



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0039005  
(43) 공개일자 2024년03월26일

- (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 10-2024-7006210
- (22) 출원일자(국제) 2022년07월28일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년02월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/074284
- (87) 국제공개번호 WO 2023/010098  
국제공개일자 2023년02월02일
- (30) 우선권주장  
PCT/CN2021/109028 2021년07월28일 중국(CN)  
PCT/CN2022/103725 2022년07월04일 중국(CN)

- (71) 출원인  
엘피사이언스 (쑤저우) 바이오파마, 엘티디.  
중국 215127 지양수 쑤저우 쑤저우 인터스트리얼  
파크 샹티안 스트리트 218 빌딩 17  
엘피사이언스 바이오파마, 엘티디.  
중국 201203 상하이 푸둥 하레이 로드 998 빌딩 3
- (72) 발명자  
루, 홍타오  
중국 201203 상하이 푸둥 하레이 로드 998 빌딩 3  
선, 다웨이  
중국 201203 상하이 푸둥 하레이 로드 998 빌딩 3  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
양영준, 이상영

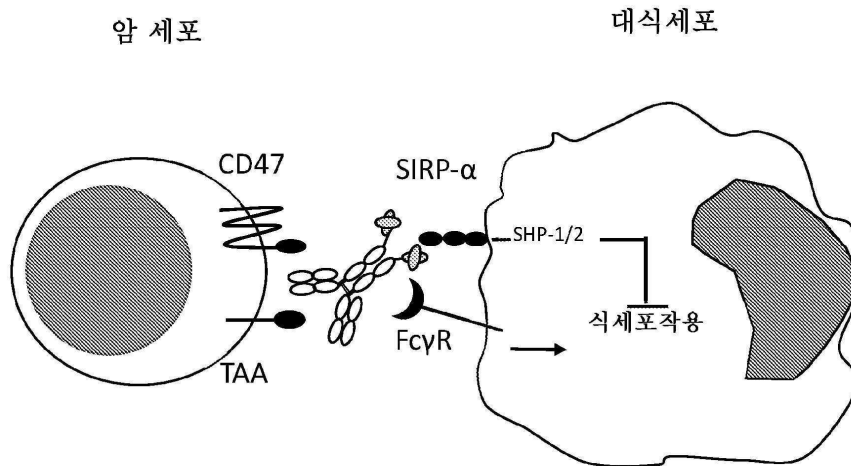
전체 청구항 수 : 총 77 항

(54) 발명의 명칭 신규 다중-특이적 분자

(57) 요약

본 개시내용은 SIRP-알파 및 1종 이상의 표적 항원에 특이적인 다중-특이적 분자, 그를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 그를 포함하는 제약 조성물, 및 그의 용도를 제공한다. 본 개시내용은 제공된 다중-특이적 분자가 SIRP-알파 결합 도메인, Fc 결합 도메인을 포함하는 활성화 수용체-결합 도메인, 및 표적 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 다중-특이적 분자를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C07K 16/28** (2013.01)  
**C07K 16/2803** (2013.01)  
**C07K 16/2827** (2013.01)  
**C07K 2317/31** (2013.01)  
**C07K 2317/52** (2013.01)  
**C07K 2317/55** (2013.01)  
**C07K 2317/622** (2013.01)  
**C07K 2317/73** (2013.01)  
**C07K 2317/76** (2013.01)

(72) 발명자

**경, 옌안**

중국 201203 상하이 푸둥 하레이 로드 998 빌딩 3

**왕, 징**

중국 201203 상하이 푸둥 하레이 로드 998 빌딩 3

**지양, 하이시아**

중국 201203 상하이 푸둥 하레이 로드 998 빌딩 3

**우, 지하오**

중국 201203 상하이 푸둥 하레이 로드 998 빌딩 3

**가오, 루이**

중국 201203 상하이 푸둥 하레이 로드 998 빌딩 3

**니우, 시아오팡**

중국 201203 상하이 푸둥 하레이 로드 998 빌딩 3

**취우, 양성**

중국 201203 상하이 푸둥 하레이 로드 998 빌딩 3

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- (a) SIRP-알파 결합 도메인,
- (b) 활성화 수용체-결합 도메인, 및
- (c) 표적 항원 및 CD47을 공동-발현하는 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원에 결합하는 표적 항원 결합 도메인을 포함하는 다중-특이적 분자로서,

여기서 다중-특이적 분자는 면역 이펙터 세포의 이펙터 기능을 표적 항원의 존재 하에 선택적으로 유도하고, 여기서 면역 이펙터 세포는 SIRP-알파 및 활성화 수용체를 공동-발현하는 것인 다중-특이적 분자.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 표적 항원 및 CD47을 공동-발현하는 표적 세포가 면역 이펙터 세포의 이펙터 기능에 의한 제거 관심대상인 암 세포, 감염된 세포, 또는 질환 세포인 다중-특이적 분자.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 표적 항원의 부재 하에는 면역 이펙터 세포의 최소 이펙터 기능을 유도하는 다중-특이적 분자.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 항원의 부재 하에 다중-특이적 분자에 의해 유도되는 이펙터 기능은 표적 항원의 존재 하에 유도되는 이펙터 기능의 10% 이하인 다중-특이적 분자.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 이펙터 세포가 골수 세포이고, 임의로 면역 이펙터 세포가 대식 세포, 단핵구, 호중구, 호산구, 식세포 또는 호염기구이고, 임의로 면역 이펙터 세포가 대식 세포인 다중-특이적 분자.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터 기능이 면역 이펙터 세포에 의한 항원 및 CD47을 공동-발현하는 세포의 식세포작용을 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 활성화 수용체가 결정화가능 단편  $\gamma$  수용체 (Fc  $\gamma$  R), TREM2, 렉틴, 스캐빈저 수용체 A1 (SRA1), MARCO, CD36, CD163, CD68, CD205, CD206, FcDR1, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CD64, CD32a, CD16a, CD89, CD19, CD28, CSFR, PDGFR, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, 텍틴 1, RAGE (SR-E1), LRP1, LRP2, ASGP, SR-PSOX, CXCL16, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), 및 CD169 수용체 또는 보체 수용체 (예컨대 CR1 및 CR3), PI3K, Fc  $\gamma$  R1, Fc  $\gamma$  R2A, Fc  $\gamma$  R2B2, Fc  $\gamma$  R2C, Fc  $\gamma$  R3A, BAH, Tyro3, Axl, Traf6, Syk, MyD88, Zap70, Fc  $\epsilon$  R1, Fc  $\alpha$  R1, BAFF-R, DAP 12, NFAM1, MRC1, ItgB5, MERTK, ELMO, 및 CD79b이고; 임의로 활성화 수용체가 Fc  $\gamma$  R인 다중-특이적 분자.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 활성화 수용체-결합 도메인이 Fc 도메인을 포함하고, 임의로 Fc 도메인이 IgG1 또는 IgG4로부터 유래된 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알과 결합 도메인이 SIRP-알과와 CD47 사이의 상호작용을 실질적으로 차단할 수 있는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알과 결합 도메인이 SIRP-알과와 CD47 사이의 상호작용을 완전히 차단할 수 있는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 11**

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알과 결합 도메인이 SIRP-알과와 CD47 사이의 상호작용에 의해 매개되는 SHP-1 동원을 실질적으로 차단할 수 있는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알과 결합 도메인이 SIRP-알과와 CD47 사이의 상호작용에 의해 매개되는 SHP-1 동원을 완전히 차단할 수 있는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알과 결합 도메인이 면역 이펙터 세포의 이펙터 기능을 유도하는 최소 내인성 활성을 갖는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알과 결합 도메인 및 활성화 수용체-결합 도메인이, 다중-특이적 분자가 동일한 면역 이펙터 세포 상에서 공동-발현된 SIRP-알과 및 활성화 수용체 둘 다에 결합하는 것을 허용하도록 근접해 있는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알과 결합 도메인 및/또는 표적 항원 결합 도메인이 항체 도메인 또는 항체 모방체 도메인을 포함하고; 임의로 항체 모방체 도메인이 피브로넥틴 도메인, 단백질 A의 Z 도메인 (아피바디), 감마-B 결정질 도메인, 유비퀴틴 도메인, 시스타틴 도메인, Sac7d 도메인, 삼중 나선 코일드 코일 도메인, 리포칼린 도메인, 막 수용체의 A 도메인, 안키린 반복 모티프, Fyn의 SH3 도메인, 프로테아제 억제제의 쿠니츠 도메인, 피브로넥틴의 유형 III 도메인 (미니바디), 탄수화물 결합 모듈 32-2를 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 항체 도메인이 Fab, VHh, 단일 쇠 Fv (scFv), 디아바디, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv 단편, 디술피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디술피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), F(ab)<sub>2</sub>, scFv 이량체 (2가 디아바디), 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 테트라바디, 도메인 항체, 또는 2가 도메인 항체를 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 17**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 항원 결합 항체 도메인, SIRP-a 결합 항체 도메인 및 Fc 도메인을 포함하는 다중-특이적 항체를 포함하는 다중-특이적 분자.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 표적 항원 결합 항체 도메인이 Fc 도메인의 N-말단에 연결된 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 표적 항원 결합 항체 도메인이 Fab 도메인을 포함하고, 임의로 Fab 도메인이 Fc 도메인의 N-

말단 중 1개에 연결된 중쇄를 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 20**

제18항에 있어서, 각각 Fab 도메인을 포함하는 2개의 표적 항원 결합 항체 도메인을 포함하고, 임의로 각각의 Fab 도메인이 각각 Fc 도메인의 각각의 N-말단에 연결된 중쇄를 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 21**

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알파 결합 도메인이 Fc 도메인 또는 표적 항원 결합 항체 도메인에 연결된 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 22**

제21항에 있어서, SIRP-알파 결합 도메인이 Fc 도메인의 C-말단에 연결된 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 23**

제21항에 있어서, SIRP-알파 결합 도메인이 Fc 도메인의 N-말단에 연결되며, 단 SIRP-알파 결합 도메인 및 표적 항원 결합 항체 도메인은 Fc 도메인의 동일한 N-말단에 연결되지 않는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 24**

제21항에 있어서, SIRP-알파 결합 도메인이 표적 항원 결합 Fab 도메인의 경쇄의 C-말단에 연결된 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 25**

제17항에 있어서, SIRP-알파 결합 항체 도메인이 Fc 도메인의 N-말단에 연결된 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 26**

제25항에 있어서, SIRP-알파 결합 항체 도메인이 Fab 도메인을 포함하고, 임의로 Fab 도메인이 Fc 도메인의 N-말단 중 1개에 연결된 중쇄를 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 27**

제25항에 있어서, 항체가 각각 Fab 도메인을 포함하는 2개의 SIRP-알파 결합 항체 도메인을 포함하고, 임의로 각각의 Fab 도메인이 각각 Fc 도메인의 각각의 N-말단에 연결된 중쇄를 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 28**

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 항원 결합 도메인이 Fc 도메인 또는 SIRP-알파 결합 항체 도메인에 연결된 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 표적 항원 결합 도메인이 Fc 도메인의 N-말단에 연결되며, 단 표적 항원 결합 도메인 및 SIRP-알파 결합 도메인은 Fc 도메인의 동일한 N-말단에 연결되지 않는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 30**

제28항에 있어서, 표적 항원 결합 도메인이 SIRP-알파 결합 Fab 도메인의 경쇄의 C-말단에 연결된 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 31**

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 항원이 중앙 표면 항원을 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 중앙 표면 항원이 PD-L1, 클라우딘 18.2, BCMA, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33,

CD38, CD44, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD123, EGFR, HER2, HER3, CD117, C-Met, EGFR, EGFRvIII, ERBB3, ERBB4, VEGFR1, VEGFR2, ROR1, PTHR2, B7-H1(PD-L1), B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, B7-H7, Trop-2, GPC-3, EPCAM, DLL-3, 넥틴-4, 클라우딘6, Muc-1, PSMA, GD3, FAP, CEA, 또는 EphA2인 다중-특이적 분자.

**청구항 33**

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알파 결합 도메인이 하기:

a) X<sub>1</sub>YYMH (서열식별번호: 161)의 서열을 포함하는 HCDR1, RIDPEDX<sub>2</sub>EX<sub>3</sub>KYAPKFQG (서열식별번호: 162)의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 GX<sub>15</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>Y (서열식별번호: 163)의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 SASSSVSSSYLY (서열식별번호: 26)의 서열을 포함하는 LCDR1, STSNLAS (서열식별번호: 27)의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 X<sub>6</sub>QWSSYPYT (서열식별번호: 164)의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

b) TYGMS (서열식별번호: 35)의 서열을 포함하는 HCDR1, WINTYSGVX<sub>7</sub>TX<sub>8</sub>ADDFKG (서열식별번호: 165)의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 DPHX<sub>9</sub>YGX<sub>10</sub>SPAWFX<sub>11</sub>Y (서열식별번호: 166)의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 X<sub>12</sub>ASQX<sub>13</sub>VGIX<sub>14</sub>VA (서열식별번호: 188)의 서열을 포함하는 LCDR1, SASNRYT (서열식별번호: 39)의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 QQYSX<sub>16</sub>YPX<sub>17</sub>T (서열식별번호: 189)의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

c) EYVLS (서열식별번호: 41)의 서열을 포함하는 HCDR1, EIYPGTITTYNEKFKG (서열식별번호: 42)의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 FYDYDGGWFAY (서열식별번호: 43)의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 SASSSVSSSDLH (서열식별번호: 44)의 서열을 포함하는 LCDR1, GTSNLAS (서열식별번호: 45)의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 QQWSGYPWT (서열식별번호: 46)의 서열을 포함하는 LCDR3

을 포함하며,

여기서 X<sub>1</sub>은 A 또는 D이고; X<sub>2</sub>는 G 또는 A이고; X<sub>3</sub>은 T 또는 S이고; X<sub>4</sub>는 L 또는 Y이고; X<sub>5</sub>는 E 또는 A이고; X<sub>6</sub>은 Y 또는 H이고; X<sub>7</sub>은 S 또는 P이고; X<sub>8</sub>은 Y 또는 C이고; X<sub>9</sub>는 Y 또는 S이고; X<sub>10</sub>은 N 또는 S이고; X<sub>11</sub>은 P 또는 V이고; X<sub>12</sub>는 E 또는 K이고; X<sub>13</sub>은 N 또는 I이고; X<sub>14</sub>는 S 또는 A이고; X<sub>15</sub>는 S이거나 부재하고; X<sub>16</sub>은 S 또는 A이고; X<sub>17</sub>은 F 또는 L인 다중-특이적 분자.

**청구항 34**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알파 결합 도메인이 하기를 포함하는 것인 다중-특이적 분자:

a) 서열식별번호: 23의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 24 또는 서열식별번호: 198의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 25의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 27의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

b) 서열식별번호: 29의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 30의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 31의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 32의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 33의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

c) 서열식별번호: 35의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 36의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 37의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 38의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 39의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 40의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

d) 서열식별번호: 47의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 48의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 49의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 50의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 51의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 52의 서열을 포함하는 LCDR3.

**청구항 35**

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알파 결합 도메인이 C25, C15, C42, C59 및 C73으로 이루어진 군으로부터 선택된 항-SIRP-알파 항체와 동일한 HCDR 및 LCDR을 포함하며, 여기서:

a) C25는 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 경

쇄 가변 영역을 포함하고,

- b) C15는 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- c) C42는 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 14의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- d) C59는 서열식별번호: 15의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- e) C73은 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 18의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인

다중-특이적 분자.

**청구항 36**

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알파 결합 도메인이 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하고, 여기서

- i) HFR1은 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISKX<sub>20</sub>SGFNIK (서열식별번호: 190) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- j) HFR2는 WVQAPGKLEWIG (서열식별번호: 191) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- k) HFR3 서열은 RVTITADTSTX<sub>21</sub>TAYMELSSLRSEDVAVYYCDR (서열식별번호: 192) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- l) HFR4는 WGQGLTVTSS (서열식별번호: 193) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- m) LFR1은 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 194) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- n) LFR2는 WYQQKPGQAPKLIWIY (서열식별번호: 195) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- o) LFR3은 GIPARFSGSGGTDX<sub>22</sub>TLTISSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 196) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- p) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 197) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하며, 여기서 X<sub>20</sub>은 A 또는 V이고; X<sub>21</sub>은 N 또는 D이고; X<sub>22</sub>는 Y 또는 F인 다중-특이적 분자.

**청구항 37**

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, SIRP-알파 결합 도메인이 하기를 포함하는 것인 다중-특이적 분자:

- a) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 1의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 2의 서열을 포함함; 또는
- b) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 3의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 4의 서열을 포함함; 또는
- c) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 5의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 6의 서열을 포함함; 또는
- d) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 7의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 8의 서열을 포함함; 또는
- e) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 9의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 10의 서열을 포

함함; 또는

f) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 11의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 12의 서열을 포함함; 또는

g) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 13의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 14의 서열을 포함함; 또는

h) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 15의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 16의 서열을 포함함; 또는

i) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 17의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 18의 서열을 포함함, 또는

j) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 159의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 160의 서열을 포함함.

### 청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 항원 결합 도메인이 클라우딘 18.2 결합 도메인을 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

### 청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 클라우딘 18.2 결합 도메인이 하기를 포함하는 것인 다중-특이적 분자:

a) 서열식별번호: 77의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 78의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 79의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 80의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 81의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 82 또는 서열식별번호: 225의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

b) 서열식별번호: 83의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 84의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 85의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 86의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 87의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 88의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

c) 서열식별번호: 89의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 90의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 91의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 92의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 93의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 94의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

d) 서열식별번호: 95의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 96의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 97의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 98의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 99의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 100의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

e) 서열식별번호: 101의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 102의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 103의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 104의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 105의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 106의 서열을 포함하는 LCDR3.

### 청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 클라우딘 18.2 결합 도메인이 hu26.H1L1, hu26.H1L2 (S92A), hu28.H1L2, C10, C29 및 C30으로 이루어진 군으로부터 선택된 항-클라우딘 18.2 항체와 동일한 HCDR 및 LCDR을 포함하며,

a) 여기서 hu26.H1L1은 서열식별번호: 65의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 66의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,

b) 여기서 hu26.H1L2 (S92A)는 서열식별번호: 65의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 224의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,

c) hu28.H1L2는 서열식별번호: 69의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 70의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,

- d) C10은 서열식별번호: 71의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 72의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- e) C29는 서열식별번호: 73의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 74의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- f) C30은 서열식별번호: 75의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 76의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인

다중-특이적 분자.

**청구항 41**

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 클라우드인 18.2 결합 도메인이 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하고, 여기서:

- a) HFR1은 EVQLLESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTLS (서열식별번호: 167) 및 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSCKASGYTFT (서열식별번호: 168)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- b) HFR2는 WVRQAPGGLEWVX<sub>18</sub> (서열식별번호: 169) 및 WVRQAPGGLEWVG (서열식별번호: 170)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- c) HFR3 서열은 RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAX<sub>23</sub> (서열식별번호: 171) 및 RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR (서열식별번호: 172)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- d) HFR4는 WGQGTLVTVSS (서열식별번호: 173) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- e) LFR1은 DIQLTQSPSFLSASVGDRTITC (서열식별번호: 174) 및 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (서열식별번호: 175)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- f) LFR2는 WYQQKPGX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>PKX<sub>19</sub>LIY (서열식별번호: 176)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- g) LFR3은 GVPSRFSGSGSGT<sub>24</sub>TLTISLQPEDFATYYC (서열식별번호: 178) 및 GVPDRFSGSGSGTDFLT<sub>24</sub>ISLQAEDVAVYHC (서열식별번호: 179)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- h) LFR4는 FGX<sub>25</sub>GTKLEIK (서열식별번호: 180) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하며,

여기서 X<sub>18</sub>은 S 또는 A이고, X<sub>19</sub>는 L 또는 A이고, X<sub>23</sub>은 T 또는 K이고, X<sub>24</sub>는 Y 또는 F이고, X<sub>25</sub>는 Q 또는 G이고, X<sub>26</sub>은 Q 또는 K이고, X<sub>27</sub>은 P 또는 A인 다중-특이적 분자.

**청구항 42**

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 클라우드인 18.2 결합 도메인이 하기를 포함하는 것인 다중-특이적 분자:

- a) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 65 또는 68의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 66 또는 67 또는 224의 서열을 포함함; 또는
- b) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 69의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 70의 서열을 포함함; 또는
- c) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 71의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 72의 서열을 포함함; 또는
- d) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 73의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 74의 서열을

포함함; 또는

e) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 75의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 76의 서열을 포함함.

**청구항 43**

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 항원 결합 도메인이 PD-L1 결합 도메인을 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 44**

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1 결합 도메인이 하기를 포함하는 것인 다중-특이적 분자:

- a) 서열식별번호: 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 120의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 121의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
  - b) 서열식별번호: 122의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 123의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 124의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
  - c) 서열식별번호: 125의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 126의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 127의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
  - d) 서열식별번호: 128의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 129의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 130의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
  - e) 서열식별번호: 131의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 132의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 133의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
  - f) 서열식별번호: 134의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 135의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 136의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
  - g) 서열식별번호: 137의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 138의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 139의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
  - h) 서열식별번호: 140의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 141의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 142의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
  - i) 서열식별번호: 143의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 144의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 145의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
  - j) 서열식별번호: 146의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 147의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 148의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
  - k) 서열식별번호: 149의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 150의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 151의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- 서열식별번호: 152의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 153의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 154의 서열을 포함하는 HCDR3.

**청구항 45**

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1 결합 도메인이 C71, C71v38, C239, C492, C570, 570h3, C446, C2811, C1778, C1793, C2855, C2713 및 C2719로 이루어진 군으로부터 선택된 항-PD-L1 항체와 동일한 HCDR을 포함하고,

- a) 여기서 C71은 서열식별번호: 107의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- b) C71v38은 서열식별번호: 108의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- c) C239는 서열식별번호: 109의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- d) C492는 서열식별번호: 110의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,

- e) C570은 서열식별번호: 111의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- f) 570h3은 서열식별번호: 223의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- g) C446은 서열식별번호: 112의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- h) C2811은 서열식별번호: 113의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- i) C1778은 서열식별번호: 114의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- j) C1793은 서열식별번호: 115의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- k) C2855는 서열식별번호: 116의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- l) C2713은 서열식별번호: 117의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- m) C2719는 서열식별번호: 118의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 46**

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, PD-L1 결합 도메인이 서열식별번호: 107-118 및 223으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 47**

제30항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) SIRP-알파 결합 도메인이 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만, 인간 SIRP $\alpha$ 에 대한 특이적 결합은 보유하고/거나;
- b) 클라우딘 18.2 결합 도메인이 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만, 클라우딘 18.2에 대한 특이적 결합은 보유하고/거나,
- c) PD-L1 결합 도메인이 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만, PD-L1에 대한 특이적 결합은 보유하는 것인

다중-특이적 분자.

**청구항 48**

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 치환 또는 변형 중 적어도 1개가 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 CDR 서열 중 1개 이상 및/또는 비-CDR 서열 중 1개 이상에 존재하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 49**

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화된 다중-특이적 분자.

**청구항 50**

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 접합 모이어티에 연결된 다중-특이적 분자.

**청구항 51**

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 접합 모이어티가 클리어런스-변형제, 화학요법제, 독소, 방사성 동위원소, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지, DNA-알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜블린-결합제, 정제 모이어티 또는 다른 항암 약물을 포함하는 것인 다중-특이적 분자.

**청구항 52**

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

**청구항 53**

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

**청구항 54**

제53항의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

**청구항 55**

제54항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 56**

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자 및/또는 제52항의 제약 조성물, 및 제2 치료제를 포함하는 키트.

**청구항 57**

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자를 발현시키는 방법으로서, 제54항의 벡터가 발현되는 조건 하에 제55항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 58**

대상체에서 표적 세포의 유도된 식세포작용으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 59**

대상체에서 표적 항원 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 60**

대상체에서 SIRP $\alpha$  관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 61**

대상체에서 CD47 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 62**

제58항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 대상체가 면역 관련 질환 또는 장애, 종양 및 암, 자가면역 질환, 및 감염성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환, 장애 또는 상태로 진단되었거나 또는 그에 대한 위험이 있는 것인 방법.

**청구항 64**

제63항에 있어서, 면역 관련 질환 또는 장애가 전신 홍반성 루푸스, 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 혈관염, 중증 근무력증, 특발성 폐 섬유증, 크론병, 천식, 류마티스 관절염, 이식편 대 숙주 질환, 척추관절병증 (예를 들어, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 염증성 장 질환과 연관된 고립성 급성 장병증성 관절염, 반응성 관절염, 베체트 증후군, 미분화 척추관절병증, 전방 포도막염, 및 소아 특발성 관절염), 다발성 경화증, 자궁내막증, 사구체신염, 폐혈증, 당뇨병, 급성 관상동맥 증후군, 허혈성 재관류, 건선, 진행성 전신 경화증, 아테롬성동맥경화증, 쇼그렌 증후군, 경피증, 또는 염증성 자가면역 근염으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

**청구항 65**

제63항에 있어서, 종양 및 암이 임의로 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 결장직장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위 암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 백혈병, 림프종, 골수종, 균상 식육종, 메르켈 세포암, 및 다른 혈액 악성종양, 예컨대 전형적 호지킨 림프종 (CHL), 원발성 종격 대 B-세포 림프종, T-세포/조직구-풍부 B-세포 림프종, EBV-양성 및 -음성 PTLD, 및 EBV-연관 미만성 대 B-세포 림프종 (DLBCL), 형질모구성 림프종, 결절의 NK/T-세포 림프종, 비인두암종, 및 HHV8-연관 원발성 삼출 림프종, 호지킨 림프종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 예컨대 원발성 CNS 림프종, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 기저 세포 암종, 담낭암, 위암, 폐암, 기관지암, 골암, 간 및 담관암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 신우 및 요관암, 타액선암, 소장암, 요도암, 방광암, 두경부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 식도암, 위장암, 피부암, 전립선암, 뇌하수체암, 질암, 갑상선암, 인후암, 교모세포종, 흑색종, 골수이형성 증후군, 육종, 기형종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, T 또는 B 세포 림프종, GI 기관 간질종, 연부 조직 종양, 간세포성 암종, 및 선암종, 또는 그의 전이로 이루어진 군으로부터 선택된 고형 종양 또는 혈액 악성종양인 방법.

**청구항 66**

제58항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 경구, 비강, 정맥내, 피하, 설하 또는 근육내 투여를 통하는 것인 방법.

**청구항 67**

제58항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 유효량의 제2 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 68**

제67항에 있어서, 제2 치료제가 화학요법제, 항암 약물, 방사선 요법제, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적화 요법제, 세포 요법제, 유전자 요법제, 호르몬 요법제, 항바이러스제, 항생제, 진통제, 항산화제, 금속 킬레이트화제 및 시토키인으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

**청구항 69**

대상체에서 표적 세포의 유도된 식세포작용으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화하기 위한 의학의 제조에서의 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자 및/또는 제52항의 제약 조성물의 용도.

**청구항 70**

대상체에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자 및/또는 제52항의 제약 조성물을 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 데 효과적인 용량으로 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 71**

제70항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

**청구항 72**

제70항 또는 제71항에 있어서, 대상체가 면역 관련 질환 또는 장애, 종양 및 암, 자가면역 질환, 및 감염성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환, 장애 또는 상태로 진단되었거나 또는 그에 대한 위험이 있는 것인 방법.

**청구항 73**

시험관내에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 방법으로서, 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자 및/또는 제52항의 제약 조성물의 존재 하에 표적 세포를 SIRP $\alpha$  양성 식세포작용 세포 샘플과 접촉시켜

SIRP $\alpha$  양성 식세포작용 세포에 의한 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 74**

제73항에 있어서, 표적 세포가 표적 항원을 발현하는 세포인 방법.

**청구항 75**

식세포작용에 의해 표적 항원 및 CD47을 공동-발현하는 표적 세포의 제거를 유도하는 방법으로서, 식세포작용 면역 세포의 존재 하에 표적 세포를 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자와 접촉시키는 것을 포함하는 방법.

**청구항 76**

대상체에서 표적 항원을 발현하지 않는 세포에 비해 표적 항원 및 CD47을 공동-발현하는 표적 세포에 대해 선택적으로 식세포작용 효과를 유도하는 방법으로서, 상기 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 77**

종양 미세환경의 M1 대식세포 수준의 증가를 필요로 하는 대상체의 종양 미세환경에서 M1 대식세포의 수준을 증가시키는 방법으로서, 상기 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제51항 중 어느 한 항의 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 SIRP- $\alpha$  및 종양 연관 항원에 특이적인 신규 다중-특이적 분자에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 신호-조절 단백질 알파 (SIRP $\alpha$ )는 주로 골수 세포 및 수지상 세포 상에서 발현되는 억제 수용체이다. SIRP $\alpha$ 는 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프 (ITIM) 세포질 도메인을 포함한다. 골수 세포에 대한 SIRP $\alpha$ 의 면역조절 활성화는 SIRP $\alpha$ 의 ITIM 세포질 도메인의 티로신 인산화를 유도하는 그의 리간드 CD47에 대한 결합, 및 후속해서 SH2-함유 티로신 포스파타제 (SHP-1/2)의 동원에 의해 활성화된다. 이어서, SHP-1/2는 단백질 탈인산화를 통해 억제 신호전달 사건을 매개하여, 궁극적으로 대식세포에서의 식세포작용의 억제를 발생시킨다 (Barclay AN, Van den Berg TK. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP $\alpha$ ) and CD47: structure, function, and therapeutic target. Annu Rev Immunol. 2014;32:25-50; Oldenborg PA, et al., Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. Science. 2000;288(5473):2051-2054.). 따라서, SIRP $\alpha$ 에 대한 CD47의 결합은 "나를 먹지 말라"는 신호를 전달하여 식세포작용을 억제한다.

[0003] CD47은 정상 세포 상에서 편재적으로 발현되고, 많은 암 세포 상에서 상향조절된다. 높은 CD47 발현은 면역계를 피하기 위해 암 세포에 의해 사용되는 메카니즘이며, 불량한 임상 결과와 상관관계가 있다 (Willingham SB, et al., The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP $\alpha$ ) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(17):6662-6667; Zhao XW, et al., CD47-signal regulatory protein- $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(45):18342-18347; Majeti R, et al., CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. Cell. 2009;138(2):286-299.). SIRP $\alpha$  및 제2 항원 (예를 들어, 표적 항원)에 특이적인 이중특이적 대식세포 증진 (BiME) 항체는 암 세포에 대해 증진된 식세포작용 특성을 제공하도록 설계되었고, 예를 들어 WO2015138600A2를 참조하며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 그리고, 상이한 특성의 SIRP $\alpha$  항체 및 포맷으로 구축된 보다 많은 BiME 분자가 더 많이 연구되고 비교될 필요가 있다.

[0004] 따라서, 감소된 부작용 및 높은 안전성을 갖는, SIRP $\alpha$ 에 대해 특이적인 개선된 BiME 항체 또는 다중-특이적 분자를 개발할 필요가 있다.

**발명의 내용**

- [0005] 본 개시내용 전반에 걸쳐, 단수 형태는 하나 또는 하나 초과 (즉, 적어도 하나)의 문법적 대상을 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 예로서, "항체"는 하나의 항체 또는 하나 초과항체의 항체를 의미한다.
- [0006] 본 개시내용은 SIRP- $\alpha$  및 중양 연관 항원에 특이적인 신규 다중-특이적 분자, 그의 아미노산 및 뉴클레오티드 서열, 및 그의 용도를 제공한다.
- [0007] 한 측면에서, 본 개시내용은
- [0008] (a) SIRP-알파 결합 도메인,
- [0009] (b) 활성화 수용체-결합 도메인, 및
- [0010] (c) 표적 항원 및 CD47을 공동-발현하는 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원에 결합하는 표적 항원 결합 도메인을 포함하는 다중-특이적 분자를 제공하며,
- [0011] 여기서 다중-특이적 분자는 면역 이펙터 세포의 이펙터 기능을 표적 항원의 존재 하에 선택적으로 유도하고, 여기서 면역 이펙터 세포는 SIRP-알파 및 활성화 수용체를 공동-발현한다.
- [0013] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 본원에 제공된 SIRP-알파 결합 도메인, Fc 도메인을 포함하는 본원에 제공된 활성화 수용체-결합 도메인, 및 본원에 제공된 표적 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0014] 특정의 이들 실시양태에서, 표적 결합 도메인은 클라우딘18.2 결합 도메인 또는 PD-L1-결합 도메인이다.
- [0015] 특정 실시양태에서, 표적 항원 및 CD47을 공동-발현하는 표적 세포는 면역 이펙터 세포의 이펙터 기능에 의한 제거 관심대상인 암 세포, 감염된 세포, 또는 질환 세포이다.
- [0016] 특정 실시양태에서, 다중-특이적 분자는 표적 항원의 부재 하에는 면역 이펙터 세포의 최소 이펙터 기능을 유도한다.
- [0017] 특정 실시양태에서, 표적 항원의 부재 하에 다중-특이적 분자에 의해 유도되는 이펙터 기능은 표적 항원의 존재 하에 유도되는 이펙터 기능의 10% 이하이다.
- [0018] 특정 실시양태에서, 면역 이펙터 세포는 골수 세포이고, 임의로 면역 이펙터 세포는 대식 세포, 단핵구, 호중구, 호산구, 식세포 또는 호염기구이고, 임의로 면역 이펙터 세포는 대식 세포이다.
- [0019] 특정 실시양태에서, 이펙터 기능은 면역 이펙터 세포에 의한 항원 및 CD47을 공동-발현하는 세포의 식세포작용을 포함한다.
- [0020] 특정 실시양태에서, 활성화 수용체는 결정화가능 단편  $\gamma$  수용체 (Fc $\gamma$ R), TREM2, 렉틴, 스캐빈저 수용체 A1 (SRA1), MARCO, CD36, CD163, CD68, CD205, CD206, FcDR1, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CD64, CD32a, CD16a, CD89, CD19, CD28, CSFR, PDGFR, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, 렉틴 1, RAGE (SR-E1), LRP1, LRP2, ASGP, SR-PSOX, CXCL16, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), 및 CD169 수용체 또는 보체 수용체 (예컨대 CR1 및 CR3), PI3K, Fc $\gamma$ R1, Fc $\gamma$ R2A, Fc $\gamma$ R2B2, Fc $\gamma$ R2C, Fc $\gamma$ R3A, BAH, Tyro3, Ax1, Traf6, Syk, MyD88, Zap70, Fc $\epsilon$ R1, Fc $\alpha$ R1, BAFF-R, DAP 12, NFAM1, MRC1, ItgB5, MERTK, ELMO, 및 CD79b이고; 임의로 활성화 수용체는 Fc $\gamma$ R이다.
- [0021] 특정 실시양태에서, 활성화 수용체-결합 도메인은 Fc 도메인을 포함하고, 임의로 Fc 도메인은 IgG1 또는 IgG4로부터 유래된다.
- [0022] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은 SIRP-알파와 CD47 사이의 상호작용을 실질적으로 차단할 수 있다.
- [0023] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은 SIRP-알파와 CD47 사이의 상호작용을 완전히 차단할 수 있다.
- [0024] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은 SIRP-알파와 CD47 사이의 상호작용에 의해 매개되는 SHP-1 동원을 실질적으로 차단할 수 있다.
- [0025] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은 SIRP-알파와 CD47 사이의 상호작용에 의해 매개되는 SHP-1 동원을 완전히 차단할 수 있다.

- [0026] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 면역 이펙터 세포의 이펙터 기능을 유도하는 최소 내인성 활성을 갖는다.
- [0027] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인 및 활성화 수용체-결합 도메인은, 다중-특이적 분자가 동일한 면역 이펙터 세포 상에서 공동-발현된 SIRP-알과 및 활성화 수용체 둘 다에 결합하는 것을 허용하도록 근접해 있다.
- [0028] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인 및/또는 표적 항원 결합 도메인은 항체 도메인 또는 항체 모방체 도메인을 포함하고; 임의로 항체 모방체 도메인은 피브로넥틴 도메인, 단백질 A의 Z 도메인 (아피바디), 감마-B 결정질 도메인, 유비퀴틴 도메인, 시스타틴 도메인, Sac7d 도메인, 삼중 나선 코일드 코일 도메인, 리포칼린 도메인, 막 수용체의 A 도메인, 안키린 반복 모티프, Fyn의 SH3 도메인, 프로테아제 억제체의 쿠니츠 도메인, 피브로넥틴의 유형 III 도메인 (미니바디), 탄수화물 결합 모듈 32-2를 포함한다.
- [0029] 특정 실시양태에서, 항체 도메인은 Fab, VHH, 단일 쇠 Fv (scFv), 디아바디, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv 단편, 디숄피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디숄피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), F(ab)<sub>2</sub>, scFv 이량체 (2가 디아바디), 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 테트라바디, 도메인 항체, 또는 2가 도메인 항체를 포함한다.
- [0030] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 표적 항원 결합 항체 도메인, SIRP-a 결합 항체 도메인 및 Fc 도메인을 포함하는 다중-특이적 항체를 포함한다.
- [0031] 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 항체 도메인은 Fc 도메인의 N-말단에 연결된다.
- [0032] 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 항체 도메인은 Fab 도메인을 포함하고, 임의로 Fab 도메인은 Fc 도메인의 N-말단 중 1개에 연결된 중쇄를 포함한다.
- [0033] 특정 실시양태에서, 다중-특이적 분자는 각각 Fab 도메인을 포함하는 2개의 표적 항원 결합 항체 도메인을 포함하고, 임의로 각각의 Fab 도메인은 각각 Fc 도메인의 각각의 N-말단에 연결된 중쇄를 포함한다.
- [0034] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 Fc 도메인 또는 표적 항원 결합 항체 도메인에 연결된다.
- [0035] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 Fc 도메인의 C-말단에 연결된다.
- [0036] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 Fc 도메인의 N-말단에 연결되며, 단 SIRP-알과 결합 도메인 및 표적 항원 결합 항체 도메인은 Fc 도메인의 동일한 N-말단에 연결되지 않는다.
- [0037] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 표적 항원 결합 Fab 도메인의 경쇄의 C-말단에 연결된다.
- [0038] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 항체 도메인은 Fc 도메인의 N-말단에 연결된다.
- [0039] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 항체 도메인은 Fab 도메인을 포함하고, 임의로 Fab 도메인은 Fc 도메인의 N-말단 중 1개에 연결된 중쇄를 포함한다.
- [0040] 특정 실시양태에서, 항체는 각각 Fab 도메인을 포함하는 2개의 SIRP-알과 결합 항체 도메인을 포함하고, 임의로 각각의 Fab 도메인은 각각 Fc 도메인의 각각의 N-말단에 연결된 중쇄를 포함한다.
- [0041] 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 도메인은 Fc 도메인 또는 SIRP-알과 결합 항체 도메인에 연결된다.
- [0042] 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 도메인은 Fc 도메인의 N-말단에 연결되며, 단 표적 항원 결합 도메인 및 SIRP-알과 결합 도메인은 Fc 도메인의 동일한 N-말단에 연결되지 않는다.
- [0043] 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 도메인은 SIRP-알과 결합 Fab 도메인의 경쇄의 C-말단에 연결된다.
- [0044] 특정 실시양태에서, 표적 항원은 종양 표면 항원을 포함한다.
- [0045] 특정 실시양태에서, 종양 표면 항원은 PD-L1, 클라우딘 18.2, BCMA, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33, CD38, CD44, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD123, EGFR, HER2, HER3, CD117, C-Met, EGFR, EGFRvIII, ERBB3, ERBB4, VEGFR1, VEGFR2, ROR1, PTHR2, B7-H1(PD-L1), B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, B7-H7, Trop-2, GPC-3, EPCAM, DLL-3, 넥틴-4, 클라우딘6, Muc-1, PSMA, GD3, FAP, CEA, 또는 EphA2이다.
- [0046] 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 임의의 적합한 포맷일 수 있다. 예시적인 예는 하기와 같이 제공된다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 표적 항원-결합 항

체를 포함하고, 여기서 각각의 경쇄의 C-말단은 항-SIRP $\alpha$  scFv (즉, SIRP $\alpha$  결합 도메인)에 융합된다. 표적 항원-결합 항체는 표적 항원 결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 2a에 제시된다.

