(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월12일
(11) 등록번호 10-2781223
(24) 등록일자 2025년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7027896(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년11월09일
심사청구일자 2024년09월19일
(85) 번역문제출일자 2024년08월20일
(65) 공개번호 10-2024-0130830
(43) 공개일자 2024년08월29일
(62) 원출원 특허 10-2017-7013490
원출원일자(국제) 2015년11월09일
심사청구일자 2020년10월23일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/076111
(87) 국제공개번호 WO 2016/075099
국제공개일자 2016년05월19일
(30) 우선권주장
62/077,486 2014년11월10일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
PNAS, 2010, Vol. 107(4), pp. 1547-1552*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
메디뮨 리미티드
영국 씨비2 0에이에이 케임브리지 케임브리지 바이오메디컬 캠퍼스 프랜시스 크릭 애비뉴 1
(72) 발명자
민터 랄프
영국 씨비21 6쥐에이치 캠브리지 캠브리지셔 그랜타 파크 밀스테인 빌딩 메디뮨 리미티드
러스트 스티븐
영국 씨비21 6쥐에이치 캠브리지 캠브리지셔 그랜타 파크 메디뮨 리미티드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 김종호

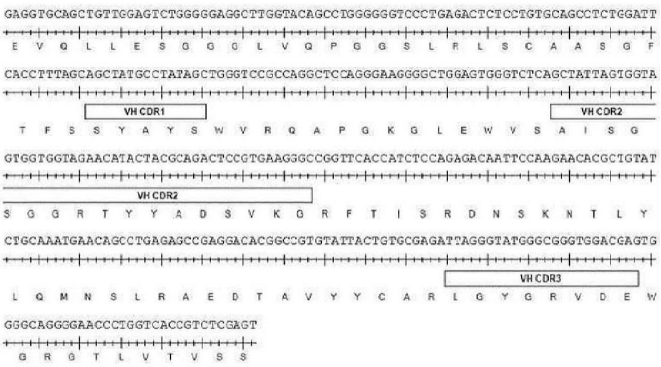
(54) 발명의 명칭 **CD73에 특이적인 결합 분자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 개시는 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 또한, 개시된 조성물을 포함하는 약학 제형 및 CD73 발현과 관련된 질병, 예컨대, 암의 진단 및 치료 방법이 제공된다. 그러한 질병은 예컨대, 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자(예컨대, CD73과 결합하는 네이키드 항체 또는 항체-약물 접합체)를 이용한

(뒷면에 계속)

대 표 도



직접 치료법, 면역 체크포인트 억제제(예컨대, 항-CTLA-4 및 항-PD-1 단일클론성 항체)와 같은 기타 항원 결합 항암제를 이용한 보조제 요법 및/또는 항-CD73 분자가 화학적 요법 전에, 후에, 또는 화학적 요법과 동시에 투여되는 병용 요법에 의해 치료할 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/77 (2013.01)

(72) 발명자
길라드 샌드린
영국 씨비21 6쥐에이치 캠브리지 캠브리지셔 그랜타 파크 메디뮨 리미티드
제르무터스 루츠 유.
영국 씨비21 6쥐에이치 캠브리지 캠브리지셔 그랜타 파크 메디뮨 리미티드
헤이 카를
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
사흐센마이어 크리스
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
술트 에린
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
후앙 퀴후이
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
파브릭 피터
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
담슈로더 멜리사
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
쳉 리
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
디드리히 군도
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
리오스-도리아 조나단
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
해몬드 스콧
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
홀링스워스 로버트 이
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
두르함 니콜라스
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
료 칭 칭
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨
안토니사미 마리
미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨

(30) 우선권주장
62/147,329 2015년04월14일 미국(US)
62/188,999 2015년07월06일 미국(US)

게오게간 제임스

미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨

루 시아오준

미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨

로센탈 킴

미국 20878 메릴랜드주 게이더스버그 원 메디뮨 웨이 메디뮨 엘엘씨

명 세 서

청구범위

청구항 1

항체 V_L 및 항체 V_H를 포함하는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, V_L은 서열 번호 88의 아미노산 서열을 포함하고, V_H는 서열 번호 87의 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3을 포함하는 V_L 및 V_H를 포함하는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, VL-CDR1은 서열 번호 97의 아미노산 서열을 포함하고, VL-CRD2는 서열 번호 99의 아미노산 서열을 포함하고, VL-CDR3은 서열 번호 100의 아미노산 서열을 포함하고, VH-CDR1은 서열 번호 35의 아미노산 서열을 포함하고, VH-CDR2는 서열 번호 95의 아미노산 서열을 포함하고, VH-CDR3은 서열 번호 96의 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 중쇄 불변 부위 또는 이의 단편을 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산.

청구항 5

제4항에 따른 핵산 서열을 포함하는 숙주 세포.

청구항 6

(a) 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 단리하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제조하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, CD73의 길항제인, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 8

제2항에 있어서, CD73의 길항제인, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 9

제7항에 있어서, CD73은 인간 CD73인, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 10

제8항에 있어서, CD73은 인간 CD73인, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제3항 및 제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 암은 결장직장암, 췌장암, 방광암, 백혈병, 림프종, 신경교종, 교모세포종, 흑색종, 난소암, 갑상선암, 식도암, 전립선암, 유방암, 폐암, 신장암 및 위암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

발명의 설명

배 경 기 술

[0001] CD73 또는 엑토-5'-뉴클레오티드가수분해효소(5'-NT)는 다수의 조직에서 보편적으로 발현된다. 이 단백질은 글리코실포스파티딜이노시톨(GPI) 연결을 통해 세포막에 고정되고, 세포 외 효소 활성을 지니며, 신호 전달에서 역할을 한다. CD73의 주된 기능은 세포들이 일반적으로 통과시키지 않는 세포 외 뉴클레오티드(예컨대, 5'-AMP)를 상응하는 뉴클레오시드(예컨대, 아데노신)로 전환하는 것이며, 이러한 뉴클레오시드는 대부분의 세포로 용이하게 들어갈 수 있다. AMP의 탈인산화에 의한 아데노신의 CD73 생산은 여러 조직에서 아데노신 수용체 관여를 조절하는 것으로 밝혀져, 아데노신이 세포 보호, 세포 성장, 혈관 신생 및 면역 억제에 작용하고, 종양 형성에도 역할을 함을 나타냈다.

[0002] 종양 세포에서의 CD73 발현은 결장직장암, 췌장암, 방광암, 백혈병, 림프종, 신경교종, 교모세포종, 흑색종, 난소암, 갑상선암, 식도암, 전립선암 및 유방암을 포함하는 여러 유형의 암에서 보고된 바 있다. 상승된 CD73 발현은 종양 침습성, 전이성 및 감소된 환자 생존기간과도 관련이 있었다. CD73은 암의 발달 및 진행을 촉진하는 증가된 아데노신 수준을 특징으로 하는 면역 억제 환경을 만들어낸다. 특히, CD73 발현은 흑색종과 유방암에서 전이 촉진성(prometastatic) 표현형과 관련이 있었다.

[0003] 면역체크포인트 억제제는 암 치료제로서 커다란 잠재력을 보유한다. 그럼에도 면역체크포인트 억제로부터의 임상적 유익은 그다지 대단하지 않았다. 한 가지 가능성 있는 설명은 종양이 면역 회피를 촉진하기 위하여 중첩되지 않는 면역억제 메커니즘을 이용한다는 것이다. 따라서 종양 매개 면역억제를 감소시키기 위한 개선된 조성물 및 방법이 절실하게 요구된다.

발명의 내용

[0004] 본 발명은 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 그러한 CD73 결합 분자는 예컨대, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항-CD73 항체(예컨대, MEDI9447)는 종양 매개 면역억제를 감소시키는 데 유용하다. 따라서, 본 발명은 항-CD73 항체들(예컨대, MEDI9447) 및, 암 면역 사이클의 추가적인 양태를 표적으로 하는 기타 제제(즉, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체; 항-CTLA4 항체, A2aR 길항제, STAT-3 억제제)를 특징으로 하는 치료적 조합물을 제공하고, 그러한 조합물을 이용하는 방법은 종양 매개 면역억제를 감소시키는 데 유용하다.

[0005] 일 양태에서, 본 발명은 CD73 에피토프에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 이때, 이러한 결합 분자는 CD730002, CD730003, CD730004, CD730008, CD730010, CD730011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, 또는 CD730058로부터 선택된 항체의 중쇄 가변 부위(V_H) 및 경쇄 가변 부위(V_L)를 가지는 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 동일한 CD73 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0006] 또 다른 양태에서, 본 발명은 CD73에 특이적으로 결합하고, CD730002, CD730003, CD730004, CD730008, CD730010, CD730011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, 또는 CD730058의 V_H 및 V_L을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 의한 CD73 결합을 경쟁적으로 억제하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0007] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 V_L을 포함하는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 이때, V_L은 아미노산 서열:

[0008] $[FW_1]SGSLSNIGRNX_1VN[FW_2]\ LX_2NX_3RX_4X_5[FW_3]\ ATWDDSX_6X_7GWX_8[FW_4]$

[0009] 를 가지며, 여기서, $[FW_1]$, $[FW_2]$, $[FW_3]$ 및 $[FW_4]$는 V_L 기본틀 부위를 나타내고, X_1은 아미노산 잔기 프롤린(P), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고; X_2는 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0010] X_3은 아미노산 잔기 글루타민(Q) 또는 류신(L)을 나타내고;

[0011] X_4는 아미노산 잔기 류신(L) 또는 프롤린(P)을 나타내고;

[0012] X_5는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0013] X_6은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;

[0014] X_7은 아미노산 잔기 라이신(K), 프롤린(P), 이소류신(I) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고;

[0015] X_8은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 트레오닌(T)을 나타낸다.

[0016] 본 설명에 기술한 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 청구항 제6항에 따른 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편, 여기서 FW_1은 서열 번호 25 또는 26을 포함하고, FW_2는 서열 번호 27 또는 28을 포함하고, FW_3은 서열 번호 29를 포함하고, FW_4는 서열 번호 30을 포함한다.

[0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 VH를 포함하는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 이때, V_H는 아미노산 서열:

[0018] $[FW_5]SYAX_9S\ [FW_6]X_{10}IX_{11}GSX_{12}GX_{13}TYYADSVKG\ [FW_7]LGYX_{14}X_{15}X_{16}DX_{17}\ [FW_8]$

[0019] 을 가지며, 여기서, $[FW_5]$, $[FW_6]$, $[FW_7]$ 및 $[FW_8]$은 VH 기본틀 부위를 나타내고,

[0020] X_9는 아미노산 잔기 메티오닌(M) 또는 티로신(Y)을 나타내고;

[0021] X_{10}은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 알라닌(A)을 나타내고;

[0022] X_{11}은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0023] X_{12}는 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 글리신(G)을 나타내고;

[0024] X_{13}은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아르기닌(R)을 나타내고;

[0025] X_{14}는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0026] X_{15}는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;

[0027] X_{16}은 아미노산 잔기 발린(V) 또는 이소류신(I)을 나타내고;

[0028] X_{17}은 아미노산 잔기 티로신(Y), 라이신(K), 메티오닌(M), 류신(L) 또는 글루탐산(E)을 나타낸다.

[0029] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 V_L 및 항체 V_H를 포함하는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또

는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 이때, V_L은 아미노산 서열:

[0030] $[FW_1]SGSLSNIGRNX_1VN[FW_2]LX_2NX_3RX_4X_5[FW_3]ATWDDSX_6X_7GWX_8[FW_4]$

[0031] 를 포함하고, 여기서 $[FW_1]$, $[FW_2]$, $[FW_3]$ 및 $[FW_4]$는 V_L 기본틀 부위를 나타내고,

[0032] X_1은 아미노산 잔기 프롤린(P), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0033] X_2는 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0034] X_3은 아미노산 잔기 글루타민(Q) 또는 류신(L)을 나타내고;

[0035] X_4는 아미노산 잔기 류신(L) 또는 프롤린(P)을 나타내고;

[0036] X_5는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0037] X_6은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;

[0038] X_7은 아미노산 잔기 라이신(K), 프롤린(P), 이소류신(I) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고;

[0039] X_8은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 트레오닌(T)을 나타내며;

[0040] 여기서 V_H는 아미노산 서열:

[0041] $[FW_5]SYAX_9S\ [FW_6]X_{10}IX_{11}GSX_{12}GX_{13}TYYADSVKG\ [FW_7]LGYX_{14}X_{15}X_{16}DX_{17}\ [FW_8]$

[0042] 을 포함하고, 여기서 $[FW_5]$, $[FW_6]$, $[FW_7]$ 및 $[FW_8]$은 VH 기본틀 부위를 나타내고,

[0043] X_9는 아미노산 잔기 메티오닌(M) 또는 티로신(Y)을 나타내고;

[0044] X_{10}은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 알라닌(A)을 나타내고;

[0045] X_{11}은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0046] X_{12}는 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 글리신(G)을 나타내고;

[0047] X_{13}은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아르기닌(R)을 나타내고;

[0048] X_{14}는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0049] X_{15}는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;

[0050] X_{16}은 아미노산 잔기 발린(V) 또는 이소류신(I)을 나타내고;

[0051] X_{17}은 아미노산 잔기 티로신(Y), 라이신(K), 메티오닌(M), 류신(L) 또는 글루탐산(E)을 나타낸다.

[0052] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 V_L을 가지는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 이때, V_L은 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51 또는 서열 번호 52와 동일하거나, 네 개, 세 개, 두 개 또는 하나의 아미노산 치환을 제외하고는 서열 번호 49, 서열 번호 50, 서열 번호 51 또는 서열 번호 52와 동일한 V_L 상보성 결정 부위-2(VL-CDR2) 아미노산 서열을 가진다.

[0053] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 V_L을 가지는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 이때, V_L은 서열 번호 53, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 또는 서열 번호 56과 동일하거나, 네 개, 세 개, 두 개 또는 하나의 아미노산 치환을 제외하고는 서열 번호 53, 서열 번호 54, 서열 번호 55, 또는 서열 번호 56과 동일한 상보성 결정 부위-3(VL-CDR3) 아미노산 서열을 가진다.

[0054] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 V_H를 가지는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원

결합 단편을 제공하는데, 이때, V_H는 서열 번호 35 또는 서열 번호 36과 동일하거나, 네 개, 세 개, 두 개 또는 하나의 아미노산 치환을 제외하고는 서열 번호 35 또는 서열 번호 36과 동일한 상보성 결정 부위-1(VH-CDR1) 아미노산 서열을 가진다.

[0055] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 V_H를 가지는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 이때, V_H는 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39, 또는 서열 번호 40과 동일하거나, 네 개, 세 개, 두 개 또는 하나의 아미노산 치환을 제외하고는 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39, 또는 서열 번호 40과 동일한 상보성 결정 부위-2(VH-CDR2) 아미노산 서열을 가진다.

[0056] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 V_H를 가지는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 이때, V_H는 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 또는 서열 번호 45와 동일하거나, 네 개, 세 개, 두 개 또는 하나의 아미노산 치환을 제외하고는 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43, 서열 번호 44, 또는 서열 번호 45와 동일한 상보성 결정 부위-3(VH-CDR3) 아미노산 서열을 가진다.

[0057] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 V_L을 가지는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 이때, V_L은 각각 서열 번호 46, 49 및 53; 서열 번호 47, 49 및 53; 서열 번호 47, 49 및 54; 서열 번호 46, 50 및 54; 서열 번호 46, 51 및 55; 서열 번호 48, 52 및 54; 서열 번호 46, 49 및 56; 서열 번호 47, 49 및 56; 서열 번호 46, 50 및 56; 서열 번호 46, 51 및 56; 또는 서열 번호 48, 52 및 56과 동일한 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 아미노산 서열, 또는 VL-CDR 중 하나 이상에 있어서 네 개, 세 개, 두 개 또는 하나의 아미노산 치환을 제외하고는 각각 서열 번호 46, 49 및 53; 서열 번호 47, 49 및 53; 서열 번호 47, 49 및 54; 서열 번호 46, 50 및 54; 서열 번호 46, 51 및 55; 서열 번호 48, 52 및 54; 서열 번호 46, 49 및 56; 서열 번호 47, 49 및 56; 서열 번호 46, 50 및 56; 서열 번호 46, 51 및 56; 또는 서열 번호 48, 52 및 56과 동일한 VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3 아미노산 서열을 가진다.

[0058] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 V_H를 가지는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 이때, V_H는 각각 서열 번호 35, 37 및 41; 서열 번호 36, 37 및 42; 서열 번호 36, 38 및 43; 서열 번호 36, 39 및 44; 서열 번호 36, 40 및 44; 서열 번호 35, 37 및 45; 서열 번호 36, 37 및 45; 서열 번호 36, 38 및 45; 서열 번호 36, 39 및 45; 또는 서열 번호 36, 40 및 45와 동일한 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 아미노산 서열, 또는 VH-CDR 중 하나 이상에 있어서 네 개, 세 개, 두 개 또는 하나의 아미노산 치환을 제외하고는 각각 서열 번호 35, 37 및 41; 서열 번호 36, 37 및 42; 서열 번호 36, 38 및 43; 서열 번호 36, 39 및 44; 서열 번호 36, 40 및 44; 서열 번호 35, 37 및 45; 서열 번호 36, 37 및 45; 서열 번호 36, 38 및 45; 서열 번호 36, 39 및 45; 또는 서열 번호 36, 40 및 45와 동일한 VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 아미노산 서열을 가진다.

[0059] 또 다른 양태에서, 본 발명은 서열 번호 46, 49, 53, 35, 37 및 41; 서열 번호 47, 49, 53, 35, 37 및 41; 서열 번호 47, 49, 54, 36, 37 및 42; 서열 번호 46, 50, 54, 36, 38 및 43; 서열 번호 46, 51, 55, 36, 39 및 44; 서열 번호 48, 52, 54, 36, 40 및 44; 서열 번호 46, 49, 56, 35, 37 및 41; 서열 번호 46, 49, 53, 35, 37 및 45; 서열 번호 47, 49, 56, 36, 37 및 45; 서열 번호 46, 50, 56, 36, 38 및 45; 서열 번호 46, 51, 56, 36, 39 및 45; 서열 번호 48, 52, 56, 36, 40 및 45; 또는 서열 번호 46, 49, 56, 35, 37 및 45와 동일한 VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 아미노산 서열을 가지거나, 하나 이상의 CDR에 있어서 네 개, 세 개, 두 개 또는 하나의 아미노산 치환을 제외하고는 서열 번호 46, 49, 53, 35, 37 및 41; 서열 번호 47, 49, 53, 35, 37 및 41; 서열 번호 47, 49, 54, 36, 37 및 42; 서열 번호 46, 50, 54, 36, 38 및 43; 서열 번호 46, 51, 55, 36, 39 및 44; 서열 번호 48, 52, 54, 36, 40 및 44; 서열 번호 46, 49, 56, 35, 37 및 41; 서열 번호 46, 49, 53, 35, 37 및 45; 서열 번호 47, 49, 56, 36, 37 및 45; 서열 번호 46, 50, 56, 36, 38 및 45; 서열 번호 46, 51, 56, 36, 39 및 45; 서열 번호 48, 52, 56, 36, 40 및 45; 또는 서열 번호 46, 49, 56, 35, 37 및 45와 동일한 VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 및 VH-CDR3 아미노산 서열을 가지는 V_L 및 V_H를 가지는, CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0060] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 V_L 및 항체 V_H를 가지는, CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 여기서 V_L은 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서

열 번호 61, 서열 번호 62, 서열 번호 63, 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66, 서열 번호 67, 서열 번호 68, 서열 번호 69 및 서열 번호 70으로부터 선택되는 기준 아미노산 서열과 적어도 약 90% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 가진다.

[0061] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 V_L 및 항체 V_H를 가지는, CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 여기서 V_H는 서열 번호 71, 서열 번호 72, 서열 번호 73, 서열 번호 74, 서열 번호 75, 서열 번호 76, 서열 번호 77, 서열 번호 78, 서열 번호 79, 서열 번호 80, 서열 번호 81, 서열 번호 82, 서열 번호 83 및 서열 번호 84로부터 선택되는 기준 아미노산 서열과 적어도 약 90% 내지 약 100% 동일한 아미노산 서열을 가진다.

[0062] 또 다른 양태에서, 본 발명은 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하는데, 여기서 이러한 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62, 서열 번호 63, 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66, 서열 번호 67, 서열 번호 68, 서열 번호 69 및 서열 번호 70으로부터 선택되는 기준 아미노산 서열과 적어도 약 90% 내지 약 100% 동일한 서열을 가지는 V_L을 가지고, 이러한 항체 또는 항원 결합 단편은 서열 번호 71, 서열 번호 72, 서열 번호 73, 서열 번호 74, 서열 번호 75, 서열 번호 76, 서열 번호 77, 서열 번호 78, 서열 번호 79, 서열 번호 80, 서열 번호 81, 서열 번호 82, 서열 번호 83 및 서열 번호 84로부터 선택되는 기준 아미노산 서열과 적어도 약 90% 내지 약 100% 동일한 서열을 가지는 V_H를 가진다.

[0063] 또 다른 양태에서, 본 발명은 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 필수적으로 서열 번호 57로 이루어지는 V_L 및 필수적으로 서열 번호 71로 이루어지는 V_H를 가지는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0064] 또 다른 양태에서, 본 발명은 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 필수적으로 서열 번호 68로 이루어지는 V_L 및 필수적으로 서열 번호 82로 이루어지는 V_H를 가지는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0065] 또 다른 양태에서, 본 발명은 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 서열 번호 57로 이루어지는 V_L 및 서열 번호 71로 이루어지는 V_H를 가지는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0066] 또 다른 양태에서, 본 발명은 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 서열 번호 68로 이루어지는 V_L 및 서열 번호 82로 이루어지는 V_H를 가지는, 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0067] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 담체를 함유하는 조성물을 제공한다.

[0068] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 서열을 가지는 핵산을 제공한다.

[0069] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0070] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산을 함유하는 벡터를 제공한다.

[0071] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 서열, 조성물, 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0072] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 서열, 조성물 또는 벡터를 함유하는 세포를 배양하는 것; 및 이러한 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 분리하는 것을 수반하는, 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 제조 방법을 제공한다.

[0073] 또 다른 양태에서, 표지를 붙인, 본 발명에 따른 단리된 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 진단 시약을 제공한다.

[0074] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 조성물, 또는 진단 시약을 함유하는 키트를 제공한다.

[0075] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 세포를 접촉시키는 것을 수반하

는, CD73을 발현하는 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

[0076] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 치료적으로 유효한 양을 대상자에 투여하는 것을 수반하는, 필요로 하는 대상자에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0077] 또 다른 양태에서, 본 발명은 치료적으로 유효한 양의 제1 작용제를 치료적으로 유효한 양의 제2 작용제와 조합하여 대상자에 투여하는 것을 수반하는, 대상자에서 암을 치료하는 방법으로, 이때, 제1 작용제는 본 발명에 따른 항체 또는 항원 결합 단편이고, 제2 작용제는 제1 작용제 이외의 항암제인 것인, 방법을 제공한다.

[0078] 또 다른 양태에서, 본 발명은 기준과 비교하여 증가된 CD73의 발현을 나타내는 종양을 가지는 것으로 확인된 대상자에 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 수반하는 치료 방법을 제공한다.

[0079] 또 다른 양태에서, 본 발명은 기준과 비교하여 증가된 CD73의 발현을 나타내는 종양을 가지는 것으로 확인된 대상자에 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4, 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 수반하는 치료 방법을 제공한다.

[0080] 또 다른 양태에서, 본 발명은 기준과 비교하여 증가된 CD73의 발현을 나타내는 종양을 가지는 것으로 확인된 대상자에 MEDI9447 또는 Phen0203 hIgG1, 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 펨브롤리주맙(키트루다(Keytruda®)) 또는 니볼루맙 (옵디바(Opdiva®)), 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 수반하는 치료 방법을 제공한다.

[0081] 또 다른 양태에서, 본 발명은 기준과 비교하여 증가된 CD73의 발현을 나타내는 종양을 가지는 것으로 확인된 대상자에 MEDI9447 또는 Phen0203 hIgG1, 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 MEDI4736 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 수반하는 치료 방법을 제공한다.

[0082] 또 다른 양태에서, 본 발명은 기준과 비교하여 증가된 CD73의 발현을 나타내는 종양을 가지는 것으로 확인된 대상자에 MEDI9447 또는 Phen0203 hIgG1, 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 트레멜리무맙 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 수반하는 치료 방법을 제공한다.

[0083] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항-CD73 치료법에 반응하는 암을 가지는 대상자를 확인하는 방법으로, 기준과 비교하여 대상자의 종양 세포 또는 혈액 세포에서 증가된 수준의 CD73 발현 또는 활성을 검출하여, 상기 암을 항-CD73 치료법에 반응한다고 확인하는 것을 수반하는, 확인 방법을 제공한다.

[0084] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 치료법 중 하나 이상과 조합하여 항-CD73 치료법에 반응하는 암을 가지는 대상자를 확인하는 방법으로, 기준과 비교하여 대상자의 종양 세포 또는 혈액 세포에서 증가된 수준의 CD73 발현 또는 활성을 검출하여, 상기 암을 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 치료법 중 하나 이상과 조합한 항-CD73 치료법에 반응한다고 확인하는 것을 수반하는, 확인 방법을 제공한다.

[0085] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 치료법에 반응하는 암을 가지는 대상자를 확인하는 방법으로, 기준과 비교하여 대상자의 종양 세포 또는 혈액 세포에서 감소된 수준의 CD73 발현 또는 활성을 검출하여, 상기 암을 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 치료법에 반응한다고 확인하는 것을 수반하는, 확인 방법을 제공한다.

[0086] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상자에서 종양 성장을 억제하는 방법으로, 필요로 하는 대상자에 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA4 항체 중 하나 이상 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 수반하는 방법을 제공한다.

[0087] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상자에서 항-종양 면역 반응을 증가시키는 방법으로, 필요로 하는 대상자에 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA4 항체 중 하나 이상 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 수반하는 방법을 제공한다.

[0088] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상자에서 종양을 치료하는 방법으로, 필요로 하는 대상자에 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA4 항체 중 하나 이상 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 수반하는 방법을 제공한다.

[0089] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0090] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 MEDI9447 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 펨브롤리주맙(키트루다)

또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0091] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 MEDI9447 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 니볼루맙(옵디바) 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0092] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 Phen0203 hIgG1 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 펨브롤리주맙(키트루다) 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0093] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 Phen0203 hIgG1 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 니볼루맙(옵디바) 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0094] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0095] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 MEDI9447 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 MEDI4736 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0096] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 Phen0203 hIgG1 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 MEDI4736 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0097] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 항-CTLA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0098] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 MEDI9447 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 트레멜리무맙 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0099] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 MEDI9447 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 이필리무맙 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0100] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 Phen0203 hIgG1 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 트레멜리무맙 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0101] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유효한 양의 Phen0203 hIgG1 또는 이의 항원 결합 단편, 그리고 이필리무맙 또는 이의 항원 결합 단편을 함유하는 약학 제형을 제공한다.

[0102] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항종양 활성을 증가시키는 키트로서, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트를 제공한다.

[0103] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항종양 활성을 증가시키는 키트로서, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트를 제공한다.

[0104] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항종양 활성을 증가시키는 키트로서, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 항-CTLA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트를 제공한다.

[0105] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, CD730002의 VL 및 VH는 각각 서열 번호 1과 2이거나, 서열 번호 1과 2를 포함하고, CD730010의 VL 및 VH는 각각 서열 번호 3과 4이거나, 서열 번호 3과 4를 포함한다.

[0106] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0107] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 결합 분자는 친화력이 성숙된 것이다.

[0108] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, FW5는 서열 번호 31이거나 서열 번호 31을 포함하고, FW6은 서열 번호 32이거나 서열 번호 32를 포함하고, FW7은 서열 번호 33이거나 서열 번호 33을 포함하고, FW8은 서열 번호 34이거나 서열 번호 34를 포함한다.

[0109] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, FW1은 서열 번호 25 또는 26이거나 서열 번호 25 또는 26을 포함하고, FW2는 서열 번호 27 또는 28이거나 서열 번호 27 또는 28을 포함하고, FW3은 서열 번호 29이거나 서열 번호 29를 포함하고, FW4는 서열 번호 30이거나 서열 번호 30을 포함하고, FW5는 서열 번호 31이거나 서열 번호 31을 포함하고, FW6은 서열 번호 32이거나 서열 번호 32를 포함하고, FW7은 서열 번호 33이거나 서열 번호 33을 포함하고, FW8은 서열 번호 34이거나 서열 번호 34를 포함한다.

[0110] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 VL은 서열 번호 46, 서열 번호 47, 또는 서열 번호 48과 동일하거나, 네 개, 세 개, 두 개, 또는 하나의 아미노산 치환을 제외하고는 서열 번호 46, 서열 번호 47, 또는 서열 번호 48과 동일한 VL 상보성 결정 부위-1(VL-CDR1) 아미노산 서열을 포함한다.

[0111] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 57을 가지는 VL 및 서열 번호 71을 가지는 VH를 가진다.

[0112] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 68을 가지는 VL 및 서열 번호 82를 가지는 VH를 가진다.

[0113] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 불변 부위 또는 이의 단편을 포함한다.

[0114] 다양한 구현예에서, 이러한 중쇄 불변 부위 또는 이의 단편은 예를 들어, IgG1 불변 부위, IgG2 불변 부위, IgG3 불변 부위 또는 IgG4 불변 부위를 포함하는, IgG 불변 부위이다.

[0115] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 카파 불변 부위 및 인간 람다 불변 부위로부터 선택되는 경쇄 불변 부위를 포함한다.

[0116] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 IgG 불변 부위는 야생형 IgG 불변 부위에 대해 하나 이상의 아미노산 치환을 가지고 있는데, 여기서 수정된 IgG는 야생형 IgG 불변 부위를 가지는 IgG의 반감기에 비해 증가된 반감기를 가진다.

[0117] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 IgG 불변 부위는 251~257, 285~290, 308~314, 385~389 및 428~436번 위치의 아미노산 잔기의 하나 이상의 아미노산 치환을 가지며, 여기서 넘버링은 카밧(Kabat)에 기재된 바와 같이 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0118] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 적어도 하나의 IgG 불변 부위 아미노산 치환은

[0119] (a) 252번 위치의 아미노산의 티로신(Y), 페닐알라닌(F), 트립토판(W), 또는 트레오닌(T)으로의 치환;

[0120] (b) 254번 위치의 아미노산의 트레오닌(T)으로의 치환;

[0121] (c) 256번 위치의 아미노산의 세린(S), 아르기닌(R), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 또는 트레오닌(T)으로의 치환;

[0122] (d) 257번 위치의 아미노산의 류신(L)으로의 치환;

[0123] (e) 309번 위치의 아미노산의 프롤린(P)으로의 치환;

[0124] (f) 311번 위치의 아미노산의 세린(S)으로의 치환;

[0125] (g) 428번 위치의 아미노산의 트레오닌(T), 류신(L), 페닐알라닌(F), 또는 세린(S)으로의 치환;

[0126] (h) 433번 위치의 아미노산의 아르기닌(R), 세린(S), 이소류신(I), 프롤린(P), 또는 글루타민(Q)으로의 치환;

[0127] (i) 434번 위치의 아미노산의 트립토판(W), 메티오닌(M), 세린(S), 히스티딘(H), 페닐알라닌(F), 또는 티로신으로의 치환; 및

[0128] (j) 상기 치환 중 둘 이상의 조합

[0129] 으로부터 선택되며, 여기서 넘버링은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0130] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 인간 IgG 불변 부위는 252, 254 및 256번 위치에서 야생형 인간 IgG 불변 부위에 대해 아미노산 치환을 가지며, 여기서

[0131] (a) 252번 위치의 아미노산은 티로신(Y)으로 치환되고,

[0132] (b) 254번 위치의 아미노산은 트레오닌(T)으로 치환되고,

[0133] (c) 256번 위치의 아미노산은 글루탐산(E)으로 치환되며,

[0134] 여기서 넘버링은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0135] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 434번 위치의 아미노산은 트립토판(W), 메티오닌(M), 티로

신(Y) 및 세린(S)으로부터 선택된 아미노산으로 치환되며, 여기서 넘버링은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0136] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 428번 위치의 아미노산은 트레오닌(T), 류신(L), 페닐알라닌(F) 및 세린(S)으로부터 선택된 아미노산으로 치환되며, 여기서 넘버링은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0137] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 257번 위치의 아미노산은 류신(L)으로 치환되고, 카밧 위치 434번의 아미노산은 티로신(Y)으로 치환되며, 여기서 넘버링은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 인덱스에 따른 것이다.

[0138] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 카밧 위치 428번의 아미노산은 류신(L)으로 치환되고, 카밧 위치 434번의 아미노산은 세린(S)으로 치환된다.

[0139] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 인간 IgG 불변 부위는 252, 254 및 256번 위치에서 야생형 인간 IgG 불변 부위에 대해 아미노산 치환을 가지며, 여기서

[0140] (a) 252번 위치의 아미노산은 티로신(Y)으로 치환되고,

[0141] (b) 254번 위치의 아미노산은 트레오닌(T)으로 치환되고,

[0142] (c) 256번 위치의 아미노산은 글루탐산(E)으로 치환된다.

[0143] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 항체는 완전히 인간형 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단일클론성 항체, 다클론성 항체, 재조합 항체, 다중특이적 항체, 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0144] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 항원 결합 단편은 Fv, Fab, F(ab')2, Fab', dsFv, scFv, 또는 sc(Fv)2이다.

[0145] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들어 항암제를 포함하는, 적어도 하나의 이종 기원의 작용제에 접합된다.

[0146] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 본 발명에 따른 조성물은 추가로 항암제를 함유한다.

[0147] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 의존적 세포 매개성 세포독성(ADCC)을 유도하지 않는다.

[0148] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD73의 길항제이다.

[0149] 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 MB-MDA-231, 4T1, MK1, 또는 언급된 세포들 중 둘 이상의 조합으로부터 선택된 세포에서의 CD73의 길항제이다.

[0150] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 CD73은 인간 CD73이다.

[0151] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 항체 또는 항원 결합 단편의 CD73과의 결합은 세포 증식을 감소시킬 수 있다.

[0152] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, CD73에 대한 이러한 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 CD73, 시노몰구스 원숭이 CD73 및 마우스 CD73과 결합할 수 있다.

[0153] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 암은 결장직장암, 췌장암, 방광암, 백혈병, 림프종, 신경교종, 교모세포종, 흑색종, 난소암, 갑상선암, 식도암, 전립선암 및 유방암으로부터 선택된다.

[0154] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 암은 흑색종 또는 유방암을 포함하는 전이촉진성 표현형을 가진다.

[0155] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 대상자는 인간이다.

[0156] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 제1 작용제와 제2 작용제의 조합은 우수한 항종양 활성을 가지며, 추가적이거나 상승적일 수 있다.

[0157] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 제2 작용제는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0158] 다양한 구현예에서, 제2 작용제는 PD-1(예정사 1 단백질), PD-L1(예정사 1 단백질 리간드 1), PD-L2(예정사 1 단백질 리간드 2) 또는 CTLA-4(세포독성 T 림프구 항원 4 단백질)에 특이적으로 결합한다.

[0159] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 제2 작용제는 예를 들어, 이필리무맙, 트레멜리무맙(티실리무맙, CP-675,206), 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 항-CTLA-4 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0160] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 제2 작용제는 예를 들어 펨브롤리주맙(키트루다, 람브롤리주맙, MK-3475), 니볼루맙(옵디바, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538), AMP-224, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0161] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 제2 작용제는 예를 들어, MEDI4736, BMS-936559, MPDL3280A, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 항-PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0162] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 항-CD73 항체는 MEDI9447, Phen0203 hIgG1, 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0163] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 대상자는 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 치료법을 받고 있거나, 받은 적이 있거나, 받을 것이다.

[0164] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 치료법은 각각 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 수반한다.

[0165] 다양한 구현예에서, 이러한 항-PD-1 항체는 펨브롤리주맙(키트루다, 람브롤리주맙, MK-3475), 니볼루맙(옵디바, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538), AMP-224, 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0166] 다양한 구현예에서, 이러한 항-PD-L1 항체는 MEDI4736, BMS-936559, MPDL3280A, 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0167] 다양한 구현예에서, 이러한 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙, 트레멜리무맙 (티실리무맙, CP-675,206), 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0168] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 종양은 결장암, 흑색종, 유방암, 림프종, 비소세포 폐암종 호지킨 림프종, 비 호지킨 림프종, 및 버킷 림프종, 난소암, 유방암, 두경부암, 또는 췌장암이다.

[0169] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, CD73 발현 또는 활성은 종양 샘플, 혈액 샘플, 또는 림프 샘플에서 검출된다.

[0170] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, CD73 발현은 종양 세포, 또는 림프성 또는 골수성 세포 아집단(즉, B 림프구, CD4+, FoxP3+ 림프구, 또는 골수 유래 억제 세포(MDSC) 중 하나 이상)을 포함하는 말초 혈액 세포에서 검출된다.

[0171] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, CD73 발현은 유동 세포분석법, 면역조직화학법(IHC) 또는 샘플 내 CD73 효소 활성 또는 가용성 CD73 수준에 의해 검출된다.

[0172] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 동시에 투여된다.

[0173] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 방법은 종양 특이적 면역 반응을 유도하거나 증가시킨다.

[0174] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 방법은 AMP/CD73/아데노신 경로의 면역억제적 효과를 감소시킨다.

[0175] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 종양은 CD73 과발현 종양이다.

[0176] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 VL 및 항체 VH를 가지는 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편으로, Val144, Lys180 Asn185에 상응하는 하나 이상의 아미노산을 가지는 CD73 단백질의 에피토프에 특이적으로 결합하는, 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0177] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 결합 분자 또는 항원 결합은 Tyr135, Lys136 및 Asn187에 상응하는 하나 이상의 아미노산을 더 함유한다.

[0178] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편은 Tyr135, Lys136 및 Asn187에 상응하는 아미노산을 함유한다.

[0179] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편은 Tyr135, Lys136, Asn187, Tyr135, Lys136 및 Asn187에 상응하는 아미노산을 함유한다.

[0180] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편은 CD73 단백질의 다음의 부위들 중 하나 이상 내부의 에피토프와 결합한다: Tyr132-Val144 및/또는 Lys180-Asn187.

[0181] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편은 Tyr132-Val144 및/또는 Lys180-Asn187의 아미노산 서열을 함유하거나, Tyr132-Val144 및/또는 Lys180-Asn187의 아미노산 서열 내에 있다.

[0182] 또 다른 양태에서, 본 발명은 Val144, Lys180 및 Asn185에 상응하는 하나 이상의 아미노산을 가지는, CD73 단백질의 표면 위의 입체형태적 에피토프(conformational epitope)로서, 이러한 에피토프를 함유하는 CD73 단백질은 단일클론성 항체 MEDI9447 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 유사체 또는 유도체에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 것인, 입체형태적 에피토프를 제공한다.

[0183] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 입체형태적 에피토프는 Tyr135, Lys136 및 Asn18에 상응하는 하나 이상의 아미노산을 더 함유한다.

[0184] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 입체형태적 에피토프는 Tyr135, Lys136 및 Asn187에 상응하는 아미노산을 함유한다.

[0185] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 입체형태적 에피토프는 Tyr135, Lys136, Asn187, Tyr135, Lys136 및 Asn187에 상응하는 아미노산을 함유한다.

[0186] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 입체형태적 에피토프는 CD73 단백질의 다음의 부위들 중 하나 이상 내부에 있다: Tyr132-Val144 및/또는 Lys180-Asn187.

[0187] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 입체형태적 에피토프는 Tyr132-Val144 및/또는 Lys180-Asn187를 함유하거나, Tyr132-Val144 및/또는 Lys180-Asn187의 아미노산 서열 내에 있다.

[0188] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, MEDI9447은 불활성 상태 또는 촉매적으로 활성 상태 또는 열린 상태 또는 닫힌 상태로 CD73 단백질과 결합한다.

[0189] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 이러한 CD73 단백질은 인간 CD73이다.

[0190] 본 설명에 기술된 임의의 양태의 다양한 구현예에서, 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편, 이때, VL 및 VH는 MED19447의 VL 및 VH이다.

[0191] 본 발명에 의해 정의된 조성물 및 물품은 아래 제공된 실시예와 관련되어 분리되었거나, 그렇지 않으면 제조되었다. 본 발명의 기타 특징 및 장점은 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0192] 도 1a는 카밧 넘버링 관례를 기초로 하여 나타낸 CDR과 함께 MEDI9447 VH 도메인의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 번역을 보여준다.

도 1b는 카밧 넘버링 관례를 기초로 하여 나타낸 CDR과 함께 MEDI9447 VL 도메인의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 번역을 보여준다.

도 1c는 가장 가까운 인간 VH 및 JH 생식세포 서열과 함께 MEDI9447 VH의 정렬선을 보여준다. 카밧 넘버링 관례를 기초로 한 CDR을 강조하였고, 생식세포 서열과 상이한 잔기들은 박스로 표시하였다.

도 1d는 가장 가까운 인간 VL 및 JL 생식세포 서열과 함께 MEDI9447 VL의 정렬선을 보여준다. 카밧 넘버링 관례를 기초로 한 CDR을 강조하였고, 생식세포 서열과 상이한 잔기들은 박스로 표시하였다.

도 2는 세포 독성 FabZAP 시약의 MDA-MB-231 세포 및 4T1 세포 내로의 항체 매개성 내재화를 보여주는 두 개의 그래프를 제공하는데, 여기서 항체들은 MEDI9447과 대조군 항체 R347이다.

도 3a는 항-CD73 항체 MEDI9447에 의한 5'엑토뉴클레오티드가수분해효소의 억제를 보여주는 그래프이다.

도 3b는 항-CD73 항체 CD370010에 의한 AMP 가수분해의 억제를 보여주는 그래프이다.

도 4는 CT26 동계 종양 모형에서 MEDI9447이 종양 성장을 억제했음을 보여주는 그래프이다. 뮤린 CT26 종양 세포를 암컷 Balb/C 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 3일 동안 종양이 성장하도록 하였고, 2주 동안 주 2회 MEDI9447 또는 이소형 대조군을 처리하였다. 16일차에 유동 세포분석법 분석을 위해 종양을 채취하였다.

도 5는 MEDI9447이 종양 침습성 골수 유래 억제 세포(MDSC)를 억제하였음을 보여주는 그래프이다. MEDI9447을 처리한 CT26 종양을 품고 있는 마우스를 희생시켜, 연구 16일차에 종양을 채취하였다. 종양을 단일 세포들로 해체하여, CD45 및 MDSC 마커에 대해 염색하고, 유동 세포분석법으로 분석하였다.

도 6은 종양 부피에 미치는 MEDI9447 mIgG1, 항-PD-1 또는 조합의 영향을 보여주는 여섯 개의 거미줄 그림을 포함한다. 대조군 항체들로는 대장균 β-갈락토시다제(β-Gal)에 특이적인 랫트 IgG2a 대조군 단일클론성 랫트 항체인 rIgG2a와 이소형 대조군 뮤린 IgG1을 포함한다. 연구일 40일까지 개별적인 동물에 대해 각 동물군으로부터의 종양 부피를 그래프로 나타냈다. 40일의 연구 기간의 종료 시까지 대조군의 마우스는 전혀 무 종양을 나타내지 않았다. 항-CD73 단독 처리는 연구 종료 시에 10%의 무 종양 동물을 초래했다. 항-PD1 단독 처리도 연구 종료 시 10%의 무 종양 동물을 초래했다. 현저하게도, 항-CD73과 항-PD 처리의 조합은 60%의 무 종양 마우스를 초래했다. 대조군의 마우스 중 어느 것도 연구 종료 시에 무 종양을 나타내지 않았다.

도 7은 생존기간에 미치는 MEDI9447 mIgG1, 항-PD1 또는 조합의 영향을 보여주는 그래프이다.

도 8은 MEDI9447과 항 PD-1의 조합이, 결장직장암종 종양에서 각각의 작용제 단독에 비교했을 때, 종양 성장 억제를 유의미하게 향상시켰음($p<0.05$)을 보여주는 그래프이다. 동계 MC38-OVA 결장직장암종 세포를 마우스에 피하 주사하고, 주 2회 kg당 10 mg의 MEDI9447 또는 kg당 10 mg의 항-PD-1 항체 단독 또는 두 항체들의 조합물을 처리하였다. 종양 부피는 주 2회 측정하였다.

도 9는 종양을 품은 마우스로부터 분리한 종양 세포에서 CD73 발현으로 측정한 것으로, 항-PD-1이 CD73이 풍부한 종양 미세환경을 유도함을 보여주는 그래프이다. 동계 CT26 결장직장 세포를 마우스(n=4)에 피하 주사하고, 주 2회 kg당 10 mg의 항-PD-1 또는 비가역적 이소형 대조군 항체를 처리하였다. 1차 처리 1일 후에 종양을 분리하고 세포를 해리시켜 유동 세포분석법으로 표면 표현형에 대해 분석하였다.

도 10은 종양을 품은 마우스로부터 분리한 골수 유래 억제 세포(MDSC)에서 CD73 발현으로 측정한 것으로, 항-PD-1이 CD73이 풍부한 종양 미세환경을 유도함을 보여주는 그래프이다. 동계 CT26 결장직장 세포를 마우스(n=4)에 피하 주사하고, 주 2회 kg당 10 mg의 항-PD-1 또는 비가역적 이소형 대조군 항체를 처리하였다. 1차 처리 1일 후에 종양을 분리하고, 종양 세포를 분리하여, 말초 전 혈액 세포를 채취하고, 유동 세포분석법으로 표면 CD73 발현에 대해 분석하였다.

도 11은 종양을 품은 마우스로부터 분리한 $CD4^+$, $FoxP3^+$ 림프구에서 CD73 발현으로 측정한 것으로, 항-PD-1이 CD73이 풍부한 종양 미세환경을 유도함을 보여주는 그래프이다. 동계 CT26 결장직장 세포를 마우스(n=4)에 피하 주사하고, 주 2회 kg당 10 mg의 항-PD-1 또는 비가역적 이소형 대조군 항체를 처리하였다. 1차 처리 3일 후에 종양을 분리하고, 말초 전 혈액 세포를 채취하고, 유동 세포분석법으로 표면 CD73 발현에 대해 분석하였다.

도 12는 MEDI9447과 항 PD-L1의 조합이, 흑색종 종양에서 각각의 작용제 단독에 비교했을 때, 종양 성장 억제를 유의미하게 향상시켰음($p<0.05$)을 보여주는 그래프이다. 동계 B16F10 흑색종 세포를 마우스에 피하 주사하고, 주 2회 kg당 10 mg의 MEDI9447 또는 kg당 10 mg의 PD-L1 항체 단독 또는 두 항체들의 조합물을 처리하였다. 종양 부피는 주 2회 측정하였다.

도 13은 MEDI9447과 항 PD-L1의 조합이, 림프종 종양에서 각각의 작용제 단독에 비교했을 때, 종양 성장 억제를 유의미하게 향상시켰음($p<0.01$)을 보여주는 그래프이다. 동계 EG7-OVA 림프종 세포를 마우스에 피하 주사하고, 주 2회 kg당 10 mg의 MEDI9447 또는 kg당 10 mg의 PD-L1 항체 단독 또는 두 항체들의 조합물을 처리하였다. 종양 부피는 주 2회 측정하였다.

도 14는 배출 림프절 B 림프구에서 CD73의 표면 발현으로 측정한 것으로, 항-PD-L1이 CD73이 풍부한 종양 미세환경을 유도함을 보여주는 그래프이다. 동계 CT26 결장직장 세포를 마우스(n=4)에 피하 주사하고, 주 2회 kg당 10 mg의 항-PD-L1 또는 비가역적 이소형 대조군 항체를 처리하였다. 1차 처리 1일 후에 배출 림프절로부터 세포를 분리하고, 유동 세포분석법으로 표면 표현형에 대해 분석하였다.

도 15는 종양 침습성 $CD4^+$, $FoxP3^+$ 림프구에서 CD73의 표면 발현으로 측정한 것으로, 항-PD-L1이 CD73이 풍부한 종양 미세환경을 유도함을 보여주는 그래프이다. 동계 CT26 결장직장 세포를 마우스(n=4)에 피하 주사하고, 주 2회 kg당 10 mg의 항-PD-L1 또는 비가역적 이소형 대조군 항체를 처리하였다. 1차 처리 3일 후에 종양을 분리하고, 세포를 해리하여, 유동 세포분석법으로 표면 표현형에 대해 분석하였다.

도 16a와 도 16b는 종양 침습성 림프계 세포에 대해 MEDI9447 단독 또는 항-PD-L1와 조합한 MEDI9447이 CD73 발현을 감소시켰음을 보여주는 그래프이다. 결장직장 CT26 동계 종양을 품은 마우스에 주 2회(12일 및 16일) 30 mg/kg MEDI9447 또는 30 mg/kg 항-PD-L1 단독 또는 MEDI9447 및 항-PD-L1의 조합을 처리하였다. 17일차에 종양을 채취하고 유동 세포분석법으로 표면 CD73 발현에 대해 분석하였다. 종양 침윤물 (A) CD4+ FoxP3+ Treg 및 (B) CD8+ T 세포에 대한 CD73 발현.

도 17a와 도 17b는 (A) 종양 세포 및 (B) 말초 전 혈액 세포에 대해 MEDI9447 단독 또는 항-PD-L1와 조합한 MEDI9447이 CD73 활성을 감소시켰음을 보여주는 그래프이다. 결장직장 CT26 동계 종양을 품은 마우스에 주 2회(12일 및 16일) 30 mg/kg MEDI9447 또는 30 mg/kg 항-PD-L1 단독 또는 MEDI9447 및 항-PD-L1의 조합을 처리하였다. 17일차에 종양 및 말초 전 혈액 세포를 채취하고 셀 타이터 글로(Cell-Titre Glo)를 이용하여 효소 활성에 대한 표면 CD73 발현에 대해 분석하였다.

도 18은 MEDI9447 및, CTLA4, OX40, PD-1 및 PD-L1에 특이적인 항체 또는 융합 단백질을 처리한 말초 혈액 단핵 세포의 사이토카인 프로파일을 나타내는 그래프 세트이다. 원발성 인간 말초 혈액 단핵 세포를 혼합 백혈구 반응에서 MEDI9447 및/또는 지시된 표적에 대해 특이적인 항체 또는 융합 단백질과 72시간 배양하였다. 2회 반복의(duplicate) 상층액 내의 사이토카인(IFN-γ, IL-1β, TNF-α)을 ELISA로 정량하였다. 도시한 데이터는 4개의 상이한 파트너 작용제와 항-CD73 항체의 최적의 용량 조합을 나타낸다. 항-PD-1과 항-CD73 조합은 블리스 표면 반응 방법(Zhao et al.)으로 결정한 바에 따르면 유의미한($p<0.05$) 상승작용을 나타냈다. 사이토카인 프로파일은 골수계와 림프계 둘 다 영향을 받았음을 나타낸다. 50개 이상의 공여자 쌍을 시험하였다.

도 19a와 도 19b는 MEDI9447과의 복합체에서 CD73의 수소 중수소 교환 MS(HDX-MS) 분석 결과를 도시한 것이다. 도 19a는 MEDI9447에 결합했을 때 감소된 중수소 흡수를 거치는 CD73의 부위들(N말단부터 C말단)을 보여주는 수소-중수소 교환 열 지도를 도시한 것이다. 항체 결합 CD73과 비 결합 CD73 사이의 상대적인 교환은 노출 시간의 함수로 도시하였고, 감소된 교환은 빨간색으로, 증가된 교환은 파란색으로, 변화 없음은 흰색으로 나타냈다. 132-143 및 182-187 위치의 N 말단 부위는 최고도의 차등 교환을 나타냈다. 도 8b는 N 말단 도메인(노란색) 내의 HDX로 확인된 결합 계면(청록색)의 위치를 묘사하는 CD73 단량체의 결정 구조를 보여준다. CD73 링커 부위 및 C 말단 도메인은 각각 주황색과 파란색으로 나타냈다.

도 20a 내지 도 20e는 유리 상태 대 결합 상태에서 차등적 수소 교환을 겪는 CD73과 MEDI9447의 부위를 나타내는 수소 중수소 교환 MS(HDX-MS) 분석 결과를 도시한 것이다. 도 20a는 132-143 부위를 아우르는 펩타이드 내에서의 상대적인 중수소 흡수(달톤으로 표시한 질량 변화)를 중수소 노출 시간의 함수로 나타낸 그래프를 도시한 것이다. 도 20b는 182-187 부위를 아우르는 펩타이드 내에서의 상대적인 중수소 흡수(달톤으로 표시한 질량 변화)를 중수소 노출 시간의 함수로 나타낸 그래프를 도시한 것이다. 도 20a와 도 20b에서, CD73에 대한 흡수는 네모로 나타냈고, MEDI9447 Fab에 결합된 CD73에 대한 흡수는 빨간색으로 나타냈다. 펩티드 서열, 위치 및 질량은 그래프 박스 내에 표시하였다. 수소 교환의 변화를 나타내는 서열을 함유하며 이러한 에피토프를 형성하리라 예측되는 부위를 한정하기 위하여, 중첩되는 펩타이드의 상대적인 질량 변화를 비교하였다. 예를 들어, 173-186번 위치에 걸쳐 있는 펩타이드는 차등적 교환을 나타냈지만, 173-181번을 아우르는 펩타이드에는 차이가 없었다. 따라서, 182 상류의 잔기들은 상이하게 표지가 붙지 않는다는 것이 추론되었다. 도 20c는 MEDI9447 Fab 중쇄에 대한 DynamX 차이 차트를 도시한 것이다. 도 20d는 MEDI9447 Fab 경쇄에 대한 DynamX 차이 차트를 도시한 것이다. 도 20c와 도 20d의 경우, 각각의 데이터 포인트는 CD73+Fab 복합체(y축의 양의 값)와 Fab 단독(y축의 음의 값) 사이의 중수소 흡수 차이를 나타낸다. 수직 막대는 노출 시점 전체에 걸친 흡수 차의 합계를 나타낸다. Fab가 CD73에 결합되었을 때 더 낮은 상대 흡수를 보여주는 CDR들을 표시하였다. 도 9e는 CD73 단독(y축의 음의 값) 대 Fab에 결합된 CD73(y축의 양의 값)의 DymnamX 차이 차트를 도시한 것이다. E1 부위(aa 132-143) 및 E2 부위(aa 182-187)를 표시하였다. 가로축은 N말단에서 C말단까지(좌에서 우) 분석된 펩타이드들에 해당한다. 통계적으로 유의한 차이에 대하여 1.6 달톤, 98% 신뢰 구간 컷오프를 보여주는 점선을 차트 상에 겹쳐 나타냈다.

도 21a 내지 도 21h는 MEDI9447 에피토프가 CD73의 N 말단 도메인 내에 있음을 보여주는 센서 칩 데이터를 도시한 것이다. 도 21a는 야생형 CD73 단백질에 대한 센서 칩 데이터를 나타내는 그래프이다. 야생형 CD73 단백질을

HTG 센서 칩에 고정시키고, MEDI9447 희석액(5 nM부터 0.3 nM까지)의 결합을 표면 플라즈몬 공명(SPR)으로 측정하였다. 도 21b는 N 말단 도메인이 스와핑된 CD73 단백질에 대한 센서 칩 데이터를 나타내는 그래프이다. N 말단 도메인이 스와핑된 CD73 단백질을 HTG 센서 칩에 고정시키고, MEDI9447 희석액(5 nM부터 0.3 nM까지)의 결합을 SPR로 측정하였다. N 말단 도메인이 스와핑되었을 때, MEDI9447은 CD73과 결합하지 않았다. 도 21c는 N 말단 및 C 말단 도메인이 스와핑된 CD73 단백질에 대한 센서 칩 데이터를 나타내는 그래프이다. N 말단 및 C 말단 도메인이 스와핑된 CD73 단백질을 HTG 센서 칩에 고정시키고, MEDI9447 희석액(5 nM부터 0.3 nM까지)의 결합을 SPR로 측정하였다. N 말단 및 C 말단 도메인이 모두 스와핑되었을 때, MEDI9447은 CD73과 결합하지 않았다. 도 21d는 링커 부위가 스와핑된 CD73 단백질에 대한 센서 칩 데이터를 나타내는 그래프이다. 링커 부위가 스와핑된 CD73 단백질을 HTG 센서 칩에 고정시키고, MEDI9447 희석액(5 nM부터 0.3 nM까지)의 결합을 SPR로 측정하였다. 링커 부위만을 스와핑하는 것은 결합에 영향을 미치지 않았다. 도 21e는 C 말단 도메인이 스와핑된 CD73 단백질에 대한 센서 칩 데이터를 나타내는 그래프이다. C 말단 도메인이 스와핑된 CD73 단백질을 HTG 센서 칩에 고정시키고, MEDI9447 희석액(5 nM부터 0.3 nM까지)의 결합을 SPR로 측정하였다. C 말단 도메인만을 스와핑하는 것은 결합에 영향을 미치지 않았다. 도 21f는 계면 E1(aa 132-143)이 스와핑된 CD73 단백질에 대한 센서 칩 데이터를 나타내는 그래프이다. 계면 E1(aa 132-143)이 스와핑된 CD73 단백질을 HTG 센서 칩에 고정시키고, MEDI9447 희석액(5 nM부터 0.3 nM까지)의 결합을 SPR로 측정하였다. 도 21g는 계면 E2(aa 182-187)가 스와핑된 CD73 단백질에 대한 센서 칩 데이터를 나타내는 그래프이다. 계면 E2(aa 182-187)가 스와핑된 CD73 단백질을 HTG 센서 칩에 고정시키고, MEDI9447 희석액(5 nM부터 0.3 nM까지)의 결합을 SPR로 측정하였다. 도 21h는 계면 E1(aa 132-143) 및 계면 E2(aa 182-187)가 스와핑된 CD73 단백질에 대한 센서 칩 데이터를 나타내는 그래프이다. 계면 E1(aa 132-143) 및 계면 E2(aa 182-187)가 스와핑된 CD73 단백질을 HTG 센서 칩에 고정시키고, MEDI9447 희석액(5 nM부터 0.3 nM까지)의 결합을 SPR로 측정하였다. 도 21f 내지 도 21h의 경우, HDX 계면 E1(aa 132-143)을 스와핑(도 21f)하는 것은 결합에 가벼운 영향을 미쳐, HDX 계면 E2(aa 182-187) 단독(도 21g)을 스와핑하는 것 또는 E1과 조합하여(도 21h) HDX 계면 E2(aa 182-187)를 스와핑하는 것과는 반대였다. 도 21a 내지 도 21h의 경우, 센서그램 및 중첩 적합도를 상응하는 색으로 나타냈다. 각 결합 분석에 대한 동역학 측정치를 표 16에 제공하였다.

도 22는 인간과 닭의 CD73 단백질 서열을 정렬한 것을 도시한 것이다. 성숙한 단백질 서열들만을 나타냈다. 비보존 잔기들을 닭 서열에서 강조하였다. 녹아웃 변이체를 생성하기 위하여 닭과 인간 사이에 스와핑된 부위에 주석을 달았다(예컨대, DS1a, DS1b 등).

도 23은 MEDI9447의 CD73 변이체와의 결합을 도시한 것이다. 도 23은 MEDI9447의 CD73 변이체와의 결합을 보여주는 데이터 표이다. 파란색으로 강조한 변이체에 대한 K_D는 WT 또는 KO 모 구성체로부터 >2배 변화된 것이다. *2:1 이종 리간드 적합으로부터 유래된 동역학 측정치. **넘버링은 닭 서열에 해당한다(인간에 있어서, 129 = 133, 140 = 144, 및 181 = 185).

도 24a 내지 도 24f는 MEDI9447 에피토프가 N 말단 도메인의 정점에 위치하고 있음을 도시한 것이다. 도 13a는 CD73 변이체 패널에 대한 MEDI9447 결합 평가(도 22 및 도 23 참조)가 상호 작용 자리를 구성하는 여섯 개의 위치를 밝혀냈음을 보여준다. 세 개의 가장 영향력 있는 잔기들(강조된 블록들) 중 둘은 HDX 계면 부위(파란색으로 강조) 외부에 위치해 있다. 세 개의 덜 중요한 잔기들(핑크색 블록들)은 HDX 계면 내에 위치해 있다. 도 24b는 닭의 N 말단 및 C 말단 도메인 서열을 함유하는 CD73 구성체로 N185 및 V144(K180은 보존됨)을 넣는 것이 야생형 CD73(5 nM부터 0.3 nM까지의 MEDI9447 희석액; 도 10b와 비교)에 대한 K_D의 20배 미만까지 결합을 회복시켰음을 보여주는 표이다. 도 24c는 CD73의 N 말단 도메인 내에 위치한 에피토프 잔기들을 클로즈업하여 도시한 것이다. 결합에 가장 중요한 잔기들을 강조하여 나타냈고, 영향력이 덜한 위치(Y135, K136 및 N187)는 핑크색으로 나타냈다. HDX 계면은 파란색으로 중첩시켰다. 도 24d는 이러한 에피토프가 가까운 인접 결합 표면을 형성함을 보여주는 표면 대표도를 도시한 것이다. 도 24e는 N 말단 도메인의 정점의 측면에 있는 이러한 에피토프의 위치를 보여주는 CD73의 열린 형태의 결정 구조를 도시한 것이다. 도 24f는 이러한 에피토프의 위치가 기질 결합 자리(구체로 묘사된 아데노신) 및 아연 이온(회색 구체) 배위 자리(청록색의 곁사슬)와 떨어져 있음을 보여준다. 모든 결정 구조에서, 이러한 CD73 N 말단 도메인, 링커 부위 및 C 말단 도메인은 각각 노란색, 주황색 및 파란색으로 묘사되었다.

도 25a 내지 도 25c는 MEDI9447이 AMP의 CD73 가수분해의 비 경쟁적 억제자임을 보여준다. 도 25a는 MEDI9447 또는 이소형이 매치된 대조군 mAb의 존재 하에 측정된 AMP의 CD73 인산가수분해의 동역학을 묘사한 그래프이다. 도 25b는 MEDI9447이 기질 농도에 관계 없이 동등하게 가수분해를 억제하여 비 경쟁적인 억제자로 작용함을 보

여주는 그래프이다. 이와는 반대로, CD73의 공지된 경쟁적 억제자인 APCP는 K_m을 증가시키지만, V_{max}는 그렇지 않았다. 도 25c는 AMP의 CD73 가수분해의 억제에 미치는 MEDI9447 IgG, Fab, 또는 대조군 IgG의 용량 반응을 보여주는 그래프이다. MEDI9447 IgG는 CD73 이량체와의 1:1 몰 화학량론에서 최대 억제에 이르렀다(화살표). MEDI9447 IgG가 과량인(>10 nM) 높은 농도에서는 억제 상실 또는 "후크 효과"가 관찰되었다. MEDI9447 Fab와 대조군 IgG는 CD73을 억제하지 않았다. 모든 실험은 본 설명에 기술된 바와 같이 셀타이터글로 분석을 이용하여 수행되었다(RLU, 상대 빛 단위).

도 26a 내지 도 26c는 항-CD73 mAb(클론 0069) 결합이 CD73 N 말단 및 C 말단 도메인 잔기들에 의존적임을 보여준다. 도 26a는 히스티딘 태그를 붙인 CD73에 대한 센서 칩 데이터를 보여주는 그래프이다. 히스티딘 태그를 붙인 CD73을 HIS2 바이오센서에 고정시키고, mAb A에 의한 결합을 바이오레이어 간섭측정법(BLI)으로 측정하였다. mAb A의 WT CD7(파란색 센서그램), N 말단 도메인 스왑 녹아웃 CD73(KO_1-291, 녹색 센서그램) 및 C 말단 도메인 스왑 녹아웃 CD7(KO_311-523 청록색 센서그램)에 대한 결합은, mAb 결합이 N 말단 및 C 말단 도메인 모두에 있는 잔기들에 의해 영향을 받는다는 점을 보여준다. 도 26b는 강조하여 나타낸 mAb A 결합 분쟁 지대(aa 114-134 및 153-170)의 위치를 보여주는 열린 상태와 닫힌 상태의 CD73의 결정 구조로, 이러한 mAb A 결합 분쟁 지대는 N 말단과 C 말단 도메인 계면(N 말단 도메인은 노란색, 링커는 주황색, C 말단은 파란색) 근처에 위치한다. 매핑은 도 26a와 도 26c로부터의 결합 데이터를 기초로 하였다. 도 26c는 CD73의 상이한 도메인 스왑 녹아웃 변이체들에 대한 mAb A의 결합 센서그램을 보여준다. 하위 부위 DS2c (aa 114-134) 또는 DS3a (aa 153-170)를 스와핑하는 것은 결합을 녹아웃시켰다. 모든 결합 분석은 본 설명에 기술된 바와 같이 옥텟(Octet) QK384 기기로 수행하였다.

도 27a 내지 도 27c는 MEDI9447이 CD73의 입체형태적으로 활성이 있는 구조로의 전이를 억제함을 보여준다. 도 27a는 야생형 CD73에 대한 바이오센서 데이터를 보여주는 그래프이다. 야생형 CD73을 HIS2 바이오센서에 고정시키고, MEDI9447(파란색 센서그램) 및 항-CD73 mAb A(갈색 센서그램)의 결합을 옥텟 QK384로 BLI에 의해 측정하였다. CD73을 Zn^{2+} 및 APCP와 사전 배양하였을 때, MEDI9447은 결합을 보유하였지만(검은색 센서그램), mAb A 결합은 상실되었다(주황색 센서그램). 도 27b는 CD73과 Zn^{2+} 및 APCP 사전 배양이 mAb A 결합의 손실을 초래하였지만(주황색 센서그램), Zn^{2+} 및 APCP 첨가 전 MEDI9447과의 사전 배양은 결합을 복원시켰음(보라색 센서그램)을 보여주는 그래프이다. CD73 단독 또는 MEDI9447(그러나 Zn^{2+} 및 APCP과는 아님)과의 사전 배양된 CD73에 대한 mAb A의 결합을 각각 파란색과 갈색의 센서그램으로 나타냈다. 도 27c는 CD73이 Zn^{2+} 및 APCP에 의해 유도된 완전히 닫힌, 활성 입체형태를 취하는 것을 MEDI9447이 어떻게 방해하는지를 보여주는 제안 모델을 나타낸다. MEDI9947은 mAb A에 대해 더 낮은 친화도를 나타내는 중간 상태로의 전이를 제한할 수 있다.

도 28a와 도 28b는 아래에 달리 언급되지 않는 한, 본 설명에 기술된 바와 같이 BLI로 측정한 상이한 조건 하에서의 MEDI9447 또는 mAb A의 CD73과의 결합을 보여준다. 도 28a는 HIS2 바이오센서에 고정된, 히스티딘 태그를 붙인 야생형 CD73에 대한 항-CD73 mAb A의 결합을 묘사하는 그래프이다. 100초의 기준선 후, 포획된 CD73을 900초 동안 Zn^{2+}, APCP 및/또는 EDTA와 배양한 다음, 결합을 측정하기 위하여 바이오센서를 600초 동안 30 nM mAb A에 인큐베이션시켰다. mAb A는 CD73에 결합하였으나(파란색 센서그램), Zn^{2+} 및 APCP와 사전 배양한 CD73에는 결합하지 않았다(보라색 센서그램). mAb A는 APCP와 EDTA(녹색 센서그램), 또는 Zn^{2+}, APCP 및 EDTA(금색 센서그램)와 사전 배양된 CD73에 대한 결합을 유지하였다. EDTA의 킬레이트 효과는 CD73을 Zn^{2+} 및 APCP와 배양하였을 때 mAb A 결합의 상실에 이러한 2가 양이온이 필요하였음을 보여준다. 도 28b는 MEDI9447 Fab 또는 대조군 IgG가 Zn^{2+} 및 APCP와 사전 배양된 CD73에 대한 mAb A의 결합을 구조하지 않았음을 보여주는 그래프이다. 이러한 분석은 도 27b에서와 같이 수행되었다. Zn^{2+} 및 APCP 첨가 전에 MEDI9447 Fab 또는 이소형이 매치된 대조군 IgG를 CD73과 사전 배양하였다. 바이오센서에 고정된 mAb A는 CD73 단독(파란색 센서그램), MEDI9447 Fab (옅은 파란색 센서그램) 또는 대조군 IgG (검은색 센서그램)와 사전 배양된 CD73과 결합하였으나, Zn^{2+} 및 APCP(갈색 센서그램)와 배양된 CD73, 또는 Zn^{2+} 및 APCP 첨가 전에 CD73과 사전 배양된 Fab (금색 센서그램) 또는 대조군 IgG (보라색 센서그램)와는 결합하지 않았다.

도 29a와 도 29b는 항-CD73 mAb B 결합이 하위 부위 DS2b(aa 92-134) 또는 DS2c(aa 114-134)의 잔기들에 의존적임을 보여준다. 도 29a는 도 30a 내지 도 30c에 상응하는 SEC-MALS 데이터를 보여주는 표이다. MEDI9447 또는

mAb B와 CD73의 각각의 혼합물에 대해, 형성된 복합체들의 상응하는 SEC 체류 시간, Mw 및 다분산성을 나타냈다. 도 29b는 CD73 위의 mAb B의 결합 분쟁 지대의 결정을 도시한다. 본 설명의 방법에 따라 도 26a 내지 도 26c의 mAb A(클론 0069)에 대해 기술한 바와 같이 HIS2 바이오센서에 고정시킨 CD73 변이체들에 대한 mAb B 결합을 BLI에 의해 측정하였다. 결합 센서그램들은 하위 부위 DS2b(aa 92-134) 또는 DS2c(aa 114-134)를 스와핑하는 것이 mAb B에 의한 결합을 녹아웃시킴을 보여주었다.

