

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0156633

(43) 공개일자 2024년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2896 (2013.01)

A61K 31/519 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7032745

(22) 출원일자(국제) 2023년03월02일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년09월30일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2023/079295

(87) 국제공개번호 WO 2023/165561

국제공개일자 2023년09월07일

(30) 우선권주장

PCT/CN2022/079021 2022년03월03일 중국(CN)

PCT/CN2022/126070 2022년10월19일 중국(CN)

(71) 출원인

아르커스 바이오사이언시즈 인코포레이티드

미국 캘리포니아 헤이워드 포인트 이든 웨이 3928
(우: 94545)

우시 바이올로지스 아일랜드 리미티드

아일랜드 에이91 엑스56에프 코 라우스 던독 물러
할린

(72) 발명자

바우먼, 크리스틴 엘리자베스

미국 94545 캘리포니아 헤이워드 포인트 이든 웨이
3928

첸, 아다 페이 시안

미국 94545 캘리포니아 헤이워드 포인트 이든 웨이
3928

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 53 항

(54) 발명의 명칭 항-CD39 항체 및 이의 용도

(57) 요약

인간 CD39의 효소적 활성을 억제하는 항-CD39 항체 및 이를 사용하는 방법이 본원에 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/555 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/565 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

(72) 발명자

페르난데즈-살라스, 에스테르

미국 94545 캘리포니아 헤이워드 포인트 이든 웨이
3928

워커, 나이젤 펠럼 클린턴

미국 94545 캘리포니아 헤이워드 포인트 이든 웨이
3928

자오, 샤오닝

미국 94545 캘리포니아 헤이워드 포인트 이든 웨이
3928

후, 야오화

중국 200131 상하이 푸둥 뉴 에리어 푸테 중 로드
넘버 299

니에, 시웨이

중국 200131 상하이 푸둥 뉴 에리어 푸테 중 로드
넘버 299

구, 지지에

중국 200131 상하이 푸둥 뉴 에리어 푸테 중 로드
넘버 299

명세서

청구범위

청구항 1

인간 CD39에 특이적으로 결합하는 항-CD39 항체로서,

(a) 서열번호: 10을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역 1(H1), 서열번호: 11을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역 2(H2), 및 서열번호: 12를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역 3(H3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 14를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역 1(L1), 서열번호: 15를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역 2(L2), 및 ID 번호: 16을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 상보성 결정 영역 3(L3)을 포함하는 경쇄 가변 영역;

(b) 서열번호: 18을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H1, 서열번호: 19를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H2, 및 서열번호: 20을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 25를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L2, 및 서열번호: 26을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

(c) 서열번호: 28을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H1, 서열번호: 29를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H2, 및 서열번호: 30을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 32를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 33을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L2, 및 서열번호: 34를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-CD39 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항체가 제1항 (a)에 따른 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지며 중쇄 가변 영역이 서열번호: 9에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖고, 경쇄 가변 영역이 서열번호: 13에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖거나;

상기 항체가 제1항 (b)에 따른 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지며 서열번호: 17에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 21에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 43에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 45에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 43에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 46에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 43에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 47에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 43에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 48에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 43에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 49에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 44에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 48에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는 서열번호: 44에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 49에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역이거나;

상기 항체가 제1항 (c)에 따른 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지며 서열번호: 27에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 31에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 58에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 60에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 58에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 61에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 58에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 62에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 58에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 63에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 59에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 61에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 59에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 60에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 59에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 62에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는 서열번호: 59에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 63에 대해

적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역인, 항-CD39 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항-CD39 항체가

(a) 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 약 0.001×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.01×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.1×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.1×10^{-11} M 내지 약 10×10^{-11} M, 약 1×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M 또는 약 1×10^{-11} M 내지 약 10×10^{-11} M의 평형 결합 상수(K_D)를 갖거나;

(b) 적어도 약 1 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구이거나; 또는

(c) (a) 또는 (b)의 임의의 조합인, 항-CD39 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항-CD39 항체가 약 0.05 nM 내지 약 0.5 nM, 또는 약 0.05 nM 내지 약 0.4 nM, 또는 약 0.05 nM 내지 약 0.3 nM의 IC_{50} 으로 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구인, 항-CD39 항체.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 항-CD39 항체가 약 0.3 nM 내지 약 1 nM, 또는 약 0.3 nM 내지 1 nM, 또는 약 0.5 nM 내지 약 1 nM, 또는 약 0.5 nM 내지 1 nM의 IC_{50} 으로 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구인, 항-CD39 항체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-CD39 항체가 단클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 항-CD39 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-CD39 항체가 키메라, 인간화, 또는 베니어드 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 항-CD39 항체.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-CD39 항체가 인간 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 항-CD39 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 변이체 인간 IgG1, 변이체 인간 IgG2, 변이체 인간 IgG3, 또는 변이체 인간 IgG4로부터 선택된 변이체 중쇄 불변 영역, 및 임의적으로 인간 경쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 것인, 항-CD39 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 변이체 중쇄 불변 영역이 야생형 중쇄 불변 영역과 관련하여 효과기 기능이 향상되거나 감소되는 것인, 항-CD39 항체.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 변이체 인간 IgG 중쇄 불변 영역이 서열번호: 2, 서열번호: 3, 또는 서열번호: 5를 포함하는 것인, 항-CD39 항체.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 야생형 인간 IgG 중쇄 불변 영역, 및 임의적으로 인간 경쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 것인, 항-CD39 항체.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 야생형 인간 IgG 중쇄 불변 영역이 서열번호: 1 또는 서열번호: 4를 포함하는 것인, 항-CD39 항체.

청구항 14

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 경쇄 카파 불변 영역을 포함하며, 임의적으로 상기 인간 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6을 포함하는 것인, 항-CD39 항체.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 항체가 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 가지며, 상기

(a) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 53을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;

(b) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 54를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;

(c) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 55를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;

(d) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 56을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;

(e) 중쇄는 서열번호: 51을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 56을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;

(f) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 57을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;

(g) 중쇄는 서열번호: 52를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 56을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;

(h) 중쇄는 서열번호: 52를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 57을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 것인, 항-CD39 항체.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 항체가 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 가지며,

(a) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 67을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;

(b) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 68을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;

(c) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 69를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;

(d) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 70을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;

- (e) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 68을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- (f) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 67을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- (g) 중쇄는 서열번호: 66을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 67을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- (h) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 69를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- (i) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 70을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 것인, 항-CD39 항체.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 항-CD39 항체가

- (a) 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 약 0.001×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.01×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.1×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.1×10^{-11} M 내지 약 10×10^{-11} M, 약 1×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M 또는 약 1×10^{-11} M 내지 약 10×10^{-11} M의 평형 결합 상수(K_D)를 갖거나;
- (b) 적어도 약 1 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구이거나;
- (c) (a) 또는 (b)의 임의의 조합인, 항-CD39 항체.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 항-CD39 항체가 약 0.05 nM 내지 약 0.5 nM, 또는 약 0.05 nM 내지 약 0.4 nM, 또는 약 0.05 nM 내지 약 0.3 nM의 IC_{50} 으로 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구인, 항-CD39 항체.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 항-CD39 항체가 약 0.3 nM 내지 약 1 nM, 또는 약 0.3 nM 내지 1 nM, 또는 약 0.5 nM 내지 약 1 nM, 또는 약 0.5 nM 내지 1 nM의 IC_{50} 으로 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구인, 항-CD39 항체.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체가 인간 CD39에 대한 결합에 대해 참조 항체와 경쟁 흐름 검정에서 측정된 바와 같이 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 경쟁하며, 상기 참조 항체는

- (a) 제17항의 항체;
- (b) 제18항의 항체;
- (c) 서열번호: 37을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호: 38을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체; 또는
- (d) 서열번호: 39를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호: 40을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 경

쇄를 포함하는 항체인, 항-CD39 항체.

청구항 21

CD39를 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항-CD39 항체와 접촉시키는 것을 포함하는 CD39 효소적 활성을 억제하는 방법.

청구항 22

효과적인 레지멘 또는 치료적으로 유효량의 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항-CD39 항체 중 임의의 하나를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 필요로 하는 대상체에서 세포의 ATP를 증가시키거나 면역계를 활성화시키는 방법.

청구항 23

효과적인 레지멘 또는 치료적으로 유효량의 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항-CD39 항체 중 임의의 하나를 암을 앓고 있거나 암에 걸릴 위험이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하거나 예방을 실행하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 암이 혈액학적 악성종양 또는 고형 종양인, 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 암이 유방암, 위장관암, 비뇨생식기암, 폐암, 림프종, 또는 난소암인, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 암이 급성 골수성 림프종, 대장암, 위암, 식도암, 거세 저항 전립선암, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 또는 삼중 음성 유방암인, 방법.

청구항 27

제23항에 있어서, 상기 암이 비소세포 폐암, 위암, 또는 위식도암인, 방법.

청구항 28

제23항에 있어서, 상기 암이 폐암, 두경부암, 갑상선암, 췌장암, 신장암, 또는 피부암인, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 암이 비소세포 폐암, 두경부 편평 세포 암종, 췌관 선암종, 투명 세포 신암종, 또는 흑색종인, 방법.

청구항 30

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가적인 치료제를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항-CD39 항체 및 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는 조합물.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 각 추가적인 치료제가 화학치료제, 방사성의약품, 면역원성 세포 사멸을 유도하는 제제, 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제, 자극 또는 공동자극 면역 체크포인트의 작용제, 및 ATP-아데노신 축-표적화제로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것인, 방법 또는 조합물.

청구항 33

제30항 또는 제31항에 있어서,

적어도 하나의 추가적인 치료제가 화학치료제 또는 면역원성 세포 사멸을 유도하는 제제이고,

적어도 하나의 추가적인 치료제가 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제 또는 ATP-아데노신 측-표적화제인, 방법 또는 조합물.

청구항 34

제30항 또는 제31항에 있어서,

적어도 하나의 추가적인 치료제가 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제이고,

적어도 하나의 추가적인 치료제가 ATP-아데노신 측-표적화제인, 방법 또는 조합물.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역원성 세포 사멸을 유도하는 제제가 방사선 요법인, 방법 또는 조합물.

청구항 36

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역원성 세포 사멸을 유도하는 제제가 (a) 보르테조미, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미토잔트론, 옥살리플라틴, 및 이의 임의의 조합으로부터 임의적으로 선택된 화학치료제, 또는 (b) 블레오마이신, 보르테조미, 카보플라틴, 세특시맙, 크리조티닙, 사이클로포스파미드, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 켐시타빈, 이다루비신, 이리노테칸, 미토잔트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 베무라페닙, 보리노스타트, 및 이의 임의의 조합인, 방법 또는 조합물.

청구항 37

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 각 화학치료제가 알킬화제, 안트라사이클린, 백금제, 타산, 및 프로테아좀 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법 또는 조합물.

청구항 38

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제가 PD-1, PD-L1, BTLA, LAG-3, B7 계열 구성원, TIM-3, TIGIT 또는 CTLA-4 중 적어도 하나의 활성을 차단하는 것인, 방법 또는 조합물.

청구항 39

제32항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제가 PD-1, PD-L1, 또는 TIGIT 중 적어도 하나의 활성을 차단하는 것인, 방법 또는 조합물.

청구항 40

제32항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제가 길항성 항-PD-1 항체, 길항성 항-PD-L1 항체, 또는 길항성 항-TIGIT 항체인, 방법 또는 조합물.

청구항 41

제32항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 각 길항제가 짐베렐리맙, 돔바날리맙, 및 AB308로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것인, 방법 또는 조합물.

청구항 42

제32항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 각 ATP-아데노신 측-표적화제가 $A_{2a}R$ 길항제, $A_{2b}R$ 길항제, $A_{2a/2b}R$ 길항제, 및 CD73 억제제로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것인, 방법 또는 조합물.

청구항 43

제32항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 각 ATP-아데노신 측-표적화제가 에트루마데난트 및 캄리클루스타트로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것인, 방법 또는 조합물.

청구항 44

제23항에 있어서, 상기 암이 비소세포 폐암이고 방법이 페메트렉시드, 카보플라틴, 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체와 조합하여 항-CD39 항체를 투여하는 것을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 45

제23항에 있어서, 상기 암이 위암 또는 위식도암이고 방법이 FOLFOX 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체와 조합하여 항-CD39 항체를 투여하는 것을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서, 길항성 항-TIGIT 항체, A_{2a}R 길항제, A_{2b}R 길항제, A_{2a/2b}R 길항제, 및 CD73 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 제제를 투여하는 것을 추가로 포함하며, 임의적으로 상기 추가적인 제제는 돔바날리맙, AB308, 에트루마데난트, 및 캄리클루스타트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 47

제31항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가적인 치료제가 (a) 페메트렉시드, 카보플라틴, 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체, 또는 (b) FOLFOX 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체를 포함하는 것인, 조합물.

청구항 48

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 49

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항체를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 50

제49항의 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 51

제50항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 52

제49항의 폴리뉴클레오타이드가 발현되는 조건 하에 제51항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항체를 발현시키는 방법.

청구항 53

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 항체를 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조 진술

[0002] 본 출원은 2022년 3월 3일 출원된 국제 출원 PCT/CN2022/079021, 및 2022년 10월 19일 출원된 국제 출원 PCT/CN2022/126070에 대한 우선권을 주장하며, 이의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 분야

[0004] 인간 CD39의 효소적 활성을 억제하는 항-CD39 항체 및 이를 사용하는 방법이 본원에 제공된다.

배경 기술

[0005] 건강한 상태 하에 무시할 수 있는 농도(10-100 nM)로 존재하며, 죽어가고 있거나 스트레스 받은 세포는 ATP를 세포외로 방출한다. 일단 방출되면, 세포외 ATP는 2형 퓨린성(P2) 수용체를 통해 신호를 보내 효과적인 선천성 및 적응성 면역 반응에 중요한 염증 신호를 제공한다. CD39는 세포외 ATP의 가수분해 시 속도를 제한하는 외부 효소이다. 세포외 ATP의 AMP로의 전환을 이화함으로써, CD39는 세포외 ATP 수준의 중요한 조절제다.

[0006] CD39는 또한 세포외 아데노신 수준에 대한 중요한 기여자이다. 아데노신은 면역억제 대사산물이므로 세포외 ATP에 대한 역관계를 갖는다. CD39는 ATP를 AMP로 가수분해함으로써 세포외 아데노신 수준 증가에 기여하며, 이는 CD73에 의해 아데노신으로 전환된다. 그런 다음 세포외 아데노신은 1형 퓨린성 수용체를 통해 신호를 보내 면역억제 환경을 생성한다.

[0007] 따라서 CD39에 의한 세포외 ATP의 가수분해는 신호전달 축의 반대 끝에서 2가지 별개의 신호전달 경로를 통해 면역 반응에 영향을 미칠 가능성이 있다. 특히, 본원에서 ATP-아데노신 신호전달 축으로 언급되는 이 신호전달 축의 조절장애는 여러 질환에서 관찰되었다. 이와 같이, 유익한 치료적 목적을 위해 CD39를 표적하고 그의 효소적 활성을 억제하는 제제가 당업계에 필요하다.

발명의 내용

[0008] 본 개시내용의 다양한 측면 중에는 항-CD39 항체의 제공이 있다. 항-CD39 항체는 임의적으로 (i) 형광 분자, 스피인 표지 분자, 효소 또는 방사성 동위원소를 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 검출가능한 신호로 표지되고/되거나, (ii) 화학치료제, 방사성 동위원소, 또는 핵산을 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 치료제에 접합된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 단리된 항체로 제공된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 조성물로 제공된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 조성물로 제공된다.

[0009] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호: 10에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(H1), 서열번호: 11에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(H2), 및 서열번호: 12에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(H3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 14에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(L1), 서열번호: 15에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(L2), 및 서열번호: 16에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(L3)을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD39에 특이적으로 결합하는 항-CD39 항체를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호: 10에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H1, 서열번호: 11에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H2, 및 서열번호: 12에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 14에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 15에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L2, 및 서열번호: 16에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD39에 특이적으로 결합하는 항-CD39 항체를 제공한다. 전술된 구현예 중 일부에서, 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호: 9에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖고, 경쇄 가변 영역은 서열번호: 13에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 항체의 중쇄 가변 영역은 서열번호: 9에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖고, 경쇄 가변 영역은 서열번호: 13에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

[0010] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호: 18에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H1, 서열번호: 19에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H2, 및 서열번호: 20에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 25에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L2, 및 서열번호: 26에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD39에 특이적으로 결합하는 항-CD39 항체를 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호: 18에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H1, 서열번호: 19에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H2, 및 서열번호: 20에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 25에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L2, 및 서열번호: 26에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD39에 특이적으로 결합하는 항-CD39 항체를 제공한다. 전술된 구현예 중 일부에서, 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 각각 서열번호: 17 및 서열번호: 21; 또는 각각 서열번호: 43 및 서열번호: 45; 또는 각각 서열번호: 43 및 서열번호: 46; 또는 각각 서열

번호: 43 및 서열번호: 47; 또는 각각 서열번호: 43 및 서열번호: 48; 또는 각각 서열번호: 43 및 서열번호: 49; 또는 각각 서열번호: 44 및 서열번호: 48; 또는 각각 서열번호: 44 및 서열번호: 49에 대해 적어도 90% 서열 동일성(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

[0011] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 서열번호: 28에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H1, 서열번호: 29에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H2, 및 서열번호: 30에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 32에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 33에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L2, 및 서열번호: 34에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 CD39에 특이적으로 결합하는 항-CD39 항체를 제공한다. 전술된 구현예 중 일부에서, 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 서열번호: 27 및 서열번호: 31; 또는 서열번호: 58 및 서열번호: 60; 또는 서열번호: 58 및 서열번호: 61; 또는 서열번호: 58 및 서열번호: 62; 또는 서열번호: 58 및 서열번호: 63; 또는 서열번호: 59 및 서열번호: 61; 또는 서열번호: 59 및 서열번호: 60; 또는 서열번호: 59 및 서열번호: 62; 또는 서열번호: 59 및 서열번호: 63에 대해 적어도 90% 서열 동일성(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%) 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는다.

[0012] 본 개시내용의 개시된 임의의 항체에 대해, 항-CD39 항체는 단클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 키메라, 인간화, 또는 베니어드(veneered) 항체 또는 이의 항원-결합 단편; 또는 인간 항체 또는 이의 항원-결합 단편일 수 있다. 게다가, 항-CD39 항체는 인간 IgG1, 인간 IgG2, 인간 IgG3, 또는 인간 IgG4로부터 선택된 중쇄 불변 영역, 및 임의적으로 인간 경쇄 불변 영역을 추가로 포함할 수 있다. 변이체 중쇄 불변 영역은 야생형 중쇄 불변 영역일 수 있거나, 야생형 중쇄 불변 영역과 관련하여 효능이 향상되거나 감소된 중쇄 불변 영역일 수 있다. 다양한 구현예에서, IgG 중쇄 불변 영역은 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 또는 서열번호: 5를 포함할 수 있고; 인간 경쇄 카파 불변 영역은 서열번호: 6을 포함할 수 있다.

[0013] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항-CD39 항체를 제공하며, 여기서 (a) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 53을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (b) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 54를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (c) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 55를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (d) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 56을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (e) 중쇄는 서열번호: 51을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 56을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (f) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 57을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (g) 중쇄는 서열번호: 52를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 56을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (h) 중쇄는 서열번호: 52를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 57을 포함하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0014] 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하는 항-CD39 항체를 제공하며, 여기서 (a) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 67을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (b) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 68을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (c) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 69를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (d) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 70을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (e) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 68을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (f) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 67을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (g) 중쇄는 서열번호: 66을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 67을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (h) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 69를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나; (i) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 70을 포함하는 아미노산 서열을 갖는다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 약제로서 사용하기 위해 본원에 개시된 임의의 항체를 제공한다. 일부 구현예에서, 항-CD39 항체는 암을 치료하는 데 사용하기 위해 제공된다. 일부 구현예에서, 항-CD39 항체는 암을 예방하는 데 사용하기 위해 제공된다.

[0016] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 추가적인 요법과 조합하여 약제로서 사용하기 위해 본원에 개시된 임의의 항체를 제공한다. 일부 구현예에서, 전술된 항-CD39 항체는 암을 치료하는 데 사용하기 위해 제공된다. 일부 구현예에서, 전술된 항-CD39 항체는 암을 예방하는 데 사용하기 위해 제공된다. 특정 구현예에서, 추가적인 요법은

면역 체크포인트 억제제, 면역원성 세포 사멸 유도 요법, ATP-아데노신 축 표적화제, HIF-2 α 억제제, 아르기나제 억제제, AXL 억제제, 또는 PI3K 억제제일 수 있다. 추가 구현예에서, 추가적인 요법은 화학요법, 방사선 요법, 더발루맙(durvalumab), 짐베렐리맙(zimberelimab), 돔바날리맙(domvanalimab), AB308, AB521, 또는 캄리클루스타트(quemliclustat)일 수 있다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 2가지 이상의 추가적인 요법과 조합하여 약제로서 사용하기 위해 본원에 개시된 임의의 항체를 제공한다. 일부 구현예에서, 전술된 항-CD39 항체는 암을 치료하는 데 사용하기 위해 제공된다. 일부 구현예에서, 전술된 항-CD39 항체는 암을 예방하는 데 사용하기 위해 제공된다. 특정 구현예에서, 각 추가적인 요법은 화학치료제, 면역 체크포인트 억제제, 면역원성 세포 사멸 유도 요법, ATP-아데노신 축 표적화제, HIF-2 α 억제제, 아르기나제 억제제, AXL 억제제, 또는 PI3K 억제제일 수 있다. 추가 구현예에서, 추가적인 요법은 화학요법, 방사선 요법, 더발루맙, 짐베렐리맙, 돔바날리맙, AB308, AB521, 또는 캄리클루스타트일 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가적인 치료제는 (a) 페메트렉시드, 카보플라틴, 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체, 또는 (b) FOLFOX 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체를 포함한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 방법은 본원에 개시된 임의의 항체를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 추가적인 요법을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 각 추가적인 요법은 면역 체크포인트 억제제, 면역원성 세포 사멸 유도 요법, ATP-아데노신 축 표적화제, HIF-2 α 억제제, 아르기나제 억제제, AXL 억제제, 또는 PI3K 억제제일 수 있다. 추가 구현예에서, 추가적인 요법은 화학요법, 방사선 요법, 더발루맙, 짐베렐리맙, 돔바날리맙, AB308, AB521, 또는 캄리클루스타트일 수 있다.

[0019] 상기 측면 각각에서, 암은 유방암, 위장관암, 비뇨생식기암, 두경부암, 신장암, 폐암, 림프종, 난소암, 췌장암, 피부암, 또는 갑상선암일 수 있다. 일부 구현예에서, 암은 급성 골수성 림프종, 대장암, 위암, 식도암, 거세 저항 전립선암, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 삼중 음성 유방암, 두경부 편평 세포 암종, 췌관 선암종, 투명 세포 신암종, 또는 흑색종일 수 있다.

[0020] 일부 구현예에서, 암은 비소세포 폐암이고 방법은 페메트렉시드, 카보플라틴, 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체와 조합하여 항-CD39 항체를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 암은 위암 또는 위식도암이고 방법은 FOLFOX 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체와 조합하여 항-CD39 항체를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이들 구현예는 길항성 항-TIGIT 항체, A_{2a}R 길항제, A_{2b}R 길항제, A_{2a/2b}R 길항제, 및 CD73 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 제제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 임의적으로 추가적인 제제는 돔바날리맙, AB308, 에트루마데난트(etrumadenant), 및 캄리클루스타트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0021] 본 개시내용의 다른 측면 및 반복이 아래에 보다 상세하게 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 B 세포의 표면 상에서 발현된 인간 CD39에 대한 여러 항체의 결합을 도시하는 그래프이다. 그래프는 단일 인간 공여자로부터의 대표적인 데이터를 보여준다. 평균 형광 강도(MFI)는 y-축 상에 있고 항체 농도(M)는 x-축 상에 있다.

도 2는 20 또는 400 마이크로몰 ATP의 존재 하에 인간 단핵구의 표면 상에서 발현된 인간 CD39의 효소적 활성 억제를 도시하는 그래프이다. 그래프는 단일 인간 공여자로부터의 대표적인 데이터를 보여준다. y-축 상에 퍼센트(%) 최대 억제가 있고 항체 농도는 x-축 상에 있다.

도 3은 실시예 6에 기재된 대식세포 사이토카인 방출 검정에서 주요 단계를 도시하는 개략도이다. MΦ = 대식세포.

도 4a, 도 4b, 도 4c, 도 4d, 도 4e, 도 4f는 대식세포 사이토카인 방출 검정 결과를 도시한다. 10 nM(도 4a) 또는 100 nM(도 4b-f)의 항-CD39 항체 또는 이소형 대조군으로 처리된 대식세포의 상청액 중 사이토카인의 상대적인 양. 배수 변화는 공여자 당 이소형 대조군에 대해 정규화되고 2 명(도 4c, 도 4d) 또는 3 명(도 4a, 도 4b, 도 4e, 도 4f)의 공여자를 테스트 당 실행하였다. 막대 높이는 정규화된 공여자 사이의 평균 배수 변화이고 오차 막대는 SEM이다.

도 5a, 도 5b, 및 도 5c는 단핵구 유래 수지상 세포(moDC) 검정 결과를 도시한다. 세포의 마커 CD83(도 5a), CD86(도 5b), 및 CD14(도 5c)를 ATP ± 항-CD39 또는 이소형 대조군의 존재 또는 부재 하에 moDC의 표면 상에서 측정하였다. 각 선은 한 명의 생물학적 공여자를 나타내며, 여기서 연결된 기호는 동일한 공여자로부터 파생된다, N=4.

도 6은 형광으로 표시된 참조 항체, hu39.1_IGG4.P-AF647, 및 표시되지 않은 테스트 항체 사이의 경쟁 유세포 측정법 검정 결과를 도시하는 그래프이다. 평균 형광 강도(MFI)는 y-축 상에 있고 테스트 항체 농도(nM)는 x-축 상에 있다.

도 7a는 인간 골수종 세포인 MOLP-8 상에서 발현된 인간 CD39에 대한 hu39.1_IGG4.P 및 이소형 대조군 항체의 결합을 도시하는 그래프이다.

도 7b는 hu39.1_IGG4.P 및 이소형 대조군 항체에 의한 인간 골수종 세포인 MOLP-8 상에서 발현된 인간 CD39의 효소적 억제를 도시하는 그래프이다.

도 8a는 hCD39KI 마우스 모델로부터의 비장세포에 대한 효소적 활성(ATP 소모)을 도시한다.

도 8b는 hu39.1_IGG4.P에 의한 비장세포 효소적 활성 억제를 도시한다.

도 9는 hCD39KI 마우스 모델에서 인간 CD39가 발현되고 무린 CD39가 발현되지 않는다는 확인을 도시한다.

도 10a는 표시된 처리에 따른 hCD39KI 마우스의 평균 중앙 부피를 도시하는 그래프이다. 점은 평균을 나타내고 오차 막대 평균의 표준 오차(SEM), * = $p < 0.5$.

도 10b는 표시된 처리에 따른 hCD39KI 마우스의 체중 퍼센트 변화를 도시하는 그래프이다.

도 11은 면역조직화학에 의한 인간 CD39 발현(패널 A 및 C) 및 효소 조직화학에 의한 항-CD39 효소 차단 활성의 증거(패널 B 및 D)에 대해 분석된 hCD39KI 마우스 종양의 저배율 이미지를 보여준다.

도 12는 면역조직화학에 의한 인간 CD39 발현(패널 A 및 C) 및 효소 조직화학에 의한 항-CD39 효소 차단 활성의 증거(패널 B 및 D)에 대해 분석된 hCD39KI 마우스 종양의 고배율 이미지를 보여준다. 도 12의 이미지는 도 11의 박스 영역의 고해상도 이미지이다.

도 13은 면역조직화학에 의한 인간 CD39 발현(패널 A 및 C) 및 효소 조직화학에 의한 항-CD39 효소 차단 활성의 증거(패널 B 및 D)에 대해 분석된 hCD39KI 마우스 비장의 저배율 이미지를 보여준다.

도 14는 면역조직화학에 의한 인간 CD39 발현(패널 A 및 C) 및 효소 조직화학에 의한 항-CD39 효소 차단 활성의 증거(패널 B 및 D)에 대해 분석된 hCD39KI 마우스 비장의 고배율 이미지를 보여준다. 도 14의 이미지는 도 13의 박스 영역의 고해상도 이미지이다.

도 15a, 도 15b, 및 도 15c는 x-축을 따라 표시된 바와 같이 처리된 hCD39KI 마우스로부터 수득된 종양(도 15a: MC38 종양; 도 15b: 4T1 종양) 또는 말초 전혈 세포(도 15c)의 단일 세포 현탁액으로부터 유래된 상청액에서 검출된 ATP 수준을 도시하는 그래프이다. ATP 수준은 상대 발광 단위(RLU)를 검출함으로써 측정되었다.

도 16은 항-CD39로 처리된 hCD39KI 마우스에서 세포 표면 CD39 및 수용체 점유를 보여주는 그래프를 도시한다. 상단 패널의 그래프는 생체내 항-CD39 처리 후 다중 세포 유형에서 비경쟁적 항-CD39 클론 A1-PE의 결합에 의해 결정된 세포 표면 CD39 발현의 감소를 보여준다. 하단 패널의 그래프는 경쟁적 항체의 결합이 생체내 이소형 대조군 처리된 마우스의 모든 CD39(A1)-발현 세포 상에서 관찰되었지만, 생체내 항-CD39 처리된 마우스의 CD39(A1)-발현 세포 상에서 관찰되지 않았음을 보여주며, 이는 완전한 또는 거의 완전한 표적 적용범위를 나타낸다. $>100 \text{ CD39(A1)}^+$ 이벤트가 수집된 경우 집단에 대한 데이터가 제시된다. 통계 분석은 일원 ANOVA(Dunnett의 다중 비교 검정, 단일 통합 분산 포함)로 수행되었다, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

도 17a는 비히클 처리된 hCD39KI 마우스의 종양 유래 림프절로부터 면역 하위집단에 대한 인간 CD39(x-축) 및 마우스 CD73(y-축)의 발현 수준을 보여주는 유세포 측정법 산점도를 도시한다. 게이트는 이소형 대조군(hCD39 이소형 대조군 회색)에 설정되고 각 그룹(검은색)에 적용되었다.

도 17b는 비히클 처리된 hCD39KI 마우스의 종양 유래 림프절로부터 면역 하위집단에 대한 인간 CD39(x-축) 및 마우스 P2X7(y-축)의 발현 수준을 보여주는 유세포 측정법 산점도를 도시한다. 게이트는 이소형 대조군(hCD39

이소형 대조군 회색)에 설정되고 각 그룹(검은색)에 적용되었다.

도 17c는 x-축을 따라 표시된 바와 같이 처리 후 관찰된 면역 하위집단 백분율을 보여주는 그래프를 도시한다. 항-CD39 처리에 따른 면역 하위집단 백분율의 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 통계 분석은 일원 ANOVA(Dunnett의 다중 비교 검정, 단일 통합 분산 포함)로 수행되었으며, $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, $****P \leq 0.0001$, 각 기호는 개별 마우스를 나타내고, 막대 높이는 평균이고 오차 막대는 $\pm$ SEM이다.

도 17d는 x-축을 따라 표시된 바와 같이 처리 후 관찰된 CD39 세포 표면 발현을 보여주는 그래프를 도시한다. 거의 모든 면역 하위집단에서 항-CD39 처리에 따른 CD39 세포 표면 발현의 유의한 감소가 관찰되었다. 통계 분석은 일원 ANOVA(Dunnett의 다중 비교 검정, 단일 통합 분산 포함)로 수행되었으며, $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, $****P \leq 0.0001$, 각 기호는 개별 마우스를 나타내고, 막대 높이는 평균이고 오차 막대는 $\pm$ SEM이다.

도 17e는 각 처리 그룹의 대표적인 동물에서 CD39 세포 표면 발현의 감소를 보여주는 각 면역 하위집단에 대한 히스토그램 오버레이이다 (이소형 + 식염수(회색 개방형 히스토그램), 이소형 + 옥살리플라틴(검은색 개방형 히스토그램), 항-CD39 + 식염수(회색 채워진 히스토그램) 및 항-CD39 + 옥살리플라틴(검은색 채워진 히스토그램)).

도 18은 실시예 9에 기재된 실험의 결론에서 MC38 종양을 보유하는 hCD39KI 마우스로부터 유래된 혈장 내 말초 사이토카인 수준을 보여주는 그래프를 도시한다. 데이터는 처리 그룹 당 총 11-12 마리의 마우스에 대한 평균 $\pm$ SEM으로 제시된다. 통계 분석은 Tukey의 다중 비교 검정과 함께 ANOVA를 사용하여 수행되었다.

도 19a는 비히클 대조군(Veh), 100 μ M 옥살리플라틴(OXA.L) 또는 250 μ M 옥살리플라틴(OXA.H)으로 처리 후 24시간 후에 CT26 세포, MC38 세포, SK-MEL-5 세포 및 이소형 대조군 항체, 및 SK-MEL-5 세포 및 hu39.5_IGG1.AA 항체의 세포 생존력을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 19b는 비히클 대조군(Veh), 100 μ M 옥살리플라틴(OXA.L) 또는 250 μ M 옥살리플라틴(OXA.H)으로 처리 후 24시간 후에 CT26 세포, MC38 세포, SK-MEL-5 세포 및 이소형 대조군 항체, 및 SK-MEL-5 세포 및 hu39.5_IGG1.AA 항체의 배양 상청액 내 HMGB1 수준을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 19c는 8시간 동안 비히클(PBS), 100 μ M 옥살리플라틴, 또는 250 μ M 옥살리플라틴으로 처리 후 CT26 세포, MC38 세포, SK-MEL-5 세포 및 이소형 대조군 항체, 및 SK-MEL-5 세포 및 hu39.5_IGG1.AA 항체에 의한 세포의 ATP 방출을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 20a는 48시간 동안 표시된 화학치료제로 처리 후 SK-MEL-5 세포의 세포 생존력을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 20b는 48시간 동안 표시된 화학치료제로 처리 후 SK-MEL-5 세포의 배양 상청액 내 HMGB1 수준을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 20c는 8 또는 32시간 동안 표시된 화학치료제로 처리 후 SK-MEL-5 세포에 의한 세포의 ATP 방출을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 21은 인간(상단 열) 및 C57BL/6 hCK39KI MC38 마우스(하단 열)의 말초 혈액 세포 상에서 CD39의 상대적 발현을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 22a는 상이한 골수 세포 유형에 대한 CD39 및 CD73의 분포를 보여주는 대표적인 공여자의 유세포 측정법 산점도를 도시한다. CD14⁺ 단핵구는 말초 인간 혈액에서 직접 단리되었다. 말초 인간 혈액에서 풍부화된 DC는 pDC, cDC1, cDC2, 및 다른 DC로 추가로 하위유형화되었다. MO, M1, M2 및 moDC 하위집단은 실시예에 기재된 바와 같이 CD14⁺ 단핵구로부터 유래되었다.

도 22b는 인간 말초 혈액 CD14⁺ 단핵구, 형질세포형 DC를 포함하는 1차 수지상 세포(DC)(HLA-DR⁺ CD11c^{neg} CD123⁺로 정의된 pDC) 하위세트, 통상적인 DC 1(HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD141⁺ Clec9a⁺로 정의된 cDC1), 통상적인 DC 2(HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD1c⁺ CD141^{neg} Clec9a^{neg}로 정의된 cDC2) 및 다른 DC(HLA-DR⁺ CD11c⁺ CD1c^{neg} CD141^{neg} Clec9a^{neg}로 정의됨) 및 대식세포(MO) 양극화된 대식세포(M1, M2) 및 DC(moDC)를 포함하는 시험관내 분화된 단핵구 유래 골수 세포에서 유세포 측정법에 의해 평가된 바와 같은 CD73 양성률(왼쪽 패널) 및 CD39 양성률(중간 패널) 및 CD39 단백질 발현(오른쪽 패널)을 보여주는 그래프를 도시한다. CD39 단백질 발현 수준의 경우, CD39⁺ 세포의 평균 형광 강도

를 이소형 대조군의 평균 형광 강도로 나누었다. 각 기호는 고유한 공여자이며, 막대 높이는 평균이고 오차 막대는 범위이다.

도 22c 및 도 22d는 인간 말초 혈액 CD14⁺ 단핵구, 1차 수지상 세포 하위세트의 풍부화된 집단(풍부화된 DC) 및 4 명의 공여자로부터 수득된 대식세포(M0) 양극화된 대식세포(M1, M2) 및 DC(moDC)를 포함하는 시험관내 분화된 단핵구 유래 골수 세포에서 평가된 *ENTPDI*(CD39)(도 22c) 및 *NT5E*(CD73)(도 22d)의 mRNA 발현을 보여주는 그래프를 도시한다.

도 22e는 279에 기재된 4 명의 건강한 공여자로부터의 세포 집단에서 맞춤형 NanoString 패널을 사용하여 CD39, 아데노신, 및 염증조절복합체(inflammasome) 경로 유전자의 하우스키핑 유전자 정규화된 발현의 비지도 클러스터링을 보여주는 히트맵이다. 낮은 카운트 또는 비정상적인 대조군 프로브에 의해 표시된 낮은 품질 웰은 이 분석에서 제거되었다. 특이적 공여자 ID는 세포 유형 라벨 끝에 첨부된다. 상단 덴드로그램에서 점 수평 선은 샘플 분할을 보여주지만 클러스터링의 비지도 특성에 영향을 미치지 않는다.

도 23은 지시된 억제제로 1시간 동안 처리한 후 0 또는 300 μ M ATP로 18시간 동안 처리한 후 세포 표면 마커 발현의 상대적 유도(DMSO와 비교)를 보여주는 그래프를 도시한다. CD86(상부 패널), CD83(중간 패널), 및 CD80(하부 패널)의 세포 표면 발현은 유세포 측정법으로 평가되었다. 0에서 300 μ M ATP까지 활성화 마커 발현의 유도를 억제제-처리된 세포와 DMSO-처리된 세포 사이에서 비교하였다. 막대 높이는 평균이고 오차 막대는 SEM이다. 각 점은 1 명의 공여자를 나타낸다. 통계 분석은 Tukey의 다중 비교 검정과 함께 ANOVA를 사용하여 수행되었다, *P $\leq$ 0.05, ***P $\leq$ 0.001.

도 24a는 유전자 기준으로 정규화된 종양(신장 신 투명 세포 암종(KIRC), 폐 편평 세포 암종(LUSC), 폐 선암종(LUAD), 두경부 편평 세포 암종(HNSC), 식도 암종(ESCA), 위 선암종(STAD), 및 췌장 선암종(PAAD))의 TCGA RNA 발현 분석을 보여주는 히트맵이다. 유전자에 의해 암호화된 단백질은 괄호 안에 표시된다. 관찰된 단백질 및 유전자는 다음을 포함한다: *ALPL*(TNAP), *P2RX4*(P2X4), *ENTPDI*(CD39), *ENPP1*, *NT5E*(CD73), *P2RX5*(P2X5), *P2RY2*(P2Y2), 및 *P2RY11*(P2Y11). 분포는 히스토그램 오른쪽에 제시된다.

도 24b는 바이올린 플롯(violin plot)을 도시한다. 바이올린 플롯은 다음 유전자(단백질)의 정규화된 log2 유전자 발현(y-축)의 커널 확률 밀도(음영 영역의 너비는 그 곳에 위치한 데이터의 비율을 나타냄)를 서술한다: TCGA 샘플의 하위집합 중에서 *ENTPDI*(CD39), *NT5E*(CD73), *P2RX7*(P2X7), 및 *P2RY11*(P2Y11). x-축을 따라 바이올린 플롯은 특이적 TCGA 하위유형으로 그룹화된다: 식도 암종(ESCA), 두경부 편평 세포 암종(HNSC), 신장 신 투명 세포 암종(KIRC), 폐 선암종(LUAD), 폐 편평 세포 암종(LUSC), 췌장 선암종(PAAD), 및 위 선암종(STAD). 또한 TCGA 암 하위유형의 동일한 하위집합에 대한 골수성 특징에 대한 경로 풍부화 점수(y-축)가 제시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 개시내용은 인간 CD39, 보다 특히 인간 CD39의 세포외 도메인 내의 에피토프에 특이적으로 결합하고, 인간 CD39 효소적 활성을 억제하는 항체를 제공한다. 또한 인간 CD39를 발현하는 세포에 결합하고 가용성 및 세포 표면 발현된 인간 CD39 효소적 활성을 억제하기 위해 본원에 개시된 항-CD39 항체를 사용하는 방법이 고려된다. 본 개시내용은 인간 CD39 효소적 활성을 억제하여 ATP-아데노신 신호전달 축의 한쪽 단부, 또는 양쪽 단부에 영향을 미치는 본원에 개시된 항-CD39 항체의 용도를 입증한다. 따라서, 본 개시내용은 또한 치료적 및 진단적 목적을 위한 본원에 개시된 항-CD39 항체의 의학적 용도를 제공한다.

[0024] I. 정의

[0025] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 용어, 표기법 및 다른 과학적 용어 또는 전문용어는 본 개시내용이 속하는 기술분야의 숙련자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는 것으로 의도된다. 본원에 기재된 발명의 측면은 측면을 "포함하고," "이루어지고," 및 "본질적으로 이루어진" 것을 포함함이 이해된다. 용어 "포함하는", "포함한" 및 "갖는"은 포괄적인 것으로 의도되며 나열된 요소 이외의 추가적인 요소가 있을 수 있음을 의미한다.

[0026] 달리 지시되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 이 기술 분야의 숙련자에 의해 이해되는 바와 같이 각각의 값에 대한 일반적인 오차 범위를 지칭한다. 의심의 여지를 피하기 위해, 본원에서 "약" 값 또는 매개변수에 대한 언급은 해당 값 또는 매개변수 자체에 관한 측면을 포함(및 설명)한다.

[0027] 또한 본원에 사용된 바와 같이, "및/또는"은 관련된 나열된 항목 중 하나 이상의 임의의 및 모든 가능한 조합,

뿐만 아니라 대안("또는")으로 해석될 때 조합의 결여를 지칭하고 포괄한다. 유사하게, "A/B" 형태 또는 "A 및/또는 B" 형태의 어구는 (A), (B), 또는 (A 및 B)를 의미하며; "A, B, 및 C 중 적어도 하나"의 형태에서 어구는 (A), (B), (C), (A 및 B), (A 및 C), (B 및 C), 또는 (A, B, 및 C)를 의미한다.

[0028] 용어 "CD39"는 달리 지시되지 않는 한 인간 CD39를 지칭한다. 예시적인 인간 CD39 서열은 서열번호: 7(UniProtKB 참조: P49961)이다. CD39는 이중 통과 막관통 단백질이다. CD39의 세포외 도메인은 서열번호: 7의 잔기 38-478을 포함한다. 예시적인 시노몰구스 원숭이 CD39 서열은 서열번호: 8이다. 용어 "CD39 효소적 활성"은 ATP의 ADP 또는 AMP로의 가수분해를 지칭한다.

[0029] 용어 "항-CD39 항체" 및 "CD39에 결합하는 항체"는 항체가 인간 CD39를 표적화하고 인간 CD39 효소적 활성을 억제하는 데 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하도록 하는 충분한 친화도로 인간 CD39에 결합할 수 있는 항체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 본 개시내용의 항-CD39 항체는 CD39에 대해 10^{-6} M 이하의 평형 해리 상수(KD)를 갖는다. 본 개시내용의 항-CD39 항체는 단일특이적 항체 또는 다중특이적 항체일 수 있고, 일부 예에서 폴리클로날 항체일 수 있다.

[0030] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 광범위한 의미로 사용되고 전장 항체, 항원-결합 단편, 중쇄 항체, 단일쇄 항체, 및 단일쇄 항체의 고차 변이체를 포함하나 이에 제한되지 않는, 단일 항원 또는 다중 항원에 특이적으로 결합하는 다양한 항체 및 항체 유사 구조를 포괄한다. 따라서, 항체에 대한 임의의 언급은 문맥상 달리 요구되지 않는 한 온전한 형태의 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 바람직하게는, 반드시 그런 것은 아니지만, 본원에 유용한 항체는 단리되고 재조합적으로 생산될 수 있다.

[0031] 용어 "전장 항체," "온전한 항체," 및 "전체 항체"는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 갖는 항체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0032] "천연 항체"는 다양한 구조를 갖는 자연 발생 면역글로불린 분자이다. 예를 들어, 천연 IgG 항체는 이황화 결합된 2개의 동일한 경쇄(각각 약 25 kDa) 및 2개의 동일한 중쇄(각각 약 50-70 kDa)로 구성된 약 150,000 달톤의 이종사량체 당단백질이다. N-말단에서 C-말단까지, 각 중쇄는 경쇄 가변 도메인 또는 중쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VH), 이어서 3개의 불변 도메인(CH1, CH2, 및 CH3)이 뒤따른다. 유사하게, N-말단에서 C-말단까지, 각 경쇄는 가변 경쇄 도메인 또는 경쇄 가변 도메인이라고도 불리는 가변 영역(VL), 이어서 불변 경쇄(CL) 도메인이 뒤따른다. 항체의 경쇄는 불변 도메인의 아미노산 서열에 기반하여 카파(κ) 및 람다(λ)라고 불리는 2가지 유형 중 하나로 지정될 수 있다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론으로 분류되고, 항체의 이소형을 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로 정의한다. 각 경쇄 및 중쇄의 아미노-말단 부분은 주로 항원 인식을 담당하는 약 100 내지 110개 이상의 아미노산 서열의 가변 영역(각각 VL 및 VH)을 포함한다. 각 쇄의 카르복시-말단 부분은 주로 효과기 기능을 담당하는 불변 영역을 정의한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역은 약 12개 이상의 아미노산 서열의 "J" 영역에 의해 연결되며, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산 서열의 "D" 영역을 포함한다.

[0033] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체를 항원에 결합시키는 데 수반되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3개의 초가변 영역(CDR)을 포함한다. (예를 들어, Kindt 등 Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., 페이지 91 (2007) 참조.) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 뿐만 아니라, 특정 항원에 결합하는 항체는 각각 상보적 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 VH 또는 VL 도메인을 사용하여 단리될 수 있다. 예를 들어, Portolano 등, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson 등, Nature 352:624-628 (1991)을 참조한다.