- [0047] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 표적 항원-결합 항체를 포함하고, 여기서 각각의 중쇄의 C-말단은 항-SIRP $\alpha$  scFv (즉, SIRP $\alpha$  결합 도메인)에 융합된다. 표적 항원-결합 항체는 표적 항원 결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 2b에 제시된다.
- [0048] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 경쇄의 C-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 scFv (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 2c에 제시된다.
- [0049] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 중쇄의 C-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 scFv (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 2d에 제시된다.
- [0050] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 경쇄의 C-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 (sdAb) (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6a에 제시된다.
- [0051] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 중쇄의 C-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 (sdAb) (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6b에 제시된다.
- [0052] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 중쇄의 N-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 (sdAb) (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6c에 제시된다.
- [0053] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 경쇄의 N-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 (sdAb) (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6d에 제시된다.
- [0054] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 각각 표적 항원에 결합할 수 있는 항-SIRP $\alpha$  결합 도메인 (예를 들어 Fab) 및 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함하고, 이들 각각은 Fc 도메인의 폴리펩티드 쇠의 N 말단에 융합된다. 예시적인 예가 도 6e에 제시된다.
- [0055] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 Fc 도메인의 폴리펩티드 쇠의 N 말단에 융합된 표적 항원에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 (sdAb)를 각각 포함하는 2개의 중쇄를 포함하고, Fc 도메인의 폴리펩티드 쇠 중 1개의 C 말단에 융합된 적어도 1개의 항-SIRP $\alpha$  결합 도메인을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 Fc 도메인의 폴리펩티드 쇠 중 1개의 C 말단에 융합된 1개의 항-SIRP $\alpha$  결합 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6f에 제시된다.
- [0056] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 각각이 Fc 도메인의 폴리펩티드 쇠 중 1개의 C 말단에 융합된 2개의 항-SIRP $\alpha$  결합 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6g에 제시된다.
- [0057] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은
- [0058] a) X<sub>1</sub>YYMH (서열식별번호(SEQ ID NO): 161)의 서열을 포함하는 HCDR1, RIDPDX<sub>2</sub>EX<sub>3</sub>KYAPKFQG (서열식별번호: 162)의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 GX<sub>15</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>Y (서열식별번호: 163)의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 SASSVSSSYLY (서열식별번호: 26)의 서열을 포함하는 LCDR1, STSNLAS (서열식별번호: 27)의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 X<sub>6</sub>QWSSYPYT (서열식별번호: 164)의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0059] b) TYGMS (서열식별번호: 35)의 서열을 포함하는 HCDR1, WINTYSGVX<sub>7</sub>TX<sub>8</sub>ADDFKG (서열식별번호: 165)의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 DPHX<sub>9</sub>YGX<sub>10</sub>SPAWFX<sub>11</sub>Y (서열식별번호: 166)의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 X<sub>12</sub>ASQX<sub>13</sub>VGIX<sub>14</sub>VA

(서열식별번호: 188)의 서열을 포함하는 LCDR1, SASNRYT (서열식별번호: 39)의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 QQYSX<sub>16</sub>YPX<sub>17</sub>T (서열식별번호: 189)의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

- [0060] c) EYVLS (서열식별번호: 41)의 서열을 포함하는 HCDR1, EIYPGTITTYNEKFKG (서열식별번호: 42)의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 FYDYDGGWFAY (서열식별번호: 43)의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 SASSSVSSDLH (서열식별번호: 44)의 서열을 포함하는 LCDR1, GTSNLAS (서열식별번호: 45)의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 QQWSGYPT (서열식별번호: 46)의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며, 여기서
- [0061] X<sub>1</sub>은 A 또는 D이고; X<sub>2</sub>는 G 또는 A이고; X<sub>3</sub>은 T 또는 S이고; X<sub>4</sub>는 L 또는 Y이고; X<sub>5</sub>는 E 또는 A이고; X<sub>6</sub>은 Y 또는 H이고; X<sub>7</sub>은 S 또는 P이고; X<sub>8</sub>은 Y 또는 C이고; X<sub>9</sub>는 Y 또는 S이고; X<sub>10</sub>은 N 또는 S이고; X<sub>11</sub>은 P 또는 V이고; X<sub>12</sub>는 E 또는 K이고; X<sub>13</sub>은 N 또는 I이고; X<sub>14</sub>는 S 또는 A이고; X<sub>15</sub>는 S이거나 부재하고; X<sub>16</sub>은 S 또는 A이고; X<sub>17</sub>은 F 또는 L이다.
- [0062] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은
- [0063] a) 서열식별번호: 23의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 24 또는 서열식별번호: 198의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 25의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 27의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0064] b) 서열식별번호: 29의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 30의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 31의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 32의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 33의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0065] c) 서열식별번호: 35의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 36의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 37의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 38의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 39의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 40의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0066] d) 서열식별번호: 47의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 48의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 49의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 50의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 51의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 52의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0067] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 C25, C15, C42, C59 및 C73으로 이루어진 군으로부터 선택된 항-SIRP-알과 항체와 동일한 HCDR 및 LCDR을 포함하며, 여기서
- [0068] a) C25는 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0069] b) C15는 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0070] c) C42는 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 14의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0071] d) C59는 서열식별번호: 15의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0072] e) C73은 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 18의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0073] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하고, 여기서
- [0074] a) HFR1은 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX<sub>20</sub>SGFNIK (서열식별번호: 190) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0075] b) HFR2는 WVQQAPGKGLEWIG (서열식별번호: 191) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0076] c) HFR3 서열은 RVTITADTSTX<sub>21</sub>TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 192) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의

상동 서열을 포함하고/거나,

- [0077] d) HFR4는 WGQGTILVTVSS (서열식별번호: 193) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0078] e) LFR1은 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 194) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0079] f) LFR2는 WYQQKPGQAPKLIWY (서열식별번호: 195) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0080] g) LFR3은 GIPARFSGSGGTD<sub>22</sub>TLTISSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 196) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0081] h) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 197) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0082] 여기서  $X_{20}$ 은 A 또는 V이고;  $X_{21}$ 은 N 또는 D이고;  $X_{22}$ 는 Y 또는 F이다.
- [0083] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 하기를 포함한다:
- [0084] f) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 1의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 2의 서열을 포함함; 또는
- [0085] g) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 3의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 4의 서열을 포함함;
- [0086] h) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 5의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 6의 서열을 포함함; 또는
- [0087] i) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 7의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 8의 서열을 포함함; 또는
- [0088] j) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 9의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 10의 서열을 포함함; 또는
- [0089] k) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 11의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 12의 서열을 포함함; 또는
- [0090] l) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 13의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 14의 서열을 포함함; 또는
- [0091] m) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 15의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 16의 서열을 포함함; 또는
- [0092] n) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 17의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 18의 서열을 포함함, 또는
- [0093] o) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 159의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 160의 서열을 포함함.
- [0094] 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 도메인은 클라우딘 18.2 결합 도메인을 포함한다.
- [0095] 특정 실시양태에서, 클라우딘 18.2 결합 도메인은
- [0096] p) 서열식별번호: 77의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 78의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 79의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 80의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 81의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 82 또는 서열식별번호: 225의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0097] q) 서열식별번호: 83의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 84의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 85의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 86의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 87의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 88의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0098] r) 서열식별번호: 89의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 90의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 91의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 92의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 93의 서열을

포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 94의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

- [0099] s) 서열식별번호: 95의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 96의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 97의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 98의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 99의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 100의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0100] t) 서열식별번호: 101의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 102의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 103의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 104의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 105의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 106의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0101] 특정 실시양태에서, 클라우딩 18.2 결합 도메인은 hu26.H1L1, hu26.H1L2 (S92A), hu28.H1L2, C10, C29 및 C30으로 이루어진 군으로부터 선택된 항-클라우딩 18.2 항체와 동일한 HCDR 및 LCDR을 포함하고,
- [0102] u) 여기서 hu26.H1L1은 서열식별번호: 65의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 66의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0103] v) 여기서 hu26.H1L2 (S92A)는 서열식별번호: 65의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 224의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0104] w) hu28.H1L2는 서열식별번호: 69의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 70의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0105] x) C10은 서열식별번호: 71의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 72의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0106] y) C29는 서열식별번호: 73의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 74의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0107] z) C30은 서열식별번호: 75의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 76의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0108] 특정 실시양태에서, 클라우딩 18.2 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하며, 여기서:
- [0109] a) HFR1은 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (서열식별번호: 167) 및 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT (서열식별번호: 168)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0110] b) HFR2는 WVRQAPGKGLEWVX<sub>18</sub> (서열식별번호: 169) 및 WVRQAPGQGLEWVG (서열식별번호: 170)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0111] c) HFR3 서열은 RFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAX<sub>23</sub> (서열식별번호: 171) 및 RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR (서열식별번호: 172)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0112] d) HFR4는 WGQGTLVTVSS (서열식별번호: 173) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0113] e) LFR1은 DIQLTQSPSFLSASVGDRTITC (서열식별번호: 174) 및 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (서열식별번호: 175)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0114] f) LFR2는 WYQKPGX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>PKX<sub>19</sub>LIY (서열식별번호: 176)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0115] g) LFR3은 GVPSRFSGSGSGT<sub>24</sub>TLTISSLQPEDFATYYC (서열식별번호: 178) 및 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYHC (서열식별번호: 179)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0116] h) LFR4는 FGX<sub>25</sub>GTKLEIK (서열식별번호: 180) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0117] 여기서 X<sub>18</sub>은 S 또는 A이고, X<sub>19</sub>은 L 또는 A이고, X<sub>23</sub>은 T 또는 K이고, X<sub>24</sub>은 Y 또는 F이고, X<sub>25</sub>은 Q 또는 G이고,

$X_{26}$ 은 Q 또는 K이고,  $X_{27}$ 은 P 또는 A이다.

- [0118] 특정 실시양태에서, 클라우딘 18.2 결합 도메인은 하기를 포함한다:
- [0119] aa) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 65 또는 68의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 66 또는 67 또는 224의 서열을 포함함; 또는
- [0120] bb) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 69의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 70의 서열을 포함함; 또는
- [0121] cc) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 71의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 72의 서열을 포함함; 또는
- [0122] dd) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 73의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 74의 서열을 포함함; 또는
- [0123] ee) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 75의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 76의 서열을 포함함.
- [0124] 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 도메인은 PD-L1 결합 도메인을 포함한다.
- [0125] 특정 실시양태에서, PD-L1 결합 도메인은
- [0126] ff) 서열식별번호: 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 120의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 121의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- [0127] gg) 서열식별번호: 122의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 123의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 124의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- [0128] hh) 서열식별번호: 125의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 126의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 127의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- [0129] ii) 서열식별번호: 128의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 129의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 130의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- [0130] jj) 서열식별번호: 131의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 132의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 133의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- [0131] kk) 서열식별번호: 134의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 135의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 136의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- [0132] ll) 서열식별번호: 137의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 138의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 139의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- [0133] mm) 서열식별번호: 140의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 141의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 142의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- [0134] nn) 서열식별번호: 143의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 144의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 145의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- [0135] oo) 서열식별번호: 146의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 147의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 148의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- [0136] pp) 서열식별번호: 149의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 150의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 151의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는
- [0137] 서열식별번호: 152의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 153의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 154의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함한다.
- [0138] 특정 실시양태에서, PD-L1 결합 도메인은 C71, C71v38, C239, C492, C570, 570h3, C446, C2811, C1778, C1793, C2855, C2713 및 C2719로 이루어진 균으로부터 선택된 항-PD-L1 항체와 동일한 HCDR을 포함하며,
- [0139] qq) 여기서 C71은 서열식별번호: 107의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,

- [0140] rr) C71v38은 서열식별번호: 108의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0141] ss) C239는 서열식별번호: 109의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0142] tt) C492는 서열식별번호: 110의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0143] uu) C570은 서열식별번호: 111의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0144] vv) 570h3은 서열식별번호: 223의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0145] ww) C446은 서열식별번호: 112의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0146] xx) C2811은 서열식별번호: 113의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0147] yy) C1778은 서열식별번호: 114의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0148] zz) C1793은 서열식별번호: 115의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0149] aaa) C2855는 서열식별번호: 116의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0150] bbb) C2713은 서열식별번호: 117의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0151] ccc) C2719는 서열식별번호: 118의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0152] 특정 실시양태에서, PD-L1 결합 도메인은 서열식별번호: 107-118 및 223으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0153] 특정 실시양태에서,
- [0154] ddd) SIRP-알파 결합 도메인은 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만, 인간 SIRP α에 대한 특이적 결합은 보유하고/거나;
- [0155] eee) 클라우딘 18.2 결합 도메인은 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만, 클라우딘 18.2에 대한 특이적 결합은 보유하고/거나,
- [0156] fff) PD-L1 결합 도메인은 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만, PD-L1에 대한 특이적 결합은 보유한다.
- [0157] 특정 실시양태에서, 치환 또는 변형 중 적어도 1개는 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 CDR 서열 중 1개 이상 및/또는 비-CDR 서열 중 1개 이상에 존재한다.
- [0158] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 인간화된다.
- [0159] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 1개 이상의 접합 모이어티에 연결된다.
- [0160] 특정 실시양태에서, 접합 모이어티는 클리어런스-변형제, 화학요법제, 독소, 방사성 동위원소, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지, DNA-알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜블린-결합제, 정제 모이어티 또는 다른 항암 약물을 포함한다.
- [0161] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 다중-특이적 분자 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0162] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0163] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0164] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0165] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 다중-특이적 분자 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물, 및 제2 치료제를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0166] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 발현시키는 방법을 제공하며, 이는 본원에 제공된 벡터가 발현되는 조건 하에 본원에 제공된 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다.
- [0167] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 세포의 유도된 식세포작용으로부터 이익을 얻을 수 있는 질

환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함한다.

- [0168] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 항원 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함한다.
- [0169] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 SIRP $\alpha$  관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함한다.
- [0170] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 CD47 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함한다.
- [0171] 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0172] 특정 실시양태에서, 대상체는 면역 관련 질환 또는 장애, 종양 및 암, 자가면역 질환, 및 감염성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환, 장애 또는 상태로 진단되었거나 또는 그에 대한 위험이 있다.
- [0173] 특정 실시양태에서, 면역 관련 질환 또는 장애는 전신 홍반성 루푸스, 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 혈관염, 중증 근무력증, 특발성 폐 섬유증, 크론병, 천식, 류마티스 관절염, 이식편 대 숙주 질환, 척추관절병증 (예를 들어, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 염증성 장 질환과 연관된 고립성 급성 장병증성 관절염, 반응성 관절염, 베체트 증후군, 미분화 척추관절병증, 전방 포도막염, 및 소아 특발성 관절염), 다발성 경화증, 자궁내막증, 사구체신염, 패혈증, 당뇨병, 급성 관상동맥 증후군, 허혈성 재관류, 건선, 진행성 전신 경화증, 아테롬성동맥경화증, 쇼그렌 증후군, 경피증, 또는 염증성 자가면역 근염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0174] 특정 실시양태에서, 종양 및 암은 임의로 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 결장직장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위 암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 백혈병, 림프종, 골수종, 근상 식육종, 메르켈 세포암, 및 다른 혈액 악성종양, 예컨대 전형적 호지킨 림프종 (CHL), 원발성 종격 대 B-세포 림프종, T-세포/조각구-풍부 B-세포 림프종, EBV-양성 및 -음성 PTLD, 및 EBV-연관 미만성 대 B-세포 림프종 (DLBCL), 형질모구성 림프종, 결절의 NK/T-세포 림프종, 비인두암종, 및 HHV8-연관 원발성 삼출 림프종, 호지킨 림프종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 예컨대 원발성 CNS 림프종, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 향문암, 충수암, 성상세포종, 기저 세포 암종, 담낭암, 위암, 폐암, 기관지암, 골암, 간 및 담관암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 신우 및 요관암, 타액선암, 소장암, 요도암, 방광암, 두경부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 식도암, 위장암, 피부암, 전립선암, 뇌하수체암, 질암, 갑상선암, 인후암, 교모세포종, 흑색종, 골수이형성 증후군, 육종, 기형종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, T 또는 B 세포 림프종, GI 기관 간질종, 연부 조직 종양, 간세포성 암종, 및 선암종, 또는 그의 전이로 이루어진 군으로부터 선택된 고형 종양 또는 혈액 악성종양이다.
- [0175] 특정 실시양태에서, 투여는 경구, 비강, 정맥내, 피하, 설하 또는 근육내 투여를 통한다.
- [0176] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 치료 유효량의 제2 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0177] 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 화학요법제, 항암 약물, 방사선 요법제, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적화요법제, 세포 요법제, 유전자 요법제, 호르몬 요법제, 항바이러스제, 항생제, 진통제, 항산화제, 금속 킬레이트화제 및 시토키인으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0178] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 세포의 유도된 식세포작용으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화하기 위한 의학의 제조에서의 본원에 제공된 다중-특이적 분자 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물의 용도를 제공한다.
- [0179] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 본원에 제공된 다중-특이적 분자 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 데 효과적인 용량으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0180] 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0181] 특정 실시양태에서, 대상체는 면역 관련 질환 또는 장애, 종양 및 암, 자가면역 질환, 및 감염성 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환, 장애 또는 상태로 진단되었거나 또는 그에 대한 위험이 있다.

- [0182] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 시험관내에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 방법을 제공하며, 이는 본원에 제공된 다중-특이적 분자 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물의 존재 하에 표적 세포를 SIRP $\alpha$  양성 식세포작용 세포 샘플과 접촉시켜 SIRP $\alpha$  양성 식세포작용 세포에 의한 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 것을 포함한다.
- [0183] 특정 실시양태에서, 표적 세포는 표적 항원을 발현하는 세포이다.
- [0184] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 식세포작용에 의해 표적 항원 및 CD47을 공동-발현하는 표적 세포의 제거를 유도하는 방법을 제공하며, 이는 식세포작용 면역 세포의 존재 하에 표적 세포를 본원에 제공된 다중-특이적 분자와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0185] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 항원을 발현하지 않는 세포에 비해 표적 항원 및 CD47을 공동-발현하는 표적 세포에 대해 선택적으로 식세포작용 효과를 유도하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함한다.
- [0186] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 중앙 미세환경의 M1 대식세포 수준의 증가를 필요로 하는 대상체의 중앙 미세환경에서 M1 대식세포의 수준을 증가시키는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0187] 도 1은 중앙 연관 항원 (TAA)을 발현하는 암 세포에 대한 대식세포 식세포작용 활성을 증진시키는 이중특이적 대식세포 결속체 (BiME) 항체의 개략적 도면을 보여준다.
- 도 2a는 경쇄 (LC)의 C 말단에서 2개의 항-SIRP $\alpha$  scFv와 융합된, 클라우딘18.2를 표적화하는 항체를 포함하는 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 분자 (ES028-001)의 개략적 도면을 보여준다.
- 도 2b는 중쇄 (HC)의 C 말단에서 2개의 항-SIRP $\alpha$  scFv와 융합된, 클라우딘18.2를 표적화하는 항체를 포함하는 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 분자 (ES028-005)의 개략적 도면을 보여준다.
- 도 2c는 경쇄 (LC)의 C 말단에서 2개의 항-클라우딘18.2 scFv와 융합된, SIRP $\alpha$ 를 표적화하는 항체를 포함하는 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 분자 (ES028-009)의 개략적 도면을 보여준다.
- 도 2d는 중쇄 (LC)의 C 말단에서 2개의 항-클라우딘18.2 scFv와 융합된, SIRP $\alpha$ 를 표적화하는 항체를 포함하는 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 분자 (ES028-013)의 개략적 도면을 보여준다.
- 도 3a는 대표적인 이중특이적 항체가 Raji/h클라우딘18.2 세포에 결합할 수 있음을 FACS 검출에 의해 보여준다. 항-클라우딘18.2 항체를 대조군으로서 사용하였다.
- 도 3b는 대표적인 이중특이적 항체가 CHO-K1/SIRP $\alpha$  세포에 결합할 수 있음을 FACS 검출에 의해 보여준다. 항-SIRP $\alpha$  항체를 대조군으로서 사용하였다.
- 도 4a는 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체가 단일 또는 조합 처리보다 더 우수하게 MC38/hCD47/h클라우딘18.2 세포에 대한 마우스 BMDM 식세포작용을 자극한다는 것을 보여준다. 항-CD47 항체를 대조군으로서 사용하였다.
- 도 4b는 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체가 클라우딘18.2를 발현하지 않는 MC38/hCD47 세포에 대해서는 마우스 BMDM 식세포작용을 자극하지 않는다는 것을 보여준다. 항-CD47 항체를 대조군으로서 사용하였다.
- 도 5는 MC38/hCD47/h클라우딘18.2 세포에 대한 마우스 BMDM 식세포작용의 식세포작용에 대한 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체 이소형의 비교를 보여준다. 항-CD47 항체를 대조군으로서 사용하였다.
- 도 6a는 경쇄 (LC)의 C 말단에서 2개의 항-PDL1 sdAb와 융합된, SIRP $\alpha$ 를 표적화하는 1개의 항체를 포함하는 항-PDL1/SIRP $\alpha$  이중특이적 분자 (ES019-020)의 개략적 도면이다.
- 도 6b는 중쇄 (HC)의 C 말단에서 2개의 항-PDL1 sdAb와 융합된, SIRP $\alpha$ 를 표적화하는 1개의 항체를 포함하는 항-PDL1/SIRP $\alpha$  이중특이적 분자 (ES019-024)의 개략적 도면이다.
- 도 6c는 중쇄 (HC)의 N 말단에서 2개의 항-PDL1 sdAb와 융합된, SIRP $\alpha$ 를 표적화하는 1개의 항체를 포함하는 항-PDL1/SIRP $\alpha$  이중특이적 분자 (ES019-025)의 개략적 도면이다.

도 6d는 경쇄 (LC)의 N 말단에서 2개의 항-PDL1 sdAb와 융합된, SIRP α를 표적화하는 1개의 항체를 포함하는 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 분자 (ES019-026)의 개략적 도면이다.

도 6e는 SIRP α를 표적화하는 1개의 Fab 아암 및 2개의 항-PDL1 sdAb를 함유하는 다른 아암을 갖는 1개의 비대칭 항체를 포함하는 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 분자 (ES019-029)의 개략적 도면이며; 이중이량체는 Fc 영역에서 노브-인 홀 돌연변이에 의해 연결된다.

도 6f는 2개의 항-PDL1 sdAb가 Fc의 N-말단에 융합되고 1개의 항-SIRP α Fab가 Fc의 C-말단에 융합된, 1개의 비대칭 항체를 포함하는 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 분자 (ES019-072)의 개략적 도면이고; 이중이량체는 Fc 영역에서 노브-인 홀 돌연변이에 의해 연결된다.

도 6g는 2개의 항-PDL1 sdAb가 Fc의 N-말단에 융합되고 2개의 항-SIRP α Fab가 Fc의 C-말단에 융합된, 1개의 비대칭 항체를 포함하는 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 분자 (ES019-073 또는 ES019-079)의 개략적 도면이다.

도 7a는 대표적인 이중특이적 항체 ES019-020, ES019-024, ES019-025 및 ES019-026이 Raji/hPDL1 세포에 결합할 수 있음을 FACS 검출에 의해 보여준다. 항-PDL1 항체를 대조군으로서 사용하였다.

도 7b는 대표적인 이중특이적 항체 ES019-020, ES019-024, ES019-025 및 ES019-026이 CHO-K1/SIRP α 세포에 결합할 수 있음을 FACS 검출에 의해 보여준다. 항-SIRP α 항체를 대조군으로서 사용하였다.

도 8은 대표적인 이중특이적 항체 ES019-020, ES019-024, ES019-025 및 ES019-026이 Jurkat T 세포를 활성화시킬 수 있음을 Jurkat/PD1 리포터 세포 검정에 의해 보여준다. 항-PDL1 항체를 대조군으로서 사용하였다.

도 9a는 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체 ES019-020, ES019-024, ES019-025, ES019-026 및 ES019-029가 단일 처리보다 더 우수하거나 또는 조합 처리와 유사하게 K562/hPDL1 세포에 대한 인간 단핵구 유래 대식세포 식세포작용을 자극한다는 것을 보여준다. 항-CD47 항체를 대조군으로서 사용하였다.

도 9b는 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체가 단일 또는 조합 처리와 유사하게 K562(PDL1 음성) 세포에 대한 인간 단핵구 유래 대식세포 식세포작용을 자극하지 않는다는 것을 보여준다. 항-CD47 항체를 대조군으로서 사용하였다.

도 9c는 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체가 단일 또는 조합 처리와 유사하게 Jurkat 세포 (SIRP γ 양성)에 대한 인간 단핵구 유래 대식세포 식세포작용을 자극하지 않는다는 것을 보여준다. 항-CD47 항체를 대조군으로서 사용하였다.

도 10은 MC38/h클라우딘18.2/hSIRP α 동계 모델에서의 ES028 BiME (예를 들어, ES028-001, ES028-005 및 ES028-009)의 생체내 항-종양 효능을 보여준다.

도 11a는 상이한 SIRP α 항체 기반 조합물 또는 SIRP α 이중특이적 항체가 Raji/hPDL1 세포에 대해 식세포작용을 유도하였음을 보여준다.

도 11b는 상이한 SIRP α 항체 기반 조합물 또는 PDL1/SIRP α 이중특이적 항체가 Raji (PDL1 음성) 세포에 대해 식세포작용을 유도하였음을 보여준다.

도 12는 키메라 항체 C15, C25, C42, C59, C73 및 hu1H9G4의 CHOK1-hSIRP α v1 및 CHOK1-hSIRP α v2에 대한 결합 친화도를 보여준다.

도 13은 키메라 항체 C15, C25, C42, C59, C73 및 hu1H9G4에 의한 인간 CD47/SIRP α v1 상호작용 및 인간 CD47/SIRP α v2 상호작용에 대한 IC50 값 및 차단 백분율을 보여준다.

도 14는 키메라 항체 C15, C25, C42, C59, C73 및 hu1H9G4에 의한 SHP-1 동원에 대한 IC50 값 및 차단 백분율을 보여준다.

도 15는 인간화 항체 hu025.021, hu025.023, hu025.033, hu025.059 및 hu025.060 및 C25의 CHOK1-hSIRP α v1 및 CHOK1-hSIRP α v2에 대한 결합 친화도를 보여준다.

도 16은 인간화 항체 hu025.021, hu025.023, hu025.033, hu025.059 및 hu025.060 및 C25의 인간 SIRP α v1 및 인간 SIRP α v2에 대한 결합 동역학을 보여준다.

도 17은 경쟁적 ELISA 검정에 의해 측정된 바와 같은 인간화 항체 hu025.021, hu025.023, hu025.033, hu025.059 및 hu025.060, 및 C25에 의한 인간 CD47/SIRP α v1 상호작용 및 인간 CD47/SIRP α v2 상호작용에 대

한 IC50 값 및 차단 백분율을 보여준다.

도 18은 경쟁적 FACS 검정법에 의해 측정된 바와 같은 인간화 항체 hu025.023, hu025.060, 및 C25에 의한 인간 CD47/SIRP α v1 상호작용 및 인간 CD47/SIRP α v2 상호작용에 대한 IC50 값 및 차단 백분율을 보여준다.

도 19는 인간화 항체 hu025.021, hu025.023, hu025.033, hu025.059 및 hu025.060, 및 C25에 의한 SHP-1 동원에 대한 IC50 값 및 차단 백분율을 보여준다.

도 20a는 단독 또는 리투시맵과 조합된 항-SIRP α 항체 025c, 015c, 042c, 059c, 또는 073c의 존재 하에서의 hSIRP α v1/v2를 발현하는 인간 대식세포에 의한 Raji 세포의 식세포 지수를 보여준다.

도 20b는 단독 또는 상이한 농도의 항-PD-L1 항체와 조합된 항-SIRP α 항체 025c 또는 042c의 존재 하에서의 hSIRP α v1/v1을 발현하는 인간 대식세포에 의한 Raji 세포의 식세포 지수를 보여준다.

도 20c는 단독 또는 상이한 농도의 항-PD-L1 항체와 조합된 항-SIRP α 항체 025c, 042c 또는 073c의 존재 하에서의 hSIRP α v2/v2를 발현하는 인간 대식세포에 의한 Raji 세포의 식세포 지수를 보여준다.

도 21a는 단독 또는 상이한 농도의 항-PD-L1 항체와 조합된 항-SIRP α 항체 025c, hu025.023 또는 hu025.060의 존재 하에서의 hSIRP α v1/v1을 발현하는 인간 대식세포에 의한 Raji 세포의 식세포 지수를 보여준다.

도 21b는 단독 또는 상이한 농도의 리투시맵과 조합된 항-SIRP α 항체 025c, hu025.023 또는 hu025.060의 존재 하에서의 hSIRP α v1/v1을 발현하는 인간 대식세포에 의한 Raji 세포의 식세포 지수를 보여준다.

도 21c는 단독 또는 상이한 농도의 항-PD-L1 항체와 조합된 항-SIRP α 항체 025c, hu025.023 또는 hu025.060의 존재 하에서의 hSIRP α v2/v2를 발현하는 인간 대식세포에 의한 Raji 세포의 식세포 지수를 보여준다.

도 21d는 단독 또는 상이한 농도의 리투시맵과 조합된 항-SIRP α 항체 025c, hu025.023 또는 hu025.060의 존재 하에서의 hSIRP α v2/v2를 발현하는 인간 대식세포에 의한 Raji 세포의 식세포 지수를 보여준다.

도 22는 SIRP α 및 CD47 상호작용을 차단하는 것에 대한 상이한 농도의 항-SIRP α 항체 035, 050 및 025의 차단 백분율 (%차단)을 보여준다.

도 23은 HDX-MS에 의해 측정된 바와 같은 항-SIRP α 항체 025c (도 23a), 042c (도 23b), 073c (도 23c), hu1H9G4 (도 23d), HEFLB (도 23e)의 잠재적인 결합 에피토프를 보여준다. 모든 항체는 S228P 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 키메라 항체이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0188] 본 개시내용의 하기 설명은 단지 본 개시내용의 다양한 실시양태를 예시하기 위해 의도된다. 따라서, 논의된 구체적 변형은 본 개시내용의 범주에 대한 제한으로서 해석되어서는 안된다. 본 개시내용의 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 등가물, 변화 및 변형이 이루어질 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 이러한 등가의 실시양태가 본원에 포함된다는 것이 이해된다. 공보, 특허 및 특허 출원을 비롯한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0189] 정의

[0190] 본원에 사용된 용어 "항체"는 특이적 항원에 결합하는 임의의 이뮤노글로불린, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다가 항체, 2가 항체, 1가 항체, 단일 도메인 항체, 다중-특이적 항체 또는 이중특이적 항체를 포함한다. 천연 무손상 IgG 항체는 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함한다. 포유동물 중쇄는 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 분류되고, 각각의 중쇄는 가변 영역 (V<sub>H</sub>) 및 제1, 제2 및 제3 불변 영역 (각각 C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub>)으로 이루어지고; 포유동물 경쇄는 λ 또는 κ로 분류되며, 각각의 경쇄는 가변 영역 (V<sub>L</sub>) 및 불변 영역으로 이루어진다. 항체는 "Y" 형상을 갖고, Y의 줄기는 디설피드 결합을 통해 함께 결합된 2개의 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역으로 이루어진다. Y의 각각의 아암은 단일 경쇄의 가변 및 불변 영역에 결합된 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다. 둘 다의 쇄 내의 가변 영역은 일반적으로 상보성 결정 영역 (CDR)으로 불리는 3개의 고도로 가변적인 루프를 함유한다 (경쇄 CDR은 L<sub>CDR1</sub>, L<sub>CDR2</sub>, 및 L<sub>CDR3</sub>을 포함하고, 중쇄 CDR은 H<sub>CDR1</sub>, H<sub>CDR2</sub>, H<sub>CDR3</sub>을 포함함). 본원에 개시된 항체 및 항원-결합 도메인에 대한 CDR 경계는 카바트(Kabat), IMG<sub>T</sub>, AbM, 코티아(Chothia), 또는 알-라지카니(Al-Lazikani)의 정의에 의해 정의 또는 확인될 수 있다 (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. and Lesk, A.M.,

J.Mol.Biol., 196,901 (1987); N. R. Whitelegg et al., Protein Engineering, v13(12), 819-824 (2000); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. et al., National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Marie-Paule Lefranc et al., Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003); Marie-Paule Lefranc et al., Immunome Research, 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells (second edition), chapter 26, 481-514, (2015)). 3개의 CDR은 CDR보다 더 고도로 보존되고 추가 변 루프를 지지하는 스캐폴드를 형성하는 프레임워크 영역 (FR)으로 공지된 플랭킹 스트레치 사이에 개재된다. 중쇄 및 경쇄의 불변 영역은 항원-결합에 수반되지 않지만, 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체는 그의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여 부류로 배정된다. 항체의 5가지 주요 부류 또는 이소형은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이며, 이는 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤 중쇄의 존재를 특징으로 한다. 주요 항체 부류 중 몇몇은 하위부류, 예컨대 IgG1 (감마1 중쇄), IgG2 (감마2 중쇄), IgG3 (감마3 중쇄), IgG4 (감마4 중쇄), IgA1 (알파1 중쇄) 또는 IgA2 (알파2 중쇄)로 나뉜다.

[0191] 본원에 사용된 용어 "항체"는 또한 단일 도메인 항체, 예컨대 중쇄 항체를 포괄할 수 있다. "중쇄 항체" 또는 "HCAb"는 2개의 VH 도메인을 함유하고 경쇄를 함유하지 않는 항체를 지칭한다 (Riechmann L. and Muyldermans S., J Immunol Methods. Dec 10;231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., J Biotechnol. Jun;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; 미국 특허 번호 6,005,079). 중쇄 항체는 원래 낙타과 (낙타, 단봉낙타 및 라마)로부터 유래되었다. 경쇄가 없지만, 낙타화 항체는 진정한 항원-결합 레퍼토리를 갖는다 (Hamers-Casterman C. et al., Nature. Jun 3;363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. et al., "Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation," Immunogenetics. Apr;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. et al. Immunology. May;109(1):93-101 (2003)). 중쇄 항체의 가변 도메인 (VHH 도메인)은 적응 면역 반응에 의해 생성된 가장 작은 공지된 항원-결합 단위를 나타낸다 (Koch-Nolte F. et al., FASEB J. Nov;21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007) ).

[0192] 본원에 사용된 용어 "항원-결합 도메인"은 1개 이상의 CDR을 포함하는 항체의 부분으로부터 형성된 항체 단편, 또는 항원에 결합하지만 무손상 천연 항체 구조를 포함하지 않는 임의의 다른 항체 단편을 지칭한다. 항원-결합 도메인의 예는 비제한적으로 디아바디, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv 단편, 디술피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디술피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), 단일-쇄 항체 분자 (scFv), scFv 이량체 (2가 디아바디), 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체를 포함한다. 항원-결합 도메인은 모 항체가 결합하는 동일한 항원에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항원-결합 도메인은 1종 이상의 상이한 인간 항체로부터의 프레임워크 영역에 그라프팅된 특정한 인간 항체로부터의 1개 이상의 CDR을 포함할 수 있다. 항원-결합 도메인의 보다 상세한 포맷은 문헌 [Spiess et al., 2015 (Supra), 및 Brinkman et al., mAbs, 9(2), pp.182-212 (2017)]에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0193] 본원에 사용된 용어 "식세포작용"은 형질막 외피 내로의 미립자 (>0.5 Dm)의 세포 흡수의 과정을 지칭한다. 식세포작용은 상이한 변형어, 예컨대 아포토시스 세포의 흡수를 수반하는 에페로시토시스, 감염 및 염증으로 인해 발생한 괴사성 세포의 흡수를 수반하는 네크로토시스 및 파이로토시스, 및 외인성 입자의 흡수를 수반하는 이형 포식을 포함한다.

[0194] 본원에 사용된 "항원"은 세포 배양물 (예컨대 하이브리도마)에 첨가되거나, 또는 동물 내로 주사 또는 흡수되거나, 또는 세포 표면 상에서 발견되는 조성물 (예컨대 암-특이적 단백질을 포함하는 것)을 포함한, 세포 배양물 또는 동물에서 항체의 생산 또는 면역 세포 (예를 들어, T 세포 또는 골수성 세포) 반응을 자극할 수 있는 화합물, 조성물, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 물질을 지칭한다. 항원은 특이적 체액성 또는 세포성 면역의 산물 (예컨대 항체)과 반응한다.

[0195] 항체와 관련하여 "Fab"는 디술피드 결합에 의해 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역에 결합된 단일 경쇄 (가변 및 불변 영역 둘 다)로 이루어진 항체의 부분을 지칭한다. "F(ab)<sub>2</sub>"는 Fab의 이량체를 지칭한다.

[0196] "Fab'"는 힌지 영역의 부분을 포함하는 Fab 단편을 지칭한다.

[0197] "F(ab')<sub>2</sub>"는 Fab'의 이량체를 지칭한다.

[0198] 항체와 관련하여 "어려운 단편 (Fd)"은 경쇄와 조합되어 Fab를 형성할 수 있는 중쇄 단편의 아미노-말단 절반을 지칭한다. 예를 들어, Fd 단편은 VH 및 CH1 도메인으로 이루어질 수 있다.

- [0199] 항체와 관련하여 "Fv"는 완전한 항원-결합 부위를 보유하는 항체의 가장 작은 단편을 지칭한다. Fv 단편은 단일 중쇄의 가변 영역에 결합된 단일 경쇄의 가변 영역으로 이루어진다. 2개의 도메인 사이의 회합이 도입된 디설피드 결합에 의해 증진되는, dsFv를 포함한 다수의 Fv 설계가 제공되었고; scFv는 단일 폴리펩티드로서 2개의 도메인을 함께 결합시키기 위해 펩티드 링커를 사용하여 형성될 수 있다. 상응하는 이뮤노글로불린 중쇄 또는 경쇄의 가변 및 불변 도메인과 회합된 이뮤노글로불린 중쇄 또는 경쇄의 가변 도메인을 함유하는 Fv 구축물이 또한 생산되었다. Fv는 또한 다량체화되어 디아바디 및 트리아바디를 형성한다 (Maynard et al., Annu Rev Biomed Eng 2 339-376 (2000)).
- [0200] "단일-쇄 Fv 항체" 또는 "scFv"는 직접적으로 또는 펩티드 링커 서열을 통해 서로 연결된 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역으로 이루어진 조작된 항체를 지칭한다 (Huston JS et al., Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988)). ScFv는 또한 다량체 구조 (이량체: "디아바디", 삼량체: "트리아바디", 사량체: "테트라바디")의 개발을 위한 기본 모듈로서의 역할을 할 수 있다.
- [0201] "디아바디" 또는 "dAb"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 포함하며, 여기서 단편은 동일한 폴리펩티드 쇠에서  $V_L$  도메인에 연결된  $V_H$  도메인 ( $V_H-V_L$  또는  $V_L-V_H$ )을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Holliger P. et al., Proc Natl Acad Sci USA, Jul 15;90(14):6444-8 (1993)]; EP404097; WO93/11161 참조). 동일한 쇠 상의 2개의 도메인 사이의 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 쇠의 상보적 도메인과 쌍형성하도록 강제되어, 2개의 항원-결합 부위를 생성한다. 항원-결합 부위는 동일하거나 상이한 항원 (또는 에피토프)을 표적화할 수 있다. 특정 실시양태에서, "이중특이적 ds 디아바디"는 2개의 상이한 항원 (또는 에피토프)을 표적화하는 디아바디이다.
- [0202] "dsFv"는 단일 경쇄의 가변 영역과 단일 중쇄의 가변 영역 사이의 연결이 디설피드 결합인 디설피드-안정화된 Fv 단편을 지칭한다. 일부 실시양태에서, "(dsFv)<sub>2</sub>" 또는 "(dsFv-dsFv)"는 3개의 펩티드 쇠를 포함한다: 펩티드 링커 (예를 들어 긴 가요성 링커)에 의해 연결되고 디설피드 가교를 통해 각각 2개의  $V_L$  모이어티에 결합된 2개의  $V_H$  모이어티. 일부 실시양태에서, dsFv-dsFv'는 각각의 디설피드 쌍형성된 중쇄 및 경쇄가 상이한 항원 특이성을 갖는 이중특이체이다.
- [0203] 본원에 사용된 용어 "가"는 주어진 분자에서의 명시된 수의 항원 결합 부위의 존재를 지칭한다. 용어 "1가"는 단지 1개의 단일 항원-결합 부위를 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭하고; 용어 "다가"는 다중 (즉, 1개 초과) 항원-결합 부위를 갖는 항체 또는 항원-결합 단편을 지칭한다. 따라서, 용어 "2가", "4가" 및 "6가"는 항원-결합 분자 내에 각각 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위 및 6개의 결합 부위가 존재하는 것을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 2가이다.
- [0204] "나노바디"는 중쇄 항체로부터의  $V_HH$  도메인 및 2개의 불변 도메인, CH2 및 CH3으로 이루어진 항체 단편을 지칭한다.
- [0205] "도메인 항체" 또는 "단일 도메인 항체" 또는 "sdAb"는 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 함유하는 항체 단편을 지칭한다. 특정 경우에, 2개 이상의  $V_H$  도메인은 펩티드 링커로 공유 연결되어 2가 또는 다가 도메인 항체를 생성한다. 2가 도메인 항체의 2개의  $V_H$  도메인은 동일하거나 상이한 항원을 표적화할 수 있다.
- [0206] 항체와 관련하여 "Fc"는 디설피드 결합을 통해 제2 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역에 결합된 제1 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역으로 이루어진 항체의 부분을 지칭한다. 항체의 Fc 부분은 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC), 보체 의존성 세포독성 (CDC) 및 식세포작용을 담당한다.
- [0207] 본원에 사용된 용어 "키메라"는 하나의 종으로부터 유래된 중쇄 및/또는 경쇄의 부분, 및 상이한 종으로부터 유래된 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지를 갖는 항체 또는 항원-결합 도메인을 의미한다. 예시적인 예에서, 키메라 항체는 인간으로부터 유래된 불변 영역 및 비-인간 동물, 예컨대 마우스로부터의 가변 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 예시적인 예에서, 키메라 항체는 인간으로부터 유래된 FR 영역 및 비-인간 동물, 예컨대 마우스로부터의 CDR 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-인간 동물은 포유동물, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양, 기니 피그 또는 햄스터이다.
- [0208] 본원에 사용된 용어 "인간화"는 항체 또는 항원-결합 도메인이 비-인간 동물로부터 유래된 CDR, 인간으로부터 유래된 FR 영역, 및 적용가능한 경우에, 인간으로부터 유래된 불변 영역을 포함하는 것을 의미한다.
- [0209] 용어 "작동가능하게 연결하다" 또는 "작동가능하게 연결된"은 2개 이상의 관심 생물학적 서열이 의도된 방식으로

로 기능하도록 허용하는 관계에 있도록 하는 방식으로 2개 이상의 관심 생물학적 서열을 스페이서 또는 링커 또는 개재 서열의 존재 또는 부재 하에 병렬배치하는 것을 지칭한다. 폴리펩티드와 관련하여 사용될 때, 이는 연결된 생성물이 의도된 생물학적 기능을 갖도록 하는 방식으로 폴리펩티드 서열이 연결된 것을 의미하는 것으로 의도된다. 예를 들어, 항체 가변 영역은 항원-결합 활성을 갖는 안정한 생성물을 제공하도록 불변 영역에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 또 다른 예로서, 항원-결합 도메인은 사이의 개재 서열의 존재 하에 또 다른 항원-결합 도메인에 작동가능하게 연결될 수 있고, 이러한 개재 서열은 스페이서일 수 있거나 또는 훨씬 더 긴 서열, 예컨대 항체의 불변 영역을 포함할 수 있다. 상기 용어는 또한 폴리뉴클레오티드와 관련하여 사용될 수 있다. 한 예에서, 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 조절 서열 (예를 들어, 프로모터, 인핸서, 사일렌서 서열 등)에 작동가능하게 연결된 경우에, 이는 폴리뉴클레오티드 서열이 폴리뉴클레오티드로부터 폴리펩티드의 조절된 발현을 허용하는 방식으로 연결된 것을 의미하는 것으로 의도된다.