도 30a 내지 도 30c는 MEDI9447이 가용성 CD73 분자들 사이에 이량체간 다리를 형성함을 보여준다. CD73을 여러 가지 양의 MEDI9447 또는 항-CD73 mAb B와 인큐베이션하고, SEC-MALS로 분석하였다. x축에 단백질 체류 시간과 y축에 MALS로 결정한 몰 질량을 나타낸 SEC UV 크로마토그램을 나타냈다. 도 30a는 1:1 몰 비율(녹색 자취)에서, MEDI9447이 약 1.7(^) 및 약 6.6(+) 메가달톤의 CD73과의 복합체를 형성함을 보여주는 크로마토그램이다. 더 낮은 비율의 MEDI9447:CD73(0.5:1 파란색, 0.1:1 자홍색)에서 비슷한 크기의 복합체들이 형성되었다. MEDI9447과 CD73 단독은 각각 검은색 및 빨간색 UV 자취로 나타냈다. 도 30b는 mAb B 결합 분쟁 지대(보라색) 및 MEDI9447 에피토프(자홍색 및 핑크색)를 보여주는 CD73 이량체의 결정 구조의 평면도이다. mAb B는 열린 입체배치에서 이량체들 사이의 중앙 홈에 가까운 자리에 결합한다. 도 30c는 CD73이 mAb B에 결합할 때, 약 270~290 kD의 단일한 두드러진 복합체(약 7.2분에서의 피크)가 형성됨을 보여주는 크로마토그램이다. 도시된 UV 자취는 1:1 mAb B:CD73(빨간색), 0.5:1(파란색) 및 0.1:1(녹색)을 나타낸다. mAb A와 CD73 단독은 각각 자홍색과 검은색이다.

도 31a 내지 도 31d는 표면 결합된 CD73이 MEDI9447의 IgG 및 Fab 포맷에 의해 억제되었음을 도시한 것이다. 도 31a는 MEDI9447 IgG, Fab 또는 대조군 항체들에 의한 고정된 CD73의 AMP 가수분해의 억제를 도시한 그래프이다. CD73을 C 말단 히스티딘 태그를 통해 니켈로 코팅된 마이크로티터 플레이트에 고정시키고, MEDI9447 IgG, Fab 또는 대조군 항체들에 의한 AMP 가수분해의 억제를 본 설명에 기술된 바와 같은 말라카이트 그린 분석법을 이용하여 측정하였다. MEDI9447 IgG는 용량 의존적인 방식으로 AMP의 CD73 가수분해를 억제하였으나 대조군 IgG는 그렇지 않았다. MEDI9447 Fab도 CD73 활성을 억제하였으나 훨씬 낮은 정도로 억제하였다. 도 31b는 항-Fd 항체(xFd, 빨간색)에 결합된 MEDI9447 Fab(녹색)를 포함하는 복합체를 도시한 것이다. MEDI9447 Fab(녹색)가 항-Fd 항체(xFd, 빨간색)의 한 팔 및 비특이적인 다클론성 Fab(pFab, 주황색)에 결합된 다른 팔에 결합될 때, 억제는 MEDI9447 IgG과 비교할 수 있을 만큼 증가하였다(Fab+xFd+pFab 대 MEDI9447 IgG 및 MEDI9947 IgG+xFd+pFab)(도 31a 참조). 도 31c는 MEDI9447 IgG, Fab 또는 대조군 항체들에 의한 GPI 고정 CD73의 AMP 가수분해의 억제를 도시한 그래프이다. MDA-MB-231 세포에서 내인성 발현된 CD73의 효소 활성을 셀타이터글로 분석법으로 측정하였다. 고정된 재조합 CD73과 비슷하게, MEDI9447 IgG는 Fab보다 더 큰 정도로 AMP 가수분해를 억제하였으나, 항-Fd 항체와 복합체를 형성함으로써 MEDI9447 Fab의 유효 크기를 증가시키자 억제력이 향상되었다. 도 31d는 MEDI9447 IgG, Fab 또는 대조군 항체들에 의한 가용성 CD73(sCD73)의 AMP 가수분해의 억제를 도시한 그래프이다. xFd+MEDI9447이 가용성 CD73을 억제할 수 있는지 시험하기 위하여, 말라카이트 그린 분석법을 이용하여 AMP 가수분해를 측정하였다. MEDI9447 Fab 단독 또는 하나의 xFd 팔에 결합된 MEDI9447 Fab는 가용성 CD73 활성을 억제하지 않았다. 이와 대조적으로 xFd 양 팔과 MEDI9947 Fab를 결합시킨 것은(MEDI9447 Fab + xFd) 2가를 주어 CD73 억제를 초래하였다.

도 32는 MEDI94447 IgG 및 MEDI94447 Fab가 AMP의 CD73 가수분해를 억제하였음을 보여주는 그래프이다. 본 설명에 기술된 바와 같이 말라카이트 그린 분석법을 이용하여 점점 증가하는 농도의 항체들 존재 하에 CD73 활성을 측정하였다. MEDI9447 IgG는 용량 의존적인 방식으로 CD73 가수분해 활성을 억제하였고, 후크 효과나 억제 상실은 관찰되지 않았다. MEDI9447 Fab도 CD73 기능을 억제하였으나, 더 낮은 수준의 최대 억제를 나타냈다. 실험은 2회 수행하였고, 비슷한 결과가 나왔다. 오로지 하나의 실험의 데이터를 나타낸 것이다.

도 33은 MEDI9447에 의한 CD73 가수분해 활성의 억제가 이중 메커니즘을 통해 일어남을 보여주는 모형을 도시한 것이다. MEDI9447IgG(녹색)는 닫힌 상태로의 입체형태적 전이를 방지하는 이량체간 다리를 형성함으로써 가용성 CD73을 억제한다. 1가 결합 IgG 또는 Fab는 가용성 CD73을 억제하지 않는다. CD73이 표면 결합될 때, 인접한 CD73 이량체들 사이의 가교화 또는 1가 결합된 IgG 또는 Fab/xFd(빨간색) 복합체로부터의 입체 차단을 통해 억제가 일어날 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0193] 본 발명은 CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 일부 양태에서, 이러한 분자들은 CD73에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편이다. 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 관련 폴리뉴클레오티드, 벡터, 약학적 조성물도 제공된다. 또한, 본 설명에 개

시된 항-CD73 항체 및 항원 결합 단편의 제조방법뿐만 아니라 이용방법, 예를 들어, 진단방법 및 대상자의 (직접 치료법, 보조 치료법, 또는 병용 치료법으로서의) 암 치료방법이 제공된다. 또한, 본 발명은 본 설명에 개시된 CD73 결합 분자들로부터 유래된 항체-약물 접합체를 제공한다. 나아가, 본 발명은 항-CD73 항체들 (예컨대, MEDI9447) 및, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체(예컨대, MEDI4736), 항-CTLA4 항체와 같은 암 면역 사이클의 추가적인 양태를 표적으로 하는 하나 이상의 작용제를 특징으로 하는 치료적 조합물 및 종양 매개성 면역 억제를 감소시키기 위하여 그러한 조합물을 이용하는 방법을 제공한다.

[0194] 본 발명이 더욱 용이하게 이해될 수 있도록 하기 위하여, 먼저 특정 용어를 정의한다. 추가적인 정의를 상세한 설명 전반에 걸쳐 기재하였다.

[0195] **I. 정의**

[0196] 본 발명을 상세하게 설명하기 전에, 본 발명이 특정 조성물 또는 공정 단계에 한정되지 않으며, 따라서 달라질 수 있음을 이해해야 한다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함한다. 용어 "a" (또는 "an")뿐만 아니라, 용어 "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 설명에서 서로 바꾸어 사용될 수 있다.

[0197] 나아가, "및/또는"이 본 설명에 사용된 경우, 이는 다른 것과 함께 또는 다른 것 없이 2종의 명시된 특징 또는 성분 각각의 구체적인 개시내용으로 받아들여진다. 따라서, 본 설명에서 "A 및/또는 B"와 같은 어구에서 사용된 용어 "및/또는"은 "A 및 B", "A 또는 B", "A"(단독) 및 "B"(단독)를 포함하도록 의도한 것이다. 마찬가지로, "A, B 및/또는 C"와 같은 어구에 사용된 용어 "및/또는"은 다음의 양태 각각을 포괄하도록 의도한 것이다: A, B 및 C; A, B 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독).

[0198] 달리 정의되지 않는 한, 본 설명에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 개시내용이 관련된 기술 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, Concise Dictionary of Biomedicine 및 Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell 및 Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 및 the Oxford Dictionary Of Biochemistry 및 Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press는 본 개시에 사용된 많은 용어의 일반적 사전을 당업자에게 제공한다.

[0199] 단위, 접두어 및 기호는 시스템 인터내셔날 드 유니테(Systeme International de Unites; SI)가 용인한 형태로 표시된다. 수치 범위는 범위를 한정하는 숫자들을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, 아미노산 서열은 아미노에서 카르복시 배향으로 좌측에서 우측으로 표기된다. 본 설명에 제공된 표제는 다양한 양태의 제한이 아니며, 이는 전체로서 본 명세서를 참조함으로써 이루어질 수 있다. 따라서, 바로 아래에 정의된 용어들은 본 명세서를 전체적으로 참조하여 더욱 완전하게 정의된다.

[0200] 표현 "포함하는"과 함께 본 설명에서 양태를 기술한 어떠한 경우에서도, "로 이루어지는(consisting of)" 및/또는 "로 필수적으로 이루어지는(consisting essentially of)"의 용어로 기술된 다른 유사한 양태도 제공되는 것으로 이해된다.

[0201] 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명체계 위원회(Biochemical Nomenclature Commission)가 권고한 통상적으로 공지된 3문자 기호 또는 1문자 기호에 의해 본 설명에 지칭된다. 마찬가지로, 뉴클레오티드는 통상적으로 용인된 단일 문자 코드로 지칭된다.

[0202] 본 설명에 사용된 용어 "CD73 폴리펩타이드"는 문헌에서 5'-뉴클레오티드가수분해효소(5'-NT) 또는 엑토-5'-뉴클레오티드가수분해효소로도 지칭되는 CD73(세포 표면 항원 무리 73) 단백질을 지칭하며, 이는 *NT5E* 유전자에 의해 암호화된다. 예컨대, Misumi et al. Eur. J. Biochem. 191(3): 563-9 (1990) 참조. CD73의 인간형 및 뮤린형의 각각의 서열은 각각 등록번호 P21589와 Q61503 하에 Uniprot 데이터베이스에서 이용할 수 있다. 임의의 CD73 항체 에피토프를 정의하는 데 있어서, 사용된 아미노산 넘버링은 신호 서열 잔기를 함유하지 않는 성숙한 CD73 단백질의 아미노산 잔기를 나타낸다. 따라서, 예를 들어, 아미노산 Val144, Lys180 및 Asn185에 결합하는 항체는 신호 서열 절단 후의 아미노산 위치들, 즉, 성숙한 단백질에서의 아미노산을 지칭한다.

[0203] 예시적인 CD73 폴리펩타이드는 아래에 제공된다:

[0204] >sp|P21589|5NTD_HUMAN 5'-뉴클레오티드가수분해효소 OS=호모 사피엔스 GN=NT5E PE=1 SV=1

[0205] MCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLEQTSEDSSKCVNASRCMGG

[0206] VARLFTKVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHFMNALRYDAMALGNHEF

[0207] DNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGIVGYTSKE

[0208] TPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLKTLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVV

[0209] GGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNV

[0210] ISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNM

[0211] GNLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFGGT

[0212] FDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDRVVKLDVLCTKCR

[0213] VPSYDPLKMDEVYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYP

[0214] AVEGRIKFSTGSHCHGSFSLIFLSLWAVIFVLYQ

[0215] CD73의 가용성 형태 및 막 결합 형태가 확인된 바 있다. Klemens et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 172(3):1371-7 (1990) 참조. 또한, 몇몇 상이한 동질효소들이 확인된 바 있다. Rosi et al. Life Sci. 62(25):2257-66 (1998) 참조. 전체 길이의 CD73 단백질은 574개 아미노산을 포함한다. 성숙한 CD73 단백질은 신호 서열(1 내지 26번 위치) 및 프로펩타이드의 C 말단 부위(550 내지 574번 위치) 제거 후에 생성된다. 또한, 아미노산 404번 내지 453번은 대안적인 스플라이싱 후에 CD73의 이소형 2에서 제거된다. 예를 들어, 변이체 C358Y, 변이체 T376A, 및 변이체 M379T 같은 천연 변이체도 공지되어 있다. Misumi et al., Eur. J. Biochem. 191:563-569 (1990); Otsuki et al. DNA Res. 12:117-126 (2005); Mungall et al. Nature 425:805-811 (2003); Hansen et al. Gene 167:307-312 (1995); Klemens et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 172:1371-1377 (1990); Knapp et al. Structure 20:2161-2173 (2012); 또는 St. Hilaire et al. N. Engl. J. Med. 364:432-442 (2011) 참조. 이들 모두는 전체가 참조로써 본 설명에 포함된다.

[0216] 조직액, 특히 혈청에서 환자의 CD73 수준의 변화를 초래하는 전형적인 질병은 조직 외상; 심근경색 또는 뇌졸중, 기관 이식 또는 기타 외과 수술로부터 기인하는 재관류 손상; 암 또는 암 전이; 또는 전술한 외상 또는 재관류 손상 또는 알레르기성 병태를 포함하는 만성 병태로부터 기인하는 염증성 병태 및 염증성 질환이다. 그러한 만성 병태의 예로는 관절염, 천식과 같은 알레르기 병태, 염증성 장 질환과 같은 염증성 병태 또는 피부의 염증성 병태, 건선, 파킨슨병, 알츠하이머병, 자가 면역 질병, 제1형 또는 제2형 당뇨병, 죽상 동맥경화증, 다발성 경화증, 크론병, 또는 기관 이식으로 인한 거부 반응을 언급할 수 있다. 특히, 염증성 질병인 전신성 염증 반응 증후군(SIRS), 급성 폐 손상(ALI), 다기관 기능 부전(MOF), 허혈 재관류 손상(IRI) 및 약물 유해 반응(ADRS)은 조직액 CD73 단백질의 변형을 초래한다. 따라서, 본 설명에 개시된 CD73 결합 분자들은 예를 들어, 암(예컨대, 결장암, 흑색종, 유방암, 림프종, 비소세포 폐암종 호지킨 림프종, 비 호지킨 림프종, 및 버킷 림프종, 난소암, 유방암, 두경부암, 및 췌장암)을 치료하거나 진단하는 데에 이용될 수 있다. 또한, 본 설명에 개시된 CD73 결합 분자를 이용하여 환자의 샘플(예컨대, 조직액)에서 CD73의 수준을 측정한 값은 위에 기술된 질병들의 전개에 대한 모니터링, 치료법의 효능 평가, 특정 치료법을 이용한 치료를 위한 환자 선정, 또는 예를 들어, 특정 치료를 개시, 종료, 중단 또는 변형하는 것과 같은 의학적 결정 내리기에 이용될 수 있다.

[0217] 용어 "억제하다", "차단하다", "저해하다" 및 이의 문법적 변형들은 본 설명에서 서로 바꿔 사용되며, 활성의 완전 차단을 포함하는, 생물학적 활성의 임의의 통계적으로 유의한 감소를 지칭한다. 예를 들어, "억제"는 생물학적 활성의 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%의 감소를 지칭할 수 있다. 따라서, 용어 "억제" 또는 "저해"가 예컨대, CD73의 효소 활성에 미치는 영향을 기술하는 데 적용될 때, 이러한 용어는, 비처리(대조군) 세포에서의 CD73 매개성 5'-뉴클레오티드가수분해효소 활성에 비해, (아데노신 일인산 AMP의 아데노신으로의 가수분해를 이화하는) CD73의 5'-뉴클레오티드가수분해효소 활성을 통계적으로 유의미하게 감소시키는 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 능력을 지칭한다. CD73을 발현하는 이러한 세포는 자연적으로 발생하는 세포 또는 세포주(예컨대, 암세포)일 수 있거나, CD73을 암호화하는 핵산을 숙주 세포로 도입시켜 재조합으로 생산될 수 있다. 일부 양태에서, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 생물학적 유체에서 CD73의 가용성 형태의 5'-뉴클레오티드가수분해효소 활성을 통계적으로 유의미하게 감소시킬 수 있다. 일 양태에서, 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD73 매개성 5'-뉴클레오티드가수분해효소 활성을 예를 들어, 아래 실시예에 기술된 방법 및/또는 당해 분야에 공지된 방법에 의해 결정한 바에 따라 적어도 10%, 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 적어도 45%, 또는 적어도 50%, 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 적어도 65%, 또는 적어도 70%, 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 적어

도 85%, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 약 100% 억제한다.

[0218] 본 설명에 사용된 용어 "CD73 활성을 저해하다"는 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 CD73을 발현하는 세포 또는 CD73을 함유하는 샘플에서 CD73 의존성 5'-뉴클레오티드가수분해효소 활성을 통계적으로 유의미하게 감소시키는 능력을 지칭한다. 일부 양태에서, CD73 활성의 저해는, 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 부재 하(대조군 조건)에서 측정된 CD73 활성에 비해, 세포 또는 샘플을 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 본 개시의 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시켰을 때, 적어도 10%, 또는 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 45%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 65%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 약 100%의 감소일 수 있다.

[0219] 본 설명에서 서로 바꾸어 사용할 수 있는 용어 "항체" 또는 "면역 글로불린"은 전체 항체 및 이의 임의의 항원 결합 단편 또는 단일 사슬을 포함한다.

[0220] 전형적인 항체는 이황화 결합에 의해 서로 연결된 적어도 2개의 무거운(H) 사슬 및 두 개의 가벼운(L) 사슬을 포함한다. 각각의 중쇄는 (본 설명에서 VH 또는 V_H로 축약된) 중쇄 가변 부위와 중쇄 불변 부위로 이루어진다. 이러한 중쇄 불변 부위는 세 개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 (본 설명에서 VL 또는 V_L로 축약된) 경쇄 가변 부위와 경쇄 불변 부위로 이루어진다. 이러한 경쇄 불변 부위는 하나의 도메인 CL로 이루어진다. VH 및 VL 부위는 기본틀 부위(FW)로 지칭되는 보다 보존된 부위들이 사이에 개재되어 있는 상보성 결정 부위(CDR)라 지칭되는 고변이성 부위로 추가적으로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FW로 구성되고, 아미노 말단에서부터 카르복시 말단까지 다음의 순서로 배열된다: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. 중쇄 및 경쇄의 가변 부위는 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 이러한 항체들의 불변 부위는, 면역계의 다양한 세포들(예를 들어, 이펙터 세포) 및 전형적 보체계의 제1 성분(C1q)을 포함하는 숙주 조직들 또는 인자들에 대한 면역 글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 본 개시의 예시적인 항체로는 (본래의 그리고 생식세포화된) 항-CD73 항체, 친화도 최적화 클론들, ADCC가 결여된 최적화 항체들, 접합된 항체들(예컨대, ADC) 및 기타 최적화 항체들(예를 들어, YTE 돌연변이를 포함하는, 예컨대, 혈청 반감기 최적화 항체들, Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006) 및 U.S. Patent No. 7,083,784 참조, 이들 참조 문헌은 전체가 참조로써 본 설명에 포함된다)을 포함한다.

[0221] 용어 "생식세포화(germlining)"는 항체 내 특정 위치의 아미노산들이 생식세포의 아미노산들로 다시 돌연변이됨을 의미한다.

[0222] 용어 "항체"는 면역 글로불린 분자의 가변 부위 내의 적어도 1개의 항원 인식 자리를 통해 표적, 예컨대 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지질, 또는 전술한 것들의 조합을 인식하고 이에 특이적으로 결합하는 면역 글로불린 분자를 의미한다. 본 설명에 사용된 용어 "항체"는 온전한 다클론성 항체, 온전한 단일클론성 항체, 항체 단편(예컨대 Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 단편), 단일 쇄 Fv(scFv) 돌연변이체, 다중특이적 항체, 예컨대 적어도 2개의 온전한 항체들로부터 생성된 이중특이적 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체의 항원 결정 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항체가 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항원 인식 자리를 포함하는 임의의 기타 변형된 면역 글로불린 분자를 포괄한다.

[0223] 항체는 그의 중쇄 불변 도메인의 동일성에 기초하여 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 지칭되는 면역 글로불린의 5가지 주요 부류: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 또는 이의 하위부류(이소형)(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 중 임의의 것일 수 있다. 상이한 부류의 면역 글로불린은 상이하고 널리 공지되어 있는 서브유닛 구조와 3차원 배위를 갖는다. 항체는 접합되지 않은 네이키드(naked)이거나 또는 다른 분자, 예컨대 독소, 방사성 동위원소 등에 접합되어 ADC를 형성할 수 있다.

[0224] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 그것이 결합하는 항원, 예컨대, CD73의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 것이다. 특정 양태에서, 차단 항체 또는 길항제 항체는 이러한 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다. 바람직하게는, 이러한 생물학적 활성은 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 심지어 100% 감소된다.

[0225] 용어 "CD73 항체", "CD73과 결합하는 항체" 또는 "항-CD73"은 이러한 분자가 CD73을 표적으로 하는 데 있어서 치료제로서 또는 진단제로서 유용하도록 충분한 친화도로 CD73과 결합할 수 있는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭한다. 관련 없는, 비-CD73 단백질에 대한 항-CD73 항체의 결합 정도는 예컨대, 방사성 면역 분석법

(RIA), (분석물로서 재조합 CD73과 리간드로서 항체를 이용하거나 그 역을 이용하는) 비아코어(BIACORE™), 또는 당해 분야에 공지된 기타 결합 분석법으로 측정한 바에 따르면, CD73에 대한 이러한 항체의 결합의 약 10% 미만이다. 특정 양태에서, CD73과 결합하는 항체는 ≤1 μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM, ≤0.1 nM, ≤10 pM, ≤1 pM, 또는 ≤0.1 pM의 해리 상수(K_D)를 갖는다. 용어 "항-CD73"은 광범위하게는 예컨대, 스캐폴드 내로 도입된 본 설명에 개시된 항체들의 CDR들을 포함하는 분자들도 포괄한다. 따라서, 어구 "CD73에 특이적으로 결합하는 단리된 결합 분자 또는 이의 항원 결합 단편"은 항체 및 이의 항원 결합 단편을 지칭할 뿐만 아니라, 예를 들어, 본 설명에 개시된 항체들의 CDR들을 도입하는 하나 이상의 스캐폴드(예컨대, 피브로넥틴 또는 테나신-3으로부터의 피브로넥틴 III 도메인)을 포함하는, 분자도 지칭한다. 예를 들어, 전체가 본 설명에 참조로 포함된, 미국 특허 공개 번호 20150098955 참조.

[0226] 일 구현예에서, 항-CD73 항체는 IgG1-TM 포맷의 항체를 지칭하여, IgG1 Fc 도메인이 돌연변이 L234, L235E 및 P331을 포함하고, 가용성 및 세포 표면 발현된 CD73과 결합하며, CD73 효소적 활성을 억제한다. 도 1a 내지 도 1d는 MEDI9447 VH 및 VL 도메인의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열을 제공한다.

[0227] "CLTA4 폴리펩타이드"는 유전자은행 등록번호(GenBank Accession) AAL07473.1에 대해 적어도 85% 아미노산 서열 동일성을 나타내는 폴리펩타이드 또는 T 세포 억제 활성을 가지는 이의 단편을 의미한다. AAL07473.1의 서열은 아래에 제공된다:

[0228] CTLA4 폴리펩타이드 서열[호모 사피엔스]

[0229] gi|15778586|gb|AAL07473.1|AF414120_1

[0230] MACLGFQRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVR

[0231] VTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYY

[0232] LGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTEPE

[0233] CEKQFQPYFIPIN

[0234] "CTLA4 핵산 분자"는 CTLA4 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 예시적인 CTLA4 핵산 분자 서열은 유전자은행 등록번호 AAL07473에서 제공된다.

[0235] "항-CTLA4 항체"는 CTLA4 폴리펩타이드와 선택적으로 결합하는 항체를 의미한다. 예시적인 항-CTLA4 항체들은 예를 들어, 본 설명에 참조로 포함된 미국 특허 번호 6,682,736; 7,109,003; 7,123,281; 7,411,057; 7,824,679; 8,143,379; 7,807,797; 및 8,491,895(거기서 트레멜리무맙은 11.2.1임)에 기술되어 있다. 트레멜리무맙은 예시적인 항-CTLA4 항체이다. 트레멜리무맙 서열은 본 설명의 아래에서 서열 목록에 제공되어 있다(서열 번호 130-137).

[0236] "PD-1 폴리펩타이드"는 NCBI 등록번호 NP_005009에 대해 적어도 약 85% 아미노산 동일성을 가지고, PD-L1 및/또는 PD-L2 결합 활성을 가지는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 의미한다. NP_005009의 서열은 아래에 제공된다.

[0237] PD-1 폴리펩타이드 서열

[0238] NCBI 등록번호 NP_005009

[0239] mqipqapwpv vwavlqlgwr pgwfldspdr pwnpptfspa llvvtegdna tftcsfsnts

[0240] esfvlnwyrm spsnqtdkla afpedrsqpg qdcrfrvtql pngrdfhmsv vrarrndsgt

[0241] ylcgaislap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpagqfqtlv vgvvggllgs

[0242] lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs vdygeldfqw rektpeppvp

[0243] cvpeqteyat ivfpsgmgts sparrgsadg prsaqplrpe dghcswpl

[0244] "PD-1 핵산 분자"는 PD-1 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 예시적인 PD-1 핵산 분자 서열은 NCBI 등록번호 NM_005018에 제공되어 있다.

[0245] "항-PD-1 항체"는 PD-1 폴리펩타이드와 선택적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 의미한다. 예시적인 항-PD-1 항체들로는 예를 들어, 펨브롤리주맙(키트루다, 람브롤리주맙, MK-3475), 니볼루맙(옵디바, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538), 또는 AMP-224를 포함한다.

[0246] "PD-L1 폴리펩타이드"는 NCBI 등록번호 NP_001254635에 대해 적어도 약 85%, 95% 또는 100% 아미노산 동일성을 가지고, PD-1 및 CD80 결합 활성을 가지는 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 의미한다. NP_001254635의 서열은 아래에 제공된다.

[0247] PD-L1 폴리펩타이드 서열

[0248] NCBI 등록번호 NP_001254635

[0249] mrifavfifm tywhllnapy nkinqrilvv dpvtsehelt cqaegypkae viwtssdhqv

[0250] lsgkttttns kreeklfnvt stlrinttтn eifyctfrrl dpeenhtael vipelplahp

[0251] pnerthlvil gaillclgva ltfifrlrkg rmmdvkkcgi qdtnskkqsd thleet

[0252] "PD-L1 핵산 분자"는 PD-L1 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 예시적인 PD-L1 핵산 분자 서열은 NCBI 등록번호 NM_001267706에 제공되어 있다.

[0253] "항-PD-L1 항체"는 PD-L1 폴리펩타이드와 선택적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 의미한다. 예시적인 항-PD-L1 항체들은 예를 들어, 본 설명에 참조로 포함된 US20130034559 / US8779108 및 US20140356353에 기술되어 있다. MEDI4736은 예시적인 PD-L1 항체이다. MEDI4736의 서열은 본 설명의 아래에서 서열 목록에 제공되어 있다(서열 번호 138-145).

[0254] 용어 "항원 결합 단편"은 온전한 항체의 일부분을 포함하는 분자를 지칭하고, 특히, 온전한 항체의 항원 결정 가변 부위를 포함하는 분자를 지칭한다. 항체의 항원 결합 기능이 전체 길이 항체의 단편들에 의해 수행될 수 있다는 점은 당해 분야에 공지되어 있다. 항체 단편들의 예로는 Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv 단편, 선형 항체, 단일 쇄 항체, 그리고 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0255] "단일클론성 항체"는 단일 항원 결정기 또는 에피토프의 고도로 특이적인 인식 및 결합에 관여하는 동종 항체 집단을 지칭한다. 이는 전형적으로 상이한 항원 결정기들에 대항하여 유도되는 상이한 항체들을 포함하는 다클론성 항체와 대조된다.

[0256] 용어 "단일클론성 항체"는 온전한 단일클론성 항체와 전체 길이의 단일클론성 항체뿐만 아니라 항체 단편들(예컨대 Fab, Fab', F(ab')2, Fv), 단일 쇄 가변 단편(scFv), 항체 부분을 포함하는 융합 단백질 및 항원 인식 자리를 포함하는 임의의 기타 변형된 면역 글로불린 분자를 포괄한다. 나아가, "단일클론성 항체"는 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현 및 형질전환 동물에 의한 것(예를 들어, 형질전환 마우스에서 인간 항체의 발현)을 포함하나 이에 한정되지 않는, 임의의 여러 방식으로 제조된 이러한 항체를 지칭한다.

[0257] 용어 "인간화 항체"는 최소의 비 인간(예컨대, 뮤린) 서열을 함유하도록 유전자 조작된 비 인간(예컨대, 뮤린) 면역 글로불린으로부터 유래된 항체를 지칭한다. 전형적으로, 인간화 항체는, CDR로부터의 잔기들이 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비 인간 종(예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 또는 햄스터)의 CDR로부터의 잔기들로 대체된 인간 면역 글로불린이다(Jones *et al.*, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science*, 239:1534-1536). 일부 경우에, 인간 면역 글로불린의 기본틀(FW) 아미노산 잔기는 원하는 특이성 및/또는 친화도 및/또는 능력을 갖는 비 인간 종으로부터의 항체 내 상응하는 잔기로 대체된다.

[0258] 이러한 인간화 항체는 Fv 기본틀 부위에서 및/또는 대체된 비 인간 잔기 내에서 추가적인 잔기들의 치환에 의해 더 변형되어 항체 특이성, 친화도 및/또는 능력을 개선하고 최적할 수 있다. 일반적으로, 이러한 인간화 항체는 비 인간 면역 글로불린에 상응하는 CDR 부위들을 전부, 또는 실질적으로 전부 함유하는, 적어도 하나의, 그리고 전형적으로는 2개 또는 3개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이나, FR 부위들의 전부, 또는 실질적으로 전부는 인간 면역 글로불린 공통 서열의 것이다. 이러한 인간화 항체는 또한 적어도 면역 글로불린 불변 부위 또는 도메인(Fc)의 일부분, 전형적으로는 인간 면역 글로불린의 일부분을 포함할 수 있다. 인간화 항체를 생성하는데 사용되는 방법의 예는 미국 특허 번호 5,225,539 또는 5,639,641에 기술되어 있다.

[0259] 항체의 "가변 부위"는 항체 경쇄의 가변 부위 또는 항체 중쇄의 가변 부위를, 단독으로 또는 조합하여, 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 부위는 각각이 3개의 CDR 부위에 의해 연결된 4개의 FW 부위로 이루어진다. 각각의 쇄에서의 CDR들은 FW 부위에 의해 서로 매우 가까이 유지되고, 다른 쇄의 CDR들과 함께 항체의 항원 결합 자리의 형성에 기여한다. CDR을 결정하는 기법은 적어도 두 가지가 있다: (1) 교차-종 서열 가변성에 기초한 접근법(즉, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National

Institutes of Health, Bethesda Md.)); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구에 기초한 접근법(Al-lazikani et al. (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). 또한, 이들 두 접근법의 조합이 당해 분야에서 CDR을 결정하는 데 사용되기도 한다.

[0260] 카밧 넘버링 시스템은 일반적으로 가변 도메인 내의 잔기(대략적으로 경쇄의 잔기 1 내지 107 및 중쇄의 잔기 1 내지 113)를 지칭할 때 사용된다(예컨대, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0261] 어구 "카밧에서와 같은 아미노산 위치 넘버링", "카밧 위치" 및 이의 문법적 변형들은 Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)에서 항체들의 편집물의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대하여 사용된 넘버링 체계를 지칭한다. 이러한 넘버링 체계를 사용하여, 실질적인 선형 아미노산 서열은 가변성 도메인의 FW 또는 CDR의 단축 또는 가변성 도메인의 FW 또는 CDR로의 삽입에 상응하는, 더 적은 또는 추가적인 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들면, 중쇄 가변성 도메인은 단일 아미노산 삽입부(카밧에 따른 잔기 52a)를 H2의 잔기 52 뒤에 포함하고, 삽입된 잔기(예를 들어, 카밧에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 중쇄 FW 잔기 82 뒤에 포함할 수 있다.

표 1

[0262]

루프	카밧	AbM	코티아
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		(카밧 넘버링)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(코티아 넘버링)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0263] 잔기의 카밧 넘버링은 주어진 항체에 대해 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카밧 넘버링된 서열로 정렬시킴으로써 결정될 수 있다. 코티아(Chothia)는 구조적 루프의 위치를 대신 지칭한다(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). 카밧 넘버링 관례를 이용하여 넘버링했을 때 코티아 CDRH1의 말단은 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 다르다(이는 카밧 넘버링 체계가 H35A와 H35B에 삽입물을 위치시키기 때문이다; 만일 35A와 35B가 존재하지 않는다면, 이러한 루프는 32에서 끝난다; 35A만 존재한다면, 이러한 루프는 33에서 끝난다; 35A와 35B 모두가 존재할 경우, 이러한 루프는 34에서 끝난다). AbM 과가변 부위는 카밧 CDR들과 코티아 구조적 루프 사이의 절충물을 나타내며, 옥스포드 몰레큘러(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다.

[0264] IMGT(임뮤노제네틱스(ImMunoGeneTics))도 CDR들을 포함하는 면역 글로불린 가변 부위에 대한 넘버링 시스템을 제공한다. 예를 들면, 본 설명에 참조로 포함 되는 Lefranc, M.P. *et al.*, Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77(2003)) 참조. IMGT 넘버링 시스템은 5,000개를 초과하는 서열들의 정렬선, 구조적 데이터 및 과가변 루프의 특징 규명을 기초로 하였고, 모든 종들에 대한 가변 부위 및 CDR 부위의 용이한 비교를 가능하게 한다. IMGT 넘버링 체계에 따르면, VH-CDR1은 위치 26 내지 35에 존재하고, VH-CDR2는 위치 51 내지 57에 존재하고, VH-CDR3은 위치 93 내지 102에 존재하고, VL-CDR1은 위치 27 내지 32에 존재하고, VL-CDR2는 위치 50 내지 52에 존재하고, VL-CDR3은 위치 89 내지 97에 존재한다.

[0265] EU 지수 또는 EU 넘버링 체계는 시퀀싱된 최초의 인간 IgG(EU 항체)의 순차적인 넘버링을 기초로 한다. 이러한 관례에 대한 가장 흔한 참고문헌이 카밧 서열 매뉴얼(Kabat *et al.*, 1991)이므로, 이러한 EU 지수는 때때로 카밧 지수와 같은 뜻으로 잘못 사용된다. EU 지수는 삽입물과 결실물을 제공하지 않으며, 따라서 일부 사례에서

IgG 하위부류 및 종을 가로지르는 IgG 위치의 비교는 불분명할 수 있으며, 특히 힌지 부위에서 불분명할 수 있다. 그럼에도 이러한 관례는 다양한 Fc 구조 기능 연구에서 Fc 부위들 사이의 간단한 비교를 가능하게 하는 데 충분했다. 따라서, 본 명세서에서 Fc 부위들에서의 치환물 및 삽입물에 대해 사용된 넘버링 체계는 카밧에서와 같은 EU 지수이다. 이와 대조적으로, 본 명세서에서 가변 부위(VH 및 VL)에 대해 사용된 넘버링 체계는 보통의 카밧 넘버링이다.

[0266] 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같이, 기술된 VH CDR 서열들은 전통적인 카밧 넘버링 위치에 해당한다. 즉, 카밧 VH-CDR1은 위치 31 내지 35에 존재하고, VH-CDR2는 위치 50 내지 65에 존재하고, VH-CDR3은 위치 95 내지 102에 존재한다. VL-CDR1, VL-CDR2 및 VL-CDR3도 전통적인 카밧 넘버링 위치, 즉, 각각 위치 24 내지 34, 50 내지 56 및 89 내지 97에 해당한다.

[0267] 본 설명에 사용된 바와 같이, Fc 부위는 제1 불변 부위 면역 글로불린 도메인을 제외한 항체의 불변 부위를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 따라서, Fc는 IgA, IgD 및 IgG의 마지막 2개의 불변 부위 면역 글로불린 도메인들, 및 IgE 및 IgM의 마지막 3개의 불변 부위 면역 글로불린 도메인들, 및 이들 도메인들에 대해 N 말단에 존재하는 유연성 힌지를 지칭한다. IgA 및 IgM의 경우, Fc는 J 쇄를 포함할 수 있다. IgG의 경우, Fc는 면역 글로불린 도메인 C감마2 및 C감마3(Cγ2 및 Cγ3), 및 C감마1(Cγ1)과 C감마2(Cγ2) 사이의 힌지를 포함한다.

[0268] Fc 부위의 경계는 달라질 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 부위는 통상적으로 잔기 C226 또는 P230부터 그의 카복실 말단까지 포함하도록 정의되고, 이때 넘버링은 카밧(Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))에 기재된 EU 지수에 따른다. Fc는 단리된 상태의 이 부위, 또는 항체, 항체 단편 또는 Fc 융합 단백질의 배경에서의 이 부위를 지칭할 수 있다. EU 지수에 의해 넘버링된 위치 270, 272, 312, 315, 356, 및 358을 포함하나 이에 한정되지 않는 다수의 상이한 Fc 위치에서 다형성이 관찰되었으므로, 제시된 서열과 선행 기술의 서열들 사이에 약간의 차이가 존재할 수 있다.

[0269] 용어 "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체, 또는 당해 분야에서 공지된 임의의 기법(예를 들면, 배양 세포에서의 재조합 발현, 또는 형질전환 동물에서의 발현)을 이용함으로써 제조된, 인간에 의해 생성된 항체에 상응하는 아미노산 서열을 가진 항체를 의미한다. 따라서, 용어 인간 항체는 인간에 의해 원래 생성된 항체(또는 이의 유전자 조작된 변이체 또는 유도체)에 상응하는 아미노산 서열을 갖되, 비 인간 시스템에서 발현된(예를 들면, 화학적 합성에 의해 생성된; 미생물, 포유동물 또는 곤충 세포에서 재조합적으로 발현된; 또는 동물 대상체에서 발현된) 항체도 포괄한다. 따라서, 인간 대상체 또는 인간 세포(예를 들면, 재조합 항체 또는 이의 단편을 발현하는 하이브리도마 또는 세포주)로부터 수득된 후 동물, 예를 들면, 마우스에서 발현된 항체는 인간 항체로 간주된다. 인간 항체의 이 정의는 온전한 또는 전체 길이 항체, 이의 단편, 및/또는 적어도 하나의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체, 예를 들면, 뮤린 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체를 포함한다.

[0270] 용어 "키메라 항체"는 면역 글로불린 분자의 아미노산 서열이 2종 이상의 동물 종들로부터 유래된 항체를 지칭한다. 전형적으로, 경쇄 및 중쇄 둘 다의 가변 부위는 원하는 특이성, 및/또는 친화도, 및/또는 능력을 가진, 포유동물의 한 종(예를 들면, 마우스, 랫트, 토끼 등)으로부터 유래된 항체의 가변 부위에 상응하는 반면, 불변 부위는 그 종에서 면역 반응을 유발하는 것을 피하기 위해 또 다른 종(통상적으로 인간)으로부터 유래된 항체의 서열과 상동하다.

[0271] 본 설명에서 사용된 용어 "에피토프"는 본 설명에 개시된 CD73 항체 또는 CD73 결합 분자에 결합할 수 있는 항원성 단백질 결정인자를 지칭한다. 에피토프는 통상적으로 분자의 화학적 활성 표면 기, 예컨대, 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되고, 통상적으로 특정한 3차원적 구조적 특성뿐만 아니라 특정 전하 특성도 가진다. 에피토프를 인식하는 항체 또는 결합 분자의 부분은 파라토프라 지칭된다. 단백질 항원의 에피토프들은 그들의 구조 및 파라토프와의 상호작용을 기초로 2개의 카테고리들, 즉 입체형상적 에피토프 및 선형 에피토프로 나뉜다. 입체형상적 에피토프는 항원의 아미노산 서열의 불연속적 구획들로 구성된다. 이들 에피토프들은 3-D 표면 특징 및 항원의 형태 또는 3차 구조를 기초로 파라토프와 상호작용한다. 이와 대조적으로, 선형 에피토프들은 그들의 1차 구조를 기초로 파라토프와 상호작용한다. 선형 에피토프는 항원으로부터의 아미노산의 연속적 서열에 의해 형성된다.

[0272] 용어 "항체 결합 자리"는 상보적 항체가 특이적으로 결합하는 연속적 또는 불연속적 자리(즉, 에피토프)를 포함하는, 항원(예를 들면, CD73) 내 부위를 지칭한다. 따라서, 이러한 항체 결합 자리는 에피토프를 넘어서 존재하고, 결합 친화도 및/또는 안정성 같은 성질을 결정할 수 있거나, 항원 효소적 활성 또는 이량체화 같은 성질에

영향을 미칠 수 있는 추가 영역을 항원 내에 함유할 수 있다. 따라서, 2개의 항체들이 한 항원 내의 동일한 에피토프에 결합하는 경우조차도, 항체 분자가 에피토프 외부의 아미노산과 별개의 분자간 접촉을 확립한다면, 이러한 항체들은 별개의 항체 결합 자리들에 결합하는 것으로 간주된다.

[0273] "결합 친화도"는 일반적으로 분자(예를 들면, 항체)의 단일 결합 자리와 그의 결합 파트너(예를 들면, 항원) 사이의 비 공유적 상호작용의 총 합계의 강도를 지칭한다. 달리 표시되어 있지 않은 한, 본 설명에서 사용된 바와 같이, "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원들(예를 들면, 항체와 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유 결합 친화도를 지칭한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수(K_D)로 표시할 수 있다. 친화도는 본 설명에 기술된 방법들을 포함하는, 당해 분야에 공지된 통상의 방법들에 의해 측정할 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 느리게 항원에 결합하고 용이하게 해리되는 경향을 나타내는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 보다 더 빠르게 항원에 결합하고 더 오랫동안 결합된 상태로 남아있는 경향을 나타낸다. 다양한 결합 친화도 측정 방법들이 당해 분야에 공지되어 있고, 이 방법들 중 임의의 방법을 본 개시의 목적을 위해 이용할 수 있다.

[0274] 달리 언급되어 있지 않은 한, "효능"은 통상적으로 nM로 나타낸 IC_{50} 값으로서 표현된다. IC_{50}은 항원 결합 분자의 중간 억제 농도이다. 기능성 분석에서, IC_{50}은 최대치의 50%까지 생물학적 반응을 감소시키는 농도이다. 리간드 결합 연구에서, IC_{50}은 최대 특이적 결합 수준의 50%까지 수용체 결합을 감소시키는 농도이다. IC_{50}은 당해 분야에 공지된 다수의 수단에 의해 계산할 수 있다. 효능의 개선은 예를 들면, 모 항체(예를 들어, 생식세포화 전의 모 항체 또는 친화도 최적화 전의 모 항체)와 대비하여 측정함으로써 결정할 수 있다.

[0275] 모 항체와 비교하여 본 개시의 항체 또는 폴리펩타이드에 대한 효능의 배수 개선은 적어도 약 2배, 적어도 약 4배, 적어도 약 6배, 적어도 약 8배, 적어도 약 10배, 적어도 약 15배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 적어도 약 60배, 적어도 약 70배, 적어도 약 80배, 적어도 약 90배, 적어도 약 100배, 적어도 약 110배, 적어도 약 120배, 적어도 약 130배, 적어도 약 140배, 적어도 약 150배, 적어도 약 160배, 적어도 약 170배 또는 적어도 약 180배 이상일 수 있다.

[0276] "항체 의존적 세포 매개성 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포들(예를 들면, 천연 살해(NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체들(FcR들)에 결합된 분비된 면역 글로불린이 이들 세포독성 이펙터 세포들로 하여금 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 이러한 표적 세포를 세포독소로 사멸시킬 수 있게 하는 세포독성의 한 형태를 지칭한다. 표적 세포의 표면에 대해 유도된 특이적 고친화도 IgG 항체는 세포독성 세포를 "무장시키고", 이러한 사멸을 위해 절대적으로 요구된다. 표적 세포의 용해는 세포외 용해이고, 직접적인 세포-대-세포 접촉을 요구하며, 보체를 수반하지 않는다. 항체 이외에도, 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합하는 능력을 가진, Fc 부위를 포함하는 다른 단백질, 구체적으로 Fc 융합 단백질은 세포 매개성 세포독성을 미칠 수 있을 것이라고 예상된다. 간결함을 위해, Fc 융합 단백질의 활성으로부터 비롯된 세포 매개성 세포독성은 본 설명에서 ADCC 활성으로도 지칭된다.

[0277] "단리된" 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물은 자연에서 발견되지 않는 형태로 존재하는 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물이다. 단리된 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물은 이들이 자연에서 발견된 형태로는 더 이상 존재하지 않을 정도까지 정제된 단리된 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물을 포함한다. 일부 양태에서, 단리된 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물은 실질적으로 순수하다.

[0278] 용어 "대상체"는 특정 치료의 수용자가 될, 인간, 비 인간 영장류, 설치류 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 동물(예를 들면, 포유동물)을 지칭한다. 전형적으로, 용어 "대상체" 및 "환자"는 인간 대상체를 언급할 때 본 설명에서 상호교환적으로 사용된다.

[0279] 용어 "약학적 조성물"은 활성 성분(예를 들면, 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자)의 생물학적 활성이 유효하도록 하는 형태로 존재하고, 조성물이 투여될 대상체에게 허용불가능한 독성을 나타내는 추가적인 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다. 이러한 조성물은 멸균 조성물일 수 있다.

[0280] 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자의 "유효량"은 구체적으로 언급된 목적을 수행하기에 충분한 양이다. "유효량"은 언급된 목적과 관련하여, 경험적으로 및 통상적인 방식으로 결정할 수 있다.

[0281] 용어 "치료적 유효량"은 대상체 또는 포유동물에서 질병 또는 장애를 "치료하기에" 효과적인, 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자 또는 기타 약물의 양을 지칭한다.

[0282] 본 설명에서 사용될 때 용어 "표지"는 "표지된" 항-CD73 결합 분자를 생성하도록 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자에 직접적으로 또는 간접적으로 융합(예컨대, 유전적으로 융합)되거나 접합(예컨대, 화학적으로 접합)되는 검출가능한 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 이러한 표지는 그 자체로 검출될 수 있거나(예를 들면, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소적 표지의 경우, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 개질을 촉매 작용할 수 있다.

[0283] "유도체화 가능한 기" 및 "유도체화 가능한 작용기"와 같은 용어들은 상호교환적으로 사용되고, 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자(예를 들면, CD73 항체)와 또 다른 물질 사이의 공유 결합의 형성을 허용하도록 반응할 수 있는 작용기를 지칭한다. 일부 양태들에서, 이러한 물질은 치료제(예를 들면, 세포독소), 검출가능한 표지, 중합체(예를 들면, PEG) 등이다. 예시적인 유도체화 가능한 기는 티올, 하이드록실, 아미노, 카복시 및 아미드뿐만 아니라 이들의 개질된 형태들, 예컨대, 활성화된 또는 보호된 형태도 포함한다.

[0284] "치료(treating 또는 treatment 또는 to treat)" 또는 "완화(alleviating 또는 to alleviate)"와 같은 용어들은 (1) 진단된 병리학적 상태 또는 장애를 치유하고/하거나, 늦추고/거나, 이러한 상태 또는 장애의 증상을 경감시키고/시키거나, 이러한 상태 또는 장애의 진행을 중단시키는 치료적 조치, 및 (2) 표적화된 병리학적 상태 또는 장애의 발생을 예방하고/하거나 늦추는 예방적 또는 방지적 조치 둘 다를 지칭한다. 따라서, 치료가 필요한 대상체는 이미 장애를 가진 대상체; 장애를 갖기 쉬운 대상체; 및 장애가 예방되어야 하는 대상체를 포함한다. 일부 양태들에서, 환자가 예를 들면, 특정 유형의 암의 전체적, 부분적 또는 일시적 관해를 보이는 경우, 대상체는 본 개시의 방법에 따라 암에 대해 성공적으로 "치료"된다.

[0285] 용어 "암", "종양", "암성" 및 "악성"은 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리적 상태를 지칭하거나 기술한다. 암의 예로는 선암종, 림프종, 모세포종, 흑색종, 육종 및 백혈병을 포함하는 암종이 있으나 이들로 한정되지 않는다. 이러한 암의 보다 구체적인 예로는 편평세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 위장암, 호지킨 및 비 호지킨 림프종, 췌장암, 신경아교모세포종, 신경아교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 예컨대, 간암종 및 간종, 방광암, 유방암(호르몬에 의해 매개되는 유방암을 포함함, 예를 들면, Innes et al. (2006) Br. J. Cancer 94:1057-1065 참조), 결장암, 결장직장암, 자궁내막암종, 골수종(예컨대, 다발성 골수종), 침샘암종, 신장암, 예컨대, 신장세포암종 및 윌름스 종양, 기저세포암종, 흑색종, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 정소암, 식도암, 다양한 유형의 두경부암들 및 점액 유래의 암들, 예컨대, 점액성 난소암, 담관암종(간) 및 신장유두암종이 있다. 일부 양태들에서, 본 설명에서 사용된 용어 암은 구체적으로 CD73을 발현하는 암을 지칭한다. 일부 특정 양태들에서, 용어 암은 저수준의 CD73을 발현하는 암을 지칭한다. 일부 양태들에서, 본 설명에 사용된 용어 암은 구체적으로 CD73을 발현하는 암(예컨대, 결장암, 유방암, 림프종, 비소세포 암종)을 지칭한다.

[0286] 본 설명에서 상호교환적으로 사용된 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드 중합체를 지칭하고 DNA 및 RNA를 포함한다. 이러한 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 개질된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해 중합체 내로 도입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 개질된 뉴클레오티드, 예컨대, 메틸화된 뉴클레오티드 및 이의 유사체를 포함할 수 있다. 전술한 설명은 RNA 및 DNA를 포함하는, 본 설명에서 지칭된 모든 폴리뉴클레오티드들에 적용된다.

[0287] 용어 "벡터"는 관심있는 하나 이상의 유전자(들) 또는 서열(들)을 숙주 세포에 전달할 수 있고, 일부 양태들에서는 발현할 수 있는 구축물을 의미한다. 벡터의 예로는 바이러스 벡터, 어느 것도 연결되지 않은(naked) DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터, 양이온성 축합제와 연결된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포좀에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 특정 진핵세포들, 예컨대, 생산자 세포가 있으나 이들로 한정되지 않는다.

[0288] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산 중합체를 지칭하기 위해 본 설명에서 상호교환적으로 사용된다. 이러한 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 개질된 아미노산을 포함할 수 있고, 비 아미노산에 의해 단절될 수 있다. 이러한 용어들은 천연적으로 또는 조작, 예를 들면, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 기타 조작 또는 개질, 예컨대, 표지 성분과의 접합에 의해 개질된 아미노산 중합체도 포괄한다. 예를 들어, (예를 들어, 비천연 아미노산 등을 포함하는)아미노산의 하나 이상의 유사체뿐만 아니라 당해 분야에 공지된 다른 개질도 함유하는 폴리펩타이드도 이러한 정의 내에 포함된다. 본 개시의 폴리펩타이드가 항체에 기초하기 때문에, 특정 양태들에서, 이러한 폴리펩타이드는 단일 쇄 또는 연결된 쇄로서 존재할 수 있다는 점이 이해된다.

[0289] "재조합" 폴리펩타이드 또는 단백질은 재조합 DNA 기술을 통해 생성된 폴리펩타이드 또는 단백질을 지칭한다. 유전자 조작된 숙주 세포에서 발현된 재조합적으로 생성된 폴리펩타이드 및 단백질은 임의의 적합한 기법에 의해 분리된, 분획화된, 또는 부분적으로 또는 실질적으로 정제된, 천연 또는 재조합 폴리펩타이드이기 때문에, 단리된 것으로 간주된다. 본 설명에 개시된 폴리펩타이드는 당해 분야에 공지된 방법을 이용함으로써 재조합적으로 생성할 수 있다. 대안적으로, 본 설명에 개시된 단백질 및 펩타이드는 화학적으로 합성할 수 있다.

[0290] 용어 "아미노산 치환"은 모 서열에 존재하는 아미노산 잔기를 다른 아미노산 잔기로 교체하는 것을 지칭한다. 아미노산은 예를 들면, 화학적 펩타이드 합성 또는 당해 분야에 공지된 재조합 방법을 통해, 모 서열에서 치환될 수 있다. 따라서, "위치 X에서의 치환" 또는 "위치 X의 치환"에 대한 언급은 위치 X에 존재하는 아미노산이 대안적 아미노산 잔기로 치환되는 것을 지칭한다. 일부 양태들에서, 치환 패턴은 AXY 체계에 따라 기술될 수 있는데, 이때 A는 위치 X에 천연적으로 존재하는 아미노산에 상응하는 단일 문자 코드이고, Y는 치환시키는 아미노산 잔기이다. 다른 양태에서, 치환 패턴은 XY 체계에 따라 기재될 수 있는데, 이때 Y는 위치 X에 천연적으로 존재하는 아미노산을 치환시키는 아미노산 잔기에 상응하는 단일 문자 코드이다.

[0291] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 가진 아미노산 잔기로 교체되는 아미노산 치환이다. 염기성 측쇄(예를 들면, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들면, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄(예를 들면, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들면, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지된 측쇄(예를 들면, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들면, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하는, 유사한 측쇄를 가진 아미노산 잔기들의 패밀리들이 당해 분야에 정의되어 있다. 따라서, 폴리펩타이드에서 아미노산이 동일한 측쇄 패밀리로부터의 또 다른 아미노산으로 교체되는 경우, 이러한 치환은 보존적 치환인 것으로 간주된다. 또 다른 양태에서, 일련의 아미노산들이 측쇄 패밀리 구성원의 순서 및/또는 조성에서 상이한, 구조적으로 유사한 일련의 아미노산들로 보존적으로 교체될 수 있다.

[0292] 비 보존적 아미노산 치환은 (i) 전기양성 측쇄를 가진 잔기(예를 들면, Arg, His 또는 Lys)가 전기음성 잔기(예를 들면, Glu 또는 Asp) 대신에 또는 이러한 전기음성 잔기로 치환되거나, (ii) 친수성 잔기(예를 들면, Ser 또는 Thr)가 소수성 잔기(예를 들면, Ala, Leu, Ile, Phe 또는 Val) 대신에 또는 이러한 소수성 잔기로 치환되거나, (iii) 시스테인 또는 프롤린이 임의의 다른 잔기 대신에 또는 임의의 다른 잔기로 치환되거나, (iv) 비대한 소수성 또는 방향족 측쇄를 가진 잔기(예를 들면, Val, His, Ile 또는 Trp)가 보다 더 작은 측쇄를 가진 잔기(예를 들면, Ala, Ser) 또는 측쇄를 갖지 않은 잔기(예를 들면, Gly) 대신에 또는 이러한 잔기로 치환되는 것들을 포함한다.

[0293] 다른 치환은 당업자에 의해 용이하게 확인될 수 있다. 예를 들면, 아미노산 알라닌의 경우, 치환은 D-알라닌, 글리신, 베타-알라닌, L-시스테인 및 D-시스테인 중 어느 하나로부터 일어날 수 있다. 라이신의 경우, 교체는 D-라이신, 아르기닌, D-아르기닌, 호모-아르기닌, 메티오닌, D-메티오닌, 오르니틴 또는 D-오르니틴 중 어느 하나일 수 있다. 일반적으로, 단리된 폴리펩타이드의 성질의 변화를 유도할 것으로 예상할 수 있는 기능적으로 중요한 부위에서의 치환은 (i) 극성 잔기, 예를 들면, 세린 또는 트레오닌이 소수성 잔기, 예를 들면, 류신, 이소류신, 페닐알라닌 또는 알라닌 대신에(또는 이러한 잔기로) 치환되거나; (ii) 시스테인 잔기가 임의의 다른 잔기 대신에(또는 이러한 잔기로) 치환되거나; (iii) 전기양성 측쇄를 가진 잔기, 예를 들면, 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘이 전기음성 측쇄를 가진 잔기, 예를 들면, 글루탐산 또는 아스파르트산 대신에 (또는 이러한 잔기로) 치환되거나; (iv) 비대한 측쇄를 가진 잔기, 예를 들면, 페닐알라닌이 이러한 측쇄를 갖지 않은 잔기, 예를 들면, 글리신 대신에(또는 이러한 잔기로) 치환되는 것들이다. 전술한 비 보존적 치환들 중 하나가 단백질의 기능적 성질을 변경시킬 수 있는 가능성은, 단백질의 기능적으로 중요한 부위와 관련하여, 이러한 치환의 위치와도 상호 관련이 있다. 따라서, 일부 비 보존적 치환들은 생물학적 성질에 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않을 수 있다.

[0294] 용어 "아미노산 삽입"은 모 서열에 존재하는 2개의 아미노산 잔기들 사이에 새로운 아미노산 잔기를 도입하는 것을 지칭한다. 아미노산은 예를 들면, 화학적 펩타이드 합성을 통해, 또는 당해 분야에 공지된 재조합 방법을 통해, 모 서열로 삽입될 수 있다. 따라서, 본 설명에서 사용된 어구 "위치 X와 Y 사이의 삽입" 또는 "카밧 위치 X와 Y 사이의 삽입"(이때, X 및 Y는 아미노산 위치들에 상응한다)(예를 들면, 위치 239와 240 사이의 시스테인 아미노산 삽입)은 X와 Y 위치 사이에 아미노산을 삽입하는 것, 및 또한 위치 X 및 Y에서 아미노산을 암호화하는 코돈들 사이에서 아미노산을 암호화하는 코돈을 핵산 서열에 삽입하는 것을 지칭한다. 삽입 패턴은 AXins 체계에 따라 기재될 수 있고, 이때 A는 삽입되는 아미노산에 상응하는 단일 문자 코드이고, X는 삽입 앞의

위치이다.

[0295] 2개의 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드 서열들 사이의 "퍼센트 서열 동일성"이라는 용어는 이러한 2개의 서열들의 최적 정렬을 위해 도입되어야 하는 추가 또는 결실(즉, 갭)을 고려할 때 비교 창(window) 전체에 걸쳐 이러한 서열들에 의해 공유되는 동일한 매치된 위치들의 수를 지칭한다. 매치된 위치는 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산이 표적 및 기준 서열 둘 다에 존재하는 임의의 위치이다. 갭은 뉴클레오티드 또는 아미노산이 아니기 때문에, 표적 서열에 존재하는 갭은 카운팅되지 않는다. 마찬가지로, 기준 서열로부터의 뉴클레오티드 또는 아미노산이 아니라 표적 서열 뉴클레오티드 또는 아미노산이 카운팅되기 때문에, 기준 서열에 존재하는 갭은 카운팅되지 않는다.

[0296] 서열 동일성의 백분율은 동일한 아미노산 잔기 또는 핵산 염기가 서열들 둘 다에 존재하는 위치의 수를 결정하여 매치된 위치의 수를 산출하고, 매치된 위치의 수를 비교 창 내의 위치의 총 수로 나누고 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산한다. 온라인 사용 및 다운로드 둘 다를 위한, 용이하게 입수가능한 소프트웨어를 이용함으로써 서열들의 비교 및 두 서열들 사이의 퍼센트 서열 동일성 결정을 할 수 있다. 다양한 공급원들로부터, 그리고 단백질 및 뉴클레오티드 서열들 둘 다의 정렬을 위해, 적합한 소프트웨어 프로그램을 이용할 수 있다. 퍼센트 서열 동일성을 결정하기 위한 적합한 프로그램 하나는 미국 정부의 국립 생물공학 정보 센터 BLAST 웹 사이트(blast.ncbi.nlm.nih.gov)로부터 이용할 수 있는 프로그램의 BLAST 스위트의 일부인 bl2seq이다. bl2seq는 BLASTN 또는 BLASTP 알고리즘을 이용하여 2개의 서열들 사이의 비교를 수행한다. BLASTN은 핵산 서열들을 비교하는 데에 사용되는 반면, BLASTP는 아미노산 서열들을 비교하는 데에 사용된다. 다른 적합한 프로그램은 예를 들면, 생물정보학 프로그램의 EMBOSS 스위트의 일부이고 유럽 생물정보학 연구소(EBI) www.ebi.ac.uk/Tools/psa로부터도 이용할 수 있는 니들(Needle), 스트레처(Stretcher), 워터(Water) 또는 매처(Matcher)이다.

[0297] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 기준 서열과 정렬되는 단일 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 표적 서열 내의 상이한 부위들은 각각 그들 자신의 퍼센트 서열 동일성을 가질 수 있다. 퍼센트 서열 동일성 값은 소수점 첫째 자리까지 반올림된다고 알려져 있다. 예를 들면, 80.11, 80.12, 80.13 및 80.14는 80.1로 반내림되는 반면, 80.15, 80.16, 80.17, 80.18 및 80.19는 80.2로 반올림된다. 길이 값은 항상 정수일 것이라는 것도 알려져 있다.

[0298] 일부 양태들에서, 제2 아미노산 서열에 대한 제1 아미노산 서열의 백분율 동일성 "X"는 100 x (Y/Z)로서 계산되고, 이때 Y는 (시각적 검사 또는 특정 서열 정렬 프로그램에 의해 정렬될 때) 제1 서열과 제2 서열의 정렬선에서 동일한 매치로서 점수화된 아미노산 잔기의 수이고, Z는 제2 서열에서의 잔기의 총 수이다. 제1 서열의 길이가 제2 서열보다 더 긴 경우, 제2 서열에 대한 제1 서열의 퍼센트 동일성은 제1 서열에 대한 제2 서열의 퍼센트 동일성보다 더 높을 것이다.

[0299] 당업자는 퍼센트 서열 동일성 계산을 위한 서열 정렬선의 생성이 오로지 일차 서열 데이터에 의해 유도된 이원 서열-서열 비교로 한정되지 않는다는 것을 인식할 것이다. 서열 정렬선은 다중 서열 정렬선으로부터 유도될 수 있다. 다중 서열 정렬선을 생성하는 한 가지 적합한 프로그램은 www.clustal.org로부터 입수가능한 ClustalW2이다. 또 다른 적합한 프로그램은 www.drive5.com/muscle/로부터 입수가능한 MUSCLE이다. ClustalW2 및 MUSCLE은 예를 들면, EBI로부터 대안적으로 입수가능하다.

[0300] 서열 정렬선이 서열 데이터를 이질적인 공급원으로부터의 데이터, 예컨대, 구조적 데이터(예를 들면, 결정학적 단백질 구조), 기능적 데이터(예를 들면, 돌연변이의 위치) 또는 계통발생적 데이터와 통합시킴으로써 생성될 수 있다는 것도 인식될 것이다. 다중 서열 정렬선을 생성하기 위하여 이질적인 데이터를 통합하는 적합한 프로그램은 www.tcoffee.org에서 입수가능하고 대안적으로는, 예를 들면, EBI로부터 입수가능한 T-Coffee이다. 퍼센트 서열 동일성을 계산하는 데에 사용된 마지막 정렬선은 자동으로 또는 수동으로 큐레이팅될 수 있다는 점도 인식될 것이다.

[0301] 경쇄(VL) 및 중쇄(VH) 가변 부위와 관련하여 본 설명에 사용된 용어 "공통 서열"은 VL 또는 VH 쇄 내부의 어떠한 아미노산 잔기가 항원 결합을 해치지 않고 변경될 수 있는지에 관한 정보를 기초로 하여 정의된 복합체 또는 일반화된 VL 또는 VH 서열을 지칭한다. 따라서, VL 또는 VH 쇄에 대한 "공통 서열"에서, 특정 아미노산 위치들은 그 위치에 있는 여러 가지 가능성 있는 아미노산 잔기들 중 하나가 차지한다. 예를 들어, 아르기닌(R) 또는 세린(S)이 특정 위치에 존재한다면, 이러한 공통 서열 내의 그 특정한 위치는 아르기닌 또는 세린(R 또는 S) 중 하나일 수 있다. 예를 들어, 시험관 내 친화도 성숙(예컨대, 축퇴성 암호화 프라이머를 이용하여 특정 CDR의 모든 아미노산 위치를 무작위화), 항체 CDR 내의 아미노산 잔기의 스캐닝 돌연변이 유발(예컨대, 알라닌 스캐닝

돌연변이 유발) 또는 당해 분야에 공지된 임의의 기타 방법과, 그 후, 돌연변이된 아미노산 위치가 항원 결합에 영향을 미치는지를 결정하기 위한 항원에 대한 돌연변이체의 결합의 평가에 의해 VH 및 VL 쇄에 대한 공통 서열을 정의할 수 있다. 일부 양태들에서, 돌연변이는 CDR 부위에 도입된다. 다른 양태들에서, 돌연변이는 기본틀 부위에 도입된다. 일부 다른 양태들에서, 돌연변이는 CDR 및 기본틀 부위에 도입된다.

[0302] **II. CD73-결합 분자**

[0303] 본 개시는 CD73 결합 분자, 예컨대, CD73, 예를 들어, 인간 CD73에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. CD73에 대한 전체 길이의 아미노산(aa) 및 뉴클레오티드(nt) 서열들은 당해 분야에 공지되어 있다(예컨대, 인간 CD73에 대한 UniProt 등록번호 P21589, 또는 마우스 CD73에 대한 UniProt 등록번호 Q61503 참조). 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 결합 분자는 인간 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체, 클론 2C5 항체, MEDI9447)이다. 특정 양태들에서, 이러한 CD73 결합 분자는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0304] 일부 양태들에서, CD73 결합 분자, 예컨대, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, 단일 쇄 Fv 또는 scFv, 이황화물 연결된 Fv, V-NAR 도메인, IgNar, 인트라바디, IgG CH2, 미니바디, $F(ab')_3$, 테트라바디, 트리아바디, 디아바디, 단일 도메인 항체, DVD-Ig, Fcab, mAb^2, $(scFv)_2$ 또는 scFv-Fc를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항체는 IgG 유형, 예를 들면, IgG1 유형의 항체이다.

[0305] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 불변 부위 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 구체적인 양태에서, 이러한 중쇄 불변 부위는 IgG 불변 부위이다. 이러한 IgG 불변 부위는 카파 불변 부위 및 람다 불변 부위로 이루어지는 군으로부터 선택된 경쇄 불변 부위를 포함할 수 있다.

[0306] 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 모 항체, 예컨대, CD730010 항체 또는 CD730002 항체에 비해, 개질된다. 일부 양태들에서, 이러한 모 항체는 CD730010이다. 다른 양태들에서, 이러한 모 항체는 CD730002이다. 다른 양태들에서, 이러한 모 항체는 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069이다. 이러한 개질은 모 항체, 예컨대, CD730010 또는 CD730002와 비교하여, CDR 부위 및/또는 FW 부위에 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0307] 어구 "CD730002 항체"는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VL 도메인 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VH 도메인을 포함하는 IgG1을 지칭한다.

[0308] 어구 "CD730004 항체"는 서열 번호 104의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VL 도메인 및 서열 번호 103의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VH 도메인을 포함하는 IgG1을 지칭한다.

[0309] 어구 "CD730008 항체"는 서열 번호 106의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VL 도메인 및 서열 번호 107의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VH 도메인을 포함하는 IgG1을 지칭한다.

[0310] 어구 "CD730010 항체"는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VL 도메인 및 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VH 도메인을 포함하는 IgG1을 지칭한다.

[0311] 어구 "CD730011 항체"는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VL 도메인 및 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VH 도메인을 포함하는 IgG1을 지칭한다.

[0312] 어구 "CD730021 항체"는 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VL 도메인 및 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VH 도메인을 포함하는 IgG1을 지칭한다.

[0313] 어구 "CD730042 항체"는 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VL 도메인 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VH 도메인을 포함하는 IgG1을 지칭한다.

[0314] 어구 "CD730046 항체"는 서열 번호 11의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VL 도메인 및 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VH 도메인을 포함하는 IgG1을 지칭한다.

[0315] 어구 "CD730047 항체"는 서열 번호 13의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VL 도메인 및 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VH 도메인을 포함하는 IgG1을 지칭한다.

[0316] 어구 "CD730068 항체"는 서열 번호 108의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VL 도메인 및 서열 번호 107의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VH 도메인을 포함하는 IgG1을 지칭한다.

[0317] 어구 "CD730069 항체"는 서열 번호 110의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VL 도메인 및 서열 번호 109의 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 VH 도메인을 포함하는 IgG1을 지칭한다.

[0318] **(i) CD730010 유래 항-CD73 항체**

[0319] 특정 양태들에서, 본 개시의 항-CD73 항체는

[0320] 1) 공통 서열 SGSLSNIGRNX$_1$VN(이때, X$_1$은 아미노산 잔기 프롤린(P), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타낸다)을 포함하는 경쇄 CDR1; 및/또는,

[0321] 2) 공통 서열 LX$_2$NX$_3$RX$_4$X$_5$(이때, X$_2$는 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고, X$_3$은 아미노산 잔기 글루타민(Q) 또는 류신(L)을 나타내고, X$_4$는 아미노산 잔기 류신(L) 또는 프롤린(P)을 나타내고, X$_5$는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 세린(S)을 나타낸다)를 포함하는 경쇄 CDR2; 및/또는,

[0322] 3) 공통 서열 ATWDDSX$_6$X$_7$GWX$_8$(이때, X$_6$은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 히스티딘(H)을 나타내고, X$_7$은 아미노산 잔기 라이신(K), 프롤린(P), 이소류신(I) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고, X$_8$은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 트레오닌(T)을 나타낸다)을 포함하는 경쇄 CDR3;

[0323] 을 포함하나 이에 한정되지 않는, CD730010 항체의 경쇄의 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 CDR3에 대한 개질을 포함한다.