[0034] "프레임워크 영역" 또는 "FR"은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3, 및 FR4로 이루어진다. 따라서, CDR 및 FR 서열은 일반적으로 다음 서열로 나타낸다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. 중쇄 및 경쇄의 FR 도메인은 당업계에서 알려져 있는 바와 같이 상이할 수 있다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같이, 통상적으로 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로도 언급되는 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 상호교환가능하게 사용되고 서열에서 초가변성이고/이거나 구조적으로 정의된 루프("초가변 루프")를 형성하고/하거나 항원-접촉 잔기("항원 접촉")를 함유하는 가변 도메인의 각 영역을 지칭한다. 일반적으로, 항체는 6개의 CDR을 포함한다: VH에서 3개(H1, H2, H3), 및 VL에서 3개(L1, L2, L3). 본원에 사용된 바와 같이, "가변 영역으로부터 유래된 CDR"은 원래 가변 영역으로부터의 상응하는 CDR과 비교하여, 2개 이하의 아미노산

치환을 갖는 CDR을 지칭한다. 본원에서 예시적인 CDR은 다음을 포함한다: (a) 아미노산 잔기 26-32(L1), 50-52(L2), 91 -96(L3), 26-32(H1), 53-55(H2), 및 96-101(H3)에서 발생하는 초가변 루프(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 -917 (1987)); (b) 아미노산 잔기 24- 34(L1), 50-56(L2), 89-97(L3), 31 -35b(H1), 50-65(H2), 및 95-102(H3)에서 발생하는 CDR(Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)); (c) 아미노산 잔기 27c-36(L1), 46-55(L2), 89-96(L3), 30-35b(H1), 47-58(H2), 및 93-101(H3)에서 발생하는 항원 접촉 (MacCallum 등 J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); 및 (d) 본 개시내용의 다양한 항체에 대해 하기에 정의된 바와 같이 (a), (b), 및/또는 (c)의 조합. 달리 지시되지 않는 한, 가변 도메인의 CDR 잔기 및 다른 잔기(예를 들어, FR 잔기)는 상기 Kabat 등에 따라 본원에서 Eu 번호지정된다.

[0036] 용어 "단리된 항체"는 자연 환경의 구성요소로부터 분리된 항체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 단리된 항체는 예를 들어, 전기영동 또는 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 또는 역상 HPLC)에 의해 결정된 바와 같이 95% 초과 또는 99% 순도로 정제된다.

[0037] 용어 "키메라" 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 공급원 또는 종으로부터 유래되는 반면, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지가 상이한 공급원 또는 종으로부터 유래되는 항체를 지칭한다.

[0038] "인간 항체"는 인간 또는 인간 세포에 의해 생산되거나 인간 항체 레퍼토리 또는 다른 인간 항체-암호화 서열을 활용하는 비인간 공급원으로부터 유래된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 보유하는 것이다. 인간 항체의 이 정의는 구체적으로 비인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 배제한다. 인간 항체는 파지 디스플레이 라이브러리를 포함하여 당업계에 알려진 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227:381 ,1991; Marks 등 J. Mol. Biol. 222:581, 1991. 또한 인간 단클론 항체의 제조에 이용가능한 방법은 Cole 등 Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner 등 J. Immunol., 147(1):86-95,1991에 기재되어 있다. 또한 van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74, 2001을 참조한다.

[0039] "인간화" 항체는 비인간 CDR의 아미노산 잔기 및 인간 FR의 아미노산 잔기를 포함하는 항체를 지칭한다. 특정 측면에서, 인간화 항체는 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR은 비인간 항체의 CDR에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 항체의 FR에 상응한다. 인간화 항체의 모든 또는 실질적으로 모든 FR이 인간 항체의 FR에 상응하는 특정 측면에서, 인간화 항체의 임의의 FR은 예를 들어 FR의 하나 이상의 Vernier 위치 잔기, 및/또는 하나 이상의 다른 선택된 잔기에서 비인간 FR(들)의 하나 이상의 아미노산 잔기를 함유할 수 있다. 인간화 항체는 임의적으로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 항체, 예를 들어, 비인간 항체의 "인간화 형태"는 인간화를 거친 항체를 지칭한다. 인간화 항체는 출발 비인간 항체와 유사한 결합 특이성 및 친화도를 유지한다.

[0040] 용어 "단클론 항체"는 예를 들어, 임의의 진핵생물, 원핵생물, 또는 파지 클론을 포함한 단일 카피 또는 클론으로부터 유래된 항체를 지칭한다. 용어 "단클론 항체"는 하이브리도마 기술을 통해 생산된 항체에만 제한되지 않는다. 단클론 항체는 당업계에 잘 알려진 하이브리도마 기술, 뿐만 아니라 재조합 기술, 파지 디스플레이 기술, 합성 기술 또는 이러한 기술과 당업계에 용이하게 알려진 다른 기술의 조합을 사용하여 생산될 수 있다.

[0041] 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 상의 특정 부위를 지칭한다. 항체가 결합하는 항원 상의 특정 부위는 예를 들어, 결정학에 의해 결정될 수 있다. 하이드록실 라디칼 단백질 발자국 및 알라닌 스캐닝 돌연변이생성과 같은 방법이 또한 사용될 수 있지만 해상도가 낮을 수 있다.

[0042] 용어 "단일특이적 항체"는 하나의 항원에만 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 단일특이적 항체는 항원의 하나의 에피토프에만 결합할 수 있거나 항원의 2개 이상의 에피토프에 결합할 수 있다. 항원의 2개 이상의 에피토프에 결합하는 단일특이적 항체는 단일특이적 폴리에피토프 항체이다.

[0043] 용어 "다중특이적 항체"는 2개 이상의 항원(예를 들어, 이중특이적 항체, 삼중특이적 항체 등)에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 다중특이적 항체의 비제한적인 예는 VH/VL 단위가 폴리에피토프 특이성을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH) 및 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는 항체, 각 VH/VL 단위가 상이한 에피토프에 결합하는 2개 이상의 VL 및 VH 도메인을 갖는 항체, 각 단일 가변 도메인이 에피토프에 결합하는 2개 이상의 단일 가변 도메인을 갖는 항체, 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody) 등, 뿐만 아니라 전장 항체 및/또는 공유적으로 또는 비공유적으로 연결된 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0044] 용어 "폴리에피토프 항체" 및 "폴리에피토프 특이성을 갖는 항체"는 동일하거나 상이한 항원 상의 2개 이상의

에피토프에 결합하는 항체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

- [0045] 용어 "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하기 위해 본원에서 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 위치 Cys226의 아미노산 잔기, 또는 Pro230에서 이의 카르복실-말단까지 연장하는 것으로 정의된다. Fc 영역의 C-말단 리신(Eu 번호지정 체계에 따른 잔기 447)은 예를 들어, 항체의 생산 또는 정제 동안, 또는 항체의 중쇄를 암호화하는 핵산을 재조합적으로 조작함으로써 제거될 수 있다. 따라서, 온전한 항체의 조성물은 모든 Lys447 잔기가 제거된 항체 집단, Lys447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단, 및 Lys447 잔기가 있거나 없는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다.
- [0046] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 효과기 기능을 보유한다. 예시적인 효과기 기능은 C1q 결합; 보체의 존적 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 이러한 효과기 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인(예를 들어, 항체 가변 도메인)과 조합하는 데 필요하고 본원에 개시되거나 당업계에 널리 알려져 있는 다양한 검정을 사용하여 평가될 수 있다. 기능적 Fc 영역은 야생형 IgG와 실질적으로 유사한 효과기 기능, 야생형 IgG와 비교하여 감소된 효과기 기능, 또는 야생형 IgG와 비교하여 향상된 효과기 기능을 보유할 수 있다. 인간 Fc 영역을 포함하는 항체의 경우, 전형적으로 야생형 인간 IgG1과 비교된다.
- [0047] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역(비-A 및 A 동종이인자형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역 뿐만 아니라 이의 자연 발생 변이체를 포함한다.
- [0048] "변이체 Fc 영역"은 적어도 하나의 아미노산 변형(예를 들어, 약 1 내지 약 10개의 아미노산 변형, 및 일부 구현예에서 약 1 내지 약 5개의 아미노산 변형), 바람직하게는 하나 이상의 아미노산 치환(들)으로 인해 천연 서열 Fc 영역의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 본원에서 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 80% 상동성, 바람직하게는 이와 적어도 약 90% 상동성, 또는 바람직하게는 이와 적어도 약 95% 상동성을 보유할 것이다. 일부 구현예에서, 변이체 Fc 영역은 야생형 IgG와 비교하여 감소되거나 향상된 효과기 기능을 보유할 수 있다. 인간 Fc 영역을 포함하는 항체의 경우, 전형적으로 야생형 인간 IgG1과 비교된다.
- [0049] 본원에 사용된 바와 같은 "Fc 구성요소"는 Fc 영역의 힌지 영역, CH2 도메인 또는 CH3 도메인을 지칭한다.
- [0050] "힌지 영역"은 일반적으로 IgG의 약 잔기 216 내지 230(Eu 번호지정), IgG의 약 잔기 226 내지 243(Kabat 번호지정), 또는 IgG의 약 잔기 1 내지 15(IMGT 고유 번호지정)로부터 연장되는 것으로 정의된다.
- [0051] 용어 "항체 단편"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항원-결합 단편의 예는 디아바디, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)_c, Fv 단편, 이황화물 안정화된 Fv 단편(dsFv), (dsFv)₂, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 이황화물 안정화된 디아바디(ds diabody), 트리아바디, 테트라바디(tetrabody), 단일 쇠 항체, scFv, scFv 이량체, 단일 도메인 항체, 단일-도메인 항체, 및 다가 도메인 항체를 포함하나 제한되지 않는다. 전형적으로, 결합 단편은 특이적 결합에 위해 유래된 온전한 항체와 경쟁한다. 결합 단편은 재조합 DNA 기술, 또는 온전한 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 분리에 의해 생산될 수 있다.
- [0052] 용어 "Fab"는 이황화 결합에 의해 단일 중쇄의 가변 영역 및 첫번째 불변 영역에 결합된 단일 경쇄(가변 및 불변 영역 둘 다)로 이루어진 항체의 부분을 지칭한다.
- [0053] 용어 "Fab'"는 힌지 영역의 일부를 포함하는 Fab 단편을 지칭한다.
- [0054] 용어 "F(ab')₂"는 Fab'의 이량체를 지칭한다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 결합이 또한 알려져 있다.
- [0055] 용어 "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 보유하는 항체의 가장 작은 단편을 지칭한다. Fv 단편은 단일 중쇄의 가변 영역에 결합된 단일 경쇄의 가변 영역으로 이루어진다.
- [0056] 용어 "단일 쇠 항체"는 링커에 의해 연결된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역으로 이루어진 항체를 지칭한다. 전부는 아니지만 대부분의 경우, 링커는 펩티드일 수 있다. 링커의 길이는 단일 쇠 항체의 유형에 따라 달라진다. 2개 이상의 단일 쇠 항체를 함께 공유적으로 또는 비공유적으로 연결하면 고자 형태를 초래한다. 단일 쇠

항체, 및 그들의 고차 형태는 단일 도메인 항체, 다가 도메인 항체, 단일 쇠 변이체 단편(scFv), 2가 scFv(di-scFv), 3가 scFv(tri-scFv), 4가 scFv(tetra-scFv), 디아바디, 및 트리아바디 및 테트라바디를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0057] 용어 "단일 쇠 Fv 항체" 및 "scFv"는 링커에 의해 연결된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역으로 이루어진 단일 쇠 항체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 전부는 아니지만 대부분의 경우, 링커는 펩티드일 수 있다. 링커 펩티드는 바람직하게는 약 5 내지 30개 아미노산 길이, 또는 약 10 내지 25개 아미노산 길이이다. 전형적으로, 링커는 적절한 접힘 및 활성 결합 부위 생성을 방해하지 않고 가변 도메인의 안정화를 허용한다. 바람직한 구현예에서, 링커 펩티드는 글리신, 뿐만 아니라 세린 또는 트레오닌이 풍부하다. 2개 이상의 scFv를 함께 공유적으로 또는 비공유적으로 연결하면 고차 형태 디-scFv, 트리-scFv, 테트라-scFv 등을 초래한다. 고차 형태에서 각 scFv의 항원-결합 부위는 동일하거나 상이한 항원 또는 에피토프를 표적할 수 있다.

[0058] 용어 "단일 쇠 Fv-Fc 항체" 또는 "scFv-Fc"는 Fc 영역에 연결된 scFv로 이루어진 전장 항체를 지칭한다.

[0059] "디아바디"는 2개의 단일 쇠 항체로 이루어진 단일 쇠 항체의 고차 변이체이다. 각 단일 쇠 항체에 대해, 너무 짧은 링커를 사용하면 동일한 쇠 상의 2개의 도메인 사이에 쌍을 이룰 수 없으므로, 도메인이 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍을 이루게 하여, 2개의 항원-결합 부위를 생성한다. 전부는 아니지만 대부분의 경우, 링커는 펩티드일 수 있다. 항원-결합 부위는 동일하거나 상이한 항원 또는 에피토프를 표적할 수 있다. 트리아바디(3개의 항원-결합 부위를 형성하기 위해 조립된 3개의 단일 쇠 항체), 테트라바디(4개의 항원-결합 부위를 형성하기 위해 조립된 4개의 단일 쇠 항체), 및 고차 변이체는 유사하게 생산될 수 있다. 예를 들어, Holliger P. 등, *Proc Natl Acad Sci USA*. July 15; 90(14):6444-8 (1993); EP404097; W093/11161 참조.

[0060] "단일-도메인 항체"는 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 항체 단편을 지칭한다. 특정 경우에, 2개 이상의 V_H 도메인은 펩티드 링커와 공유적으로 연결되어 다가 도메인 항체를 생성한다. 다가 도메인 항체의 2개 이상의 V_H 도메인은 동일하거나 상이한 항원 또는 에피토프를 표적할 수 있다.

[0061] 용어 "중쇄 항체"는 2개의 중쇄로 이루어진 항체를 지칭한다. 중쇄 항체는 낙타, 라마, 알파카, 상어 등으로부터의 IgG-유사 항체, 또는 연골 어류로부터의 IgNAR일 수 있다. 예를 들어, Riechmann L. and Muyldermans S., *J Immunol Methods*. December 10; 231(1-2): 25-38 (1999); Muyldermans S., *J Biotechnol*. June; 74(4):277-302 (2001); W094/04678; W094/25591; 또는 미국 특허 번호 6,005,079 참조. 중쇄 항체는 원래 낙타과(낙타, 단봉낙타, 및 라마)로부터 유래되었다. 경쇄가 없음에도 불구하고, 낙타화 항체는 진정한 항원-결합 레퍼토리를 갖는다(Hamers-Casterman C. 등, *Nature*. June 3; 363(6428):446-8 (1993); Nguyen V. K. 등 "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," *Immunogenetics*. April; 54(1):39-47 (2002); Nguyen V. K. 등 *Immunology*. May; 109(1):93-101 (2003)). 중쇄 항체의 가변 도메인(VHH 도메인)은 적응성 면역 반응에 의해 생성된 가장 작은 알려진 항원-결합 단위를 나타낸다(Koch-Nolte F. 등, *FASEB J*. November; 21(13):3490-8. Epub 2007 Jun. 15(2007)).

[0062] "나노바디(nanobody)"는 중쇄 항체의 VHH 도메인 및 2개의 불변 도메인, CH2 및 CH3으로 이루어진 항체를 지칭한다.

[0063] 참조 아미노산 서열에 대한 "퍼센트(%) 동일성"은 서열을 정렬하고 필요한 경우 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 간격을 도입한 후, 참조 서열 내 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내 아미노산 잔기의 백분율로 정의되며, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않는다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하려는 목적을 위한 정렬은 예를 들면, BLAST, BLAST-2, 또는 CLUSTAL 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업계의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 일반적으로 말하면, 주어진 아미노산 서열 B와 함께 또는 이에 대해 주어진 아미노산 서열 A의 % 서열 동일성은 다음과 같이 계산된다: $100 \times \frac{\text{분율 } X/Y}{\text{분율 } X/Y}$ 여기서 X는 A 및 B의 해당 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램에 의해 동일한 일치로 점수 매겨진 아미노산 잔기 수이고, 여기서 Y는 B에서 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성이 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동일하지 않을 것이라는 점이 이해될 것이다.

[0064] 용어 "환자" 및 "대상체"는 인간 CD39를 발현하는 인간 또는 비인간 동물(예를 들어, 포유동물)을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

- [0065] 용어 "치료하다", "치료하는", "치료" 등은 용어가 적용되는 질환, 장애 또는 병태, 또는 이와 관련된 증상 중 적어도 하나를 일시적으로 또는 영구적으로 제거, 감소, 억제, 완화, 또는 개선시키거나 이의 악화를 예방하는 일련의 조치를 지칭한다. 치료는 예로서, 활성 질환의 억제(예를 들어, 질환, 장애 또는 병태 또는 이와 관련된 임상 증상의 발생 또는 추가 발생의 방지), 삶의 질 개선, 및/또는 대상체의 생존 연장을 포함한다.
- [0066] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료를 필요로 하는"은 대상체가 치료를 필요로 하거나 이로부터 이익을 얻을 것이라는 의사 또는 다른 간병인의 판단을 지칭한다. 이러한 판단은 의사 또는 간병인의 전문지식 영역에 있는 다양한 요인에 기반하여 이루어진다.
- [0067] 용어 "예방하다", "예방하는", "예방", "예방책" 등은 일반적으로 특정 질환, 장애 또는 병태를 가질 경향이 있는 대상체의 맥락에서 질환, 장애, 병태 등이 발생할 대상체의 위험을 일시적으로 또는 영구적으로 예방, 저해, 억제 또는 감소시키거나(예를 들어, 임상 증상의 부재에 의해 결정됨) 이의 발병을 지연시키기 위한 방식으로(예를 들어, 질환, 장애, 병태 또는 이의 증상의 발병 전에) 시작되는 일련의 조치를 지칭한다. 특정 경우에, 용어는 또한 질환, 장애 또는 병태의 진행을 늦추거나 유해하거나 달리 원치않은 상태로 이의 진행을 억제하는 것을 지칭한다. 예방은 또한 대상체가 질환, 장애, 병태 또는 이와 관련된 증상에 대한 치료를 받은 후 해당 질환, 장애, 병태 또는 증상의 재발을 예방하기 위해 대상체에서 시작되는 일련의 조치를 지칭한다.
- [0068] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "예방을 필요로 하는"은 대상체가 예방 간호를 필요로 하거나 이로부터 이익을 얻을 것이라는 의사 또는 다른 간병인의 판단을 지칭한다. 이러한 판단은 의사 또는 간병인의 전문지식 영역에 있는 다양한 요인에 기반하여 이루어진다.
- [0069] **II. 본 개시내용의 항체**
- [0070] 본 개시내용은 인간 CD39, 보다 특히 인간 CD39의 세포외 도메인에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 본 개시내용의 항체는 가용성 및/또는 막 결합된 인간 CD39에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 단일특이적이다. 다른 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 다중특이적이다. 본 개시내용의 맥락에서 고려되는 추가적인 항원 결합 특이성은 $TGF\beta$ 를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 출원의 항-CD39 항체는 단리되거나 조성물의 일부일 수 있다.
- [0071] 단일특이적이든 다중특이적이든 본 개시내용의 항-CD39 항체는 인간 CD39에 특이적으로 결합하며, 이는 항체가 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 측정된 CD39에 대한 10^{-6} M 이하의 평형 해리 상수(K_D)를 갖는다는 것을 의미한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 SPR에 의해 측정된 10^{-8} M 이하(예를 들어, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} 등)의 인간 CD39에 대한 K_D 를 갖는다. 예를 들면, 상세한 방법론에 대해 실시예 3을 참조한다. 다양한 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 약 1×10^{-9} M 내지 약 1×10^{-14} M, 또는 약 1×10^{-9} M 내지 약 1×10^{-13} M, 또는 약 1×10^{-9} M 내지 약 1×10^{-12} M, 또는 약 1×10^{-9} M 내지 약 1×10^{-11} M인 인간 CD39에 대한 K_D 를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 약 1×10^{-10} M 내지 약 1×10^{-14} M, 또는 약 1×10^{-10} M 내지 약 1×10^{-13} M, 또는 약 1×10^{-10} M 내지 약 1×10^{-12} M인 인간 CD39에 대한 K_D 를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 약 1×10^{-11} M 내지 약 1×10^{-14} M, 약 1×10^{-11} M 내지 약 1×10^{-13} M인 인간 CD39에 대한 K_D 를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 약 1×10^{-12} M 내지 약 1×10^{-14} M, 또는 약 1×10^{-12} M 내지 약 1×10^{-13} M인 인간 CD39에 대한 K_D 를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 약 1×10^{-10} M 내지 약 1×10^{-11} M, 또는 약 1×10^{-11} M 내지 약 1×10^{-12} M인 인간 CD39에 대한 K_D 를 갖는다.
- [0072] 본 개시내용의 항-CD39 항체는 또한 CD39 효소적 활성을 억제한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 실시예 5에서와 같이 측정된 약 5 nM 이하의 IC_{50} 값으로 인간 CD39 효소적 활성을 억제한다. 예를 들어, 항-CD39 항체는 실시예 5에서와 같이 측정된 약 5 nM, 약 4 nM, 약 3 nM, 약 2 nM, 약 1 nM, 또는 그 이하의 IC_{50} 값으로 재조합 인간 CD39 효소적 활성을 억제할 수 있다. 또 다른 예로서, 항-CD39 항체는 약 1 nM 이하, 예를 들어, 약 1.0 nM, 약 0.9 nM, 약 0.8 nM, 약 0.7 nM, 약 0.6 nM, 약 0.5 nM, 또는 그 이하의 IC_{50} 값으로 재조합 인간 CD39 효소적 활성을 억제할 수 있다. 또 다른 예로서, 항-CD39 항체는 실시예 5에서와 같이 측정된 약

0.5 nM 이하, 예를 들어, 약 0.5 nM, 약 0.4 nM, 약 0.3 nM, 약 0.2 nM, 약 0.1 nM, 약 0.09 nM, 약 0.08 nM, 약 0.07 nM, 약 0.06 nM, 약 0.05 nM, 또는 그 이하의 IC₅₀ 값으로 재조합 인간 CD39 효소적 활성을 억제할 수 있다. 위의 IC₅₀ 값은 또한 개별 값, 또는 범위로 표현될 수 있다. 예를 들어, 항-CD39 항체는 약 0.05 nM 내지 약 5 nM, 약 0.05 nM 내지 약 1 nM, 0.05 nM 내지 약 0.5 nM, 약 1 nM 내지 약 5 nM, 약 0.5 nM 내지 약 1.0 nM, 또는 이의 하위 범위의 IC₅₀ 값으로 재조합 인간 CD39 효소적 활성을 억제할 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 약 0.5 nM 내지 약 1.0 nM, 또는 약 0.6 nM 내지 약 1.0 nM의 IC₅₀ 값으로 인간 CD39 효소적 활성을 억제한다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 약 0.05 nM 내지 약 0.5 nM, 약 0.05 nM 내지 약 0.4 nM, 또는 약 0.05 nM 내지 약 0.3 nM의 IC₅₀ 값으로 인간 CD39 효소적 활성을 억제한다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 약 0.07 nM 내지 약 0.5 nM, 약 0.07 nM 내지 약 0.4 nM, 약 0.07 nM 내지 약 0.3 nM, 또는 약 0.07 nM 내지 약 0.2 nM의 IC₅₀ 값으로 인간 CD39 효소적 활성을 억제한다. 전술된 구현예에서, (i) 인간 CD39는 재조합, 가용성 CD39일 수 있거나 세포 표면 발현된 CD39일 수 있고/있거나, (ii) 억제제는 낮은 ATP(예를 들어, 20 μM) 및/또는 높은 ATP(예를 들어, 400 μM)의 존재 하에 평가될 수 있다.

[0073] A. 예시적인 가변 영역

[0074] 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 VH, 또는 VH 및 VL을 포함하는 항-CD39 항체를 제공한다. 다음 구현예에서, "적어도 X% 서열 동일성"은 개별 값 및 이의 범위를 포괄한다. 예를 들어, "적어도 90% 서열 동일성"은 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 서열 동일성, 뿐만 아니라 개별 값(예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% 서열 동일성) 및 이의 범위를 포함한다.

[0075] 하나의 예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 서열번호: 9로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄 가변 영역(VH) 및 임의적으로 서열번호: 13으로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 서열번호: 9로부터 유래된 CDR은 H1, H2, H3, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 특정 구현예에서, VH는 서열번호: 10에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H1, 서열번호: 11에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H2, 서열번호: 12에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H3, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 서열번호: 13으로부터 유래된 CDR은 L1, L2, L3, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 특정 구현예에서, VL은 서열번호: 14에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 15에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L2, 서열번호: 16에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L3, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 서열번호: 9로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체는 서열번호: 13으로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 포함하는 VL을 추가로 포함할 수 있다. CDR은 L1, L2, L3, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 바람직한 구현예에서, VL은 서열번호: 14에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 15에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L2, 서열번호: 16에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L3, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 구체적 예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 서열번호: 10에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 H1, 서열번호: 11에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 H2, 서열번호: 12에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 H3을 포함하는 VH, 및 서열번호: 14에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 15에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L2, 및 서열번호: 16에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L3을 포함하는 VL을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 서열번호: 10을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H1, 서열번호: 11을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H2, 서열번호: 12를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H3을 포함하는 VH, 및 서열번호: 14를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 15를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L2, 및 서열번호: 16을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L3을 포함하는 VL을 포함한다.

[0076] 전술된 구현예 중 일부에서, 항체는 (i) 서열번호: 9에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 성숙한 VH 및/또는 서열번호: 13에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 성숙한 VL을 추가로 포함할 수 있다. 예시적인 구현예에서, 항체는 성숙한 VH 및 성숙한 VL을 포함하고, **표 A**의 항체이다.

표 A

항체	성숙한 VH	성숙한 VL
A	서열번호: 9	서열번호: 13

전술된 구현에 각각에서, 항-CD39 항체는 (i) 온전한 항체 또는 항원-결합 단편, 및/또는 (ii) 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체일 수 있다. 적합한 키메라, 인간화, 및 인간 항체는 섹션 IIC, IID, 및 IIE에 추가로 기재되어 있다. 특정 구현에 있어서, 항-CD39 항체는 임의적으로 실질적으로 인간인 하나 이상의 불변 영역, 또는 불변 영역의 일부를 포함할 수 있다. 적합한 불변 영역은 섹션 II(F)에 추가로 상세하게 기재되어 있다.

또 다른 예시적인 구현에 있어서, 항체는 표 B의 항체이다.

표 B

항체	성숙한 HC	성숙한 LC
ch19 IGG4.P	서열번호: 35	서열번호: 36

또 다른 예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 서열번호: 17, 서열번호: 43, 또는 서열번호: 44로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄 가변 영역(VH) 및 임의적으로 서열번호: 21, 서열번호: 45, 서열번호: 46, 서열번호: 47, 서열번호: 48, 또는 서열번호: 49로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 서열번호: 17, 서열번호: 43, 또는 서열번호: 44로부터 유래된 CDR은 H1, H2, H3, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 특정 구현에 있어서, VH는 서열번호: 18에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H1, 서열번호: 19에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H2, 서열번호: 20에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H3, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 서열번호: 21, 서열번호: 45, 서열번호: 46, 서열번호: 47, 서열번호: 48, 또는 서열번호: 49로부터 유래된 CDR은 L1, L2, L3, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 특정 구현에 있어서, VL은 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 25에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L2, 서열번호: 26에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L3, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 서열번호: 17, 서열번호: 43, 또는 서열번호: 44로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체는 서열번호: 21, 서열번호: 45, 서열번호: 46, 서열번호: 47, 서열번호: 48, 또는 서열번호: 49로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 포함하는 VL을 추가로 포함할 수 있다. CDR은 L1, L2, L3, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 바람직한 구현에 있어서, VL은 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 25에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L2, 서열번호: 26에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L3, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 구체적 예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 서열번호: 18에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 H1, 서열번호: 19에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 H2, 서열번호: 20에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 H3을 포함하는 VH, 및 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 25에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L2, 및 서열번호: 26에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L3을 포함하는 VL을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 서열번호: 18을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H1, 서열번호: 19를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H2, 서열번호: 20을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H3을 포함하는 VH, 및 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 25를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L2, 및 서열번호: 26을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L3을 포함하는 VL을 포함한다.

전술된 구현에 중 일부에서, 항체는 (i) 서열번호: 17에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 VH 및/또는 서열번호: 21에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 VL; 또는 (ii) 서열번호: 43 또는 서열번호: 44에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 VH 및/또는 서열번호: 45, 서열번호: 46, 서열번호: 47, 서열번호: 48, 또는 서열번호: 49에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 VL을 추가로 포함할 수 있다. 예시적인 구현에 있어서, 항체는 VH 및 VL을 포함하고, 표 C의 항체이다.

[0085] 표 C

항체	성숙한 VH	성숙한 VL
B	서열번호: 17	서열번호: 21
C	서열번호: 43	서열번호: 45
D	서열번호: 43	서열번호: 46
E	서열번호: 43	서열번호: 47
F	서열번호: 43	서열번호: 48
G	서열번호: 43	서열번호: 49
H	서열번호: 44	서열번호: 48
I	서열번호: 44	서열번호: 49

[0086]

[0087] 진술된 구현에 각각에서, 항-CD39 항체는 (i) 온전한 항체 또는 항원-결합 단편, 및/또는 (ii) 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체일 수 있다. 적합한 키메라, 인간화, 및 인간 항체는 섹션 IIC, IID, 및 IIE에 추가로 기재되어 있다. 특정 구현에에서, 항-CD39 항체는 임의적으로 실질적으로 인간인 하나 이상의 불변 영역, 또는 불변 영역의 일부를 포함할 수 있다. 적합한 불변 영역은 **섹션 II (F)**에 추가로 상세하게 기재되어 있다.

[0088] 또 다른 예시적인 구현에에서, 항체는 **표 D**의 항체이다.

[0089] 표 D

항체	성숙한 HC	성숙한 LC
ch31 IGG4.P	서열번호: 37	서열번호: 38
hu31.1 IGG4.P	서열번호: 50	서열번호: 53
hu31.2 IGG4.P	서열번호: 50	서열번호: 54
hu31.3 IGG4.P	서열번호: 50	서열번호: 55
hu31.4 IGG4.P	서열번호: 50	서열번호: 56
hu31.4 IGG1.AA	서열번호: 51	서열번호: 56
hu31.5 IGG4.P	서열번호: 50	서열번호: 57
hu31.6 IGG4.P	서열번호: 52	서열번호: 56
hu31.7 IGG4.P	서열번호: 52	서열번호: 57

[0090]

[0091] 또 다른 예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 서열번호: 27, 서열번호: 58 또는 서열번호: 59로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 갖는 중쇄 가변 영역(VH) 및 임의적으로 서열번호: 31, 서열번호: 60, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 또는 서열번호: 63으로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 포함한다. 서열번호: 58 또는 서열번호: 59로부터 유래된 CDR은 H1, H2, H3, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 특정 구현에에서, VH는 서열번호: 28에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H1, 서열번호: 29에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H2, 서열번호: 30에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 H3, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 서열번호: 60, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 서열번호: 63으로부터 유래된 CDR은 L1, L2, L3, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 특정 구현에에서, VL은 서열번호: 32에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 33에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L2, 서열번호: 34에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 L3, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 서열번호: 58 또는 서열번호: 59로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체는 서열번호: 60, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 서열번호: 63으로부터 유래된 하나 이상의 CDR을 포함하는 VL을 추가로 포함할 수 있다. CDR은 L1, L2, L3, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 바람직한 구현에에서, VL은 서열번호: 32에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 33에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L2, 서열번호: 34에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L3, 또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 구체적 예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 서열번호: 28에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 H1, 서열번호: 29에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 H2, 서열번호: 30에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 H3을 포함하는 VH, 및 서열번호: 32에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 33에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L2, 및 서열번호: 34에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 L3을 포함하는 VL을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 서열번호: 28을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H1, 서열번호: 29를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H2, 서열번호: 30을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H3을 포함하는 VH, 및 서열번호: 32를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 33을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L2, 및 서열번호: 34를 포

합하는 아미노산 서열을 갖는 L3을 포함하는 VL을 포함한다.

[0092] 전술된 구현예 중 일부에서, 항체는 (i) 서열번호: 27에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 VH 및/또는 서열번호: 31에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 VL; 또는 (ii) 서열번호: 58 또는 서열번호: 59에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 VH 및/또는 서열번호: 60, 서열번호: 61, 서열번호: 62, 또는 서열번호: 63에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 VL을 추가로 포함할 수 있다. 예시적인 구현예에서, 항체는 VH 및 VL을 포함하고, **표 E**의 항체이다.

[0093] **표 E**

항체	성숙한 VH	성숙한 VL
J	서열번호: 27	서열번호: 31
K	서열번호: 58	서열번호: 60
L	서열번호: 58	서열번호: 61
M	서열번호: 58	서열번호: 62
N	서열번호: 59	서열번호: 61
O	서열번호: 59	서열번호: 60
P	서열번호: 59	서열번호: 62
Q	서열번호: 59	서열번호: 63
R	서열번호: 58	서열번호: 63

[0094]

[0095] 전술된 구현예 각각에서, 항-CD39 항체는 (i) 온전한 항체 또는 항원-결합 단편, 및/또는 (ii) 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체일 수 있다. 적합한 키메라, 인간화, 및 인간 항체는 각각 섹션 IIC, IID, 및 IIE에 추가로 기재되어 있다. 특정 구현예에서, 항-CD39 항체는 임의적으로 실질적으로 인간인 하나 이상의 불변 영역, 또는 불변 영역의 일부를 포함할 수 있다. 적합한 불변 영역은 **섹션 II(F)**에 추가로 상세하게 기재되어 있다.

[0096] 또 다른 예시적인 구현예에서, 항체는 **표 F**의 항체이다.

[0097] **표 F**

항체	성숙한 HC	성숙한 LC
ch39_IGG4.P	서열번호: 39	서열번호: 40
ch39_mIGG2A.AAG	서열번호: 41	서열번호: 42
hu39.1_IGG4.P	서열번호: 64	서열번호: 67
hu39.2_IGG4.P	서열번호: 64	서열번호: 68
hu39.3_IGG4.P	서열번호: 64	서열번호: 69
hu39.4_IGG4.P	서열번호: 65	서열번호: 68
hu39.5_IGG4.P	서열번호: 65	서열번호: 67
hu39.5_IGG1.AA	서열번호: 66	서열번호: 67
hu39.6_IGG4.P	서열번호: 65	서열번호: 69
hu39.7_IGG4.P	서열번호: 65	서열번호: 70
hu39.8_IGG4.P	서열번호: 64	서열번호: 70

[0098]

[0099] **B. 유사한 결합 특이성을 갖는 항체**

[0100] 본 개시내용은 또한 위에서 19 또는 ch19_IGG4.P로 지정된 항체, 또는 위에서 31, ch31_IGG4.P, hu31.1_IGG4.P, hu31.2_IGG4.P, hu31.3_IGG4.P, hu31.4_IGG4.P, hu31.4_IGG1.AA, hu31.5_IGG4.P, hu31.6_IGG4.P, 또는 hu31.7_IGG4.P로 지정된 항체, 또는 위에서 39, ch39_IGG4.P, ch39_mIGG2A.AAG, hu39.1_IGG4.P, hu39.2_IGG4.P, hu39.3_IGG4.P, hu39.4_IGG4.P, hu39.5_IGG4.P, hu39.5_IGG1.AA, hu39.6_IGG4.P, hu39.7_IGG4.P, 또는 hu39.8_IGG4.P로 지정된 항체와 동일하거나 중첩되는 에피토프에 결합하는 항-CD39 항체를 제공한다. 에피토프는 접촉 잔기를 식별하기 위해 항원에 결합된 항체의 X-선 결정학과 같은 당업계에 알려진 방법에 의해 식별될 수 있다. 경쟁 검정은 이러한 항체를 식별하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-CD39 항체는 인간 CD39에 대한 참조 항체의 결합을 경쟁적으로 억제할 수 있으며, 참조 항체는 19, ch19_IGG4.P, 31, ch31_IGG4.P, hu31.1_IGG4.P, hu31.2_IGG4.P, hu31.3_IGG4.P, hu31.4_IGG4.P, hu31.4_IGG1.AA, hu31.5_IGG4.P, hu31.6_IGG4.P, 또는 hu31.7_IGG4.P, 39, ch39_IGG4.P, ch39_mIGG2A.AAG, hu39.1_IGG4.P, hu39.2_IGG4.P, hu39.3_IGG4.P, hu39.4_IGG4.P, hu39.5_IGG4.P, hu39.5_IGG1.AA,

hu39.6_IGG4.P, hu39.7_IGG4.P, 또는 hu39.8_IGG4.P로부터 선택된다. 항체가 인간 CD39에 대한 참조 항체의 결합을 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 차단하는 경우 항체는 인간 CD39에 대한 참조 항체의 결합을 경쟁적으로 억제한다고 한다. 경쟁적 억제는 예를 들어, 실시예 7에 기재된 바와 같이 경쟁 흐름 검정에 의해 결정될 수 있다.

[0101] 추가 구현예에서, 위에 기재된 바와 같이, 인간 CD39에 대한 참조 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 항체는 **섹션 II(A)**에 기재된 바와 같이 VH, 또는 VH 및 VL을 포함한다.

[0102] 이러한 결합 특이성을 갖는 다른 항체는 마우스를 인간 CD39 또는 원하는 에피토프를 포함한 이의 부분으로 면역화하고, 임의적으로 항체 19 또는 이의 변이체(예를 들어, ch19_IGG4.P 등), 항체 31 또는 이의 변이체(예를 들어, ch31_IGG4.P, hu31.1_IGG4.P, hu31.2_IGG4.P, hu31.3_IGG4.P, hu31.4_IGG4.P, hu31.4_IGG1.AA, hu31.5_IGG4.P, hu31.6_IGG4.P, hu31.7_IGG4.P 등), 또는 항체 39 또는 이의 변이체(예를 들어, ch39_IGG4.P, ch39_mIGG2A.AAG, hu39.1_IGG4.P, hu39.2_IGG4.P, hu39.3_IGG4.P, hu39.4_IGG4.P, hu39.5_IGG4.P, hu39.5_IGG1.AA, hu39.6_IGG4.P, hu39.7_IGG4.P, hu39.8_IGG4.P 등)와의 경쟁에서 인간 CD39의 세포의 도메인에 대한 결합을 위해 생성된 항체를 스크리닝함으로써 생산될 수 있다. 항체는 또한 인간 CD39의 돌연변이된 형태에 대해 스크리닝되어 19, ch19_IGG4.P, 31, ch31_IGG4.P, hu31.1_IGG4.P, hu31.2_IGG4.P, hu31.3_IGG4.P, hu31.4_IGG4.P, hu31.4_IGG1.AA, hu31.5_IGG4.P, hu31.6_IGG4.P, hu31.7_IGG4.P, 39, ch39_IGG4.P, ch39_mIGG2A.AAG, hu39.1_IGG4.P, hu39.2_IGG4.P, hu39.3_IGG4.P, hu39.4_IGG4.P, hu39.5_IGG4.P, hu39.5_IGG1.AA, hu39.6_IGG4.P, hu39.7_IGG4.P, 또는 hu39.8_IGG4.P와 같은 돌연변이가 변화의 수집에 대해 동일하거나 유사한 결합 프로파일을 나타내는 항체를 식별할 수 있다. 돌연변이는 CD39 항체의 세포의 도메인 전 반에 걸쳐 또는 에피토프가 존재하는 것으로 알려진 이의 섹션을 통해 동시에 또는 보다 넓은 이격된 간격으로 하나의 잔기를 알라닌(또는 알라닌이 이미 존재하는 경우 세린)으로 체계적으로 대체 치환할 수 있다.

[0103] 다른 항체는 19, ch19_IGG4.P, 31, ch31_IGG4.P, hu31.1_IGG4.P, hu31.2_IGG4.P, hu31.3_IGG4.P, hu31.4_IGG4.P, hu31.4_IGG1.AA, hu31.5_IGG4.P, hu31.6_IGG4.P, hu31.7_IGG4.P, 39, ch39_IGG4.P, ch39_mIGG2A.AAG, hu39.1_IGG4.P, hu39.2_IGG4.P, hu39.3_IGG4.P, hu39.4_IGG4.P, hu39.5_IGG4.P, hu39.5_IGG1.AA, hu39.6_IGG4.P, hu39.7_IGG4.P, 또는 hu39.8_IGG4.P와 같이 예시적인 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 cDNA의 돌연변이생성에 의해 획득될 수 있다. 성숙한 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열에서 19, ch19_IGG4.P, 31, ch31_IGG4.P, hu31.1_IGG4.P, hu31.2_IGG4.P, hu31.3_IGG4.P, hu31.4_IGG4.P, hu31.4_IGG1.AA, hu31.5_IGG4.P, hu31.6_IGG4.P, hu31.7_IGG4.P, 39, ch39_IGG4.P, ch39_mIGG2A.AAG, hu39.1_IGG4.P, hu39.2_IGG4.P, hu39.3_IGG4.P, hu39.4_IGG4.P, hu39.5_IGG4.P, hu39.5_IGG1.AA, hu39.6_IGG4.P, hu39.7_IGG4.P, 또는 hu39.8_IGG4.P와 적어도 임의의 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하고 기능적 특성을 유지하고/하거나, 작은 수의 기능적으로 중요하지 않은 아미노산 치환(예를 들어, 보존적 치환), 결실, 또는 삽입에 의해 각각의 항체와 상이한 항체가 또한 본 개시내용에 포함된다. 결합에 중요할 가능성이 있는 가변 영역 프레임워크의 아미노산은 아래 인간화 섹션에 기재된 바와 같이 식별될 수 있다.

[0104] 선택된 설치류 항체(예를 들어, 19, 31, 또는 37) 또는 선택된 인간화 항체(예를 들어, hu31.1_IGG4.P, hu31.2_IGG4.P, hu31.3_IGG4.P, hu31.4_IGG4.P, hu31.4_IGG1.AA, hu31.5_IGG4.P, hu31.6_IGG4.P, hu31.7_IGG4.P, hu39.1_IGG4.P, hu39.2_IGG4.P, hu39.3_IGG4.P, hu39.4_IGG4.P, hu39.5_IGG4.P, hu39.5_IGG1.AA, hu39.6_IGG4.P, hu39.7_IGG4.P, 또는 hu39.8_IGG4.P)의 결합 특이성을 갖는 항체는 또한 파지 디스플레이 방법의 변형을 사용하여 생산될 수 있다. Winter, WO 92/20791 참조. 이 방법은 인간 항체를 생산하는 데 특히 적합하다. 이 방법에서, 선택된 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역은 출발 물질로서 사용된다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역이 출발 물질로서 선택되는 경우, 파지 디스플레이는 동일한 경쇄 가변 영역(즉, 출발 물질의 경쇄) 및 상이한 중쇄 가변 영역을 나타내는 구성원으로 구성된다. 중쇄 가변 영역은 예를 들어, 재배열된 인간 중쇄 가변 영역의 라이브러리로부터 획득될 수 있다. 인간 CD39에 대한 강한 특이적 결합(예를 들어, 적어도 10^8 또는 적어도 10^9 M^{-1})을 나타내는 파지가 선택된다. 그런 다음 이 파지로부터의 중쇄 가변 영역은 추가 파지 디스플레이를 구성하기 위한 출발 물질로서 제공된다. 이 라이브러리에서, 각 파지는 동일한 중쇄 가변 영역(즉, 첫번째 디스플레이 라이브러리로부터 식별된 영역) 및 상이한 경쇄 가변 영역을 나타낸다. 경쇄 가변 영역은 예를 들어, 재배열된 인간 가변 경쇄 영역의 라이브러리로부터 획득될 수 있다. 다시, 인간 CD39에 대한 강한 특이적 결합을 나타내는 파지가 선택된다. 생성된 항체는 일반적으로 무린 출발 물질과 동일하거나 유사한 에피토프 특이성을 갖는다.

[0105] 본원에 기재된 항체 외에도, 본 발명의 항체와 실질적으로 동일하게 기능하는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 동일한 결합 특이성을 갖는 항체 모방체 또는 압타머를 설계하는 것이 가능할 수 있다. "항체 모방체"는 항원에 특이적으로 결합할 수 있지만 항체와 구조적으로 관련되지 않은 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭한다. 항체 모방체는 약 3 kDa 내지 약 20 kDa의 질량을 갖는다. 항체 모방체의 비제한적인 예는 아피바디(affibody) 분자, 아필린(affilin), 아피머(affimer), 알파바디(alphabody), 안티칼린(anticalin), 아비머(avimer), DARPin, 및 모노바디(monobody)이다. 압타머는 RNA 또는 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오타이드로 구성되고 그들의 표적에 대해 높은 특이성 및 친화도를 갖는 소형 핵산 리간드의 한 부류이다. 압타머는 항원-항체 반응과 유사한 과정인 구조적 인식을 통해 그들의 표적과 상호작용하고 결합한다. 압타머는 항체보다 낮은 분자량, 전형적으로 약 8-25 kDa를 갖는다.

[0106] C. 키메라 및 베니어드 항체

[0107] 위에 기재된 바와 같이, 본 개시내용은 본원에서 항체 19, 항체 31 또는 항체 39로 지정된 항체의 키메라 항-CD39 항체를 포함하나 이에 제한되지 않는 비인간 항체의 키메라 및 베니어드 형태를 제공한다.

[0108] 특정 구현예에서, 키메라 항체는 비인간 항체(예를 들어, 마우스, 래트 등)의 경쇄 및 중쇄의 성숙한 가변 영역이 인간 경쇄 및 중쇄 불변 영역과 조합된 항체이다. 이러한 항체는 비인간 항체의 결합 특이성을 실질적으로 또는 전적으로 보유하고 약 2/3가 인간 서열이다.

[0109] 베니어드 항체는 CDR의 일부 및 일반적으로 모두 및 비인간 항체의 비인간 가변 영역 프레임워크 잔기의 일부를 유지하지만 B- 또는 T 세포 에피토프에 기여할 수 있는 다른 가변 영역 프레임워크 잔기, 예를 들어, 노출된 잔기(Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991)를 인간 항체 서열의 상응하는 위치로부터의 잔기로 대체하는 인간화 항체의 한 유형이다. 결과는 CDR이 전적으로 또는 실질적으로 비인간 항체로부터 유래되고 비인간 항체의 가변 영역 프레임워크가 치환에 의해 더욱 인간과 유사하게 만들어진 항체이다. 항-CD39 항체의 베니어드 형태가 본 개시내용에 포함된다.

[0110] 일부 구현예에서, 항-CD39 키메라 항체는 래트 가변 도메인 및 인간 IgG1 및 카파 불변 도메인(또는 이의 변이체) 또는 인간 IgG4 및 카파 불변 도메인(또는 이의 변이체)을 갖는 래트-인간 키메라이다. 적합한 인간 불변 도메인은 당업계에 알려져 있고, **섹션 II(F)**에 추가로 기재되어 있다. 구체적 구현예에서, 항-CD39 키메라 항체는 ch19_IGG4.P, ch31_IGG4.P, 및 ch39_IGG4.P이다.