[0210] 용어 "융합" 또는 "융합된"은 아미노산 서열 (예를 들어, 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질)과 관련하여 사용되는 경우에, 2개 이상의 아미노산 서열의, 예를 들어 화학적 결합 또는 재조합 수단에 의한, 단일 아미노산 서열로의 조합을 지칭한다. 융합 아미노산 서열은 2개의 코딩 폴리뉴클레오티드 서열의 유전자 재조합에 의해 생산될 수 있고, 재조합 폴리뉴클레오티드를 함유하는 구축물을 숙주 세포 내로 도입하는 방법에 의해 발현될 수 있다.

[0211] 본원에 사용된 "SIRP알파" 또는 "SIRP-알파"와 상호교환가능하게 사용되는 "SIRP α"는 주로 골수 세포 (예를 들어, 대식세포, 과립구, 골수 수지상 세포, 비만 세포 및 그의 전구체, 예컨대 조혈 줄기 세포 (HSC)), 수지상 세포에 의해 및 또한 줄기 세포 또는 뉴런에 의해 발현되는 신호 조절 단백질 (SIRP) 패밀리로부터의 조절 막단백질을 지칭한다. SIRP α의 구조는 세포의 도메인 및 세포질 도메인을 포함한다. SIRP α의 세포의 도메인은 막-원위 Ig 가변-유사 (IgV) 폴드, 및 2개의 막-근위 Ig 불변-유사 (IgC) 폴드로 이루어진다. SIRP α의 IgV 도메인은 CD47의 세포외 Ig-도메인의 결합을 담당한다. 특정 실시양태에서, SIRP α는 인간 SIRP α이다. 인간 SIRP α를 코딩하는 유전자는 다형성 유전자이고, 인간 집단에서 여러 변이체가 기재되었다. 가장 흔한 단백질 변이체는 SIRP α v1 및 SIRP α v2 (수탁 번호 NP\_542970 (P78324) 및 CAA71403)이다. 본원에 사용된 바와 같은 SIRP α는 다른 동물 종, 예컨대 특히 마우스, 및 시노몰구스로부터의 것일 수 있다. 무스 무스쿨루스(Mus musculus) (마우스) SIRP α 단백질의 예시적인 서열은 NCBI Ref Seq No. NP\_031573, 또는 BAA20376.1, 또는 BAA13521.1에 개시되어 있다. 시노몰구스 (원숭이) SIRP α 단백질의 예시적인 서열은 NCBI Ref Seq No. NP\_001271679에 개시되어 있다.

[0212] 본원에 사용된 "PD-L1"은 프로그램화된 세포 사멸 리간드 1 (PD-L1, 예를 들어 문헌 [Freeman et al., (2000) J. Exp. Med. 192:1027] 참조)을 지칭한다. 인간 PD-L1의 대표적인 아미노산 서열은 NCBI 수탁 번호: NP\_054862.1 하에 개시되고, 인간 PD-L1을 코딩하는 대표적인 핵산 서열은 NCBI 수탁 번호: NM\_014143.3 하에 제시된다. PD-L1은 태반, 비장, 림프절, 흉선, 심장, 태아 간에서 발현되고, 또한 많은 종양 또는 암 세포에서 발견된다. PD-L1은 활성화된 T 세포, B 세포 및 골수 세포 상에서 발현되는 그의 수용체 PD-1 또는 B7-1에 결합한다. PD-L1 및 그의 수용체의 결합은 신호 전달을 유도하여 시토카인 생산 및 T 세포 증식의 TCR-매개된 활성화를 억제한다. 따라서, PD-L1은 특정한 사건, 예컨대 임신, 자가면역 질환, 조직 동종이식편 동안 면역계를 억제하는 데 있어서 주요 역할을 하고, 종양 또는 암 세포가 면역학적 체크포인트를 회피하고 면역 반응을 회피하게 하는 것으로 여겨진다.

[0213] 본원에 사용된 "CLDN18"은 클라우딘18을 지칭하고, CLDN18.1 및 CLDN18.2를 포함한 그의 임의의 변이체, 세포에 의해 자연적으로 발현되거나 또는 CLDN18 유전자로 형질감염된 세포에 의해 발현되는 CLDN18의 입체형태, 이소형 및 중 상동체를 포함한다. 특정 실시양태에서, CLDN18은 인간 CLDN18이다. 본원에 사용된 CLDN18은 다른 동물 종, 예컨대 특히 인간, 마우스 및 시노몰구스로부터의 것일 수 있다. 용어 "CLDN18", "CLDN-18", "CLDN 18", "클라우딘18", "클라우딘-18", 또는 "클라우딘 18"은 본 개시내용에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 CLDN18은 CLDN18 단백질을 지칭한다.

[0214] "CLDN18.1"은 CLDN18의 스플라이스 변이체이고, 세포에 의해 자연적으로 발현되거나 또는 CLDN18.1 유전자로 형질감염된 세포 상에서 발현되는 CLDN18.1의 번역후 변형된 변이체, 이소형 및 중 상동체를 포함한다. 용어 "CLDN18.1", "CLDN-18.1", "CLDN 18.1", "클라우딘18.1", "클라우딘-18.1" 또는 "클라우딘 18.1"은 본 개시내용에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 CLDN18.1은 CLDN18.1 단백질을 지칭한다. 인간 CLDN18.1 단백질의 예시적인 서열은 NCBI Ref Seq No. NP\_057453.1에 개시되어 있다.

[0215] "CLDN18.2"는 CLDN18의 스플라이스 변이체이고, 세포에 의해 자연적으로 발현되거나 또는 CLDN18.2 유전자로 형

질감염된 세포 상에서 발현되는 CLDN18.2의 번역후 변형된 변이체, 이소형 및 중 상동체를 포함한다. 용어 "CLDN18.2", "CLDN-18.2", "CLDN 18.2", "클라우딘18.2", "클라우딘-18.2" 또는 "클라우딘 18.2"는 본 개시내용에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 사용된 CLDN18.2는 CLDN18.2 단백질을 지칭한다. 인간 CLDN18.2 단백질의 예시적인 서열은 NCBI Ref Seq No. NP\_001002026.1에 개시되어 있다.

[0216] 본원에 사용된 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다"는 2개의 분자 사이의, 예컨대 예를 들어 항체 또는 그의 항원-결합 도메인과 항원 사이의 비-무작위 결합 반응을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 분자 또는 항원-결합 도메인은 인간 SIRP α, 인간 클라우딘18.2 및/또는 인간 PD-L1에  $\leq 10^{-6}$  M (예를 들어,  $\leq 5 \times 10^{-7}$  M,  $\leq 2 \times 10^{-7}$  M,  $\leq 10^{-7}$  M,  $\leq 5 \times 10^{-8}$  M,  $\leq 2 \times 10^{-8}$  M,  $\leq 10^{-8}$  M,  $\leq 5 \times 10^{-9}$  M,  $\leq 4 \times 10^{-9}$  M)의 결합 친화도 ( $K_D$ )로 특이적으로 결합한다. 본원에 사용된  $K_D$ 는 해리율 대 회합율의 비 ( $k_{off}/k_{on}$ )를 지칭하며, 이는 표면 플라즈몬 공명 방법, 마이크로스케일 열영동 방법, HPLC-MS 방법 및 유동 세포측정법 (예컨대 FACS) 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지된 임의의 통상적인 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 특정 실시양태에서,  $K_D$  값은 유동 세포측정법을 사용함으로써 적절하게 결정될 수 있다.

[0217] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 상의 원자 또는 아미노산의 특정 기를 지칭한다. 에피토프는 인접 아미노산 (선형 또는 순차적 에피토프로도 불림) 또는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병렬배치된 비인접 아미노산 (배위 또는 입체형태적 에피토프로도 불림) 둘 다로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 단백질 상의 1차 아미노산 잔기를 따라 선형적으로 배열되고, 인접 아미노산의 작은 절편은 항원 결합으로부터 소화되어 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자와 결합하거나 또는 변성 용매에의 노출에 유지될 수 있는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매로의 처리 시 상실된다. 에피토프는 전형적으로 고유한 공간 입체형태로 적어도 3개, 보다 통상적으로 적어도 5, 약 7, 또는 약 8-10개의 아미노산을 포함한다. 2종의 항체는 이들이 항원에 대해 경쟁적 결합을 나타내는 경우에 항원 내의 동일하거나 밀접하게 관련된 에피토프에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항원-결합 도메인이 항원에 대한 참조 항체의 결합을 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 차단하는 경우에, 항체 또는 항원-결합 도메인은 참조 항체와 동일한/밀접하게 관련된 에피토프에 결합하는 것으로 간주될 수 있다.

[0218] 본원에 사용된 용어 "아미노산"은 각각의 아미노산에 특이적인 측쇄와 함께 아민 (-NH<sub>2</sub>) 및 카르복실 (-COOH) 관능기를 함유하는 유기 화합물을 지칭한다. 아미노산의 명칭은 또한 본 개시내용에서 표준 단일 문자 또는 3-문자 코드로서 나타내어지며, 이는 하기와 같이 요약된다.

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

[0219]

- [0220] 아미노산 서열과 관련하여 "보존적 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 생리화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 상이한 아미노산 잔기로 대체하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 보존적 치환은 소수성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 Met, Ala, Val, Leu 및 Ile) 중에서, 중성 친수성 측쇄를 갖는 잔기 (예를 들어 Cys, Ser, Thr, Asn 및 Gln) 중에서, 산성 측쇄를 갖는 잔기 (예를 들어 Asp, Glu) 중에서, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어 His, Lys 및 Arg) 중에서, 또는 방향족 측쇄를 갖는 잔기 (예를 들어 Trp, Tyr 및 Phe) 중에서 이루어질 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 보존적 치환은 통상적으로 단백질 입체형태적 구조에서 유의한 변화를 유발하지 않고, 따라서 단백질의 생물학적 활성을 보유할 수 있다.
- [0221] 본원에 사용된 용어 "상동체" 및 "상동"은 상호교환가능하고, 최적으로 정렬된 경우에 또 다른 서열에 대해 적어도 80% (예를 들어, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%)의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열 (또는 그의 상보적 가닥) 또는 아미노산 서열을 지칭한다.
- [0222] 아미노산 서열 (또는 핵산 서열)과 관련하여 "퍼센트 (%) 서열 동일성"은, 서열을 정렬하고 필요한 경우에 갭을 도입하여 동일한 아미노산 (또는 핵산)의 최대 수를 달성한 후, 참조 서열 내의 아미노산 (또는 핵산) 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 (또는 핵산) 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 잔기의 보존적 치환은 동일한 잔기로서 고려될 수 있거나 또는 고려되지 않을 수 있다. 퍼센트 아미노산 (또는 핵산) 서열 동일성을 결정하기 위한 목적의 정렬은, 예를 들어 공중 이용가능한 도구, 예컨대 BLASTN, BLASTP (미국 국립 생물 정보 센터 (NCBI)의 웹사이트 상에서 이용가능함, 또한 문헌 [Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Stephen F. et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)] 참조), ClustalW2 (유럽 생물정보학 연구소의 웹사이트 상에서 이용가능함, 또한 문헌 [Higgins D.G. et al., Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al., Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)] 참조), 및 ALIGN 또는 메갈라인(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 도구에 의해 제공되는 디폴트 파라미터를 사용할 수 있거나, 또는 예컨대 예를 들어 적합한 알고리즘을 선택함으로써 정렬에 적절한 파라미터를 맞춤화할 수 있다.
- [0223] 본원에 사용된 용어 "골수 세포"는 신체의 혈액, 골수, 다른 조혈 또는 다른 비-조혈 구획에서 발견되는 정상 또는 신생물성 세포를 지칭한다. 특히, 용어 "골수 세포"는 단핵구 (대식세포 및 수지상 세포를 생성함), 다형 핵 호중구, 호산구, 호염기구 및 비만 세포를 포함한, 골수로부터 기원한 세포 계통, 뿐만 아니라 단핵구/대식 세포 계통 및 상이한 수지상 세포 계통을 의미하는 것으로 본원에 사용된다. 상기 용어는 그의 분화의 모든 단계에서의 골수계의 세포를 지칭하고, 따라서 조혈 모세포, 즉 골수 세포 계통으로 수입되지만 분화의 초기 단계에 있는 조혈 세포를 포함한다. 예는 특히 골수모세포이다. 용어 "골수 세포"는 또한 골수 전구 세포, 즉, 골수단핵구성 전구 세포, 전적모구 또는 미성숙 거핵모구와 같은 세포에서 분화할 수 있는, 예를 들어 골수의 세포 계통을 포함한다. 본원에 사용된 상태의 "치료하는" 또는 "치료"는 상태의 예방 또는 완화, 상태의 발병 또는 발생 속도의 둔화, 상태의 발생 위험의 감소, 상태와 연관된 증상의 발생의 예방 또는 지연, 상태와 연관된 증상의 감소 또는 종료, 상태의 완전 또는 부분 퇴행의 생성, 상태의 치유, 또는 그의 일부 조합을 포함한다.
- [0224] 본원에 사용된 용어 "대상체" 또는 "개체" 또는 "동물" 또는 "환자"는 질환 또는 장애의 진단, 예후, 호전, 예방 및/또는 치료를 필요로 하는 포유동물 또는 영장류를 비롯한 인간 또는 비-인간 동물을 지칭한다. 포유동물 대상체는 인간, 가축, 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대 개, 고양이, 기니 피그, 토끼, 래트, 마우스, 말, 돼지, 소, 곰 등을 포함한다.
- [0225] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 그러한 단백질의 발현이 이루어지도록 작동가능하게 삽입될 수 있는 비히클을 지칭한다. 벡터는 숙주 세포를 형질전환, 형질도입 또는 형질감염시켜 숙주 세포 내에서 그것이 운반한 유전 요소의 발현이 이루어지게 하는 데 사용될 수 있다. 벡터의 예는 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 및 인공 염색체, 예컨대 효모 인공 염색체 (YAC), 박테리아 인공 염색체 (BAC), 또는 P1-유래 인공 염색체 (PAC), 박테리오파지, 예컨대 람다 파지 또는 M13 파지, 및 동물 바이러스를 포함한다. 벡터로서 사용되는 동물 바이러스의 카테고리는 레트로바이러스 (렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스 (예를 들어, 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 마클로바이러스, 유두종바이러스 및 파포바이러스 (예를 들어, SV40)를 포함한다. 벡터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선택 요소, 및 리포터 유전자를 비롯하여, 발현을 제어하기 위한 다양한 요소를 함유할 수 있다. 또한, 벡터는 복제 기점을 함유할 수 있다. 벡터는 또한 바이러스 입자, 리포솜 또는 단백질 코팅을 포함하나 이에 제한되는 것은, 세포 내로의 그의 진입을 보조하는 물질을 포함할 수 있다. 벡터는 발현 벡터 또는 클로닝 벡터일 수 있다.

- [0226] 본원에 사용된 어구 "숙주 세포"는 외인성 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터가 도입된 세포를 지칭한다.
- [0227] "종양"과 상호교환가능하게 본원에 사용된 "암"은 악성 세포 성장 또는 신생물, 비정상적 증식, 침윤 또는 전이를 특징으로 하는 임의의 의학적 상태를 지칭하며, 고형 종양 및 비-고형 암 (혈액 악성종양), 예컨대 백혈병 등 다를 포함한다. 본원에 사용된 "고형 종양"은 신생물성 및/또는 악성 세포의 고형 덩이를 지칭한다. 암 또는 종양의 예는 혈액 악성종양, 구강 암종 (예를 들어 구순, 설 또는 인두의 암종), 소화 기관 (예를 들어 식도, 위, 소장, 결장, 대장, 또는 직장), 복막, 간 및 담로, 췌장, 호흡기계 예컨대 후두 또는 폐 (소세포 및 비소세포), 골, 결합 조직, 피부 (예를 들어, 흑색종), 유방, 생식 기관 (난관, 자궁, 자궁경부, 고환, 난소, 또는 전립선), 요로 (예를 들어, 방광 또는 신장), 뇌 및 내분비선 예컨대 갑상선을 포함한다. 특정 실시양태에서, 암은 난소암, 유방암, 두경부암, 신암, 방광암, 간세포성암 및 결합조직암으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 암은 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종 및 B-세포 림프종으로부터 선택된다.
- [0228] 용어 "제약상 허용되는"은 지정된 담체, 비히클, 희석제, 부형제(들) 및/또는 염이 일반적으로 제제를 구성하는 다른 성분과 화학적으로 및/또는 물리적으로 상용성이고, 그의 수용자와 생리학상 상용성인 것을 나타낸다.
- [0229] A. 다중-특이적 분자
- [0230] 한 측면에서, 본 개시내용은 SIRP-알파 결합 도메인, 활성화 수용체-결합 도메인 및 표적 항원 결합 도메인을 포함하는 다중-특이적 분자를 제공한다. 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 1) 활성화 수용체 (예를 들어, 식세포 상에서 발현된 Fc $\gamma$ R), 2) 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원, 및 3) 면역 이펙터 세포 (예를 들어, 식세포, 예컨대 단핵구 또는 대식세포) 상에서 발현된 SIRP알파에 결합할 수 있도록 구성된다. 표적 항원은, 예를 들어, 종양 표면 항원, 염증 항원, 또는 감염성 미생물의 항원일 수 있다.
- [0231] 어떠한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, SIRP-알파 결합 도메인 및 활성화 수용체-결합 도메인은 면역 이펙터 세포 (예를 들어, 식세포) 상의 SIRP-알파 및 활성화 수용체와의 가교, 및 이어서 표적-항원 결합 도메인과 표적 세포 상의 표적 항원 사이의 상호작용을 통한 표적 세포와의 가교에 의해 결속되어 다중 활성화 신호를 제공할 수 있는 것으로 여겨진다. 이러한 설계는 면역 이펙터 세포의 활성화 및 활성화된 면역 이펙터 세포의 표적 미세환경으로의 결속 또는 동원을 가능하게 하여 표적 세포 (예를 들어, 암 세포, 감염된 세포, 또는 손상된 또는 질환 세포)의 식세포작용 및 사멸을 촉발한다. 따라서, 본 개시내용의 다중-특이적 분자는 또한 다중-특이적 대식세포 결속체로 불린다. 본원에 제공된 결속체는 특히 원치않는 세포 (예컨대 암 세포)를 선택적으로 제거하는 한편, 정상 세포는 심지어 CD47을 발현하는 세포의 경우에도 대식세포의 식세포작용에 의해 표적화되지 않을 것이라는 점에서 유리하다. 따라서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 정상 세포에 비해 비정상적 세포를 제거하는 데 있어서 높은 선택성을 나타내고, 따라서 예를 들어 암 치료에서 감소된 부작용, 보다 낮은 독성 및 높은 안전성을 갖는다.
- [0232] 어떠한 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 암 치료에서, SIRP-알파 및/또는 활성화 수용체 (예를 들어, Fc $\gamma$ R)의 활성화는 종양 연관 대식세포 (TAM)를 종양발생촉진 상태로부터 항종양발생 상태로 재지시한다. 따라서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자 또는 결속체의 설계는 또한 종양 미세환경에 이전에 존재하고/거나 새로이 동원된 종양 연관 대식세포 (TAM)를 재지시하여 암 사멸을 증진시키는 것을 가능하게 한다. 다시 말해서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자/다중-특이적 대식세포 결속체는, 면역억제 및 TAM이 되는 것과 대조적으로, 암 세포를 효과적이고 특이적으로 사멸시킬 수 있는 단핵구 또는 대식세포를 촉진하거나 유지시킬 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 또한 TAM을 항종양 대식세포로 재지시하여 암 세포의 식세포작용을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0233] 암에서, 면역억제 환경의 확립에 기여하는 종양 미세환경이 존재한다. 종양 미세환경은 악성종양으로의 이행 동안 종양 세포와 함께 진화하고 그에 대한 지지를 제공하는 세포의 복잡한 생태환경이다 (Noy et al., Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy, *Immunity*. 2014 July 17; 41(1): 49-61.). IL-10, 글루코코르티코이드 호르몬, 아포토시스 세포, 및 면역 복합체와 같은 인자는 선천성 면역 세포 기능을 방해할 수 있다.
- [0234] 성숙 대식세포를 생성하는 단핵구는 수많은 인자에 의해 유인될 수 있고, 종양 미세환경으로 이동할 수 있으며, 여기서 이들 단핵구의 대다수는 TAM으로 분화할 수 있다 (Zhou et al., (2020) Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Front. Oncol.* 10:188). 종양 미세환경 내에 존재하는 대식세포는 또한 이들 대식세포가 종양-촉진 TAM으로 분화되도록 종양 미세환경에서 다양한 인자에 의해 재분극화될 수 있다.
- [0235] TAM은 주로 대안적으로 활성화된 대식세포 (M2 표현형) 및 작은 분획의 전형적으로 활성화된 대식세포 (M1 표현

형)를 포함한다 (Zhou et al., (2020) Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. Front. Oncol. 10:188). M1 표현형을 갖는 대식세포는 강력하고, 병원체 또는 암 세포를 사멸시킬 수 있다. M2 표현형을 갖는 대식세포는 종양 세포를 식세포하는 기능이 결여되어 있고, 또한 이들 종양 세포가 사멸로부터 벗어나는 것을 돕고, 이들이 다른 조직 및 기관으로 확산되는 것을 돕는다 (Zhou et al., (2020) Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. Front. Oncol. 10:188).

- [0236] 본원에 제공된 결속체의 SIRP-알과 결합 도메인은 CD47-SIRP알과 축 신호전달에 의해 매개되는 대식세포의 식세포작용의 하향조절을 억제할 수 있다. 암 세포는 전형적으로 면역 세포 (예를 들어, 단핵구 또는 대식세포) 상에서 발현되는 SIRP알과에 결합하는 CD47을 과다발현하여, 암 세포가 면역 세포 (예를 들어, 단핵구 또는 대식세포)에 의해 제거되는 것을 방지하는 "나를 먹지 말라"는 신호를 도출한다. 따라서, CD47-SIRP알과 축의 억제는 암 세포 매개된 항-식세포작용 활성을 상쇄시킬 수 있다.
- [0237] 본원에 제공된 SIRP-알과 결합 도메인은 CD47-SIRP알과 상호작용을 차단하고/거나 CD47-SIRP알과 상호작용에 의해 매개되는 하류 신호전달 (예를 들어, SHP-1 신호전달)을 차단함으로써 CD47-SIRP알과 축 신호전달을 억제할 수 있다. 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 SIRP알과 차단제, 예컨대 SIRP알과를 인식하여 이에 결합하는 CD47의 세포외 도메인 (ECD), 또는 SIRP알과를 인식하여 이에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 도메인을 포함할 수 있다.
- [0238] 보다 바람직한 실시양태에서, SIRP알과를 인식하고 이에 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 도메인은 하기 특성 중 1종 이상을 갖는다: 1) SIRP-알과와 CD47 사이의 상호작용을 실질적으로 또는 완전히 차단할 수 있음; 2) SIRP-알과와 CD47 사이의 상호작용에 의해 매개되는 SHP-1 동원을 실질적으로 또는 완전히 차단할 수 있음; 3) 단핵구 또는 대식세포의 식세포작용을 유도하는 최소의 내인성 활성을 가짐; 및 4) SIRP $\alpha$ 의 IgV 도메인 외부의 에피토프에 결합할 수 있음.
- [0239] 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 표적 항원 결합 도메인을 추가로 포함한다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "표적 항원 결합 도메인"은 표적 항원에 대한 임의의 결합 도메인을 포괄한다. 용어 "표적 항원"은 종양 항원 또는 감염된 세포 상에 제시된 항원을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 표적 항원을 발현하는 세포를 다른 세포와 구별할 수 있게 하는 임의의 세포 표면 마커를 지칭한다.
- [0240] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 면역 이펙터 세포 (SIRP-알과 및 활성화 수용체를 공동-발현함)의 이펙터 기능을 표적 항원의 존재 하에 선택적으로 유도한다.
- [0241] 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 비-표적 세포에 비해 표적 세포에 대한 선택적 반응을 개시하기 위해 면역 이펙터 세포에 결합하여 이를 활성화시킬 수 있다.
- [0242] 특정 실시양태에서, 표적 세포는 표적 항원을 발현한다. 특정 실시양태에서, 표적 세포는 표적 항원 및 CD47을 공동-발현한다.
- [0243] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 표적 항원의 부재 하에는 면역 이펙터 세포의 최소 이펙터 기능을 유도한다. 이펙터 기능과 관련하여 본원에 사용된 용어 "최소"는 이소형 대조군에 의해 유도되는 이펙터 기능과 대등한 이펙터 기능의 수준을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 표적 항원의 부재 하에 본원에 제공된 다중-특이적 분자에 의해 유도되는 이펙터 기능은 표적 항원의 존재 하에 유도되는 이펙터 기능의 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 이하이다.
- [0244] 본 개시내용의 다중-특이적 분자 또는 결속체는 또한 결속체가 다중 표적과 모듈식으로 및 병용으로 결속하는 것을 보조하는 추가의 구조를 포함한다. 추가의 구조는, 예를 들어 연결 및 분리시켜 공간적 근접성 및 가요성을 실현할 2개 이상의 결합 도메인에 대한 연결 요소, 예컨대 링커, 동족 펩티드 또는 화학적 결합이다.
- [0245] 본원에 제공된 보다 고차의 다중-특이적 대식세포 결속체 내로의 상기 기재된 추가의 구조의 혼입은 결속체의 생산, 폴딩, 안정성, 기능 및 조직 이용가능성을 보조한다.
- [0246] i. SIRP $\alpha$ -결합 도메인
- [0247] 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 SIRP $\alpha$ -결합 도메인은 SIRP-알과와 CD47 사이의 상호작용을 실질적으로 차단할 수 있다.
- [0248] 2개의 상호작용하는 분자 사이의 "상호작용을 실질적으로 차단한다"는 것은 항체가 2개의 상호작용하는 분자 사이의 결합을 적어도 50% 억제할 수 있다는 것, 또는 2개의 분자의 상호작용에 의해 유도되는 신호 전달을 적어

도 40% 억제할 수 있다는 것을 의미한다. SIRP-알파와 CD47 사이의 상호작용에 의해 유도되는 신호 전달은 SIRP-알파의 세포내 부분 (예를 들어, C-말단 꼬리)으로의 SHP1 동원을 특징으로 할 수 있다.

- [0249] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 SIRP  $\alpha$ -결합 도메인은 SIRP-알파와 CD47 사이의 상호작용을 완전히 차단할 수 있다. 2개의 상호작용하는 분자와 관련하여 어구 "완전히 차단한다"는 2개의 상호작용하는 분자 사이의 결합의 적어도 80% 억제, 또는 2개의 분자의 상호작용에 의해 유도되는 신호 전달의 적어도 50% 억제를 의미한다.
- [0250] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 SIRP  $\alpha$ -결합 도메인은, SIRP  $\alpha$ -CD47 상호작용을 완전히 차단함으로써 또는, SIRP  $\alpha$ -CD47 상호작용에 대한 그의 차단 효과와 관계없이, SIRP  $\alpha$ -CD47 상호작용 매개되는 하류 신호전달 (예를 들어, SHP-1 동원)을 완전히 차단함으로써, 식세포작용을 억제하는 SIRP  $\alpha$ 에 대한 CD47의 결합에 의해 전달되는 "나를 먹지 말라"는 신호를 완전히 차단할 수 있다. SIRP-알파와 CD47 사이의 상호작용을 완전히 차단할 수 있는 SIRP-알파 항체는 또한 본원에서 완전 차단제로 지칭된다.
- [0251] SIRP-알파와 CD47 사이의 결합 상호작용의 차단은 임의의 적합한 검정, 예를 들어 경쟁적 ELISA 또는 경쟁적 FACS 검정에 의해 결정될 수 있다. 간략하게, 경쟁적 ELISA를 위해, SIRP-알파의 가용성 세포외 도메인 (ECD)을 기질 상에 고정시킬 수 있고, 특정 농도의 CD47의 가용성 ECD가 SIRP-알파의 고정된 ECD에 결합하는 것을 차단하는 능력에 대해 상이한 농도에서 시험 SIRP-알파 항체를 시험할 수 있다. SIRP-알파의 고정된 ECD에 대한 CD47의 ECD의 결합을 각각 시험 SIRP-알파 결합 도메인의 부재 및 존재 하에 결정할 수 있다. 시험 SIRP-알파 결합 도메인의 존재 하에서의 CD47 및 SIRP-알파의 결합의 감소를 결정할 수 있고, 따라서 차단 백분율을 결정할 수 있다.
- [0252] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 특정 항-SIRP  $\alpha$  결합 도메인은 경쟁적 ELISA 검정에 의해 측정 시 90% 초과 의 최대 차단 백분율을 갖는다. 검정 조건은 본 개시내용의 실시예 12에 제공된 것과 유사할 수 있다 (CD47의 가용성 ECD의 농도는 25nM이고, SIRP  $\alpha$ 의 가용성 ECD의 농도는 20nM임). 본원에 제공된 바와 같은 예시적인 완전 차단제는 C15, C25, C42, C59, C73 및 그의 인간화 항체로부터 유래된 항-SIRP  $\alpha$  결합 도메인이다.
- [0253] "최고 차단 백분율"과 상호교환가능하게 사용되는 용어 "최대 차단 백분율"은 증가하는 농도의 차단제 (예를 들어, SIRP  $\alpha$ -결합 도메인)의 존재 하에서의 2개의 단백질 (예를 들어, SIRP-알파 및 CD47) 사이의 상호작용의 차단 백분율의 플래토를 지칭한다. 일반적으로, 차단 백분율은 SIRP-알파 결합 도메인의 농도의 증가에 따라 상승할 수 있지만, SIRP-알파 결합 도메인의 농도의 추가의 증가에도 불구하고 더 이상의 차단이 달성될 수 없는 플래토에 도달할 수 있다. 최대 차단 백분율은 상이한 검정, 예컨대 경쟁적 ELISA 검정 및 경쟁적 FACS 검정에 따라 달라질 수 있다.
- [0254] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 특정 항-SIRP  $\alpha$  결합 도메인은 경쟁적 ELISA 검정에 의해 측정 시 10% 이하 의 최대 차단 백분율의 최대 차단 백분율을 갖는다. 검정 조건은 본 개시내용의 실시예 12에 제공된 것과 유사할 수 있다 (CD47의 가용성 ECD의 농도는 25nM이고, SIRP  $\alpha$ 의 가용성 ECD의 농도는 20nM임). 본원에 제공된 바와 같은 예시적인 비-차단제는 C50 및 그의 인간화 항체이다. 이러한 SIRP-알파 항체는 본원에서 비-차단제로도 지칭된다.
- [0255] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 특정 항-SIRP  $\alpha$  항체는 경쟁적 ELISA 검정에 의해 측정 시 50% 이하의 최대 차단 백분율의 최대 차단 백분율을 갖는다. 검정 조건은 본 개시내용의 실시예 12에 제공된 것과 유사하다. 이러한 SIRP-알파 항체는 본원에서 부분-차단제로도 지칭된다. 본원에 제공된 바와 같은 예시적인 부분 차단제는 C35 및 그의 인간화 항체이다.
- [0256] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 SIRP  $\alpha$ -결합 도메인은 표적 세포에 대한 면역 이펙터 세포의 이펙터 기능을 유도하는 최소 내인성 활성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 표적 세포는 SIRP-알파 매개된 이펙터 기능, 예컨대 식세포작용에 의해 제거될 필요가 있는 종양 세포 또는 암성 세포, 감염된 세포, 또는 특정 질환 세포 유형이다. SIRP  $\alpha$ -결합 도메인과 관련하여 본원에 사용된 용어 "내인성 활성"은 표적 항원 결합 도메인의 부재 하에 특정 표적 항원 및 CD47을 공동-발현하는 표적 세포 상에서 면역 이펙터 세포의 식세포작용을 유도하는 SIRP  $\alpha$ -결합 도메인의 능력을 지칭한다. 특정 실시양태에서, SIRP  $\alpha$ -결합 도메인은 표적 세포에 대해 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하의 식세포작용을 유도한다. 식세포작용을 유도하는 내인성 활성과 관련하여 본원에 사용된 용어 "최소"는 이소형 대조군에 의해 유도되는 식세포작용의 수준과 대등한 SIRP-알파 결합 도메인의 내인성 활성에 의해 유도되는 식세포작용의 수준을 지칭한다. 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인 단독 또는 SIRP-알파 결합 도메인 단독을 포함하는 분자에 의해 유도되는 식세포작용은 본원에 제공된 결속체에

의해 유도되는 식세포작용의 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 이하이다.

- [0257] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 SIRP  $\alpha$ -결합 도메인은 항체 도메인 또는 항체 모방체 도메인을 포함한다.
- [0258] 본원에 사용된 용어 "항체 도메인"은 항체로부터 유래된 항원-결합 도메인을 지칭하고, 적어도 1개의 항체 단편 (예컨대 CDR, 및/또는 가변 영역 서열)을 포함한다. 항체 도메인은, 예를 들어 모노클로날 항체, 항체 단편 또는 도메인, 항체 단편 또는 도메인을 포함하는 융합 단백질, 항체 단편 또는 도메인을 포함하는 폴리펩티드 복합체 등을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 도메인은 Fab, VH, 단일 쇠 Fv (scFv), 디아바디, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv 단편, 디숄피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디숄피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), F(ab)<sub>2</sub>, scFv 이량체 (2가 디아바디), 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 테트라바디, 도메인 항체, 또는 2가 도메인 항체를 포함한다.
- [0259] 본원에 사용된 용어 "항체 모방체 도메인"은 항체와 유사한 방식으로 거동하지만 (예를 들어, 항체와 유사하게 항원에 특이적으로 결합할 수 있지만), 면역계에 의해 생성되지도 않고 항체와 구조적으로 관련되지도 않은 인공 펩티드 또는 화합물을 지칭한다. 용어 "항체 모방체 도메인"은 또한, 특이적 표적에 결합할 수 있고 단백질 조작 전략을 통해 새로운 결합 부위를 혼입하도록 설계될 수 있는,  $\alpha$ -나선,  $\beta$ -시트 또는 랜덤 코일을 포함하는 비관련 단백질 스캐폴드를 지칭할 수 있다.
- [0260] 특정 실시양태에서, SIRP  $\alpha$ -결합 도메인은 인트라바디 (예를 들어, 피브로넥틴 도메인), 모노바디, 선형 펩티드, 단백질 A의 Z 도메인 (아피바디), 감마-B 결정질 도메인, 유비퀴틴 도메인, 시스타틴 도메인, Sac7d 도메인, 삼중 나선 코일드 코일 도메인, 리포칼린 도메인, 막 수용체의 A 도메인, 안키린 반복 모티프, Fyn의 SH3 도메인, 프로테아제 억제제의 쿠니츠 도메인, 피브로넥틴의 유형 III 도메인 (미니바디), DARP인 도메인, 또는 탄수화물 결합 모듈 32-2를 포함하는 항체 모방체 도메인이다.
- [0261] 특정 실시양태에서, SIRP  $\alpha$ -결합 도메인은 C25, hu025.021, hu025.033, hu025.023, hu025.059, hu025.060, C15, C42, C59 및 C73으로 이루어진 군으로부터 선택된 항-SIRP  $\alpha$  항체의 1개 이상 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 CDR 서열을 포함한다.
- [0262] 본원에 사용된 "C25" 또는 "025c"는 서열식별번호: 1의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 2의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 지칭한다.
- [0263] 본원에 사용된 "hu025.021"은 서열식별번호: 3의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 4의 경쇄 가변 영역을 포함하는 C25에 기초한 인간화 항체를 지칭한다.
- [0264] 본원에 사용된 "hu025.023"은 서열식별번호: 5의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 6의 경쇄 가변 영역을 포함하는 C25에 기초한 인간화 항체를 지칭한다.
- [0265] 본원에 사용된 "hu025.033"은 서열식별번호: 159의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 160의 경쇄 가변 영역을 포함하는 C25에 기초한 인간화 항체를 지칭한다.
- [0266] 본원에 사용된 "hu025.059"는 서열식별번호: 7의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 8의 경쇄 가변 영역을 포함하는 C25에 기초한 인간화 항체를 지칭한다.
- [0267] 본원에 사용된 "hu025.060"은 서열식별번호: 9의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10의 경쇄 가변 영역을 포함하는 C25에 기초한 인간화 항체를 지칭한다.
- [0268] 본원에 사용된 "C15" 또는 "015c"는 서열식별번호: 11의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 지칭한다.
- [0269] 본원에 사용된 "C42" 또는 "042c"는 서열식별번호: 13의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 14의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 지칭한다.
- [0270] 본원에 사용된 "C59" 또는 "059c"는 서열식별번호: 15의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 16의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 지칭한다.
- [0271] 본원에 사용된 "C73" 또는 "073c"는 서열식별번호: 17의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 18의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 지칭한다.
- [0272] 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 SIRP알과 결합 도메인은 항-SIRP알과 항체로부터 수득될 수 있고, 그의 가변

영역 및 CDR의 아미노산 서열은 하기 표 1-2에 제시된다.

[0273] 표 1. 항-SIRP α 항체에 대한 가변 영역의 아미노산 서열 (CDR은 밑줄표시됨).