[0324] 특정 양태들에서, 본 개시의 항-CD73 항체는

[0325] 1) 공통 서열 SYAX$_9$S(이때, X$_9$는 아미노산 잔기 메티오닌(M) 또는 티로신(Y)을 나타낸다)을 포함하는 중쇄 CDR1; 및/또는,

[0326] 2) 공통 서열 X$_{10}$IX$_{11}$GSX$_{12}$GX$_{13}$TYYADSVKG(이때, X$_{10}$은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 알라닌(A)을 나타내고, X$_{11}$은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 세린(S)을 나타내고, X$_{12}$는 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 글리신(G)을 나타내고, X$_{13}$은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아르기닌(R)을 나타낸다)을 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는,

[0327] 3) 공통 서열 LGYX$_{14}$X$_{15}$X$_{16}$DX$_{17}$(이때, X$_{14}$는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 세린(S)을 나타내고, X$_{15}$는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 트레오닌(T)을 나타내고, X$_{16}$은 아미노산 잔기 발린(V) 또는 이소류신(I)을 나타내고, X$_{17}$은 아미노산 잔기 티로신(Y), 라이신(K), 메티오닌(M), 류신(L) 또는 글루탐산(E)을 나타낸다)을 포함하는 중쇄 CDR3;

[0328] 을 포함하나 이에 한정되지 않는, CD730010 항체의 중쇄의 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 CDR3에 대한 개질을 포함한다.

[0329] 일 양태에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 공통 아미노산 서열:

[0330] [FW$_1$]SGSLSNIGRNX$_1$VN[FW$_2$] LX$_2$NX$_3$RX$_4$X$_5$[FW$_3$] ATWDDSX$_6$X$_7$GWX$_8$[FW$_4$]

[0331] 을 포함하는 VL 부위를 포함한다

[0332] (이때, [FW$_1$], [FW$_2$], [FW$_3$] 및 [FW$_4$]는 각각 VL 기본틀 부위 1(서열 번호 25 또는 26), VL 기본틀 부위 2(서열 번호 27 또는 28), VL 기본틀 부위 3(서열 번호 29) 및 VL 기본틀 부위 4(서열 번호 30)의 아미노산 잔기들을 나타내고,

[0333] X$_1$은 아미노산 잔기 프롤린(P), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0334] X$_2$는 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0335] X$_3$은 아미노산 잔기 글루타민(Q) 또는 류신(L)을 나타내고;

[0336] X$_4$는 아미노산 잔기 류신(L) 또는 프롤린(P)을 나타내고;

[0337] X$_5$는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0338] X_6은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;

[0339] X_7은 아미노산 잔기 라이신(K), 프롤린(P), 이소류신(I) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고;

[0340] X_8은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 트레오닌(T)을 나타낸다).

[0341] 일 양태에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 공통 아미노산 서열:

[0342] $[FW_5]SYAX_9S\ [FW_6]X_{10}IX_{11}GSX_{12}GX_{13}TYYADSVKG\ [FW_7]LGYX_{14}X_{15}X_{16}DX_{17}\ [FW_8]$

[0343] 을 포함하는 VH 부위를 포함한다

[0344] (이때, $[FW_5]$, $[FW_6]$, $[FW_7]$ 및 $[FW_8]$은 각각 VH 기본틀 부위 1(서열 번호 31), VH 기본틀 부위 2(서열 번호 32), VH 기본틀 부위 3(서열 번호 33) 및 VH 기본틀 부위 4(서열 번호 34)의 아미노산 잔기들을 나타내고,

[0345] X_9는 아미노산 잔기 메티오닌(M) 또는 티로신(Y)을 나타내고;

[0346] X_{10}은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 알라닌(A)을 나타내고;

[0347] X_{11}은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0348] X_{12}는 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 글리신(G)을 나타내고;

[0349] X_{13}은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아르기닌(R)을 나타내고;

[0350] X_{14}는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0351] X_{15}는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;

[0352] X_{16}은 아미노산 잔기 발린(V) 또는 이소류신(I)을 나타내고;

[0353] X_{17}은 아미노산 잔기 티로신(Y), 라이신(K), 메티오닌(M), 류신(L) 또는 글루탐산(E)을 나타낸다).

[0354] 일 양태에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 공통 아미노산 서열:

[0355] $[FW_1]SGSLSNIGRNX_1VN[FW_2]\ LX_2NX_3RX_4X_5[FW_3]\ ATWDDSX_6X_7GWX_8[FW_4]$

[0356] 를 포함하는 VL 부위를 포함하고,

[0357] (이때, $[FW_1]$, $[FW_2]$, $[FW_3]$ 및 $[FW_4]$는 각각 VL 기본틀 부위 1(서열 번호 25 또는 26), VL 기본틀 부위 2(서열 번호 27 또는 28), VL 기본틀 부위 3(서열 번호 29) 및 VL 기본틀 부위 4(서열 번호 30)의 아미노산 잔기들을 나타내고,

[0358] X_1은 아미노산 잔기 프롤린(P), 글루탐산(E) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0359] X_2는 아미노산 잔기 아스파라긴(N) 또는 아스파르트산(D)을 나타내고;

[0360] X_3은 아미노산 잔기 글루타민(Q) 또는 류신(L)을 나타내고;

[0361] X_4는 아미노산 잔기 류신(L) 또는 프롤린(P)을 나타내고;

[0362] X_5는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0363] X_6은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 히스티딘(H)을 나타내고;

[0364] X_7은 아미노산 잔기 라이신(K), 프롤린(P), 이소류신(I) 또는 아스파라긴(N)을 나타내고;

[0365] X_8은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 트레오닌(T)을 나타낸다)

[0366] 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 공통 아미노산 서열:

[0367] $[FW_5]SYAX_9S\ [FW_6]X_{10}IX_{11}GSX_{12}GX_{13}TYYADSVKG\ [FW_7]LGYX_{14}X_{15}X_{16}DX_{17}\ [FW_8]$

[0368] 을 포함하는 VH 부위를 더 포함한다

[0369] (이때, $[FW_5]$, $[FW_6]$, $[FW_7]$ 및 $[FW_8]$은 각각 VH 기본틀 부위 1(서열 번호 31), VH 기본틀 부위 2(서열 번호 32), VH 기본틀 부위 3(서열 번호 33) 및 VH 기본틀 부위 4(서열 번호 34)의 아미노산 잔기들을 나타내고,

[0370] X_9는 아미노산 잔기 메티오닌(M) 또는 티로신(Y)을 나타내고;

[0371] X_{10}은 아미노산 잔기 류신(L) 또는 알라닌(A)을 나타내고;

[0372] X_{11}은 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0373] X_{12}는 아미노산 잔기 트립토판(W) 또는 글리신(G)을 나타내고;

[0374] X_{13}은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 아르기닌(R)을 나타내고;

[0375] X_{14}는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 세린(S)을 나타내고;

[0376] X_{15}는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 트레오닌(T)을 나타내고;

[0377] X_{16}은 아미노산 잔기 발린(V) 또는 이소류신(I)을 나타내고;

[0378] X_{17}은 아미노산 잔기 티로신(Y), 라이신(K), 메티오닌(M), 류신(L) 또는 글루탐산(E)을 나타낸다).

[0379] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 46, 47 및 48로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 46, 47 및 48로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR1을 포함한다.

[0380] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 49, 50, 51, 및 52로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR2를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 49, 50, 51, 및 52로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR2를 포함한다.

[0381] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 53, 54, 55, 및 56으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 53, 54, 55, 및 56으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다.

[0382] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 35 및 36으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 35 및 36으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR1을 포함한다.

[0383] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 37, 38, 39, 및 40으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR2를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 37, 38, 39, 및 40으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR2를 포함한다.

[0384] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 41, 42, 43, 44, 및 45로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 41, 42, 43, 44, 및 45로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR3을 포함한다.

[0385] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 46, 47, 및 48로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 46, 47, 및 48로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR1을 포함한다.

[0386] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 49, 50, 51, 및 52로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR2를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 49, 50, 51, 및 52로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR2를 포함한다.

[0387] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 53, 54, 55, 및 56으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 53, 54, 55, 및 56으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다.

[0388] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 35 및 36으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 35 및 36으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR1을 포함한다.

[0389] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 37, 38, 39, 및 40으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR2를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 37, 38, 39, 및 40으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR2를 포함한다.

[0390] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 41, 42, 43, 44, 및 45로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 41, 42, 43, 44, 및 45로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR3을 포함한다.

[0391] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 46, 47 및 48로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR1; 서열 번호 49, 50, 51, 및 52로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR2; 및 서열 번호 53, 54, 55, 및 56으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 46, 47 및 48로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR1; 서열 번호 49, 50, 51, 및 52로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열 번호 53, 54, 55, 및 56으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다.

[0392] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 35 및 36으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR1; 서열 번호 37, 38, 39, 및 40으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR2; 및 서열 번호 41, 42, 43, 44, 및 45로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 35 및 36으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열 번호 37, 38, 39, 및 40으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR2; 및 서열 번호 41, 42, 43, 44, 및 45로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR3을 포함한다.

[0393] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 46, 47 및 48로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR1; 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 49, 50, 51, 및 52로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR2; 및 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 53, 54, 55, 및 56으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함한다.

[0394] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 46, 47 및 48로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR1; 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 49, 50, 51, 및 52로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 53, 54, 55, 및 56으로

이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다.

[0395] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 35 및 36으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR1; 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 37, 38, 39, 및 40으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR2; 및 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 41, 42, 43, 44, 및 45로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR3을 포함한다.

[0396] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 35 및 36으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR1; 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 37, 38, 39, 및 40으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR2; 및 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 41, 42, 43, 44, 및 45로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR3을 포함한다.

[0397] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR1, 및/또는 CDR2, 및/또는 CDR3에 대한 개질을 포함하고, 중쇄 및/또는 경쇄의 FW1, 및/또는 FW2, 및/또는 FW3, 및/또는 FW4에 대한 개질을 더 포함한다.

[0398] 일부 양태들에서, FW_1은 서열 번호 25 또는 26을 포함하고, FW_2는 서열 번호 27 또는 28을 포함하고, FW_3은 서열 번호 29를 포함하고, FW_4는 서열 번호 30을 포함하고, FW_5는 서열 번호 31을 포함하고, FW_6은 서열 번호 32를 포함하고, FW_7은 서열 번호 33을 포함하고, FW_8은 서열 번호 34를 포함한다.

[0399] 일부 양태들에서, FW_1은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 25 또는 26을 포함하고; FW_2는 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 27 또는 28을 포함하고; FW_3은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 29를 포함하고; FW_4는 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 30을 포함하고; FW_5는 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 31을 포함하고; FW_6은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 32를 포함하고; FW_7은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고, 서열 번호 33을 포함하고; FW_8은 서열 번호 34를 포함한다.

[0400] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD733 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 CDR에, 동일한, 또는 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고는 동일한, VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2, 및 VH-CDR3 아미노산 서열들을 포함하는 VL 및 VH를 포함하며, 이때, 그러한 VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2, 및 VH-CDR3은 각각

[0401] 서열 번호 46, 49, 53, 35, 37, 및 41; 또는,

[0402] 서열 번호 47, 49, 53, 35, 37 및 41; 또는,

[0403] 서열 번호 47, 49, 54, 36, 37 및 42; 또는,

[0404] 서열 번호 46, 50, 54, 36, 38 및 43; 또는,

[0405] 서열 번호 46, 51, 55, 36, 39 및 44; 또는,

[0406] 서열 번호 48, 52, 54, 36, 40 및 44; 또는,

[0407] 서열 번호 46, 49, 56, 35, 37 및 41; 또는,

[0408] 서열 번호 46, 49, 53, 35, 37 및 45; 또는,

[0409] 서열 번호 47, 49, 56, 36, 37 및 45; 또는,

[0410] 서열 번호 46, 50, 56, 36, 38 및 45; 또는,

[0411] 서열 번호 46, 51, 56, 36, 39 및 45; 또는,

[0412] 서열 번호 48, 52, 56, 36, 40 및 45; 또는

[0413] 서열 번호 46, 49, 56, 35, 37 및 45이다.

[0414] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 VL 및 항체 VH를 포함하는데, 이때, 이러한 VL은 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62, 서열 번호 63, 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66, 서열 번호 67, 서열 번호 68, 서열 번호 69, 및 서열 번호 70으로 이루어지는 군으로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0415] 다른 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 VL 및 항체 VH를 포함하는데, 이때, 이러한 VH는 서열 번호 71, 서열 번호 72, 서열 번호 73, 서열 번호 74, 서열 번호 75, 서열 번호 76, 서열 번호 77, 서열 번호 78, 서열 번호 79, 서열 번호 80, 서열 번호 80, 서열 번호 81, 서열 번호 82, 서열 번호 83 및 서열 번호 84로 이루어지는 군으로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0416] 다른 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 57, 서열 번호 58, 서열 번호 59, 서열 번호 60, 서열 번호 61, 서열 번호 62, 서열 번호 63, 서열 번호 64, 서열 번호 65, 서열 번호 66, 서열 번호 67, 서열 번호 68, 서열 번호 69, 및 서열 번호 70으로 이루어지는 군으로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 서열을 포함하는 VL을 포함하고, 서열 번호 71, 서열 번호 72, 서열 번호 73, 서열 번호 74, 서열 번호 75, 서열 번호 76, 서열 번호 77, 서열 번호 78, 서열 번호 79, 서열 번호 80, 서열 번호 81, 서열 번호 82, 서열 번호 83 및 서열 번호 84로 이루어지는 군으로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 서열을 포함하는 VH를 더 포함한다.

[0417] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 68의 서열을 포함하는 VL 및 서열 번호 82의 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 68의 서열로 이루어지는 VL 및 서열 번호 82의 서열로 이루어지는 VH를 포함한다.

[0418] ("73콤보3" 또는 "MEDI9447"로도 명명된) "클론 10.3 항체"는 (각각 서열 번호 46, 51 및 56의 서열들을 나타내는, 세 개의 CDR인 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는) 서열 번호 68의 두 개의 CD730010 유래 경쇄(VL) 및 (각각 서열 번호 36, 39, 및 45의 서열들을 나타내는, 세 개의 CDR인 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는) 서열 번호 82의 두 개의 CD730010 유래 중쇄(VH)를 포함하는 IgG1이다.

[0419] 특정 양태들에서, 본 설명에 개시된 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 82의 10.3 중쇄 VH 및 서열 번호 68의 10.3 경쇄 VL을 포함하는 10.3 항체와 실질적으로 동일하거나 더 우수한 친화도로 CD73과 결합한다.

[0420] **(ii) CD730002 유래 항-CD73 항체**

[0421] 특정 양태들에서, 본 개시의 항-CD73 항체는

[0422] 1) 서열 SGDKVGDKYAS를 포함하는 경쇄 CDR1; 및/또는,

[0423] 2) 공통 서열 $EDX_{18}KX_{19}X_{20}S$(이때, X_{18}은 아미노산 잔기 세린(S) 또는 트레오닌(T)을 나타내고, X_{19}는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 티로신(Y)을 나타내고, X_{20}은 아미노산 잔기 히스티딘(H), 프롤린(P) 또는 류신(L)을 나타낸다)를 포함하는 경쇄 CDR2; 및/또는,

[0424] 3) 서열 QAWDTSFWV를 포함하는 경쇄 CDR3;

[0425] 을 포함하나 이에 한정되지 않는, CD730002 항체의 경쇄의 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 CDR3에 대한 개질을 포함한다.

[0426] 특정 양태들에서, 본 개시의 항-CD73 항체는

[0427] 1) 서열 $SX_{21}A\ X_{22}S$(이때, X_{21}은 아미노산 잔기 티로신(Y) 또는 발린(V)을 나타내고, X_{22}는 아미노산 잔기 메티오닌(M) 또는 아르기닌(R)을 나타낸다)를 포함하는 중쇄 CDR1; 및/또는,

[0428] 2) 서열 $AISGSGGSX_{23}YY\ X_{24}DSVKX_{25}$(이때, X_{23}은 아미노산 잔기 트레오닌(T) 또는 프롤린(P)을 나타내고, X_{24}는 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 G(글리신)를 나타내고, X_{25}는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 아르기닌(R)을 나타낸

다)를 포함하는 중쇄 CDR2; 및/또는,

[0429] 3) 서열 DKGYYWYM을 포함하는 중쇄 CDR3

[0430] 을 포함하나 이에 한정되지 않는, CD730002 항체의 중쇄의 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 CDR3에 대한 개질을 포함한다.

[0431] 일 양태에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 공통 아미노산 서열:

[0432] $[FW_9]SGDKVGDKYAS[FW_{10}]EDX_{18}KX_{19}X_{20}S[FW_{11}]QAWDTSFWV[FW_{12}]$

[0433] 을 포함하는 VL 부위를 포함한다(이때, $[FW_9]$, $[FW_{10}]$, $[FW_{11}]$ 및 $[FW_{12}]$는 각각 VL 기본틀 부위 1(서열 번호 90 또는 91), VL 기본틀 부위 2(서열 번호 92), VL 기본틀 부위 3(서열 번호 93, 94 또는 122) 및 VL 기본틀 부위 4(서열 번호 30)의 아미노산 잔기들을 나타내고, X_{18}은 아미노산 잔기 프롤린(P) 또는 류신(L)을 나타내고; X_{19}는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 티로신(Y)을 나타내고; X_{20}은 아미노산 잔기 히스티딘(H), 프롤린(P) 또는 류신(L)을 나타낸다).

[0434] 일 양태에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 공통 아미노산 서열:

[0435] $[FW_{13}]\ SX_{21}A\ X_{22}S[FW_{14}]AISGSGGSX_{23}YY\ X_{24}DSVKX_{25}[FW_{15}]DKGYYWYM[FW_{16}]$

[0436] 을 포함하는 VH 부위를 포함한다(이때, $[FW_{13}]$, $[FW_{14}]$, $[FW_{15}]$ 및 $[FW_{16}]$은 각각 VH 기본틀 부위 1(서열 번호 31), VH 기본틀 부위 2(서열 번호 32), VH 기본틀 부위 3(서열 번호 33) 및 VH 기본틀 부위 4(서열 번호 89)를 나타내고, X_{21}은 아미노산 잔기 티로신(Y) 또는 발린(V)을 나타내고; X_{22}는 아미노산 잔기 메티오닌(M) 또는 아르기닌(R)을 나타내고; X_{23}은 아미노산 잔기 트레오닌(T) 또는 프롤린(P)을 나타내고; X_{24}는 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 G(글리신)를 나타내고; X_{25}는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 아르기닌(R)을 나타낸다).

[0437] 일 양태에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 공통 아미노산 서열:

[0438] $[FW_9]SGDKVGDKYAS[FW_{10}]EDX_{18}KX_{19}X_{20}S[FW_{11}]QAWDTSFWV[FW_{12}]$

[0439] 를 포함하는 VL 부위를 포함하고(이때, $[FW_9]$, $[FW_{10}]$, $[FW_{11}]$ 및 $[FW_{12}]$는 각각 VL 기본틀 부위 1(서열 번호 90 또는 91), VL 기본틀 부위 2(서열 번호 92), VL 기본틀 부위 3(서열 번호 93, 94 또는 122) 및 VL 기본틀 부위 4(서열 번호 30)의 아미노산 잔기들을 나타내고, X_{18}은 아미노산 잔기 프롤린(P) 또는 류신(L)을 나타내고; X_{19}는 아미노산 잔기 아르기닌(R) 또는 티로신(Y)을 나타내고; X_{20}은 아미노산 잔기 히스티딘(H), 프롤린(P) 또는 류신(L)을 나타낸다), 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 공통 아미노산 서열:

[0440] $[FW_{13}]\ SX_{21}A\ X_{22}S[FW_{14}]AISGSGGSX_{23}YY\ X_{24}DSVKX_{25}[FW_{15}]DKGYYWYM[FW_{16}]$

[0441] 을 포함하는 VH 부위를 더 포함한다(이때, $[FW_{13}]$, $[FW_{14}]$, $[FW_{15}]$ 및 $[FW_{16}]$은 각각 VH 기본틀 부위 1(서열 번호 31), VH 기본틀 부위 2(서열 번호 32), VH 기본틀 부위 3(서열 번호 33) 및 VH 기본틀 부위 4(서열 번호 89)를 나타내고, X_{21}은 아미노산 잔기 티로신(Y) 또는 발린(V)을 나타내고; X_{22}는 아미노산 잔기 메티오닌(M) 또는 아르기닌(R)을 나타내고; X_{23}은 아미노산 잔기 트레오닌(T) 또는 프롤린(P)을 나타내고; X_{24}는 아미노산 잔기 알라닌(A) 또는 G(글리신)를 나타내고; X_{25}는 아미노산 잔기 글리신(G) 또는 아르기닌(R)을 나타낸다).

[0442] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 97로 이루어지는 서열로 이루어지는 VL-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 97로 이루어지는 서열을 포함하는 VL-CDR1을 포함한다.

[0443] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 98, 99, 127, 128, 및 129로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR2를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 98, 99, 127, 128, 및 129로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR2를 포함한다.

[0444] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 100으로 이루어지는 서열로 이루

어지는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 100으로 이루어지는 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다.

[0445] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 서열 번호 35, 123 및 124로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열의 서열로 이루어지는 VH-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 35, 123 및 124로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR1을 포함한다.

[0446] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 37, 95, 125 및 126으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR2를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 37, 95, 125 및 126으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR2를 포함한다.

[0447] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 96으로 이루어지는 서열로 이루어지는 VH-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 96으로 이루어지는 서열을 포함하는 VH-CDR3을 포함한다.

[0448] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 97로 이루어지는 서열로 이루어지는 VL-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 97로 이루어지는 서열을 포함하는 VL-CDR1을 포함한다.

[0449] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 98, 99, 127, 128, 및 129로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR2를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 98, 99, 127, 128, 및 129로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR2를 포함한다.

[0450] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 100으로 이루어지는 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 100으로 이루어지는 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다.

[0451] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 서열 번호 35, 123 및 124로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 35, 123 및 124로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR1을 포함한다.

[0452] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 37, 95, 125 및 126으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR2를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 37, 95, 125 및 126으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR2를 포함한다.

[0453] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 96으로 이루어지는 서열로 이루어지는 VH-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 96으로 이루어지는 서열을 포함하는 VH-CDR3을 포함한다.

[0454] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 97로 이루어지는 서열로 이루어지는 VL-CDR1; 서열 번호 98, 99, 127, 128, 및 129로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR2; 및 서열 번호 100으로 이루어지는 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 97로 이루어지는 서열을 포함하는 VL-CDR1; 서열 번호 98, 99, 127, 128, 및 129로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 서열 번호 100으로 이루어지는 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다.

[0455] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 35, 123, 및 124로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR1; 서열 번호 37, 95, 125, 및 126으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR2; 및 서열 번호 96으로 이루어지는 서열로 이루어지는 VH-CDR3을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 35, 123, 및 124로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR1; 서열 번호 37, 95, 125, 및 126으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR2; 및 서열 번호 96으로 이루어지는 서열을 포함하는 VH-CDR3을 포함한다.

[0456] 일부 양태들에서, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 97로 이루어지는 서열로 이루어지는 VL-CDR1; 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 98, 99, 127, 128, 및 129로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VL-CDR2; 및 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 100으로 이루어지는 서열로 이루어지는 VL-CDR3을 포함한다.

[0457] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 97로 이루어지는 서열을 포함하는 VL-CDR1; 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 98, 99, 127, 128, 및 129로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VL-CDR2; 및 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 100으로 이루어지는 서열을 포함하는 VL-CDR3을 포함한다.

[0458] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 35, 123, 및 124로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR1; 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 37, 95, 125, 및 126으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열로 이루어지는 VH-CDR2; 및 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 96으로 이루어지는 서열로 이루어지는 VH-CDR3을 포함한다.

[0459] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 35, 123, 및 124로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR1; 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 37, 95, 125, 및 126으로 이루어지는 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 VH-CDR2; 및 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 96으로 이루어지는 서열을 포함하는 VH-CDR3을 포함한다.

[0460] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR1, 및/또는 CDR2, 및/또는 CDR3에 대한 개질을 포함하고, 중쇄 및/또는 경쇄의 FW1, 및/또는 FW2, 및/또는 FW3, 및/또는 FW4에 대한 개질을 더 포함한다.

[0461] 일부 양태들에서, FW_9는 서열 번호 90 또는 91을 포함하고, FW_{10}은 서열 번호 92를 포함하고, FW_{11}은 서열 번호 93, 94, 또는 122를 포함하고, FW_{12}는 서열 번호 30을 포함하고, FW_{13}은 서열 번호 31을 포함하고, FW_{14}는 서열 번호 32를 포함하고, FW_{15}는 서열 번호 33을 포함하고, FW_{16}은 서열 번호 89를 포함한다.

[0462] 일부 양태들에서, FW_9는 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 90 또는 91을 포함하고, FW_{10}은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 92를 포함하고, FW_{11}은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 93, 94, 또는 122를 포함하고, FW_{12}는 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 30을 포함하고, FW_{13}은 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 31을 포함하고, FW_{14}는 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 32를 포함하고, FW_{15}는 하나, 둘, 셋, 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 서열 번호 33을 포함하고, FW_{16}은 서열 번호 89를 포함한다.

[0463] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD733 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 동일하거나 하나 이상의 CDR의 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고는 동일한, VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2, 및 VH-CDR3 아미노산 서열들을 포함하는 VL 및 VH를 포함하며, 이때, 그러한 VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2, 및 VH-CDR3은 각각

[0464] 서열 번호 97, 98, 100, 35, 37, 및 96; 또는,

[0465] 서열 번호 97, 99, 100, 35, 95 및 96; 또는,

[0466] 서열 번호 97, 98, 100, 35, 37, 및 96; 또는,

[0467] 서열 번호 97, 99, 100, 123, 37, 및 96; 또는,

[0468] 서열 번호 97, 99, 100, 124, 37, 및 96; 또는,

[0469] 서열 번호 97, 99, 100, 35, 125, 및 96; 또는,

[0470] 서열 번호 97, 99, 100, 35, 126, 및 96; 또는,

[0471] 서열 번호 97, 99, 100, 35, 95, 및 96; 또는,

[0472] 서열 번호 97, 127, 100, 35, 95, 및 96; 또는,

[0473] 서열 번호 97, 128, 100, 35, 95, 및 96; 또는,

[0474] 서열 번호 97, 129, 100, 35, 95, 및 96; 또는,

[0475] 서열 번호 97, 99, 100, 35, 95, 및 96이다.

[0476] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 VL 및 항체 VH를 포함하는데, 이때, 이러한 VL은 서열 번호 86, 88, 112, 118, 119, 120, 및 121로 이루어지는 군으로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0477] 다른 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 VL 및 항체 VH를 포함하는데, 이때, 이러한 VH는 서열 번호 85, 87, 111, 113, 114, 115, 116, 및 117로 이루어지는 군으로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0478] 다른 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 86, 88, 112, 118, 119, 120, 및 121로 이루어지는 군으로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 서열을 포함하는 VL을 포함하고; 서열 번호 85, 87, 111, 113, 114, 115, 116, 및 117로 이루어지는 군으로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 서열을 포함하는 VH를 더 포함한다.

[0479] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 88의 서열을 포함하는 VL; 및 서열 번호 87의 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 87의 서열로 이루어지는 VL 및 서열 번호 87의 서열로 이루어지는 VH를 포함한다.

[0480] "클론 2C5 항체"는 (각각 서열 번호 97, 99, 및 100의 서열들을 나타내는 세 개의 CDR인 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는) 서열 번호 88의 두 개의 CD730002 유래 경쇄(VL) 및 (각각 서열 번호 35, 95, 및 96의 서열들을 나타내는, 세 개의 CDR인 CDR1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는) 서열 번호 87의 CD7300002 유래 중쇄(VH)를 포함하는 IgG1이다.

[0481] 특정 양태들에서, 본 설명에 개시된 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 87의 2C5 중쇄 VH 및 서열 번호 88의 2C5 경쇄 VL을 포함하는 2C5 항체와 실질적으로 동일하거나 더 우수한 친화도로 CD73과 결합한다.

[0482] **(iii) CD730002 또는 CD730010 이외의 모 항체를 이용한 항-CD73 항체**

[0483] 다른 양태들에서, 본 설명에 개시된 항-CD73 항체 또는 항원 결합 단편의 모 항체는 CD730004(즉, 서열 번호 104의 VL 및 서열 번호 103의 VH를 포함하는 항-CD73 항체), CD730008(즉, 서열 번호 106의 VL 및 서열 번호 107의 VH를 포함하는 항-CD73 항체), CD7300011(즉, 서열 번호 5의 VL 및 서열 번호 6의 VH를 포함하는 항-CD73 항체), CD730021(즉, 서열 번호 7의 VL 및 서열 번호 8의 VH를 포함하는 항-CD73 항체), CD730042(즉, 서열 번호 9의 VL 및 서열 번호 10의 VH를 포함하는 항-CD73 항체), CD730046(즉, 서열 번호 11의 VL 및 서열 번호 12의 VH를 포함하는 항-CD73 항체), CD730047(즉, 서열 번호 13의 VL 및 서열 번호 14의 VH를 포함하는 항-CD73 항체), CD730068(즉, 서열 번호 108의 VL 및 서열 번호 107의 VH를 포함하는 항-CD73 항체), 또는 CD730069(즉, 서열 번호 110의 VL 및 서열 번호 109의 VH를 포함하는 항-CD73 항체)이다. 이러한 모 항체들에

대한 개질은 모 항체, 예컨대, CD730004와 비교했을 때, CDR 부위 및/또는 FW 부위에 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0484] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체는 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069의 경쇄의 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 CDR3에 대한 개질을 포함한다.

[0485] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체는 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069의 중쇄의 CDR1 및/또는 CDR2 및/또는 CDR3에 대한 개질을 포함한다.

[0486] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR2를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR3을 포함한다.

[0487] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR2를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR3을 포함한다.

[0488] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR2을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR3을 포함한다.

[0489] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR1을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR2를 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR3를 포함한다.

[0490] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR1; CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR2; 및 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR3을 포함한다.

[0491] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR1; CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR2; 및 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR3를 포함한다.

[0492] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR1; 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR2; 및 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042,

CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL-CDR3를 포함한다.

[0493] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR1; 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR2; 및 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH-CDR3를 포함한다.

[0494] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR1, 및/또는 CDR2, 및/또는 CDR3에 대한 개질을 포함하고, CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 중쇄 및/또는 경쇄의 FW1, 및/또는 FW2, 및/또는 FW3, 및/또는 FW4에 대한 개질을 더 포함한다.

[0495] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD733 항체 또는 이의 항원 결합 단편은, 동일한 또는 하나 이상의 CDR에서 하나, 둘, 셋 또는 네 개의 아미노산 치환을 제외하고 동일한, VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2, 및 VH-CDR3 아미노산 서열들을 포함하는 VL 및 VH를 포함하며, 이때, 그러한 VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2, 및 VH-CDR3은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터 온 것이다.

[0496] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 VL 및 항체 VH를 포함하는데, 이때, 이러한 VL은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL 서열들로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0497] 다른 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 VL 및 항체 VH를 포함하는데, 이때, 이러한 VH는 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH 서열들로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0498] 다른 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VL 서열들로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 서열을 포함하는 VL을 포함하고, CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069로부터의 VH 서열들로부터 선택된 기준 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% 동일한 서열을 포함하는 VH를 더 포함한다.

[0499] 특정 양태들에서, 본 설명에 개시된 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069 항체와 실질적으로 동일하거나 더 우수한 친화도로 CD73과 결합한다.

[0500] **(iv) 혼합 매치형(mixed and matched) 항-CD73 항체**

[0501] 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자들(예컨대, CD730002, CD730004, CD730008, CD730010, CD730011, CD73021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, 또는 CD730069)로부터의 VH 및 VL 서열들 또는 그러한 서열들의 변이체(예컨대, 클론 10 GL9, 클론 10 P32E, 클론 10 C1, 클론 10 C2, 클론 10 D3, 클론 10 G10, 클론 10 HPT, 클론 10 GRVE, 클론 10 콤보1, 클론 10 콤보2, 클론 10 콤보3, 클론 10 콤보5, 또는 클론 콤보6)의 VH 및 VL는 "혼합 매치"되어 기타 항-CD73 결합 분자들을 생성할 수 있다.

[0502] 특정 양태들에서, 10.3 항체 및 2C5 항체의 VH 서열들이 혼합 매치된다. 또 다른 양태에서, 10.03 항체 및 2C5 항체의 VL 서열들이 혼합 매치될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 본 설명에 개시된 클론 10(CD730010) 변이체들의 VL 및/또는 VH 서열들이 혼합 매치될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 본 설명에 개시된 클론 2(CD730002) 변이체들의 VL 및/또는 VH 서열들이 혼합 매치될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 본 설명에 개시된 클론 10(CD730010) 및 클론 2(CD730002) 변이체들의 VL 및/또는 VH 서열들이 혼합 매치될 수 있다.

[0503] 일부 양태들에서, VL 및/또는 VH 혼합 매치는 동일한 에피토프 빈으로 그룹화된 항체들로부터 유래된 서열들 사이에서 발생할 수 있다(실시예 2 참조). 본 설명에 사용된 용어 "에피토프 빈"은 동일한 에피토프 또는 중첩되는 에피토프와 결합하거나, 동일한 에피토프 또는 중첩되는 에피토프와의 결합에 대해 서로 경쟁하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 그룹화를 지칭한다. 예컨대, CD730003, CD730010, CD730021, CD730042, CD730046, 및 CD730047로부터의 서열들로, 그들 전부가 "에피토프 빈 B"에 속하는 항체들이 혼합 매치될 수 있다. 다른 양태들에서, 이러한 VL 및/또는 VH 혼합 매치는 상이한 에피토프 빈으로 그룹화된 항-CD73 항체들로부터 유래된 서열들 사이에서 일어날 수 있다. 따라서, "에피토프 빈 B"에 속하는 항체들로부터의 서열들은 "에피토프 빈 A"(CD730002, CD730004, CD730008, 및 CD730011) 또는 "에피토프 빈 C"(CD730068 및 CD730069)의 항-CD73 항체들로부터의 서열들과 혼합 매치될 수 있다.

[0504] **(v) 돌연변이 항-CD73 항체**

[0505] 특정 양태들에서, 본 설명에 개시된 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 FcRn에 대한 결합을 향상시키고, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 반감기를 향상시키는 돌연변이를 포함한다. 일부 양태들에서, 그러한 돌연변이는 IgG1의 불변 도메인 내로 도입된, 카밧(Kabat, *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.)에서처럼 EU 지수에 따라 넘버링된, 252번 위치에서의 메티오닌(M)으로부터 티로신(Y)으로의 돌연변이, 254번 위치에서의 세린(S)으로부터 트레오닌(T)으로의 돌연변이 및 256번 위치에서의 트레오닌(T)으로부터 글루탐산(E)으로의 돌연변이이다. 본 설명에 참조로 포함된 미국 특허 번호 7,658,921 참조. "YTE 돌연변이체"라고 지칭되는 이러한 유형의 돌연변이체 IgG는 동일한 항체의 야생형 버전과 비교하여 대략 4배 증가된 반감기를 나타내는 것으로 밝혀진 바 있다(Dall'Acqua *et al.*, J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006)). 일부 양태들에서, IgG 불변 도메인을 포함하는 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 카밧에서처럼 EU 지수에 따라 넘버링된 위치 251-257, 285-290, 308-314, 385-389, 및 428-436에 있는 아미노산 잔기들의 하나 이상의 치환을 포함하며, 이때, 그러한 돌연변이는 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 혈청 반감기를 증가시킨다.

[0506] 일부 양태들에서, YTE 돌연변이체는 카밧에서처럼 EU 지수에 따라 넘버링된, IgG 불변 도메인의 434번 위치에서, 트립토판(W), 메티오닌(M), 티로신(Y) 및 세린(S)으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산으로의 치환을 더 포함한다. 다른 양태들에서, YTE 돌연변이체는 카밧에서처럼 EU 지수에 따라 넘버링된, IgG 불변 도메인의 434번 위치에서, 트립토판(W), 메티오닌(M), 티로신(Y) 및 세린(S)으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산으로의 치환 및 카밧에서처럼 EU 지수에 따라 넘버링된, IgG 불변 도메인의 428번 위치에서, 트레오닌(T), 류신(L), 페닐알라닌(F), 및 세린(S)으로 이루어지는 군으로부터 선택된 아미노산으로의 치환을 더 포함한다.

[0507] 또 다른 양태에서, YTE 돌연변이체는 카밧에서처럼 EU 지수에 따라 넘버링된 IgG 불변 도메인의 434번 위치에서 티로신(Y)으로의 치환 및 카밧에서처럼 EU 지수에 따라 넘버링된 IgG 불변 도메인의 257번 위치에서 류신(L)으로의 치환을 더 포함한다. 일부 양태들에서, YTE 돌연변이체는 카밧에서처럼 EU 지수에 따라 넘버링된 IgG 불변 도메인의 434번 위치에서 세린(S)으로의 치환 및 카밧에서처럼 EU 지수에 따라 넘버링된 IgG 불변 도메인의 428번 위치에서 류신(L)으로의 치환을 더 포함한다.

[0508] 구체적인 양태에서, 본 설명에 개시된 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 카밧에서처럼 EU 지수에 따라 넘버링된 IgG1 불변 도메인의 252번 위치에서의 메티오닌(M)에서 티로신(Y)으로의 돌연변이, 254번 위치에서의 세린(S)에서 트레오닌(T)으로의 돌연변이 및 256번 위치에서의 트레오닌(T)에서 글루탐산(E)으로의 돌연변이를 포함하는 IgG1 불변 도메인을 포함한다.

[0509] 특정 양태들에서, 본 설명에 개시된 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은

[0510] (a) 252번 위치에 있는 아미노산의 티로신(Y), 페닐알라닌(F), 트립토판(W), 또는 트레오닌(T)으로의 치환;

[0511] (b) 254번 위치에 있는 아미노산의 트레오닌(T)으로의 치환;

[0512] (c) 256번 위치에 있는 아미노산의 세린(S), 아르기닌(R), 글루타민(Q), 글루탐산(E), 아스파르트산(D), 또는 트레오닌(T)으로의 치환;

[0513] (d) 257번 위치에 있는 아미노산의 류신(L)으로의 치환;

[0514] (e) 309번 위치에 있는 아미노산의 프롤린(P)으로의 치환;

[0515] (f) 311번 위치에 있는 아미노산의 세린(S)으로의 치환;

[0516] (g) 428번 위치에 있는 아미노산의 트레오닌(T), 류신(L), 페닐알라닌(F), 또는 세린(S)으로의 치환;

[0517] (h) 433번 위치에 있는 아미노산의 아르기닌(R), 세린(S), 이소류신(I), 프롤린(P), 또는 글루타민(Q)으로의 치환;

[0518] (i) 434번 위치에 있는 아미노산의 트립토판(W), 메티오닌(M), 세린(S), 히스티딘(H), 페닐알라닌(F), 또는 티로신으로의 치환; 및

[0519] (j) 상기 치환 중 둘 이상의 조합

[0520] 으로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 IgG 불변 도메인 아미노산 치환을 포함하며, 이때, 이러한 위치는 카밧에서처럼 EU 지수에 따라 넘버링되며, 이때, 개질된 IgG는 야생형 IgG 불변 도메인을 가지는 IgG의 혈청 반감기에 비해 증가된 혈청 반감기를 갖는다.

[0521] 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편의 VH 및/또는 VL 아미노산 서열은 위에 기재된 VH 및 VL 서열들에 대해 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 유사할 수 있고, 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 보존적 치환을 포함할 수 있다. 각각 서열 번호 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 111, 113, 114, 115, 116, 또는 117의 VH 부위들 및/또는 서열 번호 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 86, 88, 112, 118, 119, 120, 또는 121의 VL 부위들에 대해 높은(즉, 80% 이상의) 서열 유사성 또는 서열 동일성을 나타내는 VH 및 VL 부위들을 가지는 CD73 항체는 서열 번호 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 또는 121을 암호화하는 핵산 분자들의 돌연변이 유발(예컨대, 부위 특이적 또는 PCR 매개 돌연변이 유발)에 이은, 본 설명에 기술된 기능적 분석법을 이용한, 암호화된 변경된 항체의 보유된 기능에 대한 시험에 의해 얻을 수 있다.

[0522] 일부 양태들에서, 본 설명에 기술된 항-CD73 항체의 Fc 도메인 또는 본 설명에 기술된 항체의 CD73 결합 단편을 포함하는 융합 단백질의 Fc 도메인은 예컨대, ADCC를 통해, 세포독성을 감소시키기 위하여 Fc 수용체에 대해 감소된 결합을 나타낸다. 일부 양태들에서, 이러한 항체 또는 Fc 융합 단백질의 Fc 도메인은 예컨대, ADCC를 통해, 세포독성을 증가시키기 위하여 Fc 수용체에 대해 증가된 결합을 나타낸다. 일부 양태들에서, 이러한 항체 또는 Fc 융합 단백질의 Fc 도메인은 카밧에 기재된 바와 같은 EU 지수에 의해 넘버링된 것에 따라, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245,247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440, 및 443으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 비자연발생적인 ADCC 감소 아미노산 잔기를 포함한다. 항체의 ADCC 활성을 감소시킬 수 있는 다수의 구체적인 돌연변이들이 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 234F, 235E, 235F, 235Q(또는 235Y), 239A, 332Q, 331S 및 이의 조합들을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,624,821, 5,648,260, 7,597,889, 8,961,967, 7,371,826, 7,785,791, 7,790,858, 미국 특허 공개 번호 20140378663, 20130071390, 20110212087, 20150118227, 20060194290, 20060194291, 20080274105, 20080274506, US20130089541, 및 US20130108623(이들은 그 전체가 참조로 본 설명에 포함된다)에 기술된 돌연변이 참조. 감소된 ADCC 이펙터 기능을 나타내는 항체들은 Fc 부위 잔기들 238, 265, 269, 270, 297, 327, 및 329 중 하나 이상의 치환을 가지고 있는 것들도 포함한다(예컨대, 미국 특허 번호 6,737,056 참조). 그러한 Fc 돌연변이체들은 잔기 265 및 297의 알라닌으로의 치환을 가지고 있는 Fc 돌연변이체를 비롯한, 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 둘 이상에서의 치환을 가지고 있는 Fc 돌연변이체들도 포함한다(예컨대, 미국 특허 번호 7,332,581 참조). 선택적으로, ADCC와 CDC 둘 다를 감소시키는 돌연변이들도 도입될 수 있다. 일부 양태들에서, ADCC 및/또는 CDC를 감소시키거나 없애는 돌연변이를 포함하는 본 설명에 개시된 항-CD73 항체들 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 약물 접합체(ADC)를 생성하는 데 이용될 수 있다.

[0523] 일 양태에서, 본 개시는 항-CD73 항체로서, 이때, 이러한 항체는 IgG1, IgG2 또는 IgG3이고, 카밧에 기재된 바와 같이 EU 지수로 넘버링한 것에 따라 234, 235, 및 331로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 개질을 포함하는 것인, 항-CD73 항체를 제공한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 이러한 Fc 부위는 IgG1, IgG2 또는 IgG3 Fc 부위이고, 이러한 비 자연적으로 발생하는 아미노산은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 지

수로 넘버링한 것에 따라 234F, 235E, 235F, 235Q(또는 235Y), 239A, 332Q, 331S, 332Q로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0524] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항-CD73 항체로서, 이러한 항체는 IgG4이고, 카밧에 기재된 바와 같이 EU 지수로 넘버링한 것에 따라 228과 235로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 개질을 포함하는 것인, 항-CD73 항체를 제공한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 이러한 Fc 부위는 IgG4 Fc 부위이고, 이러한 비 자연적으로 발생하는 아미노산은 카밧에 기재된 바와 같이 EU 지수로 넘버링한 것에 따라 228P, 235E 및 235Y로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 구체적인 양태들에서, 본 개시는 항-CD73 항체로서, 이러한 항체는 IgG1, IgG2, 또는 IgG3이고, 위치 (i) 234F, 235E, 및 331S; (ii) 234F, 235F, 및 331S; (iii) 234F, 235Q, 및 322Q에서의 개질을 포함하는 것인, 항-CD73 항체를 제공한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 본 개시는 항-CD73 항체로서, 이러한 항체는 IgG4이고, 개질 228P 및 235E를 포함하는 것인, 항-CD73 항체를 제공한다.

[0525] **III. 에피토프 경쟁 CD73-결합 분자**

[0526] 또 다른 양태에서, 본 개시는 본 설명에 기술된 다양한 항-CD73 항체들이하는 것과 동일한 에피토프에 결합하는 CD73-결합 분자, 예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체와 동일한 에피토프에, 또는 클론 2C5 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 분자들을 제공한다.

[0527] 그러한 항체들은 표준 CD73 결합 분석법(예컨대, 유동 세포분석법, 표면 플라즈몬 공명, 또는 용액 분석법)에서 본 설명에 개시된 항-CD73 항체들, 예컨대, CD730010 항체, CD730002 항체, CD730004 항체 및 이의 항원 결합 단편과 교차 경쟁(예컨대, 통계적으로 유의한 방식으로, 결합을 경쟁적으로 억제)하는 능력을 기초로 하여 확인될 수 있다.

[0528] 따라서, 일 양태에서, 본 개시는 CD73에 대한 결합을 두고 또 다른 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 예컨대, CD730010 항체, CD730002 항체, CD730004 항체, 이의 변이체들(예컨대, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체), 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 항-CD73 항체들 및 이의 항원 결합 단편, 예컨대, 인간 단일클론성 항체들을 제공한다. 예컨대, CD730010 항체(또는 클론 10.3 항체 또는 이의 항원 결합 단편), 또는 CD730002 항체(또는 클론 2C5 항체 또는 이의 항원 결합 단편)의 결합을 억제하는 시험 항체의 능력은 이러한 시험 항체가 CD73에 대한 결합을 두고 그 항체와 경쟁할 수 있음을 보여준다; 그러한 항체는 비 제한적인 이론에 따르면 그것이 경쟁하는 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 CD73 위의 동일하거나 관련된(예컨대, 구조적으로 유사하거나 공간적으로 인접한) 에피토프와 결합할 수 있다. 일 양태에서, 예컨대, CD730010 항체(또는 클론 10.3 항체 또는 이의 항원 결합 단편), 또는 CD730002 항체(또는 클론 2C5 항체 또는 이의 항원 결합 단편)과 CD73 위의 동일한 에피토프에 결합하는 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 단일클론성 항체이다.

[0529] 본 설명에 기술된 바와 같이, CD73의 효소적 활성을 직접적으로 억제하는 단일클론성 항체인 MEDI9447의 에피토프가 확인되어 MEDI9447의 작용 기전을 설명하였다. 이러한 에피토프는 기질 결합 및 활성 자리 잔기들로부터 먼 부위인, CD73의 N 말단 도메인의 정점 표면 내부에 존재한다. 구조적 및 기계론적 연구 결과, MEDI9447은 CD73이 촉매적으로 활성인 입체형태를 채택하는 것을 막는 이중 기전을 통해 CD73에 대해 반대작용을 한다고 밝혀졌다. 이러한 결과는 종양 미세환경에서 아데노신 신호전달을 조절하는 수단으로서, CD73의 선택적, 잠재적 및 비 경쟁적 억제를 위해 표적화할 수 있는 미세하게 매핑된 에피토프에 대한 첫 번째 보고서를 제공한다.

[0530] 수소-중수소 교환(HDX) 질량 분광분석법(MS) 및 돌연변이 유발 전략을 이용하여, 본 발명자들은 MEDI9447의 이러한 에피토프를 정의하고, 전반적인 CD73 구조에 미치는 항체 결합의 잠재적인 영향력을 조사하였다. 이러한 항체는 AMP 가수분해의 비 경쟁적인 억제를 가능하게 하는 CD73의 N 말단 도메인의 한 자리와 결합한다. 다양한 양태들에서, 이러한 에피토프는 V144, K180, 및 N185에 상응하는 하나 이상의 CD73 아미노산 잔기들을 포함한다. 다양한 양태들에서, 이러한 에피토프는 CD73의 Y135, K136, 및 N187에 상응하는 하나 이상의 CD73 아미노산 잔기들을 추가적으로 포함한다. 놀랍게도, 이러한 에피토프는, 항체 결합이 열린 이형태체로부터 촉매적으로 활성인, 닫힌 이형태체로의 CD73의 전환을 방해하도록 위치하고 있다. 나아가, 우리의 연구 결과는 MEDI9447이 CD73과의 항체 상호작용의 결합가에 의해 매개되는 억제의 이중 기전을 통해 고정된 CD73과 가용성 CD73 모두를 억제할 수 있음을 보여준다.

[0531] **IV. 항-CD73 항체의 기능적 특징**

[0532] 항원에 대한 항체의 친화도 또는 결합력은 당해 분야에 잘 알려져 있는 임의의 적절한 방법, 예컨대, 유동 세포분석법, 효소결합 면역흡착 측정법(ELISA) 또는 방사성면역분석법(RIA), 또는 동역학(예컨대, 비아코어(BIACORE

™) 분석)을 이용하여 실험적으로 결정할 수 있다. 직접적인 결합 분석법뿐만 아니라, 경쟁적 결합 분석법 포맷이 용이하게 활용될 수 있다(예를 들어, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992); 및 본 설명에 기술된 방법 참조). 측정된 특정 항체-항원 상호작용의 친화도는 상이한 조건(예컨대, 염 농도, pH, 온도) 하에서 측정되었다면 다를 수 있다. 따라서, 친화도 및 기타 항원 결합 파라미터(예컨대, K_D 또는 Kd, K_{on}, K_{off})의 측정은 당해 분야에 공지된 바와 같이 그리고 본 설명에 기술된 완충액과 같은, 표준화된 항체 및 항원 용액, 그리고 표준화된 완충액을 이용하여 이루어진다.

[0533] 표면 플라즈몬 공명 분석법(예컨대, 비아코어(BIACORE™))를 이용하여 측정된 친화도는 반응물질 중 어떤 것이 칩에 결합되느냐에 따라 달라질 수 있다는 것도 당해 분야에 공지되어 있다. 이 점에 있어서, 표적화 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)가 칩 상에 고정화되는 포맷("IgG 다운(down)" 포맷이라 지칭됨)을 이용하거나, 표적 단백질(예컨대, CD73)이 칩 상에 고정화되는 포맷(예컨대, "CD73 다운" 포맷이라 지칭됨)을 이용하여 친화도를 측정할 수 있다.

[0534] 본 개시의 일 양태에서, 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 10^{-6} M 미만, 또는 10^{-7} M 미만, 또는 10^{-8} M 미만, 또는 10^{-9} M 미만, 또는 10^{-10} M 미만, 또는 10^{-11} M 미만, 또는 10^{-12} M 미만, 또는 10^{-13} M 미만의 해리 상수 또는 k_d(k_{off}/k_{on})로 CD73 및/또는 이의 항원성 단편과 특이적으로 결합한다.

[0535] 또 다른 양태에서, 이러한 항-CD73 항체 (예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 1×10^{-3} s^{-1} 미만, 또는 2×10^{-3} s^{-1} 미만의 K_{off}로 CD73 및/또는 이의 항원성 단편과 결합한다. 다른 양태들에서, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 10^{-3} s^{-1} 미만, 5×10^{-3} s^{-1} 미만, 10^{-4} s^{-1} 미만, 5×10^{-4} s^{-1} 미만, 10^{-5} s^{-1} 미만, 5×10^{-5} s^{-1} 미만, 10^{-6} s^{-1} 미만, 5×10^{-6} s^{-1} 미만, 미만 5×10^{-7} s^{-1} 미만, 10^{-8} s^{-1} 미만, 5×10^{-8} s^{-1} 미만, 10^{-9} s^{-1} 미만, 5×10^{-9} s^{-1} 미만, 또는 10^{-10} s^{-1} 미만의 K_{off}로 CD73 및/또는 이의 항원성 단편과 결합한다.

[0536] 또 다른 양태에서, 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 적어도 10^{5} M^{-1} s^{-1}, 적어도 5×10^{5} M^{-1} s^{-1}, 적어도 10^{6} M^{-1} s^{-1}, 적어도 5×10^{6} M^{-1} s^{-1}, 적어도 10^{7} M^{-1} s^{-1}, 적어도 5×10^{7} M^{-1} s^{-1}, 또는 적어도 10^{8} M^{-1} s^{-1}, 또는 적어도 10^{9} M^{-1} s^{-1}의 결합 속도 상수 또는 k_{on} 속도로 CD73 및/또는 이의 항원성 단편과 결합한다.

[0537] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 유동 세포분석법으로 측정한 바에 따르면, 적어도 약 60 pM, 적어도 약 70 pM, 적어도 약 80 pM, 적어도 약 90 pM, 적어도 약 100 pM, 적어도 약 110 pM, 적어도 약 120 pM, 적어도 약 130 pM, 적어도 약 140 pM, 적어도 약 150 pM, 적어도 약 160 pM, 또는 적어도 약 170 pm의 K_D로 MB-MDA-231 세포 표면의 CD73과 결합한다. 한 가지 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 10.3 항체이고, 그것은 유동 세포분석법으로 측정한 바에 따르면 약 150 pM의 K_D로 MB-MDA-231 세포 표면의 CD73과 결합한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 2C5 항체이고, 그것은 유동 세포분석법으로 측정한 바에 따르면 약 80 pM의 K_D로 MB-MDA-231 세포 표면의 CD73과 결합한다.

[0538] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 유동 세포분석법으로 측정한 바에 따르면 적어도 약 40 pM, 적어도 약 50 pM, 적어도 약 60 pM, 적어도 약 70 pM, 적어도 약 80 pM, 적어도 약 90 pM, 적어도 약 100 pM, 적어도 약 120 pM, 또는 적어도 약 130 pM의 K_D로 뮤린 3T1 세포 표면의 CD73과 결합한다. 한 가지 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 10.3 항체이고, 그것은 유동 세포분석법으로 측정한 바에 따르면 약 110 pM의 K_D로 뮤린 3T1 세포 표면의 CD73과 결합한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 2C5 항체이고, 그것은 유동 세포분석법으로 측정한 바에 따르면 약 55 pM의 K_D로 뮤린 3T1 세포 표면의 CD73과 결합한다.

[0539] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의

항원 결합 단편은 유동 세포분석법으로 측정한 바에 따르면 적어도 약 40 pM, 적어도 약 50 pM, 적어도 약 60 pM, 적어도 약 70 pM, 적어도 약 80 pM, 적어도 약 90 pM, 또는 적어도 약 100 pM의 K_D로 시노몰구스 MK-1 세포 표면의 CD73과 결합한다. 한 가지 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 10.3 항체이고, 그것은 유동 세포분석법으로 측정한 바에 따르면 약 80 pM의 K_D로 시노몰구스 MK-1 세포 표면의 CD73과 결합한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 2C5 항체이고, 그것은 유동 세포분석법으로 측정한 바에 따르면 약 60 pM의 K_D로 시노몰구스 MK-1 세포 표면의 CD73과 결합한다.

[0540] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 표면 플라즈몬 공명(프로테온(Proteon®))으로 측정한 바에 따르면, 적어도 약 3 pM, 적어도 약 4 pM, 적어도 약 5 pM, 적어도 약 6 pM, 적어도 약 7 pM, 적어도 약 8 pM, 적어도 약 9 pM, 또는 적어도 약 10 pM의 K_D로 인간 CD73과 결합한다. 한 가지 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 10.3 항체이고, 그것은 표면 플라즈몬 공명(프로테온)으로 측정한 바에 따르면 약 4 pM의 K_D로 인간 CD73과 결합한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 2C5 항체이고, 그것은 표면 플라즈몬 공명(프로테온)으로 측정한 바에 따르면 약 9 pM의 K_D로 인간 CD73과 결합한다.

[0541] 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 표면 플라즈몬 공명(프로테온)으로 측정한 바에 따르면 적어도 약 1 pM, 적어도 약 2 pM, 적어도 약 3 pM, 적어도 약 4 pM, 적어도 약 5 pM, 적어도 약 6 pM, 적어도 약 7 pM, 적어도 약 8 pM, 적어도 약 9 pM, 적어도 약 10 pM, 적어도 약 11 pM, 적어도 약 12 pM, 적어도 약 13 pM, 적어도 약 14 pM, 적어도 약 15 pM, 적어도 약 16 pM, 적어도 약 17 pM, 적어도 약 18 pM, 적어도 약 19 pM, 적어도 약 20 pM, 적어도 약 21 pM, 적어도 약 22 pM, 적어도 약 23 pM, 적어도 약 24 pM, 또는 적어도 약 25 pM의 K_D로 뮤린 CD73과 결합한다. 한 가지 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 10.3 항체이고, 그것은 표면 플라즈몬 공명(프로테온)으로 측정한 바에 따르면 약 1 pM의 K_D로 뮤린 CD73과 결합한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 2C5 항체이고, 그것은 표면 플라즈몬 공명(프로테온)으로 측정한 바에 따르면 약 22 pM의 K_D로 뮤린 CD73과 결합한다.

[0542] 일부 양태들에서, 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 표면 플라즈몬 공명(프로테온)으로 측정한 바에 따르면 적어도 약 3 pM, 적어도 약 4 pM, 적어도 약 5 pM, 적어도 약 6 pM, 적어도 약 7 pM, 적어도 약 8 pM, 적어도 약 9 pM, 또는 적어도 약 10 pM의 K_D로 시노몰구스 CD73과 결합한다. 한 가지 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 10.3 항체이고, 그것은 SPR(프로테온)로 측정한 바에 따르면 약 7 pM의 K_D로 시노몰구스 CD73과 결합한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 2C5 항체이고, 그것은 표면 플라즈몬 공명(프로테온)으로 측정한 바에 따르면 약 9 pM의 K_D로 시노몰구스 CD73과 결합한다.

[0543] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 용액 결합으로 측정한 바에 따르면 적어도 약 40 pM, 적어도 약 50 pM, 적어도 약 60 pM, 적어도 약 70 pM, 적어도 약 80 pM, 적어도 약 90 pM, 적어도 약 100 pM, 또는 적어도 약 110 pM의 K_D로 인간 CD73과 결합한다. 한 가지 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 10.3 항체이고, 그것은 용액 결합으로 측정한 바에 따르면 약 80 pM의 K_D로 인간 CD73과 결합한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 2C5 항체이고, 그것은 용액 결합으로 측정한 바에 따르면 약 80 pM의 K_D로 인간 CD73과 결합한다.

[0544] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 (예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 용액 결합으로 측정한 바에 따르면 적어도 약 100 pM, 적어도 약 200 pM, 적어도 약 300 pM, 적어도 약 400 pM, 적어도 약 500 pM, 적어도 약 600 pM, 적어도 약 700 pM, 적어도 약 800 pM, 적어도 약 900 pM, 적어도 약 1000 pM, 적어도 약 1100 pM, 적어도 약 1200 pM, 적어도 약 1300 pM, 적어도 약 1400 pM, 적어도 약 1500 pM, 적어도 약 1600 pM, 적어도 약, 또는 적어도 약 1700 pM의 K_D로 뮤린 CD73과 결합한다. 한 가지 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 10.3 항체이고, 그것은 용액 결합으로 측정한 바에 따르면 약 130 pM의 K_D로 뮤린 CD73과 결합한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 2C5 항체이고, 그것은 용액 결합으로 측정한 바에 따르면 약 1500 pM의 K_D로 뮤린 CD73과 결합한다.

[0545] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 용액 결합으로 측정한 바에 따르면 적어도 약 60 pM, 적어도 약 70 pM, 적어도 약 80 pM, 적어도 약 90 pM, 적어도 약 100 pM, 적어도 약 110 pM, 또는 적어도 약 120 pM의 K_D로 시노몰구스 CD73과 결합한다. 한 가지 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 10.3 항체이고, 그것은 용액 결합으로 측정한 바에 따르면 약 90 pM의 K_D로 시노몰구스 CD73과 결합한다. 또 다른 구체적인 양태에서, 이러한 항-CD73 항체는 클론 2C5 항체이고, 그것은 용액 결합으로 측정한 바에 따르면 약 100 pM의 K_D로 시노몰구스 CD73과 결합한다. 특정 양태에서, MEDI9447은 약 1×10^{-12}, 5×10^{-12}, 10×10^{-12}, 100×10^{-12}, 또는 150×10^{-12}의 K_D로 CD73과 결합한다.

[0546] 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자, 예컨대, 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 T 세포 분열의 AMP 매개성 저해를 완화할 수 있다. 다른 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자, 예컨대, 항-CD73 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 T_{reg}에 의한 ATP 유도성 T_{eff} 저해를 모면하게 할 수 있다.

[0547] 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자, 예컨대, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)은 동계 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있다. 일 양태에서, 이러한 종양은 비소세포 폐종양, 난소 종양, 유방 종양, 두경부 종양, 췌장 종양, 결장직장암 종양, 흑색종 종양, 림프종 종양이다. 일 양태에서, 이러한 종양은 CT26 마우스 동계 CRC 종양, B16F10 흑색종 종양, EG7-OVA 림프종 종양, 또는 LL2(루이스 폐) 종양이다. 일부 양태들에서, CD73-결합 분자, 예컨대, 본 설명에 개시된 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)은 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있는데, 이때, 이러한 종양은 항-PD-1 및/또는 항-PD-L1 및/또는 항-PD-L2 및/또는 항-CTLA-4 항체를 이용한 치료법에 반응이 없다. 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자, 예컨대, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)은 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg.PD1의 농도로 투여될 때 종양 성장을 유의하게 억제할 수 있다.

[0548] 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자, 예컨대, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)은 세포와 결합한 후에 내재화될 수 있다. 일부 양태들에서, 이러한 CD73-결합 분자는 항체 약물 접합체(ADC)이다.

[0549] **V. 항-CD73 항체 및 항원 결합 단편의 제조**

[0550] 단일클론성 항-CD73 항체들(예컨대, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 및 이의 항원 결합 단편은 Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495에 기재된 것들과 같은 하이브리도마 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 이러한 하이브리도마 방법을 이용하여 마우스, 햄스터 또는 기타 적절한 숙주 동물을 위에 기술된 바와 같이 면역화시켜 면역화 항원에 특이적으로 결합할 항체의 림프구에 의한 생성을 유발한다. 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수도 있다. 면역화 후, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 림프구를 단리하고 적합한 골수종 세포주와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한 후, 이 하이브리도마 세포를 비 융합된 림프구 및 골수종 세포로부터 선별할 수 있다. 그 다음, 면역침전, 면역블롯팅 또는 시험관 내 결합 분석법(예를 들면, 방사성면역분석법(RIA); 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA))으로 결정된 바에 따라, 선택된 항원에 대해 특이적으로 유도된 단일클론성 항체를 생성하는 하이브리도마를, 표준 방법(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986)을 이용하여 시험관 내 배양물에서 증식시킬 수 있거나 동물에서 복수 종양으로서 생체 내에서 증식시킬 수 있다. 그 후, 위에서 다클론성 항체에 대해 기술된 바와 같이 배양 배지 또는 복수액으로부터 이러한 단일클론성 항체를 정제할 수 있다.

[0551] 대안적으로 항-CD73 단일클론성 항체(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 및 이의 항원 결합 단편은 예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567에 기술된 바와 같은 재조합 DNA 방법을 이용하여 제조될 수도 있다. 단일클론성 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 예컨대, 이러한 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자를 특이적으로 증폭시키는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 이용한 RT-PCR에 의해 성숙한 B 세포 또는 하이브리도마 세포로부터 단리되고, 그의 서열은 통상적인 절차를 이용하여 결정된다. 그 다음, 이러한 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 이러한 단리된 폴리뉴클레오티드는, 숙주 세포, 예컨대, 대장균 세포, 유인원 COS 세포, 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 면역 글로불린 단백질을 달리 생성하지 않는 골수종 세포 내로 형질감염될 때

이러한 숙주 세포를 통해 단일클론성 항체가 생성되는, 적합한 발현 벡터 내로 클로닝된다. 또한, 원하는 종의 재조합 항-CD73 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 기술된 바와 같이 원하는 종의 CDR들을 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리될 수 있다(McCafferty *et al.*, 1990, Nature, 348:552-554; Clarkson *et al.*, 1991, Nature, 352:624-628; 및 Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

[0552] 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 이러한 폴리뉴클레오티드(들)은 재조합 DNA 기술을 이용하여 다수의 상이한 방식으로 더 개질되어 대안적인 항체들을 생성할 수 있다. 일부 양태들에서, 예를 들면, 마우스 단일클론성 항체의 경쇄 및 중쇄의 불변 도메인들은 (1) 키메라 항체를 생성하기 위해 예를 들면, 인간 항체의 이들 부위들 대신에 치환될 수 있거나, (2) 융합 항체를 생성하기 위해 비 면역 글로불린 폴리펩타이드 대신에 치환될 수 있다. 일부 양태들에서, 이러한 불변 부위들은 단일클론성 항체의 원하는 항체 단편을 생성하기 위해 절두되거나 제거된다. 가변 부위의 위치 특이적 또는 고밀도 돌연변이 유발이 단일클론성 항체의 특이성, 친화도 등을 최적화하는 데 이용될 수 있다.

[0553] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 인간 항체는 당해 분야에 공지된 다양한 기법들을 이용하여 직접적으로 제조될 수 있다. 표적 항원에 대해 유도된 항체를 생성하는, 시험관 내에서 면역화되었거나 면역화된 개체로부터 단리된 불멸화된 인간 B 림프구가 생성될 수 있다(예컨대, Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer *et al.*, 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; 및 미국 특허 5,750,373 참조).

[0554] 또한, 이러한 항-CD73 인간 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들어, Vaughan *et al.*, 1996, Nat. Biotech., 14:309-314, Sheets *et al.*, 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162, Hoogenboom 및 Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381, 및 Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222:581에 기술된 바와 같이, 파지 라이브러리로부터 선별될 수 있고, 여기서 그러한 파지 라이브러리가 인간 항체를 발현한다. 항체 파지 라이브러리의 생성 및 이용을 위한 기법 또한 미국 특허 번호 5,969,108, 6,172,197, 5,885,793, 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; 및 7,264,963; 그리고 Rothe *et al.*, 2007, J. Mol. Bio., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018(이들 각각은 전체가 참조로 포함된다)에 기술되어 있다.

[0555] 친화도 성숙 전략 및 체인 셔플링 전략(그 전체가 참조로 도입된 Marks *et al.*, 1992, Bio/Technology 10:779-783)이 당해 분야에 공지되어 있으며, 고친화도 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하기 위하여 이용될 수 있다.

[0556] 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 단일클론성 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)는 인간화 항체일 수 있다. 비 인간 또는 인간 항체를 조작하거나, 인간화하거나 재표면화하는(resurfacing) 방법도 이용될 수 있고, 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 인간화, 재표면화 또는 유사하게 조작된 항체는 비 인간, 예를 들면, 마우스, 랫트, 토끼, 비 인간 영장류 또는 기타 포유동물(그러나 이에 한정되지 않음)인 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이들 비 인간 아미노산 잔기는 전형적으로, 공지된 인간 서열의 "이입(import)" 가변, 불변 또는 기타 도메인으로부터 취한 "이입" 잔기라 종종 지칭되는 잔기들로 교체된다. 이러한 이입된 서열들은 당해 분야에 공지되어 있는 바와 같이 면역원성을 감소시키거나, 결합, 친화성, 결합 속도, 해리 속도, 결합력, 특이성, 반감기 또는 임의의 기타 적합한 특성을 감소시키거나, 향상시키거나 변경시키기 위하여 이용될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기들은 CD73 결합에 영향을 미치는 데에 직접적으로 그리고 가장 실질적으로 관여한다. 따라서, 비 인간 또는 인간 CDR 서열의 일부 또는 전부는 유지되는 반면, 가변 및 불변 부위의 비 인간 서열은 인간 또는 기타 아미노산으로 교체될 수 있다.

[0557] 또한, 항체는 CD73 항원에 대한 높은 친화도 및 기타 유리한 생물학적 성질을 보유하도록 선택적으로 인간화, 재표면화, 조작 또는 인간 항체 조작될 수 있다. 이 목표를 달성하기 위해, 인간화(또는 인간) 또는 조작된 항-CD73 항체 및 재표면화 항체는 모 서열, 조작된 서열 및 인간화 서열의 3차원적 모델을 이용하여 모 서열 및 다양한 개념적인 인간화 및 조작된 생성물들을 분석하는 과정에 의해 선택적으로 제조될 수 있다. 3차원적 면역글로불린 모델이 흔히 이용될 수 있고, 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역 글로불린 서열의 가능한 3차원적 입체형상적 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 이들 디스플레이의 검사는 후보 면역 글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 면역 글로불린이 그의 항원, 예컨대, CD73에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, 기본틀(FW) 잔기가 원하는 항체 특성, 예컨대, 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 달성되도록 공통 서열 및 이입 서열들로

부터 선택되어 조합될 수 있다.