[0111] D. 인간화 항체

[0112] 본원에 기재된 바와 같이, 본 개시내용은 본원에서 19, 31 또는 39로 지정된 항체의 인간화 항체를 제공하며, 임의적으로 여기서 인간화 항체는 실시예 5에서와 같이 측정된 약 5 nM 이하, 약 0.05 nM 내지 약 5 nM, 약 1 nM 이하, 약 0.05 nM 내지 약 1 nM, 약 0.5 nM 이하, 또는 약 0.05 nM 내지 약 0.5 nM의 IC₅₀ 값으로 인간 CD39 효소적 활성을 억제한다. 전형적으로, 비인간 항체는 모체 비인간 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서 인간에 대한 면역원성을 감소시키기 위해 인간화된다. 인간화 항체는 CDR 또는 이의 부분이 비인간 항체로부터 유래되고, FR 또는 이의 부분이 인간 항체 서열로부터 유래된 하나 이상의 가변 도메인을 포함한다. 인간화 항체는 임의적으로 또한 인간 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는 예를 들어, 항체 특이성 또는 친화도를 회복하거나 개선하기 위해 비인간 항체(예를 들어, CDR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0113] 따라서, 인간화 항체는 전적으로 또는 실질적으로 공여자 항체로부터 일부 또는 모든 CDR 및 존재하는 경우 전적으로 또는 실질적으로 인간 항체 서열로부터의 가변 영역 프레임워크 서열 및 불변 영역을 갖는 항체이다. 예를 들어, 인간화 중쇄는 전적으로 또는 실질적으로 공여자 항체 중쇄로부터의 적어도 1개, 2개 및 일반적으로 3개의 모든 CDR, 및 존재하는 경우 실질적으로 인간 중쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터의 중쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 중쇄 불변 영역을 갖는다. 유사하게, 인간화 경쇄는 전적으로 또는 실질적으로 공여자 항체 경쇄로부터의 적어도 1개, 2개 및 일반적으로 3개의 모든 CDR, 및 존재하는 경우 실질적으로 인간 경쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터의 경쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 경쇄 불변 영역을 갖는다. 여기서 본 출원의 다른 곳에서와 같이, 대상체 항체의 CDR은 상응하는 잔기(Kabat에 의해 정의됨)의 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%가 각각의 CDR 사이에서 동일한 경우 참조 항체의 상응하는 CDR로부터 실질적으로 유래하지만; 대상체 항체에서 Kabat에 의해 정의된 바와 같은 CDR H2는 상응하는 잔기(Kabat에 의해 정의됨)의 적어도 약 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%,

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%가 각각의 CDR 사이에서 동일한 경우 참조 항체의 상응하는 CDR로부터 실질적으로 유래된다. 항체쇄의 가변 영역 프레임워크 서열 또는 항체쇄의 불변 영역은 Kabat에 의해 정의된 상응하는 잔기의 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%가 동일한 경우 각각 인간 가변 영역 프레임워크 서열 또는 인간 불변 영역으로부터 실질적으로 유래된다.

[0114] 일반적으로 말하면, 인간화 항체는 비인간 "공여자" 항체로부터의 CDR이 인간 "수용자" 항체 서열에 이식된 유전적으로 조작된 항체이다(예를 들어, Queen, US 5,530,101 및 5,585,089; Winter, US 5,225,539, Carter, US 6,407,213, Adair, US 5,859,205 6,881,557, Foote, US 6,881,557 참조). 수용자 항체 서열은 예를 들어, 성숙한 인간 항체 서열, 이러한 서열의 복합체, 인간 항체 서열의 공통 서열, 또는 생식계열 영역 서열일 수 있다. 인간화 항체는 비인간(예를 들어 마우스, 래트 등) 항체로부터 6개 CDR을 모두 포함할 수 있지만, 이들은 또한 비인간 항체로부터의 모든 CDR 미만(예를 들어, 적어도 3개, 4개, 또는 5개)의 CDR로 만들어질 수 있다(예를 들어, Pascalis 등, *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos 등, *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi 등, *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura 등, *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

[0115] 일부 항체에서 CDR의 일부만, 즉 SDR로 불리는 결합에 필요한 CDR 잔기의 하위집합이 인간화 항체에서 결합을 유지하는 데 필요하다. 항원과 접촉하지 않고 SDR에 없는 CDR 잔기는 이전 연구에 기반하거나(예를 들어, CDR H2의 잔기 H60-H65는 종종 필요하지 않음), Chothia 초가변 루프 외부에 있는 Kabat CDR 영역으로부터(Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), 분자 모델링 및/또는 경험적으로, 또는 Gonzales 등, *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004에 기재된 바와 같이 식별될 수 있다. 하나 이상의 공여자 CDR 잔기가 부재하거나 전체 공여자 CDR이 생략된 위치에 있는 이러한 인간화 항체에서, 위치를 차지하는 아미노산은 수용자 항체 서열에서 상응하는 위치(Kabat 번호지정에 의해)를 차지하는 아미노산일 수 있다. 일부 항체에서, CDR에서 번역후 변형(예를 들어, 글리코실화)을 위한 잠재적인 부위는 번역후 변형을 제거하도록 대체될 수 있다. CDR 내에서 치환을 위한 위치 및 치환할 아미노산이 또한 경험적으로 선택될 수 있다.

[0116] 수용자는 인간 면역글로불린 또는 인간 공통 프레임워크로부터 유래되는 선택된 인간 프레임워크 서열과 서열이 동일할 수 있지만, 본 개시내용은 수용자 서열이 인간 면역글로불린 서열 또는 인간 공통 프레임워크 서열에 비해 기존 아미노산 치환을 포함할 수 있다는 것을 고려한다. 이러한 기존 치환은 최소화될 수 있으며; 일반적으로 인간 면역글로불린 서열 또는 공통 프레임워크 서열에 비해 4개, 3개, 2개 또는 1개 아미노산 차이만 있을 수 있다. 인간 수용자 항체 서열은 인간 수용자 서열 가변 영역 프레임워크와 공여자 항체쇄의 상응하는 가변 영역 프레임워크 사이에 높은 서열 동일성 정도(예를 들어, 65-85% 동일성)를 제공하기 위해 많은 알려진 인간 항체 서열 중에서 임의적으로 선택될 수 있다.

[0117] 인간 가변 영역 프레임워크 잔기로부터의 특정 아미노산은 CDR 형태 및/또는 항원에 대한 결합에 미치는 가능한 영향에 기반하여 치환을 위해 선택될 수 있다. 이러한 가능한 영향의 조사는 모델링, 특정 위치에서 아미노산의 특성 검사, 또는 특정 아미노산의 치환 또는 돌연변이생성 효과의 경험적 관찰에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 아미노산이 비인간 가변 영역 프레임워크 잔기와 선택된 인간 가변 영역 프레임워크 잔기 사이에서 상이한 경우, 인간 프레임워크 아미노산은 아미노산이 (1) 직접적으로 비공유적으로 항원에 결합하고, (2) CDR 영역에 인접하고, (3) 달리 CDR 영역과 상호작용하는(예를 들어 CDR 영역의 약 6 Å 내에 있음) 것으로 합리적으로 예상될 때 비인간 항체로부터의 동등한 프레임워크 아미노산으로 대체될 수 있다. 치환을 위한 다른 후보는 해당 위치에서 인간 면역글로불린에 대해 특이한 수용자 인간 프레임워크 아미노산이다. 이들 아미노산은 비인간 공여자 항체의 동등한 위치 또는 보다 전형적인 인간 면역글로불린의 동등한 위치로부터의 아미노산으로 치환될 수 있다.

[0118] 일부 구현예에서, 인간화 항-CD39 항체는 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 H1, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 H2, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 H3, 및 수용자 인간 프레임워크 영역에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 프레임워크 영역을 포함하는 성숙한 VH를 갖고; 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 L1, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 L2, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 L3, 및 수용자 인간 프레임워크 영역에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또

는 100% 동일성을 갖는 프레임워크 영역을 포함하는 성숙한 VL을 갖는다. 프레임워크 영역은 Kabat 정의에 따라 결정될 수 있다.

[0119] 일부 구현예에서, 인간화 항-CD39 항체는 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 18의 아미노산 서열을 포함하는 H1, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 19의 아미노산 서열을 포함하는 H2, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 H3, 및 수용자 인간 프레임워크 영역에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 프레임워크 영역을 포함하는 성숙한 VH를 갖고; 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 L1, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 25의 아미노산 서열을 포함하는 L2, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 26의 아미노산 서열을 포함하는 L3, 및 수용자 인간 프레임워크 영역에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 프레임워크 영역을 포함하는 성숙한 VL을 갖는다. 예를 들어, 상기 언급된 인간화 항-CD39 항체는 서열번호: 23 또는 서열번호: 24를 포함하는 L1을 가질 수 있다. 프레임워크 영역은 Kabat 정의에 따라 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, VH 인간 수용자는 M99642 또는 KF698734이고/이거나 VL 인간 수용자는 X12682 또는 Z00023이다.

[0120] 일부 구현예에서, 인간화 항-CD39 항체는 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 28의 아미노산 서열을 포함하는 H1, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 29의 아미노산 서열을 포함하는 H2, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 30의 아미노산 서열을 포함하는 H3, 및 수용자 인간 프레임워크 영역에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 프레임워크 영역을 포함하는 성숙한 VH를 갖고; 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 32의 아미노산 서열을 포함하는 L1, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 L2, 0 내지 2개의 아미노산 치환 또는 결실을 갖는 서열번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 L3, 및 수용자 인간 프레임워크 영역에 대해 적어도 약 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 프레임워크 영역을 포함하는 성숙한 VL을 갖는다. 프레임워크 영역은 Kabat 정의에 따라 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, VH 인간 수용자는 M99651 또는 M77327이고/이거나 VL 인간 수용자는 X12682 또는 M23090이다.

[0121] 전술된 구현예에서, 성숙한 중쇄 가변 영역은 중쇄 불변 영역의 적어도 일부에 연결될 수 있고 성숙한 경쇄 가변 영역은 경쇄 불변 영역의 적어도 일부에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 성숙한 중쇄 가변 영역은 중쇄 불변 영역에 연결되고 성숙한 경쇄 가변 영역은 경쇄 불변 영역에 연결된다. 적합한 불변 영역은 **섹션 II(F)**에 추가로 상세하게 기재되어 있다. 특정 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 야생형 인간 IgG1과 실질적으로 유사한 효과기 기능을 갖는다. 다른 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 야생형 인간 IgG1과 비교하여 효과기 기능이 감소되거나 향상된다. 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 1을 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6을 포함하거나 이로 이루어진다. 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 1의 아미노산 1 내지 329를 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6을 포함하거나 이로 이루어진다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 4를 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 4의 아미노산 1 내지 326을 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 2를 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 2의 아미노산 1 내지 329를 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 5를 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 5의 아미노산 1 내지 326을 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 3을 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 3의 아미노산 1 내지 329를 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다.

[0122] **E. 인간 항체**

[0123] 본원에 기재된 바와 같이, 본 개시내용은 또한 본원에서 19, ch19_IGG4.P, 31, ch31_IGG4.P, hu31.1_IGG4.P,

hu31.2_IGG4.P, hu31.3_IGG4.P, hu31.4_IGG4.P, hu31.4_IGG1.AA, hu31.5_IGG4.P, hu31.6_IGG4.P, hu31.7_IGG4.P, 39, ch39_IGG4.P, ch39_mIGG2A.AAG, hu39.1_IGG4.P, hu39.2_IGG4.P, hu39.3_IGG4.P, hu39.4_IGG4.P, hu39.5_IGG4.P, hu39.5_IGG1.AA, hu39.6_IGG4.P, hu39.7_IGG4.P, 또는 hu39.8_IGG4.P로 지정된 항체의 결합 특이성을 갖는 인간 항체를 제공하며, 임의적으로 여기서 인간 항체는 실시예 5에서와 같이 측정된 약 5 nM 이하, 약 0.05 nM 내지 약 5 nM, 약 1 nM 이하, 약 0.05 nM 내지 약 1 nM, 약 0.5 nM 이하, 또는 약 0.05 nM 내지 약 0.5 nM의 IC₅₀ 값으로 인간 CD39 효소적 활성을 억제한다. 인간 항체는 경쟁적 결합 실험에 의해, Winter, WO 92/20791의 파지 디스플레이 방법에 의해 선택될 수 있거나, 그렇지 않으면 본원에서 19, 31, 또는 39로 지정된 항체와 같은 특정 설치류 항체와 동일한 에피토프 특이성을 갖거나, 본원에서 ch19_IGG4.P, ch31_IGG4.P, hu31.1_IGG4.P, hu31.2_IGG4.P, hu31.3_IGG4.P, hu31.4_IGG4.P, hu31.4_IGG1.AA, hu31.5_IGG4.P, hu31.6_IGG4.P, hu31.7_IGG4.P, ch39_IGG4.P, ch39_mIGG2A.AAG, hu39.1_IGG4.P, hu39.2_IGG4.P, hu39.3_IGG4.P, hu39.4_IGG4.P, hu39.5_IGG4.P, hu39.5_IGG1.AA, hu39.6_IGG4.P, hu39.7_IGG4.P, 또는 hu39.8_IGG4.P로 지정된 항체와 같은 특정 인간화 항체와 동일한 에피토프 특이성을 갖도록 선택될 수 있다. 인간 항체는 또한 CD39의 단편만을 표적 항원으로 사용하고/하거나, CD39의 결실 돌연변이체 집합에 대한 항체를 스크리닝함으로써 특정 에피토프 특이성에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0124] 인간 항체를 생산하는 방법은 Oestberg 등, *Hybridoma* 2:361-367(1983); Oestberg, 미국 특허 번호 4,634,664; 및 Engleman 등, 미국 특허 4,634,666의 트리오마 방법, 인간 면역글로불린 유전자를 포함하는 형질전환 마우스의 사용(예를 들어, Lonberg 등, WO93/12227(1993); US 5,877,397, US 5,874,299, US 5,814,318, US 5,789,650, US 5,770,429, US 5,661,016, US 5,633,425, US 5,625,126, US 5,569,825, US 5,545,806, *Nature* 148, 1547-1553(1994), *Nature Biotechnology* 14, 826(1996), Kucherlapati, WO 91/10741(1991) 참조 및 파지 디스플레이 방법(예를 들어, Dower 등, WO 91/17271 및 McCafferty 등, WO 92/01047, US 5,877,218, US 5,871,907, US 5,858,657, US 5,837,242, US 5,733,743 및 US 5,565,332 참조)을 포함한다.

[0125] 본 개시내용의 인간 항체는 중쇄 불변 영역의 적어도 일부에 연결된 성숙한 중쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역의 적어도 일부에 연결된 성숙한 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 성숙한 중쇄 가변 영역은 중쇄 불변 영역에 연결되고 성숙한 경쇄 가변 영역은 경쇄 불변 영역에 연결된다. 적합한 불변 영역은 **섹션 II(F)**에 추가로 상세하게 기재되어 있다. 특정 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 야생형 인간 IgG1과 실질적으로 유사한 효과기 기능을 갖는다. 다른 구현예에서, 중쇄 불변 영역은 야생형 인간 IgG1과 비교하여 효과기 기능이 감소되거나 향상된다. 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 1을 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6을 포함하거나 이로 이루어진다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 4를 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 2를 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 5를 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다. 또 다른 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 서열번호: 3을 포함하거나 이로 이루어지고 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6으로 이루어진 것을 포함한다.

[0126] F. 불변 영역(들)의 선택

[0127] 키메라, 인간화(베니어드 포함), 또는 인간 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 각각 인간 불변 영역의 적어도 일부에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 섹션에 기재된 중쇄 가변 도메인은 인간 중쇄 불변 영역의 일부에 연결되고 상기 섹션에 기재된 경쇄 가변 도메인은 인간 경쇄 불변 영역의 일부에 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 섹션에 기재된 중쇄 가변 도메인은 인간 중쇄 불변 영역의 일부에 연결되고 상기 섹션에 기재된 경쇄 가변 도메인은 전장 인간 경쇄 불변 영역에 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 섹션에 기재된 중쇄 가변 도메인은 전장 인간 중쇄 불변 영역에 연결되고 상기 섹션에 기재된 경쇄 가변 도메인은 전장 인간 경쇄 불변 영역에 연결된다.

[0128] 불변 영역(또는 이의 절두)의 선택은 부분적으로 효과기 기능이 바람직한지, 또는 심지어 향상될 필요가 있는지에 따라 달라진다. "효과기 기능"은 항체의 경쇄 또는 중쇄 불변 영역에 기인할 수 있는 생물학적 활성을 지칭하고 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 효과기 기능의 비제한적인 예는 C1 복합체에 대한 C1q 결합 및 보체의존적 세포독성(CDC); Fc 수용체 결합; 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체(예를 들어 B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다. 인간 항체는 그들의 중쇄에 따라 5가지 이소형(IgM, IgD, IgG, IgA, 및 IgE)으로 분류되며, 각각은 상이한 기능을 제공한다. IgG는 4가지 인간 하위부류(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4)로 이루어지며 각각은 상이한 중쇄를 함유한다. 이들은 매우 상동성이며 주로 힌

지 영역 및 숙주 면역계를 활성화하는 정도가 상이하다. 예를 들어, 인간 동위원소 IgG1 및 IgG3은 보체 매개 세포독성을 매개할 수 있고 인간 이소형 IgG2 및 IgG4는 그렇지 않거나 매우 낮은 수준에서 매개한다. 경쇄 불변 영역은 하위부류 람다 또는 카파일 수 있다.

- [0129] 인간 불변 영역 또는 이의 일부를 포함하는 본 개시내용의 항체는 전형적으로 IgG 항체, 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4 항체이다. 인간 불변 영역은 상이한 개체 사이에서 동종이인자형 변이 및 이소동종이인자형 변이를 보여주며, 즉, 불변 영역은 하나 이상의 다형성 위치에서의 상이한 개체에서 상이할 수 있다. 이소동종이인자형은 이소동종이인자형을 인식하는 혈청이 하나 이상의 다른 이소형의 비다형성 영역에 결합한다는 점에서 동종이인자형과 상이하다. 인간 불변 영역에 대한 언급은 임의의 천연 동종이인자형 또는 천연 동종이인자형에서 다형성 위치를 차지하는 잔기의 임의의 순열을 갖는 불변 영역을 포함한다.
- [0130] 중쇄의 C-말단 리신과 같이 경쇄 및/또는 중쇄의 아미노 또는 카르복시 말단에 있는 하나 또는 여러 아미노산은 분자의 일부 또는 전부에서 누락되거나 유도체화될 수 있다. 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 글루타민은 피로글루타메이트의 형성을 방지하기 위해 글루타메이트 잔기로 치환될 수 있다.
- [0131] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 IgG4 항체이다. 인간 IgG4의 경우, Fab-아암(arm) 교환을 방지하기 위해 중쇄 상에 S228P(Eu 번호지정) 조작된 돌연변이를 포함하는 것이 사용될 수 있다. 인간 IgG4에 적합한 서열은 서열번호: 4 및 서열번호: 5를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, IgG4 항체의 C-말단 리신은 부재한다.
- [0132] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항체는 IgG1 또는 IgG3 항체이다. 인간 IgG1 또는 IgG3에 적합한 서열은 당업계에 알려져 있고 서열번호: 1, 서열번호: 2, 서열번호: 3, 및 US 5,624,821에 개시된 인간 IgG3을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, IgG1 항체 또는 IgG3 항체의 C-말단 리신은 부재한다.
- [0133] 특정 구현예에서, 치환은 인간에서 반감기를 연장하기 위해 불변 영역에서 이루어질 수 있다(예를 들어, Hinton 등, *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004 참조). 예시적인 치환은 항체의 반감기를 증가시키기 위해 위치 250에 Gln 및/또는 위치 428에 Leu(Eu 번호지정)를 포함한다.
- [0134] 대안적으로 또는 추가로, 치환은 보체 매개 세포독성(CDC) 또는 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC)과 같은 효과기 기능을 감소시키거나 증가시키기 위해 불변 영역에서 이루어질 수 있다(예를 들어, Winter 등, 미국 특허 번호 5,624,821; Tso 등, 미국 특허 번호 5,834,597; 및 Lazar 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:4005, 2006 참조).
- [0135] 본 개시내용의 일부 항체는 불변 영역 돌연변이(들)를 도입함으로써 돌연변이(들)가 없는 동일한 항체와 비교하여 CDC, ADCC, 및 항체 의존적 세포 식세포작용(ADCP)과 같은 감소된 Fc 효과기 기능을 갖도록 조작된다. 일부 구현예에서, 이러한 효과기 기능 각각 또는 전부는 돌연변이가 없는 항체와 비교하여 적어도 50%, 75%, 90% 또는 95% 감소된다. 효과기 기능은 실시예에 기재된 바와 같이 검정될 수 있다. 다른 검정이 Shields 등, 2001 *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, p 6591-6604; Chappel 등, 1993 *J. Biol. Chem.*, Vol 268, p 25124-25131; Lazar 등, 2006 *PNAS*, 103; 4005-4010에 의해 기재되어 있다.
- [0136] 위치 234, 235, 236 및/또는 237 중 임의의 것 또는 전부의 치환은 Fc γ 수용체, 특히 Fc γ RI 수용체에 대한 친화도를 감소시킨다(예를 들어, US 6,624,821 참조). 일부 구현예에서, 알려진 잔기는 효과기 기능을 감소시키기 위해 L234A/L235A 이중 돌연변이와 같은 치환에 사용된다. 효과기 기능이 감소된 돌연변이의 다른 조합은 L234A/L235A/G237A, E233P/L234V/L235A/ Δ G236, A327G/A330S/P331S, K322A, L234A/L235A, L234F/L235E/P331S 및 L234A/L235E/G237A/A330S/P331S(Eu 번호지정)를 포함한다. 임의적으로, 인간 IgG2에서 위치 234, 236 및/또는 237은 알라닌으로 치환되고 위치 235는 글루타민으로 치환된다. (예를 들어, US 5,624,821 참조.) Eu 지수 위치 330 및 331에서 보체 C1q 결합 부위에서 2개 아미노산 치환은 보체 고정을 감소시킨다(Tao 등, *J. Exp. Med.* 178:661(1993) 및 Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483(1991) 참조). 위치 233-236에서 IgG2 잔기 및 위치 327, 330 및 331에서 IgG4 잔기를 인간 IgG1로 치환하면 ADCC 및 CDC를 감소시킨다(예를 들어, Armour KL. 등, 1999 *Eur J Immunol.* 29(8):2613-24; 및 Shields RL. 등, 2001. *J Biol Chem.* 276(9):6591-604 참조). N297A, N297Q, 또는 N297G(Eu 번호지정) 돌연변이는 글리코실화를 감소시켜 효과기 기능을 감소시킨다.
- [0137] 본 개시내용의 일부 항체는 불변 영역 돌연변이(들)를 도입함으로써 향상된 Fc 효과기 기능을 갖도록 조작된다. 예를 들어, Fc γ R 결합은 아미노산 조작에 의해 향상될 수 있다. 일부 구현예에서, 이는 Fc 영역에서 하나 이상의 아미노산의 치환에 의해 수행될 수 있다. 바람직한 돌연변이는 예를 들어, 알라닌 스캐닝 또는 합리적 설계

및 라이브러리 스크리닝에 의해 결정될 수 있다. Fc γ R에 대한 결합이 향상되고 효과기 기능이 향상된 IgG 변이체는 이러한 기술을 사용하여 식별될 수 있다. 대안적으로, Fc 수용체 영역에 대한 여러 돌연변이는 예를 들어, Smith P. 등 (2012) PNAS 6181-6186에 기재된 바와 같이 당업계에서 알려져 있다.

[0138] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 변형이 없는 야생형 IgG1과 비교하여 ADCC를 매개하는 항체의 능력이 증가된 변형된 IgG1 불변 도메인을 포함한다. 변형된 IgG1 도메인은 L235V, S239D, F243L, R292P, A330L, I332E, P396L(Eu 번호지정) 중 하나 이상에서의 아미노산 치환을 특징으로 할 수 있다. 다른 구현예에서, 변형된 IgG1 도메인은 S239D, A330L, 및 I332E(Eu 번호지정)에서의 치환을 특징으로 한다.

[0139] 대안적으로, Fc-매개된 치료 항체 기능을 향상시키기 위해 당형(glycoform) 교란이 사용될 수 있다. IgG1 항체 상에서 N-연결된 Fc 글리코실화는 효과기 기능에 중요하다. 시알릴화, 갈락토실화, 이등분 당, 및 푸코실화는 모두 IgG 분자의 결합 및 활성에 영향을 미칠 수 있다. 치료 항체의 글리코실화 패턴을 제어하는 것은 다수의 상이한 방식으로 수행될 수 있다. 재조합 항체를 생산하는 세포의 유형 및 그의 배양 조건은 치료 항체의 글리코실화 및 활성에 영향을 미칠 수 있다. 뿐만 아니라, 생물반응기 조건 및 하류 처리가 또한 글리칸 미세이질성에 영향을 미칠 수 있다. 저푸코실화 또는 무푸코실화 항체는 Fc-매개 특성을 향상시키는 것으로 나타났다. 글리코조작에 의해 푸코스 수준의 이러한 감소를 달성하기 위한 다양한 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 한 가지 방식은 항체의 번역후 변형에 수반되는 효소를 조작하는 것이다. 이는 β -1-4-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III과 같은 글루코시다제의 과발현, 푸코실트랜스퍼라제 녹아웃(knocking out), 또는 자연적으로 푸코스 결핍되거나 낮은 푸코실화 수준을 발현하도록 돌연변이된 세포주 사용을 수반할 수 있다. 게다가, IgG 분자를 보유하는 낮은 푸코스를 수득하기 위해 카스타노스페르민과 같은 N-연결된 글루코시다제의 억제제가 또한 사용될 수 있다.

[0140] 일부 구현예에서 아미노산 조작된 변이체는 다중 Fc γ R에 대한 보다 광범위하게 향상된 친화도를 가질 수 있지만, 당형 조작된 항체는 일반적으로 향상된 Fc γ RIIIa 결합에 대한 보다 특이적인 친화도를 가질 수 있다. 당형은 Fc 부분의 근위 아미노산과 상호작용하고 Ig 올리고당류와 접촉하는 아미노산의 대체는 상이한 당형 구조를 초래할 수 있다.

[0141] G. 재조합 항체의 발현

[0142] 키메라, 인간화(베니어드 포함) 및 인간 항체는 전형적으로 재조합 발현에 의해 생산된다. 따라서, 본 개시내용은 또한 섹션 IIA-F의 항-CD39 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0143] 본 개시내용의 항-CD39 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 증폭, 발현, 또는 추가 최적화를 위해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 많은 벡터가 이용가능하다. 일부 구현예에서, 벡터 시스템은 포유동물, 박테리아, 효모 시스템 등을 포함하고, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pCMV, pEGFP, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS420, pLexA, pACT2.2 등과 같으나 이에 제한되지 않는 플라스미드, 및 다른 실험실 및 상업적으로 입수가능한 벡터를 포함한다. 적합한 벡터는 플라스미드, 또는 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결합 레트로바이러스, 아테노바이러스 및 아테노 관련 바이러스)를 포함할 수 있다. 벡터 구성요소는 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하나 이에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터(예를 들어 SV40, CMV, EF-1 α), 및 전사 종결 서열. 발현을 위해, 재조합 폴리뉴클레오티드 작제물은 전형적으로 자연 관련 또는 이중 프로모터 영역을 포함하는 항체쇄의 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 발현 제어 서열은 진핵생물 숙주 세포를 형질전환하거나 형질감염시킬 수 있는 벡터 내의 진핵생물 프로모터 시스템이다. 일단 벡터가 적절한 숙주 내로 혼입되면, 숙주는 뉴클레오티드 서열의 높은 수준 발현, 및 재조합 항체의 수집 및 정제에 적합한 조건 하에 유지된다.

[0144] 본 개시내용의 항-CD39 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터는 클로닝 및 유전자 발현을 위해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 본원의 벡터에서 폴리뉴클레오티드 서열을 클로닝하거나 발현하는 데 적합한 숙주 세포는 원핵생물 및 진핵생물 세포를 포함한다. 적합한 원핵생물의 비제한적인 예는 진정세균(eubacteria), 예컨대 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어, 장내세균(Enterobacteriaceae) 예컨대 에스케리키아(*Escherichia*), 예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 및 쉬겔라(*Shigella*), 뿐만 아니라 바실리(Bacilli) 예컨대 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및

비. 리체니포르미스(*B. licheniformis*), 슈도모나스(*Pseudomonas*) 예컨대 피. 애투기노사(*P. aeruginosa*), 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 원핵생물 외에도, 사상성 진균(filamentous fungi) 또는 효모와 같은 진핵생물 미생물은 항-CD39 항체-암호화 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 비제한적인 예는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스키토사마로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 숙주 예컨대, 예를 들어, 케이. 락티스(*K. lactis*), 케이. 프라길리스(*K. fragilis*)(ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178), 케이. 왈티이(*K. waltii*)(ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸(*K. drosophilorum*)(ATCC 36,906), 케이. 써모톨레란스(*K. thermotolerans*), 및 케이. 마르시아누스(*K. marxianus*); 야로위아(*Yarrowia*)(EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)(EP 183,070); 칸디다(*Candida*); 트리모더마 리시아(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234); 뉴로스포라 크라싸(*Neurospora crassa*); 슈반니오마이세스(*Schwanniomyces*) 예컨대 슈반니오마이세스 오시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*); 및 사상성 진균 예컨대, 예를 들어, 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*), 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 숙주 예컨대 에이. 니둘란스(*A. nidulans*) 및 에이. 니게르(*A. niger*)를 포함한다. 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 유기체로부터 유래될 수 있다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 스포도테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)(애벌레), 아에데스 애집티(*Aedes aegypti*)(모기), 아에데스 알보피투스(모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)(초파리), 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 다수의 배클로바이러스 균주와 변이체 및 숙주로부터의 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 식별되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들어, 아우토그라파 칼리포니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하고, 이러한 바이러스는 특히 스포도테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따라 본원에서 바이러스로 사용될 수 있다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아(*petunia*), 토마토, 및 담배의 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 활용될 수 있다. 일부 구현예에서, 포유동물 세포는 면역글로불린 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오티드 세그먼트를 발현하기 위한 숙주 세포로서 사용된다. Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987) 참조. 온전한 이중단백질을 분비할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주가 당업계에서 개발되었고, CHO 세포주, 다양한 COS 세포주, HeLa 세포, HEK293 세포, L 세포, 및 Sp2/0 및 NS0를 포함하는 비항체 생산 골수종을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 비인간이다. 이들 세포에 대한 발현 벡터는 발현 제어 서열, 예컨대 복제 기원, 프로모터, 인핸서(Queen 등, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), 및 필요한 처리 정보 부위, 예컨대 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위, 및 전사 종결자 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 발현 제어 서열은 내인성 유전자, 사이토메갈로바이러스, SV40, 아데노바이러스, 소 유두종바이러스 등으로부터 유래된 프로모터이다. Co 등, *J. Immunol.* 148:1149 (1992) 참조.

[0145] 숙주 세포는 항-CD39 항체 생산을 위한 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고 프로모터 유도, 형질전환체 선택, 또는 원하는 서열을 암호화하는 유전자 증폭에 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다. 일단 발현되면, 항체는 HPLC 정제, 컬럼 크로마토그래피, 겔 전기영동 등을 포함하는 당업계의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다(일반적으로, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982) 참조).

[0146] H. 표지된 항체

[0147] 개시된 항-CD39 항체는 임의적으로 형광 분자, 스핀 표지 분자, 효소, 또는 방사성 동위원소를 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 검출가능한 신호로 표지될 수 있다. 이러한 항체는 임의의 수의 시험관내, 생체내, 또는 생체의 검정에서 인간 CD39의 검출 또는 단리에 사용될 수 있다.

[0148] 예를 들어, 개시된 항-CD39 항체 중 임의의 하나가 형광 분자, 스핀 표지된 분자, 효소, 또는 방사성 동위원소와 같은 검출가능한 신호로 표지되는 경우, 이러한 검출가능한 항체는 약역학적 검정, 면역조직화학, 수용체 점유 검정, ELISA(효소 결합 면역흡착 검정), EIA(효소 면역검정), RIA(방사면역검정) 등에 사용될 수 있다.

[0149] III. 사용 방법

[0150] 본 개시내용은 CD39 효소적 활성의 억제제를 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 항-CD39 항체의 사용 방법을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "억제하다", "억제" 등은 특정 표적, 예를 들어, CD39의 기능 또는 활성을 감소시키는 길항제의 능력을 지칭한다. 감소는 바람직하게는 적어도 50%이고 예를 들어, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%일 수 있다. 본 개시내용은 또한 CD39 효소적 활성의 억제제로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 장애, 및/또는 병태의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 항-CD39 항체의 용도를 포

관한다. 하나의 예로서, 본 개시내용은 (i) 높은 세포의 ATP(비질환 조직과 비교하여), (ii) 질환 조직에서 *ENTPD1*, *P2RX7*, *P2RY11*, 또는 이의 조합의 발현 또는 증가된 발현, (iii) 질환 조직에서 CD39, P2X7, P2Y11, 또는 이의 조합의 발현 또는 증가된 발현, (iv) 질환 조직으로의 골수성 침윤, 또는 (i) 내지 (iv)의 임의의 조합을 특징으로 하는 질환의 치료를 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 항-CD39 항체의 용도를 포괄한다. 또 다른 예에서, 본 개시내용은 암의 치료를 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 항-CD39 항체의 용도를 포괄한다. 임의적으로, 암은 (i) 높은 세포의 ATP(비질환 세포와 비교하여), (ii) 질환 조직에서 *ENTPD1*, *P2RX7*, *P2RY11*, 또는 이의 조합의 발현 또는 증가된 발현, (iii) 질환 조직에서 CD39, P2X7, P2Y11, 또는 이의 조합의 발현 또는 증가된 발현, (iv) 질환 조직으로의 골수성 침윤, 또는 (i) 내지 (iv)의 임의의 조합을 특징으로 할 수 있다. 전술된 방법의 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 적어도 하나의 추가적인 요법과 조합하여 사용되며, 이의 예는 본원의 다른 곳에 제시되어 있다.

[0151]

세포의 ATP는 건강한 상태 하에 무시할 수 있는 농도(예를 들어, 약 10-100 nM)로 존재하지만 조직 손상, 스트레스, 저산소증(hypoxia), 및 암의 치료에 사용되는 제제에 반응하여 빠르게 증가하고 종양에서 고농도로 발견될 수 있다. 암 세포 및 종양 미세환경의 다른 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 죽어가고 있거나 스트레스 받은 세포에 의해 방출된 ATP는 효과적인 선천성 및 적응성 면역 반응에 중요한 염증 신호를 제공한다. 반대로, 예를 들어 종양 미세환경에서 세포의 ATP가 아데노신으로 가수분해되면, 면역 반응을 제한한다. CD39는 세포의 ATP의 가수분해 시 속도 제한 외부 효소이다. 세포의 ATP를 AMP로 전환하는 것을 이화함으로써, CD39는 또한 세포의 AMP 가수분해 시 속도 제한 외부 효소인 CD73(엑토-5'-뉴클레오타다제)을 통해 세포의 아데노신 생산을 증가시킨다. 아데노신은 1형 퓨린성 수용체를 통해 신호를 보내고 ATP 수용체에 의해 매개되는 것과 반대 효과를 갖는다. 특히, 면역 세포의 표면 상에서 발현되는 A_{2a} 및 A_{2b} 수용체는 아데노신의 면역억제 효과를 매개하는데 도움이 된다. 예를 들어, 종양 미세환경에서, 아데노신은 종양 침윤 면역 세포 상에서 A_{2a} 및 A_{2b} 수용체와의 직접 상호작용을 통해 면역억제 효과를 도출한다. 아데노신 및 ATP의 반대 역할은 Chiarella 등, "Extracellular ATP and Adenosine in Cancer Pathogenesis and Treatment," *Trends in Cancer*, 2021, 7(8): 731-750에서 검토되고 있다. 본원에서 입증된 바와 같이, 본 개시내용의 항-CD39 항체의 사용은 CD39 효소적 활성을 강력하게 억제하여, ATP 구축으로부터 면역자극을 초래하고 면역억제 아데노신 형성을 방지한다. CD39 효소적 활성의 억제로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 장애, 및/또는 병태는 예를 들어 추가적인 요법을 사용한 조직 손상, 스트레스, 저산소증 치료, 또는 이의 임의의 조합으로 인해 세포의 ATP의 방출이 높을 수 있는 것들을 포함할 수 있다. CD39 효소적 활성의 억제로부터 이익을 얻을 수 있는 추가적인 질환, 장애 및/또는 병태는 예를 들어 건강한 대조군과 비교하여 ATP의 증가된 가수분해로 인해 및/또는 예를 들어 말초 혈액 샘플 또는 조직(예를 들어, 종양) 샘플에서 증가된 CD39 효소적 활성에 의해 측정된 바와 같이 건강한 대조군과 비교하여 AMP의 아데노신으로의 증가된 가수분해로 인해 질환 조직 샘플에서 세포의 아데노신 수준이 높은 것, 및/또는 예를 들어 면역조직화학, 면역표현형 검사, RNA 서열분석, 또는 말초 혈액 샘플 또는 조직(예를 들어, 종양) 샘플에서 다른 임상적으로 검증된 방법에 의해 측정된 바와 같이 CD39 및/또는 CD73 발현이 건강한 대조군과 비교하여 검출가능하고, 임의적으로 높은 것들을 포함할 수 있다.

[0152]

따라서, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 CD39 효소적 활성을 억제하는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. CD39 효소적 활성은 대상체로부터 수득된 말초 혈액 샘플 또는 조직(예를 들어, 종양) 샘플, 또는 둘 다를 사용하여 평가될 수 있다. 비제한적인 예로서, 상업적 검정 예컨대 Kinase-Glo® 또는 AMP-Glo®를 사용하여 말초 혈액 샘플 또는 종양 샘플의 세포 및 비세포 구획에서 CD39 활성을 측정할 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 종양 조직 내 CD39 효소적 활성은 효소 조직화학에 의해 측정될 수 있다. 억제는 예를 들어, 대상체로부터 수득된 이전 샘플(즉, 항-CD39 항체의 투여 전)과 비교하거나 대조군(예를 들어, 이소형 대조군 항체, CD39 효소적 활성을 억제하지 않지만 결합하는 항-CD39 항체, 표준 진료(standard of care), 위약 등을 투여한 대상체)에 대한 참조 샘플 또는 참조 값과 비교함으로써 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 종양 미세환경에서 CD39 효소적 활성을 억제하는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 종양 주변에서 CD39 효소적 활성을 억제하는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 면역 세포 내 또는 상에서 CD39 효소적 활성을 억제하는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 골수 계통의 세포 내 또는 상에서 CD39 효소적 활성을 억제하는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. CD39를 발현하는 골수 계통 세포는 실시예에 상세하게 기재된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 간질 및/또는 혈관계 내 또는 상에서 CD39 효소적 활성을 억제하는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게

투여된다.

[0153] 대안적으로 또는 추가로, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 적합한 대조군(예를 들어, 이소형 대조군 항체가 투여된 대상체, CD39 효소적 활성을 억제하지 않지만 결합하는 항-CD39 항체가 투여된 대상체, 표준 진료를 받는 대상체, 치료를 받지 않는 대상체)와 비교하여 ATP 매개 면역자극을 증가시키는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. ATP 매개 면역자극은 대상체로부터 수득된 말초 혈액 샘플 및/또는 조직(예를 들어, 종양) 샘플을 사용하여 평가될 수 있다. ATP 매개 면역자극은 예를 들어, (i) P2Y G-단백질 결합된 수용체 또는 P2X 양이온 선택적 채널 수용체와 같은 하나 이상의 2형 퓨린성(P2) 수용체를 통한 ATP 의존적 신호전달의 증가 측정; (ii) NLRP3 염증조절복합체 활성화의 증가 측정; (iii) 수지상 세포의 세포 표면 마커의 증가 측정; (iv) CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포 활성 및/또는 증식의 증가 측정, 및/또는 (v) 골수성 계통의 하나 이상의 세포 유형에서 활성화, 성숙, 사이토카인 분비, 또는 이의 임의의 조합의 증가 측정에 의해 식별될 수 있다. 하나의 예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 적합한 대조군(예를 들어, 이소형 대조군 항체가 투여된 대상체, CD39 효소적 활성을 억제하지 않지만 결합하는 항-CD39 항체가 투여된 대상체, 표준 진료를 받는 대상체, 치료를 받지 않는 대상체)와 비교하여 P2X4, P2X5, P2X7, P2Y2 또는 P2Y11로부터 선택된 하나 이상의 P2X 수용체 또는 P2Y 수용체를 통해 ATP 의존적 신호전달을 증가시키는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 하나의 예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 적합한 대조군(예를 들어, 이소형 대조군 항체가 투여된 대상체, CD39 효소적 활성을 억제하지 않지만 결합하는 항-CD39 항체가 투여된 대상체, 표준 진료를 받는 대상체, 치료를 받지 않는 대상체)와 비교하여 P2X7을 통해 ATP 의존적 신호전달을 증가시키는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 하나의 예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 적합한 대조군(예를 들어, 이소형 대조군 항체가 투여된 대상체, CD39 효소적 활성을 억제하지 않지만 결합하는 항-CD39 항체가 투여된 대상체, 표준 진료를 받는 대상체, 치료를 받지 않는 대상체)와 비교하여 P2Y11을 통해 ATP 의존적 신호전달을 증가시키는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 하나의 예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 NLRP3 염증조절복합체 활성화를 증가시키는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. NLRP3 염증조절복합체 활성화의 측정은 당업계에 알려져 있고 실시예에 상세하게 기재된 것들(예를 들어, IL-1 β 및 IL-18 분비)을 포함한다. 하나의 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 골수 세포 활성화, 성숙, 사이토카인 분비, 또는 이의 임의의 조합을 증가시키는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 골수 세포 활성화, 성숙, 사이토카인 분비의 측정은 당업계에 알려져 있고 실시예에 상세하게 기재된 것들을 포함한다.

[0154] 대안적으로, 또는 상기에 추가로, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 적합한 대조군(예를 들어, 이소형 대조군 항체가 투여된 대상체, CD39 효소적 활성을 억제하지 않지만 결합하는 항-CD39 항체가 투여된 대상체, 표준 진료를 받는 대상체, 치료를 받지 않는 대상체)와 비교하여 아데노신 매개 면역억제를 감소시키거나 방지하는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 아데노신 매개 면역억제는 예를 들어, A_{2a}R 및/또는 A_{2b}R을 통한 아데노신 신호전달 증가를 측정함으로써 식별될 수 있다. 아데노신 매개 면역억제는 또한 림프성(예를 들어, T 세포, B 세포) 및/또는 골수성(예를 들어, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, NK 세포) 세포 활성의 아데노신 매개 억제를 포함한다. 예를 들면, 아데노신 매개 면역억제의 하나의 척도는 인간 혈액의 CD8+ T 세포에서 NECA 유도된 pCREB 활성화일 수 있다.

[0155] 대안적으로, 또는 상기에 추가로, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 수용체 점유 검정에 의해 측정된 바와 같이 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 표적(즉, CD39) 진입(engagement)을 달성하는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 수용체 점유 검정에 의해 측정된 바와 같이 적어도 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99 표적(즉, CD39) 진입을 달성하는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 예시적인 수용체 점유 검정은 실시예에 상세하게 기재되어 있다.

[0156] 대안적으로, 또는 상기에 추가로, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 CD39 발현을 감소시키는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 세포 표면 CD39 발현을 감소시키는 데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. CD39 발현(세포내 및

/또는 세포외)은 실시예에 추가로 상세하게 기재된 방법을 포함하여, 예를 들어, 면역조직화학 또는 면역표현형 검사에 의해 평가될 수 있다.

[0157] 대안적으로, 또는 상기에 추가로, 일부 구현예에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 암을 치료하거나 예방하는데 효과적인 양으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 이론에 얽매이기를 바라지 않고, 출원인은 ATP 매개 면역자극 증가 및/또는 아데노신 매개 면역억제 감소(또는 방지)가 종양 사멸을 초래할 수 있고 개선된 결과를 초래할 수 있다고 믿는다.

[0158] A. 종양학 및 종양학 관련 장애

[0159] 하나 이상의 구현예에서, 본원에 기재된 항체는 암(예를 들어, 암종, 육종, 백혈병, 림프종, 골수종 등)의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 특정 구현예에서, 암은 국소적으로 진행되고/되거나 절제불가능하거나, 전이성이거나, 전이될 위험이 있을 수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, 암은 재발성이거나 표준 진료 또는 체크포인트 억제제와 같은 치료에 더 이상 반응하지 않을 수 있다. 본 개시내용에 의해 고려되는 예시적인 암 유형은 비노생식관(예를 들어, 방광, 신장, 신세포, 음경, 전립선, 고환, 본히펠린다우병(Von Hippel-Lindau disease) 등), 자궁, 자궁경관, 난소, 유방, 위장관(예를 들어, 식도, 구인두, 위장, 소장 또는 대장, 결장, 또는 직장), 뼈, 골수, 피부(예를 들어, 흑색종), 두경부, 간, 담낭, 담관, 심장, 폐, 췌장, 침샘, 부신, 갑상선, 뇌(예를 들어, 신경교종), 신경절, 중추신경계(CNS), 말초신경계(PNS), 조혈계(즉, 혈액학적 악성종양), 및 면역계(예를 들어, 비장 또는 흉선)의 암을 포함한다.

[0160] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 혈액학적 악성종양의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 조혈계에 영향을 미치는 예시적인 암 유형은 급성 골수성 백혈병, 성인 T 세포 백혈병, T 세포 거대 과립 림프구 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 단핵구성 백혈병, 호지킨(Hodgkin) 및 비호지킨(Non-Hodgkin) 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 및 다발성 골수종을 포함한 백혈병, 림프종 및 골수종을 포함한다.

[0161] 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 고형 종양의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 고형 종양은 예를 들어, 난소암, 자궁내막암, 유방암, 폐암(소세포 또는 비소세포), 대장암, 전립선암, 자궁경부암, 담도암, 췌장암, 위암, 식도암, 간암(간세포 암종), 신장암(신세포 암종), 두경부 종양, 중피종, 흑색종, 육종, 중추신경계(CNS) 혈관모세포종(hemangioblastomas), 및 뇌종양(예를 들어, 신경교종, 예컨대 성상세포종(astrocytoma), 희소돌기아교세포종(oligodendroglioma) 및 교모세포종(glioblastoma))일 수 있다.

[0162] 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 폐암, 비노생식기암, 위장관암, 또는 이의 조합의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 폐암, 비노생식기암, 위장관암, 피부암, 또는 이의 조합의 치료 및/또는 예방에 유용하다.

[0163] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 피부암의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 추가 구현예에서, 피부암은 흑색종이다.

[0164] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 유방암의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 추가 구현예에서, 유방암은 호르몬 수용체 양성(예를 들어, ER α 양성 유방암, PR 양성 유방암, ER α 양성 및 PR 양성 유방암), HER2 양성 유방암, HER2 과발현 유방암, 또는 이의 임의의 조합이다. 또한 추가 구현예에서, 유방암은 삼중 음성 유방암이다.

[0165] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 신장암의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 추가 구현예에서, 신장암은 신세포 암종이다. 또한 추가 구현예에서, 신세포 암종은 투명 세포 신암종이다.

[0166] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 폐암의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 추가 구현예에서, 폐암은 비소세포 폐암(NSCLC)이다. 또한 추가 구현예에서, NSCLC는 폐 편평 세포 암종 또는 폐 선암종이다.

[0167] 일부 구현예에서, 비소세포 폐암을 치료하는 개시된 방법은 페메트렉시드, 카보플라틴, 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체와 조합하여 임의의 개시된 항-CD39 항체를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 방법은 길항성 항-TIGIT 항체, A2aR 길항제, A2bR 길항제, A2a/2bR 길항제, 및 CD73 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 제제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 임의적으로 여기서 추가적인 제제는 돔바날리맙, AB308, 에트루마테난트, 및 캄리클루스타트로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0168] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 췌장암의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 추가 구현예에서, 췌장

암은 췌장 신경내분비 종양 또는 췌장 선암종이다.