항체	VH	VL
C25	C25.VH, SEQ ID NO: 1: EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGFNIKDYMHVVKQR TEQGLEWIGRIDPEDGETKYA PKFQGKATITADTSSNTAYLQ LSSLTSEDTAVYYCDRGLAY WGQGTLVTVSA	C25.VL, SEQ ID NO: 2: QIVLTQSPAIMASAPGEKVTL TCSASSVSSSYLYWYQQKP GSSPKLWIYSTSNLASGVPA RFSGSGSGTYSYLTSSMEAE DAASYFCHQWSSYPYTFGG GTKLEIK
hu025.021	hu025.021.VH, SEQ ID NO: 3: EVQLVQSGAEVKKPGATVKIS CKVSGFNIKDYMHVWVQQA PGKGLEWIGRIDPEDAETKYA PKFQGRVTITADTSTNTAYME LSSLRSEDTAVYYCDRGLAY WGQGTLVTVSS	hu025.021.VL, SEQ ID NO: 4: EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCSASSVSSSYLYWYQQKP GQAPKLWIYSTSNLASGIPA RFSGSGSGTDYTLTSSLEPE DFAVYYCHQWSSYPYTFGG GTKLEIK
hu025.023	hu025.023.VH, SEQ ID NO: 5: EVQLVQSGAEVKKPGATVKIS CKVSGFNIKDYMHVWVQQA PGKGLEWIGRIDPEDAETKYA PKFQGRVTITADTSTNTAYME LSSLRSEDTAVYYCDRGLAY WGQGTLVTVSS	hu025.023.VL, SEQ ID NO: 6: EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCSASSVSSSYLYWYQQKP GQAPKLWIYSTSNLASGIPA RFSGSGSGTDFTLTSSLEPE DFAVYYCHQWSSYPYTFGG GTKLEIK
hu025.033	SEQ ID NO: 159 EVQLVQSGAEVKKPGATVKIS CKVSGFNIKDYMHVWVQQA PGKGLEWIGRIDPEDAETKYA PKFQGRVTITADTSTDYAYME LSSLRSEDTAVYYCDRGLAY WGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 160 EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCSASSVSSSYLYWYQQKP GQAPKLWIYSTSNLASGIPA RFSGSGSGTDYTLTSSLEPE DFAVYYCHQWSSYPYTFGG GTKLEIK
hu025.059	hu025.059.VH, SEQ ID NO: 7: EVQLVQSGAEVKKPGATVKIS CKASGFNIKDYMHVWVQQA PGKGLEWIGRIDPEDAETKYA	hu025.059.VL, SEQ ID NO: 8: EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCSASSVSSSYLYWYQQKP GQAPKLWIYSTSNLASGIPA

[0274]

	PKFQGRVTITADTSTNTAYME LSSLRSEDNAVYYCDRGLAY WGQGLTVTVSS	RFGSGSGTDYTLTISSLEPE DFAVYYCHQWSSYPYTFGQ GTKLEIK
hu025.060	hu025.060.VH, SEQ ID NO: 9: EVQLVQSGAEVKKPGATVKIS CKASGFNIKDYMHVWVQQA PGKGLEWIGRIDPEDAETKYA PKFQGRVTITADTSTNTAYME LSSLRSEDNAVYYCDRGLAY WGQGLTVTVSS	hu025.060.VL, SEQ ID NO: 10: EIVLTQSPATLSLSPGERATL SCSASSVSSSYLYWYQQKP GQAPKLWIYSTSNLASGIPA RFGSGSGTDFTLTISSLEPE DFAVYYCHQWSSYPYTFGQ GTKLEIK
C15	C15.VH, SEQ ID NO: 11: EVQLQQSGVEVVQPGASVKL SCTASGFNIEAYMHVWKQR TEQGLEWIGRIDPEDGESKYA PKFQGRVTITADTSSSTAYL QLSSLTSDDTAVYYCVRGSYE YWGQGTLLTVSS	C15.VL, SEQ ID NO: 12: QIVLTQSPAIMASASPGEKVTL TCSASSVSSSYLYWYQQKP GSSPKLWIYSTSNLASGVPPR FSGSGSGTSYSLTISSMQAED AASYFCYQWSSYPYTFGGG TKLEIK
C42	C42.VH, SEQ ID NO: 13: QIQLVQSGPELKKPGETVKISC RASGYTFTTYGMSWVKQAPG KGLRWMGWINTYSGVSTCA DDFKGRFAFSLETSATTAYLQ IHNLNEDTATYFCARDPHSY GNSPAWFYWGQGLTVVSA	C42.VL, SEQ ID NO: 14: DIVMTQSQKFMSTTIRDRVSI TCKASQNVGISVAWYQQKS GQSPKLLIYSASNRYTGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNMQSE DLADYFCQQYSSYPLTFGSG TKLAIK
C59	C59.VH, SEQ ID NO: 15: QVQLQQSGPELVKPGASVKM SCKASGYTFSEYVLSWVKQR TGQGLEWIGIEIYPGITITTYN EKFKGKATLTADKSSNTAYIQ LTSLTSEDSAVYFCGRFYDYD GGWFAYWGQGTLLTVSA	C59.VL, SEQ ID NO: 16: ENVLTQSPEKMAVSLGQKV TMTCSASSVSSDLHWYQQ KSGASPPLIHGTSNLASGVP ARFSGSGSGTSYSLTISSVEA EDAATYYCQQWSGYPWTFG GGTNLEIK
C73	C73.VH, SEQ ID NO: 17: QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYTFTTYGMSWVKQAPG KGLKWMGWINTYSGVPTYA DDFKGRFAFSLETSASTSYLQI NNLKNEDTATYFCARDPHYY GSSPAWFVYWGQGLTVVSA	C73.VL, SEQ ID NO: 18: DIVMTQSQKFMSTTIGDRVSI TCEASQIVGIAVAWYQQKPG QSPKLLIYSASNRYTGVPDR FTGSGSGTDFTLTISNMQSED LANYFCQQYSAYPFTFGSGT KLEVK
C35	C35.VH, SEQ ID NO: 19: QIQLVQSGPELRKPGETVKISC KASGYSFTNYAMNWKQAP GKVLKWMGFINTYTGEPTYA DDFKGRFAFSLETSASTAYLQ INNKNEDTATYFCTRTRGYY DFDGGAFDYWGQGTSLTVSS	C35.VL, SEQ ID NO: 20: DIVMTQSQKFMSTSIGDRVS VTCKASQNVGTHLAWYQQ KPGQSPKALIFSASYRYIGVP DRFTGSGSGTDFTLTITNVQS EDLAEYFCQQYNTYPLTFGA GTKLELK
C50	C50.VH, SEQ ID NO: 21:	C50.VL, SEQ ID NO: 22:

[0275]

	QIQLVQSGPELKKPGETVKISC KASGYTFTTHYSMHVWVKQAP GKGLKWMGWINTETAEPYV DDFKGRFAFSLEASASTAFFQI NNLKNEDTATYFCARGGLRQ GDYWGQGTLLTVSS	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTL TCSATSSVSASYLYWFQQKP GSSPKLWIYSTSNLASGVPA RFGSGSGTSYSLTISNMEPA DAASYFCHQWSSYPYTFGG GTKLEIK
C25.scFv	SEQ ID NO: 226 QIVLTQSPAIMASASPGEKVTL TCSASSVSSSYLYWYQQKPGSS PKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEADAASYF CHQWSSYPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDYMHVWVKORTE QGLEWIGRIDPEDGETKYAPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSS LTSEDTAVYYCDRGLAYWGQGLTVVSA	

[0276]

[0277]

표 2 본원에 제공된 항-SIRP α 항체의 CDR

항체 ID	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
C15	SEQ ID NO: 29 A <u>Y</u> YMH	SEQ ID NO: 30 RIDPED <u>G</u> E SKYAPKFQ G	SEQ ID NO: 31 G <u>S</u> Y <u>E</u> Y	SEQ ID NO: 32 SASSSVSS YLY	SEQ ID NO: 33 STSNLAS	SEQ ID NO: 34 YQWSSYP YT
C25	SEQ ID NO: 23 D <u>Y</u> YMH	SEQ ID NO: 24 RIDPED <u>G</u> E TKYAPKFQ G	SEQ ID NO: 25 G <u>L</u> A <u>Y</u>	SEQ ID NO: 26 SASSSVSS YLY	SEQ ID NO: 27 STSNLAS	SEQ ID NO: 28 H <u>Q</u> WSSYP YT
		SEQ ID NO: 198 RIDPED <u>A</u> E TKYAPKFQ G				
	SEQ ID NO: 161 X <sub>1</sub> YYMH	SEQ ID NO: 162 RIDPEDX <sub>2</sub> E X <sub>3</sub> KYAPKF QG	SEQ ID NO: 163 GX <sub>15</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> Y			SEQ ID NO: 164 X <sub>6</sub> QWSSYP PYT
C42	SEQ ID NO: 35 TYGMS	SEQ ID NO: 36 WINTYSG V <u>S</u> T <u>C</u> ADDF KG	SEQ ID NO: 37 DPH <u>S</u> Y <u>G</u> N SPA <u>W</u> FP <u>Y</u>	SEQ ID NO: 38 KASQ <u>N</u> VGI S <u>V</u> A	SEQ ID NO: 39 SASNRYT	SEQ ID NO: 40 QQY <u>S</u> SYP L <u>T</u>

[0278]

C73	SEQ ID NO: 47 TYGMS	SEQ ID NO: 48 WINTYSG V <u>P</u> T <u>Y</u> ADDF KG	SEQ ID NO: 49 DPHY <u>Y</u> G <u>S</u> PA <u>W</u> F <u>Y</u>	SEQ ID NO: 50 EASQ <u>I</u> VGI A <u>V</u> A	SEQ ID NO: 51 SASNRYT	SEQ ID NO: 52 QQY <u>S</u> A <u>Y</u> P F <u>T</u>
		SEQ ID NO: 165 WINTYSG VX <sub>7</sub> TX <sub>8</sub> AD DFKG	SEQ ID NO: 166 DPHX <sub>9</sub> YG X <sub>10</sub> SPA <u>W</u> F X <sub>11</sub> Y	SEQ ID NO: 188 X <sub>12</sub> ASQX <sub>1</sub> V <u>G</u> I <u>X</u> <sub>14</sub> A		SEQ ID NO: 189 QQY <u>S</u> X <sub>16</sub> Y <u>P</u> X <sub>17</sub> T
C59	SEQ ID NO: 41 EYVLS	SEQ ID NO: 42 EIYPGTITT YYNEKFKG	SEQ ID NO: 43 FYDYDGG WFA <u>Y</u>	SEQ ID NO: 44 SASSSVSS DLH	SEQ ID NO: 45 GTSNLAS	SEQ ID NO: 46 QQWSGY P <u>W</u> T
C35	SEQ ID NO: 53 SGYSFTNY AMN	SEQ ID NO: 54 FINTYTGE PTYADDFK G	SEQ ID NO: 55 TRGYDFD GGAF <u>D</u> Y	SEQ ID NO: 56 KASQNVG TH <u>L</u> A	SEQ ID NO: 57 SASY <u>R</u> YI	SEQ ID NO: 58 QQYNTYP L <u>T</u>
C50	SEQ ID NO: 59 SGYTFTHY SMH	SEQ ID NO: 60 WINTETAE PTYVDDFK G	SEQ ID NO: 61 GGLRQGD Y	SEQ ID NO: 62 SATSSVSA SY <u>L</u> Y	SEQ ID NO: 63 STSNLAS	SEQ ID NO: 64 HQWSSYP Y <u>T</u>

[0279]

[0280]

X<sub>1</sub>은 A 또는 D이고; X<sub>2</sub>는 G 또는 A이고; X<sub>3</sub>은 T 또는 S이고; X<sub>4</sub>는 L 또는 Y이고; X<sub>5</sub>는 E 또는 A이고; X<sub>6</sub>은 Y 또는 H이고; X<sub>7</sub>은 S 또는 P이고; X<sub>8</sub>은 Y 또는 C이고; X<sub>9</sub>는 Y 또는 S이고; X<sub>10</sub>은 N 또는 S이고; X<sub>11</sub>은 P 또는 V이고; X<sub>12</sub>는 E 또는 K이고; X<sub>13</sub>은 N 또는 I이고; X<sub>14</sub>는 S 또는 A이고; X<sub>15</sub>는 S이거나 부재하고; X<sub>16</sub>은 S 또는 A이고; X<sub>17</sub>은 F 또는 L이다.

- [0281] CDR은 항원 결합을 담당하는 것으로 공지되어 있지만, 6개의 CDR 모두가 필수적이거나 변화가능하지 않은 것은 아닌 것으로 밝혀졌다. 다시 말해서, SIRP  $\alpha$ -결합 도메인에 대해 본원에서 제공된 1개 이상의 CDR을 대체하거나 변화시키거나 변형시키는 것이 가능하지만, 이는 SIRP  $\alpha$ 에 대한 특이적 결합 친화도를 실질적으로 보유한다.
- [0282] 중쇄 CDR3 영역은 항원-결합 부위의 중심에 위치하고, 따라서 항원과 가장 많이 접촉하고 항원에 대한 항체의 친화도에 가장 많은 자유 에너지를 제공하는 것으로 여겨진다. 또한, 중쇄 CDR3은 다중 다양화 메커니즘에 의해 길이, 아미노산 조성 및 입체형태의 면에서 항원-결합 부위의 단연코 가장 다양한 CDR인 것으로 여겨진다 (Tonegawa S. Nature. 302:575-81). 중쇄 CDR3에서의 다양성은 대부분의 항체 특이성 (Xu JL, Davis MM. Immunity. 13:37-45)뿐만 아니라 바람직한 항원-결합 친화도 (Schier R, etc. J Mol Biol. 263:551-67)를 생성하기에 충분하다.
- [0283] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은
- [0284] a)  $X_1YYMH$  (서열식별번호: 161)의 서열을 포함하는 HCDR1,  $RIDPEDX_2EX_3KYAPKFQ$  (서열식별번호: 162)의 서열을 포함하는 HCDR2, 및  $GX_{15}X_4X_5Y$  (서열식별번호: 163)의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는  $SASSSVSSSYLY$  (서열식별번호: 26)의 서열을 포함하는 LCDR1,  $STSNLAS$  (서열식별번호: 27)의 서열을 포함하는 LCDR2, 및  $X_6QWSSYPYT$  (서열식별번호: 164)의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0285] b)  $TYGMS$  (서열식별번호: 35)의 서열을 포함하는 HCDR1,  $WINTYSGVX_7TX_8ADDFKG$  (서열식별번호: 165)의 서열을 포함하는 HCDR2, 및  $DPHX_9YGX_{10}SPAWFY_{11}Y$  (서열식별번호: 166)의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는  $X_{12}ASQX_{13}VGIX_{14}VA$  (서열식별번호: 188)의 서열을 포함하는 LCDR1,  $SASNRYT$  (서열식별번호: 39)의 서열을 포함하는 LCDR2, 및  $QQYSX_{16}YPX_{17}T$  (서열식별번호: 189)의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0286] c)  $EYVLS$  (서열식별번호: 41)의 서열을 포함하는 HCDR1,  $EIYPGTITTYNEKFKG$  (서열식별번호: 42)의 서열을 포함하는 HCDR2, 및  $FYDYDGGWFAY$  (서열식별번호: 43)의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는  $SASSSVSSDLH$  (서열식별번호: 44)의 서열을 포함하는 LCDR1,  $GTSNLAS$  (서열식별번호: 45)의 서열을 포함하는 LCDR2, 및  $QQWSGYPWT$  (서열식별번호: 46)의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며,
- [0287] 여기서  $X_1$ 은 A 또는 D이고;  $X_2$ 는 G 또는 A이고;  $X_3$ 은 T 또는 S이고;  $X_4$ 는 L 또는 Y이고;  $X_5$ 는 E 또는 A이고;  $X_6$ 은 Y 또는 H이고;  $X_7$ 은 S 또는 P이고;  $X_8$ 은 Y 또는 C이고;  $X_9$ 는 Y 또는 S이고;  $X_{10}$ 은 N 또는 S이고;  $X_{11}$ 은 P 또는 V이고;  $X_{12}$ 는 E 또는 K이고;  $X_{13}$ 은 N 또는 I이고;  $X_{14}$ 는 S 또는 A이고;  $X_{15}$ 는 S이거나 부재하고;  $X_{16}$ 은 S 또는 A이고;  $X_{17}$ 은 F 또는 L이다.
- [0288] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은
- [0289] a) 서열식별번호: 23의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 24 또는 서열식별번호: 198의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 25의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 27의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0290] b) 서열식별번호: 29의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 30의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 31의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 32의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 33의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0291] c) 서열식별번호: 35의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 36의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 37의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 38의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 39의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 40의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0292] d) 서열식별번호: 47의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 48의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 49의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 50의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 51의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 52의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0293] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은 C25, C15, C42, C59 및 C73으로 이루어진 군으로부터 선택된 항-SIRP-알파 항체와 동일한 HCDR 및 LCDR을 포함하며, 여기서
- [0294] a) C25는 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 경

쇄 가변 영역을 포함하고,

- [0295] b) C15는 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0296] c) C42는 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 14의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0297] d) C59는 서열식별번호: 15의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0298] e) C73은 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 18의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0299] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 SIRP α-결합 도메인은, 항원-결합 도메인이 SIRP α에 특이적으로 결합할 수 있는 한, 임의의 적합한 프레임워크 영역 (FR) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, hu025.021, hu025.033, hu025.023, hu025.059 및 hu025.060의 CDR 서열은 마우스 항체 C25로부터 획득되지만, 이는 관련 기술분야에 공지된 적합한 방법, 예컨대 재조합 기술을 사용하여 임의의 적합한 종, 예컨대 특히 마우스, 인간, 래트, 토끼의 임의의 적합한 FR 서열에 그래프팅될 수 있다.
- [0300] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 SIRP α-결합 도메인은 인간화된다. 인간화 항원-결합 도메인은 인간에서의 그의 감소된 면역원성에 있어서 바람직하다. 인간화 항원-결합 도메인은 비-인간 CDR 서열이 인간 또는 실질적으로 인간 FR 서열에 그래프팅되기 때문에 그의 가변 영역에서 키메라이다. 항원-결합 도메인의 인간화는 본질적으로 비-인간 (예컨대 무린) CDR 유전자를 인간 이뮤노글로불린 유전자 내의 상응하는 인간 CDR 유전자로 치환함으로써 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al., (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., (1988) Science 239:1534-1536] 참조).
- [0301] 이러한 목적을 달성하기에 적합한 인간 중쇄 및 경쇄 가변 도메인이 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 선택될 수 있다. 예시적인 예에서, 비-인간 (예를 들어 설치류) 항체 가변 도메인 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 데이터베이스에 대해 스크리닝하거나 BLAST하고, 비-인간 질의 서열에 가장 가까운 인간 서열을 확인하고, 비-인간 CDR 서열을 그래프팅하기 위한 인간 스캐폴드로서 사용하는 "최적-피트" 접근법이 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Sims et al., (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901] 참조). 대안적으로, 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크를 비-인간 CDR의 그래프팅에 사용할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al., (1993) J. Immunol., 151:2623] 참조).
- [0302] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항원-결합 도메인은 비-인간인 CDR 서열을 제외하고 실질적으로 모두 인간 서열로 구성된다. 일부 실시양태에서, 가변 영역 FR, 및 존재하는 경우에 불변 영역은 전적으로 또는 실질적으로 인간 이뮤노글로불린 서열로부터의 것이다. 인간 FR 서열 및 인간 불변 영역 서열은 상이한 인간 이뮤노글로불린 유전자로부터 유래될 수 있으며, 예를 들어 FR 서열은 하나의 인간 항체로부터 유래되고 불변 영역은 또 다른 인간 항체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 인간화 항원-결합 도메인은 인간 FR1-4를 포함한다.
- [0303] 일부 실시양태에서, 인간으로부터 유래된 FR 영역은 그것이 유래된 인간 이뮤노글로불린과 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 FR의 1개 이상의 아미노산 잔기는 모 비-인간 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환된다. 이는 특정 실시양태에서 인간화 항체 또는 그의 단편을 비-인간 모 항체 구조에 밀접하게 근사화하는 데 바람직할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 SIRP α-결합 도메인은 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 각각의 인간 FR 서열 내에 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환, 또는 모든 FR 내에 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 잔기에서의 이러한 변화는 중쇄 FR 영역에만, 경쇄 FR 영역에만, 또는 둘 다의쇄에 존재할 수 있다. 표 2.1은 인간화 항체 hu025.021, hu025.023, hu025.033, hu025.059 및 hu025.060의 FR 서열을 보여준다.

[0304] 표 2.1. 5개의 인간화 항체의 FR 아미노산 서열

항체		FR1	FR2	FR3	FR4
hu 025 .02 1	HFR	SEQ ID NO: 207 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCKV <u>S</u> GFNIK	SEQ ID NO: 191 WVQQAPGKGLE WIG	SEQ ID NO: 208 RVTITADTST <u>N</u> TA YMESSLRSEDTA VYYCDR	SEQ ID NO: 193 WGQGLTVTV SS
	LFR	SEQ ID NO: 194 EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC	SEQ ID NO: 195 WYQQKPGQAPK LWIY	SEQ ID NO: 209 GIPARFSGSGSGT DY <u>T</u> LTLSSELEPDF AVYYC	SEQ ID NO: 197 FGQGTKLEIK
hu 025 .02 3	HFR	SEQ ID NO: 207 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCKV <u>S</u> GFNIK	SEQ ID NO: 191 WVQQAPGKGLE WIG	SEQ ID NO: 208 RVTITADTST <u>N</u> TA YMESSLRSEDTA VYYCDR	SEQ ID NO: 193 WGQGLTVTV SS
	LFR	SEQ ID NO: 194 EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC	SEQ ID NO: 195 WYQQKPGQAPK LWIY	SEQ ID NO: 212 GIPARFSGSGSGT D <u>F</u> LTLSSELEPDF AVYYC	SEQ ID NO: 197 FGQGTKLEIK
hu 025 .03 3	HFR	SEQ ID NO: 207 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCKV <u>S</u> GFNIK	SEQ ID NO: 191 WVQQAPGKGLE WIG	SEQ ID NO: 210 RVTITADTST <u>D</u> TA YMESSLRSEDTA VYYCDR	SEQ ID NO: 193 WGQGLTVTV SS
	LFR	SEQ ID NO: 194	SEQ ID NO: 195	SEQ ID NO: 209	SEQ ID NO: 197

[0305]

		EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC	WYQQKPGQAPK LWIY	GIPARFSGSGSGT DY <u>T</u> LTLSSELEPDF AVYYC	FGQGTKLEIK
hu 025 .05 9	HFR	SEQ ID NO: 211 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCK <u>A</u> S GFNIK	SEQ ID NO: 191 WVQQAPGKGLE WIG	SEQ ID NO: 208 RVTITADTST <u>N</u> TA YMESSLRSEDTA VYYCDR	SEQ ID NO: 193 WGQGLTVTV SS
	LFR	SEQ ID NO: 194 EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC	SEQ ID NO: 195 WYQQKPGQAPK LWIY	SEQ ID NO: 209 GIPARFSGSGSGT DY <u>T</u> LTLSSELEPDF AVYYC	SEQ ID NO: 197 FGQGTKLEIK
hu 025 .06 0	HFR	SEQ ID NO: 211 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCK <u>A</u> S GFNIK	SEQ ID NO: 191 WVQQAPGK <u>G</u> LE WIG	SEQ ID NO: 208 RVTITADTST <u>N</u> TA YMESSLRSEDTA VYYCDR	SEQ ID NO: 193 WGQGLTVTV SS
	LFR	SEQ ID NO: 194 EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC	SEQ ID NO: 195 WYQQKPGQAPK <u>L</u> WIY	SEQ ID NO: 212 GIPARFSGSGSGT D <u>F</u> LTLSSELEPDF AVYYC	SEQ ID NO:197 FGQGTKLEIK
	HFR	SEQ ID NO: 190 EVQLVQSGAEVK KPGATVKISCK <u>X</u> <sub>20</sub> SGFNK		SEQ ID NO: 192 RVTITADTST <u>X</u> <sub>21</sub> T AYMESSLRSED AVYYCDR	
	LFR			SEQ ID NO: 196 GIPARFSGSGSGT D <u>X</u> <sub>22</sub> TLTISSELEPE DFAVYYC	

[0306]

[0307] 여기서 X<sub>20</sub>은 A 또는 V이고; X<sub>21</sub>은 N 또는 D이고; X<sub>22</sub>는 Y 또는 F이다.

[0308] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하고, 여기서

[0309] a) HFR1은 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX<sub>20</sub>SGFNK (서열식별번호: 190) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0310] b) HFR2는 WVQQAPGKLEWIG (서열식별번호: 191) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거

나,

- [0311] c) HFR3 서열은 RVTITADTSTX<sub>21</sub>TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 192) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0312] d) HFR4는 WGQGLTVTVSS (서열식별번호: 193) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0313] e) LFR1은 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 194) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0314] f) LFR2는 WYQQKPGQAPKLIWY (서열식별번호: 195) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0315] g) LFR3은 GIPARFSGSGGTD<sub>22</sub>TLTISSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 196) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0316] h) LFR4는 FGQGKLEIK (서열식별번호: 197) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0317] 여기서 X<sub>20</sub>은 A 또는 V이고; X<sub>21</sub>은 N 또는 D이고; X<sub>22</sub>는 Y 또는 F이다.
- [0318] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하고, 여기서
- [0319] i) HFR1은 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIK (서열식별번호: 207) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0320] j) HFR2는 WVQQAPGKLEWIG (서열식별번호: 191) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0321] k) HFR3 서열은 RVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 208) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0322] l) HFR4는 WGQGLTVTVSS (서열식별번호: 193) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0323] m) LFR1은 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 194) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0324] n) LFR2는 WYQQKPGQAPKLIWY (서열식별번호: 195) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0325] o) LFR3은 GIPARFSGSGGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 209) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0326] p) LFR4는 FGQGKLEIK (서열식별번호: 197) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함한다.
- [0327] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하고, 여기서
- [0328] q) HFR1은 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIK (서열식별번호: 207) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0329] r) HFR2는 WVQQAPGKLEWIG (서열식별번호: 191) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0330] s) HFR3 서열은 RVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 208) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0331] t) HFR4는 WGQGLTVTVSS (서열식별번호: 193) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0332] u) LFR1은 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 194) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0333] v) LFR2는 WYQQKPGQAPKLIWY (서열식별번호: 195) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나

나,

- [0334] w) LFR3은 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC (서열식별번호: 212) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0335] x) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 197) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함한다.
- [0336] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하고, 여기서
- [0337] y) HFR1은 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIK (서열식별번호: 207) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0338] z) HFR2는 WVQQAPGKLEWIG (서열식별번호: 191) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0339] aa) HFR3 서열은 RVTITADTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 210) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0340] bb) HFR4는 WGQGTSLTVSS (서열식별번호: 193) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0341] cc) LFR1은 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 194) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0342] dd) LFR2는 WYQQKPGQAPKLWIY (서열식별번호: 195) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0343] ee) LFR3은 GIPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDFAVYYC (서열식별번호: 209) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0344] ff) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 197) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함한다.
- [0345] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하고, 여기서
- [0346] gg) HFR1은 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIK (서열식별번호: 211) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0347] hh) HFR2는 WVQQAPGKLEWIG (서열식별번호: 191) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0348] ii) HFR3 서열은 RVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 208) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0349] jj) HFR4는 WGQGTSLTVSS (서열식별번호: 193) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0350] kk) LFR1은 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 194) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0351] ll) LFR2는 WYQQKPGQAPKLWIY (서열식별번호: 195) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0352] mm) LFR3은 GIPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDFAVYYC (서열식별번호: 209) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0353] nn) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 197) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함한다.
- [0354] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하고, 여기서
- [0355] oo) HFR1은 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIK (서열식별번호: 211) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0356] pp) HFR2는 WVQQAPGKLEWIG (서열식별번호: 191) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

나,

- [0357] qq) HFR3 서열은 RVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 208) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0358] rr) HFR4는 WGQGLTVTVSS (서열식별번호: 193) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0359] ss) LFR1은 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 194) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0360] tt) LFR2는 WYQQKPGQAPKLIY (서열식별번호: 195) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0361] uu) LFR3은 GIPARFSGSGGDTFTLTISLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 212) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,
- [0362] vv) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 197) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함한다.
- [0363] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 SIRP $\alpha$ -결합 도메인은 서열식별번호: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 및 159로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 SIRP $\alpha$ -결합 도메인은 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18 및 160으로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.
- [0364] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은 하기를 포함한다:
- [0365] f) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 1의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 2의 서열을 포함함; 및/또는
- [0366] g) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 3의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 4의 서열을 포함함; 및/또는
- [0367] h) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 5의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 6의 서열을 포함함; 및/또는
- [0368] i) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 7의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 8의 서열을 포함함; 및/또는
- [0369] j) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 9의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 10의 서열을 포함함; 및/또는
- [0370] k) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 11의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 12의 서열을 포함함; 및/또는
- [0371] l) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 13의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 14의 서열을 포함함; 및/또는
- [0372] m) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 15의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 16의 서열을 포함함; 및/또는
- [0373] n) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 17의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 18의 서열을 포함함; 및/또는
- [0374] o) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 159의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 160의 서열을 포함함.
- [0375] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 SIRP $\alpha$ -결합 도메인은 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 및/또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 제공된 SIRP $\alpha$ -결합 도메인은 본원에 제공된 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진 단일 도메인 항체이다. 이러한 단일 도메인 항체에 대한 보다 많은 정보는 관련 기술분야에서 이용가능하다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,248,516 참조).
- [0376] 특정 실시양태에서, SIRP $\alpha$  결합 도메인은 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만, SIRP $\alpha$ 에 대한 특이적 결합은 보유한다. 특정 실시양태에서, 치환 또는 변형 중 적어도 1개는 중쇄 가변 영역

또는 경쇄 가변 영역의 CDR 서열 중 1개 이상 및/또는 비-CDR 서열 중 1개 이상에 존재한다.

- [0377] ii. 표적 항원 결합 도메인
- [0378] 본원에 사용된 용어 "표적 항원 결합 도메인"은 항원 및 CD47을 공동-발현하는 세포를 표적화하는 항원 결합 도메인을 지칭한다. 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 표적 항원 결합 도메인은 종양 항원 결합 도메인일 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적 항원은 종양 표면 항원을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "종양 표면 항원"은 종양 세포에 의해 우세하게 제시되어 비-악성 조직과 구별시켜 주는 항원을 지칭하고, 바람직하게는 종양 세포의 세포 막 상에 위치한다. 종양 표면 항원은 다양한 형태, 예를 들어 폴리펩티드 (특히 글리코실화된 단백질), 또는 폴리펩티드의 글리코실화 패턴, 당지질 (예를 들어, 강글리오시드, 예컨대 GM2), 또는 심지어 암 세포의 특징일 수 있는 세포막의 지질 조성에서의 변화일 수 있다. 종양 표면 항원은 면역 반응을 도출하고/거나; T 세포 수용체에 (예를 들어, MHC 분자에 의해 제시되는 경우) 또는 항체에 결합하는, 암 세포 상에서 특이적으로 발현되는 항원일 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 표면 항원은 체액성 반응 (예를 들어, 항원-특이적 항체의 생산을 포함함)을 도출한다. 일부 실시양태에서, 종양 표면 항원은 세포성 반응 (예를 들어, 그의 수용체가 종양 표면 항원과 특이적으로 상호작용하는 T-세포를 수반함)을 도출한다. 일부 실시양태에서, 종양 표면 항원은 항체에 결합하고, 유기체에서 특정한 생리학적 반응을 유도할 수 있거나 또는 유도하지 않을 수 있다.
- [0379] 특정 실시양태에서, 종양 표면 항원은, 예를 들어 PD-L1, 클라우딘 18.2, BCMA, CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33, CD38, CD44, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD123, EGFR, HER2, HER3, CD117, C-Met, EGFR, EGFRvIII, ERBB3, ERBB4, VEGFR1, VEGFR2, PTHR2, B7-H1(PD-L1), B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, B7-H7, Trop-2, GPC-3, EPCAM, DLL-3, 넥틴-4, 클라우딘6, 클라우딘18.2, Muc-1, PSMA, GD3, FAP, CEA, 또는 EphA2이다.
- [0380] 클라우딘18.2-결합 도메인
- [0381] 특정 실시양태에서, 종양 표면 항원은 클라우딘18.2이다. 특정 실시양태에서, 클라우딘18.2-결합 도메인은 클라우딘18.2 (예컨대 인간 클라우딘18.2)에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0382] 특정 실시양태에서, 클라우딘18.2-결합 도메인은 hu26.H1L1, hu26.H1L2, hu26.H1L2 (S92A), hu26.H3L1, hu26.H3L2, hu28.H1L2, C10, C29 및 C30으로 이루어진 군으로부터 선택된 항-클라우딘18.2 항체의 1개 이상 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 CDR 서열을 포함한다.
- [0383] 본원에 사용된 "hu26.H1L1"은 서열식별번호: 65의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 66의 경쇄 가변 영역을 갖는 인간화 모노클로날 항체를 지칭한다.
- [0384] 본원에 사용된 "hu26.H1L2"는 서열식별번호: 65의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 67의 경쇄 가변 영역을 갖는 인간화 모노클로날 항체를 지칭한다.
- [0385] 본원에 사용된 "hu26.H1L2 (S92A)"는 서열식별번호: 65의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 224의 경쇄 가변 영역을 갖는 인간화 모노클로날 항체를 지칭한다.
- [0386] 본원에 사용된 "hu26.H3L1"은 서열식별번호: 68의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 66의 경쇄 가변 영역을 갖는 인간화 모노클로날 항체를 지칭한다.
- [0387] 본원에 사용된 "hu26.H3L2"는 서열식별번호: 68의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 67의 경쇄 가변 영역을 갖는 인간화 모노클로날 항체를 지칭한다.
- [0388] 본원에 사용된 "hu28.H1L2"는 서열식별번호: 69의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 70의 경쇄 가변 영역을 갖는 인간화 모노클로날 항체를 지칭한다.
- [0389] 본원에 사용된 "C10"은 서열식별번호: 71의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 72의 경쇄 가변 영역을 갖는 인간화 모노클로날 항체를 지칭한다.
- [0390] 본원에 사용된 "C29"는 서열식별번호: 73의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 74의 경쇄 가변 영역을 갖는 인간화 모노클로날 항체를 지칭한다.
- [0391] 본원에 사용된 "C30"은 서열식별번호: 75의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 76의 경쇄 가변 영역을 갖는 인간화 모노클로날 항체를 지칭한다.
- [0392] 표 3은 항-클라우딘18.2 항체의 CDR 서열을 보여준다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열이 또한 하기 표 4 및 표 5

에 제공된다.

[0393] 표 3. 항-클라우딘18.2 항체에 대한 가변 영역의 아미노산 서열 (CDR은 밑줄표시됨).

항체	VH	VL
hu26.H1L1	hu26.VH_1, SEQ ID NO: 65: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLSSYALSWVRQAP GKGLEWVSYISNLGGSTFYPD TVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKHLVNY DAFASWGQGLVTVSS	hu26.VL_1, SEQ ID NO: 66: DIQLTQSPSFLSASVGDRVTI TCRASSSVNYIHWYQKPG KAPKLLIYATSNLASGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDF ATYYCQQWNSNPLTFGQGT KLEIK
hu26.H1L2	hu26.VH_1, SEQ ID NO: 65: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLSSYALSWVRQAP GKGLEWVSYISNLGGSTFYPD TVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKHLVNY DAFASWGQGLVTVSS	hu26.VL_2, SEQ ID NO: 67: DIQLTQSPSFLSASVGDRVTI TCRASSSVNYIHWYQKPG KAPKALIIYATSNLASGVPSR FSGSGSGTEYTLTISLQPED FATYYCQQWNSNPLTFGQG TKLEIK
hu26.H1L2 (S92A)	hu26.VH_1, SEQ ID NO: 65: EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTLSSYALSWVRQAP GKGLEWVSYISNLGGSTFYPD TVKGRFTISRDNKNTLYLQM	hu26.VL_2, SEQ ID NO: 224: DIQLTQSPSFLSASVGDRVTI TCRASSSVNYIHWYQKPG KAPKALIIYATSNLASGVPSR FSGSGSGTEYTLTISLQPED

[0394]

	<u>NSLRAEDTAVYYCAKHLVNY</u> <u>DAFASWGQGLTVTVSS</u>	FATYYCQOWNANPLTFGQG TKLEIK
hu26.H3L1	hu26.VH_3, SEQ ID NO: 68: EVQLES GGGLVQPGSLRLS CAASGFTLSSYALSWVRQAP GKGLEWVAYISNLGGSTFY <u>DTVKGRFTISRDNKNTLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCATHLYN</u> <u>YDAFASWGQGLTVTVSS</u>	hu26.VL_1, SEQ ID NO: 66: DIQLTQSPSFLSASVGDRVTI TCRASSSVNYIHWYQKPG KAPKLLIYATSNLASGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDF ATYYCQOWNSNPLTFGQGT KLEIK
hu26.H3L2	hu26.VH_3, SEQ ID NO: 68: EVQLES GGGLVQPGSLRLS CAASGFTLSSYALSWVRQAP GKGLEWVAYISNLGGSTFY <u>DTVKGRFTISRDNKNTLYLQ</u> <u>MNSLRAEDTAVYYCATHLYN</u> <u>YDAFASWGQGLTVTVSS</u>	hu26.VL_2, SEQ ID NO: 67: DIQLTQSPSFLSASVGDRVTI TCRASSSVNYIHWYQKPG KAPKALIYATSNLASGVPSR FSGSGSGTEYTLTISLQPED FATYYCQOWNSNPLTFGQGT TKLEIK
hu28.H1L2	hu28.VH_1, SEQ ID NO: 69: QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNWHVWRQA PGQGLEWMGEINPTNARSNY <u>NEKFKRVTMTRDTSTVY</u> <u>MELSSLRSEDTAVYYCARIYY</u> <u>GNSFAHWGQGLTVTVSS</u>	hu28.VL_1, SEQ ID NO: 70: DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSLNAGNQKNYLT WYQKPGQPPKLLIYWSSTR ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYHCQNNYYY <u>PLTFGGGTKLEIK</u>
C10	C10.VH, SEQ ID NO: 71: EVQLQQSGPELVKPGSSVKM SCKASGYTFTDYNMHWLQKS HGKSLIEWIGYINPKNGGTRY <u>NQKFKGKATLTVNKSSSTAY</u> <u>MELRSLTSEDSAVYYCARLY</u> <u>YGNSFDYWGQGTTLTVSS</u>	C10.VL, SEQ ID NO: 72: DIVMTQSPSSLTVTAGEKVT MSCSSQSLNAGNQKNYLT WYQKPGQPPKLLIYWAST RESGVPDRFTGSGSGTDFTL TISSVQAEDLAVYFCQNDYS <u>FPFTFGSGTKLEIK</u>
C29	C29.VH, SEQ ID NO: 73: DVQLVESGGGLVQPGSRKL SCAASGFTFSFGMHVWRQA PEKGLEWVAYISSGSSIIYV <u>DTVKGRFTISRDNPKNTLFLQ</u> <u>MTSLRSEDTAMYYCARNAYY</u> <u>GNAFDYWGQGTTLTVSS</u>	C29.VL, SEQ ID NO: 74: DIVMTQSPSSLTVTAGEKVT MNCKSSQSLNAGNQKNYL TWYQKPGQPPKLLIYWAS TRTSVGPDRFTGSGSGTDFT LTISSVQAEDLAVYCCQNGY <u>TYPLTFGAGTKLEIK</u>
C30	C30.VH, SEQ ID NO: 75: QVQLQQSGPDLVKPGASVKL SCKASGYTFTNYDINWVKQR PGQGLEWIGGIHPRDGNTKY <u>NEKFKDKATLTIIDTSANTAY</u> <u>MEFHSLTSEDSAVYFCARGY</u> <u>YGNSFAHWGQGLTVTVSA</u>	C30.VL, SEQ ID NO: 76: DIVMTQSPSSLTVTAGEKVT MTCKSGQSLNAGNQKNYLT TWYQKPGQSPKLLIYWAS TRESGVPDRFTGSGSGADFT LTISSVQAEDLALYYCQNAV <u>FYPYTFGGGTKLEIK</u>
hu28.H1L2. scFv	SEQ ID NO: 227 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNAGNQKNYLTWY QKPGQPPKLLIYWSSTRRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQA	

	EDVAVYHCQNNYYYPLTFGGGTKLEIKGGGGSGGGSGGGG SGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNWHV WVRQAPGQGLEWMGEINPTNARSNYNEKFKRVTMTRDTST STVYMESSLRSEDTAVYYCARIYYGNSFAHWGQGLTVTVSS
--	--

[0395]

[0396]

[0397] 표 4 본원에 제공된 항-클라우드인18.2 항체의 CDR

항체	VH	VL
hu26.H1L1	CDR1 (SEQ ID NO: 77) <u>SYALS</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 80) <u>RASSSVNYIH</u>
hu26.H1L2	CDR2 (SEQ ID NO: 78) <u>YISNLGGSTFYPTVKG</u>	CDR2 (SEQ ID NO: 81) <u>ATSNLAS</u>
hu26.H3L1	CDR3 (SEQ ID NO: 79) <u>HLVNYDAFAS</u>	CDR3 (SEQ ID NO: 82) <u>QQWNSNPLT</u>
hu26.H3L2	CDR1 (SEQ ID NO: 77) <u>SYALS</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 80) <u>RASSSVNYIH</u>
hu26.H1L2 (S92A)	CDR2 (SEQ ID NO: 78) <u>YISNLGGSTFYPTVKG</u>	CDR2 (SEQ ID NO: 81) <u>ATSNLAS</u>
	CDR3 (SEQ ID NO: 79) <u>HLVNYDAFAS</u>	CDR3 (SEQ ID NO: 225) <u>QQWANPLT</u>
hu28.H1L2	CDR1 (SEQ ID NO: 83) <u>NWVH</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 86) <u>KSSQSLLNAGNQKNYLT</u>
	CDR2 (SEQ ID NO: 84) <u>EINPTNARSNYNEKFKK</u>	CDR2 (SEQ ID NO: 87) <u>WSSTRES</u>
	CDR3 (SEQ ID NO: 85) <u>IYYGNSFAH</u>	CDR3 (SEQ ID NO: 88) <u>QNNYYYPLT</u>
C10	CDR1 (SEQ ID NO: 89) <u>DYNMH</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 92) <u>KSSQSLLNSGNQKNYLT</u>
	CDR2 (SEQ ID NO: 90) <u>YINPKNGGTRYNQKFKG</u>	CDR2 (SEQ ID NO: 93) <u>WASTRES</u>
	CDR3 (SEQ ID NO: 91) <u>LYYGNSFDY</u>	CDR3 (SEQ ID NO: 94) <u>QNDYSFPFT</u>
C29	CDR1 (SEQ ID NO: 95) <u>SFGMH</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 98) <u>KSSQSLLNSGNQKNYLT</u>
	CDR2 (SEQ ID NO: 96) <u>YISSGSSSIYYVDTVKG</u>	CDR2 (SEQ ID NO: 99) <u>WASTRIS</u>
	CDR3 (SEQ ID NO: 97) <u>NAYYGNAFDY</u>	CDR3 (SEQ ID NO: 100) <u>QNGYTYPLT</u>

[0398]

C30	CDR1 (SEQ ID NO: 101) <u>NYDIN</u>	CDR1 (SEQ ID NO: 104) <u>KSGQSLLNSGNQKNYLT</u>
	CDR2 (SEQ ID NO: 102) <u>GIHPRDGNTKYNEKFKD</u>	CDR2 (SEQ ID NO: 105) <u>WASTRES</u>
	CDR3 (SEQ ID NO: 103) <u>GYYGNSFAY</u>	CDR3 (SEQ ID NO: 106) <u>QNAFYFYPYT</u>

[0399]

[0400]

CDR은 항원 결합을 담당하는 것으로 공지되어 있지만, 6개의 CDR 모두가 필수적이거나 변화가능하지 않은 것은 아닌 것으로 밝혀졌다. 다시 말해서, 클라우드인18.2-결합 도메인에 대해 본원에 제공된 1개 이상의 CDR을 대체하거나 변화시키거나 변형시키는 것이 가능하지만, 이는 PD-1 (예를 들어 인간 클라우드인18.2)에 대한 특이적 결합 친화도를 실질적으로 보유한다.