[0558] 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편의 인간화, 재표면화 또는 조작은 임의의 공지된 방법, 예컨대, Jones *et al.*, Nature 321:522 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534 (1988)), Sims *et al.*, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993), 미국 특허 번호 5,639,641, 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 5,9,55,358; 6,204,023; 6,180,370; 6,331,431; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; 4,816,567; 5,969,108; 7,635,666; 7,723,270; 7,557,189; 7,538,195; 및 7,342,110; 국제 출원 번호 PCT/US98/16280; PCT/US91/05939; PCT/US94/01234; PCT/GB92/01755; 국제 특허 출원 공개 번호 WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; 및 유럽 특허 공개 번호 EP 229246(이들 각각은 전체적으로 본 설명에 참조로 포함된다)(이들에 인용된 참고문헌을 포함)에 기술된 방법들(그러나 이에 한정되지 않음)을 이용하여 이루어질 수 있다.

[0559] 항-CD73 인간화 항체 및 이의 항원 결합 단편은 내인성 면역 글로불린 생성 부재 하에서 면역조치 시 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있는 인간 면역 글로불린좌를 함유하는 형질전환 마우스에서도 제조될 수 있다. 이 접근법은 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016에 기술되어 있다.

[0560] 특정 양태들에서 항-CD73 항체 단편(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체로부터의 단편)이 제공된다. 항체 단편 생성을 위한 다양한 기법들이 공지되어 있다. 전통적으로, 이들 단편은 온전한 항체의 단백질 용해성 분해를 통해 유래된다(예를 들면, Morimoto *et al.*, 1993, Journal of Biochemical 및 Biophysical Methods 24:107-117; Brennan *et al.*, 1985, Science, 229:81). 특정 양태들에서, 항- CD73 항체 단편은 재조합적으로 생성된다. Fab, Fv 및 scFv 항체 단편은 모두 대장균 또는 기타 숙주 세포에서 발현될 수 있고, 대장균 또는 기타 숙주 세포로부터 분비될 수 있으므로, 다량의 이들 단편의 생성을 가능하게 한다. 이러한 항-CD73 항체 단편은 위에서 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수도 있다. 이러한 항-CD73 항체 단편은 미국 특허 번호 5,641,870에 기재된 바와 같이 선형 항체일 수도 있다. 항체 단편의 기타 제조 기법, 예컨대, 화학적 합성법은 당업자에게 자명할 것이다.

[0561] 본 개시에 따르면, CD73에 특이적인 단일 쇄 항체의 생산 기법이 채택될 수 있다(예컨대, 미국 특허 번호 4,946,778 참조). 또한, CD73에 대한 원하는 특이성을 가진 단일클론성 Fab 단편, 또는 이의 유도체, 단편, 유사체 또는 상동체의 신속하고 효과적인 확인을 가능하게 하기 위해 Fab 발현 라이브러리(예를 들면, Huse *et al.*, Science 246:1275-1281 (1989) 참조)를 구축하는 방법이 채택될 수 있다. (a) 항체 분자의 펩신 소화에 의해 생성된 F(ab')2 단편; (b) F(ab')2 단편의 이황화 가교의 환원에 의해 생성된 Fab 단편, (c) 항체 분자의 파파인 및 환원제 처리에 의해 생성된 Fab 단편 및 (d) Fv 단편을 포함하나 이에 한정되지 않는 항체 단편들이 당해 분야의 기법에 의해 생성될 수 있다.

[0562] 본 설명에 개시된 항-CD733 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 그것의 혈청 반감기를 증가시키기 위하여 개질될 수 있다. 이것은 예를 들면, 항체 또는 항체 단편의 적절한 부위의 돌연변이로 살비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 또는 항체 단편 내로 도입하거나, (예를 들면, DNA 또는 펩타이드 합성으로) 어느 한 말단 또는 중간에서 항체 또는 항체 단편에 융합되는 펩타이드 태그 내로 에피토프를 도입함으로써, 또는 YTE 돌연변이에 의해 달성될 수 있다. 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 혈청 반감기를 증가시키는 기타 방법, 예를 들면, 이종 분자, 예컨대, PEG와의 접합이 당해 분야에 공지되어 있다.

[0563] 이종 접합체 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 및 이의 항원 결합 단편 또한 본 개시의 범위 내에 있다. 이종 접합체 항체는 두 개의 공유적으로 결합된 항체들로 구성된다. 그러한 항체들은 예를 들어, 면역 세포를 원치 않는 세포들로 표적화하도록 제안된 바 있다(예컨대, 미국 특허 번호 4,676,980 참조). 이종 접합체 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 및 이의 항원 결합 단편은 가교제를 수반하는 방법들을 포함하는 합성 단백질 화학에서 공지된 방법을 이용하여 시험관 내에서 제조할 수 있다는 점이 고려된다. 예를 들어, 면역 독소는 이황화물 교환 반응을 이용하여 또는 티오에테르 결합을 형성함으로써 구축될 수 있다. 이러한 목적을 위한 적절한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부티르이미데이트를 포함한다.

[0564] 특정 양태들에서, 본 설명에 개시된 이러한 CD73-결합 분자, 예컨대, 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 기타 치료제와 조합될 수 있거나(예컨대, 병용 요법으로), 그것들은

적어도 하나의 이종 기원의 모이어티에 융합(예컨대, 융합 단백질을 형성하기 위하여 유전적으로 융합)될 수 있거나 접합(예컨대, 화학적으로 또는 효소적으로 접합)될 수 있다. 따라서, 본 설명에 개시된 이러한 CD73-결합 분자는 그것들은 기타 치료제 또는 독소와 융합되거나 접합되어 면역 접합체 및/또는 융합 단백질을 형성할 수 있다. 본 개시는 유도체화되었거나 또 다른 분자(예컨대, 펩타이드, 작은 약물 분자, 검출 가능한 분자 등)에 (예컨대, 화학적으로 또는 재조합적으로) 연결된, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자들 중 적어도 하나를 포함하는 항체-약물 접합체도 제공한다. 일반적으로, 항-CD73 항체 또는 이의 부분은 그것들의 CD73 결합이 유도체화 또는 표지 부착에 의해 부정적으로 영향을 받지 않도록 유도체화된다. 따라서, 본 개시의 항-CD73 항체 및 항체 부분은 본 설명에 기술된 항-CD73 결합 분자의 온전한 형태 및 개질된 형태 둘 다를 포함하고자 한 것이다. 예를 들면, 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자 또는 이의 Cd73 결합 부분은 (화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유적 결합 또는 다른 방식에 의해) 하나 이상의 기타 분자 물질, 예컨대, 세포독성제, 약제, 검출제, 및/또는 항-CD73 결합 분자와 또 다른 분자(예컨대, 스트렙타비딘 코어 부위 또는 폴리히스티딘 태그)의 결합을 매개할 수 있는 단백질 또는 펩타이드에 기능적으로 연결될 수 있다.

[0565] 유도체화된 분자의 한 가지 유형은 2가지 이상의 분자 물질, 예컨대, 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자와 치료제(예컨대, 튜불라이신 또는 MEDI1508과 같은 세포독소)를 가교 결합시켜 생성할 수 있다. 적절한 가교 결합제로는 이종이기능성(heterobifunctional), 즉 적절한 스페이서에 의해 분리된 2개의 상이한 반응성 기들을 가진 가교 결합제(예를 들면, m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이미드 에스테르); 또는 동종이기능성(homobifunctional)을 가진 가교 결합제(예를 들면, 디석신이미딜 수버레이트)를 포함한다. 이러한 가교 결합제는 예를 들면, 피어스 케미칼 컴퍼니(Pierce Chemical Company, 미국 일리노이주 록포드)로부터 입수할 수 있다. 추가적인 이기능성 커플링제로는 N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트(SPDP), 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트, 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이기능성 유도체(예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르(예컨대, 디석신이미딜 수버레이트), 알데하이드(예컨대, 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물(예컨대, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예컨대, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물(예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 포함한다.

[0566] 유도체화된 분자의 또 다른 유형은 검출 가능한 표지를 도입함으로써 생성할 수 있다. 유용한 검출제로는 형광 화합물(예를 들면, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 5-디메틸아민-1-나프탈렌설포닐 클로라이드, 파이코에리쓰린, 란타나이드 인광체 등), 검출에 유용한 효소(예를 들면, 호스래디쉬 퍼록시다제, β-갈락토시다제, 루시퍼라제, 알칼리성 포스파타제, 글루코스 옥시다제 등), 이차 레포터에 의해 인식되는 에피토프(예를 들면, 류신 지퍼 쌍 서열, 이차 항체에 대한 결합 자리, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그 등)를 포함한다. 일부 양태들에서, 검출 가능한 표지는 적어도 하나의 스페이서 암(arm)에 의해 부착될 수 있다. 스페이서 암은 잠재적인 입체 장해를 감소시키기 위해 다양한 길이를 가질 수 있다.

[0567] 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자는 방사성 표지된 아미노산으로 표지될 수도 있다. 방사성 표지는 진단 목적 및 치료 목적 둘 다를 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 방사성 표지는 X선 또는 기타 진단 기법, 예컨대, 양전자 방출 단층촬영(PET)으로 CD73 발현 세포를 검출하는 데에 사용할 수 있다.

[0568] 나아가, 이러한 방사성 표지는 CD73 발현 세포, 예컨대, 원치 않는 면역 반응을 야기하는 CD73 발현 세포에 대한 독소로서 치료적으로 사용될 수 있다. 폴리펩타이드를 위한 표지의 예로는 다음의 방사성 동위원소 또는 방사성 핵종을 포함하나 이에 한정되지 않는다: ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I 및 ^{131}I. 일부 양태들에서, 항-CD73 결합 분자는 영상화 시 검출 가능한 상자성, 방사성 또는 형광원성 이온으로 표지될 수 있다. 일부 양태들에서, 이러한 상자성 이온은 크로뮴(III), 망간(II), 철(III), 철(II), 코발트(II), 니켈(II), 구리(II), 네오디뮴(III), 사마륨(III), 이테르븀(III), 가돌리늄(III), 바나듐(II), 테르븀(III), 디스프로슘(III), 홀뮴(III) 또는 에르븀(III)이다. 다른 양태들에서, 이러한 방사성 이온은 요오드-123, 테크네튬-99, 인듐-111, 레늄-188, 레늄-186, 구리-67, 요오드-131, 이트륨-90, 요오드-125, 아스타틴-211 및 갈륨-67이다. 다른 양태들에서, 항-CD73 결합 분자는 X선 조영제, 예컨대, 란타늄(III), 금(III), 납(II) 및 비스무쓰(III)로 표지된다. 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자는 화학적 기, 예를 들면, 중합체, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 메틸 기, 에틸 기 또는 탄수화물 기로 유도체화될 수도 있다. 이들 기들은 항체의 생물학적 특성을 개선하는 데, 예를 들면, 혈청 반감기를 증가시키거나 조직 결합을 증가시키는 데에 유용하다.

[0569] 본 설명에 사용된 용어 "세포독성제"는 광범위하게 정의되고, 세포의 기능을 억제하거나 방해하고/하거나, 세포의 파괴(세포 사멸)를 야기하고/하거나, 항-신생물/항-증식 효과를 발휘하는 물질을 지칭한다. 예를 들면, 세포

독성제는 신생물성 종양 세포의 발생, 성숙 또는 확산을 직접적으로 또는 간접적으로 방해할 수 있다. 이러한 용어는 단순한 세포독성 효과가 아니라 세포증식억제 효과만을 야기하는 이러한 작용제도 포함한다. 이러한 용어는 아래에 명시된 화학요법제들뿐만 아니라 기타 CD73 길항제, 항-혈관신생제, 티로신 키나제 억제제, 단백질 키나제 A 억제제, 사이토카인 패밀리의 구성원, 방사성 동위원소 및 독소, 예컨대, 세균, 진균, 식물 또는 동물 유래의 효소 활성 독소도 포함한다.

[0570] 용어 "화학요법제"는 천연 또는 합성 화학적 화합물을 포함하는 용어 "세포독성제"의 하위 세트이다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예를 들면, 질소 머스타드, 에틸렌이민 화합물, 알킬 설포네이트 및 알킬화 작용을 가진 기타 화합물, 예컨대, 니트로소우레아, 시스플라틴 및 다카바진; 항대사물질, 예를 들면, 엽산, 퓨린 또는 피리미딘 길항제; 유사분열 억제제, 예를 들면, 빈카 알칼로이드 및 포도필로톡신의 유도체; 세포독성 항생제 및 캄토테신 유도체를 포함한다. 다른 화학요법제는 아미포스틴(에티올(ETHYOL)®), 시스플라틴, 다카바진 (DTIC), 닥티노마이신, 메클로레타민(질소 머스타드), 스트렙토조신, 사이클로포스프아미드, 카무스틴(carmustine)(BCNU), 로무스틴(CCNU), 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)®), 독소루비신 리포(독실(DOXIL)®), 겜시타빈 (겜자르(GEMZAR)®), 다우노루비신, 다우노루비신 리포(다우녹솜(DAUNOXOME)®), 프로카바진, 미토마이신, 시타라빈, 에토포사이드, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실(5-FU), 빈블라스틴, 빈크리스틴, 블레오마이신, 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)®), 도세탁셀(탁소테레(TAXOTERE)®), 알데스류킨, 아스파라기나제, 부설판, 카보플라틴, 클라드리빈, 캄토테신, CPT-11, 10-하이드록시-7-에틸-캄토테신(SN38), 제피티닙(이레사(IRESSA)®), 다카바진, 플록수리딘, 플루다라빈, 하이드록시우레아, 이포스프아미드, 이다루비신, 메스나, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 이리노테칸, 미톡산트론, 토포테칸, 류프롤라이드, 메게스트롤, 멜팔란, 머캡토퓨린, 플리카마이신, 미토탄, 페가스파르가제, 펜토스타틴, 피포브로만, 플리카마이신, 스트렙토조신, 타목시펜, 테니포사이드, 테스토락톤, 티오구아닌, 티오테파, 우라실 머스타드, 비노렐빈, 클로람부실 아로마타제 억제제, 및 이들의 조합이다.

[0571] 본 개시의 목적을 위해, 개질된 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 이러한 항체 또는 폴리펩타이드의 CD73과의 결합을 제공하는 임의의 유형의 가변 부위를 포함할 수 있음을 인식해야 한다. 이 점에 있어서, 이러한 가변 부위는 체액 반응을 시작하고 원하는 종양 관련 항원에 대한 면역 글로불린을 생성하도록 유도될 수 있는 임의의 유형의 포유동물을 포함하거나 이러한 포유동물로부터 유래될 수 있다. 따라서, 개질된 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 이러한 가변 부위는 예를 들어, 인간, 뮤린, 비 인간 영장류(예컨대, 시노몰구스 원숭이, 마카크 등) 또는 이리 기원의 것일 수 있다. 일부 양태들에서, 개질된 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 가변 부위와 불변 부위 모두는 인간이다. 다른 양태들에서, (보통 비 인간 공급원으로부터 유래된) 적합한 항체의 이러한 가변 부위는 조작되거나 특이적으로 맞추어져 결합 특성을 개선하거나 이러한 분자의 면역원성을 감소시킬 수 있다. 이와 관련하여, 가변 부위는 인간화되거나 그렇지 않으면 이입된 아미노산 서열의 포함을 통해 변경될 수 있다.

[0572] 특정 양태들에서, 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 및 경쇄 둘 다의 가변 도메인들은 하나 이상의 CDR들의 적어도 부분적인 교체 및 필요한 경우, 부분적인 기본틀 부위 교체 및 서열 바꿈에 의해 변경된다. 이러한 CDR들이 기본틀 부위가 유래되는 항체와 동일한 부류의 항체 또는 심지어 이러한 항체의 하위 부류로부터 유래될 수 있지만, 이러한 CDR들은 상이한 부류로부터, 그리고 특정 양태들에서는 상이한 종의 항체로부터 유래될 것임이 예상된다. 모든 CDR을 공여자 가변 부위로부터의 완전 CDR로 대체하여 하나의 가변 도메인의 항원 결합 능력을 또 다른 가변 도메인으로 옮기는 것은 필수적이지 않다. 오히려, 항원 결합 자리의 활성을 유지하기 위해 필요한 이들 잔기를 옮기는 것만 필수적이다. 미국 특허 번호 5,585,089, 5,693,761 및 5,693,762에 기재된 설명을 고려하면, 면역원성이 감소된 기능성 항체를 수득하는 것은 통상적인 실험 수행 또는 시행 착오 시험에 의해 당업자의 능력 범위 내에 해당할 것이다.

[0573] 가변 부위에 대한 변경에도 불구하고, 당업자는 이러한 개질된 항-CD73 항체(예를 들어, 개질된 클론 10.3 항체 또는 개질된 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편이, 불변 부위 도메인들 중 하나 이상의 적어도 일부분이 결실되었거나 그렇지 않으면 변경되어 원했던 생화학적 특성, 예컨대, 천연의 또는 변경되지 않은 불변 부위를 포함하는 대략 동일한 면역원성의 항체에 비해 증가된 종양 편재화 또는 감소된 혈청 반감기를 제공하는 항체(예컨대, 전체 길이 항체 또는 이의 면역 반응성 단편)를 포함할 것임을 인식할 것이다. 일부 양태들에서, 개질된 항체의 이러한 불변 부위는 인간 불변 부위를 포함할 것이다. 이러한 본 설명에 개시된 항-CD73 분자들과 양립할 수 있는 이러한 불변 부위에 대한 개질은 하나 이상의 도메인에서의 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환을 포함한다. 즉, 본 설명에 개시된 이러한 개질된 항체는 3종의 중쇄 불변 도메인(CH1, CH2 또는 CH3) 중 하나 이상 및/또는 경쇄 불변 도메인(CL)에 대한 변경 또는 개질을 포함할 수 있다. 일부 양태들에서,

하나 이상의 도메인이 부분적으로 또는 전체적으로 결실된 개질된 불변 부위가 고려된다. 일부 양태들에서, 이러한 개질된 항체는 전체 CH2 도메인이 제거된 도메인 결실 구축물 또는 변이체 (ΔCH2 구축물)를 포함할 것이다. 일부 양태들에서, 생략된 불변 부위 도메인은 부재한 불변 부위에 의해 통상 제공되는 분자 가요성의 일부를 제공하는 짧은 아미노산 스페이서(예를 들어, 10개의 잔기)에 의해 대체될 것이다.

[0574] 이들의 입체배치 외에도, 이러한 불변 부위가 몇몇 이펙터 기능을 매개한다는 것이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 보체의 C1 성분의 항체와의 결합은 보체 시스템을 활성화한다. 보체의 활성화는 세포 병원체의 옵소닌화 및 용균에 중요하다. 보체의 활성화는 또한 염증성 반응을 자극하고, 또한 자가면역 과민증에 관여할 수 있다. 나아가, 항체는, 세포의 Fc 수용체(FcR)와 결합하는 항체 Fc 부위의 Fc 수용체 자리를 이용하여, Fc 부위를 통해 세포와 결합한다. IgG(감마 수용체), IgE(에타 수용체), IgA(알파 수용체) 및 IgM(뮤 수용체)를 비롯한 다양한 부류의 항체에 대해 특이적인 Fc 수용체가 다수 존재한다. 세포 표면의 Fc 수용체에 대한 항체의 결합은 항체-코팅된 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 킬러 세포에 의한 항체-코팅된 표적 세포의 용리(항체 의존적 세포 매개성 세포독성, 또는 ADCC라 함), 염증 매개자의 방출, 태반 통과 및 면역 글로불린 생산 제어를 포함한 다수의 중요하고 다양한 생물학적 반응을 촉발한다.

[0575] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은, 결국 투여된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 생물학적 프로파일에 영향을 미치는, 변경된 이펙터 기능을 제공한다. 예를 들어, (점 돌연변이 또는 기타 방법을 통한) 불변 부위 도메인의 결실 또는 불활성화는 순환하는 개질된 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시켜, 종양 편재화를 증가시킬 수 있다. 다른 경우, 본 개시와 일치하는 불변 부위 개질은 보체 결합을 완화시켜, 혈청 반감기 및 접합된 세포독소의 비특이적 결합을 감소시킬 수 있다. 이러한 불변 부위의 또 다른 개질을 이용하여, 항원 특이성 또는 항체 가요성 증가로 인한 편재성 증진을 가능하게 하는 이황화 결합 또는 올리고당 모이어티를 제거할 수 있다. 유사하게, 본 개시에 따른 이러한 불변 부위에 대한 개질은 당업자의 범위 내에서 널리 공지된 생화학 또는 분자 공학 기법을 이용하여 용이하게 이루어질 수 있다.

[0576] 특정 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자, 즉, 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 이펙터 기능을 나타내지 않는다. 예를 들어, 일부 양태들에서, 이러한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 항체 의존적 세포의 세포독성(ADCC) 활성 및/또는 보체 의존적 세포독성(CDC) 활성을 나타내지 않는다. 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fc 수용체 및/또는 보체 인자와 결합하지 않는다. 특정 양태들에서, 이러한 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 어떠한 이펙터 기능도 나타내지 않는다.

[0577] 특정 양태들에서, 이러한 항-CD73 개질 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 조작하여 CH3 도메인을 각각의 개질된 항체 또는 이의 단편의 힌지 부위에 직접 융합시킬 수 있음이 주목될 것이다. 다른 구축물에서, 힌지 부위와 개질된 CH2 및/또는 CH3 도메인 사이에 펩타이드 스페이서를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, CH2 도메인이 결실되고, 남은 CH3 도메인(개질되거나 개질되지 않음)이 5 내지 20개의 아미노산 스페이서를 이용하여 힌지 부위에 연결된 적합한 구축물이 발현될 수 있다. 이러한 스페이서를 첨가하여, 예를 들어, 불변 도메인의 조절 요소를 자유롭고 접근가능하게 유지하거나, 또는 힌지 부위를 가요적이게 유지할 수 있다. 그러나, 아미노산 스페이서는 일부 경우에 면역원성인 것으로 판명되어, 이러한 구축물에 대해 원치 않는 면역 반응을 유발할 수 있음을 주의해야 한다. 따라서, 특정 양태들에서, 이러한 구축물에 첨가되는 임의의 스페이서는 상대적으로 비 면역원성이거나, 또는 심지어 개질된 항체의 원하는 생화학적 품질을 유지하도록 전부 생략될 것이다.

[0578] 전체 불변 부위 도메인의 결실 이외에, 본 개시의 항-CD73 항체 및 이의 항원 결합 단편은 소수의 또는 심지어는 단일 아미노산의 부분 결실 또는 치환에 의해 제공될 수 있음이 인식될 것이다. 예를 들어, CH2 도메인의 선택된 영역에서의 단일 아미노산의 돌연변이는 실질적으로 Fc 결합을 감소시키기에 충분할 수 있고, 이에 따라 종양 편재화가 증가한다. 유사하게, 조절되어야 할 이펙터 기능 (예를 들어, 보체 C1Q 결합)을 제어하는 하나 이상의 불변 부위 도메인의 일부를 간단히 결실시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 불변 부위의 부분 결실은 대상 불변 부위 도메인과 관련된 기타 바람직한 기능을 온전하게 둔 채 이러한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 선택된 특징(예컨대, 혈청 반감기)을 개선할 수 있다. 게다가, 위에서 언급한 바와 같이, 개시된 항-CD73 항체 및 이의 항원 결합 단편의 불변 부위를, 그에 따른 구축물의 프로파일을 증진시키는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이 또는 치환을 통해 개질시킬 수 있다. 이러한 점에서, 개질된 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 입체배치 및 면역원성 프로파일을 실질적으로 유지하면서, 보존된 결합 자리(예를 들어, Fc 결합)에 의해 제공되는 활성을 파괴하는 것이 가능하다. 특정 양태들은 이러한 불변 부위에 하나 이상의 아미노산을 첨가하여 바람직한 특성을 증진시킬 수 있다. 예컨대 이펙터 기능을 감소 또는 증진시키거나, 보다 많은 세포독소 또는 탄수화물

부착을 제공할 수 있다. 이러한 양태들에서, 선택된 불변 부위 도메인으로부터 유래된 특정 서열을 삽입 또는 복제하는 것이 바람직할 수 있다.

[0579] 또한, 본 개시는 본 설명에 기재된 키메라, 인간화 및 인간 항-CD73 항체, 또는 이의 항원 결합 단편과 실질적으로 상동성인 변이체 및 등가물을 제공한다. 이들은, 예를 들어 보존적 치환 돌연변이, 즉, 유사한 아미노산에 의한 하나 이상의 아미노산의 치환을 함유할 수 있다. 예를 들어, 보존적 치환은 아미노산을 동일한 공통 부류 내의 또 다른 아미노산으로 치환하는 것, 예를 들어 하나의 산성 아미노산을 또 다른 산성 아미노산으로, 하나의 염기성 아미노산을 또 다른 염기성 아미노산으로, 또는 하나의 중성 아미노산을 또 다른 중성 아미노산으로 치환하는 것을 지칭한다. 보존적 아미노산 치환이 의미하는 것은 당해 분야에 널리 공지되어 있다.

[0580] 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 보통은 이러한 단백질의 일부분이 아닌 추가적인 화학적 모이어티를 함유하도록 더 개질될 수 있다. 이러한 유도체화된 모이어티는 이러한 단백질의 용해도, 생물학적 반감기 또는 흡수를 향상시킬 수 있다. 또한, 이러한 모이어티는 이러한 단백질 등의 임의의 바람직한 부작용을 감소시키거나 제거할 수 있다. 이러한 모이어티에 대한 개요는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000)에서 볼 수 있다.

[0581] **VI. CD73-결합 분자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드**

[0582] 특정 양태들에서, 본 개시는 CD73 또는 이의 항원 결합 단편에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다. 예를 들어, 본 개시는 항-CD73 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)를 암호화하거나 그러한 항체의 항원 결합 단편을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 개시의 이러한 폴리뉴클레오티드는 RNA 형태 또는 DNA 형태로 존재할 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA 및 합성 DNA를 포함하고, 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있고, 단일 가닥인 경우 코딩 가닥 또는 비 코딩(안티센스) 가닥일 수 있다.

[0583] 특정 양태들에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 단리된다. 특정 양태들에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 실질적으로 순수하다. 특정 양태들에서 이러한 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 숙주 세포로부터의 폴리펩타이드의 발현 및 분비에 도움을 주는 폴리뉴클레오티드(예를 들면, 이러한 세포로부터의 폴리펩타이드의 수송을 조절하기 위한 분비 서열로서 작용하는 리더 서열)에 동일한 판독 프레임으로 융합된, 성숙 폴리펩타이드에 대한 암호화 서열을 포함한다. 리더 서열을 가진 이러한 폴리펩타이드는 전구단백질이고, 이러한 폴리펩타이드의 성숙한 형태를 형성하기 위해 숙주 세포에 의해 절단되는 리더 서열을 가질 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 성숙 단백질 플러스 추가적인 5' 아미노산 잔기인 CD73- 결합 전구단백질을 암호화할 수도 있다.

[0584] 특정 양태들에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 예를 들면, 암호화된 폴리펩타이드의 정제를 가능하게 하는, 마커 서열에 동일한 판독 프레임으로 융합된, 성숙 CD73 결합 폴리펩타이드, 예컨대, 항-CD73 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편에 대한 암호화 서열을 포함한다. 예를 들면, 이러한 마커 서열은 세균 숙주의 경우 이러한 마커에 융합된 성숙 폴리펩타이드의 정제를 제공하기 위해 pQE-9 벡터에 의해 공급된 헥사-히스티딘 태그일 수 있거나, 포유동물 숙주(예를 들면, COS-7 세포)가 사용될 때 이러한 마커 서열은 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래된 헤마글루티닌(HA) 태그일 수 있다.

[0585] 또한, 본 개시는 본 설명에 기술된 CD73 결합 분자(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)의, 예를 들어, CD73 결합 단편, 유사체 및 유도체를 암호화하는, 기술된 폴리뉴클레오티드의 변이체를 제공한다.

[0586] 이러한 폴리뉴클레오티드 변이체는 암호화 부위, 비 암호화 부위 또는 이들 둘 다에서 변경을 함유할 수 있다. 일부 양태들에서, 이러한 폴리뉴클레오티드 변이체는 침묵 치환, 추가 또는 결실을 생성하나, 암호화된 폴리펩타이드의 성질 또는 활성을 변경시키지 않는 변경을 함유한다. 일부 양태들에서, 뉴클레오티드 변이체는 유전 코드의 축퇴성으로 인한 침묵 치환에 의해 생성된다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 다양한 이유들로, 예를 들면, 특정 숙주를 위한 코돈 발현을 최적화하기 위해(인간 mRNA 내의 코돈을 세균 숙주, 예컨대, 대장균에 의해 선호되는 코돈으로 바꾸기 위해) 생성될 수 있다. 본 설명에 기술된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 세포도 제공된다.

[0587] 일부 양태들에서, CD73-결합 분자, 예를 들면, 항-CD73 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 DNA 서열은 올리고뉴클레오티드 합성기를 이용한 화학적 합성에 의해 구축될 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드는 원하는 폴리펩타이드의 아미노산 서열, 및 관심 있는 재조합 폴리펩타이드가 생성될 숙주 세포에서 유리한 코돈의 선택을 기초로 설계될 수 있다. 표준 방법을 적용하여 관심 있는 단리된 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드 서열을 합성할 수 있다. 예를 들면, 완전한 아미노산

서열을 사용하여 역번역된(backtranslated) 유전자를 구축할 수 있다. 나아가, 특정 단리된 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA 올리고머를 합성할 수 있다. 예를 들면, 원하는 폴리펩타이드의 일부를 암호화하는 여러 작은 올리고뉴클레오티드들을 합성한 후 라이게이션시킬 수 있다. 개별 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 상보적 조립을 위한 5' 또는 3' 오버행(overhang)을 함유한다.

[0588] (합성, 위치 특이적 돌연변이 유발 또는 또 다른 방법에 의해) 일단 조립되면, 관심 있는 특정 단리된 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 발현 벡터 내로 삽입될 것이고 원하는 숙주에서의 단백질의 발현에 적절한 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결될 것이다. 적절한 조립은 적합한 숙주에서 생물학적 활성 폴리펩타이드의 뉴클레오티드 서열 결정, 제한 매핑 및 발현에 의해 확인될 수 있다. 당해 분야에 잘 공지되어 있는 바와 같이, 숙주에서 형질감염된 유전자의 높은 발현 수준을 얻기 위해, 이러한 유전자는 선택된 발현 숙주에서 작용하는 전사 및 번역 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어야 한다.

[0589] 특정 양태들에서, 재조합 발현 벡터를 사용하여 항-CD73 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편을 암호화하는 DNA를 증폭하고 발현시킨다. 재조합 발현 벡터는 포유동물, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자로부터 유래된 적합한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동가능하게 연결된, 항-CD73 항체 또는 및 이의 항원 결합 단편의 폴리펩타이드 쇄를 암호화하는 합성 또는 cDNA 유래의 DNA 단편을 가진, 복제가능한 DNA 구축물이다.

[0590] 전사 유닛은 일반적으로 아래에 상세히 기술된 바와 같이 (1) 유전자 발현에서 조절 역할을 수행하는 유전적 요소 또는 요소들, 예를 들면, 전사 프로모터 또는 인핸서, (2) mRNA로 전사되고 단백질로 번역되는 구조적 또는 암호화 서열, 및 (3) 적절한 전사 및 번역 개시 및 종결 서열의 조립체를 포함한다. 이러한 조절 요소는 전사를 조절하기 위한 작동유전자 서열을 포함할 수 있다. 통상적으로 복제기점에 의해 부여된, 숙주에서 복제하는 능력, 및 형질전환체의 인식을 용이하게 하기 위한 선별 유전자가 추가로 도입될 수 있다. DNA 부위들은 서로 기능적으로 관련되어 있을 때 작동 가능하게 연결된다. 예를 들면, 신호 펩타이드(분비 리더)에 대한 DNA가 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전구체로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동 가능하게 연결되어 있거나; 프로모터가 서열의 전사를 조절하는 경우 암호화 서열에 작동 가능하게 연결되어 있거나; 리보좀 결합 자리가 번역을 허용하도록 위치되는 경우 암호화 서열에 작동 가능하게 연결되어 있다. 효모 발현 시스템에서 사용되기 위한 구조적 요소는 숙주 세포에 의한 번역된 단백질의 세포 외 분비를 가능하게 하는 리더 서열을 포함한다. 대안적으로, 재조합 단백질이 리더 또는 수송 서열 없이 발현되는 경우, 이 재조합 단백질은 N 말단 메티오닌 잔기를 포함할 수 있다. 이 잔기는 발현된 재조합 단백질로부터 선택적으로 나중에 절단되어 최종 생성물을 제공할 수 있다.

[0591] 발현 조절 서열 및 발현 벡터의 선택은 숙주의 선택에 의존할 것이다. 매우 다양한 발현 숙주/벡터 조합들이 사용될 수 있다. 진핵 숙주에 유용한 발현 벡터는 예를 들면, SV40, 소 유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 사이토메갈로바이러스로부터의 발현 조절 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 세균 숙주에 유용한 발현 벡터는 pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체를 포함하는 공지된 세균 플라스미드, 예컨대, 대장균으로부터의 플라스미드, 보다 더 넓은 숙주 범위 플라스미드, 예컨대, M13 및 사상 단일 가닥 DNA 파지를 포함한다.

[0592] CD73-결합 분자, 예를 들면, 항-CD73 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편의 발현에 적합한 숙주 세포는 적절한 프로모터의 조절 하에 있는 원핵생물, 효모, 곤충 또는 고등 진핵세포를 포함한다. 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들면, 대장균 또는 바실러스를 포함한다. 고등 진핵세포는 아래에 기술된 포유동물 기원의 확립된 세포주를 포함한다. 세포 무함유 번역 시스템도 사용될 수 있다. 세균, 진균, 효모 및 포유동물 세포 숙주와 함께 사용되기에 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 Pouwels 등(Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985) (이의 관련 개시는 본 설명에 참고로 도입됨)이 기술하였다. 항체 생산을 포함한 단백질 생산 방법에 관한 추가적인 정보는 예컨대, 미국 특허 공개 번호 2008/0187954, 미국 특허 번호 6,413,746, 6,660,501, 및 7,932,087(이들 각각은 전체가 참고로 본 설명에 포함됨)에서 볼 수 있다.

[0593] 다양한 포유동물 또는 곤충 세포 배양 시스템들도 재조합 CD73-결합 분자, 예를 들면, 항-CD73 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편을 발현하는 데에 유리하게 사용될 수 있다. 포유동물 세포에서의 재조합 단백질은, 이러한 단백질이 일반적으로 정확하게 폴딩되고 적절하게 개질되고 완전한 기능성을 갖기 때문에, 발현이 이루어질 수 있다.

[0594] 적합한 포유동물 숙주 세포주의 예는 HEK-293 및 HEK-293T, Gluzman(Cell 23:175, 1981)이 기술한 원숭이 신장 세포의 COS-7 세포주, 및 예를 들면, L 세포, C127, 3T3, 중국 햄스터 난소(CHO), NSO, HeLa 및 BHK 세포주를

포함하는 기타 세포주를 포함한다. 포유동물 발현 벡터는 비전사 요소, 예컨대, 복제기점, 발현될 유전자에 연결된 적합한 프로모터 및 인핸서, 및 기타 5' 또는 3' 플랭킹 비전사 서열, 및 5' 또는 3' 비번역 서열, 예컨대, 필요한 리보좀 결합 자리, 폴리아데닐화 자리, 스플라이스 공여자 및 수용자 자리, 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 곤충 세포에서 이종 단백질을 제조하기 위한 바큘로바이러스 시스템은 Luckow and Summers, BioTechnology 6:47 (1988)에 의해 검토되었다.

[0595] 형질전환된 숙주에 의해 생성된 CD73-결합 분자, 예를 들면, 항-CD73 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 임의의 적합한 방법에 따라 정제될 수 있다. 이러한 표준 방법은 크로마토그래피(예를 들면, 이온 교환, 친화도 및 사이징(sizing) 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차등 용해도, 또는 임의의 기타 표준 단백질 정제 기법을 포함한다. 친화도 태그, 예컨대, 헥사히스티딘, 말토스 결합 도메인, 인플루엔자 코트 서열 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제를 단백질에 부착시켜 적절한 친화도 컬럼을 통과시켜 용이한 정제를 가능하게 할 수 있다. 단백질용해, 핵 자기 공명 또는 x선 결정학과 같은 기법을 이용하여 단리된 단백질을 물리적으로 특징규명할 수도 있다.

[0596] 예를 들면, 재조합 단백질을 배양 배지 내로 분비하는 시스템으로부터의 상층액을, 상업적으로 입수 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들면, 아미콘(AMICON)® 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon)® 한외여과 유닛을 이용하여 먼저 농축할 수 있다. 농축 단계 후, 농축액을 적합한 정제 매트릭스에 적용할 수 있다. 대안적으로, 음이온 교환 수지, 예를 들면, 펜던트 디에틸아미노에틸(DEAE) 기를 가진 매트릭스 또는 기질이 사용될 수 있다. 이러한 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스 또는 단백질 정제에서 통상적으로 사용되는 기타 유형일 수 있다. 대안적으로, 양이온 교환 단계가 사용될 수 있다. 적합한 양이온 교환제는 설포프로필 또는 카복시메틸 기를 포함하는 다양한 불용성 매트릭스들을 포함한다. 마지막으로, 소수성 RP-HPLC 매질, 예를 들면, 펜던트 메틸 또는 기타 지방족 기를 가진 실리카 겔을 사용한 하나 이상의 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC) 단계를 사용하여 CD73-결합 분자(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)를 더 정제할 수 있다. 다양한 조합들에서, 전술한 정제 단계들의 일부 또는 전부를 이용하여 균질한 재조합 단백질을 제공할 수도 있다.

[0597] 세포 배양물에서 생성된 재조합 CD73 결합 분자, 예를 들면, 항-CD73 항체 (예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들면, 세포 펠렛으로부터의 초기 추출에 이은 하나 이상의 농축, 염석, 수성 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토그래피 단계에 의해 단리될 수 있다. 최종 정제 단계를 위해 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용할 수 있다. 재조합 단백질의 발현에서 사용된 미생물 세포는 동결-해동 순환, 초음파 처리, 기계적 파괴 또는 세포 용해제의 사용을 포함하는 임의의 편리한 방법에 의해 파괴할 수 있다.

[0598] 당해 분야에 공지된, 항체 및 기타 단백질을 정제하는 방법은 예를 들면, 미국 특허 공개 번호 2008/0312425, 2008/0177048 및 2009/0187005(이들 각각은 전체가 본 설명에 참고로 도입됨)에 기술된 방법들도 포함한다.

[0599] 특정 양태들에서, 이러한 CD73-결합 분자는 항체가 아닌 폴리펩타이드이다. 단백질 표적과 높은 친화도로 결합하는 비 항체 폴리펩타이드를 확인하고 생산하는 다양한 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 예컨대, Skerra, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304 (2007), Hosse *et al.*, Protein Science, 15:14-27 (2006), Gill et al., Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658 (2006), Nygren, FEBS J., 275:2668-76 (2008), 및 Skerra, FEBS J., 275:2677-83 (2008)(이들 각각은 전체가 참고로 본 설명에 도입됨) 참조. 특정 양태들에서, CD73 결합 폴리펩타이드를 확인/생산하는 데에 파지 디스플레이 기술이 이용될 수 있다. 특정 양태들에서, 이러한 폴리펩타이드는 단백질 A, 리포칼린, 피브로넥틴 도메인(예컨대, 테나신-3 Fn III 도메인과 같은 피브로넥틴 도메인), 안키린 공통 반복 도메인 및 티오레독신으로 이루어지는 군으로부터 선택된 유형의 단백질 스캐폴드를 포함한다.

[0600] **VI. 치료적 항-CD73 항체를 이용한 치료 방법**

[0601] 본 개시는 CD73 발현 또는 CD73을 발현하는 세포와 관련된 질병, 예컨대, 암을 앓는 환자를 치료하기 위하여, 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항원 결합 단편, 변이체 및 유도체를 포함하는 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)의 이용을 대상으로 한 방법을 제공한다. 일부 구체적인 양태들에서, 이러한 암은 폐암, 유방암, 난소암, 결장직장암, 방광암, 췌장암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 폐결장암 및 림프종이다.

[0602] "CD73 발현 세포"는 CD73을 발현하는 세포를 의미한다. CD73은 글리코실 포스파티딜이노시톨 앵커링을 통해 막에 결합되어 있을 수 있고, 가용성 단백질로서 존재할 수도 있다. 세포 및 기타 적절한 샘플에서 CD73 발현을 검출하는 방법은 당해 분야에 잘 공지되어 있고, 면역조직화학법, 유동 세포분석법, 웨스턴 블롯, ELISA 등을

포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0603] 다음의 논의는 본 개시의 CD73-결합 분자(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)를 이용한 다양한 질병 및 장애의 진단 방법 및 치료와 관련 있는 것이지만, 본 설명에 기술된 이러한 방법들은 임의의 기타 항-CD73 항체 및 본 설명에 개시된 항-CD73 항체의, 예컨대, CD73과 특이적으로 결합할 수 있고, 그것의 5'-뉴클레오티드가수분해효소 활성을 중화할 수 있는, 원하는 특성들을 보유하는 이들 항-CD73 항체의 항원 결합 단편, 변이체 및 유도체(예컨대, 융합 단백질 또는 접합체)에도 적용할 수 있다. 일부 양태들에서, CD73-결합 분자는 인간 ADCC를 매개하지 않는 인간 또는 인간화 항체이거나, ADCC를 매개하지 않도록 조작된 항-CD73 항체이다.

[0604] 일부 양태들에서, 이러한 CD73-결합 분자는 CD730010 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 클론 10.3 항체 또는 이의 항원 결합 단편, CD730002 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 클론 2C5 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 CD73004 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 다른 양태들에서, 이러한 CD73-결합 분자는 클론 10.3 돌연변이체 항체이다. 일부 양태들에서, 이러한 CD73-결합 분자는 클론 10.3 단일클론성 항체이다. 일부 양태들에서, 이러한 CD73-결합 분자는 혈청 반감기를 연장하도록 조작된 클론 10.3 단일클론성 항체이다. 다른 양태들에서, 이러한 CD73-결합 분자는 클론 10.3 YTE 돌연변이체 항체이다. 다른 양태들에서, 이러한 CD73-결합 분자는 클론 2C5 돌연변이체 항체이다. 일부 양태들에서, 이러한 CD73-결합 분자는 클론 2C5 단일클론성 항체이다. 일부 양태들에서, 이러한 CD73-결합 분자는 혈청 반감기를 연장하도록 조작된 클론 2C5 단일클론성 항체이다. 다른 양태들에서, 이러한 CD73-결합 분자는 클론 2C5 YTE 돌연변이체 항체이다.

[0605] 일 양태에서, 치료는 본 개시의 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 대상체 또는 환자에 적용 또는 투여하는 것, 또는 항-CD73 결합 분자를 대상체 또는 환자로부터 단리된 조직 또는 세포주에 적용 또는 투여하는 것을 포함하며, 여기서 이러한 대상체 또는 환자는 질병, 질병의 증상, 또는 질병에 걸리기 쉬운 소인을 가진다. 또 다른 양태에서, 치료는 본 개시의 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 포함하는 약학적 조성물을 대상체 또는 환자에 적용 또는 투여하는 것, 또는 항-CD73 결합 분자를 포함하는 약학적 조성물을, 질병, 질병의 증상, 또는 질병에 걸리기 쉬운 소인을 가진 대상체 또는 환자로부터 단리된 조직 또는 세포주에 적용 또는 투여하는 것도 포함하고자 한 것이다.

[0606] 본 개시의 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 다양한 암의 치료에 유용하다. 일 양태에서, 본 개시는 특히 암(예컨대, 결장암, 흑색종, 유방암, 림프종, 또는 비소세포 폐암종 호지킨 림프종, 비 호지킨 림프종, 및 버킷 림프종, 난소암, 유방암, 두경부암, 및 췌장암)의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 의약으로서의 용도를 위한 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 제공한다. 일부 양태에서, 이러한 암은 전이촉진성 표현형을 나타낸다. 일부 양태들에서, 전이촉진성 표현형을 나타내는 이러한 암은 흑색종 또는 유방암이다. 일부 양태들에서, 이러한 암은 전이성 암이다. 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 이러한 항-CD73 결합 분자는 적응성 항종양 활성을 촉발할 수 있고/촉발할 수 있거나 전이를 억제할 수 있다. 일부 특정 양태들에서, 본 설명에 개시된 이러한 항-CD73 결합 분자는 유방암에서 전이를 억제할 수 있다.

[0607] 본 개시의 방법에 따라, 본 설명의 다른 부분에서 정의된, 적어도 하나의 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 암과 관련하여 양성 치료 반응을 촉진하기 위해 사용된다. 암 치료와 관련하여 용어 "양성 치료 반응"은 이들 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체의 활성과 관련하여 질병의 개선, 및/또는 질병과 관련된 증상의 개선을 지칭한다. 따라서, 예를 들어, 질병의 개선은 완전한 반응으로 특징 규명될 수 있다. 용어 "완전한 반응"은 임의의 이전 시험 결과가 정상화되면서 임상적으로 검출 가능한 질병이 부존재함을 지칭한다. 대안적으로, 질병의 개선은 부분적 반응인 것으로서 분류될 수 있다. "양성 치료 반응"은 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자의 투여로부터 비롯된, 암의 진행 및/또는 지속의 감소 또는 억제, 암의 중증도의 감소 또는 경감, 및/또는 이의 하나 이상의 증상의 경감을 포괄한다.

[0608] 특정 양태들에서, 이러한 용어는 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자 투여 후의 1종, 2종 또는 3종 이상의 결과를 지칭한다: (1) 암세포 집단의 안정화, 감소 또는 제거; (2) 암 성장의 안정화 또는 감소; (3) 암 형성의 손상; (4) 원발성, 국부성 및/또는 전이성 암의 박멸, 제거 또는 조절; (5) 사망률의 감소; (6) 무질병, 무재발, 무진행 및/또는 전체 생존기간, 지속기간 또는 속도의 증가; (7) 반응 속도, 반응의 지속성, 또는 반응하거나 관해 중인 환자의 수의 증가; (8) 입원율의 감소, (9) 입원 기간의 감소, (10) 암의 크기가 유지되고 증

가하지 않거나 10% 미만, 바람직하게는 5% 미만, 바람직하게는 4% 미만, 바람직하게는 2% 미만으로 증가함, 및 (12) 관해 중인 환자 수의 증가.

[0609] ELISA, RIA, 크로마토그래피 등으로 검출할 수 있는 변화를 포함하나 이에 한정되지 않는 임상적 반응은 스크리닝 기법, 예컨대, 자기 공명 영상화(MRI) 스캔, x-방사선촬영 영상화, 컴퓨터 단층촬영(CT) 스캔, 유동 세포분석법 또는 형광 활성화된 세포 분류기(FACS) 분석, 조직학, 육안 병리학 및 혈액 화학을 이용함으로써 평가할 수 있다. 이들 양성 치료 반응 이외에, 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체를 이용하는 치료법을 받는 대상체는 질병과 관련된 증상의 개선이라는 유리한 효과를 경험할 수 있다.

[0610] 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 암, 예를 들면, 결장암, 흑색종, 유방암, 림프종, 비소세포 폐암종 호지킨 림프종, 비 호지킨 림프종, 및 버킷 림프종, 난소암, 유방암, 두경부암, 및 췌장암의 치료에 유용한 것으로 공지되어 있거나, 사용되었거나 현재 사용되고 있는 임의의 작용제 또는 작용제들의 조합을 포함하는, 임의의 공지된 암 치료법과 병용하여 이용될 수 있다. 약학적 조합 제형 또는 투약법의 제2 작용제 또는 작용제들의 조합은 바람직하게는 서로 부정적으로 영향을 미치지 않도록 본 개시의 항체 또는 폴리펩타이드에 대해 상보적 활성을 가진다.

[0611] 항암제는 악성 종양, 예컨대, 암성 성장을 치료하기 위해 사용되는 약물을 포함한다. 약물 요법은 단독으로, 또는 다른 치료법, 예컨대, 수술 또는 방사선 요법과 조합하여 이용될 수 있다. 여러 부류의 약물들이 관련된 장기의 성질에 따라 암 치료에 이용될 수 있다. 예를 들면, 유방암은 통상적으로 에스트로겐에 의해 자극되고, 성호르몬을 불활성화하는 약물로 치료할 수 있다. 유사하게, 전립선암은 남성 성호르몬인 안드로겐을 불활성화하는 약물로 치료할 수 있다. 본 개시의 특정 방법들에 이용하기 위한 항암제로는 무엇보다도 항체(예를 들면, IGF-1R에 결합하는 항체, EGFR에 결합하는 항체, Her2에 결합하는 항체, 또는 cMET에 결합하는 항체), IGF1R을 표적화하는 소분자, EGFR을 표적화하는 소분자, Her2를 표적화하는 소분자, 항대사물질, 알킬화제, 토포이성질화효소 억제제, 마이크로튜불 표적화제, 키나제 억제제, 단백질 합성 억제제, 면역요법제, 호르몬요법, 글루코코르티코이드, 아로마타제 억제제, mTOR 억제제, 화학요법제, 단백질 키나제 B 억제제, 포스파티딜이노시톨 3-키나제(PI3K) 억제제, 사이클린 의존적 키나제(CDK) 억제제, RLr9, CD289, 효소 억제제, 항-TRAIL, MEK 억제제 등을 포함한다.

[0612] 특정 양태들에서, 본 설명에 개시된 이러한 CD73-결합 분자, 예컨대, 항체 (예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들어, PD-1(예정사 1 단백질), 그것의 두 리간드인 PD-L1(예정사 리간드 1) 및/또는 PD-L2, 또는 CTLA-4(세포독성 T 림프구 항원 4 단백질)을 표적화하는 항체 또는 항체 단편들과 조합하여 투여될 수 있다. 예컨대, 본 설명에 전체가 참조로 포함되는 Stagg et al. PNAS 107:1547-1552 (2010); Jin et al. Cancer Res. 70(6): (2010); Allard et al. Clin. Cancer Res. 19:5626 (2013) 참조. 일부 양태들에서, 이러한 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙 또는 이의 항원 결합 단편이다. 다른 양태들에서, 이러한 항-CTLA-4 항체는 트레멜리무맙(티실리무맙, CP-675,206) 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 양태들에서, 이러한 항-PD-1 항체는 펨브롤리주맙(키트루다, 과거 람브롤리주맙, MK-3475라고도 함) 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 양태들에서, 이러한 항-PD-1 항체는 니볼루맙(BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538, 옵디바) 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 양태들에서, 이러한 항-PD-L1 항체는 BMS-936559 또는 이의 항원 결합 단편이다. 다른 양태들에서, 이러한 항-PD-L1 항체는 MPDL3280A이다. 다른 양태들에서, 이러한 항-PD-1 항체는 AMP-224(항-PD-1 Fc 융합 단백질) 또는 이의 항원 결합 단편이다. 다양한 양태들에서, 이러한 항-PD-L1 항체는 MEDI4736 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0613] 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 이러한 CD73-결합 분자(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)는 항-PD-1 또는 항-PD-1 항체와 병용하여 투여될 수 있다. 다양한 구현예에서, 이러한 항-CD73 항체는 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 11 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 13 mg/kg, 약 14 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 16 mg/kg, 약 17 mg/kg, 약 18 mg/kg, 약 19 mg/kg, 또는 약 20 mg/kg의 농도로 투여된다. 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)는 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체와 병용하여 투여될 수 있는데, 이때, 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체는 약 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 11 mg/kg, 약 12 mg/kg, 약 13 mg/kg, 약 14 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 16 mg/kg, 약 17 mg/kg, 약 18 mg/kg, 약 19 mg/kg, 또는 약 20 mg/kg의 농도로 투여된다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 및 항-PD-1 항체, 항-

PD-L1, 또는 항-CTLA4는 약 1:1, 1:2, 1:3 또는 1:4의 비율로 투여된다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체 및 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체는 약 1:2의 비율로 투여된다. 구체적인 양태에서, 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)의 농도는 약 10 mg/kg이고, 항-PD-1 항체의 농도는 약 20 mg/kg이다. 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)는 항-PD-1 항체와 병용하여 투여될 수 있다. 일부 양태들에서, 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체와 조합한, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자(예를 들어, MEDI9447, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)를 포함하는 병용 치료의 투여는 치료되지 않은 대상체 또는 단독 치료법(예컨대, 항-CD73 항체 없이 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체)으로 치료된 대상체와 비교하여 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 또는 약 100% 생존기간을 증가시킬 수 있다. 일부 양태들에서, 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체와 조합한, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)를 포함하는 병용 치료의 투여는 치료되지 않은 대상체 또는 단독 치료법(예컨대, 항-CD73 항체 없이 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체)으로 치료된 대상체와 비교하여 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 또는 약 10배 생존기간을 증가시킬 수 있다.

[0614] 조합된 치료법이 또 다른 치료제(예컨대, 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체)의 투여와 조합한 항-CD73 결합 분자의 투여를 포함하는 경우, 본 설명에 개시된 방법은 별도의 제형 또는 단일 약학적 제형을 이용한 공동 투여 및 임의의 순서의 연속 투여를 포괄한다. 일부 양태들에서, 본 설명에 기술된 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)는 다른 약물들과 병용하여 투여되는데, 이때, 이러한 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체 및 치료제(들)은 순차적으로, 임의의 순서로, 또는 동시에(즉, 동시에 또는 동일한 시간 프레임 내에) 투여될 수 있다.

[0615] 이러한 병용 치료법은 "상승작용"을 제공할 수 있고 "상승적임"을 보여주는데, 즉 함께 사용된 활성 성분들이 화합물들의 개별적 사용으로부터 비롯된 효과들의 합계보다 더 클 때 달성된 효과를 보여준다. 상승적 효과는 활성 성분들이 (1) 조합된, 단위 투여량 제형으로 공동 제형화되고 동시적으로 투여되거나 전달되거나; (2) 별도의 제형들로서 교대로 또는 병행하여 전달되거나; (3) 일부 다른 요법에 의해 전달될 때 달성될 수 있다. 교대 요법으로 전달될 때, 상승적 효과는 화합물들이 순차적으로, 예를 들면, 별도의 주사기들에 의한 상이한 주사에 의해 투여되거나 전달될 때 달성될 수 있다. 일반적으로, 교대 요법 중에 유효 용량의 각각의 활성 성분은 순차적으로, 즉 연속적으로 투여되는 반면, 병용 요법에서 유효 용량의 2종 이상의 활성 성분들은 함께 투여된다.

[0616] 다른 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)는 티로신 키나제 억제제와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 기타 구체적인 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자는 EGFR 및/또는 HER2/neu와 관련된 티로신 키나제 활성의 억제제, 예컨대, 라파티닙와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자는 항유사분열제와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 구체적인 양태들에서, 본 설명에 개시된 CD73-결합 분자는 유사분열 방추체 마이크로튜불 조립체를 안정화하는 작용제, 예컨대, 파클리탁셀 또는 도세탁셀과 조합하여 투여될 수 있다. 추가적인 양태는 예컨대, 주어진 치료 요법의 효능을 결정하기 위하여, 임상 시험 절차의 일부로서 조직 내 단백질 수준의 진단적 모니터링을 위한 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)의 용도이다. 예를 들어, 이러한 항체를 검출 가능한 물질에 커플링시켜 검출을 용이하게 할 수 있다.

[0617] 검출가능한 물질의 예로는 다양한 효소들, 보결분자단들, 형광 물질들, 발광 물질들, 생체발광 물질들 및 방사성 물질들을 포함한다. 적합한 효소의 예로는 호스래디쉬 퍼록시다제, 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스터라제를 포함한다; 적합한 보결분자단 복합체의 예로는 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴을 포함한다; 적합한 형광 물질의 예로는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 파이코에리쓰린을 포함한다; 발광 물질의 예로는 루미놀을 포함한다; 생체발광 물질의 예로는 루시퍼라제, 루시페린 및 애쿠오린을 포함한다; 적합한 방사성 물질의 예로는 ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, 또는 ^{3}H를 포함한다.

[0618] **VIII. 항-CD73 항체 치료적 조합물 및 공동 치료법**

[0619] 본 개시는 (결장암, 흑색종, 유방암, 림프종, 비소세포 폐암종 호지킨 림프종, 비 호지킨 림프종, 버킷 림프종, 난소암, 유방암, 두경부암 및 췌장암을 포함하는) 암을 앓는 환자들을 치료하기 위하여, 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항원 결합 단편, 변이체 및 유도체를 포함하는 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)를

포함하는 치료적 조합물의 이용을 대상으로 하는 방법을 제공한다.

[0620] 다음의 논의는 본 개시의 CD73-결합 분자(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)를 특징으로 하는 치료적 조합물에 관한 것이지만, 본 설명에 기술된 방법은 임의의 기타 항-CD73 항체 및 본 설명에 개시된 항-CD73 항체의, 예컨대, CD73과 특이적으로 결합할 수 있고, 그것의 5'-뉴클레오티드가수분해효소 활성을 중화할 수 있는, 원하는 특성들을 보유하는 이들 항-CD73 항체의 항원 결합 단편, 변이체 및 유도체(예컨대, 융합 단백질 또는 접합체)에도 적용할 수 있다. 일부 양태들에서, CD73-결합 분자는 인간 ADCC를 매개하지 않는 인간 또는 인간화 항체이거나, ADCC를 매개하지 않도록 조작된 항-CD73 항체이다.

[0621] 본 발명의 조합물, 예컨대, 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체, 또는 이의 항원 결합 단편과 조합한 항-CD73 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 이용하여 고형 종양을 앓는 환자를 치료하는 것은 추가적 또는 상승적 효과를 초래할 수 있다. 본 설명에 사용된 용어 "상승적"은 단일 치료법의 추가적인 효과들보다 더욱 효과적인 치료법의 조합(예컨대, 항-CD73 항체(예컨대, MEDI9447) 및, 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체의 조합)을 지칭한다.

[0622] 치료법의 조합(예컨대, 항-CD73 항체(예컨대, MEDI9447) 및, 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체의 조합)의 상승적 효과는 고형 종양을 앓는 환자에 더 낮은 투여량의 하나 이상의 치료제 및/또는 상기 치료제들의 덜 빈번한 투여의 사용을 허용한다. 더 낮은 투여량의 치료제들을 활용하고/활용하거나 상기 치료법들을 덜 빈번하게 투여하는 능력은 고형 종양의 치료에서 상기 치료법들의 효능을 감소시키지 않고 대상체에 대한 상기 치료법들의 투여와 관련된 독성을 감소시킨다. 또한, 상승적 효과는 고형 종양의 관리, 치료, 또는 경감에 있어서 치료제들의 개선된 효능을 초래할 수 있다. 치료제들의 조합의 상승적 효과는 임의의 단독 치료법의 사용과 관련된 유해하거나 원치 않는 부작용을 막거나 감소시킬 수 있다.

[0623] 공동 치료법에서, 항-CD73 항체(예컨대, MEDI9447) 또는 이의 항원 결합 단편 및 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체, 또는 이의 항원 결합 단편의 조합은 선택적으로 동일한 약학적 조성물 내에 포함될 수 있거나, 별개의 약학적 조성물 내에 포함될 수 있다. 이러한 후자의 경우, 항-CD73 항체(예컨대, MEDI9447) 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 이러한 약학적 조성물은 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체, 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 약학적 조성물의 투여 전, 이의 투여와 동시에, 또는 이의 투여 후의 투여에 적합하다. 어떤 경우에는, 항-CD73 항체(예컨대, MEDI9447) 또는 이의 항원 결합 단편 및 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체는 별도의 조성물로 중첩되는 시간에 투여된다.

[0624] 항-CD73 항체(예컨대, MEDI9447) 또는 이의 항원 결합 단편 및 항-PD-1, 항-PD-L1, 또는 항-CTLA4 항체, 또는 이의 항원 결합 단편은 환자에 여전히 이익을 제공하면서 오로지 1회 또는 가끔 투여될 수 있다. 추가적인 양태들에서, 이러한 환자는 추가적인 후속 용량을 투여 받는다. 후속 용량은 환자의 연령, 체중, 임상적 평가, 종양 부하(tumor burden) 및/또는 담당의사의 판단을 비롯한 기타 인자들에 따라 다양한 시간 간격에서 투여될 수 있다.

[0625] 본 설명에 제공된 방법들은 종양 성장을 감소시키거나 지연시킬 수 있다. 일부 양태들에서 이러한 감소 또는 지연은 통계적으로 유의할 수 있다. 종양 성장의 감소는 예상된 종양 성장에 대해, 대규모 환자 집단을 기초로 한 예상된 종양 성장에 대해, 또는 대조군 집단의 종양 성장에 대해, 기준선에서의 환자의 종양의 성장과 비교하여 측정할 수 있다. 기타 구현예에서, 본 발명의 방법은 생존기간을 증가시킨다.

[0626] **IX. 항-PD-L1 항체**

[0627] 특이적으로 결합하여 PD-L1 활성(예컨대, PD-1 및/또는 CD80에 대한 결합)을 억제하는 항체는 종양의 치료에 유용하다. PD-L1으로도 알려져 있는 B7-H1은 그 크기가 대략 53 kDa인 I형 막관통 단백질이다. 인간에서, B7-H1은 활성화된 및 무반응성/탈진 T 세포, 미감작(naive) 및 활성화된 B 세포뿐만 아니라, 골수성 수지상 세포(DC), 단핵구 및 비만 세포를 포함한, 다수의 면역 세포 유형에서 발현된다. 또한, 그것은 그 발현이 염증성 에피소드가 진행되는 동안 증진되는 곳인, 췌장섬, 간 쿠퍼 세포, 혈관 내피 및 선택된 상피, 예를 들어, 기도 상피 및 신세뇨관 상피를 비롯한, 비 면역 세포에서도 발현된다. B7-H1 발현은 또한 유방 종양, 결장 종양, 결장직장 종양, 폐 종양, 신장 종양(신세포암종 포함), 위 종양, 방광 종양, 비소 세포 폐암(NSCLC), 간세포암(HCC) 및 췌장암 뿐만 아니라, 흑색종을 포함하나 이에 한정되지 않는 다수의 종양에서 증가된 수준으로 발견된다.

[0628] B7-H1은 2개의 대체 리간드에 결합하는 것으로 알려져 있는데, 이중 첫번째 것인 PD-1은 원래는 활성화 유도성 세포자멸사를 겪는 T 세포주에서 확인된 50~55 kDa의 I형 막관통 수용체이다. PD-1은 활성화된 T 세포, B 세포 및 단핵구 뿐만 아니라, 기타 면역계 세포에서도 발현되며, B7-H1(PD-L1) 및 관련 B7-DC(PD-L2) 둘 모두와 결합

한다. 두번째 것은 B7 패밀리 구성원인 B7-1인데, 이것은 활성화된 T 세포, B 세포, 단핵구 및 항원 제시 세포에서 발현된다.

[0629] PD-1/B7-H1 축을 통해 이루어지는 신호 전달은 T 세포 반응을 음성적으로 조절함으로써 면역계 내의 중요한 비과잉(non-redundant) 작용을 수행하는 역할을 한다고 여겨진다. 종양 세포에서의 B7-H1 발현은, 종양이 면역계에 의해 검출되어 제거되지 않도록 도와주는 것으로 여겨진다. 이와 관련하여 B7-H1은, 종양 침투 T 림프구의 탈진 및 무반응화 추진, 면역 억제 사이토카인의 종양 미세 환경으로의 분비 자극, 억제 조절성 T 세포 작용 자극, 및 종양 세포 특이적 세포독성 T 세포에 의한 용해로부터의 B7-H1 발현 종양 세포 보호를 비롯한 여러 가지 대체 기전을 통해 작용한다.

[0630] MEDI4736은 B7-H1에 대해 선택적인, 예시적인 항-PD-L1 항체이며, B7-H1이 PD-1 수용체 및 CD80 수용체에 결합하는 것을 차단한다. MEDI4736은 시험관 내에서 인간 T 세포 활성화의 B7-H1 매개성 억제를 완화할 수 있고, T 세포 의존적 기전을 통해 이종이식 모델에서 종양 성장을 억제한다. 이용할 수 있는 기타 작용제로는 PD-L1 및/또는 PD-1(AB 또는 기타)을 억제하는 작용제를 포함한다.

[0631] 본 설명에 제공된 방법에 사용하기 위한 MEDI4736(또는 이의 단편)에 관한 정보는 US20130034559 / US 8779108 및 US20140356353에서 찾아볼 수 있는데, 이들 각각의 개시 내용은 그 전체가 참조로서 본 설명에 포함된다. MEDI4736의 단편 결정가능(Fc) 도메인은 항체 의존적 세포 매개성 세포독성(ADCC)을 매개하는 것을 담당하는 보체 성분 C1q와 Fcɣ 수용체들에 대한 결합을 감소시키는 IgG1 중쇄의 불변 도메인에 삼중 돌연변이를 함유한다.

[0632] 본 설명에 제공된 방법에 사용하기 위한 MEDI4736 및 이의 항원 결합 단편은 중쇄 및 경쇄 또는 중쇄 가변 부위 및 경쇄 가변 부위를 포함한다. 구체적인 양태에서, 본 설명에 제공된 방법에 사용하기 위한 MEDI4736 및 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 130의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 부위 및 서열 번호 131의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 부위를 포함한다. 구체적인 양태에서, 본 설명에 제공된 방법에 사용하기 위한 MEDI4736 및 이의 항원 결합 단편은 중쇄 가변 부위 및 경쇄 가변 부위를 포함하는데, 이때, 이러한 중쇄 가변 부위는 서열 번호 132 내지 134의 카밧 정의의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열들을 포함하고, 경쇄 가변 부위는 서열 번호 135 내지 137의 카밧 정의의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열들을 포함한다. 당업자라면 코티아 정의, Abm 정의 또는 기타 당업자에게 공지된 CDR 정의들을 용이하게 확인할 수 있을 것이다. 구체적인 양태에서, 본 설명에 제공된 방법에 사용하기 위한 MEDI4736 또는 이의 항원 결합 단편은 US20130034559 / US 8779108 및 US20140356353(이들 각각의 개시 내용은 그 전체가 본 설명에 참조로 포함된다)에 개시된 바와 같은 2.14H9OPT 항체의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 CDR 서열들을 포함한다.

[0633] **X. 항-CTLA4 항체**

[0634] 따라서, 일 양태에서, 본 발명의 치료적 조합물은 CTLA4 차단 항체(예컨대, 트레멜리무맙) 및/또는 PD1/PD-L1 상호작용을 감소시키는 항체를 포함한다. 현재까지 상당한 주목을 받고 있는 두 가지 T 세포 조절 경로는 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4, CD152) 및 예정사 리간드 1(B7H-1 또는 CD274로도 알려져 있는 PD-L1)을 통해 신호를 전달한다.

[0635] CTLA4는 활성화된 T 세포에서 발현되고 CD28 매개성 T 세포 활성화 후의 체크(check)에서 T 세포 반응을 유지하기 위한 공동 저해제로 작용한다. CTLA4는 TCR 접촉 후의 미감작 및 메모리 T 세포의 조기 활성화의 규모를 조절하고, 항종양 면역 및 자가면역 둘 다에 영향을 주는 중추성 억제 경로의 일부인 것으로 믿어지고 있다. CTLA4는 주로 T 세포에서 발현되고, 이의 리간드인 CD80(B71) 및 CD86(B7.2)의 발현은 주로 항원 제시 세포, T 세포 및 기타 면역 매개 세포에 제한된다. CTLA4 신호 전달 경로를 차단하는 길항적 항-CTLA4 항체는 T 세포 활성화를 증진시키는 것으로 보고된 바 있다. 이러한 항체의 하나인 이필리무맙은 전이성 흑색종의 치료를 위해 2011년 FDA가 승인하였다. 다른 항-CTLA4 항체인 트레멜리무맙은 진행된 흑색종의 치료를 위하여 III상 시험이 진행되었으나, 그 당시에 표준 치료법(테모졸로마이드 또는 다카바진)과 비교하여 환자의 전체 생존기간을 유의하게 증가시키지 못하였다.

[0636] 본 설명에 제공된 방법에 사용하기 위한 트레멜리무맙(또는 이의 항원 결합 단편)에 관한 정보는 US 6,682,736(여기서 11.2.1로 지칭됨)(이의 개시 내용은 그 전체가 참조로서 본 설명에 포함된다)에서 찾아볼 수 있다. (CP-675,206, CP-675, CP-675206 및 티실리무맙으로도 알려져 있는) 트레멜리무맙은 CTLA4에 대해 매우 선택적이며 CD80(B7.1) 및 CD86(B7.2)에 대한 CTLA4의 결합을 차단하는 인간 IgG2 단일클론성 항체이다. 그것은 시험관 내에서 면역 활성화를 초래하는 것으로 밝혀진 바 있고, 트레멜리무맙으로 치료된 일부 환자들은 종양 퇴화를 보였다.

[0637] 본 설명에 제공된 방법에 사용하기 위한 트레멜리무맙은 중쇄 및 경쇄 또는 중쇄 가변 부위 및 경쇄 가변 부위를 포함한다. 구체적인 양태에서, 본 설명에 제공된 방법에 사용하기 위한 트레멜리무맙 또는 항원 결합 단편은 경쇄 가변 부위 및 중쇄 가변 부위를 포함한다. 구체적인 양태에서, 본 설명에 제공된 방법에 사용하기 위한 트레멜리무맙 또는 항원 결합 단편은 본 설명에서 확인된 중쇄 가변 부위 및 경쇄 가변 부위를 포함한다. 당업자라면 코티아 정의, Abm 정의 또는 기타 당업자에게 공지된 CDR 정의들을 용이하게 확인할 수 있을 것이다. 구체적인 양태에서, 본 설명에 제공된 방법에 사용하기 위한 트레멜리무맙 또는 이의 항원 결합 단편은 US 6,682,736(이는 그 전체가 본 설명에 참조로서 포함된다)에 개시된 바와 같은 11.2.1 항체의 가변 중쇄 및 가변 경쇄 CDR 서열들을 포함한다.