- [0169] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 신경내분비 종양의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 추가 구현예에서, 신경내분비 종양은 췌장 신경내분비 종양, 크롬친화세포종(pheochromocytoma), 부신경절종(paraganglioma), 또는 부신의 종양이다.
- [0170] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 뇌암의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 추가 구현예에서, 뇌암은 신경교종이다. 또한 추가 구현예에서, 신경교종은 성상세포종, 희소돌기아교세포종, 또는 교모세포종이다.
- [0171] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 식도암 또는 위암과 같은 상부 GI 암의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 추가 구현예에서, 상부 GI 암은 선암종, 편평 세포 암종, 또는 이의 임의의 조합이다. 또한 추가 구현예에서, 상부 GI 암은 식도 선암종(EAC), 식도 편평 세포 암종(ESCC), 위식도 접합부 선암종(GEJ), 위 선암종(본원에서 "위암"으로도 언급됨) 또는 이의 임의의 조합이다.
- [0172] 일부 구현예에서, 위암 또는 위식도암을 치료하는 개시된 방법은 FOLFOX 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체와 조합하여 임의의 개시된 항-CD39 항체를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 방법은 길항성 항-TIGIT 항체, A2aR 길항제, A2bR 길항제, A2a/2bR 길항제, 및 CD73 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 제제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 임의적으로 여기서 추가적인 제제는 돔바날리맵, AB308, 에트루마테난트, 및 캄리클루스타트로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0173] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 림프종의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 추가 구현예에서, 혈액학적 악성종양은 급성 골수성 림프종이다.
- [0174] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 유방암, 위장관암, 비뇨생식기암, 폐암, 림프종, 또는 난소암의 치료에 유용하다. 추가 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 급성 골수성 림프종, 대장암, 위암, 식도암, 거세 저항 전립선암, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 또는 삼중 음성 유방암의 치료에 유용하다.
- [0175] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 폐암, 두경부암, 갑상선암, 췌장암, 신장암, 또는 피부암의 치료에 유용하다. 또한 추가 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 비소세포 폐암, 두경부 편평 세포 암종, 췌관 선암종, 투명 세포 신암종, 흑색종의 치료에 유용하다.
- [0176] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 하부 GI 암, 상부 GI 암, 두경부암, 신장암, 폐암, 또는 췌장암의 치료에 유용하다. 추가 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 식도 암종, 두경부 편평 세포 암종, 신장 신 투명 세포 암종, 폐 선암종, 폐 편평 세포 암종, 췌장 선암종, 위(위장) 선암종의 치료에 유용하다.
- [0177] 전술된 구현예에서, 본 개시내용의 방법은 보조요법 설정 또는 신보조요법 설정으로 실행될 수 있다. 본원에 기재된 방법은 1차, 2차, 3차, 또는 더 큰 차수의 치료로 표시될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 방법은 2차 또는 더 큰 차수의 치료로 실행될 수 있으며, 여기서 초기 차수의 치료는 체크포인트 억제제를 포함한다(즉, 대상체는 체크포인트 억제제(CPI)를 경험함). 추가 구현예에서, 체크포인트 억제제는 CTLA-4 길항제, PD-1 길항제, PD-L1 길항제, TIM-3 길항제, 또는 TIGIT 길항제이다.
- [0178] 본 개시내용은 또한 다른 암 관련 질환, 장애 또는 병태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 암 관련 질환, 장애 및 병태라는 용어(들)의 사용은 암 및 비암성 증식성 질환과 직접적으로 또는 간접적으로 관련된 병태를 광범위하게 지칭하는 것을 의미하며, 예를 들어, 혈관형성, 전암성 병태 예컨대 이형성증(dysplasia), 및 비암성 증식성 질환 장애 또는 병태, 예컨대 양성 증식성 유방 질환 및 유두종을 포함한다. 명확성을 위해, 암 관련 질환, 장애 및 병태라는 용어(들)는 암 자체를 포함하지 않는다.
- [0179] 일반적으로, 암, 또는 암 관련 질환, 장애 또는 병태의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 암, 또는 암 관련 질환, 장애 또는 병태를 치료 또는 예방하는 개시된 방법은 **섹션 II**의 항-CD39 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. **섹션 II**의 항-CD39 항체의 투여는 1 회 이상(예를 들어, 1, 2, 또는 3 회 이상)의 투약 주기를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 **섹션 II**의 항-CD39 항체 및 적어도 하나의 추가적인 요법을 사용하여 암, 또는 암 관련 질환, 장애 또는 병태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 이의 예는 본원의 다른 곳에 제시되어 있다.
- [0180] 환자 선택. 일부 경우에, 본 개시내용에 따른 방법은 선택된 환자, 예를 들어 검출가능한 PD-L1, CD73, 및/또는 CD39 발현을 갖거나, 높은 미세부수체 불안정성을 갖거나, 높은 종양 돌연변이 부담을 갖거나, 이의 임의의 조합을 갖는 것으로 식별된 환자에게 제공될 수 있다. 일부 경우에, 환자는 암과 관련된 적어도 하나의 유전자에 돌연변이가 있는 종양유전자 유래 암을 갖는 것으로 식별된다. 일부 경우에, 환자는 환자의 P2X7 변이체를 결정

함으로써 선택된다. 통상적으로 발현되는 P2X7 스플라이스 변이체, 별개의 SNP 및 번역후 수용체 변형은 P2X7의 기능에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 특정 변형은 P2X7 기능의 부분적 또는 완전 손실을 초래하는 것으로 나타났고 다른 변형은 P2X7 기능을 증가시키는 것으로 나타났다. 예를 들면, Lara 등, *Front Pharmacol*, 2020, 11:793 참조.

[0181] 일부 구현예에서, 환자는 말초 혈액 샘플 또는 중양 샘플과 같은 관련 샘플에서 PD-L1(CD274), P2X7(P2RX7), P2Y11(P2RY11), IL-2, CXCL1(CXCL1), MIP-2a(CXCL2), CXCL3(CXCL3), IL-8(CXCL8), COX2(PTGS2), CD73(NT5E) 및/또는 CD39(ENTPD1) 발현을 측정함으로써 선택된다. 발현은 면역조직화학, 면역표현형 검사, RNA 서열분석, 유전자 발현 분석, 단일-분자 이미징 또는 다른 임상적으로 검증된 검정을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계에 알려진 방법을 사용하여 핵산 또는 단백질을 정량화함으로써 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 환자는 면역조직화학, 면역표현형 검사, RNA 서열분석, 유전자 발현 분석, 단일-분자 이미징 또는 다른 임상적으로 검증된 검정을 사용하여 말초 혈액 샘플 또는 중양 샘플과 같은 관련 샘플에서 (핵 또는 단백질 수준으로) PD-L1, CD73, 및/또는 CD39 발현을 측정함으로써 선택된다. 대안적으로 또는 추가로, 환자는 예를 들어 말초 혈액 샘플 또는 중양 샘플에서 CD39 효소적 활성을 측정함으로써 선택될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 항-CD39 항체를 투여함으로써, (i) 예를 들어 면역조직화학, 면역표현형 검사, 또는 다른 임상적으로 검증된 테스트에 의해 검출가능한 PD-L1, P2X7, P2Y11, IL-2, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, COX2, CD73, 및/또는 CD39 발현, (ii) 예를 들어 면역조직화학, 면역표현형 검사, 또는 다른 임상적으로 검증된 테스트에 의해 상승된 PD-L1, P2X7, P2Y11, IL-2, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, COX2, CD73, 및/또는 CD39 발현, (iii) 검출가능한 CD39 효소적 활성, 또는 (iv) (i) 내지 (iii)의 임의의 조합을 갖는 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 치료적으로 유효량의 본원에 기재된 항-CD39 항체를 투여함으로써, (i) 예를 들어 면역조직화학, 면역표현형 검사, 또는 다른 임상적으로 검증된 테스트에 의해 검출가능한 PD-L1, P2X7, P2Y11, IL-2, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, COX2, CD73, 및/또는 CD39 발현, (ii) 예를 들어 면역조직화학, 면역표현형 검사, 또는 다른 임상적으로 검증된 테스트에 의해 상승된 PD-L1, CD73, 및/또는 CD39 발현, (iii) 검출가능한 CD39 효소적 활성, 또는 (iv) (i) 내지 (iii)의 임의의 조합을 갖는 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 암의 치료를 위해 치료적으로 유효량의 본원에 기재된 항-CD39 항체를 개체에게 투여하는 방법을 제공하며 방법은 PD-L1, P2X7, P2Y11, IL-2, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, COX2, CD73, 및/또는 CD39 발현의 결정에 기반하여 측정하는 것을 포함한다. 또한 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 암의 치료를 위해 치료적으로 유효량의 본원에 기재된 항-CD39 항체를 개체에게 투여하는 방법을 제공하며, 방법은 예를 들어 면역조직화학, 면역표현형 검사, 또는 다른 임상적으로 검증된 테스트에 의해 개체로부터 수득된 샘플에서 PD-L1, P2X7, P2Y11, IL-2, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, COX2, CD73, 및/또는 CD39 발현을 측정하고, 치료적으로 유효량의 항체를 검출가능한 PD-L1(CD274), P2X7(P2RX7), P2Y11(P2RY11), IL-2, CXCL1(CXCL1), MIP-2a(CXCL2), CXCL3(CXCL3), IL-8(CXCL8), COX2(PTGS2), CD73(NT5E) 및/또는 CD39(ENTPD1) 발현을 함유하는 샘플을 갖는 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0182] B. 투여 경로

[0183] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체를 함유하는 약제학적 조성물은 경구 투여에 적합한 형태일 수 있다. 경구 투여는 제형을 삼켜 항체가 위장관의 혈류로 흡수되도록 하는 것을 수반할 수 있다. 대안적으로, 경구 투여는 흡입, 설하 또는 설하 투여하여, 항체가 구강 점막을 통해 혈류로 흡수되도록 하는 것을 수반할 수 있다.

[0184] 또 다른 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체를 함유하는 약제학적 조성물은 비경구 투여에 적합한 형태일 수 있다. 비경구 투여 형태는 정맥내, 동맥내, 근육내, 피내, 복강내, 척수강내, 수조내, 뇌내, 뇌실내, 심실내, 및 피하를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 비경구 투여에 적합한 약제학적 조성물은 적합한 수성 또는 비수성 담체를 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로 피하 또는 근육내로 투여되는 데포(depot) 주사가 또한 정의된 기간에 걸쳐 본원에 개시된 항체를 방출하는 데 활용될 수 있다.

[0185] 비강, 질, 안구내, 직장, 국소(예를 들어, 경피), 및 흡입을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 투여 경로가 또한 본 개시내용에 의해 고려된다.

[0186] 본 개시내용의 특정 구현예는 경구 투여 또는 비경구 투여를 고려한다.

[0187] C. 약제학적 조성물

[0188] 본 개시내용의 항-CD39 항체는 대상체에게 투여하기에 적합한 조성물의 형태일 수 있다. 일반적으로, 이러한 조성물은 본 개시내용에 따른 항-CD39 항체 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적

조성물이다. 특정 구현예에서, 항-CD39 항체는 유효량으로 존재할 수 있다. 약제학적 조성물은 본 개시내용의 방법에 사용될 수 있으므로; 예를 들어, 본 개시내용에 따른 항-CD39 항체를 포함하는 약제학적 조성물은 본원에 기재된 치료 및 예방 방법 및 용도를 실행하기 위해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0189] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 의도된 방법 또는 투여 경로와 호환될 수 있도록 제형화될 수 있다. 투여 경로는 당업계에 알려진 것들을 포함할 수 있다. 예시적인 투여 경로는 경구 및 비경구이다. 뿐만 아니라, 약제학적 조성물은 본 개시내용에 의해 고려된 바와 같은 질환, 장애 및 병태를 치료하거나 예방하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 다른 요법과 조합하여 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용에 의해 고려되는 하나 이상의 다른 추가적인 치료제는 본 개시내용에 따른 항-CD39 항체를 포함하는 동일한 약제학적 조성물에 포함된다. 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 다른 치료제는 본 개시내용에 따른 항-CD39 항체를 포함하는 약제학적 조성물과 별개인 조성물 내에 있다.

[0190] 하나의 측면에서, 본원에 기재된 항-CD39 항체는 경구로 투여될 수 있다. 경구 투여는 예를 들어, 캡슐 또는 정제를 통해 이루어질 수 있다. 항-CD39 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 제조하는 데 있어서, 정제 또는 캡슐은 전형적으로 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 부형제의 비제한적인 예는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 검, 인산칼슘, 알기네이트, 트라가칸트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌 글리콜, 셀룰로스, 멸균수, 시럽, 및 메틸 셀룰로스를 포함한다. 추가적인 약제학적으로 허용되는 부형제는 윤활제 예컨대 활석, 스테아르산마그네슘, 및 광유; 습윤제; 유화제 및 현탁제; 방부제 예컨대 메틸 및 프로필하이드록시-벤조에이트를 포함한다. 일부 경구 투여 형태는 맛 차폐제, 감미제 또는 향미제를 포함한다. 경구 투여 형태는 용액 또는 현탁액으로 제형화될 수 있다.

[0191] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 항체는 예를 들어 정맥내 주사에 의해 비경구로 투여될 수 있다. 비경구 투여에 적절한 약제학적 조성물은 주사용액으로 제형화될 수 있거나 생리 용액과 같은 적절한 시스템에서 주사용으로 재구성될 수 있다. 이러한 용액은 적절한 생리학의 등장성을 달성하기에 적절한 양으로 주사용수, 염, 완충액, 및 등장성 부형제를 포함할 수 있다.

[0192] 본원에 기재된 약제학적 조성물은 적절한 멸균 용기 또는 용기들에 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 용기는 주어진 기간에 걸쳐 약제학적 조성물에 대한 안정성을 유지하도록 설계된다.

[0193] D. 투약

[0194] 일반적으로, 개시된 방법은 본원에 기재된 항-CD39 항체, 또는 이의 조성물을 유효량으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 본 개시내용의 항-CD39 항체와 관련하여 "유효량"은 항체의 효능을 나타내는 수준에서 (예를 들어, CD39 효소적 활성화에 결합하고 억제함으로써) 표적이 진입하기에 충분한 항체의 양을 의미한다. CD39의 경우, 표적 진입은 EC₅₀, ED₅₀, EC₉₀, IC₅₀, 또는 항체 효능의 한 평가로서 사용될 수 있는 유사한 값을 초래하는 하나 이상의 생화학 또는 세포 검정에 의해 결정될 수 있다. 표적 진입을 결정하기 위한 검정은 실시예에 기재된 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 유효량은 단일 수량 또는 다수의 더 적은 수량(예를 들어, "x" 양의 1개 정제, 각각 "x/2" 양의 2개의 정제 등)으로 결정될 수 있다.

[0195] 일부 구현예에서, 개시된 방법은 치료적으로 유효량의 본원에 기재된 항-CD39 항체를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 항-CD39 항체와 관련하여 "치료적으로 유효량"이라는 어구는 항체가 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여되는 것에 대한 특이적 약리학적 효과를 제공하는 항체의 용량 레지멘(즉, 양 및 간격)을 의미한다. 예방적 사용의 경우, 치료적으로 유효량은 질환의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동적 징후 또는 증상을 포함하여 위험을 제거 또는 감소시키거나, 중증도를 완화하거나, 질환의 발병을 지연시키는 데 효과적일 수 있다. 치료를 위해, 치료적으로 유효량은 질환과 관련된 하나 이상의 징후 또는 증상을 감소, 개선, 또는 제거하거나, 질환 진행을 지연시키거나, 생존을 연장하거나, 질환을 치료하는 데 필요한 다른 약제(들)의 용량을 감소시키거나, 이의 조합에 효과적일 수 있다. 구체적으로 암과 관련하여, 치료적으로 유효량은 예를 들어, 암 세포 사멸을 초래하거나, 암 세포 계수를 감소시키거나, 종양 부담을 감소시키거나, 종양 또는 전이를 제거하거나, 전이 확산을 감소시킬 수 있다. 치료적으로 유효량의 항-CD39 항체는 당업자에 의해 치료적으로 유효량인 것으로 간주되는 모든 개별 대상체를 치료하는 데 있어서 항상 효과적일 필요는 없다. 치료적으로 유효량은 예를 들어, 다음 중 하나 이상에 기반하여 달라질 수 있다: 대상체의 연령 및 체중, 대상체의 전반적인 건강, 대상체의 질환 단계, 투여 경로, 및 이전 또는 병용 치료.

[0196] 특정 구현예에서, 본 개시내용에 의해 고려되는 항-CD39 항체는 원하는 효과를 획득하기 위해 1일, 1주, 또는 1

개월에 1 회 이상 하루에 대상체 체중의 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 25 mg/kg 으로 투여될 수 있다(예를 들어, 경구, 비경구 등). 일부 구현예에서, 본 개시내용에 의해 고려되는 항-CD39 항체의 적합한 체중 기반 용량은 대상체의 체중과 무관하게 투여되는 용량(즉, 고정 용량을 결정하는 데 사용된다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 원하는 효과를 수득하기 위해 1일, 1주, 또는 1개월에 1 회 이상 약 1 mg 내지 약 1000 mg, 특히 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 750, 800, 900, 또는 1000 mg의 고정 투여량 수준으로 투여될 수 있다(예를 들어, 경구, 비경구 등). 일부 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 원하는 효과를 수득하기 위해 1일, 1주, 또는 1개월에 1 회 이상 약 3 mg 내지 약 3000 mg, 특히 3, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 750, 800, 900, 1000 mg, 1100 mg, 1200 mg, 1300 mg, 1400 mg, 1500 mg, 1600 mg, 1700 mg, 1800 mg, 1900 mg, 2000 mg, 2100 mg, 2200 mg, 2300 mg, 2400 mg, 2500 mg, 2600 mg, 2700 mg, 2800 mg, 2900 mg, 또는 3000 mg의 고정 투여량 수준으로 투여될 수 있다(예를 들어, 경구, 비경구 등). 용어 "약"은 용량과 관련하여 본원에서 사용될 때 언급된 수치 뿐만 아니라 수치의 플러스 또는 마이너스 10%를 의미한다. 예를 들어, "약 10"은 "10" 및 "9-11" 둘 다로 이해되어야 한다.

[0197] 특정 구현예에서, 본 개시내용의 항-CD39 항체는 "단위 투여 형태"로 함유된다. "단위 투여 형태"라는 어구는 물리적으로 별개의 단위를 지칭하며, 각 단위는 단독으로 또는 하나 이상의 추가적인 제제와 조합하여 원하는 효과를 생산하기에 충분한 항-CD39 항체의 미리 결정된 양을 함유한다. 단위 투여 형태의 매개변수는 특정 제제 및 달성될 효과에 따라 달라질 것이라는 것이 이해될 것이다.

[0198] IV. 개시된 항-CD39 항체와의 조합

[0199] 본 개시내용은 **섹션 II**의 항-CD39 항체를 단독으로 또는 하나 이상의 추가적인 요법과 조합하여 사용하는 것을 고려한다. 각 추가적인 요법은 치료제 또는 또 다른 치료 양식일 수 있다. 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는 구현예에서, 각 제제는 상이하지만 상보적인 작용 메커니즘을 표적할 수 있다. 추가적인 치료제는 작은 화학 분자; 거대분자 예컨대 단백질, 항체, 펩티마이드(peptibody), 펩티드, DNA, RNA 또는 이러한 거대분자의 단편; 또는 세포 또는 유전자 요법일 수 있다. 추가적인 치료 양식의 비제한적인 예는 종양의 외과적 절제, 골수 이식, 방사선 요법, 및 광역학 요법을 포함한다. **섹션 II**의 항-CD39 항체를 하나 이상의 추가적인 요법과 조합하여 사용하는 것은 근본적인 질환, 장애, 또는 병태에 대한 상승적 또는 부가적 치료적 효과 또는 예방적 효과를 가질 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 조합 요법은 요법 중 하나 이상의 용량 감소를 허용하여, 제제 중 하나 이상과 관련된 부작용을 개선, 감소 또는 제거할 수 있다.

[0200] 하나 이상의 추가적인 치료 양식을 포함하는 구현예에서, **섹션 II**의 항-CD39 항체는 추가적인 치료 양식을 사용한 치료 전, 후 또는 도중에 투여될 수 있다. 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는 구현예에서, 이러한 조합 요법에 사용되는 치료제는 단일 조성물 또는 별도의 조성물로 제형화될 수 있다. 별도로 투여되는 경우, 조합된 각 치료제는 동일한 시간 또는 거의 동일한 시간, 또는 상이한 시간에 주어질 수 있다. 뿐만 아니라, 치료제는 상이한 투여 형태(예를 들어, 경구 캡슐 및 정맥내)를 가지고 있는 경우에도 "조합하여" 투여되며, 이들은 상이한 투약 간격으로 주어지고, 하나의 치료제는 일정한 투약 레지멘으로 주어지는 반면 또 다른 것은 적정이 증가되거나, 적정이 감소되거나, 중단되거나, 조합된 각 치료제는 독립적으로 적정이 증가되거나, 적정이 감소되거나, 투여량이 증가 또는 감소되거나, 환자 요법 과정 도중에 중단되고/되거나 재개된다. 조합이 별도의 조성물로 제형화되는 경우, 일부 구현예에서, 별도의 조성물은 키트에 함께 제공된다.

[0201] 암 요법

[0202] 본 개시내용은 암, 또는 암 관련 질환, 장애 또는 병태의 치료에 유용한 하나 이상의 추가적인 요법과 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체의 사용을 고려한다. 일부 구현예에서, 치료 요법 중 하나 이상은 추가적인 치료 양식이다. 예시적인 치료 양식은 종양의 외과적 절제, 골수 이식, 방사선 요법, 및 광역학 요법을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 치료 요법 중 하나 이상은 치료제이다. 예시적인 치료제는 화학치료제, 방사성 의약품, 호르몬 요법, 후생적 조절제, ATP-아데노신 측-표적화제, 표적화 요법, 신호 전달 억제제, RAS 신호전달 억제제, PI3K 억제제, 아르기나제 억제제, HIF 억제제, AXL 억제제, PAK4 억제제, 면역치료제, 세포 요법, 유전자 요법, 면역 체크포인트 억제제, 및 자극 또는 공동자극 면역 체크포인트의 작용제를 포함한다.

[0203] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 화학치료제이다. 화학치료제의 예는 알킬화제 예컨대 티오테파 및 사이클로스포스파미드; 알킬 술포네이트 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리에틸올로멜라민을 포함한 에틸렌아민 및 메틸아멜라민; 질소 머스타드 예컨대 클

로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비신, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생물질 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 포말리도미드, 페플로마이신, 포티피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사산물 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사체 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 페메트렉세드, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 사이타라빈, 디테옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 항-부신체 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스타틴; 엽산 보충물 예컨대 폴린산; 아세글락톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레블린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미토잔트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나멧; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; 라죽산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2''-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드(Ara-C); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀, 납 파클리탁셀, 및 도세탁셀; 클로람부실; 쟈시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토피린; 메토트렉세이트; 백금 및 백금 배위 착체(일괄하여 "백금제"로 언급됨) 예컨대 시스플라틴, 카보플라틴 및 옥살리플라틴; 빈블라스틴; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미토잔트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT11; 프로테아좀 억제제 예컨대 보르테조미, 카르필조미 및 익사조미; 토포이소머라제 억제제 예컨대 이리노테칸, 토포테칸, 에토포시드, 미토잔트론, 테니포시드; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노산; 에스페라미신; 카페시타빈; 안트라사이클린 및 상기 중 임의의 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 조합 요법은 하나 이상의 화학치료제를 포함하는 화학요법 레지멘을 포함한다. 하나의 구현예에서, 조합 요법은 FOLFOX(폴린산, 플루오로우라실, 및 옥살리플라틴), FOLFIRI(폴린산, 플루오로우라실, 및 이리노테칸), 탁산(예를 들어, 도세탁셀, 파클리탁셀, 납-파클리탁셀 등), CAPOX(카페시타빈 및 옥살리플라틴), XELOX(카페시타빈 및 옥살리플라틴), 이리노테칸, 백금 기반 화학치료제, 또는 쟈시타빈을 포함하는 화학요법 레지멘을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 조합 요법은 알킬화제(예를 들어, 사이클로포스파미드), 안트라사이클린(예를 들어, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미토잔트론), 백금제(예를 들어, 옥살리플라틴), 프로테아좀 억제제(예를 들어, 보르테조미), 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 화학요법 레지멘을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 조합 요법은 알킬화제(예를 들어, 사이클로포스파미드), 안트라사이클린(예를 들어, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미토잔트론), 백금제(예를 들어, 카보플라틴, 시스플라틴, 옥살리플라틴), 탁산(예를 들어, 도세탁셀, 파클리탁셀), 프로테아좀 억제제(예를 들어, 보르테조미), 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 화학요법 레지멘을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 조합 요법은 보르테조미, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미토잔트론, 옥살리플라틴, 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 화학요법 레지멘을 포함한다.

[0204] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 방사성의약품이다. 방사성의약품은 방사선원(즉, 하나 이상의 방사성 핵종)을 대상체의 신체 내부에 넣는 내부 방사선 요법의 형태이다. 방사선원은 고체 또는 액체 형태일 수 있다. 방사성의약품의 비제한적인 예는 요오드화나트륨 I-131, 이염화라듐-223, 요오드화 로벤구안-131, 방사성요오드화 소포(예를 들어, 사포신 C-디올레오일포스파티딜세렌(SapC-DOPS) 나노소포), 다양한 형태의 근접치료(brachytherapy), 및 다양한 형태의 표적화 방사성 핵종을 포함한다. 표적화 방사성 핵종은 세포, 전형적으로 암 세포 또는 면역 세포 상의 표적에 특이적으로 결합하는 분자("표적화제")와(예를 들어, 공유 또는 이온 상호작용에 의해) 회합된 방사성 핵종을 포함한다. 표적화제는 소분자, 당류(올리고당류 및 다당류 포함), 항체, 지질, 단백질, 펩티드, 비천연 중합체, 또는 압타머일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화제는 당류(올리고당류 및 다당류 포함), 지질, 단백질, 또는 펩티드이고 표적은 종양 관련 항원(풍부하지만 암 세포에 특이적이지 않음), 종양 특이적 항원(정상 조직에서는 최소로 발현되거나 발현되지 않음), 또는 신생-항원(종양 세포 계통에서 비동의 돌연변이 또는 유전자 융합에 의해 생성된 암 세포의 계통에 특이적인 항원)이다. 일부 구현예

에서, 표적화제는 항체이고 표적은 종양 관련 항원(즉, 풍부하지만 암 세포에 특이적이지 않은 항원), 종양 특이적 항원(즉, 정상 조직에서 최소로 발현되거나 전혀 발현되지 않는 항원), 또는 신생-항원(즉, 종양 세포 계능에서 비동의 돌연변이 또는 유전자 융합에 의해 생성된 암 세포의 계능에 특이적인 항원)이다. 표적화 방사성 핵종의 비제한적인 예는 소마토스타틴 또는 이의 펩티드 유사체(예를 들어, ^{177}Lu -Dotatate 등); 전립선 특이적 막 항원 또는 이의 펩티드 유사체(예를 들어, ^{177}Lu -PSMA-617, ^{225}Ac -PSMA-617, ^{177}Lu -PSMA-I&T, ^{177}Lu -MIP-1095 등); 수용체의 동족 리간드, 리간드로부터 유래된 펩티드, 또는 이의 변이체(예를 들어, ^{188}Re -표지된 VEGF₁₂₅₋₁₃₆ 또는 VEGF 수용체에 대해 더 높은 친화도를 갖는 이의 변이체 등); 종양 항원을 표적화하는 항체(예를 들어, 131I-토시투모맵, 90Y-이브리투모맵 티옥세탄, CAM-H2-I131(Precirix NV), I131-옴부르타맵 등)에 부착된 방사성 핵종을 포함한다.

[0205] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 호르몬 요법이다. 호르몬 요법은 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 역할을 한다. 호르몬 요법의 예는 선택적 에스트로겐 수용체 분해제 예컨대 풀베스트란트, GDC-9545, SAR439859, RG6171, AZD9833, 린토테스트란트, ZN-c5, LSZ102, D-0502, LY3484356, SHR9549; 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 예컨대 타목시펜, 탈록시펜, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, 토레미펜; 아로마타제 억제제 예컨대 아나스트로졸, 엑세메스탄, 레트로졸 및 다른 아로마타제를 억제하는 4(5)-이미다졸; 성선 자극 호르몬-방출 호르몬 작용제 예컨대 나파렐린, 트립토텐린, 고세렐린; 성선 자극 호르몬-방출 호르몬 길항제 예컨대 데가렐릭스; 항안드로겐 예컨대 아비라테론, 엔잘루타미드, 아팔루타미드, 다룰루타미드, 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드; 5α -환원효소 억제제 예컨대 피나스테리드, 두타스테리드 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 조합 요법은 호르몬 또는 관련 호르몬제의 투여를 포함한다. 하나의 구현예에서, 조합 요법은 엔잘루타미드의 투여를 포함한다.

[0206] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 후생적 조절제이다. 후생적 조절제는 유전자 발현을 제어하는 후생적 메커니즘을 변경하고, 예를 들어, 후생적 효소의 억제제 또는 활성화제일 수 있다. 후생적 조절제의 비제한적인 예는 DNA 메틸트랜스퍼라제(DNMT) 억제제, 저메틸화제, 및 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제를 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, **섹션 II**의 항-CD39 항체는 DNA 메틸 트랜스퍼라제(DNMT) 억제제 또는 저메틸화제와 조합될 수 있다. 예시적인 DNMT 억제제는 데시타빈, 제볼라린 및 아자시타빈을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, **섹션 II**의 항-CD39 항체와 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제의 조합이 또한 고려된다. 예시적인 HDAC 억제제는 보리노스타트, 기비노스타트, 아백시노스타트, 파노비노스타트, 벨리노스타트 및 트리코스타틴 A를 포함한다.

[0207] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 ATP-아데노신 축-표적화제이다. ATP-아데노신 축-표적화제는 예를 들어 아데노신의 수준을 조절하거나 아데노신 수용체를 표적화함으로써 아데닌 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드(예를 들어, 아데노신, AMP, ADP, ATP)에 의해 매개되는 신호전달을 변경한다. 상이한 클래스의 수용체에서 작용하는 아데노신 및 ATP는 종종 염증, 세포 증식 및 세포 사멸에 대한 반대 효과를 갖는다. 예를 들면, ATP 및 다른 아데닌 뉴클레오타이드는 PS2Y1 수용체 하위유형의 활성화를 통해 항종양 효과를 갖지만, 종양 미세환경에서 아데노신의 축적은 다양한 면역 세포의 항종양 기능을 억제하고 세포 표면 아데노신 수용체에 결합함으로써 골수 및 조절 T 세포의 면역억제 활성을 증대시키는 것으로 나타났다. 특정 구현예에서, ATP-아데노신 축-표적화제는 ATP를 아데노신으로 전환하는 데 수반되는 엑토뉴클레오타이드의 억제제 또는 아데노신 수용체의 길항제이다. ATP를 아데노신으로 전환하는 데 수반되는 엑토뉴클레오타이드는 엑토뉴클레오타이드 트리포스페이트 디포스포하이드롤라제 1(ENTPD1, CD39 또는 분화 클러스터 39로도 알려짐) 및 엑토-5'-뉴클레오타이드(NT5E 또는 5NT, CD73 또는 분화 클러스터 73으로도 알려짐)를 포함한다. 예시적인 소분자 CD73 억제제는 CB-708, ORIC-533, LY3475070 및 AB680을 포함한다. 예시적인 항-CD73 항체는 CPI-006, 올레클루맵(MEDI9447), NZV930, IPH5301, GS-1423, 울릴레들리맵(TJD5, TJ004309), 및 BMS-986179를 포함한다. 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 **섹션 II**의 항-CD39 항체와 WO 2017/120508, WO 2018/067424, WO 2018/094148, 및 WO 2020/046813에 기재된 것들과 같은 CD73 억제제의 조합을 고려한다. 추가 구현예에서, CD73 억제제는 캄리클루스타트이다. 아데노신은 4개의 상이한 G-단백질 결합 수용체: A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$, 및 A_3R 에 결합하고 활성화할 수 있다. A_{2R} 길항제는 에트루마데난트, 이누파데난트, 타미나데난트, 카페인 시트레이트, NUV-1182, TT-702, DZD-2269, INCB-106385, EVOXS-21546, AZD-4635, 이마라데난트, RVU-330, 시포라데난트, PBF-509, PBF-999, PBF-1129, 및 CS-3005를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 **섹션 II**의 항-CD39 항체와 $A_{2A}R$ 길항제, $A_{2B}R$ 길항제, 또는 $A_{2A}R$ 및 $A_{2B}R$ 의 길항제의 조합을 고려한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 **섹션 II**의 항-CD39 항체와 WO 2018/136700, WO 2018/204661, WO 2018/213377, 또는 WO 2020/023846, WO 2020/102646에 기재된 아데노신 수용체 길항제의

조합을 고려한다. 하나의 구현예에서, 아데노신 수용체 길항제는 에트루마데난트이다.

[0208]

일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 표적화 요법이다. 하나의 측면에서, 표적화 요법은 화학치료제, 방사성 핵종, 호르몬 요법, 또는 표적화제에 부착된 또 다른 소분자 약물을 포함할 수 있다. 표적화제는 소분자, 당류(올리고당류 및 다당류 포함), 항체, 지질, 단백질, 펩티드, 비천연 중합체, 또는 압타머일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화제는 당류(올리고당류 및 다당류 포함), 지질, 단백질, 또는 펩티드이고 표적은 종양 관련 항원(풍부하지만 암 세포에 특이적이지 않음), 종양 특이적 항원(정상 조직에서 최소로 발현되거나 전혀 발현되지 않음), 또는 신생-항원(종양 세포 계능에서 비동의 돌연변이에 의해 생성된 암 세포의 계능에 특이적인 항원)이다. 일부 구현예에서, 표적화제는 항체이고 표적은 종양 관련 항원(풍부하지만 암 세포에 특이적이지 않음), 종양 특이적 항원(정상 조직에서 최소로 발현되거나 전혀 발현되지 않음), 또는 신생-항원(종양 세포 계능에서 비동의 돌연변이에 의해 생성된 암 세포의 계능에 특이적인 항원)이다. 일부 구현예에서, 표적화 요법은 항체 및 약물을 포함하는 항체-약물 접합체이며, 여기서 항체는 HER2, HER3, 넥틴-4, 또는 Trop-2에 특이적으로 결합한다. 항체 및 약물을 포함하는 표적화 요법의 특이적 예는 파트리투맙 데록스테칸, 삭시투주맙 고비테칸-hziy, 텔리소투주맙 베도틴, 및 트라스투주맙 데록스테칸을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 다른 측면에서, 표적화 요법은 종양 생존, 성장 및/또는 확산을 돕는 특이적 단백질을 억제하거나 방해할 수 있다. 이러한 표적화 요법의 비제한적인 예는 신호 전달 억제제, RAS 신호전달 억제제, 종양형성 전사 인자 억제제, 종양형성 전사 인자 억제제의 활성화제, 혈관형성 억제제, 면역치료제, ATP-아데노신 축-표적화제, AXL 억제제, PARP 억제제, PAK4 억제제, PI3K 억제제, HIF2 α 억제제, CD73 억제제, A $_2$ R 길항제, TIGIT 길항제, 및 PD-1 길항제를 포함한다. ATP-아데노신 축-표적화제는 위에 기재되어 있는 반면, 다른 제제는 아래에 추가로 상세하게 기재되어 있다.

[0209]

일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 신호 전달 억제제이다. 신호 전달 억제제는 신호전달 경로에서 하나 이상의 단계를 선택적으로 억제하는 제제이다. 본 개시내용에 의해 고려되는 신호 전달 억제제(STI)는 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다: (i) BCR-ABL 키나제 억제제(예를 들어, 이마티닙); (ii) 소분자 억제제(예를 들어, CLN-081, 제피티닙, 에를로티닙, 아파티닙, 이코티닙, 및 오시메르티닙), 및 항-EGFR 항체를 포함하는 표피 성장 인자 수용체 티로신 키나제 억제제(EGFR TKI); (iii) 막관통 티로신 키나제의 인간 표피 성장 인자(HER) 계열의 억제제, 예를 들어, HER-2/neu 수용체 억제제(예를 들어, 트라스투주맙 및 HER-3 수용체 억제제); (iv) 소분자 억제제(예를 들어, 악시티닙, 레고라페닙, 수니티닙 및 소라페닙), VEGF 키나제 억제제(예를 들어, 렌바티닙, 카보잔티닙, 파조파닙, 티보자닙, XL092 등), 항-VEGF 항체(예를 들어, 베바시주맙) 및 항-VEGFR 항체(예를 들어, 라무시루맙)를 포함하는 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR) 억제제; (v) AKT 계열 키나제 또는 AKT 경로의 억제제(예를 들어, 라파마이신); (vi) 예를 들어, 베무라페닙, 다브라페닙 및 엔코라페닙과 같은 세린/트레오닌-단백질 키나제 B-Raf(BRAF)의 억제제; (vii) 예를 들어, 셀페르카티닙 및 프탈세티닙을 포함하는 혈장감염 도중 재배열(RET)의 억제제; (viii) 티로신-단백질 키나제 Met(MET) 억제제(예를 들어, 테포티닙, 티반티닙, 카보잔티닙 및 크리조티닙); (ix) 역형성 림프종 키나제(ALK) 억제제(예를 들어, 엔사르티닙, 세리티닙, 로를라티닙, 크리조티닙, 및 브리가티닙); (x) 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 RAS 신호전달 경로의 억제제(예를 들어, KRAS, HRAS, RAF, MEK, ERK의 억제제); (xi) FLT-3 억제제(예를 들어, 길테리티닙); (xii) Trop-2의 억제제; (xiii) JAK/STAT 경로의 억제제, 예를 들어, 토파시티닙 및 록솔리티닙을 포함하는 JAK 억제제, 또는 STAT 억제제 예컨대 나파부카신; (xiv) NF-kB의 억제제; (xv) 세포 주기 키나제 억제제(예를 들어, 플라보피리돌); (xvi) 포스파티딜 이노시톨 키나제(PI3K) 억제제; (xix) 단백질 키나제 B(AKT) 억제제(예를 들어, 카피바세르티닙, 미란세르티닙); (xx) 혈소판 유래 성장 인자 수용체(PDGFR) 억제제(예를 들어, 이마티닙, 수니티닙, 레고라페닙, 아바프리티닙, 렌바티닙, 닌테다닙, 파미티닙, 포나티닙, 악시티닙, 레프레티닙 등); 및 (xxi) 인슐린 유사 성장 인자 수용체(IGFR) 억제제(예를 들어, 에를로티닙, 아파티닙, 제피티닙, 오시메르티닙, 다코미티닙). 하나 이상의 구현예에서, 추가적인 치료제는 EGFR, VEGFR, HER-2, HER-3, BRAF, RET, MET, ALK, RAS(예를 들어, KRAS, MEK, ERK), FLT-3, JAK, STAT, NF-kB, PI3K, AKT, 또는 이의 임의의 조합의 억제제를 포함한다.

[0210]

일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 RAS 신호전달 억제제이다. RAS 계열 유전자, 예를 들어, HRAS, KRAS, 및 NRAS의 종양형성 돌연변이는 다양한 암과 관련되어 있다. 예를 들어, 특히 KRAS 계열 유전자의 G12C, G12D, G12V, G12A, G13D, Q61H, G13C 및 G12S의 돌연변이가 다중 종양 유형에서 관찰되었다. 돌연변이체 RAS 신호전달의 억제를 위한 직접 및 간접 억제 전략이 조사되었다. 간접 억제제는 RAS 신호전달 경로에서 RAS 이외의 효과기를 표적하고, RAF, MEK, ERK, PI3K, PTEN, SOS(예를 들어, SOS1), mTORC1, SHP2(PTPN11), 및 AKT의 억제제를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 개발 중인 간접 억제제의 비제한적인 예는 RMC-4630, RMC-5845,

RMC-6291, RMC-6236, JAB-3068, JAB-3312, TNO155, RLY-1971, BI1701963을 포함한다. RAS 돌연변이체의 직접 억제제가 또한 탐구되었으며, 일반적으로 KRAS-GTP 복합체 또는 KRAS-GDP 복합체를 표적한다. 개발 중인 예시적인 직접 RAS 억제제는 소토라십(AMG510), MRTX849, mRNA-5671 및 ARS1620을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 RAS 신호전달 억제제는 RAF 억제제, MEK 억제제, ERK 억제제, PI3K 억제제, PTEN 억제제, SOS1 억제제, mTORC1 억제제, SHP2 억제제, 및 AKT 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 구현예에서 하나 이상의 RAS 신호전달 억제제는 RAS 돌연변이체를 직접 억제한다.

[0211] 일부 구현예에서 추가적인 치료제 중 하나 이상은 포스파티딜이노시톨 3-키나제(PI3K)의 억제제, 특히 PI3K γ 이소형의 억제제이다. PI3K γ 억제제는 골수 세포의 조절을 통해, 예컨대 억제성 골수 세포를 억제하거나, 면역 억제 종양 침윤 대식세포를 약화시키거나 대식세포 및 수지상 세포를 자극하여 효과적인 T 세포 반응에 기여하는 사이토카인을 생성함으로써 항암 면역 반응을 자극하여 암 발생 및 확산을 감소시킬 수 있다. 예시적인 PI3K γ 억제제는 코판리십, 두벨리십, AT-104, ZX-101, 테날리십, 에가넬리십, SF-1126, AZD3458, 및 픽틸리십을 포함한다. 일부 구현예에서, **섹션 II**의 항-CD39 항체는 WO 2020/024749A1에 기재된 하나 이상의 PI3K γ 억제제와 조합될 수 있다.

[0212] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 아르기나제의 억제제이다. 아르기나제는 염증 촉발 면역 기능장애, 종양 면역 회피, 면역억제 및 감염성 질환의 면역병리학을 담당하거나 이에 참여하는 것으로 나타났다. 예시적인 아르기나제 화합물은 CB-1158 및 OAT-1746을 포함한다. 일부 구현예에서, **섹션 II**의 항-CD39 항체는 WO/2019/173188 및 WO 2020/102646에 기재된 하나 이상의 아르기나제 억제제와 조합될 수 있다.

[0213] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 종양형성 전사 인자의 억제제 또는 종양형성 전사 인자 억제자의 활성화제이다. 적합한 제제는 발현 수준(예를 들어, RNAi, siRNA 등)에서, 물리적 분해를 통해, 단백질/단백질 수준에서, 단백질/DNA 수준에서, 또는 활성화/억제 포켓에서의 결합에 의해 작용할 수 있다. 비제한적인 예는 MLL 복합체의 하나 이상의 하위단위(예를 들어, HDAC, DOT1L, BRD4, Menin, LEDGF, WDR5, KDM4C(JMJD2C) 및 PRMT1)의 억제제, 저산소증 유도 인자 (HIF) 전사 인자의 억제제 등을 포함한다.

[0214] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 저산소증 유도 인자(HIF) 전사 인자, 특히 HIF-2 α 의 억제제이다. 예시적인 HIF-2 α 억제제는 벨주티판, ARO-HIF2, PT-2385, AB521, 및 WO 2021113436 및 WO 2021188769에 기재된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, **섹션 II**의 항-CD39 항체는 WO 2021188769에 기재된 하나 이상의 HIF-2 α 억제제와 조합될 수 있다.

[0215] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 아넥셀렉토(AXL)의 억제제이다. AXL 신호전달 경로는 종양 성장 및 전이와 관련되어 있고, 다양한 암 요법에 대한 저항성을 매개하는 것으로 여겨진다. TAM 계열의 다른 키나제(즉, TYRO3, MERTK), 뿐만 아니라 특히 MET, FLT3, RON 및 AURORA를 포함한 다른 수용체 티로신 키나제를 또한 억제하는 개발 중인 다양한 AXL 억제제가 있다. 예시적인 멀티키나제 억제제는 시트라바티닙, 레바스티닙, 글레사티닙, 길테리티닙, 메레스티닙, 카보잔티닙, 포레티닙, BMS777607, LY2801653, S49076, GSK1363089, 및 RXDX-106을 포함한다. AXL 특이적 억제제, 예를 들어, DS-1205, SGI-7079, SLC-391, TP-0903(즉, 두베르마티닙), BGB324(즉, 뱀센티닙), 및 DP3975를 포함하는 소분자 억제제; 항-AXL 항체 예컨대 ADCT-601; 및 항체 약물 접합체(ADC) 예컨대 BA3011이 또한 개발되었다. AXL 신호전달을 억제하는 또 다른 전략은 AXL의 리간드인 GAS6을 표적화하는 것을 수반한다. 예를 들어, AVB-500은 GAS6 리간드에 결합하여 AXL 신호전달을 억제하는 Fc 융합 단백질과 마찬가지로 개발 중이다.

[0216] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 p21-활성화 키나제 4(PAK4)의 억제제이다. PAK4 과발현은 특히 PD-1 요법에 저항성인 것들을 포함하여, 다양한 암 유형에 걸쳐 나타났다. 승인된 PAK4 억제제는 없지만, 일부, 예를 들어, ATG-019 및 KPT-9274가 개발 중이고, 이중 PAK4/NAMPT 억제제 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 PAK4 선택적 억제제와 조합된다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 항체는 PAK4/NAMPT 이중 억제제, 예를 들어, ATG-019 또는 KPT-9274와 조합된다.

[0217] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 (i) 효소 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제를 억제하는 제제(예를 들어, 올라파립, 니라파립 및 루카파립 등); (ii) 단백질의 Bcl-2 계열의 억제제(예를 들어, 베네토클락스, 나비토클락스 등); (iii) MCL-1의 억제제; (iv) CD47-SIRP α 경로의 억제제(예를 들어, 항-CD47 항체, 마그롤리맵 등); (v) 이소시트레이트 데하이드로게나제(IDH) 억제제, 예를 들어, IDH-1 또는 IDH-2 억제제(예를 들어, 이보시데닙, 에나시데닙 등)이다.

[0218] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 면역치료제이다. 암의 치료에 유용한 면역치료제는 전형적으로

로 암 세포에 대한 면역 반응을 도출하거나 증폭시킨다. 적합한 면역치료제의 비제한적인 예는 면역조절제; 세포 면역요법; 백신; 유전자 요법; ATP-아데노신 측-표적화제; 면역 체크포인트 조절제; 및 특정 신호 전달 억제제를 포함한다. ATP-아데노신 측-표적화제는 위에 기재되어 있다. 면역조절제, 신호 전달 억제제, 세포 면역요법, 백신, 유전자 요법, 및 면역 체크포인트 조절제는 아래에 추가로 기재되어 있다.

[0219] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 면역치료제, 보다 구체적으로 사이토카인 또는 케모카인, 예컨대, IL1, IL2, IL12, IL18, ELC/CCL19, SLC/CCL21, MCP-1, IL-4, IL-18, TNF, IL-15, MDC, IFN α /b, M-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-13, 및 항-IL-10; 박테리아 지질다당류(LPS); 항원 제시 세포를 활성화하고 T_H1-유사 수용체(TLR) 작용제, 메탈로네이트 경로 길항제, STING 작용제를 포함하나 이에 제한되지 않는 주요 조직적합성 복합체 분자 상에서 항원 에피토프의 제시를 촉진하는 유기 또는 무기 보조요법; 인돌레아민 2,3-디옥시게나제 1(IDO1) 억제제 및 면역 자극 올리고뉴클레오타이드, 뿐만 아니라 다른 T 세포 보조요법이다.