[0401]

특정 실시양태에서, 클라우드인 18.2 결합 도메인은

[0402]

a) 서열식별번호: 77의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 78의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 79의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 80의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 81의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 82 또는 서열식별번호: 225의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0403]

b) 서열식별번호: 83의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 84의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 85의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 86의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 87의 서열을

포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 88의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

- [0404] c) 서열식별번호: 89의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 90의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 91의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 92의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 93의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 94의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0405] d) 서열식별번호: 95의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 96의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 97의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 98의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 99의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 100의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0406] e) 서열식별번호: 101의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 102의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 103의 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 104의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 105의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 106의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0407] 특정 실시양태에서, 클라우딘 18.2 결합 도메인은 hu26.H1L1, hu26.H1L2 (S92A), hu28.H1L2, C10, C29 및 C30으로 이루어진 군으로부터 선택된 항-클라우딘 18.2 항체와 동일한 HCDR 및 LCDR을 포함하고,
- [0408] a) 여기서 hu26.H1L1은 서열식별번호: 65의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 66의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0409] b) 여기서 hu26.H1L2 (S92A)는 서열식별번호: 65의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 224의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0410] c) hu28.H1L2는 서열식별번호: 69의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 70의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0411] d) C10은 서열식별번호: 71의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 72의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0412] e) C29는 서열식별번호: 73의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 74의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- [0413] f) C30은 서열식별번호: 75의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 서열식별번호: 76의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0414] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 클라우딘18.2-결합 도메인은, 항원-결합 도메인이 클라우딘18.2에 특이적으로 결합할 수 있는 한, 임의의 적합한 프레임워크 영역 (FR) 서열을 포함한다.
- [0415] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 클라우딘18.2-결합 도메인은 인간화된다. 인간화 항원-결합 도메인은 인간에서의 그의 감소된 면역원성에 있어서 바람직하다. 인간화 항원-결합 도메인은 비-인간 CDR 서열이 인간 또는 실질적으로 인간 FR 서열에 그래프팅되기 때문에 그의 가변 영역에서 키메라이다. 항원-결합 도메인의 인간화는 본질적으로 비-인간 (예컨대 뮤린) CDR 유전자를 인간 이뮤노글로불린 유전자 내의 상응하는 인간 CDR 유전자로 치환함으로써 수행될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al., (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., (1988) Science 239:1534-1536] 참조). 상기 기재된 바와 같이, 이러한 목적을 달성하기에 적합한 인간 중쇄 및 경쇄 가변 도메인이 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 선택될 수 있다.
- [0416] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항원-결합 도메인은 비-인간인 CDR 서열을 제외하고 실질적으로 모두 인간 서열로 구성된다. 일부 실시양태에서, 가변 영역 FR, 및 존재하는 경우에 불변 영역은 전적으로 또는 실질적으로 인간 이뮤노글로불린 서열로부터의 것이다. 인간 FR 서열 및 인간 불변 영역 서열은 상이한 인간 이뮤노글로불린 유전자로부터 유래될 수 있으며, 예를 들어 FR 서열은 하나의 인간 항체로부터 유래되고 불변 영역은 또 다른 인간 항체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 인간화 항원-결합 도메인은 인간 FR1-4를 포함한다.
- [0417] 일부 실시양태에서, 인간으로부터 유래된 FR 영역은 그것이 유래된 인간 이뮤노글로불린과 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 FR의 1개 이상의 아미노산 잔기는 모 비-인간 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환된다. 이는 특정 실시양태에서 인간화 항체 또는 그의 단편을 비-인간 모 항체 구조에 밀접하게 근사화하는 데 바람직할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 클라우딘18.2-결합 도메인은 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 각각의 인간 FR 서열 내에 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노

산 잔기 치환, 또는 모든 FR 내에 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 잔기에서의 이러한 변화는 중쇄 FR 영역에만, 경쇄 FR 영역에만, 또는 둘 다의 쇠에 존재할 수 있다. 표 4.1은 인간화 항체 hu26.H1L1, hu26.H1L2, hu26.H3L1, hu26.H3L2, hu28.H1L2의 FR 서열을 보여준다.

[0418] 표 4.1. 5개의 인간화 항체의 FR 아미노산 서열

항체		FR1	FR2	FR3	FR4
hu26.H1L1	HFR	SEQ ID NO: 167 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTLS	SEQ ID NO: 199 WVRQAPGKG LEWV <u>S</u>	SEQ ID NO: 200 RFTISRDNK NTLYLQMNSL	SEQ ID NO: 173 WGQGT <u>L</u> V TVSS

[0419]

	LFR	SEQ ID NO: 174 DIQLTQSPSFL SASVGDRVTI TC	SEQ ID NO: 201 WYQQKPGK <u>A</u> PK <u>L</u> LIY	SEQ ID NO: 202 GVPSRFSGSG SGTE <u>F</u> LT <u>I</u> SS LQPEDFATYY C	SEQ ID NO: 181 FGQGT <u>K</u> LE IK
hu26.H1L2/hu26.H1L2(S92A)	HFR	SEQ ID NO: 167 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTLS	SEQ ID NO: 199 WVRQAPGKG LEWV <u>S</u>	SEQ ID NO: 200 RFTISRDNK NTLYLQMNSL RAEDTAVYY CA <u>K</u>	SEQ ID NO: 173 WGQGT <u>L</u> V TVSS
	LFR	SEQ ID NO: 174 DIQLTQSPSFL SASVGDRVTI TC	SEQ ID NO: 203 WYQQKPGK <u>A</u> PK <u>A</u> LIY	SEQ ID NO: 204 GVPSRFSGSG SGTE <u>Y</u> LT <u>I</u> SS LQPEDFATYY C	SEQ ID NO: 181 FGQGT <u>K</u> LE IK
hu26.H3L1	HFR	SEQ ID NO: 167 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTLS	SEQ ID NO: 213 WVRQAPGKG LEWV <u>A</u>	SEQ ID NO: 205 RFTISRDNK NTLYLQMNSL RAEDTAVYY CA <u>T</u>	SEQ ID NO: 173 WGQGT <u>L</u> V TVSS
	LFR	SEQ ID NO: 174 DIQLTQSPSFL SASVGDRVTI TC	SEQ ID NO: 201 WYQQKPGK <u>A</u> PK <u>L</u> LIY	SEQ ID NO: 202 GVPSRFSGSG SGTE <u>F</u> LT <u>I</u> SS LQPEDFATYY C	SEQ ID NO: 181 FGQGT <u>K</u> LE IK
hu26.H3L2	HFR	SEQ ID NO: 167 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTLS	SEQ ID NO: 213 WVRQAPGKG LEWV <u>A</u>	SEQ ID NO: 205 RFTISRDNK NTLYLQMNSL RAEDTAVYY CA <u>T</u>	SEQ ID NO: 173 WGQGT <u>L</u> V TVSS
	LFR	SEQ ID NO: 174 DIQLTQSPSFL SASVGDRVTI TC	SEQ ID NO: 203 WYQQKPGK <u>A</u> PK <u>A</u> LIY	SEQ ID NO: 204 GVPSRFSGSG SGTE <u>Y</u> LT <u>I</u> SS LQPEDFATYY C	SEQ ID NO: 181 FGQGT <u>K</u> LE IK
	LFR		SEQ ID NO: 206 WYQQKPGK APK <u>X</u> <sub>19</sub> <u>L</u> IY		
hu28.H1L2	HFR	SEQ ID NO: 168 QVQLVQSGA EVKKPGASVK VSKKASGYTF T	SEQ ID NO: 170 WVRQAPGQG LEW <u>M</u> G	SEQ ID NO: 172 RVTMTRDTST STVYMELSSL RSEDVAVYYC AR	SEQ ID NO: 173 WGQGT <u>L</u> V TVSS
	LFR	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 177 WYQQKPG <u>Q</u> P PK <u>L</u> LIY	SEQ ID NO: 179 GVPDRFSGSG SGTDFLT <u>I</u> SS	SEQ ID NO: 182

[0420]

		DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INC		LQAEDVAVY HC	FGGGTKLE IK
	HFR		SEQ ID NO: 169 WVRQAPGK GLEWVX <sub>18</sub>	SEQ ID NO: 171 RFTISRDNK NTLYLQMNS LRAEDTAVY YCAX <sub>23</sub>	
	LFR		SEQ ID NO: 176 WYQQKPGX <sub>2</sub> 6X <sub>27</sub> PKX <sub>19</sub> LIY	SEQ ID NO: 178 GVPSRFSGSG SGTEX <sub>24</sub> TLTI SSLQPEDFAT YYC	SEQ ID NO: 180 FGX <sub>25</sub> GTK LEIK

[0421]

[0422]

여기서 X<sub>18</sub>은 S 또는 A이고, X<sub>19</sub>은 L 또는 A이고, X<sub>23</sub>은 T 또는 K이고, X<sub>24</sub>는 Y 또는 F이고, X<sub>25</sub>는 Q 또는 G이고, X<sub>26</sub>은 Q 또는 K이고, X<sub>27</sub>은 P 또는 A이다.

[0423]

일부 실시양태에서, 클라우드인 18.2 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하며, 여기서:

[0424]

a) HFR1은 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (서열식별번호: 167) 및 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT (서열식별번호: 168)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

[0425]

b) HFR2는 WVRQAPGKLEWVX<sub>18</sub> (서열식별번호: 169) 및 WVRQAPGGLEWVG (서열식별번호: 170)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

[0426]

c) HFR3 서열은 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAX<sub>23</sub> (서열식별번호: 171) 및 RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCAR (서열식별번호: 172)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

[0427]

d) HFR4는 WGQGTILVTSS (서열식별번호: 173) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

[0428]

e) LFR1은 DIQLTQSPSFLSASVGDRTITC (서열식별번호: 174) 및 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (서열식별번호: 175)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

[0429]

f) LFR2는 WYQQKPGX<sub>26</sub>X<sub>27</sub>PKX<sub>19</sub>LIY (서열식별번호: 176)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

[0430]

g) LFR3는 GVPSRFSGSGSGTEX<sub>24</sub>TLTISSLQPEDFATYYC (서열식별번호: 178) 및 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEVAVYHC (서열식별번호: 179)로 이루어진 균으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

[0431]

h) LFR4는 FGX<sub>25</sub>GTKLEIK (서열식별번호: 180) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

[0432]

여기서 X<sub>18</sub>은 S 또는 A이고, X<sub>19</sub>은 L 또는 A이고, X<sub>23</sub>은 T 또는 K이고, X<sub>24</sub>는 Y 또는 F이고, X<sub>25</sub>는 Q 또는 G이고, X<sub>26</sub>은 Q 또는 K이고, X<sub>27</sub>은 P 또는 A이다.

[0433]

일부 실시양태에서, 클라우드인 18.2 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하며, 여기서:

[0434]

a) HFR1은 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (서열식별번호: 167) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

[0435]

b) HFR2는 WVRQAPGKLEWVX<sub>18</sub> (서열식별번호: 169) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

[0436]

c) HFR3 서열은 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAX<sub>23</sub> (서열식별번호: 171) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

- [0437] d) HFR4는 WGQGTILVTVSS (서열식별번호: 173) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0438] e) LFR1은 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC (서열식별번호: 174) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0439] f) LFR2는 WYQQKPGKAPKX<sub>19</sub>LIY (서열식별번호: 206) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0440] g) LFR3은 GVPSRFSGSGSGTEX<sub>24</sub>TLTISSLQPEDFATYYC (서열식별번호: 178) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0441] h) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 181) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0442] 여기서 X<sub>18</sub>은 S 또는 A이고, X<sub>19</sub>는 L 또는 A이고, X<sub>23</sub>은 T 또는 K이고, X<sub>24</sub>는 Y 또는 F이다.
- [0443] 일부 실시양태에서, 클라우드인 18.2 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하며, 여기서:
- [0444] a) HFR1은 EVQLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (서열식별번호: 167) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0445] b) HFR2는 WVRQAPGKGLEWVS (서열식별번호: 199) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0446] c) HFR3 서열은 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (서열식별번호: 200) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0447] d) HFR4는 WGQGTILVTVSS (서열식별번호: 173) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0448] e) LFR1은 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC (서열식별번호: 174) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0449] f) LFR2는 WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 201) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0450] g) LFR3은 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC (서열식별번호: 202) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0451] h) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 181) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함한다.
- [0452] 일부 실시양태에서, 클라우드인 18.2 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하며, 여기서:
- [0453] a) HFR1은 EVQLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (서열식별번호: 167) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0454] b) HFR2는 WVRQAPGKGLEWVS (서열식별번호: 199) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0455] c) HFR3 서열은 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK (서열식별번호: 200) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0456] d) HFR4는 WGQGTILVTVSS (서열식별번호: 173) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0457] e) LFR1은 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC (서열식별번호: 174) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0458] f) LFR2는 WYQQKPGKAPKALIIY (서열식별번호: 203) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0459] g) LFR3은 GVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPEDFATYYC (서열식별번호: 204) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0460] h) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 181) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함한다.
- [0461] 일부 실시양태에서, 클라우드인 18.2 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하며, 여기서:
- [0462] a) HFR1은 EVQLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (서열식별번호: 167) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서

열을 포함하고,

- [0463] b) HFR2는 WVRQAPGKGLEWVA (서열식별번호: 213) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0464] c) HFR3 서열은 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT (서열식별번호: 205) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0465] d) HFR4는 WGQGTLVTVSS (서열식별번호: 173) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0466] e) LFR1은 DIQLTQSPSFLSASVGDVRTITC (서열식별번호: 174) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0467] f) LFR2는 WYQQKPGKAPKLLIY (서열식별번호: 201) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0468] g) LFR3은 GVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC (서열식별번호: 202) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
- [0469] h) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 181) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함한다.
- [0470] 일부 실시양태에서, 클라우딩 18.2 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하며, 여기서:
  - [0471] a) HFR1은 EVQLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTLS (서열식별번호: 167) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0472] b) HFR2는 WVRQAPGKGLEWVA (서열식별번호: 213) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0473] c) HFR3 서열은 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT (서열식별번호: 205) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0474] d) HFR4는 WGQGTLVTVSS (서열식별번호: 173) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0475] e) LFR1은 DIQLTQSPSFLSASVGDVRTITC (서열식별번호: 174) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0476] f) LFR2는 WYQQKPGKAPKALIY (서열식별번호: 203) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0477] g) LFR3은 GVPSRFGSGSGTEYTLTISLQPEDFATYYC (서열식별번호: 204) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0478] h) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 181) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함한다.
- [0479] 일부 실시양태에서, 클라우딩 18.2 결합 도메인은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하며, 여기서:
  - [0480] a) HFR1은 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT (서열식별번호: 168) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0481] b) HFR2는 WVRQAPGQGLEWMG (서열식별번호: 170) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0482] c) HFR3 서열은 RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR (서열식별번호: 172) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0483] d) HFR4는 WGQGTLVTVSS (서열식별번호: 173) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0484] e) LFR1은 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC (서열식별번호: 175) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0485] f) LFR2는 WYQQKPGQPPKLLIY (서열식별번호: 177) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0486] g) LFR3은 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYHC (서열식별번호: 179) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,
  - [0487] h) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 182) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함한다.
- [0488] 일부 실시양태에서, 클라우딩 18.2 결합 도메인은 하기를 포함한다:

- [0489] a) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 65 또는 68의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 66 또는 67 또는 224의 서열을 포함함; 또는
- [0490] b) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 69의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 70의 서열을 포함함; 또는
- [0491] c) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 71의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 72의 서열을 포함함; 또는
- [0492] d) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 73의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 74의 서열을 포함함; 또는
- [0493] e) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 75의 서열을 포함하고/거나 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 76의 서열을 포함함.
- [0494] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 클라우딘18.2-결합 도메인은 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 및/또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 제공된 클라우딘18.2-결합 도메인은 본원에 제공된 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진 단일 도메인 항체이다. 이러한 단일 도메인 항체에 대한 보다 많은 정보는 관련 기술분야에서 이용가능하다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,248,516 참조).
- [0495] 특정 실시양태에서, 클라우딘18.2 결합 도메인은 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만, 클라우딘18.2에 대한 특이적 결합은 보유한다. 특정 실시양태에서, 치환 또는 변형 중 적어도 1개는 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 CDR 서열 중 1개 이상 및/또는 비-CDR 서열 중 1개 이상에 존재한다. 특정 실시양태에서, 치환 또는 변형 중 적어도 1개는, 예를 들어 hu26.H1L2 (S92A)의 CDR 서열 중 1개 이상에 존재한다.
- [0496] PD-L1-결합 도메인
- [0497] 특정 실시양태에서, 종양 표면 항원은 PD-L1이다. 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 PD-L1 (예컨대 인간 PD-L1)에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0498] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 C71, C71v38, C239, C492, C570, C446, C2811, C1778, C1793, C2855, C2713 및 C2719로 이루어진 군으로부터 선택된 항-PD-L1 항체의 1개 이상 (예를 들어 1, 2 또는 3개)의 CDR 서열을 포함한다.
- [0499] 본원에 사용된 "C71"은 서열식별번호: 107의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0500] 본원에 사용된 "C71v38"은 서열식별번호: 108의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0501] 본원에 사용된 "C239"는 서열식별번호: 109의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0502] 본원에 사용된 "C492"는 서열식별번호: 110의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0503] 본원에 사용된 "C570"은 서열식별번호: 111의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0504] 본원에 사용된 "570h3"은 서열식별번호: 223의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0505] 본원에 사용된 "C446"은 서열식별번호: 112의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0506] 본원에 사용된 "C2811"은 서열식별번호: 113의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0507] 본원에 사용된 "C1778"은 서열식별번호: 114의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0508] 본원에 사용된 "C1793"은 서열식별번호: 115의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0509] 본원에 사용된 "C2855"는 서열식별번호: 116의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0510] 본원에 사용된 "C2713"은 서열식별번호: 117의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0511] 본원에 사용된 "C2719"는 서열식별번호: 118의 중쇄 가변 영역을 갖는 인간화 중쇄 항체를 지칭한다.
- [0512] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 119의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 120의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 121의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0513] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 122의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 123

의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 124의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.

- [0514] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 125의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 126의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 127의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0515] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 128의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 129의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 130의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0516] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 131의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 132의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 133의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0517] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 134의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 135의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 136의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0518] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 137의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 138의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 139의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0519] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 140의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 141의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 142의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0520] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 143의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 144의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 145의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0521] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 146의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 147의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 148의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0522] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 149의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 150의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 151의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0523] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 152의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 153의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 154의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다.
- [0524] 특정 실시양태에서, PD-L1 결합 도메인은 C71, C71v38, C239, C492, C570, 570h3, C446, C2811, C1778, C1793, C2855, C2713 및 C2719로 이루어진 군으로부터 선택된 항-PD-L1 항체와 동일한 HCDR을 포함한다.
- [0525] 특정 실시양태에서, PD-L1 결합 도메인은 서열식별번호: 107-118 및 223으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0526] 표 5는 항-PD-L1 항체의 중쇄 가변 영역 서열을 보여준다. CDR 서열이 또한 하기 표 6에 제공된다.

[0527] 표 5. 항-PD-L1 항체에 대한 가변 영역의 아미노산 서열 (CDR은 밑줄표시됨).

항체	VH
C71	C71.VH, SEQ ID NO: 107: EVQVVESGGGLVQSGGSLKLSAAGSGFTESAGFMVWHRQVPGKE RELVALIATPSGSTNYADSVKGRFTISRDNKGKNTVYLQMNSLKPE DTAVYYC <u>NIRGYWGQGLVTVSS</u>
C71v38	C71v38.VH, SEQ ID NO: 108: EVQVVESGGGLVQSGGSLRLSCAAGSGFTESAGFMVWHRQVPGKE RELVALIATPSGSTQYADSVKGRFTISRDNKGKNTVYLQMNSLKPE DTAVYYC <u>NIRGYWGQGLVTVSS</u>
C239	C239.VH, SEQ ID NO: 109: EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNFFAMSWVRQAPGKG LEWVAD <u>DTGGTDTDY</u> ADSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLKPE EDTAVYYC <u>AKGPREATDIRSWGQGTQVTSS</u>
C492	C492.VH, SEQ ID NO: 110: EVQLVESGGDLVQTGGSLRLSCASGFTFNFFAMSWVRQAPGKG LEWVAD <u>DTGGTDTDY</u> ADSVKGRFSISRDNKNTLYLQMNSLKPE EDTAVYYC <u>AKGPREATDIRSWGQGTQVTSS</u>
C570	C570.VH, SEQ ID NO: 111: EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKG LEWVSD <u>DTSGTTTDY</u> ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPE DTAVYYC <u>AKGPREATDIRSWGQGTQVTSS</u>
570h3	570h3.VH, SEQ ID NO 223: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKG LEWVSD <u>DTSGTTTDY</u> ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYC <u>AKGPREATDIRSWGQGTQVTSS</u>
C446	C446.VH, SEQ ID NO: 112: QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCKASGHIFFSYLLFWYRQPPGKERE LVATISSAGSSIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPE DTAVYYC <u>RTWPYNYWGQGLVTVSS</u>
C2811	C2811.VH, SEQ ID NO: 113:

[0528]

	QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGRTFADAAGWFRQVPGR DREWVAS <u>ISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDNKNTVCLQMNSLRAE</u> DTAVYHCA <u>AARNSGAPSSIVIAIEYWGQGTQVTSS</u>
C1778	C1778.VH, SEQ ID NO: 114: QVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRTFADAAGWFRQVPGR DREWVAS <u>ISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAE</u> DTAVYHCA <u>AARNSGAPSSIVIAIEYWGQGTQVTSS</u>
C1793	C1793.VH, SEQ ID NO: 115: QVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRAFADAAGWFRQVPGR DREWVAS <u>ISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAE</u> DTAVYHCA <u>AARNSGAPSSIVIAIEYWGQGTQVTSS</u>
C2855	C2855.VH, SEQ ID NO: 116: QVQLEESGGGLAQAGDSLRLTCAASGRTFADAAGWFRQVPGR NREWVAS <u>ISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAE</u> DTAVYHCA <u>AARNSGAPSSIVIAIEYWGQGTQVTSS</u>
C2713	C2713.VH, SEQ ID NO: 117: AVQLMESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRTFADAAGWFRQVPGR DREWVAS <u>ISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDIYAKNTVYLQMNSLRAE</u> DTAVYHCA <u>AARNSGAPSSIVIAIEYWGHTQVIVSS</u>
C2719	C2719.VH, SEQ ID NO: 118: QVQLVESGGGLVQAGGSLRLTCAASGRTFADAAGWFRQVPGR DREWVAS <u>ISRSGDTYYEDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPE</u> DTAVYHCA <u>AARNSGAPSSIVIAIEYWGQGTQVTSS</u>

[0529]

[0530] 표 6 본원에 제공된 항-PDL1 단일 도메인 항체의 CDR

항체	VH
C71	CDR1 (SEQ ID NO: 119) <u>GFTESAGFMV</u> CDR2 (SEQ ID NO: 120) <u>LVALIATPSGSTN</u> CDR3 (SEQ ID NO: 121) <u>NIRGYWG</u>
C71v38	CDR1 (SEQ ID NO: 122) <u>GFTESAGFMV</u> CDR2 (SEQ ID NO: 123) <u>VALIATPSGSTQ</u> CDR3 (SEQ ID NO: 124) <u>NIRGYWG</u>
C239	CDR1 (SEQ ID NO: 125) <u>GFTFNYFAMS</u> CDR2 (SEQ ID NO: 126)

[0531]

	<u>IDTGGTDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 127) <u>AKGPREATDIRS</u>
C492	CDR1 (SEQ ID NO: 128) <u>GFTFNYFAMS</u> CDR2 (SEQ ID NO: 129) <u>IDTGGTDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 130) <u>AKGPREATDIRS</u>
C570/570h3	CDR1 (SEQ ID NO: 131) <u>GFTFSSHAMS</u> CDR2 (SEQ ID NO: 132) <u>IDTSGTTT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 133) <u>AKGPREATDIRS</u>
C446	CDR1 (SEQ ID NO: 134) <u>GIIFSSYLLF</u> CDR2 (SEQ ID NO: 135) <u>ISSAGSSI</u> CDR3 (SEQ ID NO: 136) <u>RTWPYNY</u>
C2811	CDR1 (SEQ ID NO: 137) <u>GRTFADAAWG</u> CDR2 (SEQ ID NO: 138) <u>ISRSGDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 139) <u>AARNSGAPSSIVIAIEY</u>
C1778	CDR1 (SEQ ID NO: 140) <u>GRTFADAAWG</u> CDR2 (SEQ ID NO: 141) <u>ISRSGDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 142) <u>AARNSGAPSSIVIAIEY</u>
C1793	CDR1 (SEQ ID NO: 143) <u>GRAFADAAWG</u> CDR2 (SEQ ID NO: 144)

[0532]

	<u>ISRSGDT</u> CDR3 (SEQ ID NO: 145) <u>AARNSGAPSSIVIAEY</u>
C2855	CDR1 (SEQ ID NO: 146) <u>GRTFADAAWG</u>  CDR2 (SEQ ID NO: 147) <u>ISRSGDT</u>  CDR3 (SEQ ID NO: 148) <u>AARNSGAPSSIVIAEY</u>
C2713	CDR1 (SEQ ID NO: 149) <u>GRTFADAAWG</u>  CDR2 (SEQ ID NO: 150) <u>ISRSGDT</u>  CDR3 (SEQ ID NO: 151) <u>AARNSGAPSSIVIAEY</u>
C2719	CDR1 (SEQ ID NO: 152) <u>GRTFADAAWG</u>  CDR2 (SEQ ID NO: 153) <u>ISRSGDT</u>  CDR3 (SEQ ID NO: 154) <u>AARNSGAPSSIVIAEY</u>

[0533]

[0534]

특정 실시양태에서, PD-L1 결합 도메인은 서열식별번호: 107-118 및 223으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0535]

특정 실시양태에서, PD-L1 결합 도메인은 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만, PD-L1에 대한 특이적 결합은 보유한다. 특정 실시양태에서, 치환 또는 변형 중 적어도 1개는 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 CDR 서열 중 1개 이상 및/또는 비-CDR 서열 중 1개 이상에 존재한다.

[0536]

iv. 활성화 수용체-결합 도메인

[0537]

다중-특이적 분자는 활성화 수용체-결합 도메인을 추가로 포함한다. 본원에 사용된 용어 "활성화 수용체"는 면역 이펙터 세포 (예를 들어, 식세포작용 세포, 예컨대 대식세포) 상에서 발현되는 수용체 (예를 들어, FcγR)를 지칭하며, 이는 예를 들어 Fc 도메인에 대한 결합에 의한 활성화 시 면역 이펙터 세포 (예를 들어, 식세포작용 세포, 예컨대 대식세포)의 적어도 1종의 이펙터 기능 또는 염증유발 반응을 매개한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 면역 이펙터 세포는 SIRP-알파 및 활성화 수용체를 공동-발현한다.

[0538]

특정 실시양태에서, 활성화 수용체는 FcγR이고, 활성화 수용체-결합 도메인은 Fc 도메인이다. Fc 도메인은 대식세포 상의 Fc 수용체 (FcR)를 활성화시켜 수용체의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)에 의해 전파되는 인산화 캐스케이드를 구동할 수 있다. ITAM은 면역 이펙터 세포 상의 여러 활성화 수용체, 예컨대 FcR, T 세포 수용체 및 이뮤노글로불린 (Ig)의 세포질 꼬리에 존재하는 보존된 서열이다. ITAM은 쌍형성된 YXXL/I 모티프 (여기서 Y, L 및 I는 각각 티로신, 리신 및 이소류신을 지칭함)로 이루어지고 6 내지 8개의 아미노산의 규정된 간격으로 분리된 보존된 아미노산 서열 모티프를 특색으로 할 수 있다. ITAM 내의 잔기의 인산화는 식세포작용 활성화를 위한 여러 신호전달 분자를 동원한다. 따라서, 활성화 수용체는 ITAM-포함 세포내 식세포작용 신호전달 도메인을 통해 식세포작용을 유도하기 위해 결합되고 활성화될 수 있는, 면역 이펙터 세포 상에서 발현되는 임의의 수용체일 수 있다.

[0539]

다른 실시양태에서, 활성화 수용체는 상이한 식세포작용 신호전달 또는 메카니즘, 예컨대 Akt 매개된 신호전달 캐스케이드 (CD19, CD28, CSFR 또는 PDGFR 수용체를 포함), 식세포작용을 강화시키는 면역 이펙터 세포 (예를 들어, 대식세포) 상의 수용체 군의 클러스터링 (예를 들어, 인테그린 또는 셀렉틴을 포함), 또는 항원 매개된 세포독성 (FcDR1 (CD89) 수용체 또는 CD206을 포함)에 수반되는 수용체이다.

- [0540] 예를 들어, 이펙터 기능, 예컨대 식세포작용과 관련된 활성화 수용체는 결정화가능 단편  $\gamma$  수용체 (Fc  $\gamma$  R), TREM2, 렉틴, 스캐빈저 수용체 A1 (SRA1), MARCO, CD36, CD163, CD68, CD205, CD206, FcDR1, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CD64, CD32a, CD16a, CD89, CD19, CD28, CSFR, PDGFR, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, 렉틴 1, RAGE (SR-E1), LRP1, LRP2, ASGP, SR-PSOX, CXCL16, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), 및 CD169 수용체 또는 보체 수용체, 예컨대 CR1 및 CR3일 수 있다. 특정 실시양태에서, 활성화 수용체는 Fc  $\gamma$  R이다.
- [0541] 특정 실시양태에서, 활성화 시 염증유발 신호를 생성할 수 있는 활성화 수용체는 비제한적으로 PI3K, Fc  $\gamma$  R1, Fc  $\gamma$  R2A, Fc  $\gamma$  R2B2, Fc  $\gamma$  R2C, Fc  $\gamma$  R3A, BAH, Tyro3, Ax1, Traf6, Syk, MyD88, Zap70, Fc  $\epsilon$  R1, Fc  $\alpha$  R1, BAFF-R, DAP 12, NFAM1, MRC1, ItgB5, MERTK, ELMO, 및 CD79b를 포함한다.
- [0542] 본원에 사용된 용어 "활성화 수용체-결합 도메인"은 면역 이펙터 세포 상의 활성화 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 도메인 (예를 들어, 항체의 부분)을 지칭하고, 이러한 결합은 수용체의 활성화뿐만 아니라 그의 하류 신호전달 (예를 들어, 면역 세포의 이펙터 기능 또는 염증유발 반응)로 이어진다. 예를 들어, 활성화 수용체-결합 도메인은 항체 또는 그의 변이체의 Fc 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, Fc 도메인은 IgG1 또는 IgG4로부터 유래될 수 있다.
- [0543] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 활성화 수용체-결합 도메인은 결정화가능 단편  $\gamma$  수용체 (Fc  $\gamma$  R), TREM2, 렉틴, 스캐빈저 수용체 A1 (SRA1), MARCO, CD36, CD163, CD68, CD205, CD206, FcDR1, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CD64, CD32a, CD16a, CD89, CD19, CD28, CSFR, PDGFR, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, 렉틴 1, RAGE (SR-E1), LRP1, LRP2, ASGP, SR-PSOX, CXCL16, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), 및 CD169 수용체 또는 보체 수용체 (예컨대 CR1 및 CR3), PI3K, Fc  $\gamma$  R1, Fc  $\gamma$  R2A, Fc  $\gamma$  R2B2, Fc  $\gamma$  R2C, Fc  $\gamma$  R3A, BAH, Tyro3, Ax1, Traf6, Syk, MyD88, Zap70, Fc  $\epsilon$  R1, Fc  $\alpha$  R1, BAFF-R, DAP 12, NFAM1, MRC1, ItgB5, MERTK, ELMO, 및 CD79b로 이루어진 군으로부터 선택된 활성화 수용체에 결합하고 이를 활성화시킨다.
- [0544] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 활성화 수용체-결합 도메인은 대식세포 상의 Fc 수용체 (FcR), 예컨대 Fc  $\gamma$  RII를 활성화시키는 Fc 도메인 또는 그의 변이체를 포함한다.
- [0545] 특정 실시양태에서, 활성화 수용체-결합 도메인은 인간 IgG1 (hIgG1) 또는 인간 IgG4 (hIgG4)의 Fc 도메인을 포함하며, 그의 중쇄 불변 영역은 각각 하기에 제시된다:
- [0546] a) 중쇄 불변 영역 (hIgG4.S228P), 서열식별번호: 155 (CH1 영역의 서열은 볼드체 및 파상의 밑줄로 표시되고 (서열식별번호: 228), 힌지 영역의 서열은 이탤릭체이고 (서열식별번호: 229), Fc 영역의 서열은 밑줄표시됨 (서열식별번호: 230)):
- ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG**  
LYSLSSVVTVPSSSLGKTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV*ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL*  
*FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV*  
*SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVS*  
LTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0547]
- [0548] b) 중쇄 불변 영역 (hIgG1), 서열식별번호: 156 (CH1 영역의 서열은 볼드체 및 파상의 밑줄로 표시되고 (서열식별번호: 231), 힌지 영역의 서열은 이탤릭체이고 (서열식별번호: 232), Fc 영역의 서열은 밑줄표시됨 (서열식별번호: 233)):
- ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG**  
LYSLSSVVTVPSSSLGKTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV*EPKSCDKHTHCPPELGGPS*  
*VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY*  
*RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKN*  
QVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
- [0549]
- [0550] 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 또한 인간 경쇄 불변 영역 (CL), 예컨대 카파 쇠 및 람다 쇠를 포함할 수 있

으며, 그의 아미노산 서열은 하기에 제공된다:

[0551] 경쇄 불변 영역 (카파), 서열식별번호: 157:  
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS

[0552] KDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0553] 경쇄 불변 영역 (람다), 서열식별번호: 158:  
 GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK

[0554] QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0555] v. 다중-특이적 분자의 배위

[0556] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 결속체는 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다중 결합 도메인을 포함하는 재조합 단백질이며, 여기서 각각의 다중 결합 도메인은 SIRP알파, 활성화 수용체 또는 표적 항원에 대해 특이적 결합 친화도를 갖고, 1개 이상의 링커에 의해 서로 연결된다. 1개 이상의 링커는 서로 상보적 결합을 나타내는 동족 펩티드를 가질 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 결속체의 SIRP-알파 결합 도메인은 한 쌍의 동족 펩티드 중 제1과 융합되고, 본원에 제공된 결속체의 표적 항원 결합 도메인은 한 쌍의 동족 펩티드 중 제2와 융합되고; 따라서, SIRP-알파 결합 도메인 및 표적 항원 결합 도메인은 각각의 쌍의 동족 펩티드 사이의 상보적 결합을 통해 한 쌍의 동족 펩티드에 의해 연결될 수 있다.

[0557] 특정 실시양태에서, 동족 펩티드의 쌍은 항체 또는 그의 임의의 상보적 부분의 2개의 중쇄, 항체 또는 그의 임의의 상보적 부분의 서로 상보적인 경쇄 및 중쇄의 쌍, 서로 상보적 결합을 나타내는 류신 지퍼 도메인 (예를 들어, c-Fos 및 c-June 단백질의 결합 영역 내의 지퍼 서열), 또는 합성 커넥터를 통해 서로 특이적으로 결합하도록 설계된 합성 펩티드를 포함한다.

[0558] 본원에 제공된 결속체의 SIRP-알파 결합 도메인, 활성화 수용체 결합 도메인 및 표적 항원 결합 도메인은 또한 화학적 결합, 예컨대 가교 (예를 들어, BS2G 가교제 (비스[술포숙신이미딜] 글루타레이트), BS3 가교제 (비스[술포숙신이미딜] 수베레이트), 술포-DSS, DST 가교제 (디숙신이미딜 타르트레이트), BMPS (N-(B-말레이미도프로필옥시) 숙신이미드 에스테르; MBS 가교제 (m말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르); 또는 PDPH 가교제 (3-[2-피리딜디티오]프로피오닐히드라지드))를 통해 연결될 수 있다.

[0559] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 SIRP-알파 결합 도메인 및 활성화 수용체-결합 도메인이 근접하여 본원에 제공된 다중-특이적 분자가 동일한 면역 이펙터 세포 상에서 공동-발현된 SIRP-알파 및 활성화 수용체 둘 다에 결합하는 것을 허용하도록 구성된다. 본원에 사용된 용어 SIRP-알파 결합 도메인과 활성화 수용체-결합 도메인 사이에 "근접하여"는 동일한 면역 이펙터 세포 상의 2개의 도메인이 면역 이펙터 세포 상에서 각각 공동-발현된 SIRP-알파 및 활성화 수용체에 결합하는 것을 가능하게 하는, 3차원 관점으로부터의 2개의 도메인 사이의 상대 위치를 지칭한다. 동일한 면역 이펙터 세포 상에서 공동-발현되는 SIRP-알파 및 활성화 수용체 각각에 대한 SIRP-알파 결합 도메인 및 활성화 수용체-결합 도메인의 특이적 결합은, 예를 들어 공초점 현미경검사, 형광 공명 에너지 전달 (FRET) 또는 단일-분자 초해상도 현미경검사에 의해 검출될 수 있다.

[0560] 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 표적 항원 결합 도메인은 표적 항원에 결합하는 항체 도메인 또는 항체 모방체 도메인을 포함할 수 있다. 용어 "항체 도메인" 및 용어 "항체 모방체 도메인"은 상기 정의된다.

[0561] 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 항체 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 항체 도메인)은 활성화 수용체-결합 도메인 (예를 들어, Fc 도메인)의 N-말단에 연결된다. 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 항체 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 항체 도메인)은 Fab 도메인을 포함하고, 임의로 Fab 도메인은 활성화 수용체-결합 도메인 (예를 들어, Fc 도메인)의 N-말단 중 1개에 연결된 중쇄를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 각각 Fab 도메인을 포함하는 2개의 표적 항원 결합 항체 도메인을 포함하고, 임의로 각각의 Fab 도메인은 각각 활성화 수용체-결합 도메인 (예를 들어, Fc 도메인)의 각각의 N-말단에 연결된 중쇄를 포함한다.

[0562] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은 활성화 수용체-결합 도메인 (예를 들어, Fc 도메인) 또는 표적 항원 결합 항체 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 항체 도메인)에 연결된다.

[0563] 특정 실시양태에서, SIRP-알파 결합 도메인은 활성화 수용체-결합 도메인 (예를 들어, Fc 도메인)의 C-말단에 연결된다. 이러한 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 표적 항원 결합 항체를 포함하며, 여기서

SIRP-알과 결합 도메인은 표적 항원 결합 항체의 Fc 영역의 C-말단에 연결된다. 예시적 실시양태는, 예를 들어 도 2b, 6f 및 6g에서 확인된다.