[0638] **XI. VII. 약학적 조성물 및 투여 방법**

[0639] 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)를 제조하고 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 방법은 당업자에게 잘 공지되어 있거나 당업자라면 용이하게 확인한다. 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체의 투여 경로는 예를 들면, 경구, 비경구, 흡입 또는 국소일 수 있다. 본 설명에 사용된 용어 비경구는 예를 들면, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 피하, 직장 또는 질 투여를 포함한다. 그러나, 본 설명의 교시와 양립할 수 있는 기타 방법에서, 본 개시의 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 부정적인 세포 집단의 자리에 직접적으로 전달되어, 병든 조직의 치료제에 대한 노출을 증가시킬 수 있다.

[0640] 본 설명에 논의된 바와 같이, 본 개시의 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체), 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체는 특정 유형의 암과 같이, CD73 발현 세포 매개성 질병의 생체 내 치료를 위해 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.

[0641] 항-PD-1, 항-PD-L1, 및/또는 항-CTLA4 항체, 또는 이의 항원 결합 단편과 조합된, 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)를 포함하는 치료적 조성물을 제조하고 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있거나, 당업자가 용이하게 결정한다. 이의 조합물의 투여 경로는 예를 들어, 경구, 비경구, 흡입 또는 국소일 수 있다. 본 설명에 사용된 용어 비경구는 예컨대, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 근육 내, 피하, 직장, 또는 질 투여를 포함한다. 그러나, 본 설명의 교시와 양립할 수 있는 다른 방법에서, 본 개시의 조합물은 유해한 세포 집단의 자리에 직접적으로 전달되어, 이러한 치료제에 대한 병든 조직의 노출을 증가시킬 수 있다. 본 설명에서 논의된 바와 같이, 항-CD73 항체(예컨대, MEDI9447)와 항-PD-1, 항-PD-L1, 및/또는 항-CTLA4 항체의 조합물은 특정 유형의 암과 같은 CD73 발현 세포 매개성 질병의 생체 내 치료를 위하여 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.

[0642] 본 개시에 사용된 약학적 조성물은 예컨대, 물, 이온 교환제, 단백질, 완충 물질 및 염을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 보존제 및 기타 첨가제도 존재할 수 있다. 이러한 담체는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 본 설명에 개시된 치료적 방법에 사용하기 위한 적절한 제형은 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980)에 기술되어 있다.

[0643] 임의의 경우, 본 발명의 치료적 조성물 활성 화합물(예를 들면, 그 자체로 존재하거나 다른 활성 작용제와 조합된 항-CD73 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체, 예를 들면, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)을 요구된 양으로 적절한 용매에 도입한 후 여과 멸균함으로써 멸균 주사 용액을 제조할 수 있다. 나아가, 이러한 제제를 키트의 형태로 포장하여 판매할 수 있다. 이러한 제품은 관련된 조성물이 질병 또는 장애를 앓고 있거나 질병 또는 장애에 취약한 대상체를 치료하는 데에 유용함을 표시하는 표지 또는 포장 삽입물을 가질 수 있다.

[0644] 비경구 제형은 단회 볼러스 용량, 주입 또는 부하 볼러스 용량에 이은 유지 용량일 수 있다. 이들 조성물은 특정 고정 또는 가변 간격, 예를 들면, 1일 1회, 또는 "필요에 따라" 투여될 수 있다.

[0645] 이러한 조성물은 단회 용량으로서, 다회 용량으로서, 또는 확립된 기간에 걸쳐 주입으로 투여될 수 있다. 최적의 원하는 반응(예를 들면, 치료적 또는 예방적 반응)을 제공하기 위해 투약법을 조절할 수도 있다.

[0646] 예컨대, 결장암, 흑색종, 유방암, 림프종, 비소세포 폐암종 호지킨 림프종, 비 호지킨 림프종, 및 버킷 림프종, 난소암, 유방암, 두경부암, 및 췌장암을 비롯한 특정 유형의 암과 같은 CD73 발현 세포 매개성 질병의 치료를 위한, 본 개시의 조성물의 치료적으로 유효한 용량은 투여 수단, 표적 자리, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간인지 아니면 동물인지, 투여되는 다른 약물, 및 치료가 예방적 치료인지 아니면 치유적 치료인지를 비롯한 많

은 상이한 요인들에 따라 달라진다. 통상적으로, 이러한 환자는 인간이지만, 형질전환 포유동물을 비롯한 비 인간 포유동물도 치료될 수 있다. 치료 용량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 당업자에게 공지되어 있는 통상적인 방법을 이용하여 적정할 수 있다.

[0647] 투여될 본 발명의 적어도 하나의 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 결합 단편, 변이체 또는 유도체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 치료적 조성물의 양은 본 개시의 개시 내용을 고려해 볼 때 과도한 실험 없이 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 본 발명의 적어도 하나의 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체 또는 치료적 조성물의 투여 방식 및 각각의 양에 영향을 미치는 요인은 질병의 중증도, 병력, 및 치료를 받는 개체의 연령, 신장, 체중, 건강 및 신체적 상태를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 유사하게, 투여될 본 발명의 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체, 또는 치료적 조성물의 양은 투여 방식, 및 대상체가 이 작용제의 단회 용량 또는 다회 용량을 받을 것인지에 의해 좌우될 것이다.

[0648] 본 개시는 예를 들면, 결장암, 흑색종, 유방암, 림프종, 비소세포 폐암종 호지킨 림프종, 비 호지킨 림프종, 및 버킷 림프종, 난소암, 유방암, 두경부암, 및 췌장암을 비롯한 암의 한 유형을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서, 본 발명의 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 치료적 조성물의 용도도 제공한다.

[0649] 본 개시는 암의 한 유형을 치료하기 위한 대상체 치료용 의약의 제조에 있어서, 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)의 용도도 제공한다. 특정 양태들에서, 이러한 의약은 적어도 하나의 다른 요법으로 사전 치료된 대상체에서 사용된다.

[0650] "사전 치료된" 또는 "사전 치료"는 대상체가 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)를 포함하는 의약을 제공받기 전에 하나 이상의 다른 요법을 제공받은 것(예를 들면, 적어도 하나의 다른 항암요법으로 치료받은 것)을 의미한다. 이러한 대상체가 이러한 이전의 요법 또는 요법들을 사용한 사전 치료에 대한 반응자였을 필요는 없다. 따라서, 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체를 포함하는 의약을 제공받는 대상체는 이전의 요법을 사용한 사전 치료, 또는 사전 치료가 다수의 요법들을 포함하는 경우 이전 요법들 중 하나 이상에 반응하였을 수 있거나, 반응하지 못하였을 수 있다.

[0651] 본 개시는 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체 또는 유도체(예를 들면, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 및 적어도 하나의 다른 요법의 공동 투여도 제공한다. 항-CD73 항체 및 적어도 하나의 다른 요법은 단일 조성물로 함께 공동 투여될 수 있거나, 별도의 조성물들로 동일한 시간 또는 중첩되는 시간에 함께 공동 투여될 수 있다. 일부 양태들에서, 이러한 항-CD73 항체는 예를 들어, PD-1(예정사 1 단백질)을 표적으로 하는 항체와 공동 투여될 수 있다. 본 개시는 또한 암 치료를 위한 대상체 치료용 의약의 제조에 있어서, 항-CD73 결합 분자, 예컨대, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 변이체, 또는 유도체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)의 용도로서, 이때, 이러한 항-CD73 결합 분자는 대상체가 적어도 하나의 다른 요법으로 치료 받기 전에 투여되는 것인 용도를 제공한다.

[0652] **VIII. 진단**

[0653] 본 개시는 CD73 발현 세포 매개성 질병, 예를 들면, 특정 유형의 암의 진단 중에 유용한 진단 방법으로서, 개체로부터의 조직 또는 다른 세포 또는 체액에서 CD73 단백질의 발현 수준을 측정하고, 측정된 발현 수준을 정상 조직 또는 체액에서의 표준 CD73 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 진단 방법으로서, 이때 표준과 비교한 발현 수준의 증가는 장애를 나타내는 것인, 진단 방법도 제공한다.

[0654] 본 설명에 개시된 항-CD73 항체 및 이의 항원 결합 단편, 변이체 및 유도체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)는 당업자에게 공지된 고전적인 면역조직학적 방법을 이용하여 생물학적 샘플에서 CD73 단백질 수준을 분석하는 데 이용될 수 있다(예컨대, Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol. 101*:976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096 (1987) 참조). CD73 단백질 발현을 검출하는 데 유용한 기타 항체 기반의 방법들로는 면역분석법, 예컨대, 효소결합 면역흡착 분석법(ELISA), 면역침전 또는 웨스턴 블롯팅을 포함한다. 적절한 분석법은 본 설명의 다른 부분에서 더욱 상세히 기술하고 있다.

[0655] "CD73 폴리펩타이드의 발현 수준을 분석하는"은 직접적으로(예를 들면, 절대적 단백질 수준을 측정하거나 추정함으로써) 또는 상대적으로(예를 들면, 제2 생물학적 샘플 중의 질병 관련 폴리펩타이드 수준과 비교함으로써) 제1 생물학적 샘플 중의 CD73 폴리펩타이드 수준을 정성적으로 또는 정량적으로 측정하거나 추정하는 것을 의미

한다. 제1 생물학적 샘플 중의 CD73 폴리펩타이드 발현 수준은 측정될 수 있거나 추정될 수 있고 표준 CD73 폴리펩타이드 수준과 비교될 수 있는데, 이때 이러한 표준은 장애를 갖지 않은 개체로부터 수득된 제2 생물학적 샘플로부터 수득되거나, 장애를 갖지 않은 개체들의 집단으로부터 수준들의 평균을 산출함으로써 결정된다. 당해 분야에서 인식될 바와 같이, 일단 "표준" CD73 폴리펩타이드 수준이 공지되어 있으면, 그것은 비교를 위한 표준으로서 반복적으로 이용될 수 있다.

[0656] "생물학적 샘플"은 CD73을 잠재적으로 발현하는 개체, 세포주, 조직 배양물 또는 다른 세포 공급원으로부터 수득된 임의의 생물학적 샘플을 의미한다. 포유동물로부터 조직 생검 및 체액을 수득하는 방법은 당해 분야에 잘 공지되어 있다.

[0657] **IX. CD73-결합 분자를 포함하는 키트**

[0658] 또한, 본 개시는 본 설명에 기술된 방법을 수행하는 데 이용할 수 있는, 본 설명에 기술된 CD73-결합 분자들, 예컨대, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 설명에 개시된 분자의 변이체, 또는 유도체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 중 적어도 하나를 포함하는 키트를 제공한다. 특정 양태들에서, 키트는 하나 이상의 용기 내에 적어도 하나의 정제된 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 양태들에서, 이러한 키트는 모든 대조군들, 분석을 수행하기 위한 설명서 및 결과의 분석 및 제시를 위한 임의의 필요한 소프트웨어를 비롯한, 검출 분석을 수행하는 데에 필요하고/하거나 충분한 모든 구성요소들을 함유한다. 당업자라면 개시된 CD73-결합 분자, 예를 들면, 본 개시의 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)이 당해 분야에 잘 공지되어 있는 확립된 키트 포맷들 중 하나 내로 용이하게 도입될 수 있음을 용이하게 인식할 것이다.

[0659] **X. 면역분석법**

[0660] 당해 분야에 공지된 임의의 방법으로 면역특이적 결합에 대해 본 설명에 개시된 항-CD73 결합 분자, 예를 들면, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 본 설명에 개시된 분자들의 변이체 또는 유도체(예컨대, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)를 분석할 수 있다. 이용할 수 있는 면역분석법은 몇 가지 예를 들면, 웨스턴 블롯, 방사성 면역분석법, ELISA(효소결합 면역흡착 분석법), "샌드위치" 면역분석법, 면역침전 분석법, 침전소 반응법, 겔 확산 침전소 반응, 면역확산 분석법, 응집 분석법, 보체-고정 분석법, 면역방사측정 분석법, 형광 면역분석법, 단백질 A 면역분석법과 같은 기법들을 이용하는 경쟁적 분석 시스템 및 비 경쟁적 분석 시스템을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이러한 분석법들은 통상적이며, 당해 분야에 잘 공지되어 있다(예를 들면, 그 전체가 본 설명에 참조로서 포함되는 Ausubel *et al.*, eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 참조).

[0661] CD73-결합 분자, 예컨대, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 그것들의 변이체 또는 유도체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체)는 CD73 또는 이의 보존된 변이체 또는 펩타이드 단편의 제자리(in situ) 검출을 위해 면역형광, 면역전자 현미경관찰 또는 비 면역학적 분석법에서와 같이 조직학적으로 이용될 수 있다. 제자리 검출은 환자로부터 조직학적 표본을 떼어내어, 표지된 CD73-결합 분자, 예를 들면, 항-CD73 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이의 변이체, 또는 유도체를 이러한 표본에 적용함으로써, 바람직하게는 표지된 CD73-결합 분자(예를 들면, 및 항체 또는 단편)를 생물학적 샘플 위에 올려놓아 적용함으로써 달성될 수 있다. 이러한 절차의 이용을 통해 CD73, 또는 보존된 변이체 또는 펩타이드 단편의 존재뿐만 아니라 검사된 조직에서의 그의 분포도 결정할 수 있다. 당업자라면 본 개시를 이용하여 이러한 제자리 검출을 달성하기 위해 매우 다양한 조직학적 방법들 중 임의의 조직학적 방법(예컨대, 염색 절차)을 변경시킬 수 있음을 용이하게 인식할 것이다.

[0662] 주어진 로트의 CD73-결합 분자, 예를 들면, 항-CD73 항체(예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편, 이의 변이체, 또는 유도체의 결합 활성은 잘 공지된 방법에 따라 결정할 수 있다. 당업자라면 통상적인 실험을 이용하여 각각의 결정을 위한 작동적 및 최적의 분석 조건을 결정할 수 있을 것이다.

[0663] 단리된 CD73-결합 분자, 예를 들면, 항-CD73 항체 예를 들어, 클론 10.3 항체 또는 클론 2C5 항체) 또는 이의 항원 결합 단편, 이의 변이체, 또는 변경된/돌연변이체 유도체의 결합 특성의 결정에 적합한 방법 및 시약은 당해 분야에 공지되어 있고/있거나 상업적으로 입수 가능하다. 이러한 동력학적 분석을 위해 설계된 장치 및 소프트웨어는 상업적으로 입수가능하다(예를 들면, 비아코어(BIAcore), 비아이밸류에이션(BIAevaluation) 소프트웨어, 지이 헬쓰케어(GE Healthcare); 킨엑사(KinExa) 소프트웨어, 사피딘 인스트루먼츠(Sapidyne Instruments)).

[0664] 달리 표시되어 있지 않은 한, 본 개시의 실시는 당해 분야의 기술 내에 해당하는 세포생물학, 세포 배양, 분자생물학, 형질전환 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 및 면역학의 통상적인 기법들을 이용할 것이다. 이러한 기법들은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들면, Sambrook *et al.*, ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription and Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); 및 Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.) 참조.

[0665] 항체 조작의 일반적인 원리는 Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2nd ed.; Oxford Univ. Press)에 기재되어 있다. 단백질 조작의 일반적인 원리는 Rickwood et al., eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.)에 기재되어 있다. 항체 및 항체-햅텐 결합의 일반적인 원리는 Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); 및 Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N.Y.)에 기재되어 있다. 추가적으로, 당해 분야에서 공지되어 있고 구체적으로 기재되어 있지 않은 면역학의 표준 방법은 일반적으로 Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) 및 Mishell and Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY)에 기재된 바에 따른다.

[0666] 면역학의 일반적인 원리를 기재한 표준 참고문헌 자료로는 Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevere, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) Kuby Immunnology (4th ed.; H. Freemand & Co.); Roitt et al. (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlan); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press)를 포함한다.

[0667] 위에 언급된 모든 참고문헌뿐만 아니라, 본 설명에 인용된 모든 참고문헌들은 그 전체가 참조로서 본 설명에 포함된다.

[0668] 다음의 실시예들은 제한의 목적이 아니라 설명의 목적으로 제공된 것이다.

[0669] **실시예**

[0670] 본 개시의 양태는 본 개시의 특정 항체들의 제조 및 본 개시의 항체를 이용하는 방법을 상세히 기술하는 다음의 비 제한적인 실시예를 참고함으로써 더 정의할 수 있다. 재료 및 방법 둘 다에 대한 많은 변경들이 본 개시의 범위를 벗어나지 않으면서 실시될 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다.

[0671] 엑토-5'-뉴클레오티드가수분해효소(NT5E)라고도 알려진 CD73(세포 표면 항원 무리 73)은 종양 세포뿐만 아니라 내피 세포 및 특정 백혈구와 같은 정상적인 기질 세포에서도 발견되는 막관통 수용체이다. CD73은 촉매 작용을 하여 아데노신 일인산을 아데노신과 유기 인산으로 바꾼다. 아데노신 수용체의 세포 외 부분의 결합은 고리형 AMP를 통해 신호를 전달하여 T 세포 수용체 활성화를 억제한다(Linden and Cekic, 2012에서 검토함). CD73은 조절성 B 림프구와 T 림프구의 억제 기능을 매개하는 데 있어서(Saze et al, 2013)뿐만 아니라, 내피 온전성을 유

지하는 데 있어서(Jalkanen and Salmi, 2008에서 검토함) 역할을 하는 것으로 여겨진다.

[0672] 정상적인 생물학에서의 역할 이외에도, CD73과 아데노신은 종양 생물학에 영향을 미친다. 종양 미세환경 내에서의 세포 외 아데노신의 존재는 면역억제성 "후광"으로 기술된 바 있다(Antonioli et al, 2013). 아데노신에 대한 이 역할과 일관되게, 아데노신 수용체가 결여된 녹아웃 마우스는 정상 마우스보다 더 용이하게 종양을 거부하는 것으로 밝혀졌다(Ohta et al, 2006). 종양 내에서의 세포 외 아데노신의 1차적 공급원은 CD73인 것으로 여겨진다(Augusto et al, 2013). 이러한 가설뿐만 아니라 A2A 결핍 마우스를 이용한 연구와도 일관되게, CD73이 결여된 녹아웃 마우스는 정상 마우스와 비교하여 증가된 항-종양 면역력을 나타내고(Stagg et al, 2011) 감소된 발암성을 보인다(Stagg et al, 2012). 구체적으로, 세포 외 아데노신은 무엇보다도 조절성 T 세포와 골수 유래 억제 세포(MDSC) 양자의 면역억제적 효과를 매개한다고 여겨진다(Antonioli et al, 2013에서 검토됨). 소분자 또는 항체를 이용한 CD73의 분자 억제가 종양 형성, 성장 및 전이를 억제할 수 있음을 보여주는 기타 연구들(Young et al, 2014에서 검토)과 종합하여 고려할 때, 종양이 CD73을 이용하여 아데노신을 생성하고, 그에 의해 항-종양 면역성을 저해한다고 추측된다. 따라서, CD73과 선택적으로 결합하여 CD73의 엑토뉴클레오티드분해효소 활성을 억제하는 항-CD73 항체는 항-종양 면역 반응을 증진시키는 데 유용할 것으로 예상된다.

[0673] **실시예 1: 항-CD73 항체의 단리 및 확인**

[0674] 인간 scFv 파지 디스플레이 라이브러리를 비오틴이 부착된 CD73 세포 외 도메인(ECD)으로 패닝하여 인간, 시노몰구스 및 뮤린 CD73과 결합하는 항체들을 단리하였다. 리드 항체인 CD730010은 (유동 세포분석법에 의해) 인간, 뮤린 및 시노몰구스 CD73 발현 세포와 특이적으로 결합하는 것으로 나타났고, 재조합 가용성 CD73 ECD뿐만 아니라 세포 위에 디스플레이된 자연 그대로의 CD73의 활성도 억제하는 것으로 나타났다. CD730010의 친화도 성숙을 개시하여 인간 CD73에 대한 CD730010의 결합 친화도를 증진시켰다.

[0675] 친화도 최적화 전에, CD730010의 다수의 기본틀 잔기들을 친화도를 손상하지 않고 (IMGT 레퍼토리를 기초로) 가장 가까운 인간 생식세포 서열들로 되돌리는 것을 시도하였다. 이것은 인간에서 최종 항체 약물의 잠재적인 면역원성을 최소화하기 위하여 이루어졌다. VL 도메인의 모든 기본틀 잔기들과 VH 도메인의 하나의 기본틀 잔기를 제외한 전부를 되돌려 인간 생식세포 IGLV1-44, IGLJ3, IGHV3-23, 및 IGHJ2의 아미노산 서열과 매치시킬 수 있었다. CD730010의 VH 도메인의 94번 위치(카밧 넘버링; Kabat, 1991)의 라이신은 친화도 손실 없이 되돌릴 수 없었다.

[0676] 생식세포화된 CD730010 항체의 친화도 및 효능은 CDR 변이체 라이브러리를 생성하고, CD73에 대한 개선된 결합에 대해 이러한 변이체들을 시험하여 최적화하였다. 친화도에 최고의 개선을 가져온 몇몇 돌연변이를 조합하여 후보 약물 MEDI9447을 생성하였다. MEDI9447의 뉴클레오티드 및 추론된 아미노산 서열을 도 1a 내지 도 1d에 나타냈다.

[0677] 기본적으로 이전에 Lloyd et al., PEDS 22:159-68 (2009)에서 기술된 바와 같이, 포유동물의 세포로부터 사내에서 생산한 비오틴이 부착된 인간 및 뮤린 CD73 세포 외 도메인(ECD) 상에서 일련의 반복된 교차 선택 사이클의 인간 scFv 파지 디스플레이 라이브러리로부터 CD73 특이적 scFv 항체를 단리하였다. 선택 결과물의 2라운드와 3라운드로부터의 scFv 유전자들을 배치에서 세균의 scFv-Fc 또는 Fab 발현 벡터로 전환시켰다. 가용성 scFv-Fc 또는 Fab를 담고 있는 세균 배양물 상층액을 ELISA 또는 균일한 시간차 형광(HTRF)으로 인간, 뮤린 및 시노몰구스 CD73 ECD에 대한 결합에 대해 스크리닝하였다. 교차 반응성을 보이는 최고 적중물을 선정하고, DNA 서열결정을 하고, 전체 면역 글로불린 G1 삼중 돌연변이체 항체 포맷("IgG-TM", 돌연변이 L234F, L235E 및 P331S를 포함하는 IgG1 Fc 서열)으로 전환시켰다. IgG1 TM 항체들을 포유동물의 세포에 발현시켜, 친화도 크로마토그래피로 정제하고, 결합 및 기능 분석법에서의 특징을 기초로 하여 순위를 매겼다.

[0678] **실시예 2: 항-CD73 항체의 에피토프 비닝**

[0679] 기본적으로 기술된 바와 같이(Abdiche YN et al., Anal Biochem 386: 172-80 (2009)) 항-CD73 항체들이 인간 CD73 ECD에 대한 결합을 두고 서로 경쟁하는 능력을 옥텟(Octet) 기기로 평가하였다. CD73 ECD 단백질 및 제1의 항-CD73 항체를 사전 인큐베이션하고, 스트렙타비딘 센서 위에 포획된, 비오틴이 부착된 제2의 항-CD73 항체에 첨가하였다. 제1의 항-CD73 항체가 CD73 ECD의 제2의 항-CD73 항체의 결합을 차단하면, 두 항체들을 동일하거나 중첩되는 에피토프 빈에 넣었다. 두 항체가 모두 동시에 CD73 ECD와 결합할 수 있다면, 그것들은 비 중첩 에피토프 빈에 위치시켰다. 이러한 항-CD73 항체의 쌍별 시험은 그것들이 3개의 비 중첩 에피토프 빈에 속한다는 점을 증명하였다(표 2).

표 2

[0680] 항-CD73 항체의 에피토프 빈

에피토프 빈	항체
A	CD730002, CD730004, CD730008, CD730011
B	CD730003, CD730010, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047
C	CD730068, CD730069

[0681] **실시예 3: 항-CD73 항체의 CD73에 대한 결합**

[0682] 항-CD73 항체의 결합 친화도 및 특이성을 표면 플라즈몬 공명(SPR) 및 유동 세포분석법으로 결정하였다.

[0683] 프로테온(ProteOn) XPR36 기기를 이용하여 MEDI9447의 인간, 뮤린 및 시노몰구스 CD73 ECD에 대한 결합 특성을 규명하였다. 항-인간 Fc 항체를 이용하여 MEDI9447을 친화도 포획하였다. CD73 ECD은 이동상에 있었다. MEDI9447에 대한 CD73의 결합 및 해리는 랭뮤어(Langmuir) 1:1 모델로 정확히 설명할 수 있었다. 표 3으로 나타낸 결과는 세 종으로부터의 CD73 ECD에 대한 MEDI9447의 친화도가 비슷하며, 낮은 피코몰 범위에 있음을 보여준다.

표 3

[0684] 표면 플라즈몬 공명으로 결정한 CD73 ECD에 대한 MEDI9447의 친화도

피분석물	**k_a ($M^{-1}s^{-1}$)**	**k_d (s^{-1})**	**K_D (M)**
인간 CD73 ECD	2.57×10^{6}	1.06×10^{-5}	4.1×10^{-12}
뮤린 CD73 ECD	2.41×10^{6}	2.32×10^{-6}	0.9×10^{-12}
시노몰구스 CD73 ECD	2.71×10^{6}	1.76×10^{-5}	6.5×10^{-12}

[0685] k_a 결합 속도 상수; k_d 해리 속도 상수; K_D 해리 상수

[0686] 인간, 뮤린 및 시노몰구스 원숭이 세포주에서 발현된 자연 그대로의 CD73에 대한 MEDI9447의 결합의 특징을 유동 세포분석법으로 규명하였다. 세포들을 다양한 농도의 MEDI9447과 배양하여, 항체 결합을 형광단이 표지된 항-인간 Fc 항체로 모니터하였다. 중앙값의 형광 강도를 MEDI9447 농도의 함수로 나타낸 도표를 한 자리 결합 등온 모델을 이용하여 비 선형적으로 적합화하여 평형 해리 상수를 계산하였다. 유동 세포분석법에 의한 분석은 인간, 뮤린 및 시노몰구스 CD73에 대한 MEDI9447의 결합이 비슷한 친화도를 나타냄(표 4)을 확인해 주었으나, K_D 값은 SPR로 결정한 값보다 13 내지 126배 더 컸다. 이는 아마도 재조합 CD73과 자연 그대로의 CD73 사이의 입체형태 차이 때문일 것이다.

표 4

[0687] 유동 세포분석법으로 결정한 자연 그대로의 CD73에 대한 MEDI9447의 친화도

피분석물	**K_D (M)**
MDA-MB-231 세포(인간)	154×10^{-12}
4T1 세포(뮤린)	113×10^{-12}
MK-1 세포(시노몰구스)	84×10^{-12}

[0688] 유동 세포분석법으로 인간 CD73에 대한 MEDI9447의 특이성을 결정하기 위하여, 세포주를 개발하였다. 가슴막 삼출로부터 유래된 인간 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포를 인간 CD73 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)로 형질감염시켜 CD73의 세포 표면 발현을 녹다운시켰다. 버킷 림프종 세포로부터 유래된 T 세포의 한 계열인 저캇 세포는 인간 CD73 mRNA를 발현하는 플라스미드로 형질감염시켜 CD73의 세포 표면 발현을 녹인(knock in)시켰다. 저캇 세포는

내인성 CD73을 거의 발현하지 않는다.

[0689] 인간 CD73에 대한 MEDI9447의 특이성을 낮은 CD73 발현 세포주(MDA-MB-231, CD73-shRNA)에 대한, 높은 CD73 발현 세포주(MDA-MB-231)에 대한 MEDI9447의 결합의 비율로 결정하였다. 또한, 인간 CD73에 대한 MEDI9447의 특이성을 낮은 CD73 발현 세포주인 저캇에 대한 높은 CD73 발현 세포주(저캇-CD73 녹인)의 비율로 결정하였다.

[0690] 뮤린 CD73(mCD73)에 대한 MEDI9447의 특이성을, 마우스 세포주 4T1(높은 mCD73 발현)을 녹다운된 세포주(4T1 mCD73 -shRNA)와 비교하는 유동 세포분석법으로 결정하였다. 또한, 뮤린 CD73 녹인시킨 저캇 세포에 대한 MEDI9447의 특이성을 야생형 저캇 세포(뮤린 CD73 없음)과 비교하였다.

표 5

[0691] 인간 및 마우스 CD73에 대한 MEDI9447의 특이성

MEDI9447의 특이성	세포주 관계	평균 형광 강도 비율(MFIR)
인간	MDA-MB-231 / MDA-MB-231(CD73-shRNA)	3.5
인간	저캇(CD73 녹인) / 저캇	7.9
마우스	4T1 / 4T1(mCD73 -shRNA)	3.9
마우스	저캇(mCD73 녹인) / 저캇	57.1

[0692] **실시예 4: 항-CD73 항체 MEDI9447에 의한 CD73의 내재화**

[0693] CD73의 항체 매개성 내재화 또는 분배(shedding)를 유동 세포분석법으로 평가하였다. 0 내지 4시간 동안 37℃의 성장 배지 내에 100 nM MEDI9447 또는 음성 대조군 항체 R347의 존재 하에 MDA-MB-231 세포를 항온배양하였다. 세포를 세척하고, 얼음처럼 차가운 PBS에 재현탁시켰다. 10 nM의 DyLight488 표지된 검출 항체를 첨가하여 세포 표면에서의 CD73의 존재를 조사하였다. 세포를 15분 동안 배양하고, 세척하여, 유동 세포분석법으로 분석하였다. 검출 항체는 MEDI9447 에피토프와는 상이한 CD73의 에피토프와 결합하며, 두 항체는 간섭없이 동시에 CD73과 결합한다. CD73의 세포 표면 발현은 MEDI9447과의 4시간의 배양 후 본래의 값의 73%까지 감소하여, MEDI9447 결합 시 CD73의 27%가 내재화되었거나 분배되었음을 시사하였다(오류! 참고 출처 미발견).

표 6

[0694] 시험 항체와의 배양 후 MDA-MB-231 세포의 세포 표면에 남아있는 CD73의 백분율

시간[h]	R347	MEDI9447
0	100%	100%
0.25	107%	90%
0.5	104%	90%
1	102%	87%
2	104%	80%
4	102%	73%

[0695] 상업적으로 FabZAP 분석(어드밴스드 타케팅 시스템즈(Advanced Targeting Systems, 미국 캘리포니아 주 샌디에이고)으로 판매되고 있는 인간 항체 내재화 키트를 이용하여 세포주 MDA-MB-231(인간 유방 암종) 및 4T1(뮤린 유방 암종)로의 MEDI9447의 내재화를 평가하였다. MEDI9447 또는 음성 대조군 항체 R347의 단계별 희석액을 40 nM FabZAP 시약(세포독성 단백질 사포린에 접합시킨 다클론성 항-인간 IgG 항체의 Fab 단편)과 사전 인큐베이션한 다음, 세포주에 첨가하였다. 배양액에서 3일 후, 상업적으로 셀타이터-글로(CellTiter-Glo) 분석법(프로메가(Promega), 미국 위스콘신 주 매디슨)으로 판매되는 발광 세포 생존능력 분석법을 이용하여 세포 증식을 측정하였다. 이 분석법을 이용하여 EC_{50} 값과 최대 독성을 계산하였다. FabZAP 시약은 단독으로는 세포 내로 내재화할 수 없다. 그것은 시험 항체(예컨대, MEDI9447)와 결합하며, 시험 항체의 내재화 시에만 세포독성을 나타낸다. MEDI9447은 FabZAP의 내재화를 유발하였으며, 용량 의존적인 방식으로 세포 증식을 억제하였다.

표 7

[0696] 세포독성 FabZAP 시약의 MDA-MB-231 세포 및 4T1 세포로의 항체 매개성 내재화

	MDA-MB-231		4T1	
	EC_{50} [pM]	최대 독성	EC_{50} [pM]	최대 독성
MEDI9447	3.5	97%	18.5	97%

[0697] 시험 항체의 단계별 희석액 및 FabZAP 시약을 처리한 MDA-MB-231 세포와 4T1 세포의 세포 증식을 셀타이터-글로 분석법으로 측정하였다(도 2). 셀타이터-글로 분석법에서 음성 대조군 항체 R347로부터의 신호를 MEDI9447의 신호에서 감산하였고, 비 선형 회귀 분석을 이용하는 용량-반응 곡선을 적합화하여 EC50 값과 최대 독성을 계산하였다.

[0698] **실시예 5: 항-CD73 항체 MEDI9447에 의한 5'엑토뉴클레오티드분해효소 활성의 억제**

[0699] 본 연구에서는, 인간 비소세포 암종 세포주 NCI-H322를 이용하여 AMP의 CD73 촉매화 가수분해를 측정한 시험관내 분석법으로 MEDI9447의 기능적 활성을 결정하였다. MEDI9447의 모액을 무혈청 RMPI 배지로 1 μM의 최대 농도까지 희석하여 MEDI9447의 제형을 제조하였다. R347의 모액을 RPMI로 1 μM의 최대 농도까지 희석하여 R347의 제형을 제조하였다.

[0700] NCI-H322 세포를 1500 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고, 무혈청 RPMI 배지로 교체하였다. 비셀(ViCell, 벡만(Beckman), 쿨터(Coulter)) 세포 계수기를 이용하여 세포 현탁액을 계수하였다. 웰당 100 μL 당 10,000개 세포의 세포 밀도로 96웰 플레이트에 세포를 플레이팅하였다. 그런 다음, 플레이트를 37℃, 5% CO_2에서 24시간 배양하였다. 플레이트를 원심분리하고, 배양액 상층액 50 μL를 96웰의 불투명 둥근바닥 플레이트로 웰마다 옮겼다. 그런 다음 2X ATP를 첨가하였다. 제조사의 설명서에 따라 셀타이터글로(CellTiterGlo®)(프로메가)를 첨가하였다. 다중표지 판독기인 퍼킨-엘머 인비젼 워크스테이션으로 5'엑토뉴클레오티드분해효소의 세포 효소 억제를 측정하였다. 프리즘(Prism) 소프트웨어를 이용하여 샘플을 분석하였다.

[0701] MEDI9447은 인간 시험관 내 시스템에서 아데노신 일인산(AMP)의 탈인산화를 특이적으로 억제하였다. 표면 발현된 CD73의 세포 기반의 분석에서, 아데노신 일인산의 아데노신으로의 전환은 MEDI9447에 의해 용량 의존적인 방식으로 감소되었으나, 관련없는 이소형인 대조군 항체에 의해서는 그렇지 않았다(도 3). 도 3에 도시된 결과는, 96웰 비 조직 배양물 처리된 플레이트(팔콘(Falcon) 3788)에 첨가제 없이 RPMI 배지 100 μL에 웰당 10,000개의 세포로 플레이팅한, CD73을 발현하는 NSCLC 세포를 이용하여 얻었다. 항체를 AMP(최종 농도 200 μM)와 함께 2반복(duplicate)으로 첨가하고, 플레이트를 37℃, 5% CO_2에서 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 플레이트를 1500 rpm에서 3분 동안 원심분리하였다. 상층액을 새로운 96웰 플레이트(코스타(Costar) #3605)에 수집하고, ATP를 최종 농도 100 μM까지 첨가하였다. 셀타이터-글로 시약(프로메가)을 1:1로 첨가하고, 인비젼 발광 플레이트 판독기(퍼킨 엘머)를 이용하여 ATP 수준을 측정하여 세포 CD73 효소 AMP 가인산분해효소 활성을 결정하였다. ATP와 AMP만을 함유하는 완충액을 음성 대조군으로 이용하였다. 분석을 반복하였으며, 도 3에 나타낸 결과는 다른 인간 암 세포주를 이용한 두 개의 비슷한 실험을 나타낸 것이다.

[0702] 이들 결과는 MEDI9447이 암 세포에 의한 아데노신의 생산을 억제하였음을 나타낸다. 아데노신은 종양 미세환경 내에서 종양의 면역억제적 효과를 매개하는 것으로 여겨진다.

[0703] **실시예 6: MEDI9447에 의한 종양 침투성 골수 유래 억제 세포의 감소**

[0704] 뮤린 결장암으로부터 유래된 CT26 세포를, PBS 0.1 mL에 현탁시킨 $5x10^5$개 세포를 4내지 6주령의 암컷 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하(SC) 주사하여 확립하였다. 마우스를 MEDI9447 또는 대조군 항체로 처리하였다.

[0705] 본 연구에서는 군당 10마리의 마우스를 이용하였다. 동물을 무작위로 군별로 배정하였다. 1군의 동물은 처리하지 않았고, 2군은 이소형 대조군을 투여 받았다. MEDI9447은 3군에 투여되었다. 시험 물품은 3일차에 개시하여 주 2회 복강 내로 투여하였다. 16일차에 각 군으로부터 5마리의 동물들을 해부하고, 종양을 분리하였다.

[0706] 군 지정 및 용량 수준을 표 8에 나타냈다.

표 8

[0707] 군 지정 및 용량 수준

군	동물의마릿수(암컷)	처리	투약일	용량 수준 (mg/kg) [a]	ROA
1	5	처리하지 않음	N/A	N/A	N/A
2	5	이소형	주 2X	20 mg/kg	IP
3	5	MEDI9447	주 2X	10 mg/kg	IP

[0708] N/A = 해당 없음; ROA = 투여 경로.

[0709] 종양을 1, 7, 9, 12, 14, 및 16일차에 캘리퍼로 측정하였고, 종양의 부피를 다음과 같이 계산하였다:

[0710] (1) (종양 부피 길이(mm) x (종양 부피 너비)^2 (mm)) / 2

[0711] MEDI9447의 항암효과를 다음과 같이 계산한 퍼센트 종양 성장 억제로 나타냈다:

[0712] (2) (MEDI9447에 대한 평균 종양 부피/ R347-TM에 대한 평균 종양 부피) x100

[0713] 유동 세포분석법을 위해 종양을 분리하였다. 종양은 연구일 16일차에 CT26 종양을 품고 있는 마우스로부터 절제하였다. 종양을 작은 조각들로 잘라서 콜라겐분해효소로 소화시켰다. 30분의 배양 후, 소화된 샘플들을 70 미크론의 필터 사이로 통과시켰다. 해리된 세포들을 4℃에서 5분 동안 1000 rpm에서 펠릿화하였고, 형광 활성화 세포 분류(FACS) 완충액에 재현탁시켰다. 디폴트 셋팅을 이용하여 세포를 비-셀(Vi-Cell)로 계수하였다. 웰당 1x10^{6}개의 세포를 플레이팅하였다. 세포를 (모든 백혈구를 검출하기 위하여) 항-CD45, (MDSC를 검출하기 위하여) 항-GR1 및 항-Ly6g(Gran MDSC)로 염색하였다. LSRII 유동 세포분석기로 데이터를 얻었다. MDSC 분석으로부터 얻은 유의한 p값은, 만약 있다면, 기술통계학(즉, 평균 및 표준 편차)에 가까운 도 4로 제시하였다.

[0714] MEDI9447은 뮤린 CT26 동계 Balb/C 종양 모델에서 종양 성장을 억제하였다(도 4).

[0715] MEDI9447은 뮤린 CT26 동계 Balb/C 종양 모델에서 종양 침투성 MDSC의 비율을 감소시켰다(도 5).

[0716] MEDI9447은 CT26 뮤린 동계 종양의 성장을 억제하였다. 또한, MEDI9447 처리 후 동계 CT26 결장 암종 종양에서 골수 유래 억제 세포가 감소되었다. 종양 내 MDSC는 종양 미세환경에 면역억제적 효과를 나타내, 증진된 종양 성장을 가능하게 한다. MEDI9447 처리 후 종양 내 MDSC에서 관찰된 감소는 MEDI9447 처리가 종양 면역 억제를 감소시키는 기전을 보여준다.

[0717] **실시예 7: MEDI9447 mIgG1과 항-PD-1 항체의 조합물은 종양 성장을 감소시키고 생존기간을 증가시켰다.**

[0718] 8 내지 10주령 동물의 오른쪽 옆구리에 HBSS에 현탁시킨 5×10^{6}개 CT26 세포/ml 0.1 ml를 피하(SC) 주사하여 동계 종양을 확립하였다. 캘리퍼로 종양을 측정하였고, 종양의 부피(TV)를 다음 식을 이용하여 계산하였다:

[0719] (1) $TV = (L \times W^2) / 2$

[0720] 여기서, L은 종양 길이(밀리미터)이고, W는 종양 너비(밀리미터)이다.

[0721] 마우스를 체중을 기초로 군별로 무작위화하였다. 어떠한 동물 교환도 없었다. 60마리의 암컷 Balb/c 마우스를 본 연구에 사용하였다.

[0722] 동물들을 무작위로 6개 군으로 배정하였다. MEDI9447(mIgG1)을 동물에게 투여하였다. 시험 물품을 3일차에 시작하여 주 2회 복강 내(IP) 주사로 투여하였다. 군 지정 및 용량 수준을 표 9에 나타냈다.

표 9

[0723] 군 지정 및 용량 수준

군	동물의 마릿수 (암컷)	처리	투약 스케줄(주 2x)	용량 수준 (mg/kg) [a]	ROA
1	10	처리하지 않은	NA	NA	NA
2	10	이소형 mIgG1	4회 용량	10	ip
3	10	이소형 rIgG2a	4회 용량	10	ip

4	10	MEDI9447 mIgG1	4회 용량	10	ip
6	10	항-PD1	4회 용량	0.5	ip
7	10	PD1 + MEDI9447	4회 용량	0.5 + 10	ip

[0724] F = 암컷; IV = 정맥 내; M = 수컷; ROA = 투여 경로.

[0725] [a]용량 부피: 10 mL/kg.

[0726] (a) 생체 내 종양 억제 연구의 결과

[0727] CT26 뮤린 결장 암종을 동계 Balb/C 마우스에 이식하고, 항-CD73(MEDI9447 mIgG1), 항-PD1 또는 조합물을 처리하였다. 조합물 처리는 항-CD73 단독에 비해 종양 성장을 유의하게 억제했다(p = 0.015, ANOVA). 각 군의 동물들의 종양 부피를 개별 동물들에 대해 연구일 40일차까지 그래프로 나타냈다. 40일의 연구 기간 종료시까지 어떠한 대조군의 마우스도 종양이 없지 않았다. 항-CD73 단독 처리는 연구 종료시 10%의 무종양 동물이라는 결과를 가져왔다. 항-PD1 단독 처리 또한 연구 종료시 10%의 무종양 동물이라는 결과를 가져왔다. 놀랍게도, 항-CD73과 항-PD 조합물의 처리는 60%의 무종양 동물의 결과를 초래했다. 연구 종료시까지 대조군의 어떠한 마우스도 종양이 없지 않았다. 항-CD73(MEDI9447 mIgG1), 항-PD1 또는 항-CD73과 항-PD1의 조합물로 처리한 마우스에서 CT26 종양을 측정하였다. 연구일 40일까지 마우스를 측정하였고, 일단 종양이 2000 mm^3에 이르면 인도적으로 마우스를 희생시켰다. 항-CD73과 항-PD1 처리를 서로 조합하자 항-CD73 또는 항-PD1 처리 단독과 비교하였을 때(각각 p 값 = 0.005 및 p = 0.038, 로그 순위 검정) 통계적으로 유의한 생존기간 증가가 초래됐다(도 7). 중앙 생존기간은 조합의 경우 40일에서의 "정의되지 않음"과 비교하여 25일과 33일(각각 항-CD73과 항-PD1)로부터 증가하였다(표 10).

표 10

[0728] 연구일 40일에서의 결과

처리	무종양 마우스(%)	생존(%)
미처리	0	0
이소형 mIgG1	0	0
이소형 rIgG2a	0	0
항-CD73	10	10
항-PD1	10	20
항-CD73 + 항-PD1	60	70

[0729] 요약하면, 항-CD73 항체인 MEDI9447 mIgG1은 뮤린 동계 CT26 결장 암종 모델에서 항-PD-1 항체와 조합될 때 증진된 항종양 활성을 나타냈다. 또한, 항-CD73과 항-PD 처리의 조합은 60% 무종양 마우스를 초래했다. 또한, 항-CD73과 항-PD 처리를 서로 조합한 것은 항-CD73 또는 항-PD1 처리 단독과 비교할 때 생존기간의 통계적으로 유의한 증가를 초래했다.

[0730] **실시예 8:** 항-PD-1은 종양 세포(도 9), 골수 유래 억제 세포(MDSC) 및 종양 침투성 CD4+, FoxP3+ 림프구(도 15)에서의 CD73 발현으로 측정한 바에 따르면 CD73이 풍부한 종양 미세환경을 유도했다.

[0731] 동계 B16F10 흑색종 세포 또는 동계 EG7-OVA 림프종 세포를 피하(SC) 주사하여 동계 종양을 확립하였다. 주 2회 MEDI9447(10 mg/kg), 항-PD-L1 항체 (10 mg/kg), 또는 MEDI9447(10 mg/kg)과 항-PD-L1 항체(10 mg/kg)의 조합물을 마우스에 처리하였다. 주 2회 종양 부피를 측정하였다. MEDI9447과 항-PD-L1을 조합 투여는 흑색종 종양(도 12) 및 림프종 종양(도 13)에서 유의하게 종양 성장 억제를 증진시켰다.

[0732] 종양 미세환경에 미치는 항-PD-L1의 영향을 이해하기 위하여, 림프구 상에서의 CD73 발현을 연구했다. 동계 CT26 결장직장 세포를 마우스에 피하 주사하고(n=4), 주 2회 kg당 10 mg의 항-PD-L1 또는 관련 없는 이소형 대조군 항체를 처리하였다. 1차 처리 1일 후 유출 림프절로부터 세포를 단리하고, 유동 세포분석법으로 표면 표현형을 분석하였다. 1차 처리 3일 후 종양을 단리하고, 세포를 해리시켜 유동 세포분석법으로 표면 표현형을 분석하였다. 유출 림프절 B 림프구(도 14) 및 종양 침투성 CD4+, FoxP3+ 림프구(도 15)에서의 CD73의 표면 발현으로

측정한 바에 따르면, 항-PD-L1은 CD73이 풍부한 종양 미세환경을 유도하였다.

[0733] 결장직장 CT26 동계 종양을 품고 있는 마우스를 주 2회 MEDI9447(30 mg/kg) 또는 항-PD-L1(30 mg/kg) 또는 MEDI9447(30 mg/kg)과 항-PD-L1(30 mg/kg)의 조합물로 처리하였다. 16일 차에, 종양 및 말초 전혈액 세포를 채취하고, 유동 세포분석법에 의한 표면 CD73 발현 및 효소 활성을 분석하였다. MEDI9447 단독 또는 항-PD-L1과의 조합은 말초 전 혈액 세포(도 16), 종양 침투성 CD4+, FoxP3+ 림프구(도 17) 및 종양 침투성 CD8+ 림프구(도 18)에서의 CD73 발현을 감소시켰다. 또한, MEDI9447 단독 또는 항-PD-L1과의 조합은 종양 세포에서의 CD73 발현을 감소시켰다(도 19).

[0734] MEDI9447 및, CTLA4, OX40, PD-1, 및 PD-L1에 특이적인 항체 또는 융합 단백질을 72시간 동안 혼합 백혈구 반응에서 원발성 인간 말초 혈액 단핵 세포와 배양하였다. 2반복(duplicate)의 상층액에서 지시된 사이토카인을 ELISA로 정량하였다. 나타낸 데이터는 4개의 상이한 파트너 작용제와 항-CD73 항체의 최적의 용량 조합을 나타낸다. 항-PD-1과 항-CD73 조합은 블리스 표면 반응법(Zhao et al.)으로 결정한 바에 따르면 유의한($p<0.05$) 상승작용을 나타냈다(도 20). 사이토카인 프로파일은 골수계와 림프계 둘 다 영향을 받았음을 나타낸다. 50개 초과의 공여자 쌍을 시험하였다.

[0735] 요약하면, 항-PD-1 및 항-PD-L1 항체는 말초에서 검출 가능하며 항-CD73 항체, MEDI9447 mIgG1 처리에 의해 되돌릴 수 있는, CD73이 풍부한 종양 미세환경을 만들어냈다. 구체적으로, 뮤린 CT26 종양을 품고 있는 마우스를 항-PD-1 또는 항-PD-L1 항체로 처리하였을 때 CD73 세포 표면 발현 및 효소 활성 수준은 이들 종양에서 극적으로 증가하였다. 나아가, 발현 및 활성 수준은 항-CD73 항체 MEDI9447 단독 또는 항-PD-L1 항체와의 조합 처리에 의해 감소되었다. 이러한 변화는 두 종양뿐만 아니라, 순환하는 말초 전 혈액 세포에서도 관찰되었다. 따라서, CD73 발현 및 활성은 항-PDL1 처리와 항-CD73 처리 둘 다의 약물역학적 마커로서, 또는 조절되지 않는 CD73 발현 및 활성에 의해 종양이 "회피된" 항-PD-1 또는 항-PD-L1 처리 환자들의 세분화를 위한 예측 바이오마커로서 작용할 수 있다. 중요한 것은, 항-PD1 또는 항-PD-L1, MEDI 4736과 조합된 항-CD73 항체, MEDI9447은 증진된 항종양 활성을 나타냈다는 것이다.

[0736] 종합하면, 이들 결과는 다양한 수단에 의해, 항-PD-1 및 항-PD-L1 항체들이 "CD73이 풍부한" 종양 미세환경을 유도하며, PD-1/PD-L1 축을 표적으로 하는 치료법과 MEDI9447을 조합하는 강력한 근거를 제공한다는 점을 확인해 준다.

[0737] **실시예 9: 항-CD730010 항체 및 항체 변이체**

표 11

[0738] 모 항-CD730010 항체 및 항체 변이체의 생식세포화된 아미노산과의 친화도

항체 변이체	VL 위치의 아미노산					VH 위치의아미노산	EC50 [nM]
	1	2	11	37	39	94	
CD730010	L	P	V	K	V	R	69
CD730010 GL9	Q	S	A	Q	L	R	64
CD730010 GL10	L	P	V	K	V	K	205
CD730010 GL18	Q	S	A	Q	L	K	132

[0739] CD730002의 경우, 가장 가까운 생식세포 유전자는 VH 도메인에 대해서는 IGHV3-23과 IGHJ3, 그리고 VL 도메인에 대해서는 IGLV3-1과 IGLJ3이었다. CDR 부위 외부의 네 개의 비 생식세포 잔기들을 확인하였다: VH의 R94 및 VL의 T20, R57, L81 및 F87(카밧 넘버링)(표 11). CD730002 IgG1-TM 발현 벡터의 뉴클레오티드를 표준 분자 생물학 기법으로 역돌연변이시켜, 그 결과에 따른 발현 벡터들이 이들 위치의 생식세포 아미노산을 암호화하였다(VH의 K94 및 VL의 S20, G57, M81, 및 Y87). CD730002 IgG1-TM 단백질 변이체들을 발현시키고, 정제하여, 유동 세포분석법으로 재조합 인간 및 뮤린 CD73과의 결합을 시험하였다. VL의 모든 네 개의 비 생식세포 아미노산들은 결합을 손상시키지 않고 생식세포 잔기들로 변경될 수 있었다. 그러나, VH의 R94는 결합에 중요하며, 그것을 K로 변경하자 결합이 손상되었다. 변이체 CD730002 SGMY(비 생식세포화된 V, 완전히 생식세포화된 VL) 는 친화도 최적화된 항체 변이체를 생성하기 위한 주형으로 이용하였다.

[0740] **실시예 10: 항-CD73 항체 CD730010GL9의 친화도 최적화**

[0741] 단일 아미노산 돌연변이를 가지는 변이체 CDR 서열들을 포함하는 Fab 라이브러리를 스크리닝하여 CD730010GL9

IgG1-TM을 최적화하였다. 6개의 CDR의 61개 위치 각각을 개별적으로 19개의 아미노산(시스테인을 제외한 모든 천연 아미노산)으로 무작위화하여, 이론적으로 다양한 1159개의 독특한 클론(위치당 19개 아미노산 곱하기 61개 위치)을 가지는 라이브러리를 생성하였다. 이러한 라이브러리의 4224개 클론들로부터 세균 Fab 단편을 생성하고, 포획 ELISA로 인간 및 뮤린 CD73 단백질과의 결합에 대해 스크리닝하였다(분석 2). 모 CD730010 GL9 IgG1-TM에 비해 증가된 결합 신호를 나타내는 180개 클론들을 선정하고, VH 또는 VL 도메인의 돌연변이들을 DNA 서열결정으로 확인하였다. 세균 상층액의 Fab 농도를 정규화하고, 정규화된 상층액의 인간 및 뮤린 CD73 단백질과의 결합을 직접적 ELISA로 평가하였다(분석 1). 표 12는 선택된 유익한 단일 아미노산 치환 및 그것들이 재조합 CD73 단백질과의 결합에 미치는 영향을 나열한 것이다.

표 12

[0742] 개선된 친화도를 나타내는 CD730010 GL9의 단일 아미노산 변이체

CDR	아미노산 변경	ELISA 신호, 모 항체에 대한 개선 배수	
		huCD73	muCD73
L1	P32E	27.7	6.7
L1	P32D	11.7	6.5
H3	Y102K	9.9	7.4
L2	N51D	8.9	4.5
H2	G54N	8.9	7.1
H2	S52W	8.9	4.4
H3	Y102M	7.9	6.3
H3	Y102L	7.3	5.8
L2	S56G	7.1	5.6
L2	N51A	6.7	2.5
H3	Y102A	6.6	5.0
L1	P32G	6.1	5.8
L1	P32A	6.0	5.5
L2	Q53L	6.0	3.8
L2	Q53Y	5.8	2.3
L2	P55L	5.7	4.3
H2	S56R	5.6	4.9
L2	N51Q	4.2	2.3
H2	G54W	4.2	3.7
H2	A50L	4.2	3.0
L2	Q53F	4.1	2.7
H1	M34Y	3.9	2.9
L2	P55I	3.7	3.2
H3	Y102Q	3.6	3.0
L2	Q53W	3.1	2.7
L2	Q53H	2.4	1.9
L2	L50F	2.2	1.4
H1	S35H	1.8	1.1
H1	M34I	1.5	1.1

[0743] 항-CD73 항체의 친화도를 더 개선하기 위하여, 모 CD730010 GL9에 비해 결합을 개선한 몇몇 단일 아미노산 변경을 결합하여 조합 Fab 라이브러리를 만들었다(분석 4). 이러한 조합 라이브러리의 4224개 클론들의 Fab 단편들을 대장균에서 생산하여, 포획 ELISA로 인간 및 뮤린 CD73 단백질과의 결합에 대해 스크리닝하였다. 추가적인 특징 규명을 위해 각 스크리닝 분석에서 최고의 20개 클론들을 선택하였다. 상층액의 Fab 농도를 정규화하고, 정규화된 상층액의 단계별 희석액을 인간 및 뮤린 CD73과의 결합에 대해 포획 ELISA 및 직접적인 ELISA로 시험하였다. 클론 C1, C2, D3 및 G10은 인간 및 뮤린 CD73에 대해 강한 결합을 보였으며, 이들을 추가적인 특징 규명을 위해 선택하였다.

[0744] CD730010 GL9의 항원 결합 또한 친화도 기반의 파지 선택을 이용하여 최적화하였다. 기술된 바와 같은(Finch et al., JMB 411, 791-807 (2011)) 표준 분자 생물학 기법을 이용하여 가변 무거운(VH) 상보성 결정 부위 3(CDR3) 또는 가변 경쇄(VL) CDR3의 올리고뉴클레오티드 특이적 돌연변이 유발에 의해 리드 CD730010 GL9 서열로부터 유

래된 대규모 scFv 라이브러리를 만들었다. 이러한 라이브러리를 비오틴이 부착된 인간 및 뮤린 CD73 세포 외 도메인 단백질을 이용한 일련의 반복된 교차 선택 사이클에서 패닝하였다. 선택 결과물의 3라운드로부터의 scFv 유전자들을 세균 IgG 발현 벡터로 배치 전환시켰다. 가용성 IgG를 함유하는 세균 배양물 상층액을 대상으로 인간 및 뮤린 CD73과의 결합에 대해 스크리닝하였다. 모 CD730010 GL9와 비교하여 유의미하게 개선된 CD73과의 결합을 나타내는 IgG 변이체들을 DNA 서열결정하였다. 두 개의 변이체 GRVE 및 HPT를 추가적인 특징 규명을 위해 선택하였다.

[0745] 추가적인 친화도 개선을 이루기 위해, 조합 Fab 라이브러리 및 친화도 기반의 파지 선택으로부터 확인된 유익한 돌연변이들을 조합하여 변이체 73콤보1 내지 73콤보6을 생성했다.

[0746] **실시예 11: 항-CD73 항체 CD730002SGMY의 친화도 최적화**

[0747] CD730010GL9에 대해 기술한 바와 같이, 단일 아미노산 돌연변이를 가지는 변이체 CDR 서열들을 포함하는 Fab 라이브러리를 스크리닝하여 CD730002SGMY IgG1-TM을 최적화하였다. 재조합 CD73에 대해 증가된 결합 신호를 초래하는, VH 도메인의 다섯 개 아미노산 돌연변이 및 VL 도메인의 네 개 아미노산 돌연변이가 확인되었다. 표 13은 유익한 단일 아미노산 치환 및 그것들이 재조합 CD73과의 결합에 미치는 영향을 나열한 것이다.

표 13

[0748] 개선된 친화도를 나타내는 CD730002SGMY의 단일 아미노산 변이체

CDR	아미노산 변경	FACS 신호, 모 항체에 대한 개선 배수
		MDA-MB-231 세포
H1	Y32V	1.2
H1	M34R	1.1
H2	T57P	1.5
H2	A60G	1.3
H2	G65R	1.3
L2	T52S	1.5
L2	R54Y	1.2
L2	P55L	1.9
L2	P55H	1.5

[0749] 항-CD73 항체 CD730002SGMY의 친화도를 더 개선하기 위하여, VH 도메인의 하나의 유익한 아미노산 변경 및 VL 도메인의 하나의 유익한 아미노산 변경을 담은 IgG 변이체들을 제조하였다. 293F 세포의 일시적 형질감염으로 항체 변이체들을 제조하였으며, 유동 세포분석법으로 MDA-MB-231 세포에 대한 결합에 대해 스크리닝하였다. 클론 2C5는 모 CD730002SGMY보다 3배 더 낮은 EC50 값을 나타냈다.

[0750] **실시예 12: 최적화된 항-CD73 항체의 친화도**

[0751] 인간, 뮤린 및 시노몰구스 CD73에 대한 최적화된 (IgG1-TM 포맷의) 항-CD73 항체들의 친화도를 유동 세포분석법 및 표면 플라즈몬 공명(SPR)으로 결정하였다(표 14). 최적화된 항체들은 세 종으로부터의 세포 및 재조합 CD73에 대해 pM 친화도를 나타냈다.

표 14

[0752] 인간, 뮤린 및 시노몰구스 CD73에 대한 항-CD73 항체의 친화도

	KD [pM]					
	유동 세포분석법			SPR(프로테온)		
	MB-MDA-231 (인간)	4T1 (뮤린)	MK-1 (시노)	인간 CD73	뮤린 CD73	시노 CD73
CD730010	8000	6100	ND	3580	2470	1920
CD730010GL9	8949	16365	16460	1640	ND	ND
P32E	178	145	110	63	35	27
C1	179	95	160	29	6	12
C2	158	67	105	23		
G10	354	259	258	9		
HPT	739	5812	1138	548		

GRVE	125	88	101	29		
73콤보1 (C1+GRVE+HPT)	157	150	90	7	2	8
73콤보2 (C2+GRVE+HPT)	166	64	74	5		
73콤보3(D3+GRVE+HPT)	154	113	84	4	1	7
73콤보5 (G10+GRVE+HPT)	169	205	78	7		
73콤보6(GRVE+HPT)	166	82	107	15		
CD730002	52	50	52	7	40	15
CD730002 2C5	84	55	63	9	22	9

[0753] **실시예 13: 항-CD73 항체의 내재화**

[0754] FabZAP 분석법(어드밴스드 타게팅 시스템즈, 미국 캘리포니아 주 샌디에이고)을 이용하여 세포주 MDA-MB-231 및 4T1으로의 항-CD73 항체의 내재화를 평가하였다. 항-CD73 항체 및 FabZAP 시약의 존재 하에 세포주를 배양하였다. 3일 후, 세포 증식을 측정하여 EC50 값과 최대 독성을 계산하였다(표 15). FACS 데이터는 친화도 최적화된 항체의 내재화 비율이 낮음을 보여준다.

[0755] [표 15]

항-CD73 항체의 내재화

	MDA-MB-231		4T1	
	EC50 [pM]	최대 독성	EC50 [pM]	최대 독성
CD730010	158.3	84%	ND	ND
L1-P32E	15.7	95%	123.8	92%
73콤보1	3.8	97%	33.1	97%
73콤보3	3.5	97%	18.5	97%
CD730002	7.1	95%	205.6	83%
CD730002 2C5	9.1	98%	172.6	82%
Phen0203	92.5	91%	ND	ND

[0756]

[0757] 또 다른 실험에서는, CD73 양성 세포주에 미치는 항-CD73 항체/사포린 접합체의 세포독성 효과를 분석하여 항체의 세포주로의 내재화를 평가하였다(표 15). 항-CD73 항체들을 S-HyNic 및 4FB 화학작용(솔루링크(Solulink), 미국 캘리포니아 주 샌디에이고)을 이용하여 사포린에 직접적으로 접합시켜, 세포 성장을 50% 억제하는 데 필요한 항체/사포린 접합체 농도를 결정하였다.

[0758] [표 15]

항-CD73 항체의 특징 규명

	$1/EC_{50}$ (nM)					
항체	결합			효소 억제		내재화
	인간	마우스	시노	rCD73	MDA-MB-231	MDA-MB-231
CD730002	1.0E-001	2.4E-002	2.0E-001	2.10E-02	1.20E+01	2.10E-02
CD730003	1.8E-004	2.3E-004	4.8E-005	2.00E-03	7.00E-03	2.00E-03
CD730004	2.3E-005	2.3E-004	2.0E-006	0.00E+00	6.00E-02	0.00E+00
CD730008	1.1E-003	5.8E-004	1.1E-003	0.00E+00	1.10E-01	0.00E+00
CD730010	3.4E-003	2.4E-003	3.3E-003	6.20E-03	3.30E-01	6.20E-03
CD730011	2.1E-003	1.5E-003	2.7E-003	0.00E+00	6.80E-04	0.00E+00
CD730021	8.5E-004	5.7E-004	1.2E-003	1.10E-03	9.50E-03	1.10E-03
CD730042	1.7E-003	0.0E+000	1.4E-003	0.00E+00	3.20E-03	0.00E+00
CD730046	4.1E-003	5.2E-003	1.0E-002	0.00E+00	8.10E-02	0.00E+00
CD730047	0.0E+000	0.0E+000	0.0E+000	1.00E-03	2.70E-02	1.00E-03
CD730068	ND	ND	ND	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
CD730069	ND	ND	ND	3.80E-02	1.30E-03	3.80E-02

[0759]

[0760] **실시예 14: 항-인간 CD73 항체인 Phen0203 hIgG1은 농도 의존적인 방식으로 시험관 내에서 CD4+CD25- T 세포 증식의 AMP 매개성 저해를 억제하였다.**

[0761] 시험관 내에서 AMP 매개성 T 세포 저해를 완화하는 항-CD73 항체(Phen0203)의 능력을 결정하기 위한 연구를 수행하였다. 이 시험관 내 연구에서는, CD73에 의한 아데노신 일인산의 아데노신 및 유기 인산으로의 촉매화를 억제하는 항-인간 CD73 항체의 능력 및 그 후의 T 세포 기능에 미치는 영향을 조사하였다. Phen0203 hIgG1은 CD73의 세포적 및 생화학적 효소 활성을 (시험관 내에서) 억제하는 능력을 비롯하여 MEDI9447과 비슷한 기능적 성질을 가진다.

[0762] Phen0203 hIgG1 항체는 중쇄 불변 부위에 조작이 없는 인간 IgG1 mAb이다. MEDI9447과 유사하게, Phen0203 hIgG1 항체도 인간 CD73과 선택적으로 결합하고, 인간 CD73의 엑토뉴클레오티드분해효소 활성에 의해 면역저해성 아데노신의 생산을 억제한다. 그러나 Phen0203은 마우스 CD73에 대한 교차 반응성이 없다.

[0763] AMP 매개성 T 세포 저해에 대한 분석에서, $CD25^+$ 세포가 결핍된 원발성 인간 $CD4^+$ T 세포를 백혈구 콘의 내용물로부터 단리하여, 이펙터 세포로 이용하였다; 각 콘은 별도로 처리하였다. 간단히 말하자면, 백혈구 콘으로부터의 내용물을 PBS에 희석시킨 다음, 피콜-파크 플러스(Ficoll-Paque Plus)(지이 헬스케어(GE Healthcare), 영국 챌폰트 세인트 자일스) 위에 쌓고, 브레이크를 끈 채 400×g에서 40분 동안 원심분리하였다. 그런 다음, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 계면으로부터 단리하고, 200×g에서 10분 동안 원심분리하여 PBS로 세척하였다. 상층액을 버리고, 세포를 PBS에 현탁시켰다. 생존 세포를 결정한 다음, 350×g에서 5분 동안 펠릿화하고, 로보셉 완충액(RoboSep buffer, 스템 셀(Stem Cell), 프랑스 그르노블)에 mL당 5×10^7 개의 농도로 현탁시켰다. 이지셉(EasySep) 인간 $CD4^+$ T 세포 농축 키트(스템 셀, 프랑스 그르노블) 및 로보셉(스템 셀, 프랑스 그르노블)을 이용한 음성 선택으로 PBMS로부터 $CD4^+$ T 세포를 단리하였다. 정제된 $CD4^+$ T 세포를 펠릿화하고 로보셉 완충액에 mL당 1.5×10^7개로 재현탁시켰다. 다이나비즈 CD25(다이나비즈(Dynabeads) 조절성 $CD4^+CD25^+$ T 세포 키트(라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 영국 페이즐리)의 구성요소)를 1.5×10^7개 세포당 200 μL로 첨가하고, 계속 혼합하면서 4℃에서 25분 동안 배양하였다. 그런 다음, 세포를 다이나매그-15((DynaMag-15) 마그넷(라이프 테크놀로지스, 영국 페이즐리)에 1분 동안 넣고, $CD4^+CD25^-$ 이펙터 세포를 함유하는 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다.

[0764] 37℃에서 15분의 배양 기간과 함께 0.1% BSA를 함유하는 PBS에서 mL당 1×10^6개의 세포 농도의 셀트레이스(CellTrace) CFSE 세포 증식 키트(라이프 테크놀로지스, 영국 페이즐리)를 이용하여 단리된 이펙터 세포에 CFSE 프로브(3 μM)로 표지를 부착하였다. 따뜻한 엑스-비보(X-Vivo) 15 배지로 세포를 2회 세척하고, 동일한 배지에 mL당 5×10^5개 세포로 현탁시켰다. 1×10^6개 세포당 25 μL의 항-CD3 및 항-CD28 코팅 마이크로비즈(다이나비즈 인간 T 활성제 CD3/CD28; 라이프 테크놀로지스, 영국 페이즐리) 및 60 IU/mL의 rhIL-2를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 표지를 부착한 이펙터 세포를 활성화하였다. 그 후, 활성화된 CD4+CD25- 세포(100 μL 내에 대략 50,000개)를 멸균 둥근 바닥 96웰 플레이트의 웰에 첨가하였다. 다음 시약들의 단계별 희석을 엑스-비보 15 배지(론자(Lonza), 영국 슬라우)에 수행하였다; 시험 물품 Phen0203 hIgG1 및 R347 대조군 항체,

[0765] 플레이트 내의 이러한 세포에 50 μL의 희석된 시약들을 첨가하고, 400 μM 또는 800 μM의 AMP(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 영국 질링엄)를 함유하는 엑스-비보 15(론자, 영국 슬라우) 50 μL를 첨가하였다. 다음의 대조군 웰도 포함시켰다: 활성화된 CFSE 표지된 $CD4^+CD25^-$ 세포, AMP 없음(활성화 대조군); CFSE 표지된 $CD4^+CD25^-$ 세포, AMP 있음, 시험/대조군 물품 없음(비처리 대조군); 및 비 활성화(휴지 대조군) CFSE 표지된 $CD4^+CD25^-$ 세포, AMP 없음. 분석하는 세포들을 2분 동안 100×g의 원심분리에 의해 약하게 펠릿화하고, 5% CO_2의 37℃ 가습 조직 배양 인큐베이터에 72시간 동안 두었다.

[0766] 72시간의 배양 후, 4분 동안 380g의 원심분리에 의해 세포를 펠릿화하고, 100 μL의 FACS 완충액(이바이오사이언스(eBioscience), 영국 하트필드)으로 1회 세척하고, 마지막으로 BD 팩스칸토(FACSCanto) II(BD 바이오사이언스, 영국 옥스포드) 상의 유동 세포분석법 분석을 위해 3.7%의 포름알데히드를 함유하는 PBS 100 μL에 현탁시켰다. 휴지 $CFSE^+$ $CD4^+CD25^-$ 세포(AMP 없음) 웰을 이용하여 세포 분열을 거친 세포(분열된 세포)를 확인하였다.