[0220] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 면역치료제, 보다 구체적으로 세포 요법이다. 세포 요법은 생존가능한 세포를 대상체에게 투여하는 치료 형태이다. 특정 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 면역계를 활성화하거나 억제하는 세포 면역요법이다. 암 치료에 유용한 세포 면역요법은 전형적으로 면역 반응을 도출하거나 증폭시킨다. 세포는 하나 이상의 대상체로부터 수집된 자가 또는 동종이계 면역 세포(예를 들어, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, NK 세포, T 세포 등)일 수 있다. 대안적으로, 세포는 면역 전구체 세포(예를 들어, 림프 전조 세포, 골수 전조 세포, 공통 수지상 세포 전구체 세포, 줄기 세포, 유도 다능성 줄기 세포 등)로부터 생산된 "(재)프로그램화된" 동종이계 면역 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 세포는 별도의 효과기 기능 및/또는 성숙 마커를 갖는 세포의 확장된 하위집합(예를 들어, 적응성 기억 NK 세포, 종양 침윤 림프구, 미성숙한 수지상 세포, 단핵구 유래 수지상 세포, 형질세포양 수지상 세포, 통상적인 수지상 세포(때때로 고전적인 수지상 세포로 언급됨), M1 대식세포, M2 대식세포 등)일 수 있거나, 세포를 특이적 항원에 표적화하고/하거나 세포의 항-종양 효과를 향상시키기 위해 유전적으로 변형될 수 있거나(예를 들어, 조작된 T 세포 수용체(TCR) 세포 요법, 키메라 항원 수용체(CAR) 세포 요법, 항원 로딩된 수지상 세포의 림프절 귀소 등), 종양 관련 항원의 증가된 발현을 갖는 것을 발현하도록 조작될 수 있거나, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다. 세포 요법의 비제한적인 유형은 CAR-T 세포 요법, CAR-NK 세포 요법, TCR 요법, 및 수지상 세포 백신을 포함한다. 예시적인 세포 면역요법은 시푸류셀-T, 티사철텐류셀, 리소캅타진 마라류셀, 이데캅타진 빅류셀, 블랙수캅타진 오토류셀, 및 악시캅타진 실로류셀, 뿐만 아니라 CTX110, JCAR015, JCAR017, MB-CART19.1, MB-CART20.1, MB-CART2019.1, UniCAR02-T-CD123, BMCA-CAR-T, JNJ-68284528, BNT211, 및 NK-92/5.28.z를 포함한다.

[0221] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 면역치료제, 보다 구체적으로 유전자 요법이다. 유전자 요법은 내인성 유전자의 발현을 변형하거나 단백질의 이중 발현을 초래하기 위해 세포외에서 대상체 또는 대상체의 세포에 투여되는 재조합 핵산(예를 들어, 작은 간섭 RNA(siRNA) 제제, 이중 가닥 RNA(dsRNA) 제제, 마이크로 RNA(miRNA) 제제, 바이러스 또는 박테리아 유전자 전달 등), 뿐만 아니라 핵산 구성요소(예를 들어, 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제, TAL 뉴클레아제, CRISPR/Cas 뉴클레아제 등), 종양용해 바이러스 등을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있는 유전자 편집 요법을 포함한다. 암 치료에 유용할 수 있는 유전자 요법의 비제한적인 예는 Gendicine®(rAd-p53), Oncorine®(rAD5-H101), 탈리모젠 라헤르파레프백, Mx-dnG1, ARO-HIF2(Arrowhead), 쿠아라투수겐 오제플라스미드(Immunogene), CTX110(CRISPR Therapeutics), CTX120(CRISPR Therapeutics), 및 CTX130(CRISPR Therapeutics)을 포함한다.

[0222] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 면역치료제, 보다 구체적으로 면역 체크포인트를 조절하는 제제이다. 면역 체크포인트는 면역 세포(예를 들어, B 세포, T 세포, NK 세포 등)의 기능에 직접 영향을 미치는 일련의 억제 및 자극 경로이다. 면역 체크포인트는 면역 세포 표면 상의 단백질이 동족 리간드를 인식하거나 이에 결합할 때 진입한다. 본 발명은 자극 또는 공동자극 경로 작용제 및/또는 억제 경로 길항제와 조합된 **색션 II**의 항-CD39 항체의 사용을 고려한다. 자극 또는 공동자극 경로 작용제 및 억제 경로 길항제는 종양 미세환경 내에서 별도의 면역 억제 경로를 극복하거나, T 조절 세포를 억제하거나, T 세포 무반응 또는 고갈을 역전/방지하거나, 종양 부위에서 선천적 면역 활성화 및/또는 염증을 촉발하거나, 이의 조합인 제제로서의 유용성을 가질 수 있다.

[0223] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 면역 체크포인트 억제제이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역 체크포인트 억제제"는 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제를 지칭한다. 용어 "면역 체크포인트 억제제", "체크포인트 억제제" 및 "CPI"는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 면역 체크포인트 억제제는 수용체-리간드 결합을 방해하고/하거나 수용체 신호전달을 변경함으로써 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트를 길항화할 수 있다. 일부가 다양한 암 유형 세포에서 선택적으로 상향 조절되는, 길항화될 수 있는

면역 체크포인트(리간드 및 수용체)의 예는 PD-1(프로그램화 세포 사멸 단백질 1); PD-L1(PD-1 리간드); BTLA(B 및 T 림프구 감쇠자); CTLA-4(세포독성 T-림프구 관련 항원 4); TIM-3(T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인-함유 단백질 3); LAG-3(림프구 활성화 유전자 3); TIGIT(Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체); CD276(B7-H3), PD-L2, 갈렉틴 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, 갈렉틴-1, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, 및 TIM-4, 및 킬러 억제 수용체를 포함하며, 이는 구조적 특징에 기반하여 다음 두 클래스로 나눌 수 있다: i) 킬러 세포 면역글로불린-유사 수용체(KIR), 및 ii) C-유형 렉틴 수용체(II형 막관통 수용체 계열의 구성원). 또한 수용체(예를 들어, 2B4(CD244로도 알려짐) 수용체) 및 리간드(예를 들어, 특정 B7 계열 억제 리간드 이러한 B7-H3(CD276으로도 알려짐) 및 B7-H4(B7-S1, B7x 및 VCTN1로도 알려짐))를 둘 다 포함하는, 문헌에 기재된 다른 덜 잘 정의된 면역 체크포인트가 고려된다.

[0224] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 CTLA-4 길항제이다. 추가 구현예에서, CTLA-4 길항제는 길항성 CTLA-4 항체일 수 있다. 적합한 길항성 CTLA-4 항체는 예를 들어, 단일특이적 항체 예컨대 이필리무맙(ipilimumab) 또는 트레멜리무맙(tremelimumab), 뿐만 아니라 이중특이적 항체 예컨대 MEDI5752 및 KN046을 포함한다.

[0225] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 길항제이다. 추가 구현예에서, PD-1 길항제는 길항성 PD-1 항체, 소분자 또는 펩티드일 수 있다. 적합한 길항성 PD-1 항체는 예를 들어, 단일특이적 항체 예컨대 발스틸리맙(balstilimab), 부디갈리맙(budigalimab), 캄렐리주맙(camrelizumab), 코시벨리맙(cosibelimab), 도스타를리맙, 세미폴리맙(cemiplimab), 에자벤리맙(ezabenlimab), MEDI-0680(AMP-514; WO2012/145493), 니볼루맙(nivolumab), 펌브롤리주맙(pembrolizumab), 피딜리주맙(pidilizumab), 피미발리맙(pimivalimab), 레티판리맙(retifanlimab), 사산리맙(sasanlimab), 스파르탈리주맙(spartalizumab), 신틸리맙(sintilimab), 티슬레리주맙(tislelizumab), 토리팔리맙(toripalimab), 및 짐베렐리맙; 뿐만 아니라 이중특이적 항체 예컨대 LY3434172를 포함한다. 또한 추가 구현예에서, PD-1 길항제는 IgG1의 Fc 부분(AMP-224)에 융합된 PD-L2(B7-DC)의 세포외 도메인으로 구성된 재조합 단백질일 수 있다. 특정 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 짐베렐리맙이다.

[0226] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1 길항제이다. 추가 구현예에서, PD-L1 길항제는 길항성 PD-L1 항체일 수 있다. 적합한 길항성 PD-L1 항체는 예를 들어, 단일특이적 항체 예컨대 아벨루맙(avelumab), 아테졸리주맙(atezolizumab), 더발루맙, BMS-936559, 및 엔바폴리맙 뿐만 아니라 이중특이적 항체 예컨대 LY3434172 및 KN046을 포함한다.

[0227] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 TIGIT 길항제이다. 추가 구현예에서, TIGIT 길항제는 길항성 TIGIT 항체일 수 있다. 적합한 길항성 항-TIGIT 항체는 단일특이적 항체 예컨대 AGEN1327, AB308(WO2021247591), BMS 986207, COM902, 돔바날리맙, EOS-448, 에티길리맙(etigilimab), IBI-929, JS006, M6223, 오시페를리맙(ociperlimab), SEA-TGT, 티라골루맙(tiragolumab), 비보스톨리맙(vibostolimab); 뿐만 아니라 이중특이적 항체 예컨대 AGEN1777 및 AZD2936을 포함한다. 특정 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 WO2017152088 또는 WO2021247591에 개시된 길항성 항-TIGIT 항체이다. 특정 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 돔바날리맙 또는 AB308이다.

[0228] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 LAG-3 길항제이다. 추가 구현예에서, LAG-3 길항제는 길항성 LAG-3 항체일 수 있다. 적합한 길항성 LAG-3 항체는 예를 들어, BMS-986016(WO10/19570, WO14/08218), 또는 IMP-731 또는 IMP-321(WO08/132601, WO09/44273)을 포함한다.

[0229] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 B7-H3 길항제이다. 추가 구현예에서, B7-H3 길항제는 길항성 B7-H3 항체이다. 적합한 길항성 B7-H3 항체는 예를 들어, MGA271(WO11/109400), 옴부투맙(omburtumab), 에노블리투주맙(enoblituzumab), DS-7300a, ABBV-155, 및 SHR-A1811을 포함한다.

[0230] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 TIM-3 길항제이다. 추가 구현예에서, TIM-3 길항제는 길항성 TIM-3 항체일 수 있다. 적합한 길항성 TIM-3 항체는 예를 들어, 도스타를리맙(dostarlimab), 사바톨리맙(sabatolimab), BMS-986258, 및 RG7769/RO7121661을 포함한다.

[0231] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 자극 또는 공동자극 면역 체크포인트를 활성화한다. 자극 또는 공동자극 면역 체크포인트(리간드 및 수용체)의 예는 B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB(CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 및 CD2를 포함한다.

[0232] 일부 구현예에서, 자극 또는 공동자극 면역 체크포인트를 활성화하는 제제는 CD137(4-1BB) 작용제이다. 추가 구

현예에서, CD137 작용제는 작용성 CD137 항체일 수 있다. 적합한 CD137 항체는 예를 들어, 우렐루맵(urelumab) 및 PF-05082566(W012/32433)을 포함한다. 일부 구현예에서, 자극 또는 공동자극 면역 체크포인트를 활성화하는 제제는 GITR 작용제이다. 추가 구현예에서, GITR 작용제는 작용성 GITR 항체일 수 있다. 적합한 GITR 항체는 예를 들어, BMS-986153, BMS-986156, TRX-518(W006/105021, W009/009116) 및 MK-4166(W011/028683)을 포함한다. 일부 구현예에서, 자극 또는 공동자극 면역 체크포인트를 활성화하는 제제는 OX40 작용제이다. 추가 구현예에서, OX40 작용제는 작용성 OX40 항체일 수 있다. 적합한 OX40 항체는 예를 들어, MEDI-6383, MEDI-6469, MEDI-0562, PF-04518600, GSK3174998, BMS-986178, 및 MOXR0916을 포함한다. 일부 구현예에서, 자극 또는 공동자극 면역 체크포인트를 활성화하는 제제는 CD40 작용제이다. 추가 구현예에서, CD40 작용제는 작용성 CD40 항체, 예컨대 다세투주맵(dacetuzumab), 셀리크렐루맵(selicrelumab), APX005M, ADC-1013, 또는 CDX-1140 일 수 있다. 일부 구현예에서, 자극 또는 공동자극 면역 체크포인트를 활성화하는 제제는 CD27 작용제이다. 추가 구현예에서, CD27 작용제는 작용성 CD27 항체일 수 있다. 적합한 CD27 항체는 예를 들어, 바를리루맵(varlilumab)을 포함한다.

[0233] 일부 구현예에서, 추가적인 요법 중 하나 이상은 면역치료제, 보다 구체적으로 신호 전달 억제제이다. 면역 세포 기능에 영향을 미치는 세포내 신호전달 분자는 또한 항종양 면역을 개선시키기 위한 적합한 표적일 수 있다. 예를 들어, 추가적인 요법 중 하나 이상은 조혈 선조 키나제 1(HPK1)의 억제제인 세포내 신호전달 분자의 억제제일 수 있다. HPK1은 T 세포 항원 수용체에 의해 생성된 활성화 신호의 음성 조절자로서 기능하는 세린 / 트레오닌 키나제이다. 또 다른 예로서, 추가적인 요법 중 하나 이상은 TCR 신호전달의 조절에 수반되는 E3 유비퀴틴 리가제(예를 들어, AP401)인 Cbl-b의 억제제일 수 있다. 또 다른 예로서, 추가적인 요법 중 하나 이상은 디아실 글리세롤 키나제(DGK)의 억제제일 수 있다. 일부 구현예에서, 억제제는 소분자이다. 임상 개발 중인 소분자 HPK1 억제제의 비제한적인 예는 CFI-402411 및 BGB-15025를 포함하고; 임상 개발 중인 Cbl-b 억제제의 비제한적인 예는 AP401을 포함한다. 소분자 DAG 억제제의 비제한적인 예는 W02020006016A1 및 W02021130638에 기재된 것들을 포함한다.

[0234] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제 중 하나 이상은 면역 억제 면역 세포를 억제하거나 고갈시키는 제제이다. 예를 들어, 면역억제 대식세포 또는 단핵구를 억제하거나 고갈시키기 위해 제제는 RG7155(W011/70024, W011/107553, W011/131407, W013/87699, W013/119716, W013/132044) 또는 FPA-008(W011/140249; W013169264)을 포함하는 CSF-1R 길항제 항체, 또는 W014/036357에 개시된 항체와 같은 CSF-1R 길항제일 수 있다. 또 다른 예로서, Treg를 억제하거나 고갈시키기 위해, 제제는 생체외에서 Treg를 고갈시키는 데 사용되는 항-CD25 비드일 수 있다.

[0235] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 면역원성 세포 사멸(ICD) 유도 요법과 조합하여 **섹션 II**의 항-CD39 항체의 사용을 고려한다. ICD는 세포 "시체"로부터 유래된 항원에 대해 특이적으로 지시되는 적응성 면역을 도출하는 데 충분한 기능적으로 고유한 조절된 세포 사멸 하위유형으로 정의될 수 있다. ICD-유도 요법을 식별하기 위한 기준은 Vanmeerbeek 등, *OncoImmunology*, 2020, 9:1, DOI: 10.1080/2162402X.2019.1703449; Keep 등, *OncoImmunology*, 2014, 3(9): :e955691에 기재된 것들을 포함할 수 있다. ICD-유도 요법의 비제한적인 예는 Galluzzi 등, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2020 17: 725-742에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, ICD-유도 요법은 방사선 요법, 광역학 요법, 체외 광화학요법, 종양용해 바이러스요법, 보르테조미, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미토잔트론, 세톡시맵, 크리조티닙, 또는 옥살리플라틴일 수 있다. 일부 구현예에서, ICD-유도 요법은 방사선 요법, 광역학 요법, 체외 광화학요법, 종양용해 바이러스요법, 블레오마이신, 보르테조미, 카보플라틴, 세톡시맵, 크리조티닙, 사이클로포스파미드, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 잼시타빈, 이다루비신, 이리노테칸, 미토잔트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 베무라페닙, 또는 보리노스 타트일 수 있다.

[0236] 일부 구현예에서, 각 추가적인 요법은 독립적으로 방사선 요법, 화학치료제, 방사성의약품, 호르몬 요법, 후생적 조절제, 표적화제, 면역치료제, 세포 요법, 유전자 요법, 또는 ICD-유도 요법일 수 있다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 ICD-유도 요법과 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체 및 임의적으로 하나 이상의 추가적인 요법의 사용을 고려하며, 여기서 각 추가적인 요법은 방사선 요법, 방사성의약품, 화학치료제, 호르몬 요법, 표적화제, 면역치료제, 세포 요법, 또는 유전자 요법으로부터 독립적으로 선택된다. 또 다른 예에서, 하나의 구현예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 화학치료제와 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체 및 임의적으로 하나 이상의 추가적인 요법의 사용을 고려하며, 여기서 각 추가적인 요법은 방사선 요법, 방사성의약품, 호르몬 요법, 표적화제, 면역치료제, 세포 요법, 또는 유전자 요법으로부터 독립적으로 선택된다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 화학치료제 및 하나 이상의 티로신 키나제 억제제와 조합된 **섹션 II**의 항-

CD39 항체, 및 임의적으로 하나 이상의 추가적인 요법의 사용을 고려하며, 여기서 각 추가적인 요법은 독립적으로 표적화제, 면역치료제, 또는 세포 요법이다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 화학치료제 및 독립적으로 (i) BCR-ABL 키나제 억제제; (ii) EGFR 억제제(예를 들어, EGFR TKI 또는 항-EGFR 항체); (iii) HER-2/neu 수용체 억제제; (iv) 항-혈관생성제(예를 들어, 항-VEGF 항체, VEGFR TKI, VEGF 키나제 억제제 등); (v) AKT 억제제; (vi) BRAF 억제제; (vii) RET 억제제; (viii) MET 억제제; (ix) RAS 억제제; 및 (x) ALK 억제제로부터 선택된 하나 이상의 억제제와 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체, 및 임의적으로 하나 이상의 추가적인 요법의 사용을 고려하며, 여기서 각 추가적인 요법은 방사선 요법, 방사성의약품, 표적화제, 면역치료제, 또는 세포 요법으로부터 독립적으로 선택된다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 면역치료제와 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체 및 임의적으로 하나 이상의 추가적인 요법의 사용을 고려하며, 여기서 각 추가적인 요법은 방사선 요법, 방사성의약품, 호르몬 요법, 표적화제, 화학치료제, 세포 요법, 또는 유전자 요법으로부터 독립적으로 선택된다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 면역치료제 및 하나 이상의 화학치료제와 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체, 및 임의적으로 하나 이상의 추가적인 요법의 사용을 고려하며, 여기서 각 추가적인 요법은 방사선요법, 방사성의약품, 호르몬 요법, 표적화제, 세포 요법, 또는 유전자 요법으로부터 독립적으로 선택된다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 면역치료제 및 하나 이상의 방사선 요법 또는 방사성의약품과 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체, 및 임의적으로 하나 이상의 추가적인 요법의 사용을 고려하며, 여기서 각 추가적인 요법은 화학치료제, 호르몬 요법, 표적화제, 세포 요법, 또는 유전자 요법으로부터 독립적으로 선택된다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제 및/또는 하나 이상의 ATP-아데노신 측-표적화제와 조합된 본 개시내용의 **섹션 II**의 항-CD39 항체, 및 임의적으로 하나 이상의 추가적인 요법의 사용을 고려하며, 여기서 각 추가적인 요법은 방사선 요법, 방사성의약품, 화학치료제, 표적화제, 면역치료제, 또는 세포 요법으로부터 독립적으로 선택된다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제 및/또는 하나 이상의 ATP-아데노신 측-표적화제, 및 독립적으로 (i) BCR-ABL 키나제 억제제; (ii) EGFR 억제제(예를 들어, EGFR TKI 또는 항-EGFR 항체); (iii) HER-2/neu 수용체 억제제; (iv) 항-혈관생성제(예를 들어, 항-VEGF 항체, VEGFR TKI, VEGF 키나제 억제제 등); (v) AKT 억제제; (vi) BRAF 억제제; (vii) RET 억제제; (viii) MET 억제제; (ix) KRAS 억제제; 및 (x) ALK 억제제로부터 선택된 하나 이상의 억제제와 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체의 사용을 고려한다. 또 다른 구현예에서, 본 개시내용은 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제 및/또는 하나 이상의 ATP-아데노신 측-표적화제, 및 하나 이상의 ICD-유도 요법과 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체의 사용을 고려한다. 상기의 추가 구현예에서 (a) 표적화제는 PI3K 억제제, 아르기나제 억제제, HIF2 α 억제제, AXL 억제제, PAK4 억제제, 또는 항-혈관생성제일 수 있거나; (b) 면역치료제는 ATP-아데노신 측-표적화제, 사이토카인 요법, 면역 체크포인트 억제제, 또는 이의 조합이거나; (c) ATP-아데노신 측-표적화제는 A_{2A}R 및/또는 A_{2B}R 길항제, 또는 CD73 억제제이거나; (d) ATP-아데노신 측-표적화제는 에트루마데난트 또는 캄리클루스타트이거나; (e) 면역치료제는 부디갈리맵, 캄렐리주맵, 코시벨리맵, 도스타를리맵, 세미폴리맵, 예자벤리맵, 니볼루맵, 펌브롤리주맵, 피딜리주맵, 피미발리맵, 레티판리맵, 사산리맵, 스파르탈리주맵, 신틸리맵, 티슬레리주맵, 토리팔리맵, 짐베렐리맵, LY3434172, 아벨루맵, 아테졸리주맵, 발스틸리맵, 더발루맵, 엔바폴리맵, LY3434172 및 KN046으로 이루어진 군으로부터 임의적으로 선택된 항-PD-L1 길항제 항체 또는 항-PD-1 길항제 항체이거나; (f) 면역치료제는 임의적으로 AGEN1327, AB308(WO2021247591), BMS 986207, COM902, 돔바날리맵, EOS-448, 에티길리맵, IBI-929, JS006, M6223, 오시페를리맵, SEA-TGT, 티라글루맵, 비보스톨리맵; 뿐만 아니라 이중특이적 항체 예컨대 AGEN1777 및 AZD2936으로 이루어진 군으로부터 선택된 항-TIGIT 길항제 항체이거나; (g) 면역치료제는 돔바날리맵, AB308, 짐베렐리맵, 티라글루맵, 펌브롤리주맵, 니볼루맵, 아테졸리주맵, 또는 더발루맵이거나; (h), 항-혈관생성제는 파조파닙(pazopanib), 소라페닙(sorafenib), 수니티닙(sunitinib), 베바시주맵(bevacizumab), 악시티닙(axitinib), 렌바티닙(lenvatinib), 티보자닙(tivozanib), 또는 카보잔티닙(cabozantinib)이거나; (i) ICD-유도 요법은 방사선 요법(외부 빔 요법 및 내부 방사선 요법 둘 다 포함), 광역학 요법, 체외 광화학요법, 중앙용해 바이러스요법, 보르테조미드, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미토잔트론, 또는 옥살리플라틴이거나; (j) 이의 임의의 조합이다. 또한 상기의 추가 구현예에서, 본 개시내용은 돔바날리맵, AB308, 에트루마데난트, 캄리클루스타트, 짐베렐리맵, AB521, 또는 이의 임의의 조합과 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체의 사용을 고려한다. 또한 상기의 추가 구현예에서, 본 개시내용은 에트루마데난트, 캄리클루스타트, 또는 에트루마데난트 및 캄리클루스타트와 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체의 사용을 고려한다. 또한 상기의 추가 구현예에서, 본 개시내용은 에트루마데난트, AB521, 또는 에트루마데난트 및 AB521과 조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체의 사용을 고려한다. 또한 상기의 추가 구현예에서, 본 개시내용은 캄리클루스타트, AB521, 또는 캄리클루스타트 및 AB521과

조합된 **섹션 II**의 항-CD39 항체의 사용을 고려한다.

[0237] 추가적인 치료제(들)의 선택은 특정 암 및/또는 대상체 암의 돌연변이 상태 및/또는 질환 단계에 대한 현행 표준 진료에 의해 알려질 수 있다. 상세한 표준 진료 지침은 예를 들어, 미국 종합 암 네트워크(NCCN)에 의해 공개되어 있다. 예를 들면, NCCN 대장암 v3.2021, NCCN 간담도암 v5.2021, NCCN 신장암, v3.2022, NCCN NSCLC v7.2021, NCCN 췌장 선암종 v2.2021, NCCN 식도 및 식도위 접합부 암 v4.2021, NCCN 위암 v5.2021, 난소암 /난관암 /원발성 복막암 v3.2021, 전립선암 v3.2022, 두경부암 v1.2022, 흑색종: 피부 v1.2022, 급성 골수성 백혈병, v1.2022 참조.

[0238] **실험**

[0239] 하기 실시예는 당업자에게 본 개시내용을 제조하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 함께 제공하기 위해 제시되고, 발명자가 그들의 발명으로 고려하는 것의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본 개시내용의 범위 내에 있는 추가적인 항체는 이들 실시예에 예시된 것들에 기반하거나 본원에 기재된 다른 방법에 기반한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 사용된 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하려는 노력이 이루어졌지만, 일부 실험적 오류 및 편차가 고려되어야 한다.

[0240] 달리 표시되지 않는 한, 온도는 섭씨 단위(°C)이고, 압력은 대기압 또는 대기압 부근이다. 다음을 포함하는 표준 약어가 사용된다: rt 또는 r.t.=실온; min=분(들); h 또는 hr=시간(들); ng=나노그램; μ g=마이크로그램; mg=밀리그램; g=그램; kg=킬로그램; μ l 또는 μ L=마이크로리터; ml 또는 mL=밀리리터; l 또는 L=리터; μ M=마이크로몰; mM=밀리몰; M=몰; mol=몰; mmol=밀리몰; nM=나노몰.

[0241] **실시예 1: 항-CD39 항체의 생성**

[0242] 인간 CD39-발현 CHO-K1 세포주, 시노물구스 원숭이 CD39-발현 HEK-293 세포 풀 및 무린 CD39-발현 HEK-293 세포 풀을 생성하였다. 간단히 말해서, CHO-K1 세포 또는 HEK-293 세포(Flip-In™-293 세포)를 제조업체의 프로토콜에 따라 Lipofectamine 2000 형질감염 키트를 사용하여 전장 인간, 시노물구스 원숭이 또는 무린 CD39(각각 서열번호: 7, 서열번호: 8, 서열번호: 71)를 암호화하는 pcDNA3.3 발현 벡터로 형질감염시켰다. 형질감염 48-72 시간 후, 형질감염된 세포를 선택을 위해 블라스티시딘을 함유하는 배지에서 배양하고 CD39 발현에 대해 테스트한 다음, CD39-발현 세포 풀을 수득하였다. 희석을 제한하여 인간, 시노물구스 원숭이 및 무린 CD39-발현 세포주 또는 세포 풀을 수득하고 아래에 기재된 바와 같은 하이브리도마 상청액을 스크리닝하는 데 사용하였다.

[0243] 항-CD39 항체를 생성하기 위해, 6-8주령의 Sprague Dawley 래트 4 마리를 동물 당 단백질 또는 플라스미드 DNA 인 인간 CD39 항원 30-200 mg으로 면역화하였다. 보조요법 혼합물은 Adju-Phos, CpG-ODN 또는 Titer-Max를 포함하였다. 동물에게 발바닥, 피하, 복강내, 근육내, 및 피내 경로를 통해 격주마다 1 회 주사하였다. 혈청 역가는 ELISA 또는 형광 활성화 세포 분류(FACS)로 측정하였다. 주어진 항원에 대한 혈청 항체 역가를 측정하는 데 사용되는 ELISA는 다음과 같이 수행하였다. 플레이트(Nunc)를 1 μ g/mL의 인간 CD39 항원 100 μ L로 4°C에서 밤새 코팅한 다음, 차단 완충액(1 x PBS/ 2% BSA)으로 1시간 동안 주변 온도에서 차단하였다. 래트 혈청을 차단 완충액에서 1:100 희석으로 시작하여 3-배 연속으로 희석하고, 1시간 동안 주변 온도에서 인큐베이션하였다. 혈청 샘플이 첨가되지 않은 웰을 음성 대조군으로 사용하였다. 그런 다음 플레이트를 세척하고 후속적으로 2차 항체, 염소 항-래트 IgG-Fc-HRP(Bethyl)와 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 테트라메틸벤지딘(TMB) 기질을 첨가하고 2M HCl을 첨가하여 인큐베이션을 중단시켰다. 450 nm의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device)를 사용하여 판독하였다. 혈청 항체 역가를 측정하기 위해 사용된 FACS 검정은, 연속으로 희석된 혈청을 사용한 것을 제외하고, 하이브리도마 상청액을 스크리닝하기 위해 일반적으로 기재된 바와 같이 수행하였다(아래 기재됨). 혈청 역가는 양성 신호를 제공하는 최종 희석(즉, 음성 대조군에 비해 >3-배)으로 결정하였다.

[0244] 혈청 역가가 충분히 높으면($\geq 1:24,300$), 동물에게 보조요법 없이 멸균된 PBS 중 단백질 및 세포 막 용해물을 사용하여 최종 부스트를 제공하였다. 48-96시간 후 동물을 안락사시키고, 세포 융합을 위해 림프절 및 비장을 사용하였다.

[0245] 면역화된 동물로부터 림프절 및 비장을 균질화하고 여과하여 혈전 및 세포 파편을 제거하였다. 대수 성장 중인 Sp2/0 골수종 세포를 수집하고 원심분리하였다. B 세포 및 Sp2/0 골수종 세포를 Pronase 용액으로 별도로 처리하였고 100% FBS를 사용하여 반응을 중단시켰다. 세포를 세척하고 계수하였다. B 세포를 일반적인 전기-융합 절차에 따라 전기 융합 용액에서 1:1 비율로 Sp2/0 골수종 세포와 융합시켰다. 융합된 세포를 20% FBS 및 1x HAT가 보충된 DMEM 배지에 재현탁한 다음, 96-웰 플레이트로 옮겼다. 융합된 세포를 37°C 및 5 % CO₂로 설정된

인큐베이터에서 10-14일 동안 유지하였다.

[0246] 하이브리도마 세포를 수확하고 150-200개 세포를 1.5 mL 반고체-HAT 배지에 첨가하였다. 세포를 볼텍스 진동기에서 5-10초 동안 부드럽게 혼합한 다음 6-웰 플레이트에 시딩하였다. 플레이트를 37℃, 5% CO₂로 설정된 인큐베이터에서 7-8일 동안 유지하였다. 각 가시적인 단일 콜로니를 10% FBS가 보충된 DMEM 배지를 포함하는 96-웰 플레이트에 집어 넣었다. 2-3일 후, 세포 상청액을 수집하고 스크리닝하였다.

[0247] 4 회 라운드의 하이브리도마 생성 및 항체 스크리닝을 수행하였으며 여기서 스크리닝 패러다임의 검정 캐스캐이드 순서는 달라졌다. 스크리닝 기준을 충족시키기 위해, 주어진 하이브리도마 클론으로부터 생산된 항체는 무린 CD39 또는 임의의 다른 CD39 계열 구성원, CD39-L1, CD39-L2, CD39-L3 또는 CD39-L4에 대한 측정가능한 결합 없이 높은 친화도로 인간 및 시노물구스 원숭이 세포 CD39 둘 다에 결합하는 데 필요하였다. 항체는 또한 CD39를 과발현하도록 조작된 세포주 및 CD39를 자연적으로 발현하는 인간 세포주, 예를 들어, THP-1, SK-MEL-5 및 MOLP-8 둘 다에서 세포 인간 CD39 효소적 활성의 강력한 억제를 입증하는 데 필요하였다. 첫번째 융합 라운드에서, CHO-K1 세포 기반 인간 CD39 ELISA는 FACS(이전에 기재된 세포주 사용)에 의해 측정된 인간, 시노물구스 원숭이 및 무린 CD39의 세포 과발현에 대한 1차 스크린 및 결합이었고, 시험관내 가용성 인간 CD39 효소적 검정 및 세포 효소적 검정은 2차 스크린이었다. 두번째 융합 라운드는 적합한 하이브리도마 물질을 생산하지 못하였다. 세번째 융합 라운드에서, 가용성 인간 CD39 효소적 검정은 FACS에 의해 측정된 인간 및 무린 CD39의 세포 과발현에 대한 1차 스크린 및 결합이었으며, 인간 CD39-L1 결합 카운터-스크린, 및 확증적인 가용성 인간 CD39 효소적 검정은 2차 스크린이었다. 네번째 융합 라운드에서, THP-1 세포 효소적 검정은 FACS에 의해 측정된 인간 및 시노물구스 원숭이 CD39의 세포 과발현에 대한 1차 스크린 및 결합으로 사용하였고, 확증적인 THP-1 세포 효소적 검정은 2차 스크린이었다. 추가 특성화를 위해 첫번째 라운드의 클론 39 및 세번째 라운드의 클론 19 및 31을 선택하였다. 네번째 라운드에서 선택된 클론은 없었다.

[0248] 세포 표면 상에서 발현된 CD39에 대한 결합을 평가하는 데 사용된 세포 기반 ELISA의 경우, 검정은 일반적으로 다음과 같이 수행하였다. 플레이트(384-웰)를 웰 당 $3-5 \times 10^4$ 개의 세포로 미리 코팅하고 37℃, 5% CO₂로 설정된 인큐베이터에서 2일 동안 배양하였다. 플레이트를 차단 완충액(1 x PBS/ 5% 우유)으로 주변 온도에서 1시간 동안 차단하였다. 그런 다음 30 μ L 하이브리도마 상청액을 플레이트에 첨가하고 1시간 동안 주변 온도에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS로 3 회 세척하고 후속적으로 2차 항체, 염소 항-랫 IgG-Fc-HRP(1:500)와 주변 온도에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, TMB 기질을 각 웰에 첨가하고 플레이트를 주변 온도에서 암실에서 3-5분 동안 인큐베이션하고, 2 M HCl을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 450 nm의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기(Molecular Device)를 사용하여 판독하였다.

[0249] FACS는 또한 앞서 기재된 인간 CD39-발현 CHO-K1 세포주, 시노물구스 원숭이 CD39-발현 HEK-293 세포주, 및 무린 CD39-발현 HEK-293 세포 풀을 사용하여 CD39에 대한 상청액 중 항-CD39 항체의 결합을 검출하는 데 사용하였다. 표지되지 않은 세포를 검출 전 임계값을 설정하기 위한 대조군으로 사용한 다음, 형광 강도 임계값을 초과하는 각 그룹의 백분을 변화를 분석하였다. 웰 당 1×10^5 개의 세포를 100 μ L 부피의 하이브리도마 상청액과 1시간 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 항-인간 CD39 참조 항체는 양성 대조군으로 사용하였다. 인간/랫 IgG 이소형 항체는 음성 대조군으로 사용하였다. 세포를 1 x PBS/ 1% BSA로 세척한 후, Alexa647-표지된 염소 항-인간 항체 또는 염소 항-랫 항체(FACS 염색 완충액에 1:500으로 희석)를 첨가하였다. 세포를 4℃에서 1시간 동안 암실에서 인큐베이션하였다. 유세포 측정기로 세포의 평균 형광 강도(MFI)를 측정하고 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0250] 항-CD39 항체는 ATP를 AMP + 무기 포스페이트로 가수분해하는 인간 CD39 촉매적 기능의 억제를 측정하여, 신호로서 루시페라제 활성 및 발광과 결합된 가용성 CD39 세포외 도메인(ECD) 항원의 효소적 활성을 차단하는 능력을 테스트하였다. 효소 검정은 96-웰 다중 웰 플레이트에서 120 μ L의 최종 부피로 수행하였다. 검정 혼합물을 37℃로 설정된 인큐베이터에서 지시된 인큐베이션 기간 동안 인큐베이션하였다. Tris 마그네슘(TM) 완충액은 25 mM Tris, 5 mM MgCl₂ 및 0.01% BSA를 함유하였다. 억제 항-CD39 항체의 연속 희석은 가용성 인간 CD39를 함유하는 TM 완충 용액(Sino Biological, 카탈로그 번호 16020-H08B)에서 20 nM로부터 시작하여 제조하였다. 희석은 ATP가 있거나 없이 수행하여 기질(ATP) 첨가 전에 항체 및 효소를 미리 혼합하는 것의 영향을 결정하였다. 이소형 대조군으로서, 관련되지 않은 항체를 유사하게 희석하여 항체 매개 CD39 억제의 특이성을 조사하였다. 항체/효소 제제를 37℃로 설정된 인큐베이터에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 20 μ M의 최종 농도의 ATP를 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 효소 활성은 CellTiter-Glo(CTG)를 사용하여 정량화하였다. CTG 발

광 세포 생존력 검정(Promega Corporation)의 CTG 루시퍼라제 시약을 사용하여 남아있는 ATP의 양을 측정하였다.

[0251] 항-CD39 항체의 기능적 활성은 인간 골수 백혈병 단핵 세포주(THP-1)를 사용하여 ATP의 CD39-촉매화 가수분해를 측정함으로써 결정하였다. THP-1 세포를 TM 완충액에 재현탁하고 웰 당 80 μ L 세포를 96-웰 U-플레이트에 웰 당 4×10^4 개 세포 밀도로 시딩한 다음, 웰 당 항체 CD39 용액 40 μ L(다양한 농도, 100 nM에서 1.28 pM까지 TM 완충액에 5-배 연속으로 희석됨)를 플레이트에 첨가하였다. 항체 및 세포를 37°C로 설정된 인큐베이터에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, ATP(TM 완충액 중 50 μ M)를 플레이트에 웰 당 80 μ L 부피로 첨가하고 37°C로 설정된 인큐베이터에서 1시간 동안 유지하였다. 플레이트를 1500 rpm으로 설정된 원심분리기에 5분 동안 놓고 웰 당 50 μ L 상청액을 백색 96-웰 플레이트(Corning, 카탈로그 번호 3903)로 옮겼다. CellTiter-Glo(50 μ L/웰)를 상응하는 웰에 첨가하고 잘 혼합하였다. CD39의 세포 효소 억제제는 다중표지 판독기(Perkin-Elmer Envision Workstation)에서 측정하였다.

[0252] 항-CD39 항체가 인간 CD39에 특이적으로 결합하지만, 다른 CD39 계열 구성원(CD39-L1, CD39-L2, CD39-L3, CD39-L4)과 교차 반응하지 않는지 여부를 테스트하기 위해, 인간 CD39-L1, CD39-L2, CD39-L3, 및 CD39-L4에 대한 항-CD39 항체의 결합을 ELISA로 결정하였다. 간단히 말해서, 96-웰 높은 단백질 결합 ELISA 플레이트(Nunc MaxiSorp, ThermoFisher)를 카르보네이트-비카르보네이트 완충액(20 mM Na_2CO_3 , 180 mM NaHCO_3 , pH 9.2) 중 His-태그된 인간 CD39 교차 계열 단백질: CD39-L1, CD39-L2, CD39-L3, 또는 CD39-L4(0.5 μ g/mL)로 사전 코팅하여 밤새 4°C에서 방치하였다. 다음 날, 플레이트를 웰 당 PBS/ 0.5%(v/v) Tween-20 300 μ L으로 3 회 세척한 다음, PBS/ 2% BSA로 1시간 동안 차단하였다. 차단 후, 플레이트를 3 회 세척하였다. 세척 후, 다양한 농도(100 nM에서 0.36 pM까지 2% BSA/ PBS에서 6-배 연속 희석)의 테스트 항체를 플레이트에 첨가하고 실온으로 설정된 인큐베이터에서 2시간 동안 방치하였다. 사내 CD39-L1 결합 항체는 양성 대조군으로 사용하였고 인간 IgG4 이소형 항체는 음성 대조군으로 사용하였다. 3 회 세척 후, 웰 당 염소 항-인간 IgG Fc-HRP 항체(1:5000) 100 μ L를 첨가하고 플레이트를 실온으로 설정된 인큐베이터에서 1시간 동안 두었다. 발색을 위해, 웰 당 TMB 기질 용액 100 μ L를 플레이트에 첨가하였다. 3-5분 후, 웰 당 2M HCl 100 μ L로 반응을 중단시켰다. 흡광도는 SpectraMax® M5e 마이크로플레이트 분광광도계를 사용하여 450 nm에서 판독하였다. EC_{50} 값은 GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 4-매개변수 비선형 회귀 분석으로 획득하였다.

[0253] 래트 Fc 도메인을 갖는 하이브리도마 클론 19, 하이브리도마 클론 31 및 하이브리도마 클론 39의 항체를 하이브리도마 상청액으로부터 정제하였다. 이들 항체는 본원에서 각각 항체 19, 31, 및 39로 언급된다. 수확된 하이브리도마 상청액을 pH 7.0으로 조정된 후 단백질 A 컬럼 위에 로딩하였다. 결합된 항체를 글리신-HCl(pH 3.5)로 용출시킨 후 즉시 0.1 M Tris(pH 9.0)로 중화시켰다. 단백질을 PBS에 대해 투석하고 0.22 μ m 멤브레인 필터로 여과하였다. 항체 농도는 Nano Drop으로 측정하였다. 항체 순도는 SDS-PAGE 및 HPLC-SEC로 평가하였다.

[0254] 총 RNA는 RNeasy Plus 미니 키트(Qiagen)를 사용하여 하이브리도마 클론 19, 31 및 39로부터 분리하였다. 첫 번째 가닥 cDNA는 올리고 dT를 사용하여 역전사하였다. 항체의 VH 및 VL 유전자를 3'- 불변 영역 축퇴 프라이머 및 5'- 축퇴 프라이머 세트를 사용하여 cDNA로부터 증폭시켰다. 5' 축퇴 프라이머는 Ig 가변 서열의 상류 신호 서열-코딩 영역에 기반하여 설계하였다. 그런 다음 PCR 산물을 pMD18-T 벡터에 절찰시키고 절찰 생성물 10 μ L를 Top10 적격 세포에 형질전환시켰다. 형질전환된 세포를 카르보시닌을 포함한 2x YT 플레이트에 플레이팅하고 37°C로 설정된 인큐베이터에서 밤새 인큐베이션하였다. Biosune에 의한 DNA 서열분석을 위해 12개의 양성 콜로니를 무작위로 선별하였다.

[0255] 클론의 유전자를 포유동물 발현을 위해 코돈 최적화한 다음 GENEWIZ(중국 쑤저우시 소재)에 의해 합성하였다. 생성된 플라스미드는 인간 IgG4 CH1, 힌지, CH2 및 CH3 세그먼트(힌지 돌연변이 S228P 포함)와 융합된 항체 19, 31, 또는 39의 VH 도메인을 포함하는 중쇄를 암호화하는 유전자, 또는 경쇄 내 인간 Ig 카파 CK 도메인과 융합된 VL 도메인을 포함하는 경쇄를 암호화하는 유전자로 구성되었다.

[0256] 항체 ch19_IGG4.P, ch31_IGG4.P, 및 ch39_IGG4.P를 생산하기 위해, 상기 기재된 VH 및 VL 유전자를 함유하는 플라스미드를 Expi293F 세포에 공동 형질감염시켰다. 세포 배양 배지 40 mL 중 95% 초과파의 생존력을 갖는 2.94×10^6 /mL Expi293F 세포를 각 항체에 대해 준비하였다. 1 μ g/mL의 최종 농도의 플라스미드 DNA 및 ExpiFectamine™ 293 형질감염 시약을 혼합한 다음 세포 배양 배지에 첨가하였다. 세포 배양물을 150 rpm의 회전 속도로 플랫폼 진탕기에서 인큐베이션하였다. 온도는 37°C 및 CO_2 수준 8%로 설정된 인큐베이터에서 유지하였다. 6일 동안 인큐베이션 후, 세포를 4000 rpm, 25°C에서 10분 동안 원심분리를 사용하여 펠릿화하였다. 원하는

경우 겔 전기영동, SPR k_{off} 순위지정 및 정제를 위해 상청액을 수집하였다. 상청액은 NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gel(Thermo Fisher)에 대한 지침에 따라 SDS-PAGE 겔에 로딩하였다. PageRuler™ Unstained Protein Ladder(Thermo Fisher)를 항체 샘플과 함께 사용하여 항체의 분자량을 결정하였다.

[0257] 항체를 정제하기 위해, 단백질 A 컬럼을 1 mL MabSelect Sure 수지로 미리 채웠다. 컬럼은 세포 배양 유체를 로딩하기 전에 5 컬럼 부피(CV)의 평형 완충액(0.1 M Tris, pH 7.0)으로 평형화시켰다. 로딩 후, 컬럼을 15 CV의 0.1 M Tris, pH 7.0으로 세척한 후, 8 CV의 0.1 M 글리신, pH 3.5로 용출시켰다. 용출된 샘플을 탈염 컬럼을 사용하여 PBS 완충액으로 완충액 교체하였다. 마지막으로, 정제된 항체를 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC로 분석한 다음, -80℃에서 저장하였다.

[0258] FACS 분석을 사용하여 이전에 기재된 인간 CD39를 과발현하는 CHO-K1 세포 및 시노몰구스 원숭이 또는 무린 CD39를 과발현하는 HEK293 세포에 대한 재조합 항-CD39 항체의 결합을 측정하였다. 세포 CD39 효소적 활성을 억제하는 이들 항체의 능력을 또한 결정하였다. 표 1은 3가지 선택된 항체가 모두 세포 인간 CD39에 대해 높은 친화도를 가지며 세포 인간 CD39의 효소적 활성을 강력하게 억제한다는 것을 보여준다.

[0259] 인간 CD39에 대한 이들 재조합 항-CD39 항체의 동역학 결합은 Biacore 8K 기기를 사용하여 표면 플라스몬 공명 (SPR)에 의해 결정하였다. 재조합 항체는 염소 항-인간 Fc IgG 코팅된 CM5 센서 칩(GE, 카탈로그 번호 29-1496-03)을 사용하여 고정화하였고, 가용성 His-태그된 CD39 ECD 단백질 서열번호: 72(Sino Biological, 카탈로그 번호 16020-H08B)를 분석물로 사용하였다. 결합 상수는 25℃에서 결정하였다. 표 2에 제시된 바와 같이, 3가지 항체는 모두 느린 오프-레이트(off-rate)(k_d) 및 나노몰 이하 평형 해리 상수(K_D)에 의해 측정된 바와 같이 유사하게 높은 결합 친화도를 가졌다.

[0260] 표 1: CHO-K1 또는 HEK293 세포 표면 상에서 과발현된 CD39에 결합하는 재조합 항-CD39 래트/인간 키메라 항체, 및 세포 효소적 활성을 억제하는 이들의 차단 활성.

항-CD39 항체	인간 CD39-CHO-K1 $EC_{50}(nM)$	시노몰구스 원숭이 CD39-HEK293 $EC_{50}(nM)$	인간 THP-1 CD39 억제 $IC_{50}(nM)$
ch19_IGG4.P	9.04	4.30	0.44
ch31_IGG4.P	4.44	2.55	0.090
ch39_IGG4.P	0.79	0.32	0.042

[0261]

[0262] 표 2: His-태그된 인간 CD39 ECD에 결합하는 재조합 래트/인간 키메라 항-CD39 항체의 동역학.