- [0564] 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 항체 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 항체 도메인) 및 SIRP-알과 결합 도메인 둘 다는 활성화 수용체-결합 도메인 (예를 들어, Fc 도메인)의 N-말단에 연결되며, 단 SIRP-알과 결합 도메인 및 표적 항원 결합 항체 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 항체 도메인)은 활성화 수용체-결합 도메인 (예를 들어, Fc 도메인)의 동일한 N-말단에는 연결되지 않는다. 예시적 실시양태는, 예를 들어 도 6e에서 확인된다.
- [0565] 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 도메인은 표적 항원 결합 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 Fab 도메인)의 경쇄의 C-말단에 연결된다. 예시적 실시양태는, 예를 들어 도 2a에서 확인된다.
- [0566] 본원에 제공된 다중-특이적 분자가 2개의 표적 항원 결합 항체 도메인을 포함하는 경우에, SIRP-알과 결합 도메인은 2개의 표적 항원 결합 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 Fab 도메인) 중 1개의 경쇄의 C-말단에 연결될 수 있고; SIRP-알과 결합 도메인은 또한 2개의 표적 항원 결합 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 Fab 도메인) 둘 다의 경쇄의 C-말단에 연결될 수 있다.
- [0567] 특정의 다른 실시양태에서, SIRP-알과 결합 항체 도메인은 활성화 수용체-결합 도메인 (예를 들어, Fc 도메인)의 N-말단에 연결된다. 특정 실시양태에서, SIRP-알과 결합 항체 도메인은 Fab 도메인을 포함하고, 임의로 Fab 도메인은 활성화 수용체-결합 도메인 (예를 들어, Fc 도메인)의 N-말단 중 1개에 연결된 중쇄를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 각각 Fab 도메인을 포함하는 2개의 SIRP-알과 결합 항체 도메인을 포함하고, 임의로 각각의 Fab 도메인은 각각 활성화 수용체-결합 도메인 (예를 들어, Fc 도메인)의 각각의 N-말단에 연결된 중쇄를 포함한다. 이러한 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 SIRP-알과 결합 항체를 포함한다. 특정의 이들 실시양태에서, 표적 항원 결합 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 도메인)은 활성화 수용체-결합 도메인 (예를 들어, Fc 도메인) 또는 SIRP-알과 결합 항체 도메인에 연결된다.
- [0568] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 SIRP-알과 결합 항체를 포함하며, 여기서 표적 항원 결합 도메인은 SIRP-알과 결합 항체의 Fc 영역의 C-말단에 연결되거나 (예를 들어, 도 2d, 6b 참조), 또는 SIRP-알과 결합 항체의 경쇄의 C-말단에 연결된다 (예를 들어, 도 2c 및 6a 참조).
- [0569] 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 도메인)은 SIRP-알과 결합 Fab 도메인의 경쇄의 C-말단에 연결된다. 예시적 실시양태는, 예를 들어 도 6a에서 확인된다. 특정 실시양태에서, 표적 항원 결합 도메인 (예를 들어, 종양 항원 결합 도메인)은 SIRP-알과 결합 Fab 도메인의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 연결된다. 예시적 실시양태는, 예를 들어 도 6c 및 6d에서 확인된다.
- [0570] 본원에 사용된 용어 "연결된"은 2개의 성분 사이의 공유 또는 비-공유 상호작용 (예를 들어, 수소 결합, 이온 결합, 반 데르 발스 상호작용 및 소수성 결합)을 지칭한다.
- [0571] 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 배위가 하기 표 7에 요약된다.

[0572] 표 7: 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 배위

BiME	결합 도메인	형태	결합 도메인이 유래된 항체	배위	BiME를 구성하는 폴리펩티드쇄
ES028-001 (도 2a)	클라우딘18.2-결합 도메인	항체	hu28.H1L2로부터 유래됨	항-클라우딘18.2 항체의 경쇄의 각각의 C 말단은 2개의 항-SIRP $\alpha$ scFv의 각각의 N 말단에 융합됨	<b>제1쇄:</b> VL (hu28.H1L2)-CL-링커-scFv (C25); <b>제2쇄:</b> VH (hu28.H1L2)-CH1-Fc
	SIPR알파-결합 도메인	scFv	C25로부터 유래됨		
ES028-005 (도 2b)	클라우딘18.2-결합 도메인	항체	hu28.H1L2로부터 유래됨	항-클라우딘18.2 항체의 중쇄의 각각의 C 말단은 2개의 항-SIRP $\alpha$ scFv의 각각의 N 말단에 융합됨	<b>제1쇄:</b> VL (hu28.H1L2)-CL; <b>제2쇄:</b> VH (hu28.H1L2)-CH1-Fc-링커-scFv (C25)
	SIPR알파-결합 도메인	scFv	C25로부터 유래됨		
ES028-009 (도 2c)	클라우딘18.2-결합 도메인	scFv	hu28.H1L2로부터 유래됨	항-SIRP $\alpha$ 항체의 경쇄의 각각의 C 말단은 2개의 항-클라우딘18.2 scFv의 각각의 N 말단에 융합됨	<b>제1쇄:</b> VL (C25)-CL-링커-scFv (hu28.H1L2); <b>제2쇄:</b> VH (C25)-CH1-Fc
	SIPR알파-결합 도메인	항체	C25로부터 유래됨		
ES028-013 (도 2d)	클라우딘18.2-결합 도메인	scFv	hu28.H1L2로부터 유래됨	항-SIRP $\alpha$ 항체의 중쇄의 각각의 C 말단은 2개의 항-클라우딘18.2 scFv의 각각의 N 말단에 융합됨	<b>제1쇄:</b> VL (C25)-CL; <b>제2쇄:</b> VH (C25)-CH1-Fc-링커-scFv (hu28.H1L2)
	SIPR알파-결합 도메인	항체	C25로부터 유래됨		

[0573]

ES019-020 (도 6a)	PD-L1-결합 도메인	sdAb	C71로부터 유래됨	항-SIRP $\alpha$ 항체의 경쇄의 각각의 C 말단은 2개의 항-PDL1 sdAb의 각각의 N 말단에 융합됨	<b>제1 쇠:</b> VL (C25)-CL-링커-sdAb (C71); <b>제2 쇠:</b> VH (C25)-CH1-Fc
	SIPR알파-결합 도메인	항체	C25로부터 유래됨		
ES019-024 (도 6b)	PD-L1-결합 도메인	sdAb	C71로부터 유래됨	항-SIRP $\alpha$ 항체의 중쇄의 각각의 C 말단은 2개의 항-PDL1 sdAb의 각각의 N 말단에 융합됨	<b>제1 쇠:</b> VL (C25)-CL; <b>제2 쇠:</b> VH (C25)-CH1-Fc-링커-sdAb (C71)
	SIPR알파-결합 도메인	항체	C25로부터 유래됨		
ES019-025 (도 6c)	PD-L1-결합 도메인	sdAb	C71로부터 유래됨	항-SIRP $\alpha$ 항체의 중쇄의 각각의 N 말단은 2개의 항-PDL1 sdAb의 각각의 C 말단에 융합됨	<b>제1 쇠:</b> VL (C25)-CL; <b>제2 쇠:</b> sdAb (C71)-링커-VH (C25)-CH1-Fc
	SIPR알파-결합 도메인	항체	C25로부터 유래됨		
ES019-026 (도 6d)	PD-L1-결합 도메인	sdAb	C71로부터 유래됨	항-SIRP $\alpha$ 항체의 경쇄의 각각의 N 말단은 2개의 항-PDL1 sdAb의 각각의 C 말단에 융합됨	<b>제1 쇠:</b> sdAb (C71)-링커-VL (C25)-CL; <b>제2 쇠:</b> VH (C25)-CH1-Fc
	SIPR알파-결합 도메인	항체	C25로부터 유래됨		
ES019-029 (도 6e)	PD-L1-결합 도메인	sdAb	C71로부터 유래됨	SIRP $\alpha$ 를 표적화하는 1개의 Fab 아암, 및 2개의 항-PDL1 sdAb를 함유하는 다른 아암을 갖는 1개의 비대칭 항체;	<b>제1 쇠:</b> sdAb (C71)-링커-sdAb (C71)-링커-Fc; <b>제2 쇠:</b> VH (C25)-CH1-Fc; <b>제3 쇠:</b> VL (C25)-CL
	SIPR알파-결합 도메인	1개의 Fab 아암을 갖는 비대칭 항체	C25로부터 유래됨		

[0574]

				이종이량체는 Fc 영역의 노브-인 홀들연변이에 의해 연결됨	
ES019-072 (도 6f)	PD-L1-결합 도메인	sdAb	C71로부터 유래됨	2개의 항-PDL1 sdAb의 C 말단이 Fc의 N-말단에 융합되고, 1개의 항-SIRP $\alpha$ Fab의 N 말단이 Fc의 C-말단에 융합된 1개의 비대칭 항체; 이종이량체는 Fc 영역의 노브-인 홀들연변이에 의해 연결됨	<b>제1쇄:</b> sdAb (C71)-링커-Fc; <b>제2쇄:</b> sdAb (C71)-링커-Fc-VH (C25)-CH1; <b>제3쇄:</b> VL (C25)-CL
	SIRP알파-결합 도메인	Fab	C25로부터 유래됨		
ES019-073 (도 6g)	PD-L1-결합 도메인	sdAb	C71로부터 유래됨	2개의 항-PDL1 sdAb의 C 말단이 Fc의 N-말단에 융합되고, 2개의 항-SIRP $\alpha$ Fab의 N-말단이 Fc의 C-말단에 융합된 1개의 비대칭 항체	<b>제1쇄:</b> VL (C25)-CL; <b>제2쇄:</b> sdAb (C71)-링커-Fc-VH (C25)-CH1
	SIRP알파-결합 도메인	Fab	C25로부터 유래됨		
ES019-079 (도 6g)	PD-L1-결합 도메인	sdAb	C570으로부터 유래됨	2개의 항-PDL1 sdAb의 C 말단이 Fc의 N-말단에 융합되고, 2개의 항-SIRP $\alpha$ Fab의 N-말단이 Fc의 C-말단에 융합된 1개의 비대칭 항체	<b>제1쇄:</b> VL (C25)-CL; <b>제2쇄:</b> sdAb (C570)-링커-Fc-VH (C25)-CH1
	SIRP알파-결합 도메인	Fab	C25로부터 유래됨		

[0575]

[0576] B. 다중-특이적 분자

[0577] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 본원에 제공된 SIRP-알파 결합 도메인, Fc 도메인을 포함하는 본원에 제공된 활성화 수용체-결합 도메인, 및 본원에 제공된 표적 항원 결합 도메인을 포함한다.

[0578] 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 임의의 적합한 포맷일 수 있다. 예시적인 예는 하기와 같이 제공된다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 표적 항원-결합 항체를 포함하고, 여기서 각각의 경쇄의 C-말단은 항-SIRP $\alpha$  scFv (즉, SIRP $\alpha$  결합 도메인)에 융합된다. 표적 항원-결합 항체는 표적 항원 결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 2a에 제시된다.

[0579] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 표적 항원-결합 항체를 포함하고, 여기서 각각의 중쇄의 C-말단은 항-SIRP $\alpha$  scFv (즉, SIRP $\alpha$  결합 도메인)에 융합된다. 표적 항원-결합 항체는 표적 항원 결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 2b에 제시된다.

[0580] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 경쇄의 C-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 scFv (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 2c에 제시된다.

[0581] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 중쇄의 C-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 scFv (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 2d에 제시된다.

- [0582] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 경쇄의 C-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 (sdAb) (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6a에 제시된다.
- [0583] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 중쇄의 C-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 (sdAb) (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6b에 제시된다.
- [0584] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 중쇄의 N-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 (sdAb) (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6c에 제시된다.
- [0585] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 항-SIRP $\alpha$  항체를 포함하고, 여기서 각각의 경쇄의 N-말단은 표적 항원에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 (sdAb) (즉, 표적 항원 결합 도메인)에 융합된다. 항-SIRP $\alpha$  항체는 SIRP $\alpha$  결합 도메인 및 Fc 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6d에 제시된다.
- [0586] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 각각 표적 항원에 결합할 수 있는 항-SIRP $\alpha$  결합 도메인 (예를 들어 Fab) 및 단일 도메인 항체 (sdAb)를 포함하고, 이들 각각은 Fc 도메인의 폴리펩티드 쇄의 N 말단에 융합된다. 예시적인 예가 도 6e에 제시된다.
- [0587] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 Fc 도메인의 폴리펩티드 쇄의 N 말단에 융합된 표적 항원에 결합할 수 있는 단일 도메인 항체 (sdAb)를 각각 포함하는 2개의 중쇄를 포함하고, Fc 도메인의 폴리펩티드 쇄 중 1개의 C 말단에 융합된 적어도 1개의 항-SIRP $\alpha$  결합 도메인을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 Fc 도메인의 폴리펩티드 쇄 중 1개의 C 말단에 융합된 1개의 항-SIRP $\alpha$  결합 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6f에 제시된다.
- [0588] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 각각이 Fc 도메인의 폴리펩티드 쇄 중 1개의 C 말단에 융합된 2개의 항-SIRP $\alpha$  결합 도메인을 포함한다. 예시적인 예가 도 6g에 제시된다.
- [0589] 특정 실시양태에서, 표적 결합 도메인은 클라우딘18.2 결합 도메인 또는 PD-L1-결합 도메인이다.
- [0590] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 서열식별번호: 23-64 중 1개 이상 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 CDR 서열을 포함하는 SIRP $\alpha$ -결합 도메인 (C25, hu025.021, hu025.033, hu025.023, hu025.059, hu025.060, C15, C42, C59 및 C73으로부터 유래됨), 서열식별번호: 77-106 및 225 중 1개 이상 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 CDR 서열을 포함하는 클라우딘18.2-결합 도메인 (hu26.H1L1, hu26.H1L2, hu26.H1L2 (S92A), hu26.H3L1, hu26.H3L2, hu28.H1L2, C10, C29 및 C30으로부터 유래됨), 및/또는 서열식별번호: 119-154 및 223 중 1개 이상 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 CDR 서열을 포함하는 PD-L1-결합 도메인 (C71, C71v38, C239, C492, C570, 570h3, C446, C2811, C1778, C1793, C2855, C2713 및 C2719로부터 유래됨)을 포함한다.
- [0591] 특정 실시양태에서, SIRP $\alpha$ /클라우딘18.2/PD-L1-결합 도메인은 항체 도메인 또는 항체 모방체 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항체 도메인은 Fab, VHH, 단일 쇄 Fv (scFv), 디아바디, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv 단편, 디설피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디설피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), F(ab)<sub>2</sub>, scFv 이량체 (2가 디아바디), 낙타화 단일 도메인 항체 (adAb), 나노바디, 테트라바디, 도메인 항체, 또는 2가 도메인 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항체 모방체 도메인은 인트라바디 (예를 들어, 피브로넥틴 도메인), 모노바디, 선형 펩티드, 단백질 A의 Z 도메인 (아피바디), 감마-B 결정질 도메인, 유비퀴틴 도메인, 시스타틴 도메인, Sac7d 도메인, 삼중 나선 코일드 코일 도메인, 리포칼린 도메인, 막 수용체의 A 도메인, 안키린 반복 모티프, Fyn의 SH3 도메인, 프로테아제 억제제의 쿠니츠 도메인, 피브로넥틴의 유형 III 도메인 (미니바디), DARPin 도메인, 또는 탄수화물 결합 모듈 32-2로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0592] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는
- [0593] a) 서열식별번호: 23의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 24의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 25의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 27의 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 SIRP α-결합 도메인;
- [0594] b) i) 서열식별번호: 83의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 84의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 85의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 및/또는 서열식별번호: 86의 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 87의 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 88의 서열을 포함하는 경쇄 CDR3, 또는
- [0595] ii) 서열식별번호: 77의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 78의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 79의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 및/또는 서열식별번호: 80의 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열식별번호: 81의 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 223의 서열을 포함하는 경쇄 CDR3
- [0596] 을 포함하는 클라우딘18.2-결합 도메인; 및/또는
- [0597] c) i) 서열식별번호: 119의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 120의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 121의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3, 또는
- [0598] ii) 서열식별번호: 131의 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열식별번호: 132의 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열식별번호: 133의 서열을 포함하는 중쇄 CDR3
- [0599] 을 포함하는 PD-L1-결합 도메인을 포함한다.
- [0600] 특정 실시양태에서, SIRP α-결합 도메인은 서열식별번호: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 및 21로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 SIRP α (예를 들어, 인간 SIRP α)에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하는 그의 상동 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 및 22로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 SIRP α (예를 들어, 인간 SIRP α)에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하는 그의 상동 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0601] 특정 실시양태에서, SIRP α-결합 도메인은 항-SIRP α scFv를 포함한다. 특정 실시양태에서, scFv는 N 말단에서 C 말단으로 중쇄 가변 영역이 임의로 링커 (예를 들어 폴리펩티드 링커)를 통해 경쇄 가변 영역에 연결된 것을 포함한다. 대안적으로, 특정 실시양태에서, scFv는 N 말단에서 C 말단으로 경쇄 가변 영역이 임의로 링커 (예를 들어 폴리펩티드 링커)를 통해 중쇄 가변 영역에 연결된 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-SIRP α scFv는 서열식별번호: 226의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0602] 특정 실시양태에서, 클라우딘18.2-결합 도메인은 서열식별번호: 65, 68, 69, 71, 73 및 75로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 클라우딘18.2 (예를 들어 인간 클라우딘18.2)에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하는 그의 상동 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열식별번호: 66, 67, 70, 72, 74, 76 및 224로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 클라우딘 18.2 (예를 들어 인간 클라우딘18.2)에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하는 그의 상동 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0603] 특정 실시양태에서, 클라우딘18.2-결합 도메인은 항-클라우딘18.2 scFv를 포함한다. 특정 실시양태에서, scFv는 N 말단에서 C 말단으로 중쇄 가변 영역이 임의로 링커 (예를 들어 폴리펩티드 링커)를 통해 경쇄 가변 영역에 연결된 것을 포함한다. 대안적으로, 특정 실시양태에서, scFv는 N 말단에서 C 말단으로 경쇄 가변 영역이 임의로 링커 (예를 들어 폴리펩티드 링커)를 통해 중쇄 가변 영역에 연결된 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-클라우딘18.2 scFv는 서열식별번호: 227의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0604] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 107-118 및 223으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 또는 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 PD-L1 (예를 들어 인간 PD-L1)에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하는 그의 상동 서열을 포함한다.
- [0605] 다양한 기술이 이러한 항원-결합 도메인의 생산에 사용될 수 있다. 예시적인 방법은 무손상 항체의 효소적 소화 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); 및 Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조), 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이(E. Coli)에 의한

재조합 발현 (예를 들어, Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편의 경우), 및 상기 논의된 바와 같은 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 스크리닝 (예를 들어, ScFv의 경우)을 포함한다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0606] 특정 실시양태에서, SIRP $\alpha$ -결합 도메인 및/또는 클라우딘18.2-결합 도메인은 scFv 또는 Fab이거나 또는 이를 포함한다. scFv의 생성은 예를 들어 WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 5,587,458에 기재되어 있다. scFv는 이펙터 단백질에 아미노 또는 카르복실 말단에서 융합되어 융합 단백질을 제공할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck] 참조). scFv는 VL에 직접적으로 또는 펩티드 링커를 통해 연결된 VH를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, VH는 scFv의 N-말단에 있을 수 있고, VL은 C-말단에 있을 수 있다. 특정 실시양태에서, VL은 scFv의 N-말단에 있을 수 있고, VH는 C-말단에 있을 수 있다.

[0607] 특정 실시양태에서, SIRP알파-결합 도메인, 표적 항원-결합 도메인 (예를 들어, 클라우딘18.2-결합 도메인/PD-L1-결합 도메인), 및 활성화 수용체-결합 도메인은 펩티드 링커를 통해 연결된다. 펩티드 링커는 트레오닌/세린 및 글리신으로 구성된 단일 또는 반복 서열, 예컨대 TGGGG (서열식별번호: 183), GGGGS (서열식별번호: 184), GGGSGGGGS (서열식별번호: 185), (Gly4Ser)<sub>3</sub> (서열식별번호: 186) 또는 SGGGG (서열식별번호: 187) 또는 그의 탠덤 반복부 (예를 들어, 2, 3, 4개 또는 그 초과)의 반복부)를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 펩티드 링커는 GGGSGGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 34)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 링커는 (Gly4Ser)<sub>3</sub> (서열식별번호: 186)이거나 또는 이를 포함한다.

[0608] C. 다중-특이적 분자의 특징화

[0609] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 인간 SIRP알파 및 CD47-발현 세포 표면 마커 (예를 들어, CD47-발현 세포의 표면 상에서 발현되는 인간 클라우딘18.2 또는 PD-L1) 둘 다에 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 인간 SIRP알파 및 인간 클라우딘18.2/인간 PD-L1 둘 다에 대해 특이적 결합 친화도를 보유하고, 특정 실시양태에서 이는 상기 측면의 모 항체와 적어도 대등하거나 또는 심지어 그보다 더 우수하다.

[0610] 다중-특이적 분자의 결합은 "반수 최대 유효 농도" (EC<sub>50</sub>) 값으로 나타내어질 수 있으며, 이는 그의 최대 효과 (예를 들어, 결합 또는 억제 등)의 50%가 관찰되는 항체의 농도를 지칭한다. EC<sub>50</sub> 값은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 샌드위치 검정, 예컨대 ELISA, 웨스턴 블롯, 유동 세포측정 검정, 및 다른 결합 검정에 의해 측정될 수 있다.

[0611] 본원에 제공된 항원-결합 도메인의 결합 친화도는 또한 K<sub>D</sub> 값에 의해 나타내어질 수 있으며, 이는 항원과 항원-결합 분자 사이의 결합이 평형에 도달하였을 때의 해리율 대 회합률의 비 (k<sub>off</sub>/k<sub>on</sub>)를 나타낸다. 항원-결합 친화도 (예를 들어 K<sub>D</sub>)는, 예를 들어 유동 세포측정 검정을 포함한 관련 기술분야에 공지된 적합한 방법을 사용하여 적절하게 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상이한 농도에서의 항원에 대한 항원-결합 도메인의 결합은 유동 세포측정법에 의해 결정될 수 있고, 결정된 평균 형광 강도 (MFI)는 먼저 항원-결합 도메인의 농도에 대해 플롯팅될 수 있고, 이어서 프리즘 버전 5 (그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software), 캘리포니아주 샌디에고)를 사용하여 특이적 결합 형광 강도 (Y) 및 항체의 농도 (X)의 의존성을 1개의 부위 포화 방정식:  $Y=B_{max} * X / (K_D + X)$ 에 피팅함으로써 K<sub>D</sub> 값이 계산될 수 있으며, 여기서 B<sub>max</sub>는 항원에 대한 시험된 항원-결합 도메인의 최대 특이적 결합을 지칭한다.

[0612] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 인간 SIRP알파에, 옥텟 검정에 의해 측정 시 25x10<sup>-8</sup> M, 20x10<sup>-8</sup> M, 15x10<sup>-8</sup> M, 12x10<sup>-8</sup> M, 10x10<sup>-8</sup> M, 9x10<sup>-8</sup> M, 8x10<sup>-8</sup> M, 7x10<sup>-8</sup> M, 6x10<sup>-8</sup> M, 5x10<sup>-8</sup> M, 4x10<sup>-8</sup> M, 3x10<sup>-8</sup> M, 2x10<sup>-8</sup> M, 또는 1x10<sup>-8</sup> M 이하의 결합 친화도 (K<sub>D</sub>)로 특이적으로 결합한다.

[0613] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 인간 클라우딘18.2에, 옥텟 검정에 의해 측정 시 1x10<sup>-12</sup> M 이하의 결합 친화도 (K<sub>D</sub>)로 특이적으로 결합한다.

[0614] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 인간 PD-L1에, 옥텟 검정에 의해 측정 시 70x10<sup>-8</sup> M, 65x10<sup>-8</sup> M, 60x10<sup>-8</sup> M, 55x10<sup>-8</sup> M, 50x10<sup>-8</sup> M, 45x10<sup>-8</sup> M, 40x10<sup>-8</sup> M, 35x10<sup>-8</sup> M, 30x10<sup>-8</sup> M, 25x10<sup>-8</sup> M, 20x10<sup>-8</sup> M,

$15 \times 10^{-8}$  M,  $12 \times 10^{-8}$  M,  $10 \times 10^{-8}$  M,  $9 \times 10^{-8}$  M,  $8 \times 10^{-8}$  M,  $7 \times 10^{-8}$  M,  $6 \times 10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $4 \times 10^{-8}$  M,  $3 \times 10^{-8}$  M,  $2 \times 10^{-8}$  M, 또는  $1 \times 10^{-8}$  M 이하의 결합 친화도 ( $K_D$ )로 특이적으로 결합한다.

[0615] CD47 및 SIRP알과 상호작용 또는 PD-1 및 PD-L1 상호작용에 대한 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 차단 효과는 다양한 기술, 예컨대 루시페라제 리포터 검정, 경쟁적 ELISA 검정 및 경쟁적 FACS 검정에 의해 측정될 수 있으며, 이는 IC50으로 표현될 수 있다. CD47 및 SIRP알과 상호작용의 차단에 대한 IC50은 SIRP알과에 대한 CD47의 결합이 본 개시내용의 다중-특이적 분자의 존재 하에 50%만큼 감소되는, 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 농도를 나타낸다. PD-1 및 PD-L1 상호작용의 차단에 대한 IC50은 PD-L1에 대한 PD-1의 결합이 본 개시내용의 다중-특이적 분자의 존재 하에 50%만큼 감소되는, 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 농도를 나타낸다. 특정 실시양태에서, PD-1 및 PD-L1 상호작용의 차단에 대한 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 IC50은 항-PD-1 C71의 것과 대등하다.

[0616] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 SIRP-알과 결합 도메인은 SIRP-알과 및 CD47 상호작용의 차단에 대해 경쟁적 ELISA 검정 또는 경쟁적 FACS 검정에 의해 측정 시 6.0 nM, 5.0 nM, 4.0 nM, 3.80 nM, 3.60 nM, 3.0 nM, 2.90 nM, 2.88 nM, 2.86 nM, 2.80 nM, 2.78 nM, 2.76 nM, 2.74 nM, 2.70 nM, 2.64 nM, 2.40 nM, 2.20 nM, 2.0 nM, 1.0 nM, 0.4 nM, 0.3 nM, 0.2 nM, 0.18 nM, 0.16 nM, 0.14 nM, 0.12 nM 이하의 IC50 값을 갖는다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 SIRP-알과 결합 도메인은 SHP-1 동원 차단에 대해 경쟁적 ELISA 검정 또는 경쟁적 FACS 검정에 의해 측정 시 6.0 nM 이하, 5.0 nM 이하, 4.0 nM 이하, 3.80 nM 이하, 3.60 nM 이하, 3.0 nM 이하, 2.90 nM 이하, 2.88 nM 이하, 2.86 nM 이하, 2.80 nM 이하, 2.78 nM 이하, 2.76 nM 이하, 2.74 nM 이하, 2.70 nM 이하, 2.64 nM 이하, 2.40 nM 이하, 2.20 nM 이하, 2.0 nM 이하, 1.0 nM 이하, 0.4 nM 이하, 0.3 nM 이하, 0.2 nM 이하, 0.18 nM 이하, 0.16 nM 이하, 0.14 nM 이하, 0.12 nM 이하, 0.10 nM 이하, 0.09 nM 이하, 0.08 nM 이하 또는 0.07 nM 이하의 IC50 값을 갖는다.

[0617] D. 변이체

[0618] 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 또한 그의 다양한 변이체를 포괄한다. 특정 실시양태에서, 변이체는 표 2, 4 및 6에 제공된 바와 같이 1개 이상의 CDR 서열, 표 1, 3 및 5에 제공된 1개 이상의 가변 영역 서열 (그러나 어떠한 CDR 서열에서도 그렇지 않음), 및/또는 불변 영역 (예를 들어 Fc 영역)에 1개 이상의 변형 또는 치환을 포함한다. 이러한 변이체는 그의 모 항체의 SIRP  $\alpha$ , 클라우딘18.2 및/또는 PD-L1에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하지만, 변형(들) 또는 치환(들)에 의해 부여되는 1가지 이상의 바람직한 특성을 갖는다. 예를 들어, 변이체는 개선된 항원-결합 친화도, 개선된 생산성, 개선된 안정성, 개선된 글리코실화 패턴, 감소된 글리코실화 위험, 감소된 탈아미노화, 감소 또는 고갈된 이펙터 기능(들), 개선된 FcRn 수용체 결합, 증가된 약동학적 반감기, pH 감수성, 및/또는 접합에 대한 상용성 (예를 들어 1개 이상의 도입된 시스테인 잔기)을 가질 수 있다.

[0619] 모 항체 서열은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"을 사용하여, 변형 또는 치환될 적합한 또는 바람직한 잔기를 확인하기 위해 스크리닝될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085] 참조). 간략하게, 표적 잔기 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 Arg, Asp, His, Lys 및 Glu)를 확인하고, 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (예를 들어, 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체하고, 변형된 항체를 생산하고, 관심 특성에 대해 스크리닝할 수 있다. 특정한 아미노산 위치에서의 치환이 관심 기능적 변화를 입증하는 경우에, 위치는 변형 또는 치환을 위한 잠재적 잔기로서 확인될 수 있다. 잠재적 잔기는 상이한 유형의 잔기 (예를 들어 시스테인 잔기, 양으로 하전된 잔기 등)로 치환함으로써 추가로 평가될 수 있다.

[0620] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 SIRP  $\alpha$ -결합 도메인, 클라우딘18.2-결합 도메인 및/또는 PD-L1 결합 도메인은 1개 이상의 CDR 서열 및/또는 1개 이상의 FR 서열 및/또는 1개 이상의 가변 영역 서열에 1개 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 변이체는 CDR 서열 및/또는 FR 서열 및/또는 1개 이상의 가변 영역 서열에 총 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 치환을 포함한다.

[0621] 특정 실시양태에서, SIRP  $\alpha$ -결합 도메인은 서열식별번호: 23-64 및 198로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 서열에 대해 적어도 80% (예를 들어, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 한편, SIRP  $\alpha$ 에 대한 결합 친화도를 그의 모 항체와 유사하거나 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준으로 보유하는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR 서열을 포함한다.

- [0622] 특정 실시양태에서, SIRP $\alpha$ -결합 도메인은 서열식별번호: 1-22로부터 선택된 1개 이상의 서열에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 한편, SIRP $\alpha$ 에 대한 결합 친화도를 그의 모 항체와 유사하거나 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준으로 보유하는 1개 이상의 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 1-22로부터 선택된 가변 영역 서열에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (예를 들어, FR에서) 발생한다.
- [0623] 특정 실시양태에서, 클라우딘18.2-결합 도메인은 서열식별번호: 77-106 및 225로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 서열에 대해 적어도 80% (예를 들어, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 한편, SIRP $\alpha$ 에 대한 결합 친화도를 그의 모 항체와 유사하거나 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준으로 보유하는 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR 서열을 포함한다.
- [0624] 특정 실시양태에서, 클라우딘18.2-결합 도메인은 서열식별번호: 65-76 및 224로부터 선택된 1개 이상의 서열에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 한편, 클라우딘18.2에 대한 결합 친화도를 그의 모 항체와 유사하거나 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준으로 보유하는 1개 이상의 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 65-76 및 224로부터 선택된 가변 영역 서열에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (예를 들어, FR에서) 발생한다.
- [0625] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 119-154로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 서열에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 한편, PD-L1에 대한 결합 친화도를 그의 모 항체와 유사하거나 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준으로 보유하는 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함한다.
- [0626] 특정 실시양태에서, PD-L1-결합 도메인은 서열식별번호: 107-118 및 223으로부터 선택된 1개 이상의 서열에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 한편, PD-L1에 대한 결합 친화도를 그의 모 항체와 유사하거나 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준으로 보유하는 1개 이상의 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 107-118 및 223으로부터 선택된 가변 영역 서열에서 총 1 내지 10개의 아미노산이 치환, 삽입 또는 결실되었다. 일부 실시양태에서, 치환, 삽입 또는 결실은 CDR 외부의 영역에서 (예를 들어, FR에서) 발생한다.
- [0627] i. 글리코실화 변이체
- [0628] 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 또한 다중-특이적 분자의 항원-결합 도메인 또는 활성화-수용체 도메인의 글리코실화 정도를 증가 또는 감소시키기 위해 수득될 수 있는 글리코실화 변이체를 포괄한다.
- [0629] 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 탄수화물 모이어티 (예를 들어 올리고사카라이드 구조)가 부착될 수 있는 측쇄를 갖는 1개 이상의 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 항체 항원-결합 도메인의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 아스파라긴 잔기, 예를 들어 트리펩티드 서열, 예컨대 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌의 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 모이어티의 부착을 지칭하며, 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 1개가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착된 것을 지칭한다. 천연 글리코실화 부위의 제거는, 예를 들어 서열 내에 존재하는 상기 기재된 트리펩티드 서열 중 1개 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우) 또는 세린 또는 트레오닌 잔기 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우)가 치환되도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성될 수 있다. 새로운 글리코실화 부위는 이러한 트리펩티드 서열 또는 세린 또는 트레오닌 잔기를 도입함으로써 유사한 방식으로 생성될 수 있다.
- [0630] ii. 시스테인-조작된 변이체
- [0631] 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 또한 1개 이상의 도입된 유리 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 시스테인-조작된 변이체를 포괄한다.
- [0632] 유리 시스테인 잔기는 디설피드 가교의 일부가 아닌 것이다. 시스테인-조작된 변이체는 조작된 시스테인의 부위에서, 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통해, 예를 들어 특히 세포독성 및/또는 영상화 화합물, 표지 또는 방사성동위원소와의 접합에 유용하다. 유리 시스테인 잔기를 도입하기 위해 항체 폴리펩티드를 조작하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 WO2006/034488을 참조한다.

- [0633] iii. Fc 변이체
- [0634] 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 또한, 예를 들어 변경된 이펙터 기능, 예컨대 ADCC, ADCP 및 CDC를 제공하기 위해 그의 Fc 영역 및/또는 힌지 영역에 1개 이상의 아미노산 잔기 변형 또는 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포함한다. 항체 조작에 의해 ADCC 활성을 변경시키는 방법은 관련 기술분야에 기재되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Shields RL. et al., J Biol Chem. 2001. 276(9): 6591-604; Idusogie EE. et al., J Immunol. 2000.164(8):4178-84; Steurer W. et al., J Immunol. 1995, 155(3): 1165- 74; Idusogie EE. et al., J Immunol. 2001, 166(4): 2571-5; Lazar GA. et al., PNAS, 2006, 103(11): 4005-4010; Ryan MC. et al., Mol. Cancer Ther., 2007, 6: 3009-3018; Richards JO., et al., Mol Cancer Ther. 2008, 7(8): 2517-27; Shields R. L. et al., J. Biol. Chem, 2002, 277: 26733-26740; Shinkawa T. et al., J. Biol. Chem, 2003, 278: 3466-3473]을 참조한다.
- [0635] 본원에 제공된 항체의 CDC 활성은 또한, 예를 들어 C1q 결합 및/또는 CDC를 개선 또는 감소시킴으로써 변경될 수 있다 (예를 들어, Fc 영역 변이체의 다른 예에 관한 W099/51642; 문헌 [Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 W094/29351 참조). Fc 영역의 아미노산 잔기 329, 331 및 322로부터 선택된 1개 이상의 아미노산을 상이한 아미노산 잔기로 대체하여 C1q 결합을 변경시키고/거나 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 감소 또는 폐지할 수 있다 (미국 특허 번호 6,194,551 (Idusogie et al.) 참조). 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 또한 도입하여 보체를 고정시키는 항체의 능력을 변경시킬 수 있다 (PCT 공개 WO 94/29351 (Bodmer et al.) 참조).
- [0636] 용어 "항체-의존성 세포성 식세포작용" 및 "ADCP"는 항체-코팅된 세포 또는 입자가 이뮤노글로불린 Fc 영역에 결합하는 식세포성 면역 세포 (예를 들어, 대식세포, 호중구 및 수지상 세포)에 의해 전체적으로 또는 부분적으로 내재화되는 과정을 지칭한다. 항체 조작에 의해 항체의 ADCP 활성을 변경시키는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Kellner C et al., Transfus Med Hemother, (2017)44:327-336 및 Chung AW et al., AIDS, (2014) 28:2523-2530]을 참조한다. Fc 변이체의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Wang et al., Protein Cell 2018, 9(1): 63-73 and Kang et al., Exp & Mol., Med. (2019) 51:138]을 참조하며, 이는 그 전문이 본원에 포함된다.
- [0637] i) 증진된 이펙터 기능을 갖는 Fc 변이체
- [0638] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 Fc 변이체는 야생형 Fc (예를 들어 IgG1의 Fc)에 비해 증가된 ADCC 및/또는 Fc $\gamma$  수용체 (예를 들어 Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ R II (CD32) 및/또는 Fc $\gamma$ R III (CD16))에 대한 증가된 친화도를 갖는다. 특정 실시양태에서, Fc 변이체는 Fc 영역의 하기 위치: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 300, 301, 303, 304, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 345, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 396, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439 및 440 중 1개 이상에서 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함하며 (WO 00/42072 (Presta), W02006/019447 (Lazar), 및 W02016/196228 참조, 그 전문은 본원에 포함됨), 여기서 Fc 영역 내의 잔기의 넘버링은 카바트에서와 같은 EU 인덱스의 것이다 (문헌 [Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)] 참조). 증가된 이펙터 기능을 위한 예시적인 치환은, 비제한적으로 234Y, 235Q, 236A, 236W, 239D, 239E, 239M, 243L, 247I, 268D, 267E, 268D, 268E, 268F, 270E, 280H, 290S, 292P, 298A, 298D, 298V, 300L, 305I, 324T, 326A, 326D, 326W, 330L, 330M, 333S, 332D, 332E, 298A, 333A, 334A, 334E, 326A, 247I, 339D, 339Q, 345R, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I, 396L, 430G, 440Y, 또는 그의 임의의 조합 (예컨대 239D/332E, 239D/332E/330L, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T, 및 267E/268F/324T)을 포함한다 (W02016/196228; 문헌 [Richards et al., (2008) Mol. Cancer Therap. 7:2517; Moore et al., (2010) mAbs 2:181; 및 Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 20:685-691] 참조).
- [0639] 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339에서의 특이적 돌연변이는 Fc $\gamma$ R III에 대한 결합을 개선시키는 것으로 밝혀졌다. 추가적으로, 하기 조합 돌연변이체는 Fc $\gamma$ R III 결합을 개선시키는 것으로 밝혀졌다: 하나의 중쇄에서 T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, S298A/E333A/K334A 및 L234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A 및 반대편 중쇄에서 D270E/K326D/A330M/K334E (증진된 Fc $\gamma$ R III 결합 및 ADCC 활성을 가짐). Fc $\gamma$ R IIIa에 대해 강하게 증진된 결합을 갖는 다른 Fc 변이체는 Fc $\gamma$ R IIIa에 대해

친화도에서의 최대 증가, Fc $\gamma$ RIIb 결합에서의 감소, 및 강한 세포독성 활성을 나타낸 S239D/I332E 및 S239D/I332E/A330L 돌연변이를 갖는 변이체, 및 Fc $\gamma$ RIIIa의 증진 및 병행 증진된 ADCC 활성을 표출한 L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I 및 P396L 돌연변이를 갖는 변이체를 포함한다. (문헌 [Lazar et al. (2006) Proc. Nat'l Acad Sci. (USA) 103:4005; Awan et al., (2010) Blood 115: 1204; Desjarlais & Lazar (2011) Exp. Cell Res, Stavenhagen et al., (2007) Cancer Res 67:8882] 참조). C1q에 대한 결합을 증가시키는 변형은 CDC 활성을 증진시키기 위해 도입될 수 있다. 예시적인 변형은 IgG2에서의 K326 (예를 들어, K326W) 및/또는 E333 변형, 또는 IgG1에서의 S267E/H268F/S324T 변형 단독 또는 임의의 조합을 포함한다 (문헌 [Idusogie et al., (2001) J. Immunol. 166:2571, Moore et al., (2010) mAbs 2: 181] 참조). 다른 예시적인 변형은 K326W/E333S, S267E/H268F/S324T, 및 E345R/E430G/S440Y를 포함한다.

[0640] ii) 감소된 이펙터 기능을 갖는 Fc

[0641] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 Fc 변이체는 야생형 Fc (예를 들어 IgG1의 Fc)에 비해 감소된 이펙터 기능을 갖고, Fc 영역의 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 267, 268, 269, 270, 297, 309, 318, 320, 322, 325, 328, 329, 330, 및 331로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함하며 (WO2016/196228; 문헌 [Richards et al., (2008) Mol. Cancer Therap. 7:2517; Moore et al., (2010) mAbs 2:181; 및 Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 20:685-691] 참조), 여기서 Fc 영역 내의 잔기의 넘버링은 카바트에서와 같은 EU 인덱스의 넘버링이다. 감소된 이펙터 기능을 위한 예시적인 치환은 비제한적으로 220S, 226S, 228P, 229S, 233P, 234V, 234G, 234A, 234F, 234A, 235A, 235G, 235E, 236E, 236R, 237A, 237K, 238S, 267R, 268A, 268Q, 269R, 297A, 297Q, 297G, 309L, 318A, 322A, 325L, 328R, 330S, 331S 또는 그의 임의의 조합을 포함한다 (WO2016/196228; 및 문헌 [Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 20:685-691] 참조).