[0767] CD73은 $CD4^+$ T 세포의 하위 세트에서 발현되는 것으로 밝혀졌다. 세포 외 AMP의 존재 하에서 $CD73^+$ T 세포는, CD73에 의한 AMP의 아데노신으로의 기전에 이은 아데노신 수용체의 활성화 및 T 세포 기능의 이후 조절을 수반하는 측분비/자가분비 경로를 가능하게 할 잠재력을 가지고 있다. TCR 신호전달 및 rhIL-2에 의해 활성화된, 정제된 $CD4^+CD25^-$ 원발성 인간 T 세포를 이용하여 시험관 내에서 이러한 CD73/아데노신 경로를 모형화하였다. 100 또는 200 μM의 세포 외 AMP의 존재 하에 T 세포 증식이 저해되었다.

[0768] 항-인간 CD73 항체인 Phen0203 hIgG1은 농도 의존적인 방식으로 시험관 내에서 $CD4^+CD25^-$ T 세포 증식의 AMP 매개성 저해를 억제할 수 있었다. 이러한 데이터는 AMP/CD73/아데노신 경로의 면역저해 효과를 표적으로 하는 항-CD73 항체 접근법의 과학적인 근거를 제공한다.

[0769] **실시예 15: MEDI9447 에피토프 및 파라토프 매핑**

[0770] MEDI9447과 CD73의 결합 계면을 확인하기 위하여, MEDI9447 Fab와 재조합 가용성 CD73(sCD73)을 단독으로 또는 복합체로 이용하여 수소 중수소 교환 MS(HDX-MS) 분석을 수행하였다(도 19a, 도 19b 및 도 20a 내지 도 20e). 최근에, 수소 중수소 교환 MS(HDX-MS)는 단백질-단백질 상호작용 자리의 지도를 만들고 단백질 구조 및 입체형태학적 역학의 특성을 규명하는 데 있어서 강력한 도구인 것으로 밝혀졌다. 용매 접근성에 의해 매개되는 방식으로 단백질 부위의 차등 표지화를 이용함으로써, HDX-MS를 이용하여 항체 에피토프는 성공적으로 매핑되었다. 유리 CD73과 복합체를 이룬 CD73 사이의 수소 교환의 동역학을 비교한 결과, Fab에 결합될 때 감소된 중수소 흡수를 나타내는, sCD73의 N 말단 도메인 내에 위치한 두 개의 부위(아미노산(aa) 132-143 및 182-187)가 드러났다(도 19a, 도 20a 및 도 20b). 부위 132-143(HDX_E1)은 가장 짧은 노출시점에서만 유의한 흡수 변화를 나타냈다. 더 긴 노출시점에서는 교환에 차이가 없었다. 특정 이론에 얽매이지 않고, 이것은 이러한 자리가 용매로부터 부분적으로만 보호됨을 나타낸다. 이와 대조적으로, 부위 182-187(HDX_E2)에서의 중수소의 차등 흡수 정도는 노출 시간과 함께 증가했다. 특정 이론에 얽매이지 않고, 이것은 용매 접근가능성을 감소시키는 높은 친화도의 단백질-단백질 상호작용과 일치한다(도 19a). Fab를 분석한 결과는 Fab가 CD73과 복합체를 이루었을 때, 중쇄의 상보성 결정 부위(CDR) 1과 3, 그리고 경쇄의 CDR1과 CDR2가 가장 큰 교환 감소를 나타냈음을 보여주어, 이들 부위가 파라토프의 주요 구성 성분임을 나타냈다(도 20c 및 20d). CD73 aa 132-143(HDX_E1) 및 182-187(HDX_E2)는 서열 공간에서 불연속적이지만, 그것들은 CD73의 접힌 구조 위로 매핑시켰을 때 인접해있다(도 19b). 수소 교환의 차이가 CD73 내의 다른 부위에서 관찰되었다. 그러나 공지된 기질 결합 잔기 및 활성 자리 잔기들을 함유하는 펩타이드들의 질량 변화를 포함하는 질량 변화의 대부분은 통계적으로 유의미하지 않았다(도

19a 및 도 20e).

[0771] HDX가 폴리펩타이드 백본 용매 노출의 환경 의존적인 변화를 보고하므로, 에피토프-파라토프 계면 내의 백본 차폐 대(versus) 항체 결합에 의해 간접적으로 또는 알로스테릭하게 유도된 입체형태적 변경으로 인한 수소 교환의 차이를 구분하기 위하여 타당성 검증이 필요하다. HDX_E1과 HDX_E2가 MEDI9447 에피토프를 구성하는지를 결정하기 위하여, 도메인이 스와핑된 키메라 CD73 변이체들에 대한 항체 결합을 평가하였다(도 21a 내지 도 21h 및 표 16).

표 16

CD73 변이체와 MEDI9447의 결합

CD73 구축물	KO 스왑/돌연변이 위치	KD(M)	ka(1/Ms)	kd(1/s)
야생형 인간 CD73	WT huCD73	4.20E-12	4.63E+06	1.94E-05
KO_N말단+C말단	KO_1-291+311-523		결합 없음	
KO_N말단	KO_1-291		결합 없음	
KO_링커	KO_292-310	4.14E-12	5.57E+06	2.31E-05
KO-C말단	KO_311-523	1.70E-12	4.75E+06	8.10E-06
HDX_E1	KO_132-143	9.90E-12	2.15E+06	2.12E-05
HDX_E2	KO_182-187*	2.83E-09	5.73E+06	1.62E-02
HDX_E1+E2	KO_132-143+182-187*	4.43E-09	4.76E+06	2.11E-002
V144K	V144K	8.14E-11	1.13E+06	9.18E-05
K180A	K180A	4.35E-11	3.45E+06	1.54E-04
N185G	N185G*	2.69E-11	9.11E+06	2.45E-04
V144K+K180A	V144K+K180A	2.68E-09	1.58E+06	4.25E-03
V144K+N185G	V144K+N185G		결합 없음	
K180A+N185G	K180A+N185G		결합 없음	

*2:1 적합으로부터 유래된 동역학 값.

[0772]

[0773] 도메인 스와핑은 관심 있는 항체와 결합하지 않는 표적 단백질(즉, 인간 CD73)의 동족체를, 에피토프를 구성하는 잔기들을 드러내는 키메라를 생성하는 데 사용하는 기법이다. 결실을 도입하는 것과는 반대로, 동족체들 사이의 서열을 교환하는 것은 단백질 구조를 전체적으로 붕괴하거나 단백질 발현을 막을 가능성을 최소화한다. 갈루스 갈루스(*Gallus gallus*, 닭) CD73은 성숙한 인간 CD73과 약 65% 서열 동일성을 공유한다(도 22). 인간 CD73 N 말단 도메인(KO_1-291) 또는 N 말단과 C 말단 도메인 둘 다(KO_1-291+311-523)가 상응하는 닭의 서열로 교체하여 녹아웃되었을 때, 스와핑된 키메라의 MEDI9447에 대한 결합이 상실되었다(도 21a 내지 도 21h 및 표 16). C 말단 도메인(aa 311-523) 또는 알파 헬릭스 링커 부위(aa 292-310)만을 녹아웃시키는 것은 야생형(WT) 단백질에 비해 결합에 영향을 미치지 않았다(도 21a, 도 21d, 도 21e 및 표 16). 이들 결과는 CD73의 N 말단 도메인 내의 에피토프 위치와 일치한다. 다음으로, 각각의 HDX 계면 부위를 별도로 그리고 조합하여 녹아웃시켰다. KO_HDX_E1과의 MEDI9447의 결합은 WT CD73과 비슷하였으나, 결합 상수 k_a의 소소한 감소가 있었다(도 21f 및 표 16). 이와 대조적으로, KO_HDX_E2에 대한 결합 친화도는 더 빠른 해리로 인해 WT CD73보다 유의미하게 약했다(도 21f 및 표 16). 두 자리(KO_HDX_E1+E2)를 녹아웃시킨 결과, 부위 E2 단독과 비교했을 때 결합의 근소한 감소만 초래되었다(도 21g 및 표 16). 이러한 발견은 부위 182-187 및 그보다 정도는 덜 하지만, 부위 132-143이 항체 결합에 중요한 잔기를 함유하며, HDX로 확인된 계면 밖의 추가적인 잔기들이 에피토프를 구성함을 나타낸다.

[0774] 이러한 MEDI9447 에피토프를 완전히 정의하기 위하여, 인간 CD73의 N 말단 도메인의 약 70개 아미노산 범위를 상응하는 닭 서열로 교체하여 서열 스와핑 키메라 패널을 생성하였다(도 22, 도 23a 및 도 23b). 부위 2(DS2) 또는 부위 3(DS3) 단독 중 하나를 녹아웃시키는 것은 결합을 감소시켰고, 양 부위를 함께(DS2_3) 스와핑하는 것은 결합을 녹아웃시켰다(도 23a 및 도 23b). 부위 4(DS4) 또는 부위 1의 일부분(DS1a)를 녹아웃시키는 것(전체

부위를 스와핑하는 것은 발현을 막았다)은 결합에 영향을 미치지 않았다(도 23a 및 도 23b). 약 20 내지 30개 aa 스와핑된 부위를 함유하는 키메라를 이용한 결합 분석은 하위 부위 DS2d(aa 135-152) 및 DS3b(aa 171-188)가 MEDI9447 결합에 영향을 미치는 잔기들을 함유하고 있음을 드러냈다(도 23a 및 도 23b). 하위 부위 2d의 일부분(DS2dmod)이 부위 3b와 스와핑되었을 때(DS2dmod_3b), 결합은 상실되었다(도 23a 및 도 23b). 주목할 만한 점은, 이들 두 하위 부위는 HDX 연구에 의해 확인된 계면을 포괄한다는 것이다(도 22). 양 HDX 부위들을 함께 스와핑하는 것이 결합을 제거하지 않았다는 관찰은 결합을 매개하는 추가적인 잔기들이 하위 부위 2d 및 3b 내에 위치하고 있으며, HDX로 확인된 자리 내에는 위치하지 않음을 나타낸다. 이들 추가적인 에피토프 잔기들을 매핑하기 위하여, 단일 점 돌연변이 또는 점 돌연변이와 부위 스왑의 조합을 함유하는 CD73 키메라 패널에 대한 항체 결합을 평가하였다. 또한, 닭 CD73과 인간 CD73 사이에 보존된 HDX 계면 내의 잔기들 및 이러한 HDX 계면과 공간적으로 인접한 잔기들에 대해 알라닌 돌연변이 유발을 수행하였다(도 22, 도 23a 및 도 23b). 이들 분석은 V144, K180, 및 N185가 주요 에피토프 잔기들이며, N185가 가장 중요함을 드러냈다(도 23a, 도 23b 및 도 24). N185G 돌연변이를 K180A 또는 V144K와 조합하자 결합이 제거되었으나, K180 및 V144를 함께 돌연변이시키자 결합의 감소가 초래되었다(도 23a 및 도 23b). K180 이외에도, 세 개의 다른 보존된 잔기들 Y135, K136, 및 N187이 결합에 영향을 미쳤으나, 보다 덜한 정도로 영향을 미침을 발견했다(도 23a, 도 23b 및 도 24a). 이러한 나중의 세 개의 잔기들의 영향력을, 도메인 스와핑된 KO 배경의 상황에서 그것들을 알라닌으로 돌연변이시켜 밝혀냈다. 배타적인 점 돌연변이로서, 그것들은 친화도에 최소한의 영향을 미쳤거나 전혀 영향을 미치지 않았다(도 23a 및 도 23b). 이러한 에피토프의 중요한 구성요소들로서 V144, K180, 및 N185를 검증하기 위하여, 닭 CD73을 V144 및 N185로 교체하였다(K180은 보존됨). 이들 세 개 잔기들의 존재는 나노몰 이하의 친화도(K_D = 79 pM)로 MEDI9947에 의한 결합을 제공했다(도 23a, 도 23b 및 도 24b). 특정 이론에 얽매이지 않고, 이것은 CD73에 대한 MEDI9447의 결합이 주로 이들 세 개의 아미노산 위치에 의해 매개됨을 나타낸다. 주목할 만하게도, HDX 분석은 결합 계면의 일반적인 위치를 확인하였지만, 세 개의 중요한 에피토프 잔기들 중 둘은 수소 교환 변화를 나타내는 펩타이드들 내부에 함유되어 있지 않았다(도 20a 및 도 20b).

[0775] 확인된 에피토프를 CD73의 구조 위에 덮어씌우자 결합 자리가 CD73의 열린 입체배치의 정점 측면에 위치함이 드러났다(도 24c 내지 도 24e). N185는 K180을 함유하는 헬릭스 G로부터 밖으로 연장되는 루프 부위의 N 말단 도메인 정점 가까이에 위치한다(도 24c). Y135 및 K136은 β-가닥 6 위 그리고 K180에 인접하여 위치해 있다. V144는 N187과 가까이 접촉하여 β-가닥 7 내에 위치한다(도 24c). 전체적으로, 이들 잔기들의 측쇄들은 가까운 인접한 결합 표면을 형성한다(도 24d). CD73 단량체 열린 구조에서 볼 때, 이러한 에피토프는 반대되는 면에 있고, 기질 결합 자리와 공간적으로 멀리 있음이 명백하다(도 24f). 추가적으로, 이러한 결합 자리는 Zn^{2+} 공통 인자와의 상호작용을 조정하는 것들을 포함한 임의의 활성 자리 잔기들을 포괄하지 않는다(도 24f). 특정 이론에 얽매이지 않고, MEDI9447은 AMP 결합을 두고 경쟁하지 않지만, 그 대신 이러한 에피토프의 위치를 기초로 잠재적인 알로스테릭 기전을 통해 CD73 효소 활성을 억제함이 예상되었다.

[0776] **실시예 14: MEDI9447은 CD73 효소 활성을 억제하였다.**

[0777] MEDI9447 억제 방식의 특징을 규명하기 위하여, 먼저, MEDI9447 또는, CD73의 가수분해 불가능한 억제자인 APCP의 존재 하에 AMP의 sCD73 가수분해의 동역학을 조사하였다. MEDI9447은 기질 농도와 관계 없이 감소된 V_{max}(4.59±0.26 대 1.21±0.03)로 증명된 바와 같이 sCD73을 비 경쟁적으로 억제하였다(도 25a). 이와 대조적으로, APCP는 미하엘리스 상수 K_m을 증가시켰으나(75.85±3.36 대 26.03±3.87), APCP가 CD73의 경쟁적 억제자라는 이전의 발견 내용과 일관되게 V_{max}를 감소시키지 않았다(3.35±0.04 대 3.50±0.11)(도 25b). 이러한 결과들은 MEDI9447이 AMP를 가수분해하는 sCD73의 능력을 차단하였음을 보여준다. 추가적으로, 그것들은 MEDI9447이 에피토프의 위치와 일치하는 AMP 기질의 결합을 차단하지 않음을 나타낸다.

[0778] 다음으로, IgG 또는 Fab 포맷의, 증가하는 농도의 MEDI9447의 함수로서 sCD73의 억제를 시험하였다. MEDI9447 IgG는 용량-반응 방식으로 sCD73 활성을 억제하며, 최대 억제는 IgG와 sCD73 이량체 사이에서 약 1:1의 몰 비율을 달성하였다(도 25c). 그러나 IgG가 sCD73에 비해 화학량론으로 과잉일 때, 억제의 손실이 관찰되었다(도 25c). 이러한 소위 "후크 효과"는 다른 면역분석법에서 관찰된 바 있으며, 표적 항원 위의 제한적인 결합 자리를 두고 경쟁하는 동일한 IgG 분자의 Fab 팔(arm)에 의한 1가 항체 결합으로부터 기인할 수 있다. 이러한 관찰과 일치하여, MEDI9447의 Fab 포맷은 sCD73 활성을 억제하지 않았다(도 25c). 종합하면, 이들 결과는 MEDI9447의 2가 상호작용이 sCD73 기능을 억제하는 데 필요하다는 것을 나타낸다.

[0779] **실시예 15: MEDI9447은 CD73의 닫힌 상태로의 입체형태적 전이를 막았다.**

[0780] CD73의 이전의 구조적 연구는 CD73의 효소 활성은 "열린" 입체형태와 "닫힌" 입체형태 사이의 전이를 필요로 함을 밝혀냈다. 열린 상태에서, 효소는 불활성인 반면, 닫힌 상태에서, 활성 자리가 형성되어 기질 가수분해를 가능하게 한다. 인간 CD73의 결정 구조의 결정은 열린 이형태체와 닫힌 이형태체 사이의 전이는 N 말단 도메인이 C 말단 도메인에 대해 위치를 조정하여 활성 자리를 형성할 수 있도록 알파-헬릭스 링커 부위의 광범위한 굽힘 및 회전을 필요로 함을 보여주었다. 두 개의 CD73 N 말단 도메인 상에서의 MEDI9447의 각각의 Fab 팔의 맞물림은 CD73의 불활성의 열린 상태에서 촉매적으로 활성인 닫힌 상태로의 전이를 제한하는 다리를 형성할 수 있다고 가정하였다. MEDI9447이 CD73 입체형태적 전이를 억제하는지를 시험하기 위하여, CD73 입체형태의 리포터로 개발된 항체인 mAb A를 활용하였다. mAb A의 결합 계면을 매핑하자, 그것이 CD73의 N 말단 도메인과 C 말단 도메인 둘 다와 상호작용함이 밝혀졌다(도 26a 내지 도 26c). 결합 부위의 위치를 고려하여, 이러한 에피토프는 CD73 열린 이형태체에 존재할 것이나 닫힌 이형태체에서는 붕괴될 것으로 상정하였다(도 26b). 이를 시험하기 위하여, mAb A의 열린, 기질이 없는, sCD73과 닫힌 sCD73에 대한 결합을 측정하였다(도 27a 내지 도 27c). 닫힌 입체형태를 유도하기 위해, sCD73을 Zn^{2+} 및 APCP와 사전 배양하였다. 이러한 공통 인자 및 가수분해 불가능한 기질은 이전에 인간 CD73의 닫힌 이형태체의 결정 구조를 생성하는 데 사용하였다. 결합 분석 결과, mAb A는 열린 sCD73과 결합하나 CD73을 Zn^{2+} 및 APCP와 사전 배양할 때에는 결합이 파괴되는 것으로 나타났다(도 27a). 특정 이론에 얽매이지 않고, 이러한 발견은 mAb A 에피토프가 CD73의 열린 구조에서만 존재한다는 것과 일치한다. 이와 대조적으로, MEDI9447 결합은 CD73의 상태에 민감하지 않았으며, 이는 그것이 기질이 없는 CD73 또는 결합된 CD73과 결합할 수 있음을 의미한다(도 27a). mAb A에 의한 결합의 상실은 Zn^{2+} 및 APCP 둘 다에 의존적이었다(도 28a). mAb A 결합이 CD73의 입체형태적 상태에 대해 보고한다는 점을 확립하였으므로, 다음으로 CD73의 Zn^{2+}/APCP 유도성 구조적 전이에 미치는 MEDI9447의 영향을 시험하였다. mAb A가 MEDI9447과 사전 배양된 sCD73에 결합함은 두 항체들이 별개의 에피토프들과 결합함을 나타낸다(도 27b). 중요하게도, sCD73-MEDI9447 복합체를 나중에 Zn^{2+} 및 APCP와 배양했을 때, mAb A에 의한 결합이 유지되었다(도 27b). 이와 대조적으로, 대조군 IgG 및 MEDI9447의 Fab 포맷은, Zn^{2+} 및 APCP 첨가 전에 sCD73과 사전 복합시켰을 때 mAb A 결합을 복원하지 않았다(도 28b). 이들 결과는 2가의 MEDI9447 결합이 sCD73의 열린 상태로부터 완전히 닫힌, 가수분해적으로 활성의 입체배치로의 전이를 막는다는 가설을 뒷받침한다. MEDI9447이 결합될 때에 mAb A 결합이 오로지 부분적으로만 유지된다는 관찰은 Zn^{2+} 및 APCP가 CD73을 리포터 항체와 더 낮은 친화도로 결합하는, 촉매적으로 불활성인 중간 상태를 채택하게 유도할 수 있음을 나타낸다(도 27c).

[0781] **실시예 16: sCD73과 MEDI9447은 이량체간 다리로 연결된 복합체를 형성했다.**

[0782] 관찰된 MEDI9447의 억제 활성은 단일 CD73 분자의 N 말단 도메인의 이량체간(inter-dimer) 다리 연결을 통해, 또는 별도의 CD73 분자들의 이량체내(intra-dimer) 다리 연결을 통해 일어날 수 있다. 이들 시나리오를 구별하기 위하여, 용액 내에서 형성된 복합체의 크기 특징을 규명했다. 결합되지 않은 MEDI9447 및 CD73의 측정된 중량(각각 145 및 125 킬로달톤(kD))을 기초로, 항체의 CD73에 대한 이량체간 다리 연결된 1:1 복합체의 예상 크기는 약 270 kD이다(도 29a). MEDI9447과 sCD73이 1:1 몰 비율로 결합되었을 때, 두 가지 복합체가 형성되었다. 우세한 종은 약 1.74 메가달톤의 중량 평균 몰 질량(Mw)을 나타냈고, 덜 풍부한 종은 약 0.66 kD의 Mw를 나타냈다(도 30a). 최대 복합체의 Mw는 일곱 개의 CD73 이량체 및 여섯 개의 IgG를 함유하는 올리고머와 일치한다(7 x 125 kD + 6 x 150 kD = 1.745 메가달톤). MEDI9447이 한정적일 때(0.5:1, 0.1:1), 비슷한 Mw의 복합체들이 형성되지만, 각 종의 존재도의 상대적인 차이는 덜 확연하다(도 30a). MEDI9447과의 복합체들을 상이한 항-CD73 항체인 mAb B와 형성된 복합체들과 비교하였다. 도메인 스와핑된 CD73 키메라 패널에 대한 mAb B의 결합 분석은 mAb B가 MEDI9447과는 대조적으로 CD73 단량체들 사이에 형성된 홈에 인접한, CD73의 N 말단 도메인 내의 부위와 결합한다는 점을 보여주었다(도 29b 및 도 19b). 이러한 내부에 위치한 표면에서의 결합은 mAb B의 Fab 팔들이 CD73 이량체들에 다리를 연결하지 못하도록 방해할 수 있다고 상정하였다. 실제로, SEC-MALS는 mAb B가 1:1 상호작용에 대해 예측했던 Mw에 가까운 Mw인 약 270-295 kD의 복합체를 형성함을 보여주었다(도 30c). 종합적으로, 이러한 발견은 MEDI9447이 여러 개의 sCD73 이량체들 사이에서 이량체간 다리를 형성하며, 이들 올리고머의 생성은 에피토프에 의해 제공되는 것임을 나타낸다.

[0783] **실시예 17: MEDI9447은 1가 상호작용을 통해 고정 CD73을 억제하였다.**

[0784] CD73은 생체 내에서 세포 표면으로부터 떨어져 나오며, 가용성 형태에서 효소 활성을 보유하지만, 자연 그대로의 CD73 대부분은 GPI 고정 포맷으로 존재한다. 이러한 점과 앞선 연구들이 CD73의 가용성 형태로 수행되었다는

점에서, 고정된 상태의 CD73으로 MEDI9447의 특성을 규명하는 것은 필수적이었다. 니켈 코팅된 마이크로티터 플레이트 상에 C 말단의 여섯 개 히스티딘 태그를 통해 재조합 CD73을 포획하여, 세포 표면 상의 GPI 고정 CD73과 유사한 방식으로 공간적으로 배향되어 있는 고정된 CD73의 효소 활성을 분석할 수 있게 되었다. 우리의 이전 결과들과 비슷하게도, MEDI9447 IgG는 용량 의존적인 방식으로 AMP 가수분해를 억제하였다(도 31a). 그러나 이러한 항체가 CD73 이량체에 비해 몰 과잉 상태일 때, 어떠한 억제 상실이나 후크 효과도 관찰되지 않았다(도 31a 및 도 32). 뜻밖에도, MEDI9447 Fab도 CD73 활성을 억제하였으나 MEDI9447 IgG에 비해 더 낮은 최대 억제를 나타냈다(도 31a 및 도 32). 이러한 결과들은, 가용성 CD73과는 달리, 고정 CD73이 1가 항체 상호작용을 통해 억제될 수 있음을 나타낸다. IgG 및 Fab 사이의 억제 차이는 항체 분자의 크기가 효능을 지배할 수 있음을 시사하였다. 이를 조사하기 위해서, 항-Fd 항체(xFd)의 한 Fab 팔은 MEDI9447 Fab와 결합하고 다른 팔은 비 특이적인 다클론성 Fab(pFab)와 결합하도록 하는 조건 하에서 MEDI9447 Fab를 xFd 항체와 사전 배양하였다(도 31b). 이러한 복합체의 형성은 CD73에 대한 1가를 유지하면서도 MEDI9447 Fab의 크기를 효과적으로 증가시켰다. 이 xFd 결합된 Fab는 MEDI9447 IgG와 균등한 수준까지 CD73 활성을 억제하였다(도 31a). 이러한 관찰을 검증하기 위하여, 내인성으로 발현된 CD73의 항체 억제를 인간 상피 유방암 세포주 MBA-MD-231에서 측정하였다. 고정된 재조합 CD73과 비슷하게도, GPI 고정 CD73은 MEDI9447 IgG에 의해 왕성하게, MEDI9447 Fab에 의해 중간 정도로 억제되었고, xFd 항체에 대해 Fab를 사전 결합시키자 IgG와 균등한 수준까지 최대 억제가 증가되었다(도 31c). 마지막으로, xFd 항체의 한 팔 또는 양 팔에 결합된 MEDI9447 Fab에 의한 sCD73의 억제를 시험하였다. 표면 결합된 CD73과는 달리, sCD73은 단일 xFd 팔에 결합된 MEDI9447 Fab에 의해 억제되지 않았다(도 31d). 그러나 xFd 양 팔에 MEDI9447 Fab를 결합시켜 2가를 부여하자 MEDI9447 IgG와 비슷한 sCD73 억제가 초래되었다(도 31b 및 도 31d). 이러한 발견은 표면 고정된 CD73이 1가 항체 결합에 의해 억제될 수 있으며, 그 효능은 항체의 크기에 의해 매개됨을 보여준다. 이것은 2가 상호작용을 통해 MEDI9447에 의해서만 억제되는 sCD73과는 직접적인 대조를 이룬다.

[0785] **실시예 18: MEDI9447은 이중적이고 비 경쟁적인 작용 기전에 의해 CD73 입체형태 변화 및 AMP 가수분해를 억제한다.**

[0786] 본 설명에 기술된 바와 같이, CD73의 효소 활성을 억제하는 치료적 단일클론성 항체의 에피토프 및 작용 기전을 결정하였다. 본 연구의 결과는 두 가지 별도의 기전을 통한 억제를 가능하게 한 CD73 N 말단 도메인 내의 결합 자리를 드러냈다. 중요한 것은, 이러한 특성이 MEDI9447에 비 경쟁적인 방식으로 가용성 CD73 및 세포 표면 고정 CD73 둘 다를 차단하는 능력을 부여한다는 점이다.

[0787] HDX-MS를 이용하여, CD73과 MEDI9447 Fab 사이의 결합 계면을 확인하였다. 펩신 소화로부터 유래된 상대적으로 큰 펩타이드들 때문에, 교환 분석으로 확인한 상호작용 자리는 상대적으로 광범위하여, 두 개의 불연속 펩타이드를 가로지르는 총 열 여덟 개의 아미노산에 걸쳐 있었다. 도메인 스와핑 및 돌연변이 유발 실험은 이들 잔기 중 한 하위 세트가 항체 결합에 영향력이 있으며, 세 가지 가장 영향력 있는 아미노산 중 두 개(V144 및 K180)가 차등적 수소 교환을 나타내지 않은 펩타이드 내부에 함유되어 있음을 보여주었다. 이러한 불일치에 대한 한 가지 설명은, V144 및 K180 측쇄들이 항체 CDR 잔기들과의 접촉으로 인해 가려질 수 있지만, 중수소와의 교환을 거치는, 관련된 폴리펩타이드 백본 아미드 수소 원자들이 상대적으로 용매에 노출될 수 있다는 것이다. HDX-MS 결과는 aa 132-143으로 이루어진 부위만이 가장 짧은 노출 시점에서 유의미한 교환 동역학의 차이를 나타냈다는 점도 보여주었다. 특정 이론에 얽매이지 않으면, 이는 이 부위에서의 결합이 상대적으로 약하다는 점을 나타냈다. 실제로, 이 부위 내에서 결합에 영향을 미치는 것으로 밝혀진 두 잔기들(Y135 및 K136)은 MEDI9447 친화도에 최소한의 영향만을 미쳤다(도 23a 및 도 23b). 이와 대조적으로, 가장 유의미한 차등 교환을 나타낸 부위 aa 182-187은 결합에 가장 중요한 잔기(N185)를 함유하였다. 공통 결정 구조가 부재한 상태에서, MEDI9447과의 상호작용자로 치부되었던 일부 잔기들이 실제로 파라토프와의 접촉을 형성할 가능성을 정식으로 배제할 수 없다. 그러나 광범위한 돌연변이체 결합 분석은 이러한 잠재적인 잔기들이 결합의 열역학에 최소한으로 기여하리라는 점을 나타낸다. 중쇄 CDR3은 항원 접촉 자리를 형성하는 데 중요하므로, 이 CDR은 최대 정도의 차등 교환을 나타냈다. HDX 결과는 또한 경쇄, 특히 CDR1 및 CDR2가 항원 결합에 중요함을 나타냈다(도 20c 및 도 20d). 종합하자면, 이들 결과는 HDX-MS의 에피토프 매핑에서의 유용성뿐만 아니라 돌연변이 유발과 같은 직교 기법에 의한 예상했던 결합 계면을 검증하는 것의 중요성 모두를 강조한다.

[0788] CD73 기질 결합 및 활성 자리 잔기들로부터 먼 N 말단 도메인 내의 한 위치에 있는 에피토프의 위치는 MEDI9447이 비 경쟁적인 억제 방식을 나타낸다는 것을 보여주는 결과와 일치한다. 이러한 에피토프 단독의 발자국을 기초로, 항체가 전통적인 알로스테릭 억제자로서 작용하여, 가수분해 활성을 막는 방식으로 활성 자리 잔기들을 왜곡하는 CD73의 장거리 입체형태 변화를 유도한다고 가설을 세울 수 있다. 그러나 HDX-MS 데이터는 이러한 형

태의 알로스테리를 뒷받침하는 결합 계면 바깥 부위에서 CD73 구조의 유의미한 변경을 드러내지 않았다. 대안적으로, 이러한 에피토프는, MEDI9447 결합이 촉매 활성에 필요한 N 말단 도메인 내의 루프, β-가닥 또는 α 헬릭스의 움직임을 제한한다는 점을 시사할 수 있다. 이와는 반대로, CD73의 열린 구조와 닫힌 구조 사이에서는 아예 없거나 적은, N 말단 도메인 내의 2차 또는 3차 구조의 변화가 보고되었다. 발생하는 국소적인, 도메인간 입체형태적 변화는 링커와 C 말단 도메인에 한정된다.

[0789] 구조적 변경을 유도하는 것에 대한 대안으로, 에피토프의 위치를 잘 위치시켜 필수적인 입체형태 변화를 제한하는 CD73 이량체들의 항체 다리 연결 또는 가교결합을 가능하게 하는 것을 고려하였다. 이러한 다리 연결은 IgG가 CD73의 가용성 형태를 억제하는 데 필요하다는 점과 MEDI9447이 여러 CD73 이량체들을 함유하는 복합체들을 형성한다는 점을 보여주는 데이터에 의해 뒷받침된다. 후자의 결과는 이량체간 다리를 형성하지 않았던 mAb B와는 대조적이어서, 이러한 가교결합 활성을 부여하는 데 있어서 MEDI9447 에피토프의 중요성을 강조한다. 합리적으로, 두 개의 CD73 N 말단 도메인들이 동일한 IgG의 Fab 도메인들에 의해 결합된다면, 이것은 효소가 닫힌 활성 구조를 채택하는 데 필수적인 N 말단 도메인과 링커 부위의 움직임을 물리적으로 제한할 수 있다. CD73 상태에 대한 입체형태적 프로브로 작용하는 mAb A를 사용함으로써, MEDI9447의 결합이 CD73으로 하여금, Zn^{2+} 및 APCP에 의해 유도된 바와 같이, 완전히 닫힌 이형태체를 채택하는 것을 억제한다는 점이 증명되었다. MEDI9447을 CD73과 사전에 복합체를 형성하도록 하였을 때, 리포터 mAb A에 의한 결합의 중간체 수준은, 어느 정도의 입체형태적 전이가 여전히 Zn^{2+} 및 APCP에 의해 유도된다는 점을 나타낸다. 감소된 mAb A 결합은, 그 에피토프가 이러한 중간 상태에서 부분적으로 왜곡되지만 결합을 낳기에는 여전히 충분하다는 점을 반영할 수 있다. 힌지 부위의 높은 정도의 가요성을 고려하면, MEDI9447이 CD73 이량체들을 다리 연결할 때조차도 기질 결합으로 인한 일부 CD73 구조적 변경이 여전히 존재한다는 점은 놀라운 일이 아니다. 특정 이론에 얽매이지 않고, 결합된 IgG가 CD73을 완전히 경직된 입체형태 내에 가두는 것을 상상하기란 어렵다.

[0790] 이러한 작업의 놀라운 결과는, 2가 상호작용을 통한 다리 연결 이외에도, MEDI9447이 1가 결합 기전을 통해 표면 결합될 때에도 CD73을 억제할 수 있다는 점이다. 처음에는 복잡하지만, 고정 CD73 활성의 제2의 입체 구조에 의해 매개된 차단 기전은 본 설명에 기술된 관찰 내용과 일치한다. 촉매적으로 활성인 GPI 고정 CD73의 형성은 N 말단 도메인이 세포 표면에 대해 근접한 위치를 향해 아래로 회전한다는 점을 요구한다. 자연 그대로의 CD73 이량체는 약 130 kDa이다. IgG 또는 Fab의 크기(각각 약 150 kD 및 약 50 kD)와 비교하여, N 말단 도메인에 결합된 항체는 CD73이 닫힌 입체형태를 채택하기 위하여 완전히 회전하는 것을 입체적으로 차단할 수 있다는 점은 타당하다. 이러한 기전은 두 가지 관찰 내용에 의해 뒷받침된다. 첫째, Fab가 IgG에 비해 더 낮은 최대 억제를 나타낸다는 사실은 크기 의존적인 입체 효과와 일치한다. Fab 친화도는 여전히 나노몰 이하(K_D= 327 pM, 데이터 미도시)이므로, Fab와 IgG 사이의 불일치는 결합 차이때문일 가능성은 낮다. 나아가, xFd 항체와의 접합을 통해 Fab의 효과적인 크기를 증가시킴으로써 부여된, 증가된 효능 또한 크기 의존적이며, 결합가 또는 결합력에 의존적이지 않은 입체 기전을 강력하게 뒷받침한다. 이러한 방식의 억제를 뒷받침하는 두 번째 관찰 내용은, CD73이 표면 결합되었을 때 후크 효과 또는 억제 상실이 MEDI9447 IgG에 의해 관찰되지 않는다는 점이다. 아마도 이는 이러한 항체가 2가 또는 1가 상호작용을 통해 AMP의 고정 CD73 가수분해를 차단할 수 있기 때문이다(도 33). 이와 대조적으로, CD73이 가용성일 때 1가로 결합된 IgG 또는 Fab가 N 말단 도메인 회전을 입체적으로 차단하는 데 필요한 고체상의 부재 때문에 후크 효과가 관찰된다.

[0791] 따라서, MEDI9447이 에피토프에 완전하게 연결되는 이중 억제 기전을 통해, 가용성 CD73 및 GPI 고정 CD73 기능에 대해 길항작용을 하는 모델이 제안된다(도 33). 본 설명에 기술된 연구 결과가 MEDI9447이 가용성 CD73 및 결합된 CD73 둘 다를 차단할 수 있음을 보여주지만, 생체 내에서 GPI 고정 CD73이 하나의 기전 또는 두 기전을 통해 억제되는지는 알려져 있지 않다. 아마도, 세포 표면 상의 CD73의 밀도, 배향 및 이량체간 거리가 우세한 억제 방식을 지배할 것이다. 대부분의 암세포가 CD73을 과발현하며, 이것이 이량체들이 아주 근접하게 존재할 가능성을 높여준다는 점을 고려할 때, MEDI9447이 2가 및 1가 상호작용 둘 다에 관여하리라는 점이 예상된다. CD73 발현이 상대적으로 더 낮은 표면 밀도로 존재하는, 정상적인, 비 종양 조직에서, MEDI9447은 주로 입체 차단 방식을 통해 AMP 가수분해를 억제할 수 있다.

[0792] 기계론적 관점에서, CD73을 차단하는 것은 이미 승인된 약물이 존재하는 PD-1 및 CTLA-4 같은 비슷한 표적들과는 구별되는 면역종양학 전략이다. 치료적 관점에서, MEDI9447의 활성은 유리하다. 그것은 CD73을 비 경쟁적으로 억제하며, 따라서 활성 자리를 차단함으로써 내인성 뉴클레오티드 결합과 경쟁할 필요가 없다. 이것은 다른 뉴클레오티드/구조적으로 보존된 활성 자리가 있는 측면 결합 단백질에 대한 잠재적인 교차 반응성을 막아준다. 나아가, MEDI9447은 1가 또는 2가 연결을 통해 가용성 CD73과 막 결합 CD73 둘 다를 억제할 수 있다. 이러한 특

징들 모두는 생체 내 효능에 기여할 것이라 예상된다. 이러한 치료적 mAb는, 단독으로 그리고 상보적인 면역 조절 경로를 표적으로 하는 기존의 화학요법제와 조합하여, 암 치료를 위한 면역 조절 가능성을 나타낸다.

[0793] 위에 기술된 결과들은 다음의 재료 및 방법을 이용하여 수행되었다.

[0794] **분석법 1: 직접적인 ELISA**

[0795] 384웰 ELISA 플레이트를 약 1.5ng/웰의 재조합 CD73 단백질로 코팅하고, 1% BSA/0.1% 트윈20/PBS로 블로킹하고, 항체 샘플들과 90분 동안 실온에서 배양하였다. 이것에 이어, 염소-항-Ig람다-호스래디쉬 페록시다제(HRP) 접합체와 30분 동안 실온에서 배양하였다. 테트라 메틸 벤지딘(TMB) 기질로 HRP 활성을 검출하였고, 1 M HCl로 반응을 정지시켰다. 플레이트를 450 nm에서 판독하였다.

[0796] **분석법 2: 포획 ELISA**

[0797] 384웰 ELISA 플레이트를 약 3 ng/웰의 (Fab 포맷의 항체들을 스크리닝하기 위한) 양-항-인간 Fd 항체로 코팅하고, 1% BSA/0.1% 트윈20/PBS로 블로킹하고, 샘플들과 90분 동안 실온에서 배양하였다. 그런 다음, 비오틴이 부착된 CD73 단백질을 실온에서 1시간 동안 첨가하였다. 이것에 이어, 스트렙타비딘-호스래디쉬 페록시다제(HRP) 접합체와 30분 동안 실온에서 배양하였다. 테트라 메틸 벤지딘(TMB) 기질로 HRP 활성을 검출하였고, 1 M HCl로 반응을 정지시켰다. 플레이트를 450 nm에서 판독하였다.

[0798] 약 50 ng/웰의 비오틴이 부착된 재조합 CD73을 이용하여 단일 아미노산 돌연변이가 있는 클론들을 스크리닝하였다. 조합 라이브러리로부터 클론의 스크리닝을 위하여, 10 ng/웰의 비오틴이 부착된 재조합 CD73을 이용하였다.

[0799] **분석법 3: 유동 세포분석법 결합 분석법**

[0800] 모든 유동 세포분석법 실험은 4C에서 수행하였고, 시약들은 PBS/1% FBS 완충액에 제조하였다. 10,000개의 세포들을 50 uL 부피의 시험 항체와 4시간 동안 배양하였다. 세포를 2회 세척하고, 50 uL 염소 항-인간 IgGFc-알렉사플루오르647 접합체 내에 15분 동안 배양하였다. 세포를 세척하고, Dapi를 보충한 완충액에 재현탁시켜, 유동 세포계수기로 분석하였다. 높은 Dapi 염색으로 확인한 죽은 세포들은 분석에서 제외시켰다. KD 값 결정을 위해, 시험 항체 농도의 함수로서의 중앙값의 형광 강도의 도표를 한 자리 결합 등온 모델을 이용하여 비 선형적으로 적합화하였다.

[0801] **분석법 4: 단일 아미노산 변화가 있는 항체 라이브러리의 생성**

[0802] 퀵체인지 라이트닝 멀티 부위 특이적 돌연변이 유발 키트(QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit, 애질런트(Agilent))와 프라이머를 이용하여 CD730010 또는 CD730002의 CDR 코돈들의 부위 특이적 돌연변이 유발을 수행하였다. 야생형 코돈을 코돈 NNS로 교체한 프라이머로 각 코돈에 돌연변이를 일으켰다. 돌연변이 유발된 VH 및 VL 유전자들을 세균 발현을 위한 Fab 벡터 내로 클로닝하였다. 대장균 균주 BL21(DE3)을 항체 라이브러리로 형질전환시키고, 개별적인 콜로니들을 채집하여 매직 배지(Magic Media, 인비트로젠(Invitrogen))에 실온에서 24시간 동안 배양하여 세균 Fab 단편을 생성하였다. 세균 상층액을 제조하여, ELISA 결합 분석법에서 항체 라이브러리를 스크리닝하는 데 이용하였다.

[0803] **분석법 5: 조합 아미노산 변화가 있는 항체 라이브러리의 생성**

[0804] CD730010GL9 VH 및 VL 유전자들을 세균 Fab 발현을 위한 벡터 내로 클로닝하였다. 퀵체인지 라이트닝 멀티 부위 특이적 돌연변이 유발 키트(애질런트) 또는 중첩적 PCR 및 축퇴성 프라이머를 이용하여 CD730010GL9의 CDR 코돈의 부위 특이적인 돌연변이 유발을 수행하였다. 이러한 축퇴성 프라이머는 선택된 아미노산 변화뿐만 아니라 동일한 위치에 있는 모 아미노산을 암호화하기 위하여 설계하였다. 대장균 균주 BL21(DE3)을 Fab 라이브러리로 형질전환시키고, 개별적인 콜로니들을 매직 배지(Magic Media, 인비트로젠(Invitrogen))에 실온에서 24시간 동안 배양하여 세균 Fab 단편을 생성하였다. 세균 상층액을 ELISA 결합 분석법에서 항체 라이브러리를 스크리닝하는 데 이용하였다.

[0805] **분석법 6: FabZAP 분석법**

[0806] 1,000개 세포/웰을 96웰 플레이트에 RPMI/10% FBS에서 배양하였다. 5 nM로 시작하는 항-CD73 항체들의 단계별 희석액을 FabZAP 시약(어드밴스드 타케팅 시스템즈, 미국 캘리포니아 주 샌디에이고)과 혼합하여 세포에 첨가하였다. 37C에서의 3일간의 배양 후, 셀타이터-글로 분석법(프로메가, 미국 위스콘신 주 매디슨)을 이용하여 세포 증식을 측정하였다.

[0807] 다음의 CD73 및 항체 시약을 이용하여 다음의 분석법(분석법 7 내지 분석법 11)을 수행하였다.

[0808] 재조합 성숙한 인간 CD73(아미노산 위치 1-526)을 암호화하는 포유동물의 발현 벡터 플라스미드를 구축하였다(메디뮨(MedImmune)). 가용성의, 분비된 형태의 CD73의 발현을 달성하기 위하여, GPI 앵커 신호 펩타이드를 제거하고, C 말단 6x-히스티딘 태그로 교체하였다. CD73 서열 넘버링은 신호 펩타이드 없는 성숙한 단백질을 기초로 한 것이다(인간 *NT5E*, NCBI 기준 서열 NP_002517.1). 코돈 최적화된 닭 CD73 DNA 서열(닭 *NT5E*, NCBI 기준 서열 XP_004940453.1)을 암호화하는 합성 DNA g블록(IDT, Inc.)을 이용하여 재조합 인간/닭 키메라 도메인 스와핑된 "녹아웃"(KO) 돌연변이체를 암호화하는 플라스미드를 생성하였다. 인간 CD73 단백질 서열과의 정렬선을 기초로, 닭의 N 말단 도메인을 함유하는 구축물의 1번 위치를 암호화하는 아미노산은 예상했던 신호 펩타이드를 함유하는 미성숙 닭의 CD73의 20번 위치에 해당한다. g블록 및 인간 CD73의 PCR 앰플리콘의 단일 중첩 연장 PCR에 의해 전체 길이 KO DNA 구축물을 만들었다. 모든 구축물은 C 말단 6x 히스티딘 태그를 함유하였다. 퀵체인지 라이트닝 멀티 부위 특이적 돌연변이 유발 키트(스트라타진(Stratagene))를 이용하는 부위 특이적 돌연변이 유발로 인간 구축물과 키메라 구축물에서 단일 및 다중 점 돌연변이를 만들었다. 모든 CD73 구축물을 현탁액 HEK293 세포에서 발현시켰다. 메디뮨 단백질 사이언스 그룹(MedImmune Protein Sciences group)이 HisTrap 니켈 친화도 컬럼(GE 헬스케어 라이프 사이언스)을 이용하여 히스티딘 태그가 붙은 (GPI 앵커 신호 서열이 결여된) 야생형 인간 CD73을 정제하였다. 이러한 단백질은 용액 내에서 이량체임이 확인되었고, 몰 질량은 약 125 kDa이었다(도 18a 및 도 18b). 293펙틴(293Fecin)(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))를 이용하여 현탁액 HEK293 세포를 일시적으로 형질감염시켜 모든 돌연변이체 CD73 구축물을 발현시켰다. 세포를 24웰 딥웰 블록에서 무혈청 293프리스타일 배지(라이프 테크놀로지스)에서 성장시키고 형질감염시켰다. 형질감염 후 6일째에 미정제 세포 상층액을 채취하고, 0.45 μm 필터로 여과하여 사용 전에 세포 찌꺼기를 제거하였다. 옥텟(Octet) QK384 바이오레이어 간섭측정법(bio-layer interferometry, BLI) 기기(포르테바이오(ForteBio)/폴 라이프 사이언스(Pall Life Sciences))에서 HIS2 바이오센서(포르테바이오/폴 라이프 사이언스)에 대한 히스티딘 태그가 붙은 단백질의 결합을 측정하여 CD73 변이체들의 상층액 농도를 결정하였다. 공지된 농도의, 정제된, 재조합 6x-히스티딘 태그가 붙은 인간 CD73의 희석액으로부터 생성한 표준 곡선과 결합 신호를 비교하여 옥텟 데이터 분석 소프트웨어를 이용하여 농도를 계산하였다. 메디뮨 단백질 사이언스 및 발현 그룹이 MEDI9447(인간 IgG1 및 마우스 IgG1 포맷), mAb A(인간 IgG1)와 mAb B(인간 IgG1) 및 MEDI9447 Fab(인간 IgG1)을 발현시키고, 정제하였다. IgG를 포유동물 세포에서 발현시키고, 단백질 A 및 크기 배제 크로마토그래피로 정제하였다. MEDI9447 Fab를 생성하기 위하여, 10 mg의 IgG를 고정된 파파인(써모 사이언티픽/라이프 테크놀로지스)으로 37℃에서 5시간 동안 소화시키고, 하이트랩(HiTrap) Q 컬럼(GE 헬스케어 라이프 사이언스)을 이용하여 Fab를 정제하였다.

[0809] **분석법 7: HDX-MS 분석**

[0810] 재조합 인간 CD73 및 MEDI9447 Fab 샘플을 2 mg/mL의 농도로 제조하였다. 1:1의 농도 비율로 사전 배양하여 CD73 + Fab 복합체를 형성하였다. 리프(Leap) 자동화 로봇을 구비한 워터스(Waters) HDX 테크놀로지(워터스 코포레이션)를 이용하여 전체 HDX 실험을 수행하였다. 간략하게는, 1.25 μL 단백질 샘플을 20 ℃에서 H_2O 또는 D_2O 완충액(10 mM 인산염, pH 7.0)으로 20배 희석하였다. 상이한 배양 시간 후(비 중수소화 실험의 경우 0초, 또는 중수소화 실험의 경우 0.5, 1, 5, 10, 30, 60, 및 120분), 4.0 M 구아니딘 HCl(피어스 바이오테크놀로지(Pierce Biotechnology)), 500 mM 트리스(2-카복시에틸)포스핀 염산염(TCEP)(피어스 바이오테크놀로지), pH 2.4의 얼음처럼 차가운 용액 동 부피를 첨가하여 표지를 붙인 샘플들을 퀜칭시켰다. 그 직후, 20℃에서 포러스 자임(Poroszyme) 고정 펩신 카트리지(어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))를 이용하여 샘플을 소화시켰다. 소화 단편들을 수집하고, 애퀴티(ACQUITY) BEH C18 밴가드(VanGuard) 프리컬럼(2.1 x 5 mm, 워터스)을 이용하여 탈염시키고, 0℃에서 애퀴티 BEH C18 컬럼(1.7 μm, 1.0 x 100 mm, 워터스) 내로 용리시켰다. 컬럼 상에서 분리된 펩타이드들을 SYNAPT G2 질량 분광분석기(워터스)로 분석하였다. 데이터 분석을 위해, 프로틴링크스 글로벌 서버(ProteinLynx Global Server) 소프트웨어(워터스)를 이용하여 펩타이드를 확인하고, 각 표지화 시간으로부터의 각각의 소화성 펩타이드에 대한 중수소 도입 수준을 DynamX(워터스)를 이용하여 계산하였다. 각각의 단백질에 대해, 4회의 비 중수소화 실험 및 3회의 완전한 HDX 실험을 수행하였다. 개별적인 표준 편차의 평균 대신 표준 편차의 변동풀을 이용하였다는 점을 제외하고는 이전에 기술한 바와 같이, 실험적 불확실성 및 98% 신뢰 구간을 이용하여 유의한 차이값(±1.6 달톤)을 계산하였다. CD73 + Fab 복합체와 CD73 사이의 상대적인 부분 흡수(fractional uptake)를 DynamX 소프트웨어(워터스)로 생성하고, 구조적 모델화를 위해 PyMOL(Shroedinger, Inc.)로 엑스포트했다. PyMol 및 CD73의 열린 입체형태 및 닫힌 입체형태(각각 PDB 기준 번호 4H2F 및 4H2I)의 보고된 결정 구조를 이용하여 인간 CD73의 모든 구조적 도면을 생성하였다.

[0811] **분석법 8: SPR 및 BLI 결합 분석**

[0812] 프로테온 기기(바이오라드(BioRad))를 이용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR)으로 야생형 및 돌연변이체 CD73 단백질에 대한 MEDI9447의 결합을 측정하였다. CD73 미정제 세포 상층액 단백질 샘플을 PBS, 0.005% 트윈-20, pH 7.4(바이오라드)에 3 μg/ml까지 희석하고, 10 mM $NiSO_4$, 10 mM MES, pH 6.0(바이오라드)로 사전 활성화시킨 HTG 트리스-NTA 센서 칩(바이오라드) 상에 약 400 RU까지 고정시켰다. 형질 감염되지 않은 세포로부터 동등하게 희석된 미정제 세포 상층액 샘플을 기준 채널 대조군으로 포함시켰다. 5 nM부터 0.31 nM까지 범위의 PBS, 0.005% 트윈-20, pH 7.4에 제조한 MEDI9447의 2배 희석액을 흘려서 센서그램을 기록하였다. 일부 사례에서는, MEDI9447에 약하게 결합된 CD73 변이체들을 위해, 항체 희석액은 20 nM부터 1.25 nM까지의 범위였다. 항체 결합은 3분의 결합기와 20분의 해리기와 함께 100 μL/분의 유속에서 측정하였다. 각 실행 사이에 30 μL/분 유속의 300 mM EDTA, pH 8.5(바이오라드)를 800s 주입하여 센서 칩 표면을 재생시켰다. 프로테온 데이터 분석 소프트웨어를 이용하여 결합 동역학을 분석하였다. 이중 참조를 수행하였고, 달리 언급되지 않는 한, 1:1 랭뮤어 결합 모델을 이용하여 데이터를 적합화하였다. 아미노산 부위 171-188 내에 돌연변이를 함유하는 일부 CD73 변이체들은 1:1 모델에 대해 저조하게 맞았다(즉, Chi^2 값 > Rmax의 10%). 언급된 곳에서, 이들 변이체는 이종 항원(2:1) 모델에 적합했다. MEDI9447의 높은 친화도(약 4 pM)와 프로테온은 민감도 제한으로 인해, CD73 변이체에 대한 MEDI9447 결합을 비교할 때 측정된 동역학의 >2배의 변화만이 의미있다고 간주되었다. 분석법 포맷(항원 고정) 및 CD73의 이량체 상태로 인해, 결합력 효과 때문에 K_D 값이 과장될 수 있다. 그러나 이것이 상이한 CD73 변이체에 대한 MEDI9447 결합의 순위에 영향을 미칠 것으로 예상되지는 않는다.

[0813] 옥텟 QK384 기기를 이용하여 BLI로 항-CD73 항체 mAb A 및 mAb B의 결합의 분쟁 지대를 매핑하였다. 모든 단백질은 1x 동역학 완충액(포르테바이오/폴 라이프 사이언스)에 제조하였다. 미정제 세포 상층액으로부터의 C 말단 히스티딘 태그가 붙은 CD73 변이체들을 6 μg/ml까지 희석하고, HIS2 바이오센서에 0.8 nm의 결합 반응 역치까지 고정시켰다. 300초의 기준선 단계 후, 센서를 30 nM 항체에 담갔다. 결합 시간 및 해리 시간은 600초였다. 데이터 분석 중, 배경 결합 뺄셈을 위해 형질 감염되지 않은 세포 상층액 기준 대조군을 포함시켰다. 포르테바이오 데이터 분석 소프트웨어를 이용하여 데이터를 처리하고 그래프를 준비하였다.

[0814] **분석법 9: CD73 효소 활성 분석법**

[0815] 무기 인산염을 정량하거나(말라카이트 그린 분석법; R&D 시스템즈) AMP에 의해 억제되는 루시페린의 ATP 의존성 산화를 측정하여(셀타이터글로 분석법; 프로메가) AMP의 아데노신 및 무기 인산염으로의 CD73 촉매화 가수분해를 분석하였다. 프리즘 소프트웨어(그래프패드(Graphpad))를 이용하여 데이터 그래프 및 효소 동역학 측정치(미카엘리스-멘텐 비 선형 회귀)를 생성하였다. 실험은 2반복(duplicate) 또는 3반복(triplicate)으로 수행하였다.

[0816] 셀타이터글로 분석법을 이용하는 가용성 재조합 CD73의 측정을 위해, 같은 부피의 200 μM AMP/600 μM ATP(분석 완충액 내)를 첨가하기 전에 400 pM 재조합 CD73 및 다양한 농도의 항-CD73 항체들을 분석 완충액(25mM 트리스 pH7.5, 5 mM $MgCl_2$, 0.005% 트윈-20)에 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 37℃에서 1시간 배양 후, 제조사의 설명서에 따라 셀타이터글로 분석법을 이용하여 샘플 내의 AMP 농도를 결정하였다.

[0817] 말라카이트 그린 분석법을 이용하는 가용성 재조합 CD73의 측정을 위해, 1시간 동안 실온에서 1 nM 재조합 CD73 및, 1 nM 항체 또는 40 μM 아데노신 5'-(α,β-메틸렌)디포스페이트(APCP; 시그마-알드리치)를 분석 완충액(25 mM 트리스 pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 0.005% 트윈-20)에 배양하였다. 분석 완충액 내의 400 μM AMP(항-CD73 항체에 대해) 또는 3 mM AMP(APCP에 대해) 동일한 부피를 첨가하고, 실온에서 15분 동안 샘플을 배양하였다. 제조사의 설명서에 따라 말라카이트 그린 분석법을 이용하여 무기 인산염의 농도를 결정하였다.

[0818] 고정된 재조합 CD73의 측정을 위해, 100 μg/mL BSA로 보충한 분석 완충액(25 mM 트리스 pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 0.005% 트윈-20) 내에 100 ng/mL의 50 μL CD73을 니켈 코팅된 플레이트(라이프 테크놀로지스)에 고정하였다. 결합되지 않은 CD73을 씻어내고, (분석 완충액 내의) 항-CD73 항체 50 μL를 첨가하였다. 실온에서 1시간 배양한 후, 플레이트를 다시 세척하고, (분석 완충액 내의) 500 μM AMP 100 μL를 첨가하고, 실온에서 15분 동안 샘플을 배양하였다. 제조사의 설명서에 따라 말라카이트 그린 분석법을 이용하여 무기 인산염의 농도를 결정하였다. 고정된 CD73 및 가용성 CD73 모두를 이용하는 일부 실험에서는, CD73에 첨가하기 전에 10배 몰 과량의 다클론성 인간 Fab 단편(베틸 래버러토리즈(Bethyl Laboratories)) 및 100배 몰 과량의 양-항-인간 IgG(Fd)(메리디안 라이프 사이언스(Meridian Life Sciences))와 항-CD73 항체(IgG 및 Fab)를 적어도 2시간 동안 사전 배양하였다.

[0819] 배양된 세포에서의 내인성 CD73 활성 측정을 위해, 웰당 20,000개의 MDA-MB-231 셀을 96웰 플레이트에 RPMI/10% FBS(라이프 테크놀로지스) 내에 플레이팅하였다. 밤새 배양 후, 웰을 무혈청 RPMI로 3회 세척하고, (무혈청 RPMI 내의) 항체들 50 μL를 첨가하였다. 37℃에서 30분 동안 배양한 후, 웰당 (무혈청 RPMI 내의) 1.2 mM AMP 25 μL를 첨가하였다. 플레이트를 37℃에서 3시간 동안 배양하였다. 세포 상층액 25 μL와 100 mM ATP 25 μL를 혼합하고, 제조사의 설명서에 따라 셀타이터글로 분석법을 이용하여 샘플 내 AMP 농도를 결정하였다.

[0820] **분석법 10: CD73 입체형태적 전이의 mAb A 리포터 분석법**

[0821] 옥텟 QK384 기기 상에서 정제된 재조합 인간 CD73에 대한 MEDI9447 및 mAb A의 결합을 수행하였다. mAb A와 MEDI9447의 결합을 비교하기 위하여, CD73을 PBS, pH 7.4(라이프 테크놀로지스) 플러스 0.5% 소 혈청 알부민(PBSB; 시그마-알드리치)에 6 μg/mL까지 희석하고, HIS2 바이오센서 상으로 1.0 nm의 결합 신호 역치까지 로딩하였다. 그런 다음, 바이오센서를 PBSB 단독 또는, 10 μM $ZnCl_2$(시그마-알드리치), APCP, 및/또는 2 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)(라이프 테크놀로지스)이 있는 PBSB 안으로 옮겨 15분 동안 배양하였다. 다음으로, PBSB에 30 nM까지 희석한 MEDI9447 또는 mAb A를 함유하는 PBSB로 바이오센서를 옮겨 항체 결합을 10분 동안 측정하였다.

[0822] $ZnCl_2$ 및 APCP의 존재 하에 CD73 입체형태적 전이에 미치는 MEDI9447의 영향을 시험하기 위해, PBS, pH 7.4에 10 μg/mL까지 희석한 mAb A를 항-인간 Fc AHC 바이오센서(포르테바이오/폴 라이프 사이언스) 상에 고정시켰다. 400s 고정화 단계 후, 바이오센서를 PBS, pH 7.4 내의 50 μg/mL의 비 특이적 다클론성 인간 IgG(잭슨 이뮤노리서치 래버러토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories)) 내에서 10분 동안 블로킹하였다. 4분의 기준선 단계 후, PBS 단독, 또는 10 μM $ZnCl_2$ 및/또는 0.5 mM APCP를 함유하는 PBS 내에 (이량체의 분자량을 기초로) 250 nM까지 희석한 CD73을 함유하는 웰에 600초 동안 바이오센서를 배양하여 mAb A 결합을 측정하였다. CD73에 결합된 MEDI9447을 함유하는 샘플을 위해, $ZnCl_2$ 및 APCP와의 배양 전에, PBS에 250 nM까지 희석한 (항-인간 Fc 바이오센서에 대한 결합을 피하기 위해 사용된) MEDI9447의 마우스 IgG1 버전을 실온에서 15분 동안 CD73과 사전 배양하였다. MEDI9447 Fab 및 (메디뮨에서 생성한) 마우스 이소형 매치 대조군 IgG1을 500 nM로 시험하였다. 모든 분석 단계에 대한 진탕 속도는 1000 rpm이었다. 포르테바이오 데이터 분석 소프트웨어를 이용하여 결합 분석 및 데이터 그래프를 생성하였다.

[0823] **분석법 11: SEC-MALS 분석법**

[0824] CD73 및 MEDI9447 또는 mAb B로 형성된 복합체들을 분석하는 실험을 위해, 900 피코몰의 CD73을 PBS, pH 7.4에 희석한 900, 450, 90, 또는 0 피코몰의 항체와 배양하였다. 900 피코몰의 항체만의 별도의 샘플도 제조하였다. 샘플을 실온에서 30분 동안 배양한 다음, 20분 동안 1 mL/분 유속에서 TSK겔 G3000WxL 5 μm, 7.88 mm x 30 cm 컬럼(토소 바이오사이언스(Tosoh Bioscience, LLC))을 이용하는 HP 1100 HPLC(애질런트) 상에서 각 샘플 100 μL를 분리하였다. 샘플 전개 완충액은 0.1 M NaPi, 0.1M $NaSO_4$, pH 6.8이었다. HPLC 분리 후, Dawn Heleos II MALS 검출기 및 옵티랩(Optilab) T-rEx 굴절 지수 검출기(와이엇(Wyatt))를 이용하여 모든 샘플을 분석하였다. 아스트라(Astra) 소프트웨어(와이엇)를 이용하여 데이터를 분석하였다.

[0825] 특정 양태들에 대한 앞선 설명은 다른 이들이 과도한 실험없이 본 발명의 일반적인 개념으로부터 벗어나지 않고 다양한 적용을 위해 당해 기술 내의 지식을 적용하여 그러한 구체적인 양태들을 용이하게 변경 및/또는 채택할 수 있도록 본 발명의 일반적인 성질을 완전히 드러낼 것이다. 따라서, 그러한 채택 및 변경은 본 설명에 제시된 교시 및 지침에 기초하여 개시된 양태들의 균등물의 의미 및 범위 내에 있는 것으로 의도된 것이다. 본 설명의 어구 또는 용어는 설명의 목적을 위한 것이지 제한의 목적이 아니며, 본 명세서의 어구 또는 용어는 이러한 교시 및 지침의 견지에서 당업자에 의해 해석된다고 이해해야 한다.