항-CD39 항체	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(M)$
ch19_IGG4.P	9.02E+05	4.00E-04	4.43E-10
ch31_IGG4.P	1.10E+06	1.25E-04	1.13E-10
ch39_IGG4.P	3.48E+05	7.45E-05	2.14E-10

[0263]

[0264] 실시예 2: 인간화 항-CD39 항체의 생성

[0265] CDR 이식 기술을 사용하여 인간화를 위해 래트 항체 31 및 39를 선택하였다(Queen 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:10029-10033, 1989). 항체 31 및 39의 래트 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL) 서열을 사용하여 각 체에 대해 가장 가까운 인간 생식계열을 식별하였다. VH 및 VL 프레임워크에 대한 인간 수용자는 GenBank 데이터베이스 내에서 검색하였다(Benson 등, Nucleic Acids Res. 2005, 33, D34-D38). 프레임워크는 Kabat CDR1이 N-말단에서 5개 아미노산 확장된 경우 확장된 CDR 정의를 사용하여 정의되었다. 상위 3개 히트(hit)를 사용하여 인간화 VH-유전자 및 VL-유전자의 서열을 유도하였고, 이들 각각으로부터 인간화 항체를 발현하기 위해 2개를 선택하였다. 항체 31 VH의 경우, 64.6% 서열 동일성을 갖는 IGHV4-24*01, 및 63.4% 동일성을 갖는 IGHV1-69-2*01을 선택하였고, VL의 경우, 84.8% 서열 동일성을 갖는 IGKV7-3*01, 및 77.2% 동일성을 갖는 IGKV4-1*01을 선택하였다(표 3). 항체 39 VH의 경우, 87.8% 서열 동일성을 갖는 IGHV3-9*01, 및 85.4% 동일성을 갖는 IGHV3-30*15를 선택하였고, VL의 경우, 83.5% 서열 동일성을 갖는 IGKV7-3*01, 및 72.2% 동일성을 갖는 IGKV3-15*01을 선택하였다(표 4).

표 3: 클론 31에 대한 인간 생식계열 및 수용자의 식별.

가변 쇠	인간 생식계열	인간/랫트 동일성(%)	인간 수용자
VH1	IGHV1-24*01	64.6%	M99642
VH2	IGHV1-69-2*01	63.4%	KF698734
VL1	IGKV7-3*01	84.8%	X12682
VL2	IGKV4-1*01	77.2%	Z00023

표 4: 클론 39에 대한 인간 생식계열 및 수용자의 식별.

가변 쇠	인간 생식계열	인간/랫트 동일성(%)	인간 수용자
VH1	IGHV3-9*01	87.8%	M99651
VH3	IGHV3-30*15	85.4%	M77327
VL1	IGKV7-3*01	83.5%	X12682
VL3	IGKV3-15*01	72.2%	M23090

각 인간 수용자에 대한 CDR 이식을 수행하였다. 항체 31의 경우, HC-CDR1(서열번호: 18), HC-CDR2(서열번호: 19), 및 HC-CDR3(서열번호: 20)을 VH 수용자로 사용하였고, LC-CDR1(서열번호: 22), LC-CDR2(서열번호: 25), 및 LC-CDR3(서열번호: 26)을 VL 수용자로 사용하였다. 항체 39의 경우, HC-CDR1(서열번호: 28), HC-CDR2(서열번호: 29), 및 HC-CDR3(서열번호: 30)을 VH 수용자로 사용하였고, LC-CDR1(서열번호: 32), LC-CDR2(서열번호: 33), 및 LC-CDR3(서열번호: 34)을 VL 수용자로 사용하였다. 생성된 서열을 이성질체화, 탈아미노화, 글리코실화 및 산화와 같은 임의의 잠재적인 번역후 변형(PTM) 부위의 도입에 대해 조사하였다. 랫트 서열 역 돌연변이에 적합한 추정 잔기를 또한 항체 상동성 그래픽 모델링을 사용하여 식별하였다. PTM 부위 제거 후, 항체를 김정하여 변화(들)가 모 항체와 비교하여 항원 결합에 영향을 미치는지 여부를 결정하였다.

인간화 유전자를 역 번역하고, 포유동물 발현을 위해 코돈 최적화하고, GENEWIZ에 의해 합성하였다. 합성 유전자를 사내 IgG 발현 벡터로 재클로닝하고, 발현하고, 정제하였다.

항원에 결합하는 정제된 항체의 동역학을 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 사용하여 결정하고 항체 순위를 결정하는데 사용하였다. 인간 CD39 ECD His-태그된 항원(서열번호: 72)에 대한 항-CD39 항체의 친화도는 Biacore 8K 기기를 사용하여 측정하였다. 활성화제는 주사 직전에 400 mM EDC 및 100 mM NHS(GE)를 혼합하여 제조하였다. CM5 센서 칩(GE, 카탈로그 번호 29-1496-03)을 활성화제를 사용하여 420초 동안 활성화하였다. 그런 다음 염소 항-인간 Fc IgG(10 mM NaAc 중 30 µg/mL, pH 4.5)를 10 µL/분의 유속으로 420초 동안 채널에 주입하였다. 칩을 1 M 에탄올아민 염산으로 탈활성화하였다. 항-CD39 항체를 실행 완충액(1x HBS-EP+) 중 4 µg/mL로 희석하였고 10 µL/분의 유속으로 15초 동안 채널에 주입하였다. 6가지 농도(8, 4, 2, 1, 0.5 및 0.25 nM)의 CD39 항원 분석물을 180초의 회합 단계 동안 30 µL/분의 유속으로 채널에 순서대로 주입한 후, 2400초 해리 단계를 거쳤다. 해리 단계 후 글리신(10 mM, pH 1.5)을 재생 완충액으로 주입하였다. 참조 채널 및 완충액 채널에 대한 센서그램을 테스트 센서그램에서 뺐다. 실험 데이터는 1:1 결합 모델 정상 상태 친화도/이중 리간드를 사용하여 피팅하였다. 계산에 사용되는 CD39 항원 및 항-CD39 항체의 분자량은 각각 52 및 145 kDa였다.

항체 39의 인간화 변이체: ch39_IGG4.P의 결합 친화도를 유지하기 위해 K94R 랫트 서열 역 돌연변이를 VH1 쇠(서열번호: 58)에 도입하였지만, R94가 존재하였으므로(서열번호: 59) VH3에 대해 동등한 역 돌연변이는 필요하지 않았다. VL1에 대한 인간 프레임워크는 또한 추가적인 랫트 서열 역 돌연변이 N81D(서열번호: 61)를 도입함으로써 제거된 글리코실화 PTM 부위(⁸¹NDT⁸³)를 도입하였다. VL3(서열번호: 62)에 대해 랫트 서열 역 돌연변이는 필요하지 않았다.

그런 다음 39의 인간화 변이체에 대한 VH1(서열번호: 58) 또는 VH3(서열번호: 59)과 VL1(서열번호: 61) 또는 VL3(서열번호: 62)의 4가지 VH/VL 조합 모두가 발현되었지만, VH1+VL3 쌍은 잘 발현되지 않았다. 변이체의 유전자는 포유동물 발현을 위해 코돈 최적화된 다음 GENEWIZ에 의해 합성되었다: VH 도메인이 중쇄(힌지 돌연변이 S228P 포함) 내 인간 IgG4 CH1, 힌지, CH2 및 CH3 세그먼트와 융합된 VH를 함유하는 플라스미드; 및 VL 도메인이 경쇄 내 인간 Ig 카파 CK 도메인과 융합된 VL을 함유하는 플라스미드.

항체 39의 키메라 rVH+rVL/인간 IgG4(S228P) 변이체와 함께 항체 39의 인간화 IgG4(S228P) 변이체를 위에 기재된 바와 같이 SPR에 의해 분석하였다. 결과는 표 5에 제시되어 있다.

표 5: 항체 39의 인간화 IgG4(S228P) 변이체에 대한 동역학 결합 친화도 데이터.

항-CD39 항체	VH+VL	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(M)$
ch39_IGG4.P	rVH+rVL	2.80E+05	9.40E-05	3.36E-10
hu39.2_IGG4.P	VH1+VL1	5.35E+05	5.01E-05	9.36E-11
hu39.3_IGG4.P	VH1+VL3	4.55E+05	1.16E-04	2.54E-10
hu39.4_IGG4.P	VH3+VL1	2.79E+05	5.15E-05	1.85E-10
hu39.6_IGG4.P	VH3+VL3	2.70E+05	9.38E-05	3.47E-10

추가적인 래트 서열 역 돌연변이(I2T)를 VL1 프레임워크(서열번호: 60) 및 VL3 프레임워크(서열번호: 63)에 도입하였고, 항체를 발현하고 분석하였지만, VH1+VL3 쌍은 잘 발현되지 않았다. 표 6은 이들 항체 변이체에 대한 SPR 데이터를 보여준다.

표 6: 클론 39 인간화 IgG4 항체에 대한 동역학 결합 친화도 데이터.

항-CD39 항체	VH+VL	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(M)$
hu39.1_IGG4.P	VH1+VL1	3.35E+05	4.59E-05	1.37E-10
hu39.8_IGG4.P	VH1+VL3	5.67E+05	8.50E-05	1.50E-10
hu39.5_IGG4.P	VH3+VL1	3.11E+05	3.75E-05	1.21E-10
hu39.7_IGG4.P	VH3+VL3	3.08E+05	5.87E-05	1.91E-10

항체 39의 인간화 변이체는 세포 인간 CD39에 대한 높은 친화도를 보여주고 세포 인간 CD39의 효소적 활성을 강력하게 억제한다(표 7).

표 7: CHO-K1 또는 HEK293 세포 표면 상에서 과발현된 CD39에 결합하는 인간화 IgG4 항-CD39 항체, 및 세포 효소적 활성을 억제하는 이들의 차단 활성.

항-CD39 항체	인간 CD39-CHO-K1 EC ₅₀ (nM)	시노물구스 원숭이 CD39-HEK293 EC ₅₀ (nM)	인간 THP-1 CD39 억제 IC ₅₀ (nM)
hu39.1_IGG4.P	0.43	0.091	0.094
hu39.5_IGG4.P	0.44	0.088	0.10
hu39.7_IGG4.P	0.46	0.11	0.080

항체 31의 인간화 변이체: ch31_IGG4.P의 결합 친화도를 유지하기 위해, 다음 래트 서열 역 돌연변이를 VH1 쇠: E71S, D76N 및 A78V(서열번호: 43)에 도입하였고; 역 돌연변이 D76N 및 A78V를 VH2 쇠(서열번호: 44)에 도입하였다. 항체 31은 LC CDR1에 글리코실화 PTM 부위 서열(²⁶NQT²⁸)을 가지고 있다. 이는 VL1에서 Q27P(서열번호: 45) 또는 N26Q(서열번호: 46)로 돌연변이되고, VL2에서 N26Q(서열번호: 49)로 돌연변이되었다. VL1에 대한 인간 프레임워크에 또한 추가적인 래트 서열 역 돌연변이 N81D(각각 서열번호: 47 및 서열번호: 48)를 도입함으로써 제거된 글리코실화 PTM 부위(⁸¹NDT⁸³)를 도입하였다. VL2에 대한 래트 서열 역 돌연변이는 필요하지 않았다.

항체 31의 인간화 변이체에 대한 VH1(서열번호: 43) 또는 VH2(서열번호: 44)와 VL1(서열번호: 45, 서열번호: 46, 서열번호: 47, 또는 서열번호: 48) 또는 VL2(서열번호: 49)의 4가지 VH/VL 조합 모두가 발현되었지만, VH1+VL2 쌍은 잘 발현되지 않았다. 변이체의 유전자는 포유동물 발현을 위해 코돈 최적화된 다음 GENEWIZ에 의해 합성되었다: VH 도메인이 중쇄(힌지 돌연변이 S228P 포함) 내 인간 IgG4 CH1, 힌지, CH2 및 CH3 세그먼트에 융합된 VH를 함유하는 플라스미드; 및 VL 도메인이 경쇄 내 인간 Ig 카파 CK 도메인에 융합된 VL을 함유하는 플라스미드.

항체 31의 키메라 rVH+rVL/인간 IgG4(S228P) 변이체와 함께 항체 31의 인간화 IgG4(S228P) 변이체를 위에 기재된 바와 같이 SPR에 의해 합성하였다. 결과는 표 8에 제시되어 있다.

[0287] 표 8: 클론 31 인간화 IgG4 항체에 대한 동역학 결합 친화도 데이터.

항-CD39 항체	VH+VL	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(M)$
ch31_IGG4.P	rVH+rVL	1.16E+06	1.50E-04	1.29E-10
hu31.4_IGG4.P	VH1+VL1	1.11E+06	1.96E-04	1.76E-10
hu31.6_IGG4.P	VH2+VL1	1.12E+06	6.84E-04	6.13E-10
hu31.7_IGG4.P	VH2+VL2	1.24E+06	6.15E-04	4.96E-10

[0288]

[0289] 항체 31의 인간화 변이체는 세포 인간 CD39에 대한 높은 친화도를 나타내고 세포 인간 CD39의 효소적 활성을 강력하게 억제한다(표 9).

[0290] 표 9: CHO-K1 또는 HEK293 세포 표면 상에서 과발현된 CD39에 결합하는 인간화 IgG4 항-CD39 항체, 및 세포 효소적 활성을 억제하는 이들의 차단 활성.

항-CD39 항체	인간 CD39-CHO-K1 $EC_{50}(nM)$	시노몰구스 원숭이 CD39-HEK293 $EC_{50}(nM)$	인간 THP-1 CD39 억제 $IC_{50}(nM)$
hu31.4_IGG4.P	1.70	0.78	0.26
hu31.6_IGG4.P	1.69	0.81	0.30
hu31.7_IGG4.P	1.83	1.01	0.25

[0291]

[0292] CDR 이식 적용을 통해 항체 31 및 항체 39 둘 다에 대한 인간화 변이체를 수득한 후, 인간 가변 도메인 프레임 워크에 대한 소수의 래트 서열 역 돌연변이를 수득하였다. 이들 항체는 각각의 래트/인간 키메라 항체의 결합 친화도 및 억제 효능을 유지하거나 개선하였다.

[0293] 실시예 3: SPR에 의한 전체 동역학 결합 특성화

[0294] 포유동물 발현을 위해 코돈 최적화된 hu31.4_IGG4.P 및 hu39.5_IGG4.P 인간화 항체의 VH 및 VL 도메인에 대한 유전자를 사용하여 인간 IgG1 변이체를 생성하였다. VH 도메인이 L234A 및 L235A(Eu 번호지정) 돌연변이(서열번호: 2)를 포함하는 중쇄(HC) 내 인간 IgG1 CH1, 힌지, CH2 및 CH3 불변 도메인 세그먼트와 융합된 VH를 함유하는 플라스미드, 및 VL 도메인이 경쇄(LC) 내 인간 Ig 카파 CK 불변 도메인(서열번호: 6)과 융합된 VL을 함유하는 플라스미드를 CHO-K1 세포에 형질감염시켰다. 항체 hu31.4_IGG1.AA(서열번호: 51을 갖는 HC 및 서열번호: 56을 갖는 LC) 및 hu39.5_IGG1.AA(서열번호: 66을 갖는 HC 및 서열번호: 67을 갖는 LC)를 빠르고 안정된 폴 프로토콜을 사용하여 발현하고 단백질을 A 친화성 크로마토그래피로 정제한 후 크기 배제 크로마토그래피(SEC)로 >95% 순도까지 정제하였으며, SEC-HPLC 분석에 의해 확인하였다.

[0295] 항체 hu31.4_IGG1.AA 및 hu39.5_IGG1.AA를 Biacore 4000 기기를 사용하여 SPR에 의해 분석하였다. 동역학 결합 특성화는 2가지 모드로 수행하였다. "1가 친화도 모드"에서, 테스트 항체는 7가지 상이한 밀도로 아민 결합된 염소 항-인간 IgG 코팅된 CM3 센서 칩으로 코팅된 CM3 센서 칩(GE, 카탈로그 번호 29-1049-90)을 사용하여 포획하였다. 가용성 인간 CD39 ECD His-태그된 항원(Sino Biological, 카탈로그 번호 16020-H08B)은 분석물이었으며; 33.3 μM 로 제조된 스톱 용액을 가장 높은 농도로서 33 nM로 희석하고 항체 표면에 대해 3-배 희석 시리즈로 삼중으로 테스트하였다. "2가 결합력 결합력 모드"에서, 가용성 인간 CD39 ECD His-태그된 항원을 6가지 상이한 밀도로 CM3 센서 칩에 아민 결합시켰다. 분석물에 대한 테스트 항체는 33.3 μM 스톱 용액으로 제조하고, 가장 높은 농도로서 100 nM로 희석하고 CD39 표면에 대해 3-배 희석 시리즈로 삼중으로 테스트하였다. 실행 완충액은 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% tween-20 및 0.2 mg/mL BSA를 함유하였다. 다중 주입이 분석물의 농도가 증가함에 따라 수행되고 해리 단계가 1시간 동안 모니터링된 경우 단일 주기 동역학을 사용하여 데이터를 수집하였다. 모든 데이터는 25°C에서 수집하였다. 6 또는 7가지 표면 밀도 모두의 반응 데이터는 형성된 복합체의 최대 양에 대한 반응인 로컬 R_{max} 를 사용하여 1:1 상호작용 모델에 피팅하였다. 1가 친화도 모드에서 수행된 실험에 대한 결과는 표 10에 제시되어 있고, 2가 결합력 모드에 대해서는 표 11에 제시되어 있다.

[0296] 항체 hu31.4_IGG1.AA 및 hu39.5_IGG1.AA는 센서 칩에 포획된 항체 및 분석물로서 가용성 CD39 ECD를 사용하여 1가 친화도 모드로 분석되는 경우 유사한 평형 해리 상수(K_D)를 갖는다. 그러나, 센서 칩에 포획된 CD39 ECD와 결합하는 2가 항체 및 분석물로서 가용성 항체를 허용하는 모드로 분석되는 경우, hu31.4_IGG1.AA는 항원 표면 밀도와 무관한 1가 모드로 분석될 때 수득된 것과 매우 유사한 K_D 를 나타내었다. 대조적으로, hu39.5_IGG1.AA는 항원 표면 밀도에 따라 최대 3 자릿수 더 낮은 K_D 를 나타내었으며, 이는 이 항체가 칩의 표면 상에 고정화된 하

나 초과의 CD39 분자에 2가 모드로 결합할 수 있음을 나타내며 따라서 결합력으로 인해 향상된 동역학 결합 친화도를 나타낸다.

표 10: 고정화된 항체 및 가용성 CD39 ECD 분석물로 수행된 SPR의 hu31.4_IGG1.AA 및 hu39.5_IGG1.AA에 대한 동역학 데이터.

항-CD39 항체	R _{max} (RU)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (M)
hu31.4_IGG1.AA	244.80(3)	1.36(1)E+06	2.510(1)E-04	1.85(1)E-10
	177.77(4)	1.51(2)E+06	2.877(1)E-04	1.90(2)E-10
	125.98(2)	1.36(1)E+06	2.941(1)E-04	2.16(2)E-10
	120.12(1)	1.21(1)E+06	3.039(1)E-04	2.52(1)E-10
	50.588(7)	2.96(1)E+06	3.022(1)E-04	1.02(1)E-10
	48.40(1)	2.24(2)E+06	3.377(1)E-04	1.51(1)E-10
	31.787(5)	1.56(1)E+06	3.389(1)E-04	2.18(1)E-10
평균		1.7[6]E+06	3.0[3]E-04	1.9[5]E-10
hu39.5_IGG1.AA	268.14(4)	2.55(1)E+05	7.601(6)E-05	2.98(2)E-10
	255.16(3)	3.03(2)E+05	7.695(5)E-05	2.54(1)E-10
	211.73(2)	3.06(2)E+05	7.043(5)E-05	2.30(1)E-10
	89.36(1)	3.13(2)E+05	7.511(6)E-05	2.40(2)E-10
	84.17(1)	3.44(2)E+05	7.120(5)E-05	2.07(1)E-10
	66.79(1)	2.75(2)E+05	7.149(5)E-05	2.60(1)E-10
	64.50(1)	3.34(2)E+05	6.581(5)E-05	1.97(1)E-10
평균		3.0[3]E+05	7.2[4]E-05	2.4[3]E-10
참고: 괄호 안의 숫자는 비선형 최소 제곱 피팅 루틴으로부터 마지막 보고된 숫자의 표준 오차를 나타낸다. 괄호 안의 숫자는 상이한 밀도 표면의 평균에서 취한 실험 편차를 나타낸다.				

표 11: 고정화된 CD39 ECD 및 가용성 항체 분석물로 수행된 SPR의 hu31.4_IGG1.AA 및 hu39.5_IGG1.AA에 대한 동역학 데이터.

항-CD39 항체	R _{max} (RU)	k _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _d (s ⁻¹)	K _D (M)
hu31.4_IGG1.AA	1568.5(1)	1.634(4)E+05	9.97(2)E-06	6.11(2)E-11
	896.01(8)	2.621(4)E+05	2.753(4)E-05	1.050(2)E-10
	225.80(5)	2.493(8)E+05	5.87(1)E-05	2.356(9)E-10
	38.30(2)	3.13(2)E+05	1.590(2)E-04	5.07(4)E-10
	9.67(1)	6.4(1)E+05	2.482(7)E-04	3.86(7)E-10
	1.472(2)	5.9(1)E+05	2.50(1)E-04	4.3(1)E-10
평균		4[2]E+05	1[1]E-04	3[2]E-10
hu39.5_IGG1.AA	2230.22(5)	3.331(6)E+05	1.2(1)E-07	4(3)E-13
	524.16(1)	6.828(9)E+05	4.48(1)E-06	6.56(2)E-12
	420.45(2)	1.518(5)E+06	1.514(2)E-05	9.98(3)E-12
	96.66(1)	3.02(2)E+06	4.946(7)E-05	1.64(1)E-11
	58.42(2)	3.73(5)E+06	8.25(1)E-05	2.21(3)E-11
	7.757(3)	4.34(7)E+06	1.115(2)E-04	2.57(4)E-11
평균		2[2]E+06	4.4[5]E-05	1[1]E-11
참고: 괄호 안의 숫자는 비선형 최소 제곱 피팅 루틴으로부터 마지막 보고된 숫자의 표준 오차를 나타낸다. 괄호 안의 숫자는 상이한 밀도 표면의 평균에서 취한 실험 편차를 나타낸다.				

실시예 4: 내인성 인간 CD39에 항-CD39 항체의 결합

항체 19, 31, 및 39의 변이체를 1차 인간 세포의 표면에 대한 결합에 대해 테스트하였다. 결합은 ATP의 부재 및 높은 ATP(400 μM)의 존재 하에 평가하였다.

정제된 단핵구 결합: 항체를 유세포 측정법에 의해 1차 인간 단핵구(CD14⁺)의 세포 표면 상에서 발현된 인간 CD39에 대한 결합에 대해 테스트하였다. 단핵구는 EasySep 인간 CD14 양성 선택 키트 II(Stem Cell, 카탈로그

번호 17858)를 사용하여 말초 혈액(leukopak 또는 LRS 챔버)에서 양성으로 선택하고, Bambanker(Wako, 카탈로그 번호 302-14681)에서 동결시키고, 향후 사용을 위해 액체 질소에 저장하였다. 검정 당일에, 동결된 단핵구를 해동하고, 행구고, DPBS 중 1:25 Fc 블록(BD, 카탈로그 번호 564220) 및 1:250 수성 생존력 염료(Invitrogen, 카탈로그 번호 L34966A)에 재현탁하고 15분 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션하였다. 폴리프로필렌 v-바닥 96-웰 플레이트에서, 세포를 웰 당 $0.2 - 0.5 \times 10^6$ 개 세포로 플레이팅하였다. 0 또는 400 μ M ATP를 첨가하고 30분 동안 4℃에서 인큐베이션한 후 테스트 항체를 첨가하고 추가로 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. DPBS로 2 회 세척한 후, 항체 검출을 위해 1 μ g/mL의 PE 표지된 마우스 항-인간 IgG4 2차(Southern Biotech, 카탈로그 번호 9200-09)를 30분 동안 4℃에서 첨가하였다. DPBS로 2 회 세척한 후, 세포를 50 μ L IC 고정 완충액(Invitrogen, 카탈로그 번호 00-8222-49)으로 20분 동안 실온에서 고정시켰다. 그런 다음 세포를 1 회 세척하고 DPBS에 재현탁하고 BD LSR Fortessa X-20 세포 분석기를 사용하여 유세포 측정법에 적용하였다. 살아있는 단일 세포 집단에 대해 PE의 형광 강도에 대한 기하 평균을 획득하였다. EC₅₀ 값은 GraphPad Prism의 표준 4-매개변수 곡선 피팅을 사용하여 계산하였다(표 12).

[0304] 표 12: 정제된 인간 단핵구 상의 인간 CD39에 결합하는 항체의 EC₅₀(nM) 값. 이 표의 데이터는 1 명의 생물학적 공여자를 나타낸다.

항-CD39 항체	0 μ M ATP	400 μ M ATP
ch19_IGG4.P	61	49
ch31_IGG4.P	27	28
hu31.2_IGG4.P	15	25
hu31.3_IGG4.P	7.7	26
hu31.4_IGG4.P	16	26
ch39_IGG4.P	0.69	1.3
hu39.1_IGG4.P	1.2	1.4
hu39.4_IGG4.P	1.4	10
hu39.5_IGG4.P	3.9	10
hu39.6_IGG4.P	3.5	6.5
hu39.7_IGG4.P	5.7	6.9

[0305]

[0306] PBMC 결합: 항체 31 및 항체 39의 IgG1 이소형 변이체를 또한 유세포 측정법에 의해 CD14⁺(단핵구) 및 CD19⁺(B 세포) 집단에 게이트된 PBMC의 세포 표면 상에서 발현된 인간 CD39에 대한 결합에 대해 테스트하였다. 이 실험에서, 본원에서 huBMK2_IGG1.AEASS로 언급된, 인간 CD39에 결합하고 억제하는 것으로 보고된 항체는 비교자로 사용하였다. huBMK2_IGG1.AEASS에 대한 성숙한 중쇄의 아미노산 서열은 서열번호: 73이다. huBMK2_IGG1.AEASS에 대한 성숙한 경쇄의 아미노산 서열은 서열번호: 74이다. 이전에 정제된, 동결된 PBMC를 해동하고, 행구고, DPBS 중 1:25 Fc 블록(BD, 카탈로그 번호 564220) 및 1:250 수성 생존력 염료(Invitrogen, 카탈로그 번호 L34966A)에 재현탁하고 15분 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 DPBS로 세척하고 여과된 염색 완충액: 5% 염소 혈청이 보충된 DPBS(Gibco, 카탈로그 번호 16210-064)에 재현탁하였다. 폴리프로필렌 v-바닥 96-웰 플레이트에서, 세포를 염색 완충액에 웰 당 0.5×10^6 개 세포로 플레이팅하였다. 0 또는 400 μ M ATP를 첨가하고 30분 동안 4℃에서 인큐베이션한 후 테스트 항체를 첨가하고 추가 30-분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 염색 완충액으로 2 회 세척한 후, 0.8 μ g/테스트 CD14 FITC(Invitrogen, 카탈로그 번호 11-0149-42, 클론 61D3) 및 0.5 μ g/테스트 CD19 eFluor 450(eBioscience, 카탈로그 번호 48-0199-42, 클론 HIB19)을 PBMC에 첨가하였다. 테스트 항체에 의한 CD39 결합을 0.5 μ g/mL의 PE 표지된 염소 항-인간 IgG(Southern Biotech, 카탈로그 번호 2048-09)로 30분 동안 4℃에서 검출하였다. 그런 다음 세포를 세척하고 DPBS에 재현탁하고 BD LSR Fortessa X-20 세포 분석기를 사용하여 유세포 측정법에 적용하였다. 단핵구(CD14⁺) 또는 B 세포(CD19⁺)에서 게이트된 살아있는 단일 세포 집단에 대해 PE의 형광 강도에 대한 기하 평균을 획득하였다. EC₅₀ 값(표 13)은 GraphPad Prism의 표준 4-매개변수 곡선 피팅을 사용하여 계산하였다. 1 명의 공여자로부터의 대표적인 그래프는 도 1에 제시되어 있다.

[0307] 표 13: 인간 PBMC 내 단핵구 및 B 세포 상의 인간 CD39에 결합하는 항체의 EC₅₀(nM). 보고된 오차는 평균의 표

준 오차(SEM)이다. N은 확실한 생물학적 공여자이다.

	단핵구		B 세포	
	0 μ M ATP	400 μ M ATP	0 μ M ATP	400 μ M ATP
hu31.4_IGG1.AA	-	-	1 $\pm$ 0.3, N = 8	1 $\pm$ 0.3, N = 6
hu39.5_IGG1.AA	0.3 $\pm$ 0.04, N = 8	0.5 $\pm$ 0.3, N = 6	0.2 $\pm$ 0.06, N = 8	0.3 $\pm$ 0.09, N = 6
huBMK2_IGG1.AEASS	1 $\pm$ 0.3, N = 8	1 $\pm$ 0.2, N = 6	0.9 $\pm$ 0.09, N = 8	0.8 $\pm$ 0.08, N = 6

전적으로, 항체 19, 31, 39의 변이체는 1차 세포의 표면에 대한 강력한 결합을 보여주었다. 효능은 39개 변이체 > 31개 변이체 > 19개 변이체인 것으로 결정되었다. 변이체 31 및 39의 효능 순위 결정은 IGG4.P에서 IGG1.AA로 이소형 전환으로 유지되었고 효능은 높은 ATP의 존재 하에 유지되었다. 항체 31의 인간화 IgG1 변이체인 hu31.4_IGG1.AA, 및 항체 39의 인간화 IgG1 변이체인 hu39.5_IGG1.AA는 이전에 기재된 항-CD39 항체와 비교하여 강력한 결합을 보여주었으며, hu39.5_IGG1.AA > huBMK2_IGG1.AEASS > hu31.4_IGG1.AA였다.

실시예 5: 인간 CD39 효소적 활성의 억제

항체 19, 31, 및 39의 변이체를 인간 CD39 효소적 활성의 억제에 대해 테스트하였다. 억제는 환자 종양 샘플에서 유래된 1차 인간 세포 또는 인간 세포주의 세포 표면 상에서 발현된 가용성, 제조합 CD39 및 CD39를 사용하여 평가하였다. 억제는 낮은 ATP 및 높은 ATP(각각 20 μ M 및 400 μ M)의 존재 하에 평가하였다.

제조합 CD39 억제: 이전 실시예에 기재된 항체가 CD39 효소적 활성을 억제하는 효능을 먼저 제조합 인간 CD39를 사용하여 평가하였다. 제조합 인간 CD39 생화학 검정을 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 및 0.01% BSA로 이루어진 검정 완충액에서 수행하였다. 테스트 항체의 14 점, 1:3 마스터 연속 희석을 검정 완충액에서 제조하여 최종 농도 범위가 200 nM 내지 0.125 pM에 걸쳐 하였다. 검정 완충액 중 5배 최종 농도의 테스트 항체 5 마이크로리터를 384-웰 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 검정 완충액에 재현탁된 1.56 nM의 제조합 인간 CD39 10 마이크로리터를 각 웰에 첨가하고 플레이트를 추가 60분 동안 37°C에서 인큐베이션한 후 검정 완충액 중 50 μ M ATP 10 μ L를 첨가하였다. 최종 검정 조건은 0.625 nM의 제조합 인간 CD39 및 20 μ M의 ATP 기질로 구성되었다. 37°C에서 추가 30분 인큐베이션한 후, 키나제 Glo Plus 시약 25 μ L를 384-웰 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 반응은 제조업체의 프로토콜에 따라 키나제-Glo 시약 키트(Promega, 카탈로그 번호 V3771)를 사용하여 측정하였다. CD39 억제 후 남아있는 ATP의 양은 생성된 발광의 함수로서 평가하고 발광 필터가 장착된 Envision 2102 다중표지 판독기를 사용하여 정량화하였다. CD39 효소적 활성은 남아있는 ATP 수준의 상관관계로 평가하였다. 각 테스트 웰의 최대 활성 백분율은 검정 완충액(최대 활성, 0% 억제) 및 효소 없음 대조군 웰(기준선 활성, 100% 억제)에 기반하여 계산하였다. 테스트 항체의 IC₅₀ 값은 표준 4개 매개변수 피트 방정식을 사용하여 피팅된 용량 반응 곡선으로부터 결정하였다. 데이터는 표 14에 제시되어 있다.

표 14: 가용성, 제조합 CD39에 대한 항체의 효능.

항-CD39 항체	IC ₅₀ (nM)	최대 억제(%)
ch19_IGG4.P	1.8	100%
ch31_IGG4.P	1.3	100%
hu31.4_IGG1.AA	0.30	86%
ch39_IGG4.P	2.3	100%
hu39.1_IGG4.P	0.26	92%
hu39.5_IGG1.AA	0.19	80%

SK-MEL-5 CD39 억제: CD39 효소적 활성의 억제를 또한 환자 유래 종양 샘플에서 확립된 흑색종 세포주인 SK-MEL-5 세포를 사용하여 평가하였다. 실험 당일에, 이전에 동결된 SK-MEL-5 세포의 1개 바이알을 해동하고, 세포를 20 mM HEPES, pH 7.4, 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 4.2 mM NaHCO₃ 및 0.1% 글루코스로 이루어진 검정 완충액 10 mL에 재현탁하였다. 항-CD39 항체의 14 점, 1:3 마스터 연속 희석을 검정 완충액에 제조하여 최종 농도 범위가 100 nM 내지 0.063 pM에 걸쳐 하였다. 검정 완충액 중 5배 최종 농도의 테스트 항체 20 마이크로리터를 96-웰 둥근 바닥 폴리프로필렌 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. SK-MEL-5 세포 40 마이크로리터를 각 웰에 첨가하고 플레이트를 추가 60분 동안 37°C에서 인큐베이션한 후 검정 완충액 중 50 μ M ATP 40 μ L를 첨가하였다. 최종 검정 조건은 웰 당 10,000개 세포 및 20 μ M의 ATP 기질로 구성되었다. 37°C 및 5% CO₂에서 추가 60분 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 225xg에서 10분 동안 원심분리하였다. 상청액 30 마이크로리터를

96-웰 검정 플레이트(Corning, 카탈로그 번호 3912)로 옮기고 반응물에 남아있는 ATP의 양을 제조업체의 프로토콜에 따라 키나제-Glo 시약 키트(Promega, 카탈로그 번호 V3771)를 사용하여 측정하였다. CD39 억제 후 남아있는 ATP의 양은 생성된 발광의 함수로서 평가하였고 발광 필터가 장착된 Envision 2102 다중표지 판독기를 사용하여 정량화하였다. CD39 효소적 활성은 남아있는 ATP 수준의 상관관계로 평가하였다. 각 테스트 웰의 최대 활성 백분율은 검정 완충액(최대 활성, 0% 억제) 및 세포 없음 대조군 웰(기준선 활성, 100% 억제)에 기반하여 계산하였다. 테스트 항체의 IC₅₀ 값은 표준 4개 매개변수 피트 방정식을 사용하여 피팅된 용량 반응 곡선으로부터 결정하였다. 데이터는 표 15에 제시되어 있다.

표 15: SK-MEL-5 세포의 표면 상에서 발현된 CD39에 대한 항체의 효능.

항-CD39 항체	IC ₅₀ (nM)	최대 억제(%)
ch19_IGG4.P	5.4	55%
ch31_IGG4.P	2.4	63%
hu31.3_IGG4.P	0.61	71%
hu31.4_IGG4.P	1.1	71%
ch39_IGG4.P	0.56	63%
hu39.1_IGG4.P	0.16	65%
hu39.4_IGG4.P	0.13	60%
hu39.5_IGG4.P	0.14	66%
hu39.6_IGG4.P	0.12	55%
hu39.7_IGG4.P	0.20	65%

THP-1 CD39 억제: CD39 효소적 활성의 억제는 두번째 종양 세포주, 구체적으로 급성 단핵구성 백혈병 환자에서 유래된 인간 단핵구성 세포주에서 평가하였다. 실험 당일, 이전에 동결된 THP-1 세포의 1개 바이알을 해동하고 세포를 20 mM HEPES, pH 7.4, 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 4.2 mM NaHCO₃ 및 0.1% 글루코스로 이루어진 검정 완충액 10 mL에 재현탁하였다. 항-CD39 항체의 14 점, 1:3 마스터 연속 희석을 검정 완충액에서 제조하여 최종 농도 범위가 100 nM 내지 0.063 pM에 걸치게 하였다. 검정 완충액 중 5배 최종 농도의 테스트 항체 20 마이크로리터를 96-웰 둥근 바닥 폴리프로필렌 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. THP-1 세포 40 마이크로리터를 각 웰에 첨가하고 플레이트를 추가 60분 동안 37°C에서 인큐베이션한 후 검정 완충액 중 50 μM ATP 40 μL를 첨가하였다. 최종 검정 조건은 웰 당 40,000개 세포 및 20 μM의 ATP 기질로 구성되었다. 37°C 및 5% CO₂에서 추가 60분 동안 인큐베이션 후, 플레이트를 225xg에서 10분 동안 원심분리하였다. 상청액 30 마이크로리터를 96-웰 검정 플레이트(Corning, 카탈로그 번호 3912)로 옮기고 반응물에 남아있는 ATP의 양을 제조업체의 프로토콜에 따라 키나제-Glo 시약 키트(Promega, 카탈로그 번호 V3771)를 사용하여 측정하였다. CD39 억제 후 남아있는 ATP의 양은 생성된 발광의 함수로 평가하였고 발광 필터가 장착된 Envision 2102 다중표지 판독기를 사용하여 정량화하였다. CD39 효소적 활성은 남아있는 ATP 수준의 상관관계로 평가하였다. 각 테스트 웰의 최대 활성 백분율은 검정 완충액(최대 활성, 0% 억제) 및 세포 없음 대조군 웰(기준선 활성, 100% 억제)에 기반하여 계산하였다. 테스트 항체의 IC₅₀ 값은 표준 4개 매개변수 피트 방정식을 사용하여 피팅된 용량 반응 곡선으로부터 결정하였다. 데이터는 표 16에 제시되어 있다.

[0319] 표 16: THP-1 세포의 표면 상에서 발현된 CD39에 대한 항체의 효능.

항-CD39 항체	IC ₅₀ (nM)	최대 억제(%)
ch19_IGG4.P	0.75	75%
ch31_IGG4.P	0.14	86%
hu31.3_IGG4.P	0.080	79%
hu31.4_IGG4.P	0.095	73%
hu31.4_IGG1.AA	0.53	62%
ch39_IGG4.P	0.11	67%
hu39.1_IGG4.P	0.077	78%
hu39.4_IGG4.P	0.064	76%
hu39.5_IGG4.P	0.062	83%
hu39.6_IGG4.P	0.058	79%
hu39.7_IGG4.P	0.071	77%
hu39.5_IGG1.AA	0.075	55%

[0320]

[0321] 정제된 단핵구 CD39 억제: 효능은 1차 인간 단핵구를 사용하여 추가적으로 평가하였다. 실험 당일, 이전에 동결된 CD14⁺ 양성으로 선택된 인간 단핵구(공여자 1003773) 세포의 2개 바이알을 해동하고, 세포를 20 mM HEPES, pH 7.4, 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 4.2 mM NaHCO₃ 및 0.1% 글루코스로 이루어진 검정 완충액 10 ml에 재현탁하였다. 테스트 항체의 14 점, 1:3 마스터 연속 희석을 검정 완충액에 제조하여 최종 농도 범위가 200 nM 내지 0.13 pM에 걸쳐 하였다. 검정 완충액 중 5배 최종 농도의 테스트 항체 20 마이크로리터를 96-웰 둥근 바닥 폴리프로필렌 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 인간 단핵구 세포 40 마이크로리터를 각 웰에 첨가하고 플레이트를 추가 60분 동안 37°C에서 인큐베이션한 후 검정 완충액 중 50 μM 또는 1000 μM ATP 40 μL를 첨가하였다. 최종 검정 조건은 웰 당 20,000개 세포 및 20 μM 또는 400 μM의 ATP 기질로 구성되었다. 37°C 및 5% CO₂에서 추가 60분 동안 인큐베이션 후, 플레이트를 225xg에서 10분 동안 원심분리하였다. 상청액 15 마이크로리터를 96-웰 검정 플레이트(Corning 카탈로그 번호 3912)로 옮기고 반응 시 생산된 AMP의 양을 제조업체의 프로토콜에 따라 AMP-Glo 시약 키트(Promega, 카탈로그 번호 5012)를 사용하여 측정하였다. 400 μM ATP 기질을 함유하는 반응 플레이트의 상청액을 검정 완충액으로 1:8 배 희석한 후 옮기고 AMP-Glo 시약을 첨가하였다. CD39 억제 후 생산된 AMP의 양은 생성된 발광의 함수로서 평가하고 발광 필터가 장착된 Envision 2102 다중표지 판독기를 사용하여 정량화하였다. CD39 효소적 활성은 AMP 수준의 상관관계로 평가하였다. 각 테스트 웰의 최대 활성 백분율은 검정 완충액(최대 활성, 0% 억제) 및 세포 없음 대조군 웰(기준선 활성, 100% 억제)에 기반하여 평가하였다. 테스트 항체의 IC₅₀ 값은 표준 4개 매개변수 피트 방정식을 사용하여 피팅된 용량 반응 곡선으로부터 결정하였다. 데이터는 표 17 및 표 18, 및 도 2에 제시되어 있다.

[0322] 표 17: 20 μM ATP의 존재 하에 인간 단핵구의 표면 상에서 발현된 CD39에 대한 항체의 효능.

항-CD39 항체	IC ₅₀ (nM)	최대 억제(%)
hu31.3_IGG4.P	0.42	74%
hu31.4_IGG4.P	0.59	74%
hu39.1_IGG4.P	0.15	74%
hu39.4_IGG4.P	0.13	71%
hu39.5_IGG4.P	0.15	72%
hu39.6_IGG4.P	0.21	68%
hu39.7_IGG4.P	0.20	70%
hu39.5_IGG1.AA	0.10	69%
hu31.4_IGG1.AA	1.0	69%
huBMK2_IGG1.AEASS	2.7	74%

[0323]

[0324] 표 18: 400 μ M ATP의 존재 하에 인간 단핵구의 표면 상에서 발현된 CD39에 대한 항체의 효능.

항-CD39 항체	IC ₅₀ (nM)	최대 억제(%)
hu31.2_IGG4.P	0.87	71%
hu39.1_IGG4.P	0.33	76%
hu39.2_IGG4.P	0.14	80%
hu39.4_IGG4.P	0.45	73%
hu39.5_IGG4.P	0.20	60%
hu39.6_IGG4.P	0.38	73%
hu39.7_IGG4.P	0.39	70%
hu39.5_IGG1.AA	0.083	62%
hu31.4_IGG1.AA	0.70	63%
huBMK2_IGG1.AEASS	1.40	62%

[0325]

[0326] 전적으로, 항체 19, 31, 39의 변이체는 가용성 및 표면 인간 CD39 효소적 활성의 강력한 억제를 보여주었다. 중요하게는, 효능은 높은 ATP의 존재 하에 유지되었다.

[0327] 실시예 6: CD39 억제제의 면역자극 효과

[0328] 실시예 1-3에서 생산된 항-CD39 항체의 효과를 평가하기 위해, 골수 세포의 표면에서 CD39 효소적 활성을 억제하는 하류 기능 결과를 시험관내에서 평가하였다.

[0329] 대식세포 IL-1 β /IL-18 방출 검정: NLRP3 염증조절복합체는 일단 올리고머화되면 프로-카스파제-1 단백질을 카스파제-1로 절단 및 활성화하게 하는 다중 단백질, 세포질 복합체이다. 그런 다음 카스파제-1은 비활성 프로-이성질체(프로-IL-1 β 및 프로-IL-18)를 활성 및 분비된 형태로 절단하는 것을 통해 IL-1 β 및 IL-18 성숙을 용이하게 한다. 이들 사이토카인은 선천성 면역 반응에 수반되어, 일반화된 전염증성 환경을 생성한다.

[0330] 성숙한 IL-1 β 및 IL-18의 분비를 측정함으로써, 항-CD39 항체를 대식세포 상에서 NLRP3 염증조절복합체를 활성화하는 능력에 대해 테스트하였다. 검정의 개략도가 도 3에 제시되어 있다. 0일차에, 이전에 단리된, 양성으로 선택된 CD14⁺ 단핵구(실시예 4 참조를 해동하고 10% 열 비활성화된 FBS, 1% 글루타맥스, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 50 ng/mL 제조함 인간 M-CSF(R&D, 카탈로그 번호 216MCC/CF)를 함유하는 RPMI 배지에서 10 cm 접시(Thermo Scientific Nunclon Delta Surface, 카탈로그 번호 150464) 당 대략 15 x 10⁶개 CD14⁺ 단핵구의 밀도로 배양하였다. 5일차에, 비부착된 세포를 세척 제거하고 부착된 대식세포를 긁어서 수집하고 24-웰 플레이트에 웰 당 0.125 x 10⁶개 세포의 밀도로 플레이팅하였다. 그런 다음 세포를 밤새 인큐베이션하여 부착시켰다. 다음날, 세포를 1 ng/mL LPS(InvivoGen, 카탈로그 번호 tlrl-pek1ps)로 처리한 후 10 또는 100 nM의 테스트 항체 또는 IgG 대조군으로 처리하고 37°C, 5% CO₂에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 500 μ M ATP(Life Technologies, 카탈로그 번호 R0441)로 처리하고 37°C, 5% CO₂에서 추가 2 - 4시간 동안 인큐베이션하였다. 상청액을 수집하고 IL-1 β 수준을 제조업체의 지침에 따라 CBA(BD, 카탈로그 번호 558279) 또는 ELISA(R&D, 카탈로그 번호 QK201)에 의해 분석하였다. 상청액 중 IL-18 수준은 제조업체의 지침에 따라 ELISA(R&D, 카탈로그 번호 DL180)에 의해 분석하였다. 실험은 공여자마다 기술적으로 사중으로 수행하고, 평균 낸 다음, 각 공여자에 대한 이소형 대조군으로 정규화하였다. 도 4에 제시된 바와 같이, ch39_IGG4.P, hu39.1_IGG4.P, hu39.5_IGG1.AA, 및 hu31.4_IGG1.AA는 이소형 대조군에 비해 시험관내 유래된 대식세포로부터 IL-1 β 및 IL-18 방출을 증가시켰다.