[0642] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 Fc 변이체는 IgG1 이소형의 것이고, L234A, L234F, L234V, F234A, V234A, L235A, L235E, G237A, P238S, H268Q, H268A, N297A, N297Q, N297G, V309L, A330S 및 P331S, 또는 그의 임의의 조합 (예컨대 L234A/L235A)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 Fc 변이체는 IgG2 이소형의 것이고, H268Q, V309L, A330S, P331S, V234A, G237A, P238S, H268A 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 Fc 변이체는 IgG4 이소형의 것이고, S228P, F234A, L235E, L235A, G237A, E318A, N297A, N297Q, N297G 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0643] iii) FcRn에 대해 변경된 결합을 갖는 Fc

[0644] 특정 실시양태에서, Fc 변이체는 pH 6.0에서 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 결합 친화도를 개선시키면서 pH 7.4에서는 최소 결합을 보유하는 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 이러한 변이체는 이것이 리소솜에서의 분해로부터 탈출한 다음 전위되고 세포 밖으로 방출되도록 하는 산성 pH에서 FcRn에 결합하기 때문에 연장된 약동학적 반감기를 가질 수 있다. FcRn과의 결합 친화도를 개선시키기 위해 항체 및 그의 항원-결합 단편을 조작하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Vaughn, D. et al., Structure, 6(1): 63-73, 1998; Kontermann, R. et al., Antibody Engineering, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK, published by Springer, 2010; Yeung, Y. et al., Cancer Research, 70: 3269-3277 (2010); Hinton, P. et al., J. Immunology, 176:346-356 (2006); Petkova et al., (2006) Int. Immunol. 18:1759, Ball Acqua et al., Journal of Immunology 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua WF. et al., J Biol Chem. 281:23514-23524 (2006); Zalevsky J, et al., Nat Biotechnol.;28:157-159 (2010)]; WO 2009/086320; US 6,277,375; US 6,821,505; WO 97/34631; 및 WO 2002/060919를 참조한다.

[0645] 투여 시 항체의 혈청 반감기의 증가를 발생시킬 수 있는 Fc 변형의 비제한적 예는, 예를 들어 234 (예를 들어, F에 의함), 235 (예를 들어, Q에 의함), 238 (예를 들어, D에 의함), 250 (예를 들어, E 또는 Q에 의함), 252 (예를 들어, L/Y/F/W 또는 T에 의함), 254 (예를 들어, S 또는 T에 의함), 256 (예를 들어, S/R/Q/E/D 또는 T에 의함); 259 (예를 들어, I에 의함); 272 (예를 들어, A에 의함), 305(예를 들어, A에 의함), 307(예를 들어, A 또는 P에 의함), 308 (예를 들어, F, C 또는 P에 의함), 311(예를 들어, A 또는 R에 의함), 312 (예를 들어, A에 의함), 322 (예를 들어, Q), 328 (예를 들어, E), 331 (예를 들어, A에 의함), 378 (예를 들어, A에 의함), 380 (예를 들어, A에 의함), 382 (예를 들어, A에 의함), 428 (예를 들어, L 또는 F에 의함), 432 (예를 들어, C에 의함), 433 (예를 들어, H/L/R/S/P/Q 또는 K에 의함), 434 (예를 들어, H/F 또는 Y 또는 S 또는

A 또는 W에 의함), 435 (예를 들어, H에 의함), 436 (예를 들어, L에 의함) 및 437 (예를 들어, C에 의함) (모든 위치는 EU 넘버링에 의함)로부터 선택된 1개 이상의 위치에서의 치환(들)을 포함한다 (W02016049000A2; W02020052692; W02016196228 참조). 일부 실시양태에서, Fc 변이체는 234F, 235Q, 238D, 250Q, 252T, 252Y, 254T, 256E, 259I, 272A, 305A, 307A, 308F, 311A, 322Q, 328E, 331S, 380A, 428L, 432C, 433K, 433S, 434S, 434Y, 434F, 434W, 434A, 435H, 436L, 437C 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 변형은 a) 428L (예를 들어, M428L) 및 434S (예를 들어, N434S) 치환; 428L, 259I (예를 들어, V259I), 및 308F (예를 들어, V308F) 치환; b) 433K (예를 들어, H433K) 및 434 (예를 들어, N434Y 또는 N434F) 치환; c) 252Y, 254T, 및 256E (예를 들어, M252Y, S254T, 및 T256E) 치환; d) 250Q 및 428L 치환 (예를 들어, T250Q 및 M428L); e) 307A, 380A 및 434A 치환 (예를 들어, T307A, E380A 및 N434A); f) P238D 및 L328E 치환; g) L234F, L235Q, K322Q, M252T, S254T 및 T256E 치환; 및 h) L432C, H433S, N434W, Y436L 및 T437C 치환으로부터 선택된 1개 또는 쌍 또는 군의 변형을 포함한다.

[0646] 일부 실시양태에서, 하이브리드 IgG 이소형은 항체의 FcRn 결합 및 반감기를 증가시키는 데 사용될 수 있다. 하이브리드 Ig는 2개 이상의 이소형으로부터 생성될 수 있다. 예를 들어, CH2 및/또는 CH3 영역 내의 IgG1 위치를 2개의 이소형이 상이한 위치에서의 IgG3으로부터의 아미노산으로 치환함으로써 IgG1/IgG3 하이브리드 변이체를 구축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하이브리드 Ig는 본원에 개시된 1개 이상의 변형 (예를 들어, 치환)을 포함할 수 있다.

[0647] E. 접합체

[0648] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 접합 모이어티를 추가로 포함한다. 접합 모이어티는 다중-특이적 분자에 연결될 수 있다. 접합 모이어티는 다중-특이적 분자에 부착될 수 있는 비-단백질성 모이어티이다. 다양한 접합 모이어티가 본원에 제공된 다중-특이적 분자에 연결될 수 있는 것으로 고려된다 (예를 들어, 문헌 ["Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989)] 참조). 이들 접합 모이어티는 다른 방법 중 공유 결합, 친화도 결합, 삽입, 배위 결합, 복합체화, 회합, 블렌딩 또는 부가에 의해 다중-특이적 분자에 연결될 수 있다.

[0649] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 다중-특이적 분자는 1개 이상의 접합체에 대한 결합에 이용될 수 있는 에피토프 결합 부분 외에 특이적 부위를 함유하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 이러한 부위는 접합체에 대한 공유 연결을 용이하게 하기 위해 1개 이상의 반응성 아미노산 잔기, 예컨대 예를 들어 시스테인 또는 히스티딘 잔기를 포함할 수 있다.

[0650] 특정 실시양태에서, 다중-특이적 분자는 접합 모이어티에 간접적으로, 또는 또 다른 접합 모이어티를 통해 연결될 수 있다. 예를 들어, 다중-특이적 분자는 비오틴에 접합된 다음, 아비딘에 접합된 제2 접합 모이어티에 간접적으로 접합될 수 있다. 접합 모이어티는 클리어런스-변형제, 독소 (예를 들어, 화학요법제), 검출가능한 표지 (예를 들어, 방사성 동위원소, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지 또는 효소-기질 표지), 또는 정제 모이어티일 수 있다.

[0651] "독소"는 세포에 유해하거나 또는 세포를 손상 또는 사멸시킬 수 있는 임의의 작용제일 수 있다. 독소의 예는 비제한적으로 탁솔, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 브로민화에티듐, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, MMAE, MMAF, DM1, 빈블라스틴, 콜키신, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로가인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신 및 그의 유사체, 항대사물 (예를 들어, 메토크세이트, 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카르바진), 알킬화제 (예를 들어, 메클로레타민, 티오에파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스-디클로로디아민 백금 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린 (예를 들어, 다우노루비신 (이전의 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제 (예를 들어, 닥티노마이신 (이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)), 항유사분열제 (예를 들어, 빈크리스틴 및 빈블라스틴), 토포이소머라제 억제제, 및 튜블린-결합제를 포함한다.

[0652] 검출가능한 표지의 예는 형광 표지 (예를 들어 플루오레세인, 로다민, 단실, 피코에리트린, 또는 텍사스 레드), 효소-기질 표지 (예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 루시페라제, 글루코아미라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제 또는 β-D-갈락토시다제), 방사성동위원소 (예를 들어 <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>3</sup>H, <sup>111</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>14</sup>C, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>86</sup>Y, <sup>88</sup>Y, <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu, <sup>211</sup>At, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>153</sup>Sm, <sup>212</sup>Bi, 및 <sup>32</sup>P, 다른 란타나이드), 발

광 표지, 발색단 모이어티, 디콕시게닌, 비오틴/아비딘, DNA 분자 또는 검출용 금을 포함할 수 있다.

- [0653] 특정 실시양태에서, 접합 모이어티는 다중-특이적 분자의 반감기를 증가시키는 것을 돕는 클리어런스-변형제일 수 있다. 예시적인 예는 수용성 중합체, 예컨대 PEG, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체 등을 포함한다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 다중-특이적 분자에 부착되는 중합체의 수는 다양할 수 있고, 1개 초과 중합체가 부착되는 경우에, 이는 동일하거나 상이한 분자일 수 있다.
- [0654] 특정 실시양태에서, 접합 모이어티는 정제 모이어티, 예컨대 자기 비드일 수 있다.
- [0655] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 접합체를 위한 베이스로서 사용된다.
- [0656] F. 폴리뉴클레오티드 및 제조법
- [0657] 본 개시내용은 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0658] 본원에 사용된 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 및 그의 중합체를 지칭한다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 상기 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 자연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다. 달리 나타내지 않는 한, 특정한 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 명시적으로 나타낸 서열뿐만 아니라 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 축중성 코돈 치환), 대립유전자, 오르토로그, SNP 및 상보적 서열을 암시적으로 포괄한다. 구체적으로, 축중성 코돈 치환은 1개 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다 (문헌 [Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); 및 Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)] 참조).
- [0659] 많은 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 1개 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 (예를 들어 SV40, CMV, EF-1 $\alpha$ ), 및 전사 종결 서열 중 1개 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0660] 본 개시내용은 다중-특이적 분자를 코딩하는 본원에 제공된 핵산 서열, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 1개의 프로모터 (예를 들어, SV40, CMV, EF-1 $\alpha$ ), 및 적어도 1개의 선택 마커를 함유하는 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)를 제공한다. 벡터의 예는 레트로바이러스 (렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스 (예를 들어, 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바칼로바이러스, 유두종바이러스, 파포바이러스 (예를 들어, SV40), 람다 파지, 및 M13 파지, 플라스미드 pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0661] 다중-특이적 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터는 클로닝 또는 유전자 발현을 위해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 본원의 벡터 내 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물은 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어, 엔테로박테리아세아에(Enterobacteriaceae) 예컨대 에스케리키아(Escherichia), 예를 들어, 이. 콜라이, 엔테로박터(Enterobacter), 에르위니아(Erwinia), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 예를 들어, 살모넬라 티피무리움(Salmonella typhimurium), 세라티아(Serratia), 예를 들어, 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans), 및 시겔라(Shigella), 뿐만 아니라 바실루스(Bacilli) 예컨대 비. 서브틸리스(B. subtilis) 및 비. 리케니포르미스(B. licheniformis), 슈도모나스(Pseudomonas) 예컨대 피. 아에루기노사(P. aeruginosa), 및 스트렙토미세스(Streptomyces)를 포함한다.
- [0662] 원핵생물에 더하여, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모가 제공된 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미세스 세레비시아에(Saccharomyces cerevisiae), 또는 통상적인 빵 효모가 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종, 및 균주, 예컨대 쉬조사카로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe); 클루이베로미세스(Kluyveromyces) 숙주 예컨대, 예를 들어, 케이. 락티스(K. lactis), 케이. 프라길리스(K. fragilis) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(K. bulgaricus) (ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(K. wickeramii) (ATCC 24,178), 케이. 왈티이(K. waltii) (ATCC 56,500), 케이. 드로스필라룸(K. drosophilaram) (ATCC 36,906), 케이. 썬모톨레란스(K. thermotolerans), 및 케이. 마르시아누스(K.

marxianus); 야로위아(yarrowia) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(Pichia pastoris) (EP 183,070); 칸디다(Candida); 트리코더마 레에시아(Trichoderma reesia) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa); 슈완니오미세스(Schwanniomyces) 예컨대 슈완니오미세스 옥시덴탈리스(Schwanniomyces occidentalis); 및 사상진균 예컨대, 예를 들어, 뉴로스포라(Neurospora), 페니실리움(Penicillium), 톨리포클라디움(Tolypocladium), 및 아스페르길루스(Aspergillus) 숙주 예컨대 에이. 니둘란스(A. nidulans) 및 에이. 니거(A. niger)가 통상적으로 이용가능하고 본원에서 유용하다.

[0663] 본원에 제공된 글리코실화된 다중-특이적 분자의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) (모충), 아에데스 아에깃티(Aedes aegypti) (모기), 아에데스 알보픽투스(Aedes albopictus) (모기), 드로스필라 멜라노가스터(Drosophila melanogaster) (과실파리), 및 봄빅스 모리(Bombyx mori)와 같은 숙주로부터의 수많은 바큇로바이러스 균주 및 변이체 및 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들어 아우토그라파 칼리포르니카(Autographa californica) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공중 이용가능하고, 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따라 본원에서 바이러스로서 사용될 수 있다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 이용될 수 있다.

[0664] 그러나, 척추동물 세포가 가장 큰 관심대상이며, 배양물 (조직 배양물) 중에서의 척추동물 세포의 증식은 상용 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293 또는 현탁 배양으로의 성장을 위해 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니스 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간세포암 세포주 (Hep G2)이다. 일부 바람직한 실시양태에서, 숙주 세포는 293F 세포이다.

[0665] 숙주 세포는 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 생산을 위해 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 관련 기술분야에 공지된 상동 재조합에 의해 생산될 수 있다.

[0666] 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 생산하는 데 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 배지, 예컨대 햄(Ham) F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM) (시그마), RPMI-1640 (시그마), 및 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM) (시그마)가 숙주 세포를 배양하는 데 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 배지 중 임의의 것이 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 이들 배지 중 임의의 것은 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 겐타마이신(GENTAMYCIN)<sup>TM</sup> 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 등가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충물이 또한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이고, 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0667] 재조합 기술을 사용할 때, 다중-특이적 분자는 세포내에서, 주변세포질 공간에서 생산되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포내에서 생산되는 경우, 제1 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 단편인 미립자 파편은 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]은 이. 콜라이의 주변세포질 공간으로 분비된 항체를 단리하는 절차를 기재한다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸술폰닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐 해동시킨다. 세포 파편은 원심분리에 의해 제거할 수 있다. 다중-특이적 분자가 배지 내로 분비되는 경우에,

이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 일반적으로 먼저 상업적으로 입수가 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 유닛을 사용하여 농축시킨다. 프로테아제 억제제, 예컨대 PMSF는 단백질분해를 억제하기 위해 상기 단계 중 임의의 단계에 포함될 수 있고, 항생제는 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.

[0668] 세포로부터 제조된 다중-특이적 분자는, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, DEAE-셀룰로스 이온 교환 크로마토그래피, 황산암모늄 침전, 염석, 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있으며, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다.

[0669] 특정 실시양태에서, 고체 상에 고정된 단백질 A는 다중-특이적 분자의 면역친화성 정제에 사용된다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 다중-특이적 분자에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 좌우된다. 단백질 A는 인간 감마1, 감마2 또는 감마4 중쇄에 기초한 항체를 정제하는 데 사용될 수 있다 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 감마3에 대해 권장된다 (Guss et al., EMBO J. 5:1567 1575 (1986)). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 종종 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 제어된 세공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성될 수 있는 것보다 더 빠른 유량 및 더 짧은 프로세싱 시간을 가능하게 한다. 다중-특이적 분자가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상에서의 크로마토그래피, 헤파린 상에서의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예컨대 폴리아스파르트산 칼럼) 상에서의 세파로스(SEPHAROSE)™ 크로마토그래피, 크로마토포싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전이 또한 회수될 항체에 따라 이용가능하다.

[0670] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 분자 및 오염물을 포함하는 혼합물은 pH 약 2.5-4.5의 용리 완충제를 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어, 약 0-0.25M 염)에서 수행되는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용될 수 있다.

[0671] G. 제약 조성물

[0672] 본 개시내용은 다중-특이적 분자 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 추가로 제공한다.

[0673] 본원에 개시된 제약 조성물에 사용하기 위한 제약상 허용되는 담체는, 예를 들어 제약상 허용되는 액체, 겔 또는 고체 담체, 수성 비히클, 비수성 비히클, 향미생물제, 등장화제, 완충제, 항산화제, 마취제, 현탁화제/분산제, 격리제 또는 킬레이트화제, 희석제, 아주반트, 부형제, 또는 비-독성 보조 물질, 관련 기술분야에 공지된 다른 성분, 또는 그의 다양한 조합을 포함할 수 있다.

[0674] 적합한 성분은, 예를 들어 항산화제, 충전제, 결합제, 붕해제, 완충제, 보존제, 유희제, 향미제, 증점제, 착색제, 유화제 또는 안정화제, 예컨대 당 및 시클로덱스트린을 포함할 수 있다. 적합한 항산화제는, 예를 들어 메티오닌, 아스코르브산, EDTA, 티오황산나트륨, 백금, 카탈라제, 시트르산, 시스테인, 티오글리세롤, 티오글리콜산, 티오소르비톨, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔 및/또는 프로필 갈레이트를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 본원에 제공된 바와 같은 다중-특이적 분자 및 접합체를 포함하는 조성물 중 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌의 포함은 다중-특이적 분자의 산화를 감소시킨다. 이러한 산화의 감소는 결합 친화도의 손실을 방지하거나 감소시킴으로써, 항체 안정성을 개선시키고 보관 수명을 최대화한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 1종 이상의 다중-특이적 분자 및 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌을 포함하는 조성물이 제공된다. 다중-특이적 분자를 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌과 혼합함으로써 본원에 제공된 바와 같은 다중-특이적 분자의 산화를 방지하고/거나, 그의 보관 수명을 연장시키고/거나, 그의 효능을 개선시키는 방법이 추가로 제공된다.

[0675] 추가로 예시하기 위해, 제약상 허용되는 담체는, 예를 들어 수성 비히클, 예컨대 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 등장성 텍스트로스 주사액, 멸균수 주사액, 또는 텍스트로스 및 락테이트화 링거 주사액, 비수성 비히클, 예컨대 식물성 기원의 고정 오일, 목화씨 오일, 옥수수 오일, 참깨 오일, 또는 땅콩 오일, 정박테리아 또는 정진균 농도의 향미생물제, 등장화제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스, 완충제, 예컨대 포스페이트 또는 시트레이트 완충제, 항산화제, 예컨대 중황산나트륨, 국부 마취제, 예컨대 프로카인 히드로클로라이드, 현탁화제 및 분산제, 예컨대 소듐 카복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 또는 폴리비닐피롤리돈, 유화제, 예컨대 폴리소르베이트 80 (트윈-80), 격리제 또는 킬레이트화제, 예컨대 EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 또

는 EGTA (에틸렌 글리콜 테트라아세트산), 에틸 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 수산화나트륨, 염산, 시트르산, 또는 락트산을 포함할 수 있다. 페놀 또는 크레졸, 수은제, 벤질 알콜, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-히드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 벤즈알코늄 클로라이드 및 벤제토늄 클로라이드를 비롯한, 담체로서 이용되는 항미생물제가 다중-용량 용기 내의 제약 조성물에 첨가될 수 있다. 적합한 부형제는, 예를 들어 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤 또는 에탄올을 포함할 수 있다. 적합한 비-독성 보조 물질은, 예를 들어 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제, 용해도 증진제, 또는 작용제, 예컨대 아세트산나트륨, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 또는 시클로텍스트린을 포함할 수 있다.

[0676] 제약 조성물은 액체 용액, 현탁액, 에멀전, 환제, 캡슐, 정제, 지속 방출 제제, 또는 분말일 수 있다. 경구 제제는 표준 담체, 예컨대 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 폴리비닐 피롤리돈, 사카린나트륨, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등을 포함할 수 있다.

[0677] 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 주사가 가능한 조성물로 제제화된다. 주사가 가능한 제약 조성물은 임의의 통상적인 형태, 예컨대 예를 들어 액체 용액, 현탁액, 에멀전, 또는 액체 용액, 현탁액 또는 에멀전을 생성하는 데 적합한 고체 형태로 제조될 수 있다. 주사용 제제는 주사용으로 준비된 멸균 및/또는 비-발열성 용액, 멸균 건조 가능성 생성물, 예컨대 사용 직전에 용매와 조합되도록 준비된 동결건조된 분말, 예컨대 피하 정제, 주사용으로 준비된 멸균 현탁액, 사용 직전에 비히클과 조합되도록 준비된 멸균 건조 불용성 생성물, 및 멸균 및/또는 비-발열성 에멀전을 포함할 수 있다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0678] 특정 실시양태에서, 단위-용량 비경구 제제는 애플, 바이알 또는 바늘을 갖는 시린지 내에 포장된다. 비경구 투여를 위한 모든 제제는, 관련 기술분야에 공지되어 있고 실시되는 바와 같이 멸균성이어야 하고 발열성이 아니어야 한다.

[0679] 특정 실시양태에서, 멸균 동결건조된 분말은 본원에 개시된 바와 같은 다중-특이적 분자를 적합한 용매 중에 용해시킴으로써 제조된다. 용매는 분말 또는 분말로부터 제조된 재구성된 용액의 안정성 또는 다른 약리학적 성분을 개선시키는 부형제를 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는 물, 텍스트로스, 소르비톨, 프룩토스, 옥수수 시럽, 크실리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스 또는 다른 적합한 작용제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 용매는 완충제, 예컨대 시트레이트, 소듐 또는 포타슘 포스페이트, 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된, 한 실시양태에서, 대략 중성의 pH의 다른 이러한 완충제를 함유할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 조건 하에서의 용액의 후속 멸균 여과에 이은 동결건조는 바람직한 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 생성된 용액은 동결건조용 바이알에 배분될 것이다. 각각의 바이알은 다중-특이적 분자 또는 그의 조성물의 단일 투여량 또는 다중 투여량을 함유할 수 있다. 정확한 샘플 회수 및 정확한 투여를 용이하게 하기 위해 용량 또는 용량의 세트에 필요한 것보다 조금 더 많은 양 (예를 들어, 약 10%)으로 바이알을 과충전하는 것이 허용된다. 동결건조된 분말은 적절한 조건 하에, 예컨대 약 4°C 내지 실온에서 저장될 수 있다.

[0680] 동결건조된 분말을 주사용수로 재구성하는 것은 비경구 투여에 사용하기 위한 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 재구성을 위해 멸균 및/또는 비-발열성 물 또는 다른 액체의 적합한 담체가 동결건조된 분말에 첨가된다. 정확한 양은 주어지는 선택된 요법에 좌우되고, 경험적으로 결정될 수 있다.

[0681] H. 사용 방법

[0682] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 사용 방법을 제공한다. 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 본원에 제공된 SIRP-알파 결합 도메인, 본원에 제공된 활성화 수용체-결합 도메인 및 본원에 제공된 표적 항원 결합 도메인을 포함한다. 표적 항원 결합 도메인은 표적 항원 및 CD47을 공동-발현하는 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원에 결합한다. 본원에 제공된 다중-특이적 분자는 면역 이펙터 세포의 이펙터 기능을 표적 항원의 존재 하에 선택적으로 유도할 수 있고, 면역 이펙터 세포는 SIRP-알파 및 활성화 수용체를 공동-발현한다.

[0683] 한 측면에서, 본 개시내용은 시험관내에서 식세포작용을 유도하는 방법을 제공하며, 이는 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 존재 하에 표적 세포를 SIRP α 양성 식세포작용 세포 샘플과 접촉시켜 SIRP α 양성 식세포작용 세포에 의한 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 것을 포함한다.

[0684] 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 대상체에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 데 효과적인 용량으로 투여하는 것을 포함한다.

- [0685] 한 측면에서, 본 개시내용은 암 세포의 식세포작용의 증진을 필요로 하는 대상체에서 암 세포의 식세포작용을 증진시키기 위해 종양-연관 단백질 또는 대식세포 (TAM)를 항종양 대식세포로 재지시하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자 또는 결속체를 투여하는 것을 포함한다. 또한, 본원에 제공된 결속체는 또한 대식세포를 활성화시키고, 활성화된 대식세포를 종양 미세환경 내로 결속시켜 암 세포에 대해 식세포작용 효과를 나타내도록 할 수 있다.
- [0686] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 종양 미세환경의 M1 대식세포 수준의 증가를 필요로 하는 대상체의 종양 미세환경에서 M1 대식세포의 수준을 증가시키는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자 또는 결속체를 투여하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "종양 미세환경"은 암 세포 또는 종양 세포를 둘러싸는 조직(들), 세포 및 환경을 지칭한다. 종양 미세환경은 기질 세포, 예컨대 섬유모세포, 혈관주위세포, 내피 세포, 지방 세포, 및 골수 중간엽 기질 세포 (MSC)를 포함할 수 있다. 종양 미세환경은 또한 암 세포와 회합되거나 또는 암 세포 주위의 기질 세포와 회합된 세포의 매트릭스를 포함할 수 있다. 세포의 매트릭스는 주로 기저 물질 - 주로 프로테오글리칸 응집체로 만들어진 다공성 수화 겔 - 및 결합 조직 섬유로 구성된다. 실험적으로, 특정한 종양에 대한 종양 미세환경은, 예를 들어, 특이적 종양을 보유하는 조직을 해부 및 단리함으로써 수득될 수 있다.
- [0687] M1 대식세포의 수준과 관련하여 본원에 사용된 용어 "증가시키다" 또는 "증가시키는"은 본원에 제공된 다중-특이적 분자 또는 결속체의 부재 하의 종양 미세환경과 비교하여 본원에 제공된 다중-특이적 분자 또는 결속체의 존재 하의 종양 미세환경에서의 총 대식세포 카운트에 대해 정규화된 상승된 M1 대식세포 카운트를 지칭한다. 종양 미세환경에서의 M1 대식세포의 수준 또는 M1 대식세포 카운트는 관련 기술분야에 공지된 통상적인 기술, 예컨대 M1 표현형의 표면 마커 프로파일을 갖는 대식세포의 양에 대한 FACS 검정에 의해 측정될 수 있다 (CD80<sup>high</sup> 및 CD206<sup>mid</sup> 프로파일, 문헌 [Zhang M et al., Anti-CD47 Treatment Stimulates Phagocytosis of Glioblastoma by M1 and M2 Polarized Macrophages and Promotes M1 Polarized Macrophages In Vivo. PloS one 11, e0153550, 10.1371/ journal.pone.0153550 (2016)] 참조). M1 대식세포의 수준 또는 M1 대식세포 카운트는 또한 M1 대식세포에서 상승되는 것으로 공지된 유도성 산화질소 신타제 1 (Nos1)의 mRNA 발현 수준 (총 mRNA 발현 수준에 대해 정규화된)의 qPCR 분석에 의해 측정될 수 있다 (Zhang M et al., Anti-CD47 Treatment Stimulates Phagocytosis of Glioblastoma by M1 and M2 Polarized Macrophages and Promotes M1 Polarized Macrophages In Vivo. PloS one 11, e0153550, 10.1371/ journal.pone.0153550 (2016)). M1 표현형을 갖는 대식세포의 수를 카운팅할 수 있거나 또는 M1 대식세포에 대한 1종 이상의 특징적인 마커의 발현 수준을 결정할 수 있는 다른 방법, 예컨대 공초점 형광 현미경검사 또는 웨스턴 블롯이 또한 본 개시내용의 고려 내에 있다. 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 표적 세포의 유도된 식세포작용으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함한다.
- [0688] 특정 실시양태에서, 표적 세포는 표적 항원 및 CD47을 공동-발현한다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 암 세포, 염증 세포, 및/또는 만성 감염 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 종양 표면 항원, 염증 항원, 또는 감염성 미생물의 항원이다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 종양 항원 (예를 들어, 종양 연관 항원 (TAA), 종양 특이적 항원 (TSA), 예컨대 신생항원), 또는 감염된 세포 상에 제시된 항원 (예를 들어, B형 간염 표면 항원 (HBsAg))일 수 있다.
- [0689] 특정 실시양태에서, 표적 세포의 유도된 식세포작용으로부터 이익을 얻을 수 있는 장애 또는 상태는, 예를 들어 암 (예를 들어 고형 종양, 혈액 악성종양), 염증성 질환, 감염성 질환 (예를 들어 만성 감염), 자가면역 질환 (예를 들어 다발성 경화증), 신경계 질환, 뇌 손상, 신경 손상, 다혈구혈증, 혈액소증, 외상, 폐혈성 쇼크, 섬유증, 아테롬성동맥경화증, 비만, 제II형 당뇨병, 이식 기능장애, 및 관절염을 포함할 수 있다.
- [0690] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 표적 항원 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 표적 항원이 종양 항원을 포함하는 경우, 표적 항원 관련 질환은 종양 또는 암을 포함할 수 있다. 예를 들어, 표적 항원이 감염된 세포 상에 제시된 항원을 포함하는 경우, 표적 항원 관련 질환은 관련 감염성 질환을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적 항원은 PD-L1을 포함한다. 특정 실시양태에서, 표적 항원은 클라우딘 18.2를 포함한다.
- [0691] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 SIRP $\alpha$  관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함한다.

- [0692] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 CD47 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 다중-특이적 분자를 투여하는 것을 포함한다.
- [0693] 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 SIRP $\alpha$  v1에 대해 동형접합이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 SIRP $\alpha$  v2에 대해 동형접합이다.
- [0694] 일부 실시양태에서, 대상체는 암 (예를 들어 고형 종양, 혈액 악성종양), 염증성 질환, 감염성 질환 (예를 들어 만성 감염), 자가면역 질환 (예를 들어 다발성 경화증), 신경계 질환, 뇌 손상, 신경 손상, 다혈구혈증, 혈액색소증, 외상, 패혈성 쇼크, 섬유증, 아테롬성동맥경화증, 비만, 제II형 당뇨병, 이식 기능장애, 및 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환, 장애 또는 상태로 진단되었거나 또는 그에 대한 위험이 있다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 1종 이상의 고형 종양으로 진단되었거나 또는 그의 위험이 있다.
- [0695] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 의해 치료가능한 상태 또는 장애는 면역 관련 질환 또는 장애, 종양 및 암, 자가면역 질환, 또는 감염성 질환일 수 있다. 특정 실시양태에서, 면역 관련 질환 또는 장애는 전신 홍반성 루푸스, 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 혈관염, 중증 근무력증, 특발성 폐 섬유증, 크론병, 천식, 류마티스 관절염, 이식편 대 숙주 질환, 척추관절병증 (예를 들어, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 염증성 장 질환과 연관된 고립성 급성 장병증성 관절염, 반응성 관절염, 베체트 증후군, 미분화 척추관절병증, 전방 포도막염, 및 소아 특발성 관절염), 다발성 경화증, 자궁내막증, 사구체신염, 패혈증, 당뇨병, 급성 관상동맥 증후군, 허혈성 재관류, 건선, 진행성 전신 경화증, 아테롬성동맥경화증, 쇼그렌 증후군, 경피증, 또는 염증성 자가면역 근염으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0696] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 의해 치료가능한 상태 또는 장애는 종양 및 암을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 의해 치료가능한 상태 또는 장애는 고형 종양 및 혈액 악성종양을 포함한다. 암 및 종양의 예는 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 신세포암, 결장직장암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위 암종, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 갑상선암, 육종, 전립선암, 교모세포종, 자궁경부암, 흉선 암종, 백혈병, 림프종, 골수종, 근상 식육종, 메르켈 세포암, 및 다른 혈액 악성종양, 예컨대 전형적 호지킨 림프종 (CHL), 원발성 종격 대 B-세포 림프종, T-세포/조각구-풍부 B-세포 림프종, EBV-양성 및 -음성 PTLID, 및 EBV-연관 미만성 대 B-세포 림프종 (DLBCL), 형질모구성 림프종, 결절외 NK/T-세포 림프종, 비인두 암종, 및 HHV8-연관 원발성 삼출 림프종, 호지킨 림프종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 예컨대 원발성 CNS 림프종, 척수축 종양, 뇌간 신경교종, 향문암, 충수암, 성상세포종, 기저 세포 암종, 담낭암, 위암, 폐암, 기관지암, 골암, 간 및 담관암, 췌장암, 유방암, 간암, 난소암, 고환암, 신장암, 신우 및 요관암, 타액선암, 소장암, 요도암, 방광암, 두경부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 식도암, 위장암, 피부암, 전립선암, 뇌하수체암, 질암, 갑상선암, 인후암, 교모세포종, 흑색종, 골수이형성 증후군, 육종, 기형종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, T 또는 B 세포 림프종, GI 기관 간질종, 연부 조직 종양, 간세포성 암종, 및 선암종, 또는 그의 전이를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 의해 치료가능한 상태 또는 장애는 1종 이상의 고형 종양을 포함한다.
- [0697] 일부 실시양태에서, 암은 CD47-양성 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 CD47-양성 및 표적 항원-양성 암이다. 일부 실시양태에서, 치료될 대상체는 CD47-양성 암, 또는 CD47-양성 및 표적 항원-양성 암을 갖는 것으로 확인되었다. 본원에 사용된 "CD47-양성" 암은 암 세포에서 CD47을 발현하거나, 또는 정상 세포에서 예상되는 것보다 유의하게 더 높은 수준으로 암 세포에서 CD47을 발현하는 것을 특징으로 하는 암을 지칭한다. 본원에 사용된 "표적 항원-양성" 암은 암 세포에서 표적 항원을 발현하거나, 또는 정상 세포에서 예상되는 것보다 유의하게 더 높은 수준으로 암 세포에서 표적 항원을 발현하는 것을 특징으로 하는 암을 지칭한다.
- [0698] 관심 생물학적 샘플에서의 CD47 및 표적 항원의 존재 및/또는 양은 대상체로부터의 시험 생물학적 샘플에서 다양한 적합한 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 시험 생물학적 샘플은 발현된 CD47 단백질 또는 표적 항원 단백질에 결합하고 이를 검출하는 항-CD47 항체 또는 항-표적 항원 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 노출될 수 있다. 대안적으로, CD47 또는 표적 항원 단백질은 또한 qPCR, 리버스 트랜스크립타제 PCR, 마이크로어레이, SAGE, FISH 등과 같은 방법을 사용하여 핵산 발현 수준에서 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시험 샘플은 암 세포 또는 조직, 또는 종양 침윤 면역 세포로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 시험 생물학적 샘플에서의 CD47 또는 표적 항원 단백질의 존재 또는 상향조절된 수준은 반응성의 가능성을 나타낸다. 본원에 사용된 용어 "상향조절된"은 CD47 또는 표적 항원의 참조 발현 수준과 비교하여 시험 샘플에서의 CD47 또는 표적 항원 단백질의 발현 수준의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 이

상 또는 그 초과와 전반적 증가를 지칭한다. 참조 수준은 또 다른 유전자 (예를 들어 하우스 키핑 유전자)의 발현 수준에 대해 임의로 정규화된, 동일한 조직 유형의 정상 세포에서 발견되는 CD47 또는 표적 항원 발현의 수준일 수 있다. 대안적으로, 참조 수준은 건강한 대상체에서 발견되는 CD47 또는 표적 항원 발현의 수준일 수 있다. 참조 샘플은 건강한 또는 비-이환 개체로부터 취득된 대조군 샘플, 또는 시험 샘플이 취득된 동일한 개체로부터 취득된 건강한 또는 비-이환 샘플일 수 있다. 예를 들어, 참조 샘플은 시험 샘플 (예를 들어, 종양)에 인접하거나 그 근처에 있는 비-이환 샘플일 수 있다. 일부 실시양태에서, 참조는 관심 시험 또는 결정과 실질적으로 동시에 시험되고/거나 결정된다. 일부 실시양태에서, 참조는 임의로 유형 매체로 구현된 과거의 참조이다. 전형적으로, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 참조는 평가 하의 것과 대등한 조건 또는 상황 하에서 결정되거나 특징화된다.

- [0699] 특정 실시양태에서, 종양 및 암은 전이성, 특히 CD47을 발현하는 전이성 종양이다.
- [0700] 특정 실시양태에서, 종양 및 암은 PD-L1 양성 암이다. 특정 실시양태에서, PD-L1 양성 암은 NSCLC, SCLC, 흑색종, 두경부암, 간세포성 암종, MSI-H 또는 dMMR 암, 자궁경부암, 유방암, 위 암종, 전형적 호지킨 림프종, 췌장암, 요로상피암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0701] 특정 실시양태에서, 종양 및 암은 클라우딘 18.2 양성 암이다. 일부 실시양태에서, 클라우딘 18.2 양성 암은 상피-세포 유래 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 위암, 췌장암, 폐암, 식도암, 난소암 및 그의 전이이다.
- [0702] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 의해 치료가능한 상태 또는 장애는 자가면역 질환을 포함한다. 자가면역 질환은 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS, 자가면역 요인을 갖는 바이러스성 질환), 원형 탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병, 자가면역 당뇨병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 림프증식성 증후군 (ALPS), 자가면역 혈소판감소성 자반증 (ATP), 베체트병, 심근병증, 포진성 복강 스프루-피부염; 만성 피로 면역 기능장애 증후군 (CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증 (CIPD), 반흔성 유천포창, 저온 응집소 질환, CREST 증후군, 크론병, 데고스병, 소아-피부근염, 원판상 루푸스, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근육통-섬유근염, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판감소증 자반증 (ITP), IgA 신병증, 인슐린-의존성 당뇨병, 소아 만성 관절염 (스틸병), 소아 류마티스 관절염, 메니에르병, 혼합 결합 조직 질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 악성 빈혈, 결절성 다발동맥염, 다발연골염, 다선성 증후군, 류마티스성 다발근육통, 다발근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변증, 건선, 건선성 관절염, 레이노 현상, 라이터 증후군, 류마티스성 열, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 경피증 (진행성 전신 경화증 (PSS), 또한 전신 경화증 (SS)으로도 공지됨), 쇼그렌 증후군, 강직-사람 증후군, 전신 홍반성 루푸스, 다카야스 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 궤양성 결장염, 포도막염, 백반증 및 베게너 육아종증을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0703] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 의해 치료가능한 상태 또는 장애는 감염성 질환을 포함한다. 감염성 질환은, 예를 들어 만성 바이러스 감염, 예를 들어, 진균 감염, 기생충/원충 감염 또는 만성 바이러스 감염, 예를 들어, 말라리아, 콕시디오이데스진균증 임피티스, 히스토플라스마증, 조갑진균증, 아스페르길루스증, 블라스토포미세스증, 칸디다증 알비칸스, 파라콕시디오이데스진균증, 미포자충증, 아칸트아메바 각막염, 아메바증, 회충증, 바베시아증, 발란티디움증, 바일리사스카리스증, 샤가스병, 간흡충증, 코클리오미이아, 크립토스포리디움증, 열두조충증, 메디나충증, 에키노코쿠스증, 상피증, 요충증, 간질증, 비대흡충증, 사상충증, 편모충증, 악구충증, 왜소조충증, 포자충증, 카타야마 열, 리슈마니아증, 라임병, 요코가와흡충증, 구더기증, 회선사상충증, 이감염증, 옴, 주혈흡충증, 수면병, 분선충증, 조충증, 톡소카라증, 톡소플라스마증, 선모충증, 편충증, 트리파노소마증, 연충 감염, B형 간염 (HBV), C형 간염 (HCV), 포진 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, HIV-1, HIV-2, 시토메갈로바이러스, 단순 포진 바이러스 유형 I, 단순 포진 바이러스 유형 II, 인간 유두종 바이러스, 아데노바이러스, 유행성 카포시 웨스트 육종 연관 포진 바이러스, 얇은 고리 바이러스 (토르크테노바이러스), 인간 T 백혈병 바이러스 I, 인간 T 백혈병 바이러스 II, 수두 조스터, JC 바이러스 또는 BK 바이러스의 감염을 포함한다.
- [0704] 본원에 제공된 바와 같은 다중-특이적 분자의 치료 유효량은 관련 기술분야에 공지된 다양한 인자, 예컨대 예를 들어 대상체의 체중, 연령, 과거 병력, 현재 의약, 건강 상태 및 교차-반응 가능성, 알레르기, 과민성 및 유해 부작용, 뿐만 아니라 투여 경로 및 질환 발생의 정도에 좌우될 것이다. 투여량은 이들 및 다른 상황 또는 요인에 의해 지시되는 바와 같이 관련 기술분야의 통상의 기술자 (예를 들어, 의사 또는 수의사)에 의해 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다.
- [0705] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 바와 같은 다중-특이적 분자는 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 치료 유효

효 투여량으로 투여될 수 있다. 특정의 이들 실시양태에서, 다중-특이적 분자는 약 50 mg/kg 이하의 투여량으로 투여되고, 특정의 이들 실시양태에서 투여량은 10 mg/kg 이하, 5 mg/kg 이하, 3 mg/kg 이하, 1 mg/kg 이하, 0.5 mg/kg 이하, 또는 0.1 mg/kg 이하이다. 특정 실시양태에서, 투여 투여량은 치료 과정에 걸쳐 변할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 초기 투여 투여량은 후속 투여 투여량보다 더 높을 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여 투여량은 대상체의 반응에 따라 치료 과정에 걸쳐 달라질 수 있다.

