Glu Gly

20 25 30

Ile Phe Leu Ser Ser Met Cys Pro Ile Asn Val Ser Ala Ser Thr Leu

35 40 45

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

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

Trp Val Thr Val Asn Phe Leu Thr Gly Gln Leu His Gly His Arg Gln
180 185 190
Glu Thr Val Gly Thr Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln Ile Thr
195 200 205
Phe Leu Pro Gln Phe Glu Lys Thr Leu Glu Gln Thr Pro Arg Gly Tyr
210 215 220
Leu Thr Ser Phe Glu Met Phe Asn Ser Thr Tyr Lys Leu Tyr Thr His
225 230 235 240

Ser Tyr Leu Gly Phe Gly Leu Lys Ala Ala Arg Leu Ala Thr Leu Gly
245 250 255
Ala Leu Glu Thr Glu Gly Thr Asp Gly His Thr Phe Arg Ser Ala Cys
260 265 270
Leu Pro Arg Trp Leu Glu Ala Glu Trp Ile Phe Gly Gly Val Lys Tyr
275 280 285

Gln Tyr Gly Gly Asn Gln Glu Gly Glu Val Gly Phe Glu Pro Cys Tyr
290 295 300

Ala Glu Val Leu Arg Val Val Arg Gly Lys Leu His Gln Pro Glu Glu
305 310 315 320
Val Gln Arg Gly Ser Phe Tyr Ala Phe Ser Tyr Tyr Tyr Asp Arg Ala
325 330 335
Val Asp Thr Asp Met Ile Asp Tyr Glu Lys Gly Gly Ile Leu Lys Val
340 345 350
Glu Asp Phe Glu Arg Lys Ala Arg Glu Val Cys Asp Asn Leu Glu Asn
355 360 365

Phe Thr Ser Gly Ser Pro Phe Leu Cys Met Asp Leu Ser Tyr Ile Thr
370 375 380
Ala Leu Leu Lys Asp Gly Phe Gly Phe Ala Asp Ser Thr Val Leu Gln
385 390 395 400
Leu Thr Lys Lys Val Asn Asn Ile Glu Thr Gly Trp Ala Leu Gly Ala
405 410 415
Thr Phe His Leu Leu Gln Ser Leu Gly Ile Ser His
420 425

<210> 44
<211
> 330
<212> PRT
<213> HOMO SAPIENS
<400> 44
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

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

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

180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 45

<211> 330

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

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

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 46

<211> 330

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 46

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

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

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 47

<211> 330

<212> PRT

<213> HOMO SAPIENS

<400> 47

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

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

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

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

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

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

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 48

<211> 574

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 48

Met Cys Pro Arg Ala Ala Arg Ala Pro Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15

Gly Ala Val Leu Trp Pro Ala Ala Gly Ala Trp Glu Leu Thr Ile Leu

20 25 30

His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu Gln Thr Ser Glu Asp Ser

35 40 45

Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met Gly Gly Val Ala Arg Leu

50 55 60

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

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

180 185 190
Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys
195 200 205
Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe Glu
210 215 220
Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg Gly Val Asp Val Val Val
225 230 235 240
Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Pro Ser Lys

245 250 255
Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile Val Thr Ser Asp Asp Gly
260 265 270
Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Gly
275 280 285
Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly Asn Val Ile Ser Ser His
290 295 300
Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile Pro Glu Asp Pro Ser Ile

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn Leu Ile Cys Asp Ala Met

355 360 365

Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Thr Asp Glu Met Phe Trp Asn His Val

370 375 380

Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ser Pro Ile Asp Glu

385 390 395 400

Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn Leu Ala Ala Val Leu Pro

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570