[0331] 단핵구 유래 수지상 세포 검정: 항체를 또한 ATP의 존재 하에 단핵구 유래 수지상 세포(moDC)를 성숙시키는 능력에 대해 테스트하였다. 0일차에, 양성으로 선택된 단핵구를 10% 열 비활성화된 FBS, 1% 글루타맥스, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 100 ng/mL 제조함 인간 GM-CSF(R&D, 카탈로그 번호 215-GM/CF) 및 100 ng/mL IL-4(Peprotech, 카탈로그 번호 200-04)가 보충된 RPMI에 재현탁하고, 6-웰 플레이트(Falcon, 카탈로그 번호 353046)에 웰 당 4 x 10⁶개 세포로 시딩하였다. 6일차에, moDC를 수집하고 24-웰 Upcell 플레이트(Thermo Fisher, 카탈로그 번호 174899)에 웰 당 0.5 x 10⁶개 세포로 시딩하고 10 μ g/mL 이소형 대조군 또는 항-CD39 항체로 37°C, 5% CO₂에서 1시간 동안 처리한 후 0 μ M 또는 300 μ M ATP로 37°C, 5% CO₂에서 18시간 동안 처리

하였다. 7일차에, 염색을 위해 moDC를 폴리프로필렌 v-바닥 96-웰 플레이트로 옮겼다. 모든 웰을 DPBS 중 1:25 Fc 블록(BD, 카탈로그 번호 564220) 및 1:250 수성 생존력 염료(Invitrogen, 카탈로그 번호 L34966A)에 재현탁하고 15분 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션하였다. DPBS로 1 회 세척한 후, 세포를 다음 항체 [1 μ g/테스트 CD83 PE-Cy7(BD, 카탈로그 번호 561132), 1 μ g/테스트 CD86 BV605(BD, 카탈로그 번호 562999), 0.8 μ g/테스트 CD14 FITC(Invitrogen, 카탈로그 번호 11-0149-42)] 또는 상응하는 이소형 대조군 [PE-Cy7 마우스 IgG1 κ (BD, 카탈로그 번호 565573), BV605 마우스 IgG1 κ (BD, 카탈로그 번호 562652), FITC 마우스 IgG1 κ (eBiosciences, 카탈로그 번호 11-4714-41)]로 30분 동안 4°C에서 염색하였다. 수지상 세포 성숙 마커 CD83 및 CD86의 표면 수준은 수지상 세포의 성숙과 함께 증가해야 하는 반면, 단핵구 마커인 CD14는 감소해야 한다. DPBS로 1 회 세척한 후, 세포를 50 μ L IC 고정 완충액(Invitrogen, 카탈로그 번호 00-8222-49)으로 20분 동안 실온에서 고정시켰다. 그런 다음 세포를 세척하고 DPBS에 재현탁하고 BD LSR Fortessa X-20 세포 분석기를 사용하여 유세포 측정법에 적용하였다. CD83 및 CD14의 경우 모 게이트의 퍼센트는 0 μ M ATP 조건에서 각 공여자에 대한 이소형 대조군(총 이벤트의 < 5%)으로 설정하였다. CD86의 경우, 세포의 >90%가 대조군 처리된 조건에서 이소형 대조군과 비교하여 양성이었으므로, 대신 형광단의 형광 강도의 기하 평균은 살아있는 단일 세포 집단에 대해 보고되었다.

[0332] 도 5a 및 도 5b에 나타난 바와 같이, ATP는 수지상 세포 성숙 마커 CD83 및 CD86의 증가로 볼 수 있는 바와 같이 moDC를 성숙시켰다. 이소형 대조군이 아니라 항-CD39 항체의 첨가에 의한 CD39 효소적 활성의 억제는 성숙을 향상시켰으며, CD83을 발현하는 세포의 백분율 및 세포 당 CD86의 표면량을 추가로 증가시킨다. ATP의 존재 하에 항-CD39 첨가 시, 단핵구 마커 CD14를 발현하는 세포의 백분율은 또한 감소하였다(도 5c). hu39.6_IGG4.P를 제외하고 CD83, CD86, 및 CD14에 대한 효과는 ATP 의존적 효과였다.

[0333] 전적으로, 상기 데이터는 본 개시내용의 항체에 의한 인간 CD39의 효소적 억제가 시험관내에서 상이한 골수 집단에 대한 면역억제 효과를 가지고 있다는 것을 시사한다.

[0334] 실시예 7: 경쟁 흐름에 의한 항체 특성화

[0335] 이 실시예는 2개의 항체(테스트 항체 및 참조 항체)가 세포의 표면 상에서 발현된 인간 CD39에 대한 결합에 대해 경쟁하는지 여부를 결정하는 데 유용한 경쟁 흐름 검정을 설명한다. 테스트 항체, 참조 항체 및 세포 유형의 선택은 변형될 수 있다.

[0336] 항체 hu39.1_IGG4.P 및 항체 IGG4.P, IgG4(S228P) 이소형 대조군(CrownVivo)을 Alexa Fluor 647 접합 키트 - Lightning-Link(Abcam, 카탈로그 번호 ab269823)를 활용하여 Alexa Fluor 647("AF647")에 직접적으로 접합시켰다. 접합된 항체는 이 실시예에서 "hu39.1_IGG4.P-AF647" 및 "IGG4.P-AF647"로 언급된다. 결합에 대한 검증은 인간 다발성 골수종, CD39 발현 세포주, MOLP-8을 사용하여 수행하였다. 검정 당일에, 동결된 MOLP-8 세포를 해동하고, 행구고, DPBS 중 1:25 Fc 블록(BD, 카탈로그 번호 564220) 및 1:250 수성 생존력 염료(Invitrogen, 카탈로그 번호 L34966A)에 재현탁하고 15분 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션하였다. 세포를 폴리프로필렌 v-바닥 96-웰 플레이트에 웰 당 0.2×10^6 개 세포로 플레이팅하였다. 각 항체에 대해 833-0.0141 nM 범위의 농도로 DPBS에 3-배 연속 희석하여 11-점 용량 반응 곡선을 제조하였다. 12번째 지점은 DPBS만 함유하고 항체는 함유하지 않았다. 용량 반응으로부터 희석된 항체를 플레이팅된 세포에 1:1 비율로 첨가하고 30분 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 3 회 세척하고 DPBS에 재현탁하고 BD LSR Fortessa X-20 세포 분석기를 사용하여 유세포 측정법에 적용하였다. 살아있는 단일 세포 집단에 대한 AF647의 평균 형광 강도를 획득하였다. EC₅₀ 및 EC₉₅ 값은 GraphPad Prism 소프트웨어에서 표준 4-매개변수 비선형 회귀 분석을 사용하여 계산하였다.

[0337] 그런 다음 항체 hu39.1_IGG4.P-AF647을 표지되지 않은 테스트 항체(hu31.1_IGG1.AA, hu39.1_IGG4.P, hu39.5_IGG1.AA, IGG1.AA 이소형 대조군, 및 IGG4.P 이소형 대조군(CrownVivo))를 사용한 경쟁 흐름 검정에서 참조 항체로 사용하였다. 검정 당일에, 동결된 MOLP-8 세포를 해동하고, 행구고, DPBS 중 1:25 Fc 블록(BD, 카탈로그 번호 564220) 및 1:250 수성 생존력 염료(Invitrogen, 카탈로그 번호 L34966A)에 재현탁하고, 15분 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션하였다. 각 테스트 항체에 대해 833-0.0141 nM 범위의 농도로 DPBS에 3-배 연속 희석하여 11-점 용량 반응 곡선을 제조하였다. 12번째 지점은 DPBS만 함유하고 항체는 함유하지 않았다. 12.5 μ L를 96-웰 염색 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 93.7 nM 농도의 참조 항체, hu39.1_IGG4.P-AF647 12.5 μ L를 각 웰에 첨가하고 3 회 부드럽게 혼합하였다. 세포를 웰 당 0.2×10^6 개 세포로 플레이팅하고 60분 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 3 회 세척하고 DPBS에 재현탁하고 BD LSR Fortessa X-20 세포 분석기를 사용하여 유세포 측정법에 적용하였다. 살아있는 단일 세포 집단에 대해 AF647의 평균 형광 강도를 획득

하였다. EC_{50} 은 GraphPad Prism 소프트웨어에서 표준 4-매개변수 비선형 회귀 분석을 사용하여 계산하였다. Max 경쟁(%)은 다음 공식을 사용하여 계산하였다: $\text{Max 경쟁} = 1 - (\text{테스트 항체에 대한 상위 농도에서의 MFI} / \text{hu39.1_IGG4.P-AF647 단독의 일치된 농도에서의 MFI})$. 단일 농도의 참조 항체 hu39.1_IGG4.P-AF647만 사용하였다.

도 6 및 표 19에 제시된 바와 같이, 테스트 항체 hu39.5_IGG1.AA는 참조 항체 hu39.1_IGG4.P-AF647과 93%의 최대 경쟁으로 경쟁한다. hu39.1_IGG4(표지되지 않은 참조 항체)에 대해 유사한 수준의 경쟁이 관찰되었다. 대조적으로, 테스트 항체 hu31.4_IGG1.AA 항체와 참조 항체 hu39.1_IGG4.P-AF647 사이에서 경쟁은 관찰되지 않았다. 이들 데이터는 항체 31 및 39, 및 이들의 변이체가 상이한 비중첩 에피토프에 결합함을 시사한다.

표 19: CD39 결합에 대한 항체 경쟁.

테스트 항체	최소 MFI	상위 농도에서의 MFI	최대 경쟁	EC_{50} (nM)
hu31.4_IGG1.AA	7578	9591	-22%	
hu39.5_IGG1.AA	528	528	93%	14
표지되지 않은 hu39.1_IGG4.P	511	511	93%	13
hu39.1_IGG4.P-AF647 단독		7849		

실시예 8: 이종이식편 모델에서의 효능

실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이 생산된 항-CD39 항체는 인간에 결합하지만 무린 CD39에는 결합하지 않는다. 따라서, 생체내 효능을 평가하기 위해, 이종이식편 마우스 모델을 사용하였다. 인간 CD39를 발현하는 50만 내지 1000만 개의 인간 암 세포를 면역 약화된 마우스, 예컨대 SCID 또는 누드 마우스에 피하로 또는 정위적으로 주입하고, 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 항-CD39 항체는 MOLP-8 골수종(**도 7**), THP-1 백혈병(**표 16**), SK-MEL-5 흑색종(**표 15**), 및 OAW42 난소암 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 여러 인간 암 세포주에서 CD39 활성을 억제하고 결합할 수 있다. 종양이 150 mm^3 미만인 경우, 마우스에 $0.1 - 30 \text{ mg/kg}$ 의 본 개시내용의 항-CD39 항체 또는 이소형 대조군을 $\text{BIW} \times 4$ 로 또는 종양 부피가 $2,000 \text{ mm}^3$ 에 도달할 때까지 복강내(i.p.) 처리하였다. 인간 CD39를 발현하는 MOLP-8 종양을 본 개시내용의 항-CD39 항체로 처리하면 이소형 대조군 처리된 마우스와 비교하여 종양 성장 억제를 초래하였다. 이소형 대조군 처리된 마우스와 비교하여 종양 성장 억제는 또한 인간 CD39를 발현하는 다른 종양 유형을 본 개시내용의 항-CD39 항체로 처리한 후 예상된다.

실시예 9: 인간 CD39 녹인 모델에서의 효능

면역 적격 무린 모델에서 본 개시내용의 항-CD39 항체를 평가하기 위해, 항체를 완전한 면역 적격 C57BL/6 또는 BALB/c 마우스가 인간 CD39를 발현하고 무린 CD39를 발현하지 않는 인간 CD39 녹인(Knock-in)(hCD39KI) 마우스 모델에서 테스트할 수 있다(**도 9**). 이 마우스 모델에서, 인간 CD39의 발현은 야생형 마우스에서 무린 CD39의 발현과 유사하다. 이 마우스 모델은 항-CD39 억제제가 기질 세포, 혈관계, 및 면역 세포와 같은 숙주 세포에서 작용할 수 있는 생체내 테스트를 허용한다. 마우스에게 MCA-205 섬유육종, B16-F10 흑색종, MC38 결장 선암종, ID8 난소암, 4T1 유방암, 또는 CT-26 결장 암종 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 무린 야생형 또는 조작된 종양 세포주를 피하로 또는 정위적으로 접종하였다. 50만 내지 1000만 개의 무린 암 세포를 주입하고 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양이 150 mm^3 미만인 경우 마우스에 $0.1 - 30 \text{ mg/kg}$ ch39_mIGG2A.AAG 또는 이소형 대조군을 $\text{BIW} \times 4$ 로 또는 종양 부피가 $2,000 \text{ mm}^3$ 에 도달할 때까지 복강내(i.p.)로 처리하였다. 종양을 단일 제제로서 항-CD39로, 또는 하나 이상의 추가적인 요법(예를 들어, ICD 유도제, 면역요법 등)과 조합하여 처리하면 이소형 대조군 처리된 마우스와 비교하여 종양 성장 억제를 초래할 것이다.

하나의 실험에서, 0일차에 C57BL/6 hCD39KI 마우스에 100만개의 MC38 세포를 접종하였다. 종양이 80 mm^3 에 도달하면, 마우스에 20 mg/kg 항-CD39 또는 이소형 대조군 항체(비히클: PBS)의 로딩 용량을 복강내(i.p.) 투여한 다음, 후속적으로 10 mg/kg 항-CD39 또는 이소형 대조군 항체를 주 2 회(BIW) 투여하였다. 각 그룹은 11 - 12 마리 마우스로 이루어졌다. 이들 실험에서, 항-CD39 항체는 ch39_mIGG2A.AAG를 지칭한다. 옥살리플라틴(OXA) 처리, 5 mg/kg i.p.(비히클: 식염수)를 항-CD39 또는 이소형 대조군 로딩 용량 다음 날에 시작하고 주 1 회 투여하였다. 유사하게 설계된 실험에서, 0일차에 BALB/c hCD39KI 마우스에 4T1 세포를 접종하고 MC38 모델에 대해

기재된 바와 같이 OXA 또는 항-CD39 항체를 처리하였다. 이들 실험의 결과는 다음 단락에 기재되어 있다.

- [0346] 항-CD39는 hCD39KI 모델에서 효능을 보여준다. 항-CD39 처리의 효과를 평가하기 위해, 종양 부피, 종양내 및 말초 CD39 효소적 활성, 및 CD39 발현을 평가하였다.
- [0347] 종양 부피 및 체중을 대략 주 2 회(BIW) 측정하였고 각각 **도 10a** 및 **도 10b**에 제시되어 있으며, 여기서 점은 평균을 나타내고 오차 막대는 각 마우스 그룹의 각각의 측정항목의 평균의 표준 오차(SEM)이다. 유의성은 다중 비교에 따른 혼합 효과 모델을 사용하여 계산하였다. **도 10a**에 제시된 바와 같이, 항-CD39 및 옥살리플라틴을 사용한 처리는 단일 제제 단독을 사용한 처리와 비교하여 통계적으로 유의하였다($p = 0.0217$)(이소형 + OXA 대 항-CD39 + OXA의 경우 $p = 0.0372$ 및 항-CD39 + 식염수 대 항-CD39 + OXA의 경우 $p = 0.0217$). 체중은 실험 과정 동안 안정되었으며 이는 항-CD39 처리가 잘 용인되었음을 나타낸다(**도 10b**).
- [0348] 연구 종료 시 C57BL/6 hCD39KI MC38 마우스의 종양 및 비장을 면역조직화학(IHC)에 의한 인간 CD39 발현 및 효소 조직화학(EHC)에 의한 항-CD39 항체 효소 차단 활성의 증거에 대해 추가적으로 분석하였다. 간단히 말하면, 동결된 OCT-포매된 종양 또는 비장 샘플을 4 μm 두께로 절개하고, 양으로 하전된 현미경 슬라이드 위에 장착하고, 15분 동안 공기 건조시킨 다음, 4% 파라포름알데하이드(PFA) 고정액에 20분 동안 두었다. 고정 후, 슬라이드를 Tris 완충 식염수로 세척하고 IHC를 자동화 Leica Bond Rx 플랫폼에서 내인성 퍼옥시다제 차단으로 시작하여 수행한 후, 토끼 항-CD39 mAb(Abcam, EPR20627)와 인큐베이션하고, 항-토끼 HRP 중합체 시스템 이어서 디아미노벤지딘(DAB) 갈색 발색체, 헤마톡실린 핵 대조염색으로 검출한 다음, 탈수 및 장착하였다. EHC 검정을 위해, 4% PFA에 5분 고정시킨 후, 절편을 Tris 말레이이트 완충액으로 세척하고 50 mM Tris 말레이이트, 250 mM 수크로스, 및 2 mM MgCl_2 의 용액에서 30분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 절편을 1 mM ATP, 2.5 mM 레바미솔(levamisole), 2 mM 질산납, 0.25 mM 수크로스, 및 5 mM MnCl_2 를 함유하는 100 mM Tris 말레이이트 용액에서 2시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 레바미솔을 사용하여 조직 비특이적 알칼리 포스파타제(TNAP) 활성을 억제하였으며; 다른 억제제가 또한 사용될 수 있다. 그런 다음 절편을 1% 황화암모늄 용액으로 5분 동안 현상하고, 세척하고, 헤마톡실린으로 대조염색하고, 탈수하고 장착하였다. 대표적인 이미지는 **도 11-14**(종양, **도 11-12**; 비장, **도 13-14**)에 제시되어 있다. 인간 CD39 발현은 혈관 내피, 침윤 면역 세포, 및 종양 미세환경의 간질 구성요소에 국한된 이소형 처리(**도 11**, 패널 A 및 **도 12**, 패널 A, 각각 저출력 및 고출력 배율) 및 항-CD39 처리된 종양(**도 11**, 패널 C 및 **도 11** 패널 C, 각각 저출력 및 고출력 배율) 둘 다에서 검출되었다. 인간 CD39 발현 수준은 적색속질(red pulp)에 국한되고 백색속질(white pulp)에서 저 적은 정도로 국한된 이소형 처리(**도 13**, 패널 A 및 **도 14**, 패널 A, 각각 저출력 및 고출력 배율) 및 항-CD39 처리된 비장(**도 13**, 패널 C 및 **도 14**, 패널 C, 각각 저출력 및 고출력 배율) 둘 다에서 관찰되었다. 이소형으로 생체내에서 처리된 종양 및 비장에서, 인산납 침착은 효소 조직화학에 의해 관찰되었다(종양 - **도 11**, 패널 B 및 **도 12**, 패널 B, 각각 저출력 및 고출력 배율; 비장, **도 13**, 패널 B 및 **도 14**, 패널 B, 각각 저출력 및 고출력 배율). 항-CD39 항체로 생체내 처리된 종양 및 비장에서, 인산납 침착은 효소 조직화학에 의해 관찰되지 않았으며, 이는 효소적 활성이 차단되었음을 나타낸다(종양 - **도 11**, 패널 D 및 **도 12**, 패널 D, 각각 저출력 및 고출력 배율; 비장, **도 13**, 패널 D 및 **도 14**, 패널 D 각각 저출력 및 고출력 배율).
- [0349] 종양내 및 말초 CD39 효소적 활성을 또한 생체외에서 평가하였다. 연구 완료 시, C57BL/6 hCD39KI MC38 및 BALB/c hCD39KI 4T1 마우스를 희생시킨 후 수득된 종양 샘플을 RPMI + 20 % FBS + 250 $\mu\text{g/ml}$ 콜라게나제 D(Millipore Sigma, 카탈로그 번호 11088858001) + 100 KU/ml DNase 1(Millipore Sigma 카탈로그 번호 D5025-150KU)에 넣고 gentleMACS™ Octo 분해자를 사용하여 효소적으로 소화시켜 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 그런 다음 세포를 96-웰 플레이트에 웰 당 2.5×10^4 개 세포로 플레이팅하고 100 nM의 hu39.5_IGG1.AA 또는 IgG1 Fc 침묵 이소형 대조군 항체(Absolute Antibody, 카탈로그 번호 Ab00178-10.3)로 처리하고 37°C, 5% CO_2 에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 20 μM ATP로 처리하고 37°C, 5% CO_2 에서 추가 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 기간의 종료 시, 96-웰 플레이트를 1000 rpm에서 3분 동안 회전시키고 상청액을 수집하였다. 그런 다음 2X Kinase-Glo® Plus(Promega, 카탈로그 번호 V3771)를 상청액에 첨가하였다. 그런 다음 상청액 내 ATP 수준을 Flexstation® 3 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 발광을 검출함으로써 측정하였다. 데이터는 상대 발광 단위(RLU)로 제시된다. 생체외 hu39.5_IGG1.AA의 RLU와 이소형-처리된 그룹 사이에 차이 없음은 생체내 처리로부터 완전한 효소적 활성 억제를 나타낸다. 항-CD39 처리는 종양에서 효소적 활성을 억제하였다(**도 15a** 및 **도 15b**).
- [0350] 검정 말초 CD39 효소적 활성을 검정하기 위해, 말초 백혈구(WBC)를 hCD39KI 마우스의 말단 혈액 샘플에서 분리

하고 종양 세포 현탁액에 대해 일반적으로 기재된 바와 같이 검정하였다. 간단히 말해서, 전혈 샘플을 1X Pharm Lyse 적혈구 용해 용액(BD Biosciences, 카탈로그 번호 555899)과 혼합하였다. 그런 다음 1X PBS 용액으로 세척한 후 WBC 펠릿을 수집하고 BamBanker 세포 동결 배지(Bulldog Bio, 카탈로그 번호 BB01)에 저장하였다. 효소적 억제 검정을 수행하기 위해, 샘플을 해동한 다음 세포를 96-웰 플레이트에 웰 당 2.5×10^4 개 세포로 플레이팅하였다. 각 샘플을 2가지 처리 조건으로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다: 100 nM의 hu39.5_IGG1.AA 또는 IgG1 Fc 침묵 이소형 대조군 항체(Absolute Antibody, 카탈로그 번호 Ab00178-10.3). 그런 다음 모든 웰을 20 μ M ATP로 처리하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 기간의 종료 시, 96-웰 플레이트를 1000 rpm에서 3분 동안 회전시키고 상청액을 수집하였다. 그런 다음 2X Kinase-Glo® Plus(Promega, 카탈로그 번호 V3771)를 상청액에 첨가하였다. 그런 다음 상청액의 ATP 수준을 Flexstation® 3 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 발광을 검출함으로써 측정하였다. 데이터는 상대 발광 단위(RLU)로 제시된다. 생체의 hu39.5_IGG1.AA의 RLU와 이소형-처리된 그룹 사이에 차이 없음은 생체내 처리의 완전한 효소적 활성 억제를 나타낸다. 항-CD39 처리는 4T1 종양-보유 마우스의 말초에서 효소적 활성을 억제하였다(도 15c).

[0351] hCD39KI 마우스의 말초 면역 집단에서 항-CD39 처리에 따른 세포 표면 CD39의 감소 및 완전한 또는 거의 완전한 적용범위. C57BL/6 hCD39KI MC38 마우스의 말단 출혈로부터의 전혈 샘플을 유세포 측정법에 의해 평가하여 단핵구($CD3^-CD19^-CD11b^+Ly6c^{++}$), 과립구($CD3^-CD19^-CD11b^+Ly6c^+$), T 세포($CD3^+CD19^-$), B 세포($CD3^-CD19^+$), 및 다른 계통 음성(Lin $^-$) 림프구를 포함하는 CD39를 발현하는 말초 면역 세포 유형에 대한 표적 적용범위 및 CD39 발현 변화를 평가하였다. 표적 진입은 ch39_mIGG2A.AAG과 경쟁적으로 결합하는 시약인 hu39.5_IGG1.AA-AF647을 사용하여 결정하였다. hu39.5_IGG1.AA를 Abcam AF647 Lightning Link 접합 키트를 사용하여 AF647에 접합시켰다. 처리군 당 5-6 마리마우스의 전혈 샘플을 다음을 포함하는 세포의 항체의 각테일로 염색하였다: CD39 hu39.5_IGG1.AA-AF647(항-CD39에 대해 경쟁적), CD39 A1 PE(항-CD39에 대해 비경쟁적), CD3 17A2 PerCP-Cy5.5, CD11b M1/70 FITC, CD19 6D5 BV421, 및 Ly6c HK1.4 PE-Cy7. 항체를 전혈에서 30분 동안 암실에서 얼음 위에서 인큐베이션한 다음, 샘플을 1X BD FACSL용해 용액을 사용하여 20분 동안 암실에서 얼음 위에서 고정/용해시켰다. 그런 다음 샘플을 400xg에서 5분 동안 원심분리하고 1X PBS 완충액으로 1 회 세척하고, 1% 파라포름알데하이드 용액에 재현탁하고, 20 μ m 여과기를 통해 여과한 후 데이터를 획득하였다. 샘플을 BD FACSCanto Special Order 세포측정기에서 실행하고 FlowJo 및 Prism 소프트웨어를 사용하여 분석을 수행하였다. 결합되지 않은 CD39를 이소형 항체로 처리된 모든 동물에서 세포 유형에 걸쳐 경쟁적 클론 hu39.5_IGG1.AA-AF647(이소형 대조군, IgG1.FcS-AF647에 대한 hu39.5_IGG1.AA-AF647 신호의 MFI에 의해 측정됨)에 의해 검출하였다. hu39.5_IGG1.AA-AF647의 유의한 경쟁적 결합이 항-CD39로 처리된 동물의 모든 CD39(A1)-발현 세포에서 관찰되었으며, 이는 완전한 또는 거의 완전한 표적 적용범위를 나타낸다(도 16, 하부 패널). 총 CD39 표면 단백질은 비경쟁적 CD39 항체(클론 A1 PE)에 의해 검출되었다. 표면 CD39 단백질의 감소는 항-CD39로 처리된 마우스의 다중 유형의 말초 면역 세포에서 관찰되었다(도 16, 상부 패널).

[0352] 세포 표면 CD39는 hCD39KI 마우스의 종양 배수 림프절에서 항-CD39 처리로 감소한다. 종양 배수 림프절(TLDN)(우측 서혜부 림프절)을 또한 위에 기재된 C57BL/6 hCD39KI MC38 마우스 연구의 종료 시 수집하였다. 림프절을 37°C 수조에서 0.6 mg/mL 콜라게나제 P(Roche, 카탈로그 번호 11213865001), 2.4 mg/mL 디스파제 II(Sigma, 카탈로그 번호 D4693), 및 0.3 mg/mL DNase I(Thermo Scientific, 카탈로그 번호 J62229MB)을 함유하는 RPMI 1640(Gibco, 카탈로그 번호 11875119)에서 30분 동안 부드럽게 교반하면서 해리시켰다. 해리된 림프절을 계수하고 웰 당 2×10^5 개 세포를 96-웰 폴리프로필렌 v-바닥 플레이트에 플레이팅하였다. 세포를 PBS(Gibco, 카탈로그 번호 14190-144)로 세척하고 1:25 Fc 블록(BD, 카탈로그 번호 564220) 및 1:250 Near IR 형광 반응성 염료(Invitrogen, 카탈로그 번호 L34976A)를 함유하는 PBS 용액에 15분 동안 암실에서 재현탁하였다. 인큐베이션 후, 세포를 항체 각테일(표 20)로 염색하고 30분 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 펠릿화하고, 상청액을 제거하고, 고정 완충액(eBioscience, 카탈로그 번호 00-8222-49) 100 μ L를 1시간 동안 첨가하였다. 세포를 세척하고, PBS 200 μ L에 재현탁하고, 40 μ m 필터 플레이트(Fisher Scientific, 카탈로그 번호 NC0726512)로 여과한 후 BD LSR Fortessa X-20 세포 분석기에서 획득하고 FlowJo™ v10.8 소프트웨어(BD Life Sciences)로 분석하여 면역 하위집단을 정의하였다. 정의된 면역 하위집단에 대한 인간 CD39, 마우스 CD73, 및 마우스 P2X7 발현은 도 17a 및 도 17b에 제시되어 있다. 단일 제제로서 또는 옥살리플라틴 처리와 조합된 항-CD39 항체인 ch39_mIGG2A.AAG는 MC38 종양 세포가 접종된 hCD39KI 마우스의 종양 배수 림프절에서 면역 하위집단 백분율의 유의한 변화를 초래하지 않았다(도 17c). 면역 집단에서 이러한 변화의 부족에도 불구하고, 항-CD39 처리는 종양 배수 림프절로부터 식별된 거의 모든 면역 하위집단의 표면 상에서 인간 CD39의 유의한 감소

를 초래하였다(도 17d). 대표적인 히스토그램은 도 17e에 제시되어 있다.

표 20. 유세포 측정법 염색 정보

제조사	카탈로그 번호	형광염색소	마커	클론
ThermoFisher	11-4801-82	FITC	F4/80	BM8
ThermoFisher	12-5971-83	PE	CD49b	DX5
Biolegend	328218	PerCPy5.5	hCD39	A1
Biolegend	400149	PerCPy5.5	IgG1, κ 이소형 Ctrl	MOPC-21
Biolegend	148708	PECy7	P2X7	1F11
Biolegend	400617	PECy7	IgG2b, κ 이소형 Ctrl	RTK4530
ThermoFisher	L34975	APCCy7	LD-NIR	n/a
Biolegend	127217	BV421	CD73	TY/11.8
Biolegend	400429	BV421	IgG1, κ 이소형 Ctrl	RTK2071
BD	744178	BV510	CD11c	N418
BD	563005	BV605	Ly6g	1A8-Ly6g
Biolegend	128049	BV650	Ly6c	HK1.4
Biolegend	115555	BV711	CD19	6D5
Biolegend	100750	BV785	CD8	53-6.7
BD	563553	BUV396	CD11b	M1/70
BD	612843	BUV737	CD4	RM4.5
BD	748370	BUV805	CD45	30-F11

항-CD39 처리는 말초 사이토카인 수준을 변경하지 않는다. MC38 종양을 보유하는 마우스의 말단 출혈을 BD Vacutainer® 헤파린 튜브(BD Biosciences, 카탈로그 번호 367871)에 수집하고, 2000xg에서 15분 동안 원심분리하고, 상청액 혈장 샘플을 수집하였다. 혈장 샘플 내 사이토카인 수준을 제조업체의 지침에 따라 MSD를 사용하여 분석하였다. 항-CD39-처리된 마우스에서 말초 사이토카인 수준의 상승은 관찰되지 않았다. 데이터는 처리 그룹 당 총 11-12 마리 마우스에 대한 평균 $\pm$ SEM으로 제시된다(도 18). 통계 분석은 Tukey의 다중 비교 검정과 함께 ANOVA를 사용하여 수행하였다.

실시예 10: 면역원성 세포 사멸(ICD) 유도 요법과 조합된 항-CD39 항체의 용도

화학치료제의 ICD-유도 가능성은 항-CD39 항체의 부제 또는 존재 하에 특성화되었다. 이 연구는 ICD-유도 가능성을 측정하기 위해 3가지 측정항목, (1) 세포독성, (2) 세포외 HMGB1 방출, 및 (3) 세포외 ATP 방출을 사용하였다.

옥살리플라틴 처리 후 세포 ATP 방출을 평가하기 위해, 무린 결장 암종 세포주 CT26 및 MC38 및 인간 흑색종 세포주 SK-MEL-5를 해동하고, 행구고, 각각의 배양 배지에 재현탁하였다. CT26 및 MC38에 대한 배양 배지는 RPMI + 10% FBS + 1% 글루타맥스 + 1% 페니실린-스트렙토마이신 + 1% 피루브산나트륨이다. SK-MEL-5에 대한 배양 배지는 EMEM + 10% FBS + 1% 글루타맥스 + 1% 페니실린-스트렙토마이신 + 1% 피루브산나트륨이다. 세포를 96-웰 플레이트에 웰 당 2.5×10^4 개 세포로 플레이팅하고 37°C, 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 세포를 비히클(PBS), 100 μ M 또는 250 μ M 옥살리플라틴으로 처리하였다. SK-MEL-5 세포는 100 nM hu39.5_IGG1.AA 또는 IgG1 Fc 침묵 이소형 대조군 항체(Absolute Antibody, 카탈로그 번호 Ab00178-10.3)로 추가 처리하였다. 세포 생존력을 결정하기 위해, 세포를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 처리하여 인큐베이션하였다. 인큐베이션 기간의 종료 시, 생존력을 발광 기반 Cell Titer Glo 2.0 검정(Promega, 카탈로그 번호 G9242)을 사용하여 결정하였다. 데이터는 처리되지 않은 비히클 대조군에 대해 정규화된 생존력으로 제시된다(도 19a). HMGB1 방출을 결정하기 위해, 세포를 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 처리하여 인큐베이션하였다. 인큐베이션 기간의 종료 시, 플레이트를 400 x g에서 5분 동안 원심분리하고 상청액을 수집하였다. 그런 다음 배양 상청액의 HMGB1 수준을 제조업체의 지침에 따라 Lumit HMGB1 키트(Promega, 카탈로그 번호 CS3030B01)를 사용하여 결정하였다(도 19b). 그런 다음, ATP 방출을 조사하기 위해, 세포를 37°C, 5% CO₂에서 8시간 동안 처리하여 인큐베이션하였다. 인큐베이션 기간의 종료 시, 4x RealTime-Glo™ 세포외 ATP 검정(Promega 카탈로그 번호 GA5010)을 세포에 첨가하였다. 세포외 ATP를 Flexstation® 3 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 6시간 동안 15분 간격으로 발광을 검출함으로써 동역학적으로 측정하였다. 3가지 세포주 모두는 250 μ M 옥살리플라틴으로 처리 시 ATP 방출을 입증하였다(도 19c). SK-MEL-5 세포에서, hu39.5_IGG1.AA 처리는 이소형 대조군-처리된 세포와 비교하여 세포외 ATP의 더 큰 축적을 야기하였다(도 19c).

[0359] 추가적인 화학치료제의 ICD-유도 가능성을 인간 흑색종 세포주 SK-MEL-5에서 특성화하였다. 세포를 해동하고, 헥구고, EMEM + 10% FBS + 1% 글루타맥스 + 1% 페니실린-스트렙토마이신 + 1% 피루브산나트륨의 배양 배지에 재현탁하였다. 세포를 96-웰 플레이트에 웰 당 2.5×10^4 개 세포로 플레이팅하고 37°C, 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 세포를 지시된 농도의 화학치료제 독소루비신(비히클: DMSO), 이리노테칸(비히클: DMSO), 켈시타빈(비히클: PBS) 및 시스플라틴(비히클: PBS)으로 처리하고 37°C, 5% CO₂에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. (1) 세포독성을 평가하기 위해, 인큐베이션 기간의 종료 시, 세포 생존력을 발광 기반 Cell Titer Glo 2.0 검정(Promega, 카탈로그 번호 G9242)을 사용하여 결정하였다. 데이터는 처리되지 않은 비히클 대조군에 대해 정규화된 생존력으로 제시된다(도 20a). (2) HMGB1 방출을 측정하기 위해, 인큐베이션 기간의 종료 시, 플레이트를 400 x g에서 5분 동안 원심분리하고 상청액을 수집하였다. 그런 다음 배양 상청액의 HMGB1 수준을 제조업체의 지침에 따라 Lumit HMGB1 키트(Promega, 카탈로그 번호 CS3030B01)를 사용하여 결정하였다(도 20b). (3) 세포의 ATP 방출은 100 nM hu39.5_IGG1.AA 또는 IgG1 Fc-침묵 이소형 대조군 항체(Absolute Antibody, 카탈로그 번호 Ab00178-10.3)를 첨가하거나 첨가하지 않은 화학치료제로 정량화하고 8시간 또는 32시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 기간의 종료 시, 4x RealTime-Glo™ 세포의 ATP 검정(Promega 카탈로그 번호 GA5010)을 세포에 첨가하였다. 그런 다음 세포의 ATP 방출을 Flexstation® 3 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 10시간의 기간 동안 15-분 간격으로 발광을 검출함으로써 동역학적으로 측정하였다. 모든 화학요법 처리된 그룹은 처리되지 않은 세포에 비해 ATP 방출의 증가를 보여준다. hu39.5_IGG1.AA의 첨가는 더 높은 수준의 세포의 ATP를 초래한다(도 20c).

[0360] 실시예 11: 인간 세포에서 CD39 및 CD39-관련 마커의 특성화

[0361] CD39 전혈(WB) 수용체 점유(RO) 유세포 측정법 검정을 사용하여 인간, cyno, 및 hCD39KI 마우스 WB에서 다양한 세포 유형에 대한 CD39 발현을 평가하였다. hCD39KI RO 검정의 설명은 실시예 9에 기재되어 있다. 인간 전혈 샘플을 hCD39KI 마우스 샘플에 대해 기재된 것과 동일한 방법으로 분석되었지만 단핵구 및 B 세포에 대한 종-종 특이적 세포 계통 마커를 혼입하였다. 인간 CD39 WB RO 패널은 다음 항체로 이루어졌다: hu39.5_IGG1.AA-AF647(항-CD39에 대해 경쟁적), 항-CD39 A1 PE(항-CD39에 대해 비경쟁적), 항-CD14 61D3 FITC, 및 항-CD19 H1B19 eFluor450. 도 21에 제시된 바와 같이, 말초 면역 세포 상에서 CD39의 상대적 발현은 인간과 C57BL/6 hCD39KI MC38 마우스 사이에서 달라진다. 단핵구는 인간 혈액에서 검정된 세포 유형 중에서 가장 높은 수준의 CD39 발현을 가지는 반면, 과립구는 hCD39KI 마우스에서 가장 높은 CD39 발현을 가졌다. B 세포 발현은 종 사이에서 가장 유의하게 달라진다. 인간 말초 B 세포는 매우 높은 수준의 CD39를 발현하는 반면, hCD39KI 마우스 B 세포는 CD39 발현이 낮거나 전혀 없다.

[0362] CD39 및 CD39-관련 마커는 또한 M0-, M1-, M2-양극화된 대식세포, 및 단핵구 유래 수지상 세포(moDC)와 같은 인간 시험관내 분화된 골수 세포, 및 4명의 건강한 공여자의 말초 혈액으로부터의 CD14⁺ 단핵구 및 골수 수지상 세포(DC) 하위집합과 같은 1차 인간 골수 세포에서 특성화되었다. 시험관내 분화된 대식세포를 생성하기 위해, 양성으로 선택된 CD14⁺ 단핵구를 10% 열 비활성화 FBS, 1% 글루타맥스, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 50 ng/mL의 재조합 인간 M-CSF(R&D, 카탈로그 번호 216-MCC/CF)가 보충된 RPMI에 재현탁하고 6-웰 플레이트(Falcon, 카탈로그 번호 353046)에 총 2 mL로 웰 당 4×10^6 개 세포로 시딩하였다. 4일차에 2X M-CSF를 함유하는 새로운 RPMI-보충 배지 2 mL를 세포에 보충하였다. 6일차에, 세포는 100 ng/mL LPS(Invivogen, 카탈로그 번호 tlr-pek1ps) 및 20 ng/mL 재조합 인간 IFN- γ (Peprotech, 카탈로그 번호 300-02)를 사용하여 M1 대식세포로 양극화된 반면, M2 대식세포는 20 ng/mL 재조합 인간 IL-4(Peprotech, 카탈로그 번호 200-04)로 양극화되었다. M0 대식세포에 대해 추가적인 사이토카인은 첨가하지 않았다. moDC를 생성하기 위해, 양성으로 선택된 CD14⁺ 단핵구를 10% 열 비활성화 FBS, 1% 글루타맥스, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 100 ng/mL의 재조합 인간 GM-CSF(R&D, 카탈로그 번호 215-GM/CF) 및 100 ng/mL의 재조합 인간 IL-4가 보충된 RPMI에 재현탁하였고 6-웰 플레이트(Falcon, 카탈로그 번호 353046)에 총 2 mL로 웰 당 4×10^6 개 세포로 시딩하였다. 4일차에 2X GM-CSF/IL-4를 함유하는 새로운 RPMI-보충된 배지 2 mL를 세포에 보충하였다. 7일차에, M0-, M1-, M2-양극화된 대식세포 및 moDC를 수집하고, 계수하고 유세포 측정법의 경우 U-바닥 96-웰 플레이트에 또는 RNA의 경우 1.5 mL 에펜도르프(Eppendorf) 튜브에 분취하였다. 양성 선택 키트를 사용하여 단리된 1차 CD14⁺ 단핵구 및 음성 선택 키트를 사용하여 풍부화된 골수 DC를 또한 유세포 측정법의 경우 U-바닥 96-웰 플레이트에 또는 RNA의 경우 1.5 mL 에펜도르프 튜브에 분취하였다.

[0363] 1차 CD14⁺ 단핵구 단리의 순도, 1차 골수 수지상 세포(DC) 풍부화의 순도, 및 1차 골수 DC 풍부화로 인한 세포 내 DC 하위집합의 분포를 결정하기 위해 유세포 측정법 품질 관리 검색을 수행하였다. 단핵구는 CD14⁺ 발현에 의해 정의되었다. CD14⁺ 단핵구 단리의 순도는 ~99%였다. 4 명의 인간 공여자의 말초 혈액으로부터 1차 수지상 세포의 풍부화는 HLA-DR⁺ CD11c⁺ 및 pDC로 정의되는 48.5% 수지상 세포의 풍부화된 집단을 보여주었다. 풍부화된 DC는 2.8% 형질세포양 DC(HLA⁺DR⁺ CD11c^{neg} CD123⁺로 정의된 pDC), 3.0% 통상적인 DC1(HLA⁺DR⁺ CD11c⁺ CD141⁺ Clec9a⁺로 정의된 cDC1), 30.4% 통상적인 DC2(HLA⁺DR⁺ CD11c⁺ CD1c⁺ CD141^{neg} Clec9a^{neg}로 정의된 cDC2) 및 12.0% 다른 DC(HLA⁺DR⁺ CD11c⁺ CD1c^{neg} CD141^{neg} Clec9a^{neg}로 정의됨)로 구성되었다.

[0364] CD39 및 CD73의 유세포 측정법 평가를 위해(도 22a 및 도 22b), CD14⁺ 단핵구, 풍부화된 골수 DC, M0, M1, M2 대식세포 및 moDC를 96-웰 플레이트에 분취하고 웰 당 DPBS 중 1:25 Fc 블록(BD, 카탈로그 번호 564220) 및 1:250 수성 생존력 염료(Invitrogen, 카탈로그 번호 L34966A) 50 μ L에 재현탁하고 15분 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 세포를 다음 항체 [0.25 μ g/테스트 CD39 PE-Cy7(eBiosciences, 카탈로그 번호 25-0399-42) 및 0.5 μ g/테스트 CD73 BUV737(BD, 카탈로그 번호 612812) 또는 상응하는 이소형 대조군, 마우스 IgG1 PE-Cy7(BD, 카탈로그 번호 557647) 및 마우스 IgG1 BUV737(BD, 카탈로그 번호 612758)]로 웰 당 50 μ L에서 30분 동안 4°C에서 염색하였다. DPBS로 1 회 세척한 후, 세포를 50 μ L IC 고정 완충액(Invitrogen, 카탈로그 번호 00-8222-49)으로 20분 동안 실온에서 고정시켰다. 그런 다음 세포를 세척하고 DPBS에 재현탁하고 BD LSR Fortessa X-20 세포 분석기를 사용하여 유세포 측정법에 적용하였다. CD14⁺ 단핵구, 풍부화된 골수 DC 하위 유형, M0, M1, M2 대식세포 및 moDC에서 CD39 및 CD73의 양성률을 이소형 대조군과 비교하여 평가하였다. CD14⁺ 단핵구, 모든 시험관내 유래된 하위집합(M0, M1, M2 대식세포 및 moDC), 및 1차 풍부화된 DC 하위집합 cDC1, cDC2 및 다른 DC는 모두 높은 CD39 양성률 및 낮은 CD73 양성률을 가졌다(도 22a 및 도 22b). 상대적으로 적은 (15%) pDC는 CD39에 대해 양성이었다. 대부분의 세포 유형이 > 90% CD39 양성률을 가졌다는 점을 고려하면, CD39 발현 수준은 이소형 대조군과 비교하여 CD39 염색의 강도를 살펴봄으로써 추가로 탐구하였다(도 22b). 공여자에 걸쳐 가변적일 수 있지만, CD39 발현은 1차 DC와 비교하여 CD14⁺ 단핵구, 시험관내 유래된 대식세포, moDC에서 더 높았다. 1차 DC 중에서, cDC1은 세포 표면 CD39의 발현이 가장 높다.

[0365] *ENTPD1*(CD39) 및 *NT5E*(CD73) 유전자 발현을 표준 방법을 사용하여 qPCR에 의해 분석하였다(도 22c 및 도 22d). *ENTPD1* 유전자 발현 수준은 모든 세포 유형에 걸쳐 *NT5E* 유전자 발현 수준보다 더 컸다. 풍부화된 DC 집단은 *ENTPD1*의 상대적 발현이 가장 낮았고 *NT5E*의 상대적 발현이 가장 높았다.

[0366] 이들 인간 골수 하위집합에서 광범위한 CD39-관련 유전자 발현을 평가하기 위해, 맞춤형 NanoString 패널을 설계하고 활용하였다. 골수 세포 하위집합 각각의 RNA를 제조업체의 지침에 따라 Qiagen RNeasy Mini 키트(카탈로그 번호 74106)를 사용하여 단리하였다. 그런 다음 RNA를 Nanodrop에서 정량화하고 NanoString을 위해 RNA 70 ng를 활용하였다. RNA를 맞춤형 NanoString 코드 세트에 혼성화하기 위해, 혼성화 완충액 70 μ L를 리포터 코드 세트에 첨가하고 8 μ L를 각 샘플에 대한 RNA 5 μ L에 첨가하였다. 그런 다음 포획 프로브 세트 2 마이크로리터를 각 샘플에 첨가하고 열 순환기에서 65°C로 16시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 샘플을 RNase-무함유 물로 최대 30 μ L까지 채우고 nCounter SPRINT 카트리지를(NanoString, 카탈로그 번호 SPRINT-CAR-1.0)의 샘플 로딩 포트에 로딩하였다. 그런 다음 카트리지를 NanoString nCounter SPRINT 프로파일러에서 실행하였다. 품질 관리 측정항목을 각 샘플의 데이터에 대해 실행하였고, 품질 관리 테스트를 통과한 샘플을 맞춤형 NanoString 패널 내에 포함된 3가지 하우스키핑 유전자에 대해 정규화하여 유전자 발현을 평가하였다.

[0367] 맞춤형 NanoString 패널을 사용하여 CD39, 아데노신, 및 염증조절복합체 경로 유전자의 하우스키핑 유전자 정규화된 발현의 비지도 클러스터링을 보이는 히트맵은 도 22e에 제시되어 있다. 낮은 계수 또는 비정상적인 제어 프로브에 의해 표시된 저품질 웰은 이 분석에서 제거하였다. 특이적 공여자 ID가 세포 유형 라벨 끝에 첨부된다. 상단 덴드로그램의 점선 수평선은 샘플 분할을 보여주지만 클러스터링의 비지도 특성에는 영향을 미치지 않는다. CD39는 모든 프로파일링된 면역 집단에 걸쳐 발현된다. 각 세포 유형 내의 이러한 경로에서 유전자가 일관되게 발현되면 세포 유형은 별도의 클러스터를 형성한다. IL-1 β , P2X7, 및 A2AR 상에서의 발현에 의해 구동된 단핵구, M1 대식세포, 및 풍부화된 1차 DC가 함께 클러스터링된다. M0, M1 대식세포, 및 moDC는 CD206, A2BR, 및 P2Y11의 발현이 더 높은 다른 클러스터를 형성한다.