[0826] 서열 목록

[0827] >서열 번호 1 CD730002 VL

[0828] QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSRIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFCQAWDTSFWVFGGGTKLTVL

[0829] >서열 번호 2 CD730002 VH

[0830] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGY

YWYMDVWGQGTMVTVSS

[0831] >서열 번호 3 CD730010 VL

[0832] LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYKQVPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFG
GGTKLTVL

[0833] >서열 번호 4 CD730010 VH

[0834] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYS
TIDYWGRGTLVTVSS

[0835] >서열 번호 5 CD730011 VL

[0836] NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASKYVQWYQQRPGSSPMAVIYKDNQRSSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKPEDEADYYCQSYDASNYYVF
GTGTKVTVL

[0837] >서열 번호 6 CD730011 VH

[0838] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGHG
LYFDLWGQGTTVTVSS

[0839] >서열 번호 7 CD730021 VL

[0840] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRPNIGGNTVNWYQQLPGAAPKLLIYSNSQRPSGVPDRFSGSKYGTSASLAISGLQSDDEADYYCGTWDDSLNGPVFG
RGTKLTVL

[0841] >서열 번호 8 CD730021 VH

[0842] QVQLQESGPGLVRPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWAWVRQSPGKGLEWIGNIYYRGSTYYNPSLKSRVTMSVDMSKHQFSLKLSSLNAADTAVYYCASLYS
GTYVFDYWGRGTLVTVSS

[0843] >서열 번호 9 CD730042 VL

[0844] QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEGSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTTR-
STRVFGGGTKLTVL

[0845] >서열 번호 10 CD730042 VH

[0846] GVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCSTLSGS
YGYFDYWGRGTLVTVSS

[0847] >서열 번호 11 CD730046 VL

[0848] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVSWYQHLPGTAPQLLIYTNNHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFG
TGTKVTVL

[0849] >서열 번호 12 CD730046 VH

[0850] QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNSLFLQMNSLRDDDTATYYCARGHLL
RIGDIFYYSLDVWGQGTLVTVSS

[0851] >서열 번호 13 CD730047 VL

[0852] QSVLTQPPSASGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQRLPGAAPQLLIYNNDQRPSGIPDRFSGSKSGTSGSLVISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGNVFG
TGTKVTVL

[0853] >서열 번호 14 CD730047 VH

[0854] EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFAISRDNAKNTLYLQMNSLRREDTAMYYCASGLTG
VAGALGVWGRGTLVTVSS

[0855] >서열 번호 15 CD730058 VL

[0856] QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDRLRNEFVSWYQQRPGQSPVVVIYQDIYRPSGIPDRFSGSKSGNTATLTISGPQTVDEADYYCQAWDSNTVVFGGGTK
LTVL

[0857] >서열 번호 16 CD730058 VH

[0858] QLQLQESGSGLVKPSQTLSLICAVSGGSITSGGNAWNWIRQSPGAGLEWIGYIFSNGATYYNPSLESRVTISADTSKNQFSLTLTSVTAADTAVYYCARGDF
WTGKGVFDPWGQGTLVTVSS

[0859] >서열 번호 17 10.3AA_HC

[0860] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYG
RVDEWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0861] >서열 번호 18 10.3Nt_HC

[0862] GCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCT
CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
TCCGGGTAAA

[0863] >서열 번호 19 10.3AA_LC

[0864] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFG
GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS
TVEKTVAPTECS

[0865] >서열 번호 20 10.3Nt-LC

[0866] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCCTCTCCAACATCGGAAGGAATCCTGTT
AACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGGACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATCTTGATAATCTACGGCTAAGTGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCT
GGAACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCACCCCGGGTGGACGTTCGGC
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTG
GTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAA
CAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGC
ACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

[0867] >서열 번호 21 10.3AA_VH

[0868] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYG
RVDEWGRGTLVTVSS

[0869] >서열 번호 22 10.3Nt_VH

[0870] GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCTAT
AGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGAACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGATTAGGGTATGGG
CGGGTGGACGAGTGGGGCAGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT

[0871] >서열 번호 23 10.3AA_VL

[0872] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFG
GGTKLTVL

[0873] >서열 번호 24 10.3Nt-VL

[0874] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTTCTGGAAGCCTCTCCAACATCGGAAGGAATCCTGTT
AACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGGACGGCCCCCAAACTCCTCATCTATCTTGATAATCTACGGCTAAGTGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCT
GGAACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCACCCCGGGTGGACGTTCGGC
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

[0875] >서열 번호 25 CD7300010 모(parent) FW1-VL

[0876] LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISC

[0877] >서열 번호 26 CD7300010 GL FW1-VL

[0878] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC

[0879] >서열 번호 27 CD7300010 모 FW2-VL

[0880] WYKQVPGTAPKLLIY

[0881] >서열 번호 28 CD7300010 GL FW2-VL

[0882] WYQQLPGTAPKLLIY

[0883] >서열 번호 29 CD7300010 모/GL FW3-VL

[0884] GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC

[0885] >서열 번호 30 CD7300010 모/GL FW4-VL (또한 CD370002 및 2C5)

[0886] FGGGTKLTVL

[0887] >서열 번호 31 CD7300010 모/GL FW1-VH (또한 CD370002 및 2C5)

[0888] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS

[0889] >서열 번호 32 CD7300010 모/GL FW2-VH (또한 CD370002 및 2C5)

[0890] WVRQAPGKGLEWVS

[0891] >서열 번호 33 CD7300010 모/GL FW3-VH (또한 CD370002 및 2C5)

[0892] RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

[0893] >서열 번호 34 CD7300010 모/GL FW4-VH

[0894] WGRGTLVTVSS

[0895] >서열 번호 35 CD7300010 CDR1-VH (또한 CD370002 및 2C5)

[0896] SYAMS

[0897] >서열 번호 36 CD7300010 CDR1-VH

[0898] SYAYS

[0899] >서열 번호 37 CDR2-VH (또한 CD370002)

[0900] AISGSGGSTYYADSVKG

[0901] >서열 번호 38 CDR2-VH

[0902] LIWGSWGSTYYADSVKG

[0903] >서열 번호 39 CDR2-VH

[0904] AISGSGGRTYYADSVKG

[0905] >서열 번호 40 CDR2-VH

[0906] AISGSWGRTYYADSVKG

[0907] >서열 번호 41 CDR3-VH

[0908] LGYSTIDY

[0909] >서열 번호 42 CDR3-VH

[0910] LGYSTIDK

[0911] >서열 번호 43 CDR3-VH

[0912] LGYSTIDM

[0913] >서열 번호 44 CDR3-VH

[0914] LGYSTIDL

[0915] >서열 번호 45 CDR3-VH

[0916] LGYGRVDE

[0917] >서열 번호 46 CDR1-VL

[0918] SGSLSNIGRNPVN

[0919] >서열 번호 47 CDR1-VL

[0920] SGSLSNIGRNEVN

[0921] >서열 번호 48 CDR1-VL

[0922] SGSLSNIGRNDVN

[0923] >서열 번호 49 CDR2-VL

[0924] LNNQRPS

[0925] >서열 번호 50 CDR2-VL

[0926] LDNLRLG

[0927] >서열 번호 51 CDR2-VL

[0928] LDNLRLS

[0929] >서열 번호 52 CDR2-VL

[0930] LNNQRLG

[0931] >서열 번호 53 CDR3-VL

[0932] ATWDDSLNGWL

[0933] >서열 번호 54 CDR3-VL

[0934] ATWDDSLKGWL

[0935] >서열 번호 55 CDR3-VL

[0936] ATWDDSLIGWL

[0937] >서열 번호 56 CDR3-VL

[0938] ATWDDSHPGWT

[0939] >서열 번호 57 CD730010-VL

[0940] LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYKQVPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFG
GGTKLTVL

[0941] >서열 번호 58 CD730010GL9-VL

[0942] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFG
GGTKLTVL

[0943] >서열 번호 59 P32E-VL

[0944] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFG
GGTKLTVL

[0945] >서열 번호 60 C1-VL

[0946] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFG
GGTKLTVL

[0947] >서열 번호 61 C2-VL

[0948] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLGGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFG
GGTKLTVL

[0949] >서열 번호 62 D3-VL

[0950] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLIGWLFG
GGTKLTVL

[0951] >서열 번호 63 G10-VL

[0952] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNDVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRLGGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFG
GGTKLTVL

[0953] >서열 번호 64 HPT-VL

[0954] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFG
GGTKLTVL

[0955] >서열 번호 65 GRVE-VL

[0956] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFG
GGTKLTVL

[0957] >서열 번호 66 73콤보1 (C1+GRVE+HPT)-VL

[0958] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFG
GGTKLTVL

[0959] >서열 번호 67 73콤보2 (C2+GRVE+HPT)-VL

[0960] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLGGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFG
GGTKLTVL

[0961] >서열 번호 68 73콤보3(D3+GRVE+HPT)-VL [10.3]

[0962] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFG
GGTKLTVL

[0963] >서열 번호 69 73콤보5 (G10+GRVE+HPT)-VL

[0964] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNDVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRLGGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFG
GGTKLTVL

[0965] >서열 번호 70 73콤보6(GRVE+HPT)-VL

[0966] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFG
GGTKLTVL

[0967] >서열 번호 71 CD730010-VH

[0968] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYS
TIDYWGRGTLVTVSS

[0969] >서열 번호 72 CD730010GL9-VH

[0970] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYS
TIDYWGRGTLVTVSS

[0971] >서열 번호 73 P32E-VH

[0972] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYS
TIDYWGRGTLVTVSS

[0973] >서열 번호 74 C1-VH

[0974] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYS
TIDKWGRGTLVTVSS

[0975] >서열 번호 75 C2-VH

[0976] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSLIWGSWGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYS
TIDMWGRGTLVTVSS

[0977] >서열 번호 76 D3-VH

[0978] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYS
TIDLWGRGTLVTVSS

[0979] >서열 번호 77 G10-VH

[0980] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSWGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYS
TIDLWGRGTLVTVSS

[0981] >서열 번호 78 HPT-VH

[0982] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYS
TIDYWGRGTLVTVSS

[0983] >서열 번호 79 GRVE-VH

[0984] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYG
RVDEWGRGTLVTVSS

[0985] >서열 번호 80 73콤보1 (C1+GRVE+HPT)-VH

[0986] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYG
RVDEWGRGTLVTVSS

[0987] >서열 번호 81 73콤보2 (C2+GRVE+HPT)-VH

[0988] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSLIWGSWGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYG
RVDEWGRGTLVTVSS

[0989] >서열 번호 82 73콤보3(D3+GRVE+HPT)-VH [10.3]

[0990] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYG
RVDEWGRGTLVTVSS

[0991] >서열 번호 83 73콤보5 (G10+GRVE+HPT)-VH

[0992] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSWGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYG
RVDEWGRGTLVTVSS

[0993] >서열 번호 84 73콤보6(GRVE+HPT)-VH

[0994] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYG
RVDEWGRGTLVTVSS

[0995] >서열 번호 85 CD730002VH

[0996] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGY
YWYMDVWGQGTMVTVSS

[0997] >서열 번호 86 CD730002VL

[0998] QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSRIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFCQAWDTSFWVFGGGTK
LTVL

[0999] >서열 번호 87 2C5VH

[1000] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKRRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGY
YWYMDVWGQGTMVTVSS

[1001] >서열 번호 88 2C5VL

[1002] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRLSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTK
LTVL

[1003] >서열 번호 89 CD730002 모/2C5 FW4-VH

[1004] WGQGTMVTVSS

[1005] >서열 번호 90 CD730002 모 FW1-VL

[1006] QSVLTQPPSVSVSPGQTATITC

[1007] >서열 번호 91 CD7300002 2C5 FW1-VL

[1008] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITC

[1009] >서열 번호 92 CD730002 모/2C5 FW2-VL

[1010] WYQQKPGQSPVLVIY

[1011] >서열 번호 93 CD730002 모 FW3-VL

[1012] RIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFC

[1013] >서열 번호 94 CD730002/2C5 FW3-VL

[1014] GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC

[1015] >서열 번호 95 CD730002/2C5 CDR2-VH

[1016] AISGSGGSTYYADSVKR

[1017] >서열 번호 96 CD730002 모/2C5 CDR3-VH

[1018] DKGYYWYMDV

[1019]

[1020] >서열 번호 97 CD730002 모/2C5 CDR1-VL

[1021] SGDKVGDKYAS

[1022] >서열 번호 98 CD730002 모 CDR2-VL

[1023] EDTKRPS

[1024] >서열 번호 99 CD730002 2C5 CDR2-VL

[1025] EDTKRLS

[1026] >서열 번호 100 CD730002 모/2C5 CDR3-VL

[1027] QAWDTSFWV

[1028] >서열 번호 101 Phen0203-VH

[1029] EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFRFSDFAMHWVRQAPGKGLEWVAGISYDGGNKYYADSVKGRFTISRDNSNNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDHGY
SGYYGHLDYWGRGTLVTVSS

[1030] >서열 번호 102 Phen0203-VL

[1031] QSVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGRVFG
TGTKLTVL

[1032] >서열 번호 103 CD730004-VH

[1033] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRPN
YYGASGSYYKQGGDHWGQGTMVTVSS

[1034] >서열 번호 104 CD730004-VL

[1035] NFMLTQPHSVSESPGQTVTISCTRSSGSIASKYVQWYQKRPGSSPTTVIYEDTQRPSGVPDRFSGSIDISSNSASLTISGLRTEDEADYYCQSYDSTNWVFG
GGTKVTVL

[1036] >서열 번호 105 CD730008-VH

[1037] EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNYG
NLDHWGKGTLVTVSS

[1038] >서열 번호 106 CD730008-VL

[1039] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDRKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSSHWVFGGGTK
LTVL

[1040] >서열 번호 107 CD730068-VH

[1041] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYIMGWVRQAPGKGLEWVSSISSSGGATIYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYCAKDHLG
GHGMDVWGQGTTVTVSS

[1042] >서열 번호 108 CD730068-VL

[1043] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWFQQKPGKAPKSLIFAASSLESGVPSKFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQQYNSYPLTFGGGT
KVEIK

[1044] >서열 번호 109 CD730069-VH

[1045] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYQMGWVRQAPGKGLEWVSYIRSSGGQTIYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRTYS
SGWHIDYWGQGTLVTVSS

[1046] >서열 번호 110 CD730069-VL

[1047] DIQMTQSPDSLSASVGDRVTITCRASQSISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFSLTISSLQLEDFATYYCQQSYRTPLTFGGGT
KVEIQ

[1048] >서열 번호 111 클론 2 SGMY-VH

[1049] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGY
YWYMDVWGQGTMVTVSS

[1050] >서열 번호 112 클론 2 SGMY-VL

[1051] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTK
LTVL

[1052] >서열 번호 113 CDRH1 Y32V-VH

[1053] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSVAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGY
YWYMDVWGQGTMVTVSS

[1054] >서열 번호 114 CDRH1 M34R-VH

[1055] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYARSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGY
YWYMDVWGQGTMVTVSS

[1056] >서열 번호 115 CDRH2 T57P-VH

[1057] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSPYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGY
YWYMDVWGQGTMVTVSS

[1058] >서열 번호 116 CDRH2 A60G -VH

[1059] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGY
YWYMDVWGQGTMVTVSS

[1060] >서열 번호 117 CDRH2 G65R-VH

[1061] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKRRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGY
YWYMDVWGQGTMVTVSS

[1062] >서열 번호 118 CDRL2 T52S-VL

[1063] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTK
LTVLL

[1064] >서열 번호 119 CDRL2 R54Y-VL

[1065] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKYPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTK
LTVLVL

[1066] >서열 번호 120 CDRL2 P55H-VL

[1067] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSVLVIYEDTKRHSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKL
TVLVL

[1068] >서열 번호 121 CDRL2 P55L-VL

[1069] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRLSGIPERFSGSNRGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTK
LTVLVL

[1070] >서열 번호 122 2SGMY FW3-VL

[1071] GIPERFSGSNRGNTATLTISGTQAMDEADYYC

[1072] >서열 번호 123 CDRH1 Y32V CDR1-VH

[1073] SVAMS

[1074] >서열 번호 124 CDRH1 M34R CDR1-VH

[1075] SYARS

[1076] >서열 번호 125 CDRH2 T57P CDR2-VH

[1077] AISGSGGSPYYADSVKG

[1078] >서열 번호 126 CDRH2 A60G CDR2-VH

[1079] AISGSGGSTYYGDSVKG

[1080] >서열 번호 127 CDRL2 T52S CDR2-VL

[1081] EDSKRPS

[1082] >서열 번호 128 CDRL2 R54H CDR2-VL

[1083] EDTKYPS

[1084] >서열 번호 129 CDRL2 P55H CDR2-VL

[1085] EDTKRLS

[1086] >서열 번호 130 트레멜리무맙 VL, 미국 6,682,736으로부터

[1087] PSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV

[1088] >서열 번호 131 트레멜리무맙 VH, 미국 6,682,736으로부터

[1089] GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYG MDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

[1090] >서열 번호 132 트레멜리무맙 VH CDR1, 미국 6,682,736으로부터

[1091] GFTFSSYGMH

[1092] >서열 번호 133 트레멜리무맙 VH CDR2, 미국 6,682,736으로부터

[1093] VIWYDGSNKYYADSV

[1094] >서열 번호 134 트레멜리무맙 VH CDR3, 미국 6,682,736으로부터

[1095] DPRGATLYYYYYGMDV

[1096] >서열 번호 135 트레멜리무맙 VL CDR1, 미국 6,682,736으로부터

[1097] RASQSINSYLD

[1098] >서열 번호 136 트레멜리무맙 VL CDR2, 미국 6,682,736으로부터

[1099] AASSLQS

[1100] >서열 번호 137 트레멜리무맙 VL CDR3, 미국 6,682,736으로부터

[1101] QQYYSTPFT

[1102] >서열 번호 138

[1103] US 20130034559_77, 미국 20130034559로부터 서열 77, 생물체: 호모 사피엔스

[1104] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQG TKVEIK

[1105] >서열 번호 139

[1106] US 20130034559_72 미국 20130034559로부터 서열 72, 생물체: 호모 사피엔스

[1107] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGW FGELAFDYWGQGTLVTVSS

[1108] >서열 번호 140 - VH CDR1

[1109] US 20130034559_73 미국 20130034559로부터 서열 73, 생물체: 호모 사피엔스

[1110] RYWMS

[1111] >서열 번호 141 - VH CDR2

[1112] US 20130034559_74 미국 20130034559로부터 서열 74, 생물체: 호모 사피엔스

[1113] NIKQDGSEKYYVDSVKG

[1114] >서열 번호 142 - VH CDR3

[1115] US 20130034559_75 미국 20130034559로부터 서열 75, 생물체: 호모 사피엔스

[1116] EGGWFGELAFDY

[1117] >서열 번호 143 - VL CDR1

[1118] US 20130034559_78 미국 20130034559로부터 서열 78, 생물체: 호모 사피엔스

[1119] RASQRVSSSYLA

[1120] >서열 번호 144 - VL CDR2

[1121] US 20130034559_79 미국 20130034559로부터 서열 79, 생물체: 호모 사피엔스

[1122] DASSRAT

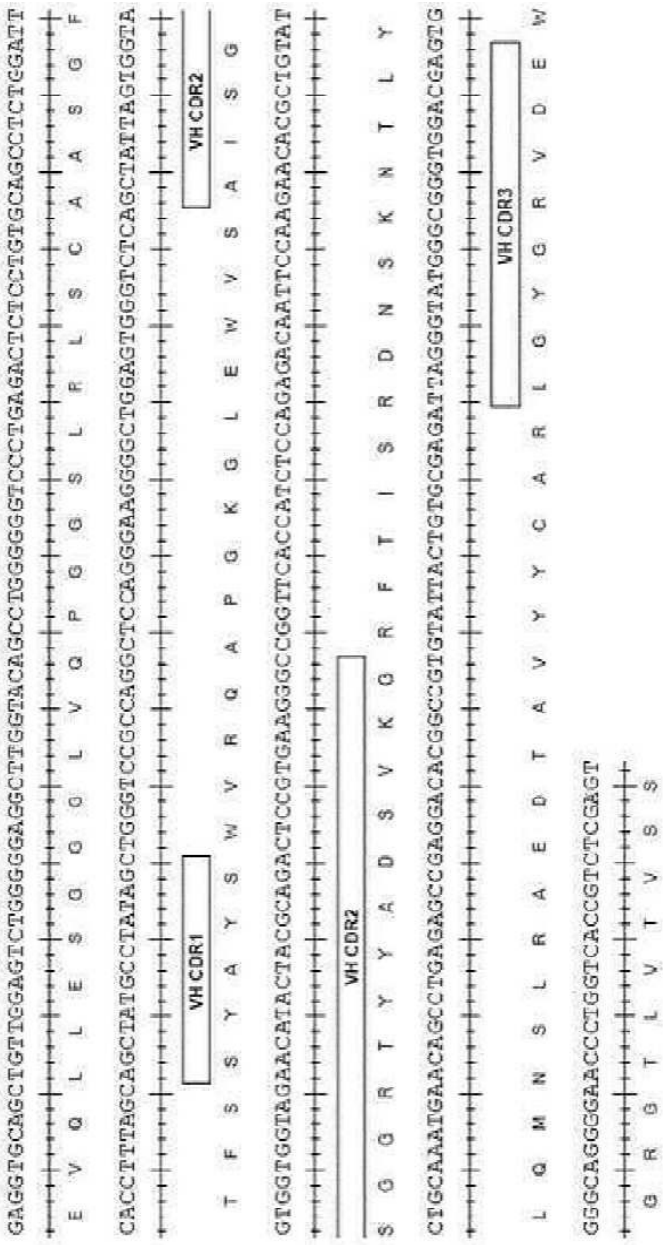
[1123] >서열 번호 145 - VL CDR3

[1124] US 20130034559_80 미국 20130034559로부터 서열 80, 생물체: 호모 사피엔스

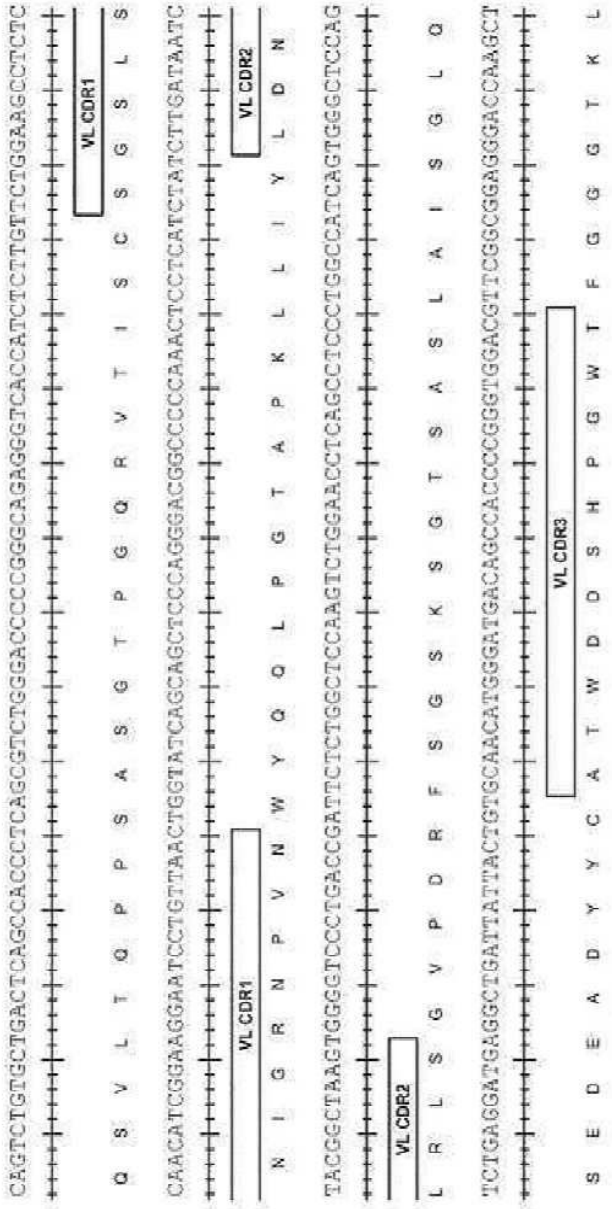
[1125] QQYGSLPWT

도면

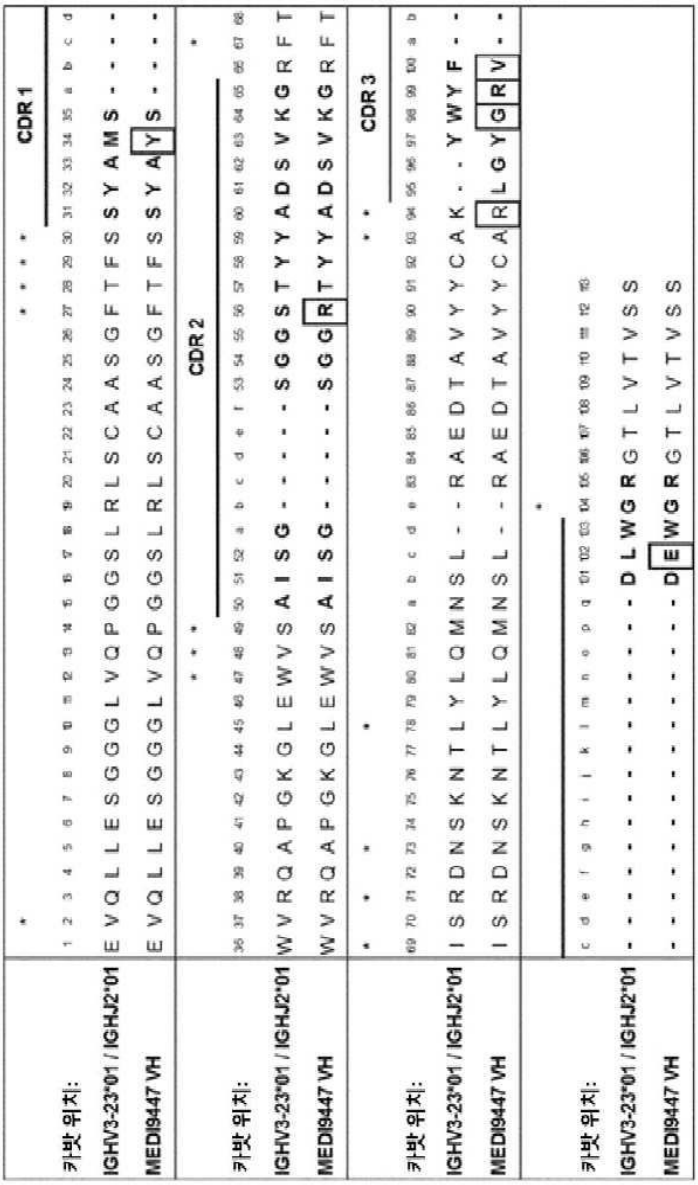
도면1a



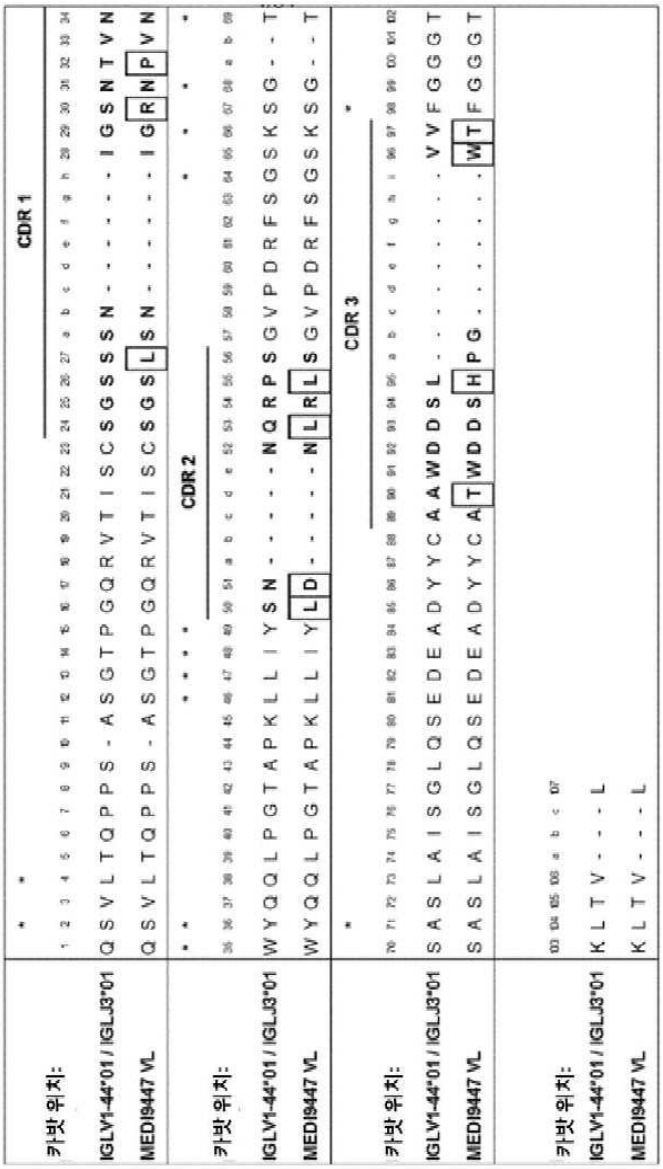
도면1b



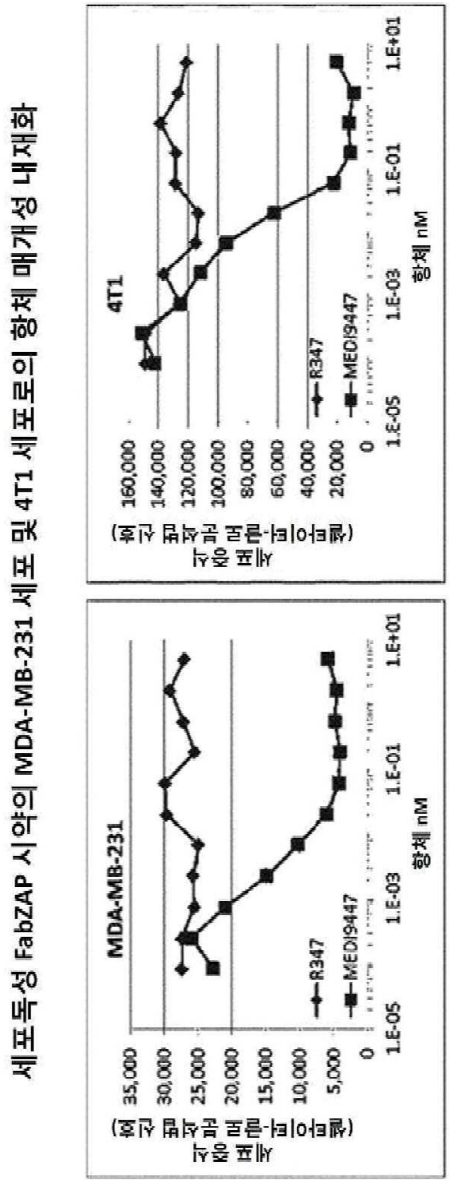
도면1c



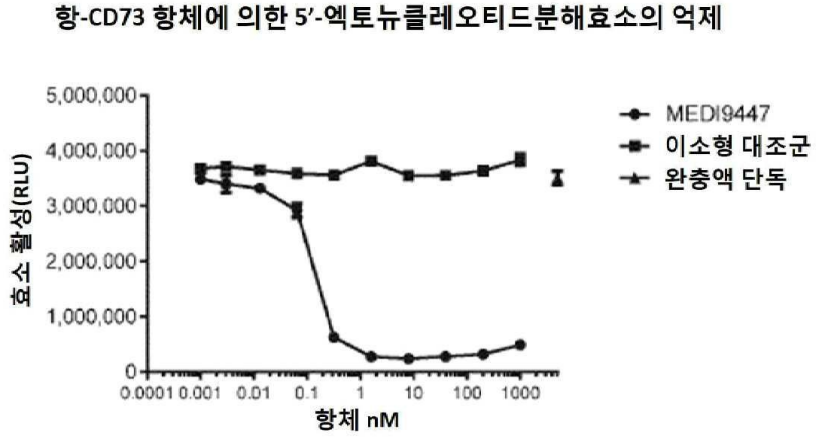
도면1d



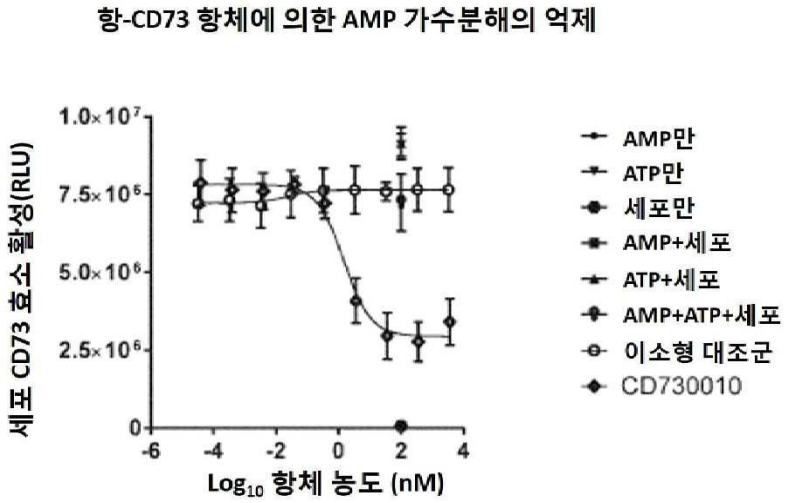
도면2


세포독성 FabZAP 시약의 MDA-MB-231 세포 및 4T1 세포로의 항체 매개성 내재화
4T1
MDA-MB-231
R347
MEDI9447
항체 nM
세포 증식
(셀타이터-글로 분석법 신호)

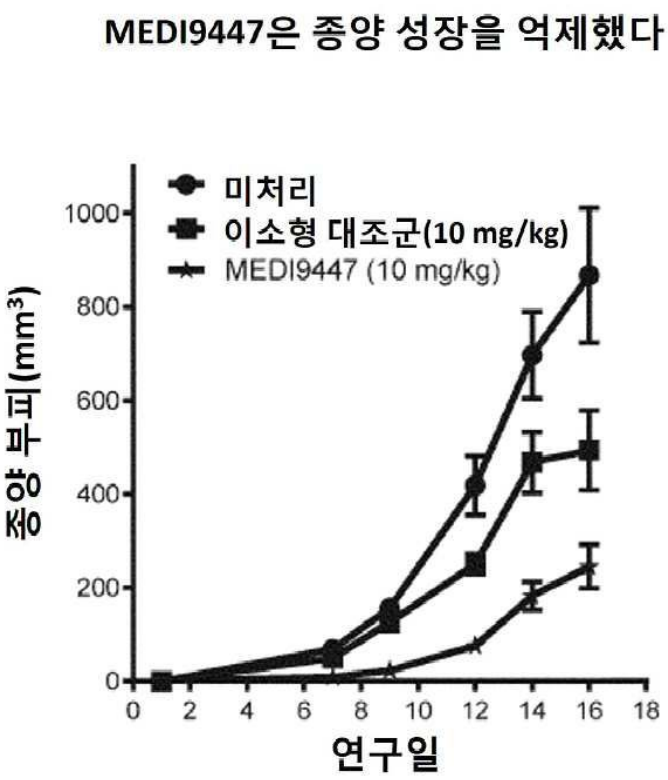
도면3a


항-CD73 항체에 의한 5'-엑토뉴클레오티드분해효소의 억제
효소 활성(RLU)
항체 nM
MEDI9447
이소형 대조군
완충액 단독

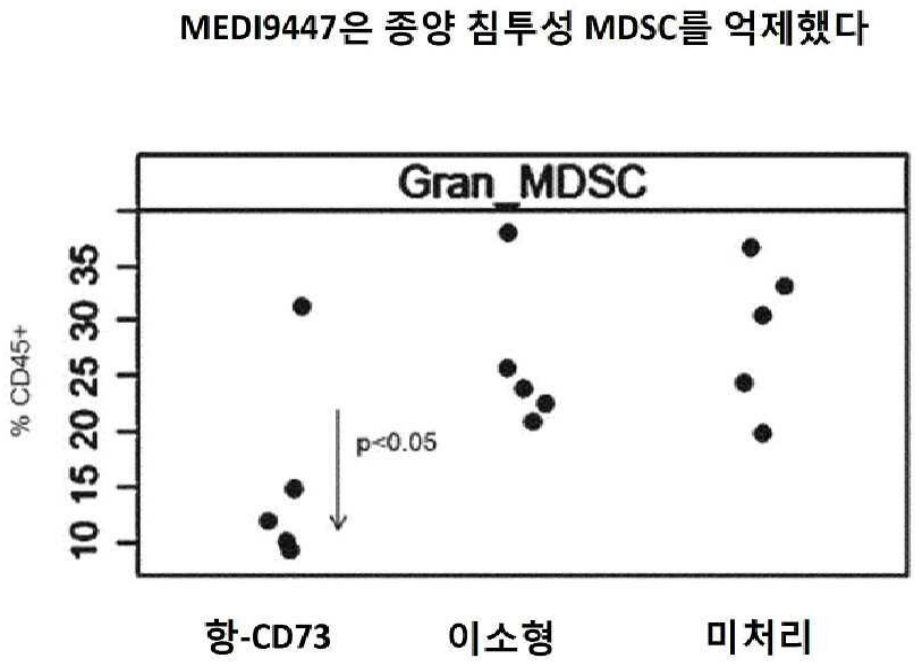
도면3b


항-CD73 항체에 의한 AMP 가수분해의 억제
세포 CD73 효소 활성(RLU)
1.0×10⁷
7.5×10⁶
5.0×10⁶
2.5×10⁶
0
-6
-4
-2
0
2
4
Log10 항체 농도 (nM)
AMP만
ATP만
세포만
AMP+세포
ATP+세포
AMP+ATP+세포
이소형 대조군
CD730010

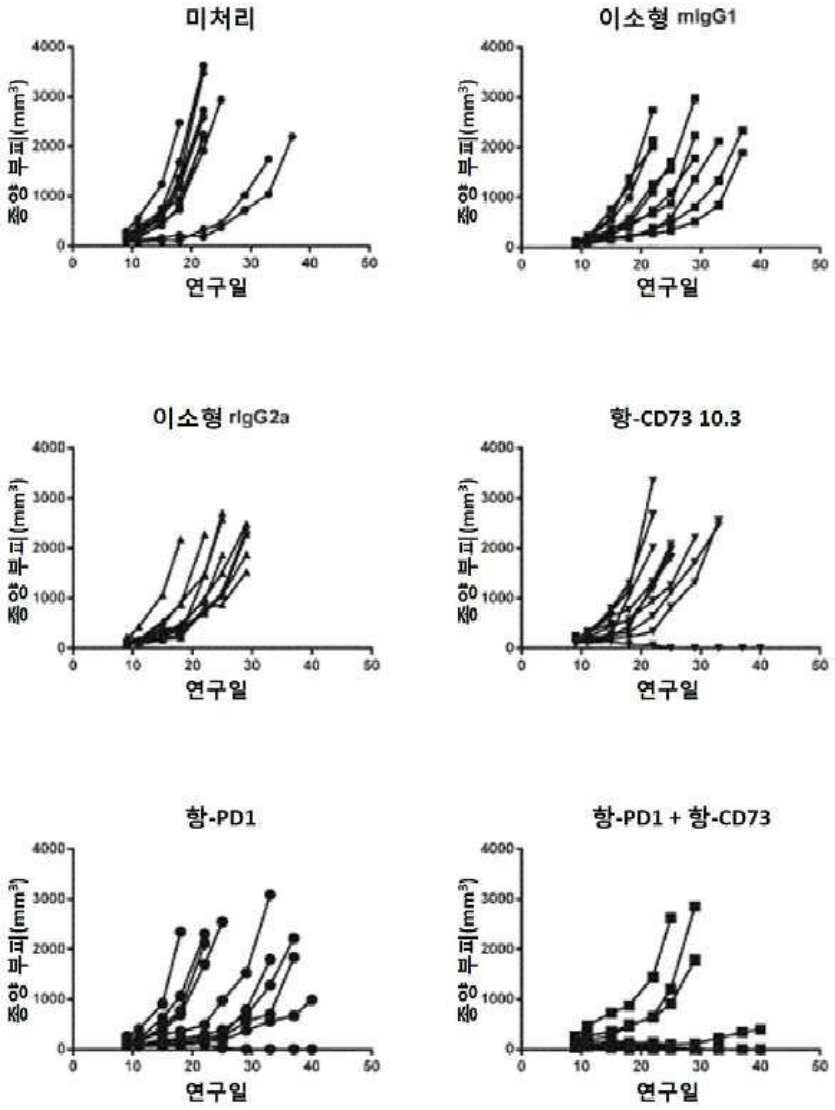
도면4


MEDI9447은 종양 성장을 억제했다
종양 부피(mm³)
1000
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
연구일
미처리
이소형 대조군(10 mg/kg)
MEDI9447 (10 mg/kg)

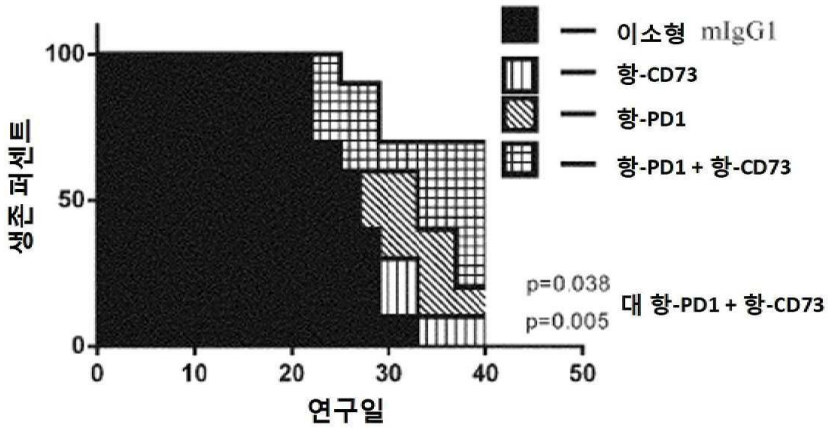
도면5


MEDI9447은 종양 침투성 MDSC를 억제했다
Gran_MDSC
% CD45+
10 15 20 25 30 35
p<0.05
항-CD73
이소형
미처리

도면6

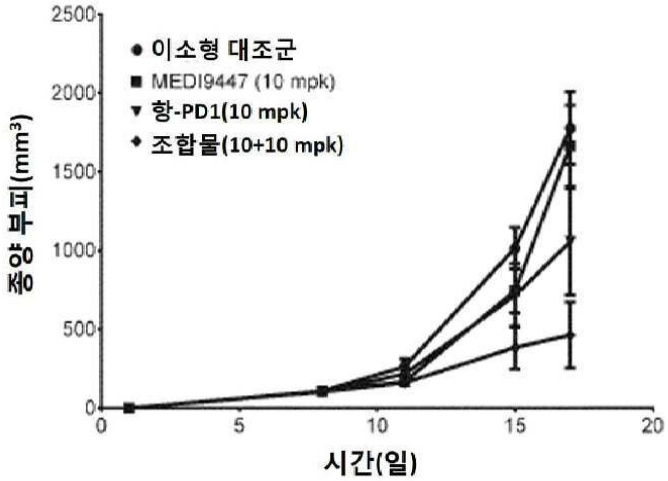

미처리
이소형 mIgG1
이소형 rIgG2a
항-CD73 10.3
항-PD1
항-PD1 + 항-CD73
종양 부피(mm³)
연구일

도면7

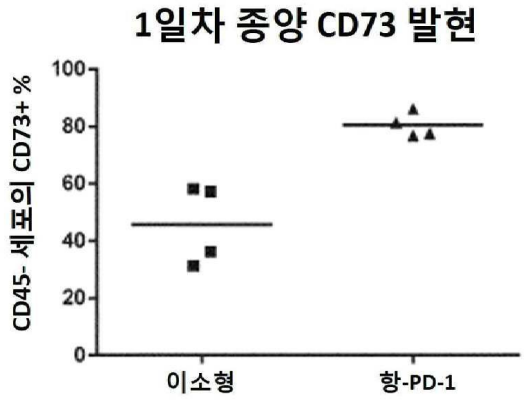

이소형 mIgG1
항-CD73
항-PD1
항-PD1 + 항-CD73
생존 퍼센트
연구일
p=0.038
p=0.005
대 항-PD1 + 항-CD73

도면8

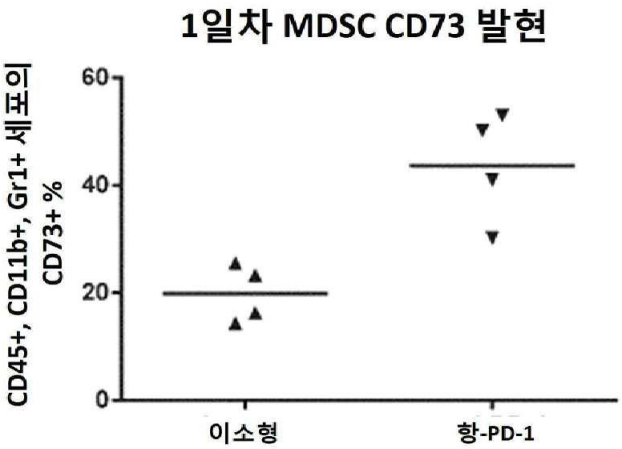
항-PD-1 및 MEDI9447의 조합물을 처리한 마우스 결장직장 종양



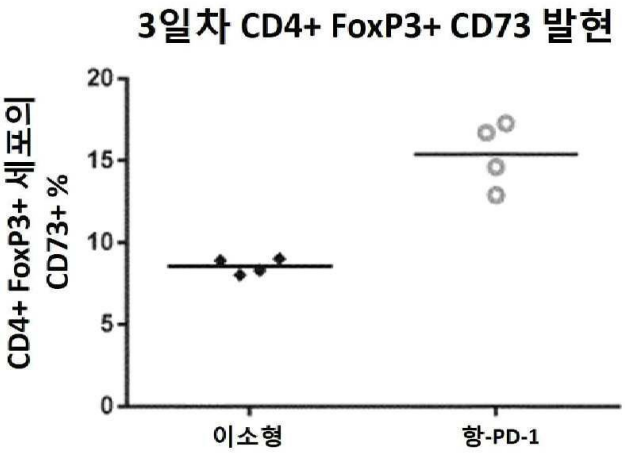
도면9



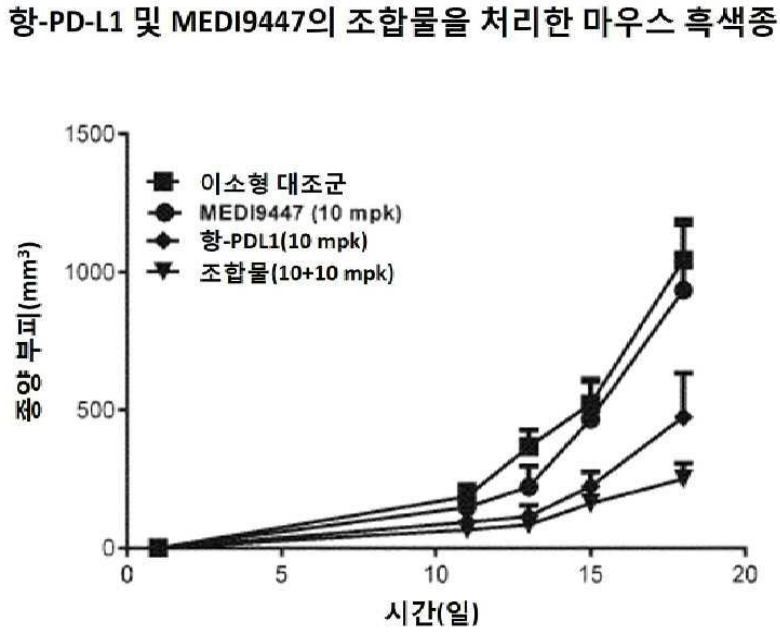
도면10



도면11

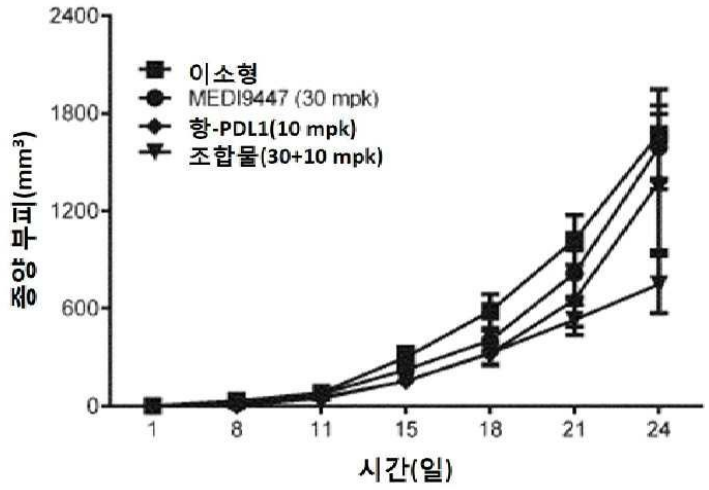

3일차 CD4+ FoxP3+ CD73 발현
CD4+ FoxP3+ 세포의 CD73+ %
20
15
10
5
0
이소형
항-PD-1

도면12

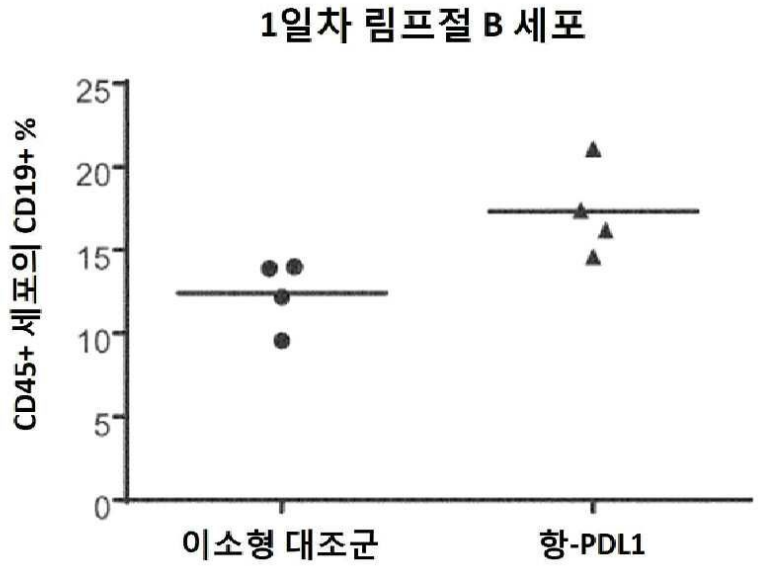

항-PD-L1 및 MEDI9447의 조합물을 처리한 마우스 흑색종 종양
종양 부피(mm³)
1500
1000
500
0
이소형 대조군
MEDI9447 (10 mpk)
항-PDL1(10 mpk)
조합물(10+10 mpk)
0
5
10
15
20
시간(일)

도면13

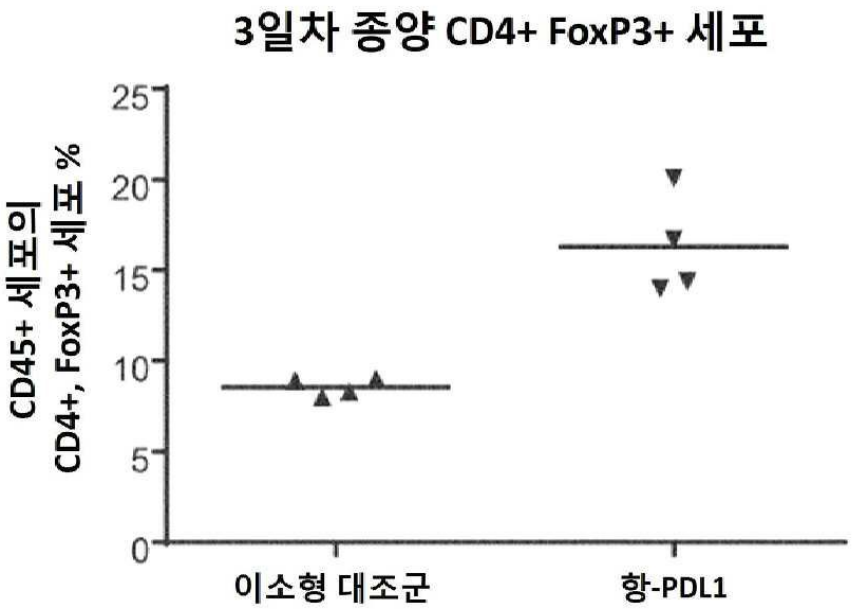
항-PD-L1 및 MEDI9447의 조합물을 처리한 마우스 림프종 종양



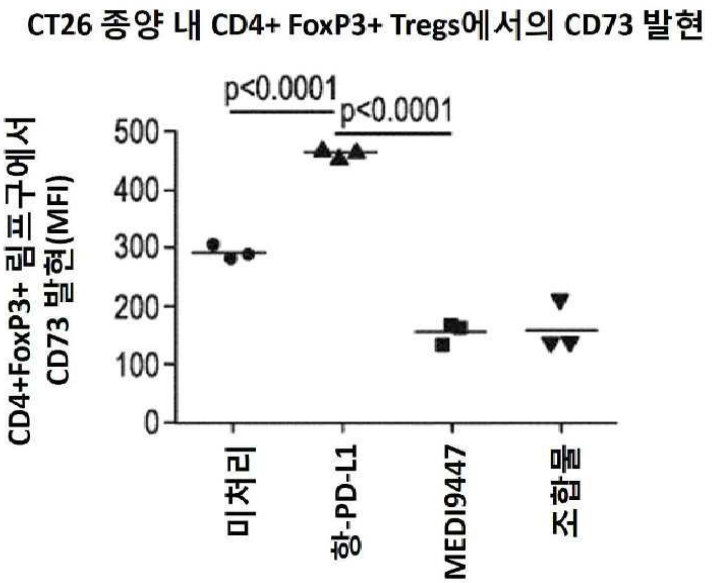
도면14



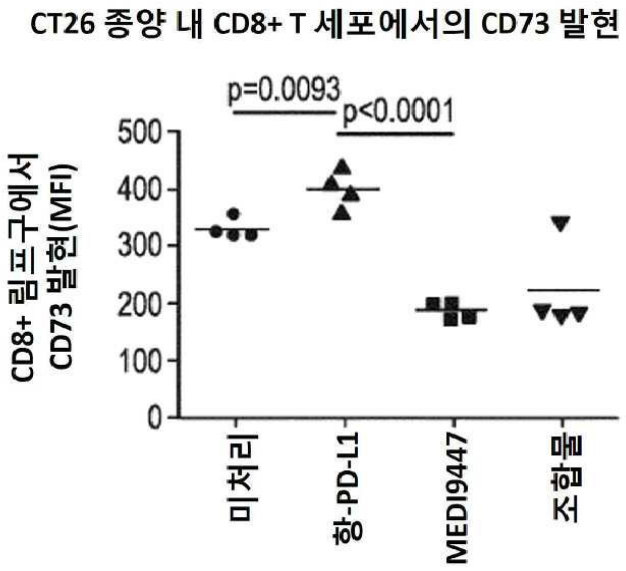
도면15


3일차 종양 CD4+ FoxP3+ 세포
CD45+ 세포의 CD4+, FoxP3+ 세포 %
25
20
15
10
5
0
이소형 대조군
항-PDL1

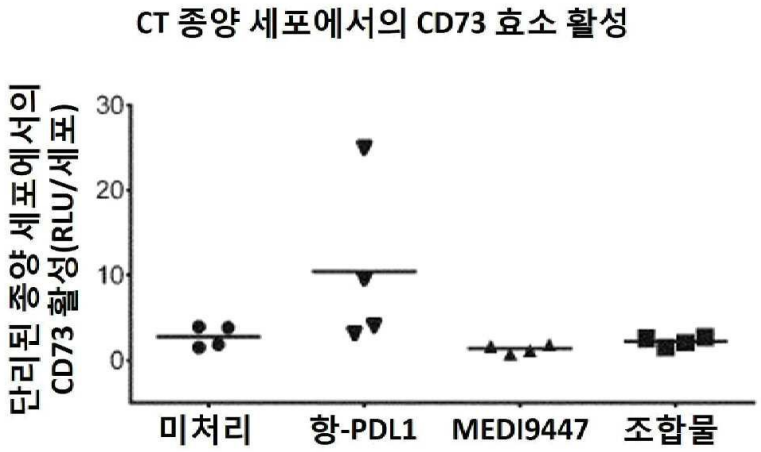
도면16a


CT26 종양 내 CD4+ FoxP3+ Tregs에서의 CD73 발현
CD4+FoxP3+ 림프구에서 CD73 발현(MFI)
p<0.0001
p<0.0001
500
400
300
200
100
0
미처리
항-PD-L1
MEDI9447
조합물

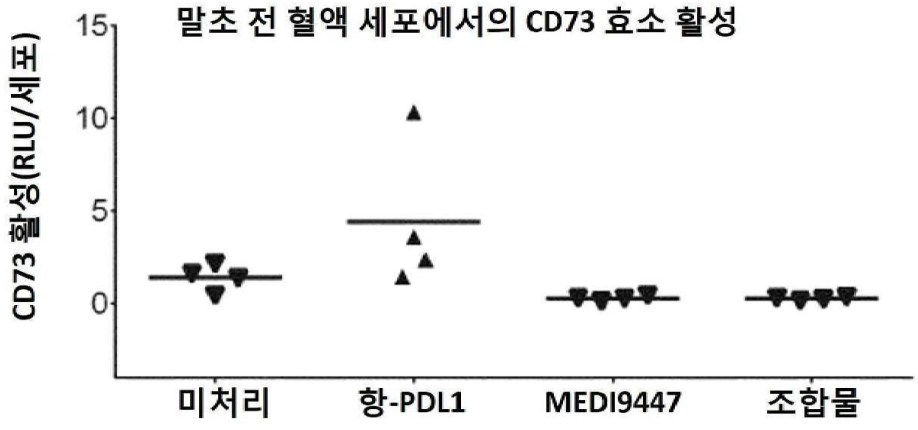
도면16b



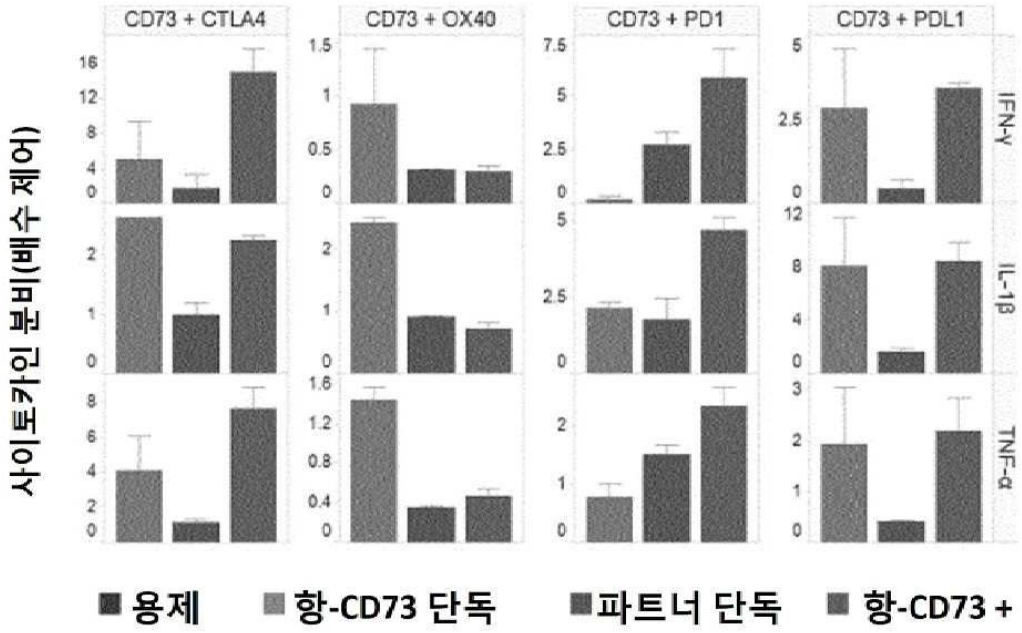
도면17a



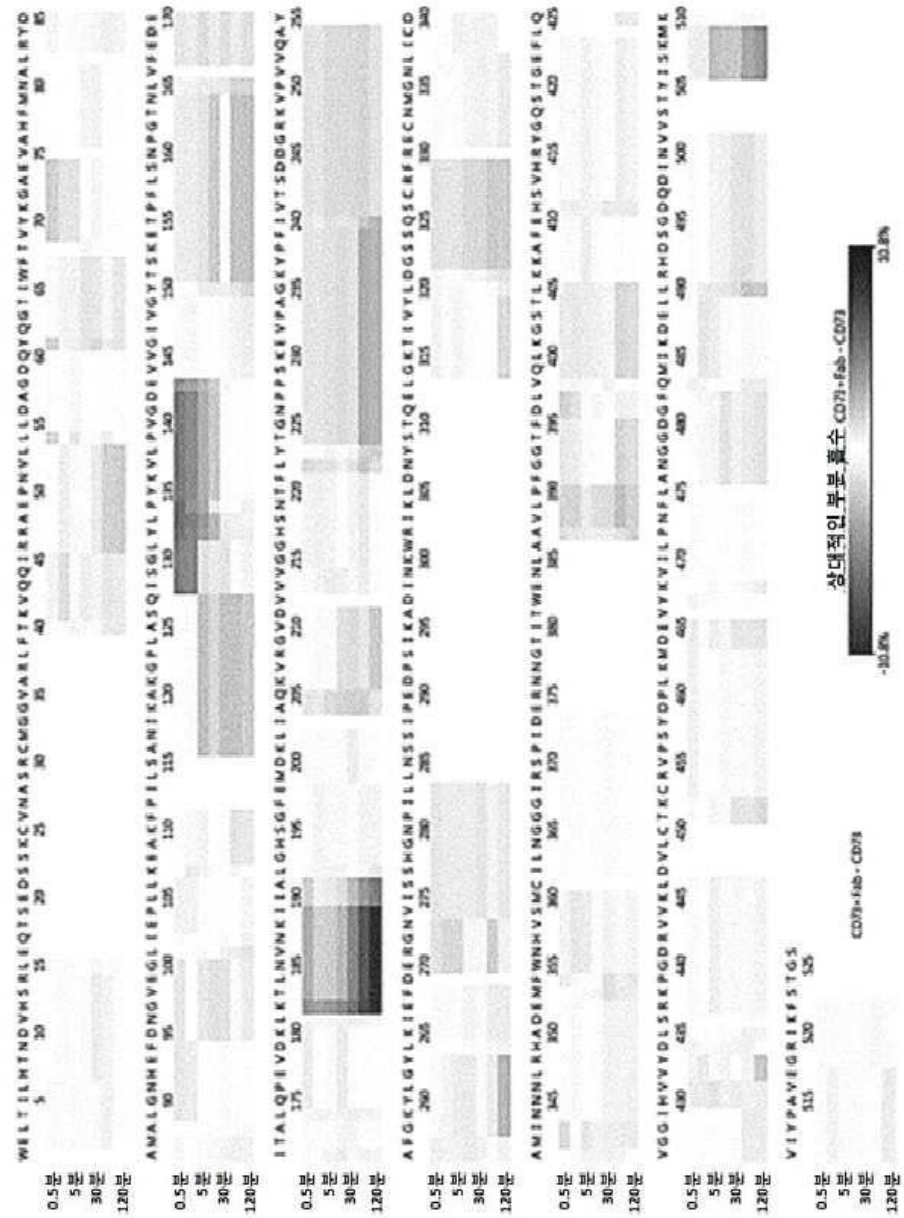
도면17b



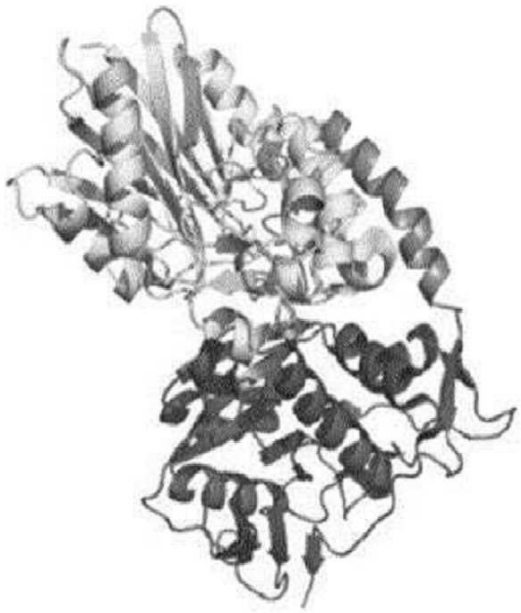
도면18


CD73 + CTLA4
CD73 + OX40
CD73 + PD1
CD73 + PDL1
IFN-γ
IL-1β
TNF-α
사이토카인 분비(배수 제어)
용제
항-CD73 단독
파트너 단독
항-CD73 +

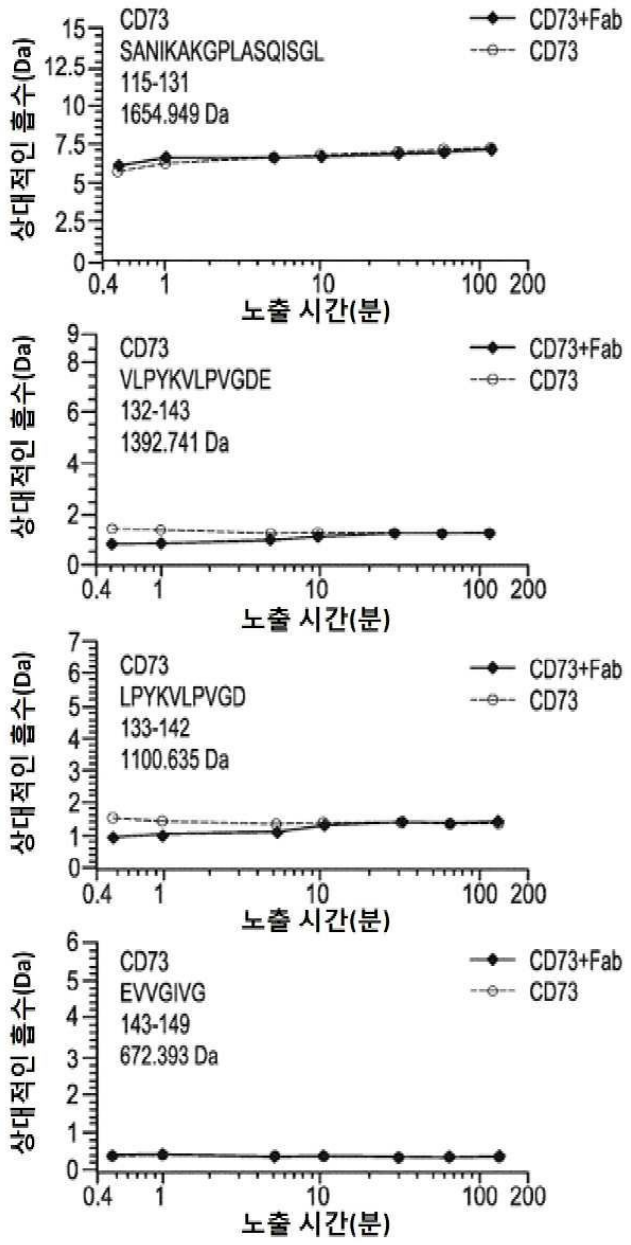
도면19a



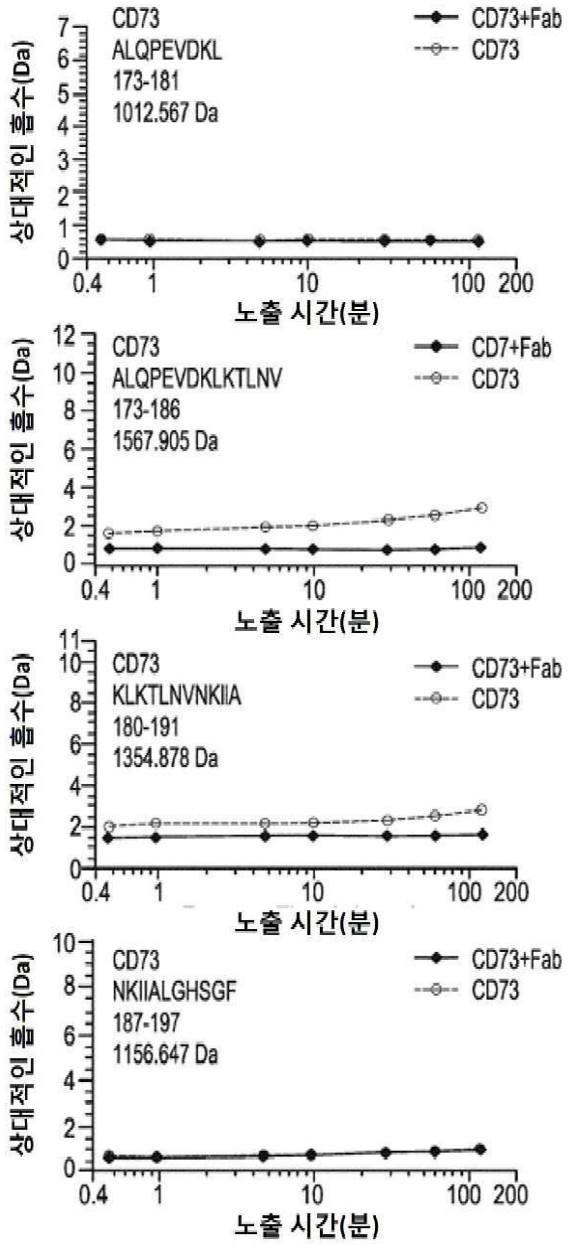
도면19b



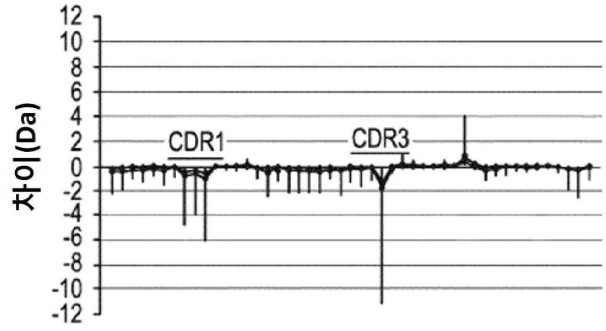
도면20a


CD73
SANIKAKGPLASQISGL
115-131
1654.949 Da
CD73+Fab
CD73
상대적인 흡수(Da)
노출 시간(분)
CD73
VLPYKVLPVGDE
132-143
1392.741 Da
CD73+Fab
CD73
상대적인 흡수(Da)
노출 시간(분)
CD73
LPYKVLPVGD
133-142
1100.635 Da
CD73+Fab
CD73
상대적인 흡수(Da)
노출 시간(분)
CD73
EVVGIVG
143-149
672.393 Da
CD73+Fab
CD73
상대적인 흡수(Da)
노출 시간(분)

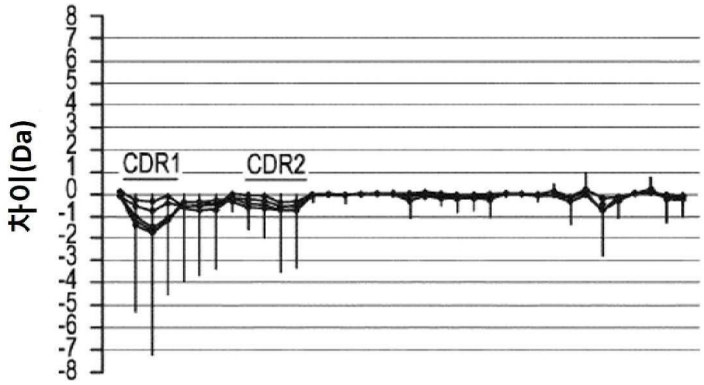
도면20b


CD73
ALQPEVDKL
173-181
1012.567 Da
CD73+Fab
CD73
상대적인 흡수(Da)
노출 시간(분)
CD73
ALQPEVDKLKTLNV
173-186
1567.905 Da
CD7+Fab
CD73
상대적인 흡수(Da)
노출 시간(분)
CD73
KLKTLNVNKIIA
180-191
1354.878 Da
CD73+Fab
CD73
상대적인 흡수(Da)
노출 시간(분)
CD73
NKIIALGHSGF
187-197
1156.647 Da
CD73+Fab
CD73
상대적인 흡수(Da)
노출 시간(분)

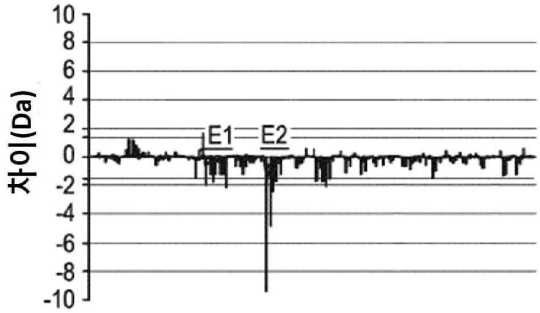
도면20c


차이(Da)
CDR1
CDR3

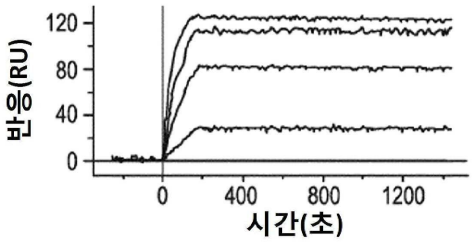
도면20d



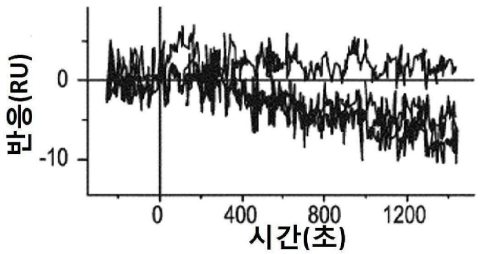
도면20e



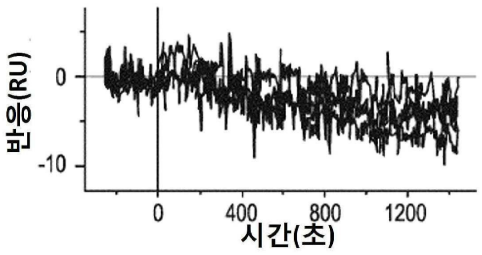
도면21a



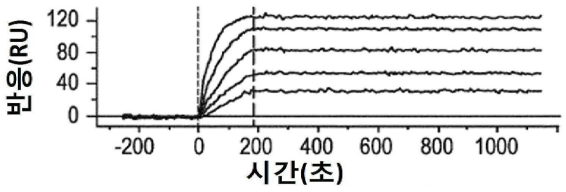
도면21b



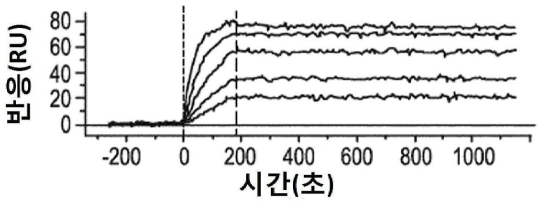
도면21c



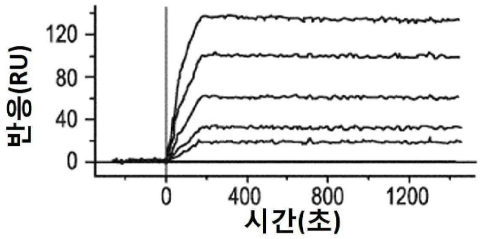
도면21d



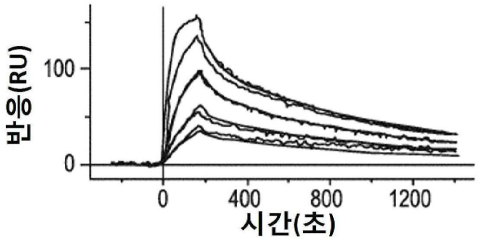
도면21e



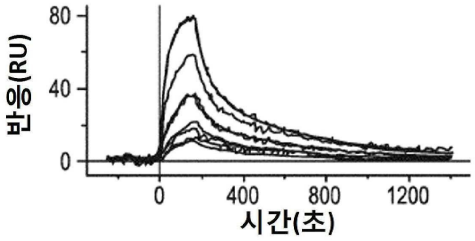
도면21f



도면21g



도면21h



도면22a

기호 해설	HDX-MX 확인된 계면	AMP 결합/촉매 자리
	금속 결합/촉매 자리 잔기	전이 상태 안정화제
	N-글리코실화 자리	

N 말단 부위 1a

위치	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
인간	W	E	L	T	I	L	H	T	N	D	V	H	S	R	L	E
닭	**L**	**R**	L	**R**	**L**	L	H	T	N	D	V	H	**A**	**H**	**V**	E