[0368] 실시예 12: P2Y11 길항작용은 ATP 구동된 수지상 세포 활성화를 감소시킨다

[0369] 단핵구 유래 수지상 세포(MoDC)의 활성화에 대한 P2X1, P2X7, 및 P2Y11 억제제의 효과를 조사하였다. MoDC를 실시예 11에 기재된 바와 같이 GM-CSF 및 IL-4와 배양된 양성으로 선택된 인간 단핵구로부터 생성하였다. 7일차에, 6-웰 플레이트를 얼음 위에서 5분 동안 인큐베이션하고 급어서 떼어내고 세포를 계수하였다. 세포를 GM-CSF 및 IL-4를 함유하는 새로운 배지에 재현탁하고 100 μ L 중 125,000개 세포를 96-웰 평판-바닥 Upcell 플레이트(Nunc, 카탈로그 번호 174897)에 웰 당 플레이트하였다. 10 마이크로몰의 각 화합물 [P2X1 억제제, NF023, Millipore Sigma, 카탈로그 번호 104869-31-0; P2X7 억제제, A-740003, Millipore Sigma, 카탈로그 번호 861393-28-4; P2Y11 억제제 NF340, APExBIO, 카탈로그 번호 B7508; P2Y11 억제제 NF157, APExBIO 카탈로그 번호 B7060] 또는 비히클-대조군(0.1% DMSO)을 첨가하고, 부드럽게 혼합하고, 37°C 5% CO₂에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 후속적으로, 0 또는 300 μ M ATP를 첨가하고, 부드럽게 혼합하고, 37°C 5% CO₂에서 18시간 동안 인큐베이션하였다. 유세포 측정법 평가를 위해, 세포를 플레이트에서 떼어내고 96-웰 폴리프로필렌 v-바닥 플레이트로 옮겼다. 세포를 PBS(Gibco, 카탈로그 번호 14190-144)로 세척하고 2% FBS, 생존력 염료(LD-NIR, Invitrogen, 카탈로그 번호 L34994), Fc 블록, 및 염색 항체 [BV510 항-CD80(BD Horizon, 카탈로그 번호 563084), PE-Cy7 항-CD83(BD Horizon, 카탈로그 번호 561132) 및 BV605 항-CD86(BD Horizon, 카탈로그 번호 562999)]를 함유하는 PBS 용액에 재현탁하였다. 세포를 실온에서 60분 동안 인큐베이션하고, 염색을 세척 제거하고 세포를 BD Phosphoflow FIX 완충액 I(BD, 카탈로그 번호 557870)로 고정시키고 15분 동안 인큐베이션하였다. 고정 완충액을 제거하고, 세포를 PBS로 세척하고, BD LSR Fortessa X-20 세포 분석기에서 획득하고 FlowJo™ v10.8 소프트웨어(BD Life Sciences)로 분석할 때까지 4°C에서 저장하였다.

[0370] 각 억제제 그룹 내에서, 배수 변화를 ATP와 비-ATP-처리된 그룹 사이에서 계산하여 ATP의 존재 하에 각 표면 마커의 유도를 계산하였다. 그런 다음 억제제-처리된 그룹의 유도 수준을 DMSO-처리된 그룹으로 정규화하였다. 결과는 P2Y11 억제제가 ATP에 의해 CD86 유도를 억제하지만, CD80 또는 CD83은 그렇지 않음을 보여준다(도 23).

[0371] **실시예 13: 고행 종양은 CD39 억제제의 결과로서 상승된 ATP에 반응하는 기계를 발현한다**

[0372] ATP 반응 기계를 고행 종양의 하위집합에서 평가하였다. 간단히 말해서, TCGA RNA 발현을 관심 종양 유형에서 분석하고 발현을 유전자 기준으로 정규화하였다(도 24a). 도 24b의 바이올린 플롯은 다음 유전자(단백질)의 정규화된 log2 유전자 발현(y-축)의 커널 확률 밀도(음영 영역의 폭은 그 곳에 위치한 데이터의 비율을 나타냄) 개요를 서술한다: TCGA 샘플의 하위집합 중에서 *ENTPDI*(CD39), *NT5E*(CD73), *P2RX7*(P2X7), 및 *P2RY11*(P2Y11). x-축 바이올린 플롯을 따라 특이적 TCGA 하위유형으로 그룹화된다: 식도 암종(ESCA), 두경부 편평 세포 암종(HNSC), 신장 신 투명 세포 암종(KIRC), 폐 선암종(LUAD), 폐 편평 세포 암종(LUSC), 췌장 선암종(PAAD), 및 위 선암종(STAD). TCGA 암 하위유형의 동일한 하위집합에 대한 유전자 세트 풍부화 분석을 사용하여 계산된 골수 유전자 서명(*IL-6*, *CXCL2*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL8*, 및 *PTGS2*)에 대한 경로 풍부화 점수(y-축)가 또한 도 24b에 제시되어 있다. 이 측정항목을 사용하여, > 0 값은 상향조절을 나타내고 < 0 값은 하향조절을 나타낸다. 모든 종양은 높은 수준의 CD39 및 골수 침윤을 갖는다. 모든 종양은 또한 유사한 수준의 P2X7 및 P2Y11을 공유하며, 이는 이들이 종양 미세환경에서 상승된 ATP에 반응할 수 있음을 나타낸다.

[0373] **개시된 구현예의 예**

[0374] 구현예 1: 인간 CD39에 특이적으로 결합하는 항-CD39 항체로서, (a) 서열번호: 10에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(H1), 서열번호: 11에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(H2), 및 서열번호: 12에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(H3)을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 14에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 1(L1), 서열번호: 15에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 2(L2), 및 서열번호: 16에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 상보성 결정 영역 3(L3)을 포함하는 경쇄 가변 영역; (b) 서열번호: 18에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H1, 서열번호: 19에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H2, 및 서열번호: 20에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 25에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L2, 및 서열번호: 26에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는 (c) 서열번호: 28에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H1, 서열번호: 29에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H2, 및 서열번호: 30에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 32에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 33에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L2, 및 서열번호: 34에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-CD39 항체.

[0375] 구현예 2: 구현예 1에 있어서, (a) 서열번호: 10에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성

을 갖는 H1, 서열번호: 11에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 H2, 및 서열번호: 12에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 14에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 15에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 L2, 및 서열번호: 16에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; (b) 서열번호: 18에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 H1, 서열번호: 19에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 H2, 및 서열번호: 20에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 25에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 L2, 및 서열번호: 26에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는 (c) 서열번호: 28에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 H1, 서열번호: 29에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 H2, 및 서열번호: 30에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 32에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 L1, 서열번호: 33에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 L2, 및 서열번호: 34에 대해 적어도 90% 서열 동일성 또는 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-CD39 항체.

[0376] 구현예 3: 인간 CD39에 특이적으로 결합하는 항-CD39 항체로서, (a) 서열번호: 10을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H1, 서열번호: 11을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H2, 및 서열번호: 12를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 14를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 15를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L2, 및 ID 번호: 16을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; (b) 서열번호: 18을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H1, 서열번호: 19를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H2, 및 서열번호: 20을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 22, 서열번호: 23, 또는 서열번호: 24를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 25를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L2, 및 서열번호: 26을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는 (c) 서열번호: 28을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H1, 서열번호: 29를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H2, 및 서열번호: 30을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 H3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 서열번호: 32를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L1, 서열번호: 33을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L2, 및 서열번호: 34를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항-CD39 항체.

[0377] 구현예 4: 구현예 1, 2 또는 3 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 항체가 구현예 1(a)에 따른 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지며 중쇄 가변 영역이 서열번호: 9에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖고, 경쇄 가변 영역이 서열번호: 13에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖거나;

[0378] 상기 항체가 구현예 1(b)에 따른 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지며 서열번호: 17에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 21에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 43에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 45에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 43에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 46에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 43에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 47에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 43에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 48에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 43에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 49에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 44에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 48에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는 서열번호: 44에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 49에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역이거나;

[0379] 상기 항체가 구현예 1(c)에 따른 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지며 서열번호: 27에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 31에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 58에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 60에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 58에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 61에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 58에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는

을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 62에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 58에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 63에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 59에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 61에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 59에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 60에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 서열번호: 59에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 62에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역; 또는 서열번호: 59에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호: 63에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역인, 항-CD39 항체.

[0380] 구현예 5: 구현예 1 내지 4 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 항-CD39 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

[0381] (a) 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 약 0.001×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.01×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.1×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.1×10^{-11} M 내지 약 10×10^{-11} M, 약 1×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M 또는 약 1×10^{-11} M 내지 약 10×10^{-11} M의 평형 결합 상수(K_D)를 갖거나;

[0382] (b) 적어도 약 1 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구이거나;

[0383] (c) (a) 또는 (b)의 임의의 조합인, 항-CD39 항체.

[0384] 구현예 6: 구현예 5에 있어서, 상기 항-CD39 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 약 0.05 nM 내지 약 0.5 nM, 또는 약 0.05 nM 내지 약 0.4 nM, 또는 약 0.05 nM 내지 약 0.3 nM의 IC_{50} 으로 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구인, 항-CD39 항체.

[0385] 구현예 7: 구현예 5에 있어서, 상기 항-CD39 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 약 0.3 nM 내지 약 1 nM, 또는 약 0.3 nM 내지 1 nM, 또는 약 0.5 nM 내지 약 1 nM, 또는 약 0.5 nM 내지 1 nM의 IC_{50} 으로 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구인, 항-CD39 항체.

[0386] 구현예 8: 구현예 1-7 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 항-CD39 항체가 단클론 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 항-CD39 항체.

[0387] 구현예 9: 구현예 1-8 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 항-CD39 항체가 키메라, 인간화, 또는 베니어드 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 항-CD39 항체.

[0388] 구현예 10: 구현예 1-8 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 항-CD39 항체가 인간 항체 또는 이의 항원-결합 단편인, 항-CD39 항체.

[0389] 구현예 11: 구현예 1 내지 10 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 항체가 변이체 인간 IgG1, 변이체 인간 IgG2, 변이체 인간 IgG3, 또는 변이체 인간 IgG4로부터 선택된 변이체 중쇄 불변 영역, 및 임의적으로 인간 경쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 것인, 항-CD39 항체.

[0390] 구현예 12: 구현예 11에 있어서, 상기 변이체 중쇄 불변 영역이 야생형 중쇄 불변 영역과 관련하여 효과기 기능이 향상되거나 감소된 것인, 항-CD39 항체.

[0391] 구현예 13: 구현예 11에 있어서, 상기 변이체 인간 IgG 중쇄 불변 영역이 서열번호: 2, 서열번호: 3, 또는 서열번호: 5를 포함하는 것인, 항-CD39 항체.

[0392] 구현예 14: 구현예 1-10 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 항체가 야생형 인간 IgG 중쇄 불변 영역, 및 임의적으로 인간 경쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 것인, 항-CD39 항체.

[0393] 구현예 15: 구현예 14에 있어서, 상기 야생형 인간 IgG 중쇄 불변 영역이 서열번호: 1 또는 서열번호: 4를 포함

하는 것인, 항-CD39 항체.

- [0394] 구현예 16: 구현예 11-15 중 어느 한 구현예에 있어서, 인간 경쇄 카파 불변 영역을 포함하며, 임의적으로 상기 인간 경쇄 불변 영역은 서열번호: 6을 포함하는 것인, 항-CD39 항체.
- [0395] 구현예 17: 구현예 1-3 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 항체가 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 가지며, 상기
- [0396] (a) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 53을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0397] (b) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 54를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0398] (c) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 55를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0399] (d) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 56을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0400] (e) 중쇄는 서열번호: 51을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 56을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0401] (f) 중쇄는 서열번호: 50을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 57을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0402] (g) 중쇄는 서열번호: 52를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 56을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0403] (h) 중쇄는 서열번호: 52를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 57을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 것인, 항-CD39 항체.
- [0404] 구현예 18: 구현예 1-3 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 항체가 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄를 가지며, 상기
- [0405] (a) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 67을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0406] (b) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 68을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0407] (c) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 69를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0408] (d) 중쇄는 서열번호: 64를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 70을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0409] (e) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 68을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0410] (f) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 67을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0411] (g) 중쇄는 서열번호: 66을 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 67을 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0412] (h) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 69를 포함하는 아미노산 서열을 갖거나;
- [0413] (i) 중쇄는 서열번호: 65를 포함하는 아미노산 서열을 갖고, 경쇄는 서열번호: 70을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 것인, 항-CD39 항체.
- [0414] 구현예 19: 구현예 17 또는 구현예 18에 있어서, 상기 항-CD39 항체 또는 이의 항원 결합 단편이

- [0415] (a) 표면 플라스몬 공명에 의해 측정된 약 0.001×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.01×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.1×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M, 약 0.1×10^{-11} M 내지 약 10×10^{-11} M, 약 1×10^{-11} M 내지 약 100×10^{-11} M 또는 약 1×10^{-11} M 내지 약 10×10^{-11} M의 평형 결합 상수(K_D)를 갖거나;
- [0416] (b) 적어도 약 1 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구이거나;
- [0417] (c) (a) 또는 (b)의 임의의 조합인, 항-CD39 항체.
- [0418] 구현예 20: 구현예 19에 있어서, 상기 항-CD39 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 약 0.05 nM 내지 약 0.5 nM, 또는 약 0.05 nM 내지 약 0.4 nM, 또는 약 0.05 nM 내지 약 0.3 nM의 IC_{50} 으로 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구인, 항-CD39 항체.
- [0419] 구현예 21: 구현예 19에 있어서, 상기 항-CD39 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 약 0.3 nM 내지 약 1 nM, 또는 약 0.3 nM 내지 1 nM, 또는 약 0.5 nM 내지 약 1 nM, 또는 약 0.5 nM 내지 1 nM의 IC_{50} 으로 CD39 효소적 활성을 억제하며, 임의적으로 상기 (i) 억제는 20 μ M ATP 또는 400 μ M ATP의 존재 하에 측정되고/되거나, (ii) CD39는 인간 세포의 표면 상에서 발현되며, 임의적으로 상기 인간 세포는 실시예 5에 기재된 바와 같은 1차 단핵구인, 항-CD39 항체.
- [0420] 구현예 22: 구현예 1-21 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 항체가 인간 CD39에 대한 결합에 대해 참조 항체와 경쟁 흐름 검정에서 측정된 바와 같이 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 경쟁하며, 상기 참조 항체는 (a) 구현예 17의 항체; (b) 구현예 18의 항체; (c) 서열번호: 37을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호: 38을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체; 또는 (d) 서열번호: 39를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열번호: 40을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체인, 항-CD39 항체.
- [0421] 구현예 23: CD39를 구현예 1 내지 22 중 어느 한 구현예의 항-CD39 항체와 접촉시키는 것을 포함하는 CD39 효소적 활성을 억제하는 방법.
- [0422] 구현예 24: 효과적인 레지멘 또는 치료적으로 유효량의 구현예 1-22 중 어느 한 구현예의 항-CD39 항체 중 임의의 하나를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 세포의 ATP 증가 또는 면역계 활성화를 필요로 하는 대상체에서 세포의 ATP를 증가시키거나 면역계를 활성화하는 방법.
- [0423] 구현예 25: 효과적인 레지멘 또는 치료적으로 유효량의 구현예 1-22 중 임의의 하나의 항-CD39 항체 중 임의의 하나를 암을 앓고 있거나 암에 걸릴 위험이 있는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하거나 예방을 실행하는 방법.
- [0424] 구현예 26: 구현예 25에 있어서, 상기 암이 혈액학적 악성종양 또는 고형 종양인, 방법.
- [0425] 구현예 27: 구현예 25에 있어서, 상기 암이 유방암, 위장관암, 비뇨생식기암, 폐암, 림프종, 또는 난소암인, 방법.
- [0426] 구현예 28: 구현예 27에 있어서, 상기 암이 급성 골수성 림프종, 대장암, 위암, 식도암, 거세 저항 전립선암, 비소세포 폐암, 난소암, 췌장암, 또는 삼중 음성 유방암인, 방법.
- [0427] 구현예 29: 구현예 25에 있어서, 상기 암이 비소세포 폐암, 위암, 또는 위식도암인, 방법.
- [0428] 구현예 30: 구현예 25에 있어서, 상기 암이 폐암, 두경부암, 갑상선암, 췌장암, 신장암, 또는 피부암인, 방법.
- [0429] 구현예 31: 구현예 30에 있어서, 상기 암이 비소세포 폐암, 두경부 편평 세포 암종, 췌관 선암종, 투명 세포 신암종, 또는 흑색종인, 방법.
- [0430] 구현예 32: 구현예 24-31 중 어느 한 구현예에 있어서, 하나 이상의 추가적인 치료제를 대상체에게 투여하는 것

을 추가로 포함하는, 방법.

- [0431] 구현예 33: 구현예 1-22 중 어느 한 구현예의 항-CD39 항체 및 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는 조합물.
- [0432] 구현예 34: 구현예 32 또는 구현예 33에 있어서, 상기 각 추가적인 치료제가 화학치료제, 방사성의약품, 면역원성 세포 사멸을 유도하는 제제, 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제, 자극 또는 공동자극 면역 체크포인트의 작용제, 및 ATP-아데노신 측-표적화제로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것인, 방법 또는 조합물.
- [0433] 구현예 35: 구현예 32 또는 구현예 33에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 치료제가 화학치료제 또는 면역원성 세포 사멸을 유도하는 제제이고, 적어도 하나의 추가적인 치료제가 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제 또는 ATP-아데노신 측-표적화제인, 방법 또는 조합물.
- [0434] 구현예 36: 구현예 32 또는 구현예 33에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 치료제가 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제이고, 적어도 하나의 추가적인 치료제가 ATP-아데노신 측-표적화제인, 방법 또는 조합물.
- [0435] 구현예 37: 구현예 32-36 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 면역원성 세포 사멸을 유도하는 제제가 방사선 요법인, 방법 또는 조합물.
- [0436] 구현예 38: 구현예 32-36 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 면역원성 세포 사멸을 유도하는 제제가 (a) 보르테조미드, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미토잔트론, 옥살리플라틴, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 임의적으로 선택된 화학치료제, 또는 (b) 블레오마이신, 보르테조미드, 카보플라틴, 세특시맙, 크리조티닙, 사이클로포스파미드, 도세탁셀, 독소루비신, 에피루비신, 켄시타빈, 이다루비신, 이리노테칸, 미토잔트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 베무라페닙, 보리노스타트, 및 이의 임의의 조합인, 방법 또는 조합물.
- [0437] 구현예 39: 구현예 32-38 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 각 화학치료제가 알킬화제, 안트라사이클린, 백금제, 타산, 및 프로테아좀 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법 또는 조합물.
- [0438] 구현예 40: 구현예 32-39 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제가 PD-1, PD-L1, BTLA, LAG-3, B7 계열 구성원, TIM-3, TIGIT 또는 CTLA-4 중 적어도 하나의 활성을 차단하는 것인, 방법 또는 조합물.
- [0439] 구현예 41: 구현예 32-40 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제가 PD-1, PD-L1, 또는 TIGIT 중 적어도 하나의 활성을 차단하는 것인, 방법 또는 조합물.
- [0440] 구현예 42: 구현예 32-41 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제가 길항성 항-PD-1 항체, 길항성 항-PD-L1 항체, 또는 길항성 항-TIGIT 항체인, 방법 또는 조합물.
- [0441] 구현예 43: 구현예 32-42 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 각 억제 또는 공동억제 면역 체크포인트의 길항제가 짐베렐리맙, 돔바날리맙, 및 AB308로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것인, 방법 또는 조합물.
- [0442] 구현예 44: 구현예 32-43 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 각 ATP-아데노신 측-표적화제가 A_{2a} R 길항제, A_{2b} R 길항제, $A_{2a/2b}$ R 길항제, 및 CD73 억제제로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것인, 방법 또는 조합물.
- [0443] 구현예 45: 구현예 32-44 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 각 ATP-아데노신 측-표적화제가 에트루마데난트 및 켄리클루스타트로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것인, 방법 또는 조합물.
- [0444] 구현예 46: 구현예 25에 있어서, 상기 암이 비소세포 폐암이고 방법이 페메트렉시드, 카보플라틴, 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체와 조합하여 항-CD39 항체를 투여하는 것을 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [0445] 구현예 47: 구현예 25에 있어서, 상기 암이 위암 또는 위식도암이고 방법이 FOLFOX 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체와 조합하여 항-CD39 항체를 투여하는 것을 추가로 포함하는 것인, 방법.
- [0446] 구현예 48: 구현예 46 또는 47에 있어서, 길항성 항-TIGIT 항체, A_{2a} R 길항제, A_{2b} R 길항제, $A_{2a/2b}$ R 길항제, 및 CD73 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 제제를 투여하는 것을 추가로 포함하며, 임의적으로 상기 추가적인 제제는 돔바날리맙, AB308, 에트루마데난트, 및 켄리클루스타트로 이루어진 군으로부터

선택되는 것인, 방법.

- [0447] 구현예 49: 구현예 33에 있어서, 상기 하나 이상의 추가적인 치료제가 (a) 페메트렉시드, 카보플라틴, 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체, 또는 (b) FOLFOX 및 길항제 항-PD-1 항체 또는 길항제 항-PD-L1 항체를 포함하는 것인, 조합물.
- [0448] 구현예 50: 구현예 1-19 중 어느 한 구현예의 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.
- [0449] 구현예 51: 구현예 1-22 중 어느 한 구현예의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드.
- [0450] 구현예 52: 구현예 51의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [0451] 구현예 53: 구현예 52의 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0452] 구현예 54: 구현예 51의 폴리뉴클레오티드가 발현되는 조건 하에 구현예 53의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 구현예 1-22 중 어느 한 구현예의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 발현시키는 방법.
- [0453] 구현예 55: 구현예 1-22 중 어느 한 구현예의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 키트.

서열 목록 표

서열 번호	아미노산 서열	설명
1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	중쇄 불변 영역 IGG1; 야생형 IMGT 대립유전자 IGHG1*01-EU 번호지정 118-447
2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	중쇄 불변 영역 IGG1.AA; IMGT 대립유전자 IGHG1*01(L234A, L235A) EU 번호지정
3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	중쇄 불변 영역 IGG1.DLE; IMGT 대립유전자 IGHG1*01(S239D, A330L, I332E) EU 번호지정
4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	중쇄 불변 영역 IGG4; 야생형; IMGT 대립유전자 IGHG4*01-EU 번호지정
5	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCPAPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	중쇄 불변 영역 IGG4.P; IMGT 대립유전자 IGHG4*01(S228P) EU 번호지정
6	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	경쇄 불변 영역, 카파 IMGT 대립유전자 IGKC*01
7	MEDTKEINVKTFCSKNLAIFGFSIIAVIALLAVALTQNKALPENVKYGIIVLDAGSSHTSLYIKWPAEKENDTGVVHQVEECRVKGPISKVFQKVNIEGIYLTDCMERAREVIP	인간 CD39(UniProtKB 참조: P49961)

[0455]

	RSQHQPVPVYL GATAGMRLLRMESEELADRVLDVVER SLSNYPDFQGGARIITGQEEGAYGWITINYL LGKFSQKT RWFVSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIES PDNALQFRLYGKDYNVYTHSFLCYGKDQALWQKLAK DIQVASNEILRDPCHFPGYKVVNVSDLYKTPCTKRFE MTLPFQQFEIQGIGNYQQCHQSILEFNTSYCPYSQCAF NGIFLPLQGDGFAFSAFYFVMKFLNLTSEKVSQEKVTE MMKKFCAQWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSL LLQGYHFTADSWEHIFIGKIQGS DAGWTLGYMLNLTN MIPAEQPLSTPLSHSTYVFLMVLFSLVLFVAIIGLLIFHK PSYFWKDMV	
8	MKGTKDLTSQQKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIAL AVGLTQNKALPENIKYGIVLDAGSSHTSLYIYKWPAAK ENDTGVVHQVEECRVKGPISKYVQKVNEIGIYLTDCM ERAREVIPRSQHQPVPVYL GATAGMRLLRMESEELADRV LDVVERSLSNYPDFQGGARIITGQEEGAYGWITINYL GKFSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQITFVP QNQTIESPDNALQFRLYGKDYNVYTHSFLCYGKDQAL WQKLAKDIQVASNEILRDPCHFPGYKVVNVSDLYKTP CTKRFE MTLPFQQFEIQGIGNYQQCHQSILEFNTSYCP YSQCAFNGIFLPLQGDGFAFSAFYFVMKFLNLTSEKVS QEKVTEMMKKFCSQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSG TYILSLLLQGYHFTADSWEHIFIGKIQGS DAGWTLGY MLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYVFLMVLFSLVLVIVAI GLLIFHKPSYFWKDMV	시노물구스 원숭이 CD39(UniProtKB 참조: G7PDM2)
9	QVQLKETGPGVLVQPTQILSITCTVSGFSLTSYFTQWVRQ TPGKGLEWMGFIRSGGSTQYNSAFKSRLSISRDTSKNQV FLKMNSLKTEDTGVIYCARDRPDYHDGTYGVLDVWG QGASVTVSS	19 HCVR(성숙한 펩티드) ch19_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드)
10	GFSLTSYFTQ	19 HC CDR1 ch19_IGG4.P HC CDR1
11	FIRSGGSTQYNSAFKS	19 HC CDR2 ch19_IGG4.P HC CDR2
12	DRPDYHDGTYGVLDV	19 HC CDR3 ch19_IGG4.P HC CDR3
13	DIRMTQSPASLSASLGTVNIECLASEIDSDLA WYQKK PGKSPQLLIYNGNALQNGVPSRFSGSGSGTHFSLKINS LQSEDVATYFCQQYINYPYTFGGGKLELR	19 LCVR(성숙한 펩티드) ch19_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드)
14	LASEIDSDLA	19 LC CDR1 ch19_IGG4.P LC CDR1
15	NGNALQN	19 LC CDR2 ch19_IGG4.P LC CDR2
16	QQYINYPYT	19 LC CDR3 ch19_IGG4.P LC CDR3
17	EVHLQQSGAALVRPGTSVKLPCKVSGDSITAYFMHFVR QRPQGQLEWMGRIDPDHERTKYAEKFKNRASLTSETSS NTVFLQLTSLTSEDATYFCTTERTVPGFETDYWGQGV MTVSS	31 HCVR(성숙한 펩티드) ch31_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드)
18	GDSITAYFMH	31 HC CDR1 ch31_IGG4.P HC CDR1 hu31.1_IGG4.P HC CDR1 hu31.2_IGG4.P HC CDR1 hu31.3_IGG4.P HC CDR1 hu31.4_IGG4.P HC CDR1 hu31.4_IGG1.AA HC CDR1 hu31.5_IGG4.P HC CDR1

[0456]

		hu31.6_IGG4.P HC CDR1 hu31.7_IGG4.P HC CDR1
19	RIDPDHERTKYAEKFN	31 HC CDR2 ch31_IGG4.P HC CDR2 hu31.1_IGG4.P HC CDR2 hu31.2_IGG4.P HC CDR2 hu31.3_IGG4.P HC CDR2 hu31.4_IGG4.P HC CDR2 hu31.4_IGG1.AA HC CDR2 hu31.5_IGG4.P HC CDR2 hu31.6_IGG4.P HC CDR2 hu31.7_IGG4.P HC CDR2
20	ERVPGFETDY	31 HC CDR3 ch31_IGG4.P HC CDR3 hu31.1_IGG4.P HC CDR3 hu31.2_IGG4.P HC CDR3 hu31.3_IGG4.P HC CDR3 hu31.4_IGG4.P HC CDR3 hu31.4_IGG1.AA HC CDR3 hu31.5_IGG4.P HC CDR3 hu31.6_IGG4.P HC CDR3 hu31.7_IGG4.P HC CDR3
21	DIVLTQSPTLAVSLGQRATISCRINQTVVDHYGTTYMNW YQQKPGQQPKLLIYLASSLASGIPARFSGRGSGLDFTLTI DPVEADDTATYYCQQRNLWTFGGGKLELK	31 LCVR(성숙한 펩티드) ch31_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드)
22	RTNQTVVDHYGTTYMN	31 LC CDR1 ch31_IGG4.P LC CDR1
23	RTNPTVDHYGTTYMN	hu31.1_IGG4.P LC CDR1 hu31.3_IGG4.P LC CDR1
24	RTQQTVVDHYGTTYMN	hu31.2_IGG4.P LC CDR1 hu31.4_IGG4.P LC CDR1 hu31.4_IGG1.AA LC CDR1 hu31.5_IGG4.P LC CDR1 hu31.6_IGG4.P LC CDR1 hu31.7_IGG4.P LC CDR1
25	LASSLAS	31 LC CDR2 ch31_IGG4.P LC CDR2 hu31.1_IGG4.P LC CDR2 hu31.2_IGG4.P LC CDR2 hu31.3_IGG4.P LC CDR2 hu31.4_IGG4.P LC CDR2 hu31.4_IGG1.AA LC CDR2 hu31.5_IGG4.P LC CDR2 hu31.6_IGG4.P LC CDR2 hu31.7_IGG4.P LC CDR2
26	QQRNLWT	31 LC CDR3 ch31_IGG4.P LC CDR3 hu31.1_IGG4.P LC CDR3 hu31.2_IGG4.P LC CDR3 hu31.3_IGG4.P LC CDR3 hu31.4_IGG4.P LC CDR3 hu31.4_IGG1.AA LC CDR3 hu31.5_IGG4.P LC CDR3 hu31.6_IGG4.P LC CDR3 hu31.7_IGG4.P LC CDR3

[0457]

27	EVQLVESGGGLVQPGRSLKSLASGFTFNNGMNWIR QAPGKGLEWVASFSSSTYISYADTVKGRFTISRENAKN TLYLQMTSLRSEDITALYYCVRHGRYGGYGGFYFDYWG QGVMVTSS	39 HCVR(성숙한 펩티드) ch39_m1GG2A.AAG HCVR(성숙한 펩티드) ch39_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드)
28	GFTFNNGMN	39 HC CDR1 ch39_m1GG2A.AAG HC CDR1 ch39_IGG4.P HC CDR1 hu39.1_IGG4.P HC CDR1 hu39.2_IGG4.P HC CDR1 hu39.3_IGG4.P HC CDR1 hu39.4_IGG4.P HC CDR1 hu39.5_IGG4.P HC CDR1 hu39.5_IGG1.AA HC CDR1 hu39.6_IGG4.P HC CDR1 hu39.7_IGG4.P HC CDR1 hu39.8_IGG4.P HC CDR1
29	SFSSSTYISYADTVKG	39 HC CDR2 ch39_m1GG2A.AAG HC CDR2 ch39_IGG4.P HC CDR2 hu39.1_IGG4.P HC CDR2 hu39.2_IGG4.P HC CDR2 hu39.3_IGG4.P HC CDR2 hu39.4_IGG4.P HC CDR2 hu39.5_IGG4.P HC CDR2 hu39.5_IGG1.AA HC CDR2 hu39.6_IGG4.P HC CDR2 hu39.7_IGG4.P HC CDR2 hu39.8_IGG4.P HC CDR2
30	HGRYGGYGGFYFDY	39 HC CDR3 ch39_m1GG2A.AAG HC CDR3 ch39_IGG4.P HC CDR3 hu39.1_IGG4.P HC CDR3 hu39.2_IGG4.P HC CDR3 hu39.3_IGG4.P HC CDR3 hu39.4_IGG4.P HC CDR3 hu39.5_IGG4.P HC CDR3 hu39.5_IGG1.AA HC CDR3 hu39.6_IGG4.P HC CDR3 hu39.7_IGG4.P HC CDR3 hu39.8_IGG4.P HC CDR3
31	DTVLTQSPALAVSPGERVVISCRASEGVKSYMHYQQK PGQQPKLLIYKASNLASGVPARFSGSGSGIDFTLTIDPVE ADDTATYFCQQSWNDPTFGAGTKLELK	39 LCVR(성숙한 펩티드) ch39_m1GG2A.AAG LCVR(성숙한 펩티드) ch39_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드)
32	RASEGVKSYMH	39 LC CDR1 ch39_m1GG2A.AAG LC CDR1 ch39_IGG4.P LC CDR1 hu39.1_IGG4.P LC CDR1 hu39.2_IGG4.P LC CDR1 hu39.3_IGG4.P LC CDR1 hu39.4_IGG4.P LC CDR1 hu39.5_IGG4.P LC CDR1 hu39.5_IGG1.AA LC CDR1 hu39.6_IGG4.P LC CDR1 hu39.7_IGG4.P LC CDR1 hu39.8_IGG4.P LC CDR1
33	KASNLAS	39 LC CDR2

[0458]

		ch39_mIGG2A.AAG LC CDR2 ch39_IGG4.P LC CDR2 hu39.1_IGG4.P LC CDR2 hu39.2_IGG4.P LC CDR2 hu39.3_IGG4.P LC CDR2 hu39.4_IGG4.P LC CDR2 hu39.5_IGG4.P LC CDR2 hu39.5_IGG1.AA LC CDR2 hu39.6_IGG4.P LC CDR2 hu39.7_IGG4.P LC CDR2 hu39.8_IGG4.P LC CDR2
34	QQSWNDPT	39 LC CDR3 ch39_mIGG2A.AAG LC CDR3 ch39_IGG4.P LC CDR3 hu39.1_IGG4.P LC CDR3 hu39.2_IGG4.P LC CDR3 hu39.3_IGG4.P LC CDR3 hu39.4_IGG4.P LC CDR3 hu39.5_IGG4.P LC CDR3 hu39.5_IGG1.AA LC CDR3 hu39.6_IGG4.P LC CDR3 hu39.7_IGG4.P LC CDR3 hu39.8_IGG4.P LC CDR3
35	QVQLKETGPGVLVQPTQTLSTCTVSGFSLTSYFTQWVRQ TPGKGLEWMGFIRSGGSTQYNSAFKSRLSISRDTSKNQV FLKMNSLKTEDTGVYYCARDRPDYHDGTYGVLVDVWG QGASVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	ch19_IGG4.P HC
36	DIRMTQSPASLSASLGETVNECLASEDIDSDLAWYQKK PGKSPQLLIYNGNALQNGVPSRFSGSGTHFSLKINS QSEDEVATYFCQYINYPYTFGGGTKLELRRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVY ACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC	ch19_IGG4.P LC
37	EVHLQQSGAALVRPGTSVKLPCKVSGDSITAYFMHFVR QRPQGQGLEWMGRIDPDHERTKYAEKFKNRASLTSETSS NTVFLQLTSLTSEDATYFCTTERVPGFETDYWGQGM VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	ch31_IGG4.P HC
38	DIVLTQSPFLAVSLGQRATISCRNTQVDHYGTTYMNW YQKPGQPKLLIYLASSLASGIPARFSGRSGTDFLTIT DPVEADDTATYYCQSRNLWTFGGGTKLELKRTVAAP	ch31_IGG4.P LC

[0459]

	SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
39	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFNNGMWNIR QAPGKGLEWVASFSSTSYISYADTVKGRFTISRENAKN TLYLQMTSLRSEDALYYCVRHGRYGGYGGFYFDYWG QGVMTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK	ch39_IGG4.P HC
40	DTVLTQSPALAVSPGERVSISCRASEGVKSYMHWYQQK PGQPKLLIYKASNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVE ADDTATYFCQQSWNDPTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	ch39_IGG4.P LC
41	EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFNNGMWNIR QAPGKGLEWVASFSSTSYISYADTVKGRFTISRENAKN TLYLQMTSLRSEDALYYCVRHGRYGGYGGFYFDYWG QGVMTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSTLGLCLV KGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSV TVTSSTWPSQSIENVAHPASSTKVVDKIEPRGPTIKPCP PCKCPAPNAAGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVD VSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRV VSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLGAPIERTISKPK GSRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIY VEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKK NWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	ch39_mIGG2A.AAG HC
42	DTVLTQSPALAVSPGERVSISCRASEGVKSYMHWYQQK PGQPKLLIYKASNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTIDPVE ADDTATYFCQQSWNDPTFGAGTKLELKRAAAPTYSIF PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQ GVLNSWTDQDSKDYSLSSSTLTLTKDEYERHNSYTCE ATHKTSTSPVKSFNRECE	ch39_mIGG2A.AAG LC
43	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGDSITAYFMHWV RQAPGKGLEWMGRIDPDHERTKYAEKFKNRVTMTSDT STNTVYMESSLRSEDATVYYCATERVPGFETDYWGQ GTMVTVSS	hu31.1_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드) hu31.2_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드) hu31.3_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드) hu31.4_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드) hu31.4_IGG1.AA HCVR(성숙한 펩티드) hu31.5_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드)
44	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGDSITAYFMHWV QQAPGKGLEWMGRIDPDHERTKYAEKFKNRVTITADTS TNTVYMESSLRSEDATVYYCATERVPGFETDYWGQ VMVTVSS	hu31.6_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드) hu31.7_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드)
45	DIVLTQSPALAVSPGQRATITCRTNPTVDHYGTTYMNW YQKPKGPQPKLLIYLASSLASSGVPARFSGSGSGTDFTLTI NPVEANDTANYCQQSRNLWTFGGGTKVEIK	hu31.1_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드)
46	DIVLTQSPALAVSPGQRATITCRTQQTVDHYGTTYMNW YQKPKGPQPKLLIYLASSLASSGVPARFSGSGSGTDFTLTI NPVEANDTANYCQQSRNLWTFGGGTKVEIK	hu31.2_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드)

[0460]

47	DIVLTQSPALAVSPGQRATITCRTNPVDHYGTTYMNW YQQKPGQPPKLLIYLASSLASGVPARFSGSGSGTDFTLTI NPVEADDTANYCQQRNLTWFGGGTKVEIK	hu31.3_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드)
48	DIVLTQSPALAVSPGQRATITCRTQQTVDHYGTTYMNW YQQKPGQPPKLLIYLASSLASGVPARFSGSGSGTDFTLTI NPVEADDTANYCQQRNLTWFGGGTKVEIK	hu31.4_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드) hu31.4_IGG1.AA LCVR(성숙한 펩티드) hu31.6_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드)
49	DIVMTQSPDLAVSLGERATINCRTQQTVDHYGTTYMN WYQQKPGQPPKLLIYLASSLASGVPRFSGSGSGTDFTL TISSLAQEDVAVYYCQQRNLTWFGGGTKVEIK	hu31.5_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드) hu31.7_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드)
50	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGDSITAYFMHWV RQAPGKGLEWMGRIDPDHERTKYAEKFKNRVTMTSDT STNTVYMESSLRSEDVAVYYCATERVPGFETDYWGQ GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV VPSSSLGKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	hu31.1_IGG4.P HC(성숙한 펩티드) hu31.2_IGG4.P HC(성숙한 펩티드) hu31.3_IGG4.P HC(성숙한 펩티드) hu31.4_IGG4.P HC(성숙한 펩티드) hu31.5_IGG4.P HC(성숙한 펩티드)
51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGDSITAYFMHWV RQAPGKGLEWMGRIDPDHERTKYAEKFKNRVTMTSDT STNTVYMESSLRSEDVAVYYCATERVPGFETDYWGQ GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV VPSSSLGKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	hu31.4_IGG1.AA HC(성숙한 펩티드)
52	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGDSITAYFMHWV QQAPGKGLEWMGRIDPDHERTKYAEKFKNRVTITADTS TNTVYMESSLRSEDVAVYYCATERVPGFETDYWGQG VMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	hu31.6_IGG4.P HC(성숙한 펩티드) hu31.7_IGG4.P HC(성숙한 펩티드)
53	DIVLTQSPALAVSPGQRATITCRTNPVDHYGTTYMNW YQQKPGQPPKLLIYLASSLASGVPARFSGSGSGTDFTLTI NPVEANDTANYCQQRNLTWFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLSKADYEK KVYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC	hu31.1_IGG4.P LC(성숙한 펩티드)
54	DIVLTQSPALAVSPGQRATITCRTQQTVDHYGTTYMNW YQQKPGQPPKLLIYLASSLASGVPARFSGSGSGTDFTLTI NPVEANDTANYCQQRNLTWFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLSKADYEK	hu31.2_IGG4.P LC(성숙한 펩티드)

[0461]

	KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
55	DIVLTQSPALAVSPGQRATITCRTNPTVDHYGTTYMNWYQKPGQPPKLLIYLASSLASGVPARFSGSGSGTDFTLINPVEADDTANYCQQRNLTWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hu31.3_IGG4.P LC(성숙한 펩티드)
56	DIVLTQSPALAVSPGQRATITCRTQQTVDHYGTTYMNWYQKPGQPPKLLIYLASSLASGVPARFSGSGSGTDFTLINPVEADDTANYCQQRNLTWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hu31.4_IGG4.P LC(성숙한 펩티드) hu31.4_IGG1.AA LC(성숙한 펩티드) hu31.6_IGG4.P LC(성숙한 펩티드)
57	DIVMTQSPDLAVSLGERATINCRQTQTVVDHYGTTYMNWYQKPGQPPKLLIYLASSLASGVPDRFSGSGSGTDFLTITSSLAQEDVAVYYCQQRNLTWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hu31.5_IGG4.P LC(성숙한 펩티드) hu31.7_IGG4.P LC(성숙한 펩티드)
58	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNNGMNWVRQAPGKGLEWVSSFSSTYSYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARHGRYGGYGGFYFDYWGQGTMTVSS	hu39.1_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드) hu39.2_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드) hu39.3_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드) hu39.8_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드)
59	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNNGMNWVRQAPGKGLEWVASFSSSTYSYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGRYGGYGGFYFDYWGQGTMTVSS	hu39.4_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드) hu39.5_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드) hu39.5_IGG1.AA HCVR(성숙한 펩티드) hu39.6_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드) hu39.7_IGG4.P HCVR(성숙한 펩티드)
60	DTVLTQSPALAVSPGQRATITCRASEGVKSYMHWYQQKPGQPPKLLIYKASNLASGVPARFSGSGSGTDFLTINPVEADDTANYCQQRNLTWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hu39.1_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드) hu39.5_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드) hu39.5_IGG1.AA LCVR(성숙한 펩티드)
61	DIVLTQSPALAVSPGQRATITCRASEGVKSYMHWYQQKPGQPPKLLIYKASNLASGVPARFSGSGSGTDFLTINPVEADDTANYCQQRNLTWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hu39.2_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드) hu39.4_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드)
62	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEGVKSYMHWYQQKPGQAPRLLIYKASNLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQRNLTWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hu39.3_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드) hu39.6_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드)
63	ETVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEGVKSYMHWYQQKPGQAPRLLIYKASNLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQRNLTWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hu39.7_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드) hu39.8_IGG4.P LCVR(성숙한 펩티드)
64	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNNGMNWVRQAPGKGLEWVSSFSSTYSYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARHGRYGGYGGFYFDYWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTITCTYCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLK	hu39.1_IGG4.P HC(성숙한 펩티드) hu39.2_IGG4.P HC(성숙한 펩티드) hu39.3_IGG4.P HC(성숙한 펩티드) hu39.8_IGG4.P HC(성숙한 펩티드)
65	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNNGMNWVRQAPGKGLEWVASFSSSTYSYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARHGRYGGYGGFYFDYWGQGTMTVSS	hu39.4_IGG4.P HC(성숙한 펩티드) hu39.5_IGG4.P HC(성숙한 펩티드)

[0462]

	NTLYLQMSSLRAEDTAVVYCARHGRYGGYGGFYFDY WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVV VDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	hu39.6_IGG4.P HC(성숙한 펩티드) hu39.7_IGG4.P HC(성숙한 펩티드)
66	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFNNGMNVV RQAPGKGLEWVASFSSSTYISYADTVKGRFTISRDNK NTLYLQMSSLRAEDTAVVYCARHGRYGGYGGFYFDY WGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKCD KTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	hu39.5_IGG1.AA HC(성숙한 펩티드)
67	DTVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASEGVKSYMHWYQQ KPGQPPKLLIYKASNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTINPV EADDTANYVCQQSWNDPTFGQGKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTLKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hu39.1_IGG4.P LC(성숙한 펩티드) hu39.5_IGG4.P LC(성숙한 펩티드) hu39.5_IGG1.AA LC(성숙한 펩티드)
68	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASEGVKSYMHWYQQ KPGQPPKLLIYKASNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTINPV EADDTANYVCQQSWNDPTFGQGKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTLKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hu39.2_IGG4.P LC(성숙한 펩티드) hu39.4_IGG4.P LC(성숙한 펩티드)
69	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEGVKSYMHWYQQ KPGQAPRLLIYKASNLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQ SEDFAVYYCQQSWNDPTFGQGKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTLKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hu39.3_IGG4.P LC(성숙한 펩티드) hu39.6_IGG4.P LC(성숙한 펩티드)
70	ETVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASEGVKSYMHWYQ KPGQAPRLLIYKASNLASGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQ SEDFAVYYCQQSWNDPTFGQGKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTLKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	hu39.7_IGG4.P LC(성숙한 펩티드) hu39.8_IGG4.P LC(성숙한 펩티드)
71	MEDIKDSKVRFCSKNILILGFTSILAVIALIAGVLTQNK PLPENVKYGHVLDAGSSHTNLIYIKWPAEKENDTGVVQ QLEECQVKGPGISKYAQKTDEIGAYLAECMELSTELIPT SKHHQTPVYLGATAGMRLLRMESEQSADEVLAADVST LKSYPDFQGAQKITGQEEGAYGWITINYLGRFTQEQS WLSLISDSQKQETFGALDLGGASTQITFVPONSTIESPEN SLQFRLYGEDYTVYTHSFLCYGKDQALWQKLAKDIQV SSGGVLDKPCFNPGEYKVVNVSELYGTPCTKRFEKKLP FDQFRIQGTGDYEQCHQSILELFNNSHCPYSQC.AFNQV LPLHGSFGAFSAFYVMDFKKVAKNSVISQEKMTET	마우스 CD39(UniProtKB 참조: P55772)

	KNFCSKSWEEKTSYPSVKEKYLSEYCFSGAYILSLQGG YNFTDSSWEQHFMGKIKDSNAGWTLGYMLNLNMP AEQPLSPPLPHSTYIGLMVLSLLVAVAITGLFIYSKPS YFWKEAV	
72	TQNKALPENVKYGVLDAGSSHTSLYIKWPAEKENDT GVVHQVEECRVKGPISKVQKVNEIGIYLTDCMERAR EVIPRSQHQPVTYLGATAGMRLLRMESEELADRVLDV VERSLSNYPDFDQGARITGQEEGAYGWITINYLKGF QKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPO TIESPDNALQFRLYGKDYNNVYTHSFLCYGKDQALWQ LAKDIQVASNEILRDPCHPGYKVVNVSDLYKTPCTK RFEMITLPPQGFQIGIGNYQQCHQSILELNTSYCPYSQC AFNGIFLPLPQGFQAFSAFYVMKFLNLTSEKVSQEKV TEMMKKFCAQPWEEKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYIL SLLQGYHFTADSWHHHFGIKQGSADAGWTLGYMLNL TNMPAEQPLSTPLSHSTYVAHHHHHHHHHH	인간 CD39 세포외 도메인, His-태그
73	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYNMHV VRQAPGQRLWIGYIVPLNGGSTFNQKFKGRATITVDT ARTAYMELSSRLSEDTAVYYCARGGTRFAYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVESKCDKTHTCPP PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQ REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI ESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ GNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	huBMK2_IGG1.AEASS HC(성숙한 펩티드)
74	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCRASEVDNFGVSFMY WFQKQPGQPPKLLIYGASNQSGVPRFSGSGSGTDFT LTISSLQAEDVAVYYCQQTKEVPYTFGGGTVKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQ KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSITLTLKADY EEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	huBMK2_IGG1.AEASS LC(성숙한 펩티드)

[0463]

[0464]

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.