N 말단 부위 1a

위치	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		31
인간	Q	T	S	E	D	S	S	K	C	V	N	A	S	R	-	C
닭	**A**	**R**	**G**	-	-	-	-	-	C	**A**	**E**	**G**	**P**	R	G	C

N 말단 부위 1a

위치	32	33	34
인간	M	G	G
닭	**F**	G	G

N 말단 부위 1b

위치	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
인간	V	A	R	L	F	T	K	V	Q	Q	I	R	R	A	E	P
닭	V	A	R	**R**	**A**	**A**	**R**	V	**A**	**A**	**E**	R	**A**	A	**Q**	**R**

N 말단 부위 1b

위치	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66
인간	N	V	L	L	L	D	A	G	D	Q	Y	Q	G	T	I	W
닭	N	V	L	L	L	D	A	G	D	Q	Y	Q	G	**S**	**V**	W

N 말단 부위 1b

위치	67	68	69	70	71
인간	F	T	V	Y	K
닭	F	**S**	**R**	**F**	K

N 말단 부위 2a

위치	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87
인간	G	A	E	V	A	H	F	M	N	A	L	R	Y	D	A	M
닭	G	**Q**	E	**A**	**V**	H	F	M	N	**L**	L	R	Y	D	A	M

N 말단 부위 2a

위치	88	89	90	91
인간	A	L	G	N
닭	A	L	G	N

도면22b

N 말단 부위 2b

위치	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
인간	H	E	F	D	N	G	V	E	G	L	I	E	P	L	L	K
닭	H	E	F	D	E	G	V	R	G	L	L	N	P	L	L	R

N 말단 부위 2b

위치	109	110	111	112	113
인간	E	A	K	F	P	I
닭	N	A	S	F	A	I

N 말단 부위 2c

위치	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129
인간	L	S	A	N	I	K	A	K	G	P	L	A	S	Q	I	S
닭	L	S	A	N	I	K	G	K	T	P	L	G	N	Q	M	M

N 말단 부위 2c

위치	130	131	132	133	134
인간	G	L	Y	L	P
닭	K	Y	V	H	P

N 말단 부위 2d

위치	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
인간	Y	K	V	L	P	V	G	D	E	V	V	G	I	V	G	Y
닭	Y	K	I	L	H	I	D	S	E	K	I	G	I	V	G	Y

N 말단 부위 2d

위치	151	152
인간	T	S
닭	T	T

N 말단 부위 3a

위치	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168
인간	K	E	T	P	F	L	S	N	P	G	T	N	L	V	F	E
닭	Q	E	T	S	F	L	S	Q	P	G	N	D	V	I	F	E

N 말단 부위 3a

위치	169	170
인간	D	E
닭	D	E

N 말단 부위 3b

위치	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186
인간	I	T	A	L	Q	P	E	V	D	K	L	K	T	L	N	V
닭	I	E	A	L	Q	V	Q	V	N	K	L	T	A	M	G	V

도면22c

N 말단 부위 3b

위치	197	198
인간	N	K
닭	N	K

N 말단 부위 3c

위치	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222
인간	I	I	A	L	G	H	S	G	F	E	M	D	K	L	I	A	Q	K	V	R	G	V	D	V	V	V	G	G	H	S	N	T	F	L
닭	I	I	A	L	G	H	S	G	F	T	V	D	I	N	I	A	Q	K	V	K	G	V	D	V	V	I	G	G	H	T	N	T	F	L

N 말단 부위 3d

위치	223	224
인간	Y	T
닭	Y	T

N 말단 부위 4

위치	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256
인간	G	N	P	P	S	K	E	V	P	A	G	K	Y	P	F	I	V	T	S	D	D	G	R	K	V	P	V	V	Q	A	Y	A
닭	G	T	P	P	S	T	E	Q	P	A	G	P	Y	P	F	M	V	D	S	D	D	G	R	K	V	P	V	V	Q	A	Y	A

N 말단 부위 4

위치	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288
인간	F	G	K	Y	L	G	Y	L	K	I	E	F	D	E	R	G	N	V	I	S	S	H	G	N	P	I	L	L	N	S	S	I
닭	Y	G	K	Y	L	G	Y	L	N	V	T	F	D	E	K	G	N	V	V	E	A	V	G	N	P	I	L	L	D	S	S	V

도면22d

N 말단 부위 4

위치	289	290	291
인간	P	E	D
닭	P	E	D

알파 헬릭스 링커

위치	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307
인간	P	S	I	K	A	D	I	N	K	W	R	I	K	L	D	N
닭	E	Q	I	K	E	E	V	E	K	W	R	K	N	L	G	N

알파 헬릭스 링커

위치	308	309	310
인간	Y	S	T
닭	Y	S	-

C 말단 도메인 1

위치	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326
인간	Q	E	L	G	K	T	I	V	Y	L	D	G	S	S	Q	S
닭	K	E	I	G	T	T	S	V	Y	L	N	G	T	S	E	A

C 말단 도메인 1

위치	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342
인간	C	R	F	R	E	C	N	M	G	N	L	I	C	D	A	M
닭	C	R	F	Q	E	C	N	M	G	N	L	L	C	D	A	M

C 말단 도메인 1

위치	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358
인간	I	N	N	N	L	R	H	A	D	E	M	F	W	N	H	V
닭	L	Y	E	N	V	R	R	P	D	R	K	S	W	N	H	V

C 말단 도메인 1

위치	359	360	361	362	363	364
인간	S	M	C	I	L	N
닭	S	L	C	I	L	N

C 말단 도메인 2

위치	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376		377	378	379
인간	G	G	G	I	R	S	P	I	D	E	R	N	-	N	G	T
닭	G	G	G	I	R	A	S	I	D	E	R	N	A	N	G	S

C 말단 도메인 2

위치	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395
인간	I	T	W	E	N	L	A	A	V	L	P	F	G	G	T	F
닭	I	T	M	E	D	L	L	S	V	L	P	F	G	G	R	F

도면22e

C 말단 도메인 2

위치	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411
인간	D	L	V	Q	L	K	G	S	T	L	K	K	A	F	E	H
닭	D	L	V	T	L	K	G	S	T	L	K	E	A	F	E	H

C 말단 도메인 2

위치	412	413	414	415	416	417
인간	S	V	H	R	Y	G
닭	S	V	R	R	Y	G

C 말단 도메인 3

위치	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433
인간	Q	S	T	G	E	F	L	Q	V	G	G	I	H	V	V	Y
닭	R	G	T	G	E	L	L	Q	V	G	G	I	H	V	V	Y

C 말단 도메인 3

위치	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449
인간	D	L	S	R	K	P	G	D	R	V	V	K	L	D	V	L
닭	D	L	S	R	A	P	G	H	R	A	V	S	I	E	V	L

C 말단 도메인 3

위치	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465
인간	C	T	K	C	R	V	P	S	Y	D	P	L	K	M	D	E
닭	C	T	A	C	R	V	P	A	Y	V	P	L	E	M	D	E

C 말단 도메인 3

위치	466	467	468	469	470	471
인간	V	Y	K	V	I	L
닭	V	Y	N	V	T	L

C 말단 도메인 4

위치	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487
인간	P	N	F	L	A	N	G	G	D	G	F	Q	M	I	K	D
닭	P	S	Y	M	L	F	G	G	D	G	Y	Y	M	L	R	D

C 말단 도메인 4

위치	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503
인간	E	L	L	R	H	D	S	G	D	Q	D	I	N	V	V	S
닭	N	H	I	T	Y	S	K	G	E	P	D	I	E	V	V	S

C 말단 도메인 4

위치	504	505	506	507	508
인간	T	Y	I	S	K
닭	R	Y	L	D	R

C 말단 도메인 4

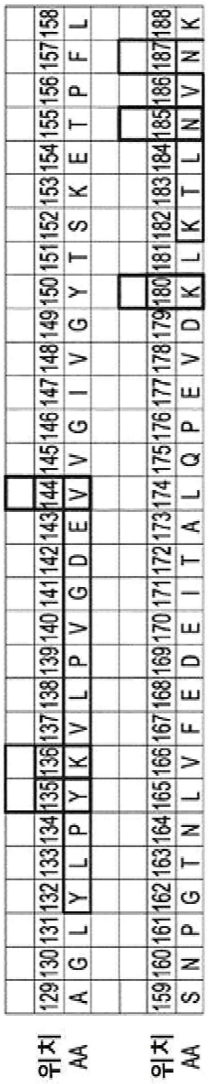
위치	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523
인간	M	K	V	I	Y	P	A	V	E	G	R	I	K	F	S
닭	M	K	R	V	Y	P	A	V	E	G	R	I	K	F	S

도면23

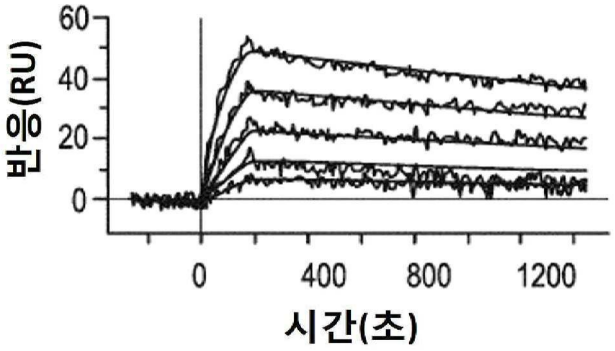
CD73 구축물	KO 스왑/돌연변이 위치	KD(M)	ka(1/Ms)	kd(1/s)
야생형 인간 CD73	WT huCD73	4.20E-12	4.63E+06	1.94E-05
KO_N말단+C말단	KO_1-291+311-523		결합 없음	
KO_N말단	KO_1-291		결합 없음	
KO_링커	KO_292-310	4.14E-12	5.57E+06	2.31E-05
KO-C말단	KO_311-523	1.70E-12	4.75E+06	8.10E-06
HDX_E1	KO_132-143	9.90E-12	2.15E+06	2.12E-05
HDX_E2	KO_182-187*	2.83E-09	5.73E+06	1.62E-02
HDX_E1+E2	KO_132-143+182-187*	4.43E-09	4.76E+06	2.11E-002
V144K	V144K	8.14E-11	1.13E+06	9.18E-05
K180A	K180A	4.35E-11	3.45E+06	1.54E-04
N185G	N185G*	2.69E-11	9.11E+06	2.45E-04
V144K+K180A	V144K+K180A	2.68E-09	1.58E+06	4.25E-03
V144K+N185G	V144K+N185G		결합 없음	
K180A+N185G	K180A+N185G		결합 없음	

*2:1 적합으로부터 유래된 동역학 값 (방법 참조)

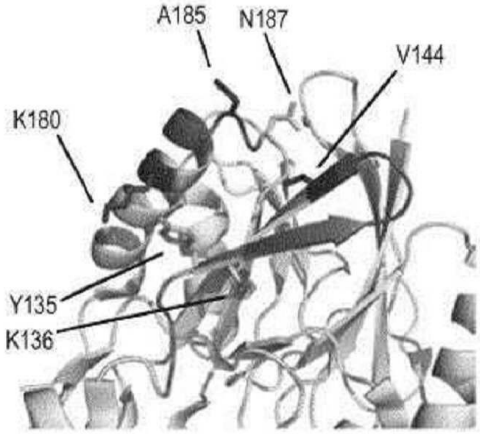
도면24a


위치 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158
AA A G L Y L P Y K V L P V G D E V V G I V G Y T S K E T P F L
위치 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188
AA S N P G T N L V F E D E I T A L Q P E V G V D K L K T L N V K

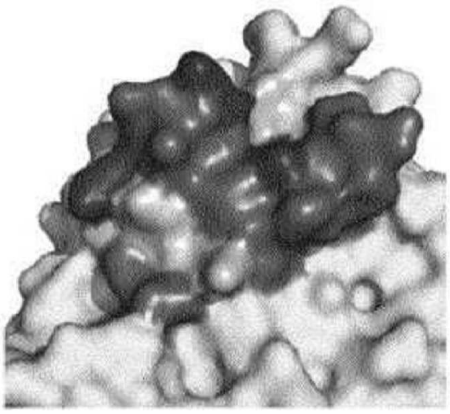
도면24b


60
40
20
0
반응(RU)
0
400
800
1200
시간(초)

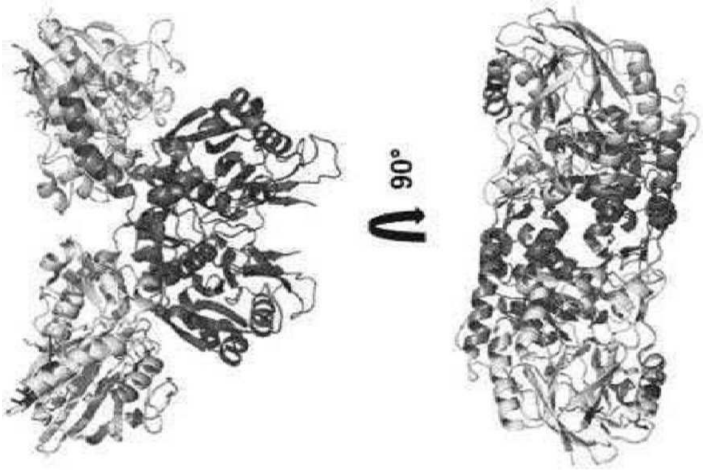
도면24c



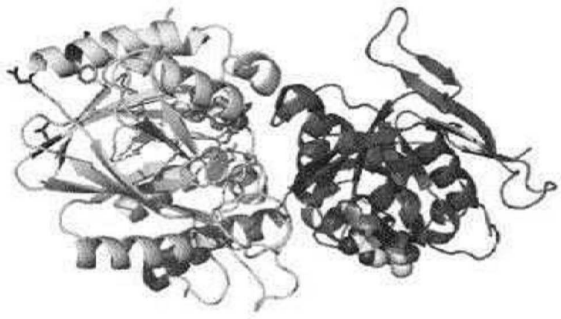
도면24d



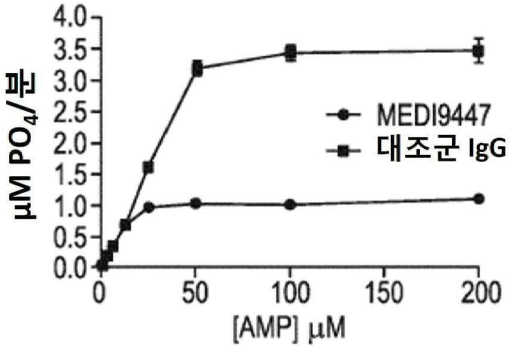
도면24e



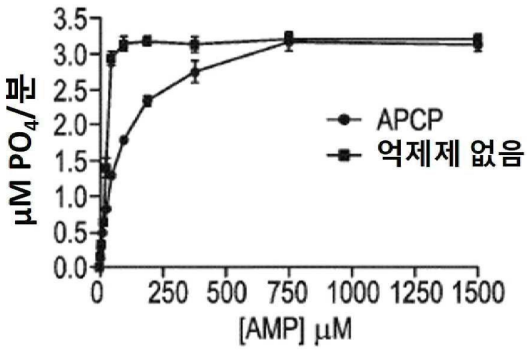
도면24f



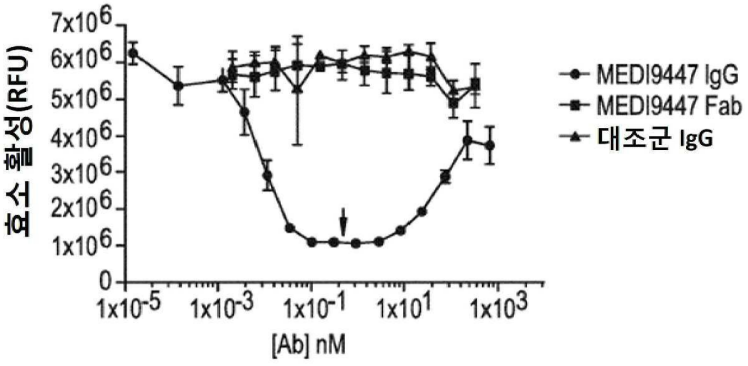
도면25a



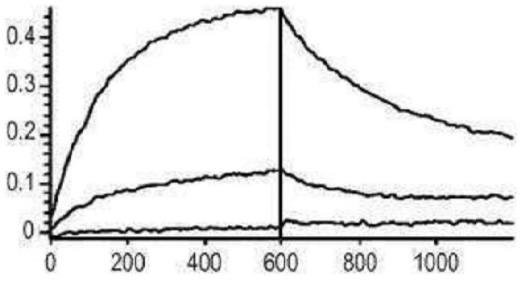
도면25b



도면25c



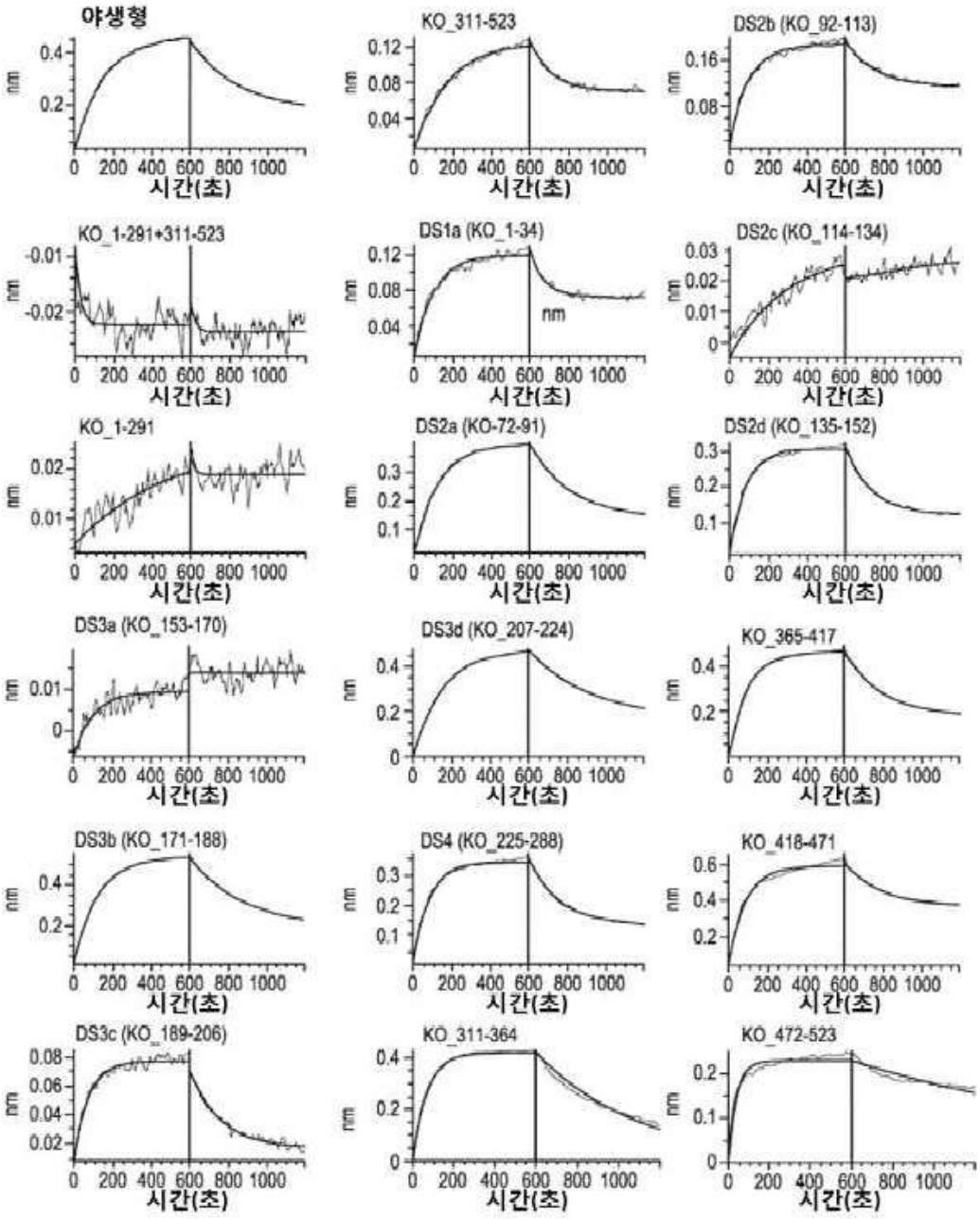
도면26a



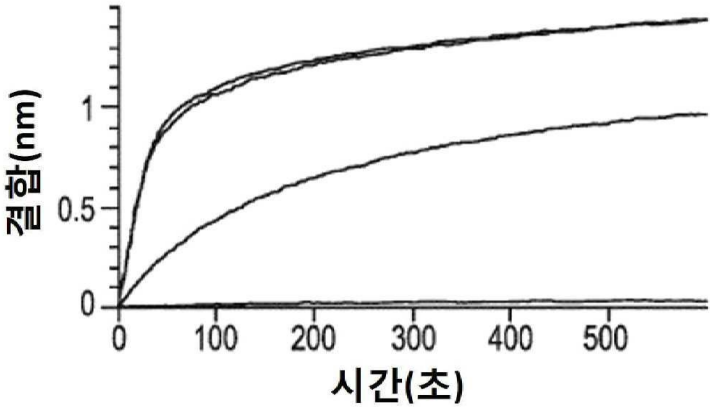
도면26b



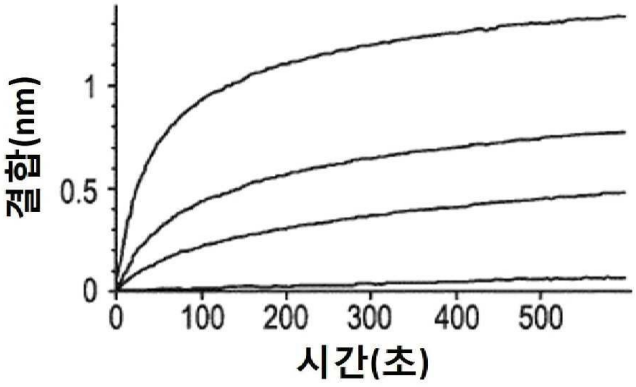
도면26c


야생형
KO_311-523
DS2b (KO_92-113)
KO_1-291+311-523
DS1a (KO_1-34)
DS2c (KO_114-134)
KO_1-291
DS2a (KO-72-91)
DS2d (KO_135-152)
DS3a (KO_153-170)
DS3d (KO_207-224)
KO_365-417
DS3b (KO_171-188)
DS4 (KO_225-288)
KO_418-471
DS3c (KO_189-206)
KO_311-364
KO_472-523
nm
시간(초)

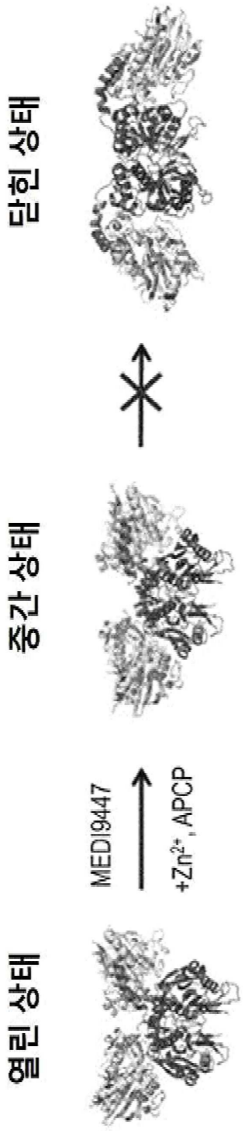
도면27a


결합(nm)
1
0.5
0
0
100
200
300
400
500
시간(초)

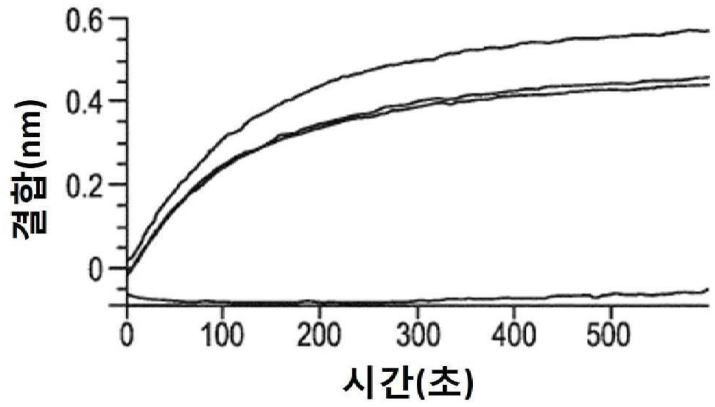
도면27b


결합(nm)
1
0.5
0
0
100
200
300
400
500
시간(초)

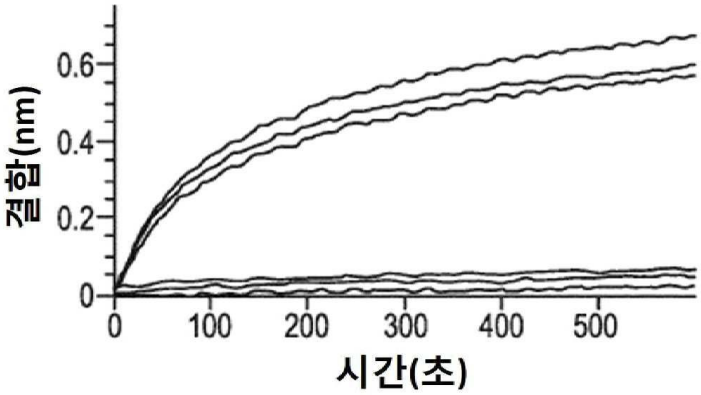
도면27c


닫힌 상태
중간 상태
MEDI9447
+Zn2+, APCP
열린 상태

도면28a


0.6
0.4
0.2
0
결합(nm)
0
100
200
300
400
500
시간(초)

도면28b



도면29a

	MEDI9447:CD73 몰 비율	
	1:0	0:1
	피크 1	피크 1
SEC 체류 시간(분)	8.6	8.6
Mw (g/mol)	1.454E+05(±0.092%)	1.248E5 (±0.090%)
다분산성(Mw/Mn)	1.001 (±0.130%)	1.002 (±0.126%)

	1:1		
	피크 1	피크 2	피크 3
SEC 체류 시간(분)	5.7	6.2	8.5
Mw (g/mol)	1.736E+06 (±0.105%)	6.643E+05(±0.244%)	2.201E+05 (±0.869%)
다분산성(Mw/Mn)	1.029 (±0.147%)	1.004 (±0.342%)	1.001 (±1.255%)

	0.5:1		
	피크 1	피크 2	피크 3
SEC 체류 시간(분)	5.7	6.4	8.6
Mw (g/mol)	1.336E+06 (±0.120%)	5.452E+05 (±0.094%)	1.357E+05 (±0.114%)
다분산성(Mw/Mn)	1.029 (±0.169%)	1.004 (±0.132%)	1.001 (±0.161%)

	0.1:1		
	피크 1	피크 2	피크 3
SEC 체류 시간(분)	5.7	6.4	8.6
Mw (g/mol)	1.230E+06 (±0.093%)	5.298E+05 (±0.066%)	1.268E5 (±0.084%)
다분산성(Mw/Mn)	1.015 (±0.129%)	1.002 (±0.094%)	1.002 (±0.118%)

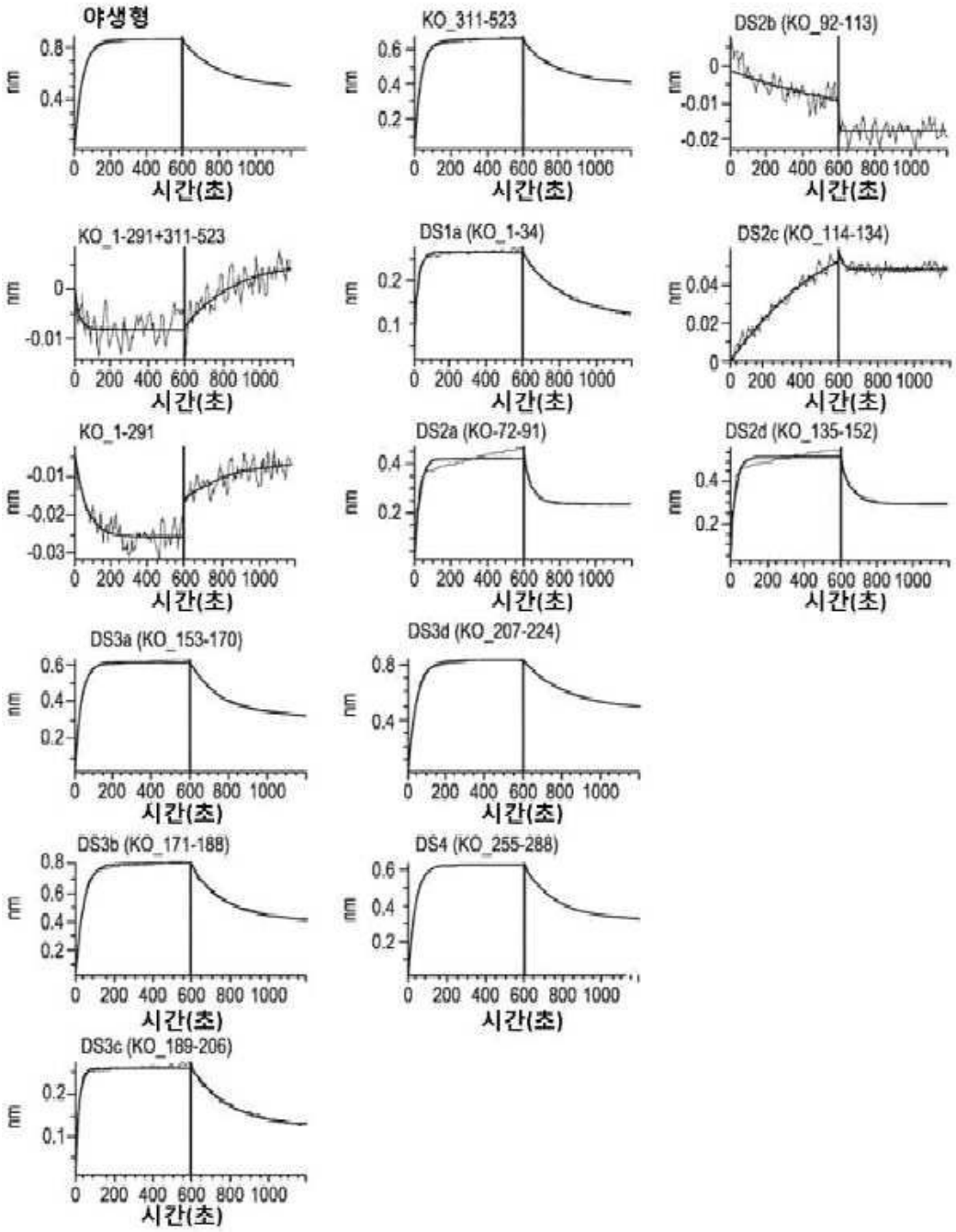
	mAb B:CD73 몰 비율	
	1:0	0:1
	피크 1	피크 1
SEC 체류 시간(분)	8.2	8.6
Mw (g/mol)	1.485E+05(±0.099%)	1.248E5 (±0.090%)
다분산성(Mw/Mn)	1.002 (±0.140%)	1.002 (±0.126%)

	1:1	
	피크 1	피크 2
SEC 체류 시간(분)	6.6	7.1
Mw (g/mol)	3.802E+05 (±0.075%)	2.965E+05 (±0.108%)
다분산성(Mw/Mn)	1.0000 (±0.106%)	1.000 (±0.153%)

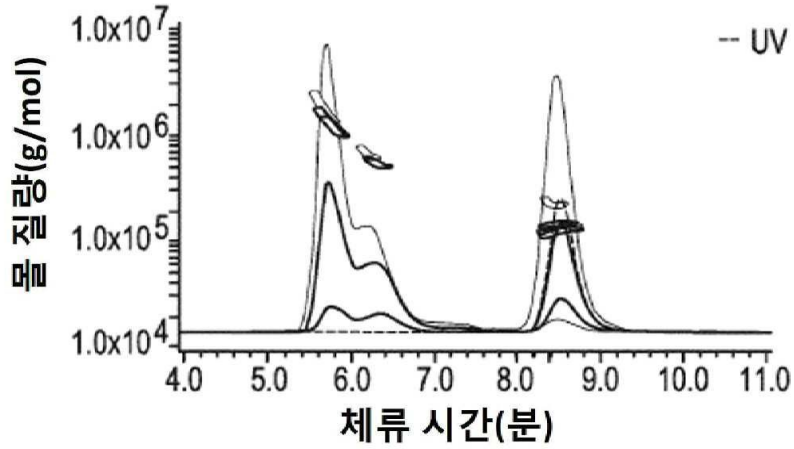
	0.5:1	
	피크 1	피크 2
SEC 체류 시간(분)	7.2	8.5
Mw (g/mol)	2.935E+05 (±0.112%)	1.290E+05 (±0.086%)
다분산성(Mw/Mn)	1.000 (±0.159%)	1.000 (±0.122%)

	0.1:1	
	피크 1	피크 2
SEC 체류 시간(분)	7.3	8.6
Mw (g/mol)	2.716E+05 (±0.071%)	1.258E+05 (±0.098%)
다분산성(Mw/Mn)	1.000 (±0.100%)	1.002 (±0.139%)

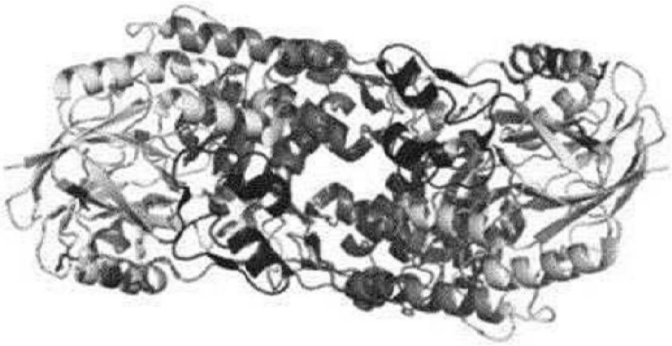
도면29b


야생형
KO_311-523
DS2b (KO_92-113)
KO_1-291+311-523
DS1a (KO_1-34)
DS2c (KO_114-134)
KO_1-291
DS2a (KO-72-91)
DS2d (KO_135-152)
DS3a (KO_153-170)
DS3d (KO_207-224)
DS3b (KO_171-188)
DS4 (KO_255-288)
DS3c (KO_189-206)
nm
시간(초)

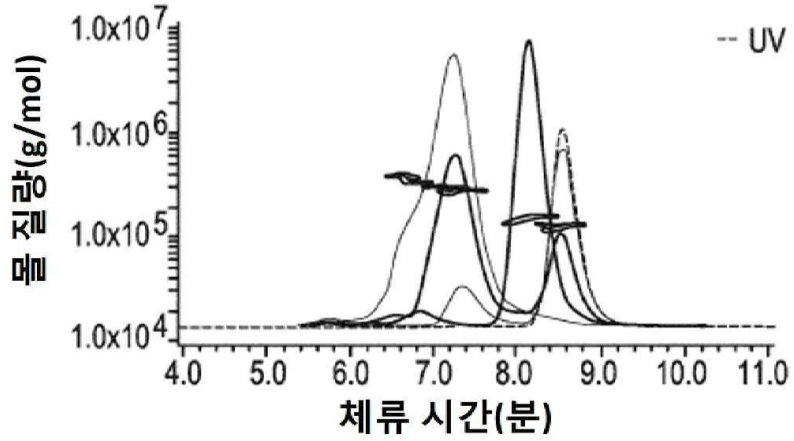
도면30a



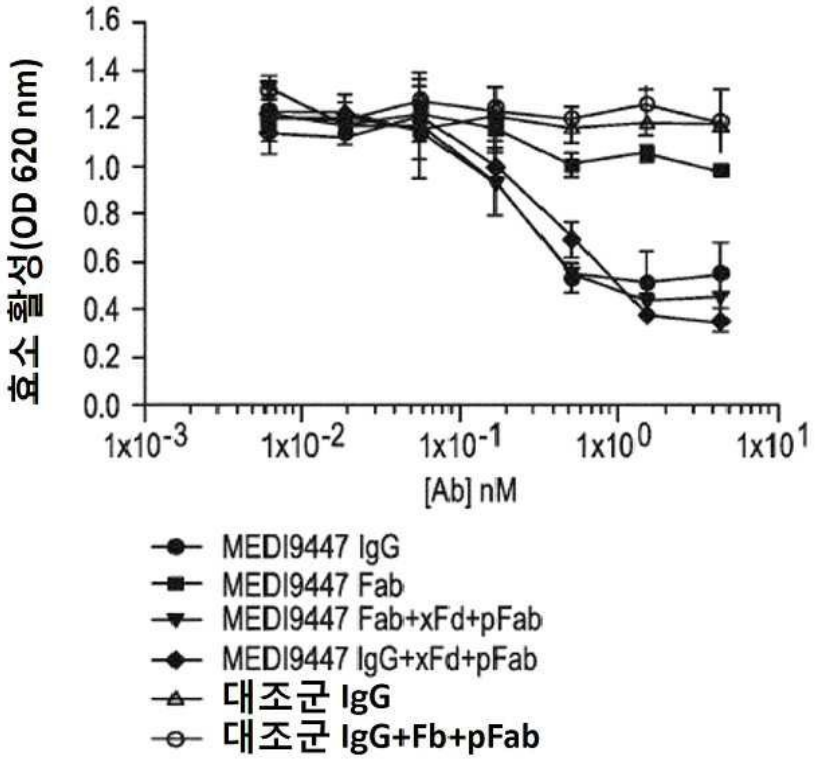
도면30b



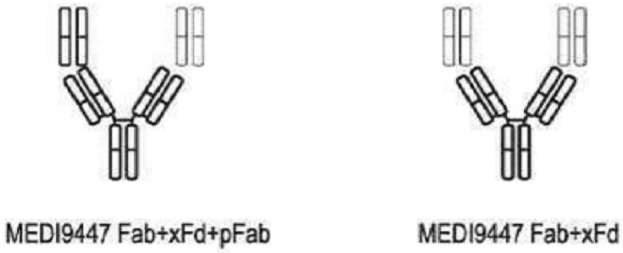
도면30c



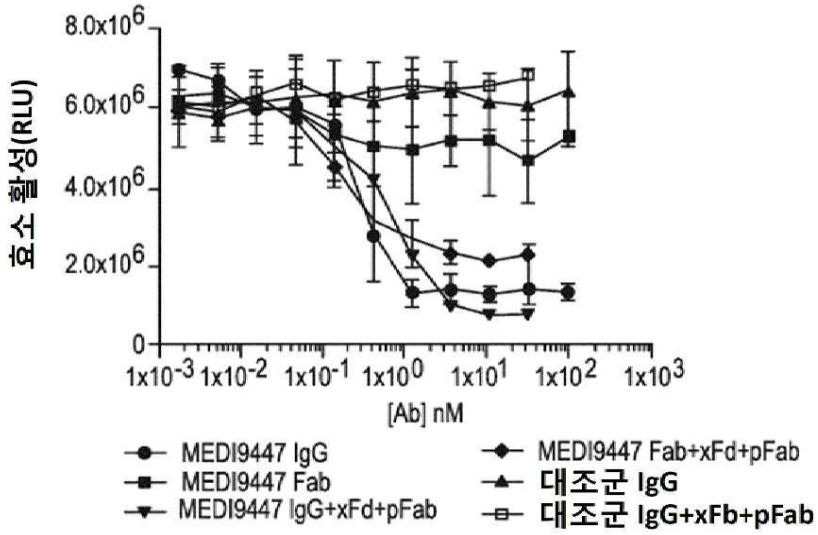
도면31a


효소 활성(OD 620 nm)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1x10-3
1x10-2
1x10-1
1x100
1x101
[Ab] nM
MEDI9447 IgG
MEDI9447 Fab
MEDI9447 Fab+xFd+pFab
MEDI9447 IgG+xFd+pFab
대조군 IgG
대조군 IgG+Fb+pFab

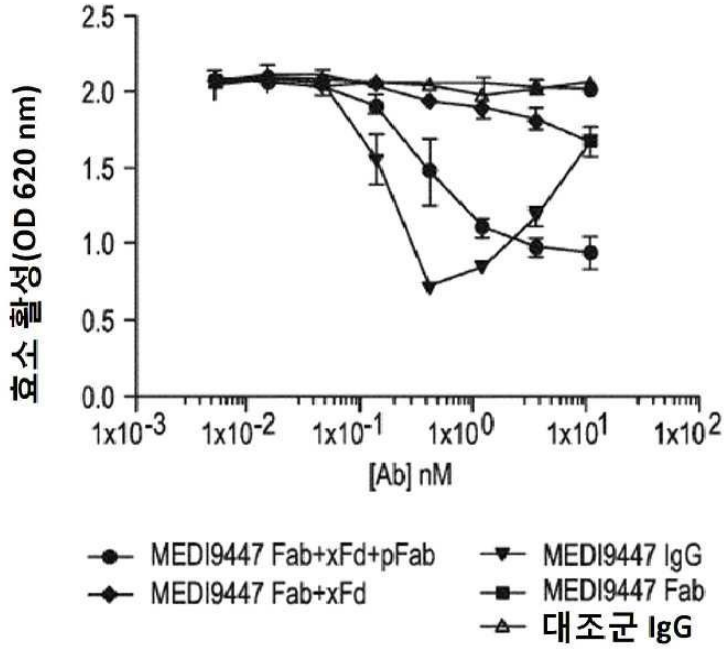
도면31b


MEDI9447 Fab+xFd+pFab
MEDI9447 Fab+xFd

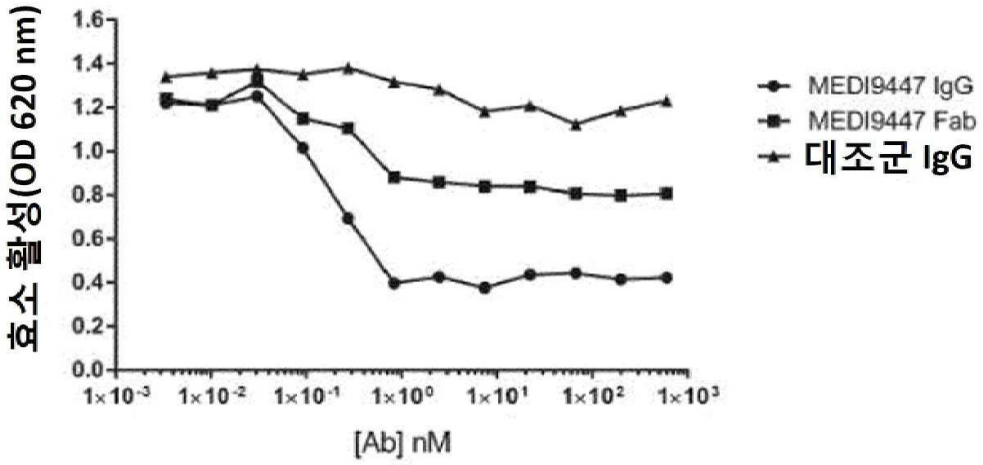
도면31c


8.0x10^6
6.0x10^6
4.0x10^6
2.0x10^6
0
효소 활성(RLU)
1x10^-3 1x10^-2 1x10^-1 1x10^0 1x10^1 1x10^2 1x10^3
[Ab] nM
MEDI9447 IgG
MEDI9447 Fab
MEDI9447 IgG+xFd+pFab
MEDI9447 Fab+xFd+pFab
대조군 IgG
대조군 IgG+xFb+pFab

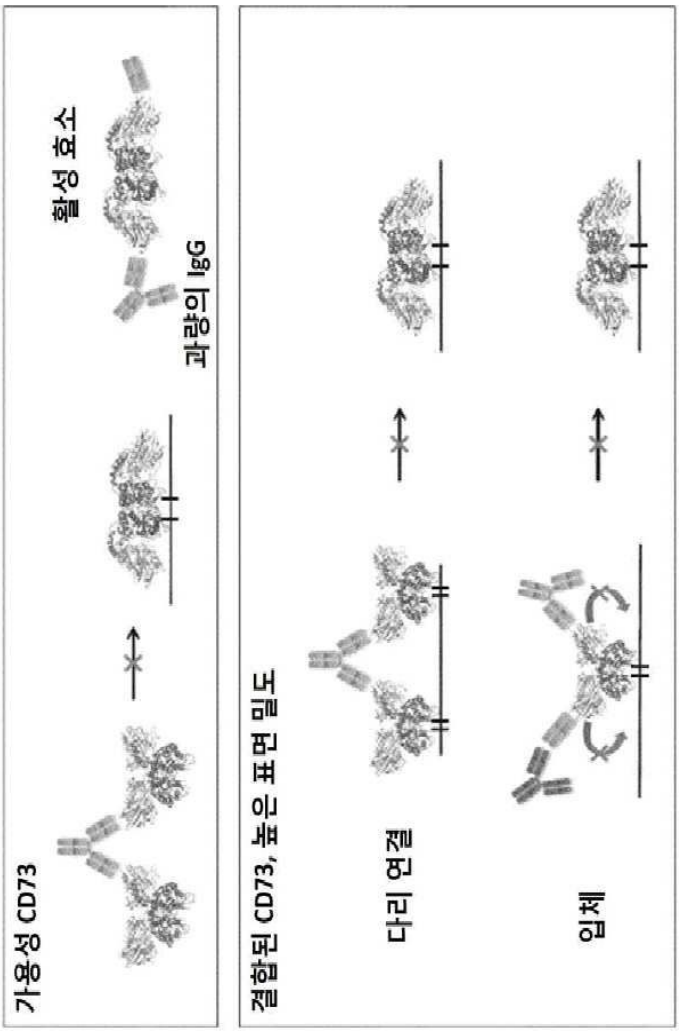
도면31d


2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
효소 활성(OD 620 nm)
1x10^-3 1x10^-2 1x10^-1 1x10^0 1x10^1 1x10^2
[Ab] nM
MEDI9447 Fab+xFd+pFab
MEDI9447 Fab+xFd
MEDI9447 IgG
MEDI9447 Fab
대조군 IgG

도면32



도면33



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MEDIMMUNE LIMITED

<120> BINDING MOLECULES SPECIFIC FOR CD73 AND USES THEREOF

<130> CD73-100WO1

<140><141><150> 62/188,999

<151> 2015-07-06

<150> 62/147,329

<151> 2015-04-14

<150> 62/077,486

<151> 2014-11-10

<160> 184

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 3

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

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

<210> 4
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 4
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221
> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 5

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Lys
20 25 30
Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Met Ala Val
35 40 45
Ile Tyr Lys Asp Asn Gln Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80
Leu Lys Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ala
85 90 95
Ser Asn Tyr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 6

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

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

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

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

50 55 60

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 7

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

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

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

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

<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 8
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30
Ser Tyr Tyr Trp Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 9

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg

85 90 95

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

100 105 110

<210> 10

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 10

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ala Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 11

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 11

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Thr Asn Asn His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

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

100 105 110

<210> 12

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly His Leu Leu Arg Ile Gly Asp Ile Phe Tyr Tyr Ser Leu

100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 13

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 13

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

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

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 14

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

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

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Arg Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

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

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 15

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 15

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

1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Arg Leu Arg Asn Glu Phe Val

20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Val Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Asp Ile Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asn Thr Val Val

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 16

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ile Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly

20 25 30

Gly Asn Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Ala Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Gly Ala Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser

50 55 60

Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80

Ser Leu Thr Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Gly Asp Phe Trp Thr Gly Lys Gly Val Phe Asp Pro Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 17

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 17

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

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

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

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

245 250 255

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

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

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

<210> 18
<211> 1341
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 18

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggGtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcct atagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag aacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagattaggg 300

tatgggcggg tggacgagtg gggcaggGga accctggtca ccgtctcgag tgcgtcgacc 360

aagggcccat ccgtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc ctggaactca 480

ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaat tcgagggggg accgtcagtc 720

ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtctacacc ctgccccCat cccgggagga gatgaccaag 1080

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200

gacggctcct tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320

ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 19

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 19

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His

85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr

130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His

180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 20

<211> 648

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 20

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60

tcttgttctg gaagcctctc caacatcgga aggaatcctg ttaactggta tcagcagctc 120

ccagggacgg cccccaaact cctcatctat cttgataatc tacggctaag tggggtccct 180

gaccgattct ctggctccaa gtctggaacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240

tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca acatgggatg acagccaccc cgggtggacg 300

ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggcggcgcc ctcggtcact 360

ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata 420

agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtcaag 480

gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 540

tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 600

catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gcccctacag aatgttca 648

<210> 21

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 21

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

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

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220><221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 22

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

gcc tat agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt aga aca tac tac gca gac tcc gtg 192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gcg aga tta ggg tat ggg cgg gtg gac gag tgg ggc agg gga acc ctg 336
Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110
gtc acc gtc tcg agt 351
Val Thr Val Ser Ser

115
<210> 23
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 23
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

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

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

<210> 24

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220><221> CDS

<222> (1)..(330)

<400> 24

cag tct gtg ctg act cag cca ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggg cag 48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc ctc tcc aac atc gga agg aat 96
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

cct gtt aac tgg tat cag cag ctc cca ggg acg gcc ccc aaa ctc ctc 144
Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

atc tat ctt gat aat cta cgg cta agt ggg gtc cct gac cga ttc tct 192
Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ggc tcc aag tct gga acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cag 240
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

tct gag gat gag gct gat tat tac tgt gca aca tgg gat gac agc cac 288
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
85 90 95

ccc ggg tgg acg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 330
Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 25

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 26

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 27

Trp Tyr Lys Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 28

Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 29

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 29

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
1 5 10 15
Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221>

source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 30

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

1 5 10

<210> 31

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 32

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 32

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

1 5 10

<210> 33

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400

> 33

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 34

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 35

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 36

Ser Tyr Ala Tyr Ser

1 5

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<

223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 37

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

1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 38

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

1 5 10 15

Gly

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 39

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 40

Ala Ile Ser Gly Ser Trp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 41

Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 42

Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Lys

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 43

Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Met

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 44

Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Leu

1 5

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 45

Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu

1 5

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 46

Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn

1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 47

Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Glu Val Asn

1 5 10

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 48

Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Asp Val Asn

1 5 10

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 49

Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 50

Leu Asp Asn Leu Arg Leu Gly

1 5

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 51

Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser

1 5

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 52

Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly

1 5

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 53

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Leu

1 5 10

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 54

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Lys Gly Trp Leu

1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 55

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ile Gly Trp Leu

1 5 10

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 56

Ala Thr Trp Asp Asp Ser His Pro Gly Trp Thr

1 5 10

<210> 57

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 57

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Lys Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 58

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 58

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

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

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

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

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

<210> 59

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 59

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

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

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

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

<210> 60
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 60
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30
Glu Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

<210> 61
<211> 110
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 61

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

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

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

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

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

<210> 62

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 62

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

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

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Ile Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 63

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 63

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn

20 25 30

Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Lys Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 64

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 64

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

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

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

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
85 90 95

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

<210> 65

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 65

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 66

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 66

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn

20 25 30

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

35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His

85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 67

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 67

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

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

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

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
85 90 95

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

<210> 68

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 68

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His

85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 69

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 69

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn

20 25 30

Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His

85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 70

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 70

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn

20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His

85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 71

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 71

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

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

<210> 72

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 72

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

50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210
> 73
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 73

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 74

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 74

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

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

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Lys Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 75

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 75

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Met Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 76
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 76
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30
Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 77
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 77
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 78

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 78

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 79

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 79

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

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

<210> 80
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><
221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 80
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

<210
> 81
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 81
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 82

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

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

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 83

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 83

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Trp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 84

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 84

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 85

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 85

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 86

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 86

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 87

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 87

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 88

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Asp Thr Lys Arg Leu Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 89

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400

> 89

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 90

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 90

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

1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys

20

<210> 91

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 91

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

1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys

20

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 92

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

1 5 10 15

<210> 93

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 93

Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Leu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys

20 25 30

<210> 94

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 94

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<

223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 95

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

1 5 10 15

Arg

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 96

Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val

1 5 10

<210> 97

<211> 11

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 97

Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 98

Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 99

Glu Asp Thr Lys Arg Leu Ser

1 5

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 100

Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val

1 5

<210> 101

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 101

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Ser Asp Phe
20 25 30

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

Ala Gly Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp His Gly Tyr Ser Gly Tyr Tyr Gly His Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 102

<211> 110

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 102

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

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

<210> 103
<211> 128
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 103
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Gln Gly Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 104
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 104
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Lys
20 25 30

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

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

<210> 105
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 105

Glu Val Gln Leu Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Asn Tyr Gly Asn Leu Asp His Trp Gly Lys Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 106

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 106

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 107
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 107
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

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

85 90 95
Ala Lys Asp His Leu Gly Gly His Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 108

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 108

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Phe Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 109

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 109

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

1 5 10 15

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Thr Tyr Ser Ser Gly Trp His Ile Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 110
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 110
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

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

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Gln

100 105

<210> 111

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 111

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 112

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 112

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 113

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 113

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

<210> 114
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 114
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Arg Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 115
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 115

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 116
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 116

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 117

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 117

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

85 90 95
Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 118
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 118
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Leu
100 105

<210> 119

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 119

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Val Leu
100 105

<210> 120

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 120

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

1 5 10 15

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

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

<210> 121
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 121
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Val Leu
100 105

<210> 122

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 122

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Arg Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 123

Ser Val Ala Met Ser
1 5

<210> 124

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400

> 124

Ser Tyr Ala Arg Ser
1 5

<210> 125

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 125

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 126

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 126

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 127

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser

1 5

<210> 128

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 128

Glu Asp Thr Lys Tyr Pro Ser

1 5

<210> 129

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 129

Glu Asp Thr Lys Arg Leu Ser

1 5

<210> 130

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 130

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

1 5 10 15

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

65 70 75 80
Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
85 90 95
Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
100 105 110
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
115 120 125
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
130 135

<210> 131
<211> 167
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 131
Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
1 5 10 15
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
20 25 30
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
35 40 45

Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
50 55 60

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

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

<210> 132
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 132
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 133
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 133
Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

<210> 134

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 134

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

1 5 10 15

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 135

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp

1 5 10

<210> 136

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 136

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 137

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 137

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 138

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 139

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

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

1 5 10 15

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 140
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 140
Arg Tyr Trp Met Ser
1 5
<210> 141
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400
> 141
Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 142

<211> 12

<212> PRT

<213> omo sapiens

<400> 142

Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 143

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 146

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> /note="This region may encompass 'LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISC' or

'QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC'"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Gln"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (10)..(10)

<223> /replace="Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (33)..(33)

<223> /replace="Glu" or "Asp"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(50)

<223> /note="This region may encompass 'WYKQVPGTAPKLLIY' or

'WYQQLPGTAPKLLIY'"

<220><221> VARIANT

<222> (38)..(38)

<223> /replace="Gln"

<220><221> VARIANT

<222

> (40)..(40)

<223> /replace="Leu"

<220><221> VARIANT

<222> (52)..(52)

<223> /replace="Asp"

<220><221> VARIANT

<222> (54)..(54)

<223> /replace="Leu"

<220><221> VARIANT

<222> (56)..(56)

<223> /replace="Pro"

<220><221> VARIANT

<222> (57)..(57)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (96)..(96)

<223> /replace="His"

<220><221> VARIANT

<222> (97)..(97)

<223> /replace="Pro" or "Ile" or "Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (100)..(100)

<223> /replace="Thr"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(110)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations
for variant positions"

<400> 146

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

Pro Val Asn Trp Tyr Lys Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

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

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

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Lys Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105 110

<210> 147

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (34)..(34)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (50)..(50)

<223> /replace="Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (52)..(52)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (55)..(55)

<223> /replace="Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (57)..(57)

<223> /replace="Arg"

<220><221> VARIANT

<222> (102)..(102)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (103)..(103)

<223> /replace="Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (104)..(104)

<223> /replace="Ile"

<220><221> VARIANT

<222> (106)..(106)

<223> /replace="Lys" or "Met" or "Leu" or "Glu"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(117)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400>

147

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 148

<211> 574

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

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

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

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

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

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

Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile Val Thr Ser Asp Asp Gly

260 265 270

Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Gly

275 280 285

Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly Asn Val Ile Ser Ser His

290 295 300

Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile Pro Glu Asp Pro Ser Ile

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp Gln Asp Ile Asn Val Val
515 520 525
Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile Tyr Pro Ala Val Glu Gly
530 535 540
Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser His Cys His Gly Ser Phe Ser Leu
545 550 555 560
Ile Phe Leu Ser Leu Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln
565 570

<210> 149
<211> 223
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 149
Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15
Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30
Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
35 40 45
Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly

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

115 120 125
Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
130 135 140
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser

145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe

165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys

180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu

195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

210 215 220

<210> 150

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln

1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp

20 25 30

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

35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu

115 120 125

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

130 135 140

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

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

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 151
<211> 176
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 151
Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15
Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro
20 25 30
Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys

35 40 45
Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr

85 90 95

Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile

100 105 110

Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val

115 120 125

Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile

130 135 140

Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile

145 150 155 160

Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr

165 170 175

<210> 152

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /replace="Glu" or "Asp"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(13)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 152

Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn

1 5 10

<210> 153

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Asp"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Leu"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Pro"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="Ser"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 153

Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly

1 5

<210> 154

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> /replace="His"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Pro" or "Ile" or "Asn"

<220><221> VARIANT

<222> (11)..(11)

<223> /replace="Thr"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(11)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 154

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Lys Gly Trp Leu

1 5 10

<210> 155

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 155

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 156

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> /replace="Ala"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Arg"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 156

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

1 5 10 15

Gly

<210> 157

<

211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Ile"

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> /replace="Lys" or "Met" or "Leu" or "Glu"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(8)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no

preference with respect to those in the annotations

for variant positions"

<400> 157

Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Tyr

1 5

<210> 158

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> /replace="Thr"

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> /replace="Pro" or "Leu"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(7)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations
for variant positions"

<400> 158

Glu Asp Ser Lys Arg His Ser

1 5

<210> 159

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> /replace="Val"

<220><221> VARIANT

<222

> (4)..(4)

<223> /replace="Arg"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no
preference with respect to those in the annotations

for variant positions"

<400> 159

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 160

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> /replace="Pro"

<220

><221> VARIANT

<222> (12)..(12)

<223> /replace="Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (17)..(17)

<223> /replace="Arg"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(17)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 160

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

1 5 10 15

Gly

<210> 161

<211> 8

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 161

Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met

1 5

<210> 162

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> /note="This region may encompass 'QSVLTQPPSVSVSPGQTATITC' or 'QSVLTQPPSVSVSPGQTASITC'"

<220><221> VARIANT

<222> (19)..(19)

<223> /replace="Ser"

<220><221> VARIANT

<222> (51)..(51)

<223> /replace="Leu"

<220><221> VARIANT

<222> (53)..(53)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> VARIANT

<222> (54)..(54)

<223> /replace="Pro" or "Leu"

<220><221> VARIANT

<222> (56)..(56)

<223> /replace="Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (66)..(66)

<223> /replace="Arg"

<220><221> VARIANT

<222> (80)..(80)

<223> /replace="Met"

<220><221> VARIANT

<222> (86)..(86)

<223> /replace="Tyr"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(87)

<223> /note="This region may encompass
'RIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFC,'
'GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC' or
'GIPERFSGSNRGNTATLTISGTQAMDEADYYC'"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(106)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no preference with respect to those in the annotations for variant positions"

<400> 162

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Pro Lys Arg His Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 163

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<220><221> VARIANT

<222> (32)..(32)

<223> /replace="Val"

<220><221> VARIANT

<222> (34)..(34)

<223> /replace="Arg"

<220

><221> VARIANT

<222> (58)..(58)

<223> /replace="Pro"

<220><221> VARIANT

<222> (61)..(61)

<223> /replace="Gly"

<220><221> VARIANT

<222> (66)..(66)

<223> /replace="Arg"

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(117)

<223> /note="Variant residues given in the sequence have no

preference with respect to those in the annotations

for variant positions"

<400> 163

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Trp Gly Gln Gly Thr Met

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 164

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag"

<400> 164

His His His His His His

1 5

<210> 165

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 165

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 166

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 166

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

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu

85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 167

<211> 526

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 167

Trp Glu Leu Thr Ile Leu His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu
1 5 10 15

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

Gly Gly Val Ala Arg Leu Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala
35 40 45

Glu Pro Asn Val Leu Leu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr
50 55 60

Ile Trp Phe Thr Val Tyr Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn
65 70 75 80

Ala Leu Arg Tyr Asp Ala Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn
85 90 95

Gly Val Glu Gly Leu Ile Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro
100 105 110

Ile Leu Ser Ala Asn Ile Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile
115 120 125

Ser Gly Leu Tyr Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val
130 135 140

Val Gly Ile Val Gly Tyr Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn
145 150 155 160

Pro Gly Thr Asn Leu Val Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro
165 170 175

Glu Val Asp Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu
180 185 190

Gly His Ser Gly Phe Glu Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Val Thr Ser Asp Asp Gly Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala

245 250 255

Phe Gly Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly

260 265 270

Asn Val Ile Ser Ser His Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile

275 280 285

Pro Glu Asp Pro Ser Ile Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys

290 295 300

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

305 310 315 320

Asp Gly Ser Ser Gln Ser Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn

325 330 335

Leu Ile Cys Asp Ala Met Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Ala Asp Glu

340 345 350

Met Phe Trp Asn His Val Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile

355 360 365

Arg Ser Pro Ile Asp Glu Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Gly Gln Ser Thr Gly Glu Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val

420 425 430

Tyr Asp Leu Ser Arg Lys Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val

435 440 445

Leu Cys Thr Lys Cys Arg Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp
450 455 460
Glu Val Tyr Lys Val Ile Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp
465 470 475 480
Gly Phe Gln Met Ile Lys Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp
485 490 495
Gln Gly Ile Asn Val Val Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile
500 505 510

Tyr Pro Ala Val Glu Gly Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser
515 520 525

<210> 168
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 168
Ser Ala Asn Ile Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly
1 5 10 15
Leu

<210> 169
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 169
Val Leu Pro Val Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu
1 5 10
<210> 170

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 170

Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp

1 5 10

<210> 171

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 171

Glu Val Val Gly Ile Val Gly

1 5

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 172

Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu

1 5

<210> 173

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 173

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

1 5 10

<210> 174

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 174

Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala

1 5 10

<210> 175

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 175

Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe

1 5 10

<210> 176

<211> 523

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 176

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

1 5 10 15

Gln Thr Ser Glu Asp Ser Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met

20 25 30

Gly Gly Val Ala Arg Leu Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala

35 40 45

Glu Pro Asn Val Leu Leu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr

50 55 60

Ile Trp Phe Thr Val Tyr Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn

65 70 75 80

Ala Leu Arg Tyr Asp Ala Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn

85 90 95

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

100 105 110

Ile Leu Ser Ala Asn Ile Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile

115 120 125

Ser Gly Leu Tyr Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Gly Thr Asn Leu Val Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro

165 170 175

Glu Val Asp Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu

180 185 190

Gly His Ser Gly Phe Glu Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Val Thr Ser Asp Asp Gly Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala

245 250 255

Phe Gly Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly

260 265 270

Asn Val Ile Ser Ser His Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile

275 280 285

Pro Glu Asp Pro Ser Ile Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys

290 295 300

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

305 310 315 320

Asp Gly Ser Ser Gln Ser Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn

325 330 335

Leu Ile Cys Asp Ala Met Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Ala Asp Glu

340 345 350

Met Phe Trp Asn His Val Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile

355 360 365

Arg Ser Pro Ile Asp Glu Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Gly Gln Ser Thr Gly Glu Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val

420 425 430

Tyr Asp Leu Ser Arg Lys Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Gly Phe Gln Met Ile Lys Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp

485 490 495

Gln Asp Ile Asn Val Val Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile

500 505 510

Tyr Pro Ala Val Glu Gly Arg Ile Lys Phe Ser

515 520

<210> 177

<211> 519

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 177

Leu Arg Leu Arg Leu Leu His Thr Asn Asp Val His Ala His Val Glu
1 5 10 15

Ala Arg Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Gly Cys Phe Gly Gly Val Ala

20 25 30

Arg Arg Ala Ala Arg Val Ala Ala Glu Arg Ala Ala Gln Arg Asn Val
35 40 45

Leu Leu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Ser Val Trp Phe Ser
50 55 60

Arg Phe Lys Gly Gln Glu Ala Val His Phe Met Asn Leu Leu Arg Tyr
65 70 75 80

Asp Ala Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Glu Gly Val Arg Gly

85 90 95

Leu Leu Asn Pro Leu Leu Arg Asn Ala Ser Phe Ala Ile Leu Ser Ala
100 105 110

Asn Ile Lys Gly Lys Thr Pro Leu Gly Asn Gln Met Met Lys Tyr Val
115 120 125

His Pro Tyr Lys Ile Leu His Ile Asp Ser Glu Lys Ile Gly Ile Val
130 135 140

Gly Tyr Thr Thr Gln Glu Thr Ser Phe Leu Ser Gln Pro Gly Asn Asp

145 150 155 160

Val Ile Phe Glu Asp Glu Ile Glu Ala Leu Gln Val Gln Val Asn Lys
165 170 175

Leu Thr Ala Met Gly Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly
180 185 190

Phe Thr Val Asp Ile Asn Ile Ala Gln Lys Val Lys Gly Val Asp Val
195 200 205

Val Ile Gly Gly His Thr Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Thr Pro Pro

210 215 220

Ser Thr Glu Gln Pro Ala Gly Pro Tyr Pro Phe Met Val Asp Ser Asp

225 230 235 240

Asp Gly Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Tyr Gly Lys Tyr

245 250 255

Leu Gly Tyr Leu Asn Val Thr Phe Asp Glu Lys Gly Asn Val Val Glu

260 265 270

Ala Val Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asp Ser Ser Val Pro Glu Asp Glu

275 280 285

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

290 295 300

Ser Lys Glu Ile Gly Thr Thr Ser Val Tyr Leu Asn Gly Thr Ser Glu

305 310 315 320

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

325 330 335

Met Leu Tyr Glu Asn Val Arg Arg Pro Asp Arg Lys Ser Trp Asn His

340 345 350

Val Ser Leu Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ala Ser Ile Asp

355 360 365

Glu Arg Asn Ala Asn Gly Ser Ile Thr Met Glu Asp Leu Leu Ser Val

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Gly Glu Leu Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val Tyr Asp Leu Ser

420 425 430

Arg Ala Pro Gly His Arg Ala Val Ser Ile Glu Val Leu Cys Thr Ala

435 440 445

Cys Arg Val Pro Ala Tyr Val Pro Leu Glu Met Asp Glu Val Tyr Asn

450 455 460

Val Thr Leu Pro Ser Tyr Met Leu Phe Gly Gly Asp Gly Tyr Tyr Met

465 470 475 480

Leu Arg Asp Asn His Ile Thr Tyr Ser Lys Gly Glu Pro Asp Ile Glu

485 490 495

Val Val Ser Arg Tyr Leu Asp Arg Met Lys Arg Val Tyr Pro Ala Val

500 505 510

Glu Gly Arg Ile Lys Phe Ser

515

<210> 178

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 178

Ser Gly Leu Tyr Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Thr Asn Leu Val Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro

35 40 45

Glu Val Asp Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys

50 55 60

<210> 179

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> X is Proline (P), Glutamic Acid (E) or Aspartic Acid (D)

<400> 179

Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Xaa Val Asn

1 5 10

<210> 180

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(7)

<223> "X represents amino acid residues Asparagine (N) or Aspartic Acid

(D); X2 represents amino acid residues Glutamine (Q) or Leucine

(L); X3 represents amino acid residues Leucine (L) or Proline

(P); "

<400> 180

Leu Xaa Asn Xaa Arg Xaa Xaa

1 5

<210> 181

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(11)

<223> "X1 represents amino acid residues Leucine (L) or Histidine (H);

X2 represents amino acid residues Lysine (K), Proline (P),

Isoleucine (I) or Asparagine (N); and, X3 represents amino acid

residues Leucine (L) or Threonine (T). "

<400> 181

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Xaa Xaa Gly Trp Xaa

1 5 10

<210> 182

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> X represents amino acid residues Methionine (M) or Tyrosine (Y)

<400> 182

Ser Tyr Ala Xaa Ser

1 5

<210> 183

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(8)

<223> "X1 represents amino acid residues Leucine (L) or Alanine (A); X2 represents amino acid residues Tryptophan (W) or Serine (S); X3 represents amino acid residues Tryptophan (W) or Glycine (G); X4 represents amino acid residues Serine (S) or Arginine (R);"

<400> 183

Xaa Ile Xaa Gly Ser Xaa Gly Xaa Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 184

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(8)

<223> "X1 represents amino acid residues Glycine (G) or Serine (S); X2 represents amino acid residues Arginine (R) or Threonine (T); X3 represents amino acid residues Valine (V) or Isoleucine (I); and, X4 represents amino acid residues Tyrosine (Y), Lysine (K),

<400> 184

Leu Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Asp Xaa
1 5