- [0706] 투여 요법은 최적의 목적하는 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 단일 용량이 투여될 수 있거나, 또는 여러 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있다.
- [0707] 본원에 개시된 다중-특이적 분자는 관련 기술분야에 공지된 임의의 경로, 예컨대 예를 들어 비경구 (예를 들어, 피하, 복강내, 정맥내, 예컨대 정맥내 주입, 근육내 또는 피내 주사) 또는 비-비경구 (예를 들어, 경구, 비강내, 안내, 설하, 직장 또는 국소) 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0708] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 다중-특이적 분자는 단독으로 또는 1종 이상의 추가의 치료 수단 또는 작용제와 조합되어 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 다중-특이적 분자는 또 다른 치료제, 예를 들어 화학요법제 또는 항암 약물과 조합되어 투여될 수 있다.
- [0709] 특정의 이들 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 치료제와 조합되어 투여되는 본원에 개시된 바와 같은 다중-특이적 분자는 1종 이상의 추가의 치료제와 동시에 투여될 수 있고, 특정의 이들 실시양태에서 다중-특이적 분자 및 추가의 치료제(들)는 동일한 제약 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 그러나, 또 다른 치료제와 "조합되어" 투여되는 다중-특이적 분자는 작용제와 동시에 또는 그와 동일한 조성물로 투여되어야 하는 것은 아니다. 또 다른 작용제 전에 또는 그 후에 투여되는 다중-특이적 분자는, 다중-특이적 분자 및 제2 작용제가 상이한 경로를 통해 투여되는 경우에도, 어구가 본원에 사용된 바와 같이 그러한 작용제와 "조합되어" 투여되는 것으로 간주된다. 가능한 경우에, 본원에 개시된 다중-특이적 분자와 조합되어 투여되는 추가의 치료제는 추가의 치료제의 제품 정보 시트에 열거된 스케줄에 따라, 또는 문헌 [Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002))] 또는 관련 기술분야에 널리 공지된 프로토콜에 따라 투여된다.
- [0710] 본 개시내용은 추가로 그의 다중-특이적 분자를 사용하는 방법을 제공한다.
- [0711] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 표적 세포의 유도된 식세포작용으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환, 장애 또는 상태를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 본원에 제공된 다중-특이적 분자의 용도를 제공한다.
- [0712] 본 개시내용은, 예를 들어 SIRP-알파와 CD47 사이의 상호작용을 실질적으로 또는 완전히 차단하고/거나; SIRP-알파 및 CD47 상호작용의 하류의 SHP-1 동원을 실질적으로 또는 완전히 차단하고/거나; 단독으로 사용되는 경우에 특정 표적 세포의 식세포작용을 유도하지 않고/거나, SIRP α의 IgV 도메인 외부의 에피토프에 결합할 수 있는 특정한 특성을 갖는 항-SIRP-알파 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 다중-특이적 분자 (예를 들어 다중-특이적 항체)의 놀라운 발견을 기초로 한다. 이러한 다중-특이적 분자는 상기 기재된 바와 같이 특이적 배위일 수 있고, 생성된 다중-특이적 분자는 원치않는 세포 (예를 들어, 암성 세포 및 감염된 세포)를 제거하도록 원치않는 세포에 대한 면역 반응 (예를 들어, 식세포작용)을 유도하는 예상외의 높은 선택성을 나타낸다.
- [0713] 따라서, 본 개시내용은 또한 CD47-관련 상태 및 장애를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 본원에 제공된 이러한 다중-특이적 분자의 용도를 제공한다.
- [0714] 하기 실시예는 청구된 발명을 보다 잘 예시하기 위해 제공되며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 하기 기재된 모든 구체적 조성물, 물질 및 방법은, 전체적으로 또는 부분적으로, 본 발명의 범주 내에 속한다. 이들 구체적 조성물, 물질 및 방법은 본 발명을 제한하기 위해 의도되는 것이 아니라, 단지 본 발명의 범주 내에 속하는 구체적 실시양태를 예시하기 위해 의도된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 발명적 능력을 행사하지 않고 본 발명의 범주로부터 벗어나지 않으면서 등가의 조성물, 물질 및 방법을 개발할 수 있다. 여전히 본 발명의 범위 내에 있으면서 본원에 기재된 절차에서 많은 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 변형은 본 발명의 범주 내에 포함된다는 것이 본 발명자들의 의도이다.
- [0715] 실시예
- [0716] 실시예 1: 항-클라우딘18.2/SIRP α 이중특이적 항체 구축 및 발현
- [0717] SIRP α 기반 이중특이적 대식세포 결속체 (BiME) 항체의 원리가 도 1에 도시된다. BiME는 특이적 사멸을 위해

대식세포를 암 세포에 물리적으로 가교시킬 수 있고; CD47-SIRP $\alpha$  상호작용을 차단할 수 있고, SHP-1/2 억제제를 제거할 수 있고, 대식세포 상의 Fc 수용체에 결속하여 식세포작용을 활성화시킬 수 있다.

- [0718] 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체를 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에서 항-SIRP $\alpha$  C25 단일-쇄 가변 단편 (scFv)과 융합된 항-클라우딘18.2 항체 hu28.H1L2로서 구축하였다 (도 2a-b). 가요성 (Gly4Ser)<sub>3</sub> 링커를 항-SIRP $\alpha$  scFv의 N-말단에 유전자적으로 연결시켰다. 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체를 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에서 항-클라우딘18.2 단일쇄 가변 단편 (scFv)과 융합된 항-SIRP $\alpha$  항체로서 구축하였다 (도 2c-d). 가요성 (Gly4Ser)<sub>3</sub> 링커를 항-클라우딘18.2 scFv의 N-말단에 유전자적으로 연결시켰다.
- [0719] 1개의 항-클라우딘18.2 항체 및 경쇄의 C-말단에서 2개의 항-SIRP $\alpha$  scFv를 포함하는 이중특이적 단백질 ES028-001 (도 2a, 또한 표 7 참조).
- [0720] 1개의 항-클라우딘18.2 항체 및 중쇄의 C-말단에서 2개의 항-SIRP $\alpha$  scFv를 포함하는 이중특이적 단백질 ES028-005 (도 2b, 또한 표 7 참조).
- [0721] 1개의 항-SIRP $\alpha$  항체 및 경쇄의 C-말단에서 2개의 항-클라우딘18.2 scFv를 포함하는 이중특이적 단백질 ES028-009 (도 2c, 또한 표 7 참조).
- [0722] 1개의 항-SIRP $\alpha$  항체 및 중쇄의 C-말단에서 2개의 항-클라우딘18.2 scFv를 포함하는 이중특이적 단백질 ES028-013 (도 2d, 또한 표 7 참조).
- [0723] 발현을 위해, 동일한 발현 벡터 또는 별개의 발현 벡터 내의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA를 사용하여 형질감염을 위한 HEK293 세포를 형질감염시켰다. 배양 배지를 수거하고, 융합 단백질을 단백질 A 세파로스 칼럼에 의해 정제하였다.
- [0724] 실시예 2 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체 결합 친화도
- [0725] 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 단백질을 제조업체의 매뉴얼에 따라 옥텟 검정 (포어바이오(ForeBio))을 사용하여 인간 클라우딘18.2 또는 SIRP $\alpha$ 에 대한 결합 친화도에 대해 개별적으로 특징화하였다. 간략하게, 항체를 센서 상에 커플링시킨 다음, 센서를 클라우딘18.2 또는 SIRP $\alpha$  단백질 구매 (200nM에서 시작, 2-배 희석 및 총 8회 용량)에 침지시켰다. 그의 결합 반응을 실시간으로 측정하고, 결과를 전반적으로 피팅하였다. 시험된 항체의 친화도 데이터를 표 8 및 표 9에 요약한다.
- [0726] 표 8. 옥텟 검정에 의해 측정된 바와 같은 인간 SIRP $\alpha$ 에 대한 이중특이적 항체의 결합 친화도

샘플	KD (M)	kon(1/Ms)	koff(1/s)
항-SIRP $\alpha$ , C25	2.12E-09	5.12E+05	1.09E-03
ES028-001	1.51E-09	1.79E+05	2.71E-04
ES028-005	1.41E-09	3.34E+05	4.70E-04
ES028-009	2.44E-09	5.44E+05	1.33E-03

[0727]

[0728] 표 9. 옥텟 검정에 의해 측정된 바와 같은 인간 클라우딘18.2에 대한 이중특이적 항체의 결합 친화도

샘플	KD (M)	kon(1/Ms)	koff(1/s)
항-클라우딘18.2, hu28.H1L2	<1.0E-12	9.58E+04	<1.0E-07
ES028-001	<1.0E-12	1.05E+05	<1.0E-07
ES028-005	<1.0E-12	1.06E+05	<1.0E-07
ES028-009	<1.0E-12	2.11E+04	<1.0E-07
항-클라우딘18.2, hu26.H1L2 (S92A)	1.81E-09	3.45E+04	6.25E-05

[0729]

[0730] 실시예 3 FACS에 의한 클라우딘18.2 및 SIRP $\alpha$ 에 대한 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체의 결합

- [0731] 인간 클라우딘18.2를 과다발현하는 대략 100,000개의 Raji 림프종 세포를 세척 완충제로 세척하고, 클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 단백질의 100 uL 연속 희석물과 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 세척 완충제로 2회 세척하고, 100 uL의 항-인간 Fc-PE와 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 세척 완충제로 2회 세척하고, FACS 칸토 II 분석기 (비디 바이오사이언시스(BD Biosciences)) 상에서 분석하였다. 도 3a에 제시된 바와 같이, 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체는 Raji/h클라우딘18.2 세포에 용량-의존적 방식으로 결합하였다. 이중특이적 항체 ES028-001, ES028-005, ES028-013은 항-클라우딘18.2 모노클로날 항체 hu28H1L2와 유사하게 Raji/h클라우딘18.2에 결합한 반면, ES028-009는 항-클라우딘18.2, hu28H1L2에 비해 더 적은 정도로 Raji/h클라우딘18.2에 결합하였다.
- [0732] 인간 SIRP $\alpha$ 를 과다발현하는 CHO-K1 세포를 세척 완충제로 세척하고, 클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 단백질의 100 uL 연속 희석물과 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 세척 완충제로 2회 세척하고, 100 uL의 항-인간 Fc-PE와 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 세척 완충제로 2회 세척하고, FACS 칸토 II 분석기 (비디 바이오사이언시스) 상에서 분석하였다. 도 3b에 제시된 바와 같이, 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체는 CHO-K1/SIRP $\alpha$  세포에 용량-의존적 방식으로 결합하였다. ES028-001 및 ES028-005는 항-SIRP $\alpha$ , C25에 비해 더 적은 정도로 CHO-K1/hSIRP $\alpha$ 에 결합하였다.
- [0733] 실시예 4 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체는 클라우딘18.2+ 암 세포의 시험관내 대식세포 식세포작용을 증진시킨다
- [0734] 인간 CD47 및 인간 클라우딘18.2를 발현하는 마우스 MC38 결장 종양 세포를 형광 염료 CFSE로 표지하고, C57BL6/hCD47/hSIRP $\alpha$  녹-인 마우스로부터 제조된 마우스 골수 유래 대식세포 (BMDM)와 함께 이소형 대조군, 항-클라우딘18.2 항체, 항-SIRP $\alpha$  항체, 항-클라우딘18.2 및 항-SIRP $\alpha$  항체의 조합물, 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체의 존재 하에 인큐베이션하였다. 2시간 후, 대식세포를 수거하고, 형광 표지된 항-마우스 대식세포 항체로 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. CD11b+CFSE+ 이중 양성 사건은 포식된 CFSE-표지된 종양 세포를 갖는 대식세포를 확인시켜 준다. 각각의 샘플은 상이한 색으로 나타내어진다. 식세포 지수가 3개의 개별 샘플에 대해 제시된다.
- [0735] 도 4a에 제시된 바와 같이, 항-클라우딘18.2 항체 hu28H1L2는 항체 의존성 세포성 식세포작용 (ADCP)에 의해 ~25% 식세포작용을 유도하였고, 항-SIRP $\alpha$  항체 C25는 식세포작용을 거의 유도하지 않았다. 항-클라우딘18.2 및 항-SIRP $\alpha$  항체 C25의 조합물은 식세포작용을 유의하게 개선시켰다. 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체 ES028-001, ES028-005, ES028-009는, 최상의 식세포작용 효과를 나타낸 조합물 및 ES028-005와 비교하여, 용량 의존적 방식으로 보다 강한 식세포작용을 유도하였고; ES028-013은 상승작용적 식세포작용 효과를 나타내지 않았다. 클라우딘18.2를 발현하지 않는 MC38 세포의 경우에, 항-클라우딘18.2 및 항-SIRP $\alpha$  항체 C25의 조합물은 클라우딘18.2 비-발현 세포에 대한 식세포작용을 유의하게 개선시키지 않았다 (도 4b). 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체 또는 항-클라우딘18.2 항체 및 항-SIRP $\alpha$  항체의 조합물은 클라우딘18.2를 발현하지 않는 세포에 대해 개선된 식세포작용을 유도하지 않았다 (도 4b).
- [0736] 실시예 5 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체 활성 IgG1 Fc는 Fc $\gamma$ R-의존적 ADCP를 활성화시키고, IgG4 또는 IgG1LALA 이소형보다 더 강한 효력을 제공한다
- [0737] MC38/hCD47/h클라우딘18.2의 또 다른 마우스 BMDM 식세포작용 검증에서, IgG1, IgG4 및 IgG1LALA 상이한 이소형을 갖는 항-클라우딘18.2 항체를 단독처리 또는 항-SIRP $\alpha$  항체와의 조합으로 시험하였다. 유사하게, IgG1, IgG4 및 IgG1LALA를 갖는 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체 ES028-001, ES028-005 및 ES028-009를 식세포작용에 대해 또한 시험하였다.
- [0738] 2시간 동안 공동-배양한 후, 대식세포를 수거하고, 형광 표지된 항-인간 대식세포 항체로 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. CD11b+CFSE+ 이중 양성 사건은 포식된 CFSE-표지된 종양 세포를 갖는 대식세포를 확인시켜 준다. 각각의 샘플은 상이한 색으로 나타내어진다. 식세포 지수가 3개의 개별 샘플에 대해 제시된다.
- [0739] 도 5에 제시된 바와 같이, 항-클라우딘18.2 IgG1은 항-클라우딘18.2 IgG4 및 항-클라우딘18.2 IgG1LALA 돌연변이체와 비교하여 단독처리 및 항-SIRP $\alpha$  항체와의 조합물 둘 다에서 최상의 식세포작용을 나타내었다. 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체 ES028-001 IgG1, ES028-005 IgG1 및 ES028-009 IgG1은 ES028-001 IgG4, ES028-005 IgG4 및 ES028-009 IgG4와 비교하여 더 강한 식세포작용 효과를 유도한 반면, 항-클라우딘18.2/SIRP $\alpha$  이중특이적 항체 ES028-001 IgG1LALA, ES028-005 IgG1LALA 및 ES028-009 IgG1LALA의 경우에는 식세포작용

효능이 존재하지 않았다. 데이터는 항-클라우딘18.2/SIRP α 이중특이적 항체 IgG1이 Fc γR-의존적 ADCP를 활성화시키고, IgG4 또는 IgG1LALA 이소형보다 더 강한 효력을 제공한다는 것을 나타내었다.

- [0740] 실시예 6 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체 구축 및 발현
- [0741] 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체를 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 또는 C-말단에서 항-PDL1 단일 도메인 항체 (sdAb) C71 또는 C570과 융합된 항-SIRP α 항체 C25로서 구축하였다 (도 6a-d, 또한 표 7 참조). 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체는 또한 Fc 영역에서 노브-인 홀 (KiH)에 의해 연결된, 하나의 아암에서의 항-SIRP α Fab 및 또 다른 아암에서의 2개의 카피의 항-PDL1 sdAb로 구축될 수 있다 (도 6e, 또한 표 7 참조). 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체는 또한 Fc의 N-말단에서의 항-PDL1 sdAb 및 Fc의 C-말단에 융합된 항-SIRP α Fab로서 구축될 수 있다 (도 6f-g, 또한 표 7 참조). 가요성 (Gly4Ser)<sub>3</sub> 링커를 항-SIRP α Fab의 N-말단에 유전자적으로 연결시켰다.
- [0742] 1개의 항-SIRP α 항체 및 경쇄의 C-말단에서 2개의 항-PDL1 sdAb를 포함하는 이중특이적 단백질 ES019-020 (도 6a, 또한 표 7 참조).
- [0743] 1개의 항-SIRP α 항체 및 중쇄의 C-말단에서 2개의 항-PDL1 sdAb를 포함하는 이중특이적 단백질 ES019-024 (도 6b, 또한 표 7 참조).
- [0744] 1개의 항-SIRP α 항체 및 중쇄의 N-말단에서 2개의 항-PDL1 sdAb를 포함하는 이중특이적 단백질 ES019-025 (도 6c, 또한 표 7 참조).
- [0745] 1개의 항-SIRP α 항체 및 경쇄의 N-말단에서 2개의 항-PDL1 sdAb를 포함하는 이중특이적 단백질 ES019-026 (도 6d, 또한 표 7 참조).
- [0746] Fc 영역에서의 노브-인 홀 돌연변이에 의해 1개의 항-SIRP α Fab 아암 및 2개의 항-PDL1 sdAb 아암 이중이량체를 포함하는 이중특이적 단백질 ES019-029 (도 6e, 또한 표 7 참조).
- [0747] Fc의 N-말단에서 2개의 항-PDL1 sdAb 및 Fc 영역의 C-말단에서 1개의 카피의 항-SIRP α Fab를 포함하는 이중특이적 단백질 ES019-072. 비대칭 이중이량체는 Fc 영역에서의 노브-인 홀 돌연변이에 의해 형성된다 (도 6f, 또한 표 7 참조).
- [0748] Fc의 N-말단에서 2개의 항-PDL1 sdAb 및 Fc 영역의 C-말단에서 2개의 항-SIRP α Fab를 포함하는 이중특이적 단백질 ES019-073 또는 ES019-079 (도 6g, 또한 표 7 참조).
- [0749] 실시예 7: 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체 결합 친화도
- [0750] 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 단백질을 제조업체의 매뉴얼에 따라 옥텟 검정 (포어바이오)을 사용하여 인간 PDL1에 대한 결합 친화도에 대해 개별적으로 특징화하였다. 간략하게, 항체를 센서 상에 커플링시킨 다음, 센서를 PDL1 단백질 구배 (200nM에서 시작, 2-배 희석 및 총 8회 용량)에 침지시켰다. 그의 결합 반응을 실시간으로 측정하고, 결과를 전반적으로 피팅하였다. 시험된 항체의 친화도 데이터를 표 9.1에 요약한다.

[0751] 표 9.1. 옥텟 검정에 의해 측정된 바와 같은 인간 PDL1에 대한 이중특이적 항체의 결합 친화도

샘플	KD (M)	kon(1/Ms)	koff(1/s)
항-PDL1, C71	5.31E-09	9.42E+05	5.01E-03
항-PDL1, C570	3.74E-10	8.19E+05	3.06E-04
항-PDL1, 570h3	1.98E-10	4.70E+05	9.29E-05
ES019-020	5.54E-09	9.18E+05	5.09E-03
ES019-024	6.56E-09	9.20E+05	6.03E-03
ES019-025	3.81E-09	1.58E+06	6.04E-03
ES019-026	4.10E-09	1.56E+06	6.39E-03
ES019-029	1.23E-09	1.11E+06	1.36E-03
ES019-079	4.85E-11	5.88E+05	2.85E-05

[0752]

[0753] 실시예 8: FACS에 의한 PDL1 및 SIRP α에 대한 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체의 결합

[0754] 인간 PDL1을 과다발현하는 대략 100,000개의 Raji 세포를 세척 완충제로 세척하고, PDL1/SIRP α 이중특이적 단백질의 100 ul 연속 희석물과 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 세척 완충제로 2회 세척하고, 100 ul의 항-인간 Fc-PE와 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 세척 완충제로 2회 세척하고, FACS 칸토 II 분석기 (비디 바이오사이언시스) 상에서 분석하였다. 도 7a에 제시된 바와 같이, 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체는 Raji/hPDL1 세포에 용량-의존적 방식으로 결합하였다. 이중특이적 항체 ES019-025, ES019-026은 항-PDL1 모노클로날 항체 C71과 유사하게 Raji/hPDL1에 결합한 반면, ES019-020, ES019-024는 항-PDL1, C71에 비해 더 적은 정도로 Raji/hPDL1에 결합하였다.

[0755] 인간 SIRP α를 과다발현하는 CHO-K1 세포를 세척 완충제로 세척하고, PDL1/SIRP α 이중특이적 단백질의 100 ul 연속 희석물과 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 세척 완충제로 2회 세척하고, 100 ul의 항-인간 Fc-PE와 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 세척 완충제로 2회 세척하고, FACS 칸토 II 분석기 (비디 바이오사이언시스) 상에서 분석하였다. 도 7b에 제시된 바와 같이, 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체는 CHO-K1/SIRP α 세포에 용량-의존적 방식으로 결합하였다. ES019-020, ES019-024, ES019-025 및 ES019-026은 항-SIRP α, C25와 유사하게 CHO-K1/hSIRP α에 결합하였다.

[0756] 실시예 9: Jurkat/PD1 리포터 세포 검정에 의한 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체의 PDL1 차단 활성

[0757] PDL1 및 항-CD3 scFv를 발현하는 CHO 세포 및 PD1을 과다발현하는 Jurkat/NFAT-RE 리포터 세포주에 기초한 2가지 세포 시스템을 사용하는, 진스크립트(GenScript)에 의해 개발된 PD1 차단 리포터 검정을 사용하여 PD1-PDL1 차단 리포터 검정을 수행하였다. 대수기로 성장 중인 세포를 수거하고, 1% 열 불활성화된 FBS를 함유하는 RPMI 1640 20 중에 2x10<sup>6</sup>개 세포/ml CHO 및 Jurkat/PD1 NFAT-RE 세포의 경우 4x10<sup>6</sup>개 세포/ml의 농도로 재현탁시켰다. 이어서, 검정 배지 (1% FBS를 함유하는 RPMI 1640) 중의 시험 항체를 연속 희석물로 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 95% 상대 습도에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 40 ul의 루시페라제 (바이오-글로(Bio-Glo) 루시페라제 검정 시스템)를 다음날 첨가하고, 루시페라제 활성의 양을 바이오텍 다중-모드 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다.

[0758] 도 8에 제시된 바와 같이, 이중특이적 항체 ES019-024, ES019-025, ES019-026은 항-PDL1 모노클로날 항체 C71과 유사하게 Jurkat/PD1 리포터 세포를 활성화시키는 반면, ES019-020은 항-PDL1, C71에 비해 더 적은 정도로 Jurkat/PD1 리포터 세포를 활성화시켰다.

[0759] 실시예 10: 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체는 PDL1+ 암 세포의 시험관내 대식세포 식세포작용을 증진시킨다

[0760] 인간 PDL1 발현이 결여된 인간 K562 백혈병 종양 세포 또는 인간 PDL1을 발현하는 K562를 형광 염료 CFSE로 표지하고, 인간 대식세포-콜로니 자극 인자 (M-CSF) 처리된 단핵구 유래 대식세포와 함께 이소형 대조군, 항-PDL1 항체, 항-SIRP α 항체, 항-PDL1 및 항-SIRP α 항체의 조합물, 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체의 존재 하에 인큐베이션하였다. 2시간 후, 대식세포를 수거하고, 형광 표지된 항-인간 대식세포 항체로 염색하고, 유동 세포

측정법에 의해 분석하였다. CD11b+CFSE+ 이중 양성 사건은 포식된 CFSE-표지된 종양 세포를 갖는 대식세포를 확인시켜 준다. 각각의 샘플은 상이한 색으로 나타내어진다. 식세포 지수가 3개의 개별 샘플에 대해 제시된다.

- [0761] 도 9a에 제시된 바와 같이, 항-PDL1 항체 C71은 항체 의존성 세포성 식세포작용 (ADCP)에 의해 ~20% 식세포작용을 유도하였고, 항-SIRP α 항체 C25는 식세포작용을 거의 유도하지 않았다. 항-PDL1 및 항-SIRP α 항체 C25의 조합물은 식세포작용을 유의하게 개선시켰다. 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체 ES019-020, ES019-029는 조합물과 유사한 용량 의존적 방식으로 강한 식세포작용을 유도하였고; ES019-024, ES019-025 및 ES019-026은 상승작용적 식세포작용 효과를 나타내지 않았다.
- [0762] 도 9b에 제시된 바와 같이, 항-PDL1 항체 C71 단독요법 또는 항-SIRP α 항체 C25와의 조합은 PDL1 발현이 결여된 K562 모 세포에 대해 식세포작용을 거의 유도하지 않았다. 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체 ES019-020, ES019-024, ES019-025, ES019-026, ES019-029는 K562 세포 (PDL1 음성)에 대해 식세포작용 효과를 나타내지 않았다.
- [0763] 도 9c에 제시된 바와 같이, 항-PDL1 항체 C71 단독요법 또는 항-SIRP α 항체 C25와의 조합은 인간 SIRP γ를 발현하는 인간 Jurkat T 세포주에 대해 식세포작용을 거의 유도하지 않았다. 항-PDL1/SIRP α 이중특이적 항체 ES019-020, ES019-024, ES019-025, ES019-026, ES019-029는 Jurkat T 세포 (SIRP γ 양성)에 대해 식세포작용 효과를 나타내지 않았다.
- [0764] 실시예 11: 항-클라우딘18.2/SIRP α 이중특이적 항체는 PDL1+ 암 세포의 시험관내 대식세포 식세포작용을 증진시킨다
- [0765] 인간 SIRPα/CD47 이중 KI 마우스에 hCD47/hCLDN18.2 과다발현 MC38 세포를 접종하였다. 평균 종양 부피가 ~70-100 mm<sup>3</sup>에 도달했을 때 마우스를 종양 부피에 따라 7개의 군으로 분류하였다. 마우스에게 동일한 몰 농도의 10mpk 이소형 항체, 10mpk CLDN18.2 mAb, 10mpk SIRPα mAb, 10mpk CLDN18.2 mAb 플러스 10mpk SIRPα mAb 또는 14mpk ES028-001, ES028-005, ES009를 i.p. 투여하였다. 투여 스케줄은 5회 용량에 대해 BIW였다. 종양 부피를 1주에 2회 측정하였다. 제5 투여 3일 후에, 마우스를 희생시키고, 종양을 칭량하였다. 상이한 처리군의 평균 종양 부피를 이소형 대조군의 것과 비교하는 이원 anova에 의해 통계를 수행하였다.
- [0766] 상대 종양 억제율, TGI (%)를 하기와 같이 계산하였다:
- [0767]  $TGI\% = (1-T/C) \times 100\%$ . (T 및 C는 각각 특정 시점에서의 처리군 및 대조군의 상대 종양 부피 (RTV) 또는 종양 중량 (TW)임).
- [0768]  $T/C\% = TRTV / CRTV \times 100\%$  (TRTV: 처리군의 평균 RTV; CRTV: 비히클 대조군의 평균 RTV;
- [0769]  $RTV = V_t/V_0$ ,  $V_0$ 은 분류 시점의 동물의 종양 부피이고,  $V_t$ 는 처리 후의 동물의 종양 부피임);
- [0770] T/C는 또한 하기와 같이 종양 중량에 기초하여 계산될 수 있다:
- [0771]  $T/C\% = TTW / CTW \times 100\%$  (TTW: 종료 시 처리군의 평균 종양 중량; CTW: 종료 시 비히클 대조군의 평균 종양 중량).
- [0772] 도 10에 제시된 바와 같이, 항-클라우딘18.2 항체 hu28H1L2 및 항-SIRP α 항체 C25 단독요법은 이소형 처리와 유사하게 종양 성장을 억제하지 않는다. 항-클라우딘18.2 및 항-SIRP α 항체 C25의 조합물은 종양의 성장을 유의하게 감소시켰다. 항-클라우딘18.2/SIRP α 이중특이적 항체 ES028-005는 조합물과 유사하게 강한 종양 성장 억제를 유도하였고; ES028-001은 보다 약한 종양 억제를 나타내었고, ES028-009는 종양 성장을 억제하지 않았다.
- [0773] 실시예 12: 항-SIRP α 완전 차단 항체 기반 BiME는 종양 세포에 대한 선택성과 함께 최상의 상승작용적 식세포 작용 효과를 제공한다
- [0774] 키메라 항체의 특징화
- [0775] 1.1 결합 특이성 검출
- [0776] 인간 SIRP α v1을 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포 또는 293F 세포 및 인간 SIRP α v2를 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포를 사용하는 FACS 검정에 의해 인간 SIRP α 변이체에 대한 정제된 키메라 항체의 결합 활성을 검출하였다. 도 12에 제시된 바와 같이, 시험된 바와 같은 모든 항체는 세포 표면 인간 SIRP α v1 및 세포 표면 인간

SIRP α v2에 강하게 결합한다. EC<sub>50</sub> 및 최고 신호를 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산하였다.

[0777]

1.2 CD47/SIRP α 상호작용 차단 활성 검출

[0778]

경쟁적 ELISA 검정을 사용하여 정제된 키메라 항체가 CD47 및 SIRP α 상호작용을 차단할 수 있는지 결정하였다. 간략하게, 항체 및 mFc 태그부착된 인간 CD47 ECD 재조합 단백질을 ELISA 마이크로플레이트 코팅된 인간 SIRP α v1 ECD 또는 인간 SIRP α v2 ECD 재조합 단백질과 함께 공동-인큐베이션하였다. CD47의 가용성 ECD의 농도는 25nM이고, SIRP α의 가용성 ECD의 농도는 20nM이다. 세척 후에, HRP 표지된 항-마우스 Fc 제2 항체 (시그마)를 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 100 μl/웰의 TMB 용액 (바이오테크놀로지 (Biotechnology))을 첨가하였다. 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 1N HCl 50 μl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. OD 450nm을 판독하였다. ELISA 마이크로플레이트 코팅된 인간 CD47 ECD 재조합 단백질에 대한 인간 SIRP α ECD 재조합 단백질 결합의 차단에 의해 차단 비를 결정하였다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 IC<sub>50</sub> 및 최고 차단 백분율을 도 13에 요약한다. 시험된 바와 같은 모든 항체는 인간 CD47과 상이한 인간 SIRP α 변이체 사이의 상호작용을 차단할 수 있었다.

[0779]

1.2.1 에피토프 분석

[0780]

경쟁적 ELISA 검정을 정제된 키메라 항체의 에피토프 비닝에 사용하였다. 간략하게 과량의 경쟁자 항체 및 mFc 태그부착된 인간 SIRP α v1 ECD 재조합 단백질을 ELISA 마이크로플레이트 코팅된 항체와 함께 공동-인큐베이션하였다. 세척 후에, HRP 표지된 항-마우스 Fc 제2 항체 (시그마)를 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 100 μl/웰의 TMB 용액 (바이오테크놀로지)을 첨가하였다. 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 1N HCl 50 μl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. OD 450nm을 판독하였다. 경쟁 비를 계산하였다. SIRP α에의 결합에 대해 서로 경쟁할 수 있는 항체는 관련된 결합 에피토프를 가질 수 있다. 표 B에 제시된 바와 같이, 025c는 인간 SIRP α에 대해 042c, 073c 및 hu1H9G4와 경쟁적 결합을 나타내지 않았고, 이는 이것이 별개의 에피토프에 결합할 수 있다는 것을 나타낸다. 042c, 073c와 hu1H9G4 사이의 경쟁은 양방향성이 아니며, 이는 그의 결합 에피토프가 관련될 수 있지만 완전히 동일하지는 않음을 나타낸다.

[0781]

025c, 042c, 073c, HEFLB 및 hu1H9G4의 에피토프 맵핑을 수소 중수소 교환 질량 분광측정법 (HDX-MS)을 사용하여 추가로 수행하였다. 도 23a에 제시된 바와 같이, 025c 결합은 His 태그부착된 인간 SIRP α v1 ECD의 YNQKEGHFPRVTTVSDL (서열식별번호: 218) 영역의 더 적은 수소 중수소 교환 비를 발생시켰고, 이는 이들 아미노산이 025c가 결합하는 데 중요할 수 있다는 것을 나타낸다. 도 23b에 제시된 바와 같이, 042c 결합은 His 태그부착된 인간 SIRP α v1 ECD의 SGAGTEL (서열식별번호: 219) 및 TNVDPVGESVS (서열식별번호: 220)의 2개의 영역의 더 적은 수소 중수소 교환 비를 발생시켰고, 이는 이들 아미노산이 042c가 결합하는 데 중요할 수 있다는 것을 나타낸다. 도 23c에 제시된 바와 같이, 073c 결합은 His 태그부착된 인간 SIRP α v1 ECD의 TNVDPVGESVSY (서열식별번호: 221) 영역의 더 적은 수소 중수소 교환 비를 발생시켰고, 이는 이들 아미노산이 073c가 결합하는 데 중요할 수 있다는 것을 나타낸다. 특히, 이들 3개의 영역은 CD47이 결합하는 SIRP α ECD의 IgV 도메인에 위치하지 않고, 이는 042c 및 073c가 CD47과 SIRP α의 상호작용을 차단하는 알로스테릭 항체로서 작용할 수 있거나 또는 042c 및 073c의 차단 활성이 입체 장애 효과라는 것을 나타낸다. 도 23d에 제시된 바와 같이, hu1H9G4 결합은 His 태그부착된 인간 SIRP α v1 ECD의 YNQKEGHFPRVTTVSDL (서열식별번호: 218) 영역의 더 적은 수소 중수소 교환 비를 발생시켰고, 이는 이들 아미노산이 hu1H9G4가 결합하는 데 중요할 수 있다는 것을 나타낸다. 도 23e에 제시된 바와 같이, HEFLB 결합은 his 태그부착된 인간 SIRP α v1 ECD의 VGPIQW (서열식별번호: 222) 영역의 더 적은 수소 중수소 교환 비를 발생시켰고, 이는 이들 아미노산이 HEFLB가 결합하는 데 중요할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0782]

경쟁적 ELISA 데이터 및 HDX-MS 데이터를 함께 취합하면, 025c, 042c 및 073c는 hu1H9G4 및 HEFLB의 참조 항체와 또한 상이한, 별개의 결합 에피토프를 가질 수 있는 것으로 결론지어진다. 또한, 결과는 025c, 042c 및 073c의 에피토프가 IgV 도메인 외부에 존재할 수 있음을 보여준다. IgV 도메인은 CD47의 세포외 Ig-도메인의 결합을 담당한다. 참조 항체의 서열 정보는 하기 표 A에 제시된다.

[0783] 표 A. HEFLB 및 hu1H9G4의 가변 영역 아미노산 서열

항체	VH	VL
HEFLB	SEQ ID NO: 214 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISC KASGYSFTSYVWHVWRQMPG KGLEWGMGNIDPSDSDTHYSPSF QGHVTLSDVSKSISTAYLQLSSL KASDTAMYVCVRGGTGLAYF AYWGQGLTVVSS	SEQ ID NO: 215 DVVMTQSPLSLPVTLGQPAS ISCRSSQSLVHSYGNTYLYW FQQRPGQSPRLLIYRVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCFQGTHTVPY TFGGGTVKVEIK
	SEQ ID NO: 216 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWITWVKQAPG QGLEWIGDIYPGSGSTNHIEKF KSKATLTVDTISISTAYMELSR RSDDTAVYYCATGYGSSYGYF DYWGQGLTVVSS	SEQ ID NO: 217 DIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCRASENIYSYLAWYQQKP GKAPKLLIYTAKTAEVGS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQHQYGPPTFGQ GTKLEIK

[0784]

[0785] 표 B. 항-SIRP α 키메라 항체 에피토프 비닝 요약

% 결합				
경쟁자	코팅 mAb	G25c	042c	hu1H9G4
	025c	93.5	19.1	15.3
	042c	8.9	93.9	29.8
	hu1H9G4	14.5	82.6	90.5
	073c	9.1	93.6	37.7

[0786]

[0787] 1.3 SHP-1 동원 검정

[0788] CD47/SIRP α 매개되는 "나를 먹지 말라"는 신호전달을 차단하는 정제된 키메라 항체의 효능을 세포-기반 SHP-1 동원 검정에 의해 평가하였다. 전장 인간 SIRP α v1을 그의 C-말단에 융합된 소형 베타-gal 단편 (ED)으로 조작하고, SHP-1의 SH2-도메인을 상보성 베타-gal 단편 (EA)으로 조작하였다. 이들 구축물을 K562 세포에서 안정적으로 발현시켰다. 인간 CD47 발현 세포와의 공동-배양을 통한 리간드 결속은 SIRP α-ED 융합 단백질의 인산화를 발생시켜 SHP-1-EA의 동원을 초래하며, 이는 활성 베타-gal 효소를 생성하도록 강제한다. 이 활성 효소는 기질을 가수분해하여 리포터 활성의 척도로서 화학발광을 생성한다. IC<sub>50</sub> 및 최고 차단 백분율을 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산하였다. 도 14에 요약된 바와 같이, 시험된 바와 같은 모든 항체가 CD47/SIRP α 매개되는 "나를 먹지 말라"는 신호전달을 상이한 수준으로 파괴할 수 있다.

[0789] 1.4 시험관내 식세포작용 검정

[0790] 정제된 키메라 항체의 기능 효능을 유동 세포측정법 기반 식세포작용 검정에 의해 평가하였다. 상이한 SIRPA 유전자형을 갖는 M0 비분극화된 또는 M1 분극화된 인간 단핵구 유래 대식세포를 시험된 바와 같은 항체의 존재 하에서 셀트레이스 바이올렛(CellTrace Violet) (라이프 테크놀로지스(Life Technologies)) 표지된 CD47 발현 암 세포와 공동-배양하였다. 셀 트레이스 바이올렛 염료에 대해 양성인 대식세포의 백분율을 결정함으로써 식세포작용을 검정하였다. 비분극화된 대식세포의 경우, 말초 혈액 단핵 세포를 10% FBS 및 50 ng/ml M-CSF로 보충된 1640 내의 10 cm 조직 배양 플레이트에 7 내지 9일 동안 시딩하였다. 부착 세포를 M0 비분극화된 대식세포로서 수거하였다. M1 분극화된 대식세포의 경우, 말초 혈액 단핵 세포를 10% FBS 및 50 ng/ml GM-CSF로 보충된 1640 내의 10 cm 조직 배양 플레이트에 5일 동안 시딩하였다. 50 ug/ml IFN γ 및 100 ug/ml LPS를 추가의 2 내지 4일 배양 동안 첨가하였다. 부착 세포를 M1 분극화된 대식세포로서 수거하였다.

[0791] 도 20a에 제시된 바와 같이, 015c, 025c, 042c, 059c 및 073c는 SIRPA 이형접합 v1/v2 개체로부터 획득된 M0 대식세포에 의한 Raji 세포의 종양 세포 흡수를 증진시키는 단일 작용제 활성을 나타내지 않았다. 그러나, 리톡시맙 (항-CD20 항체)의 존재 하에서, 인간 CD47과 인간 SIRP α v2 사이의 상호작용을 차단하는 활성이 보다

약한 059c 이외에, 시험된 바와 같은 모든 다른 정제된 키메라 항체는 Raji 세포의 대식세포 매개된 항체 의존성 세포성 식세포작용 (ADCP)을 강화시켰다.

- [0792] SIRP α 항체 및 PD-L1 항체의 조합물을 SIRPA 동형접합 v1/v1 (도 20b) 및 v2/v2 (도 20c) 개체로부터 수득된 MO 대식세포를 사용하는 식세포작용 검정에서 시험하였다. PD-L1 항체의 존재 하에, 025c, 042c 및 073c는 PD-L1을 안정적으로 발현하는 Raji 세포의 대식세포 매개된 ADCP를 효과적으로 강화시켰다.
- [0793] 인간화 항체의 특징화
- [0794] 1.5 결합 특이성 검출
- [0795] 시험된 바와 같은 모든 인간화 항체는 SIRP 패밀리 구성원에 결합하는 C25의 모 항체와 유사한 활성을 보유하는 것으로 확인되었다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 EC<sub>50</sub> 및 최고 신호를 도 15에 요약한다. 따라서, 본원에 제공된 모든 인간화 항체 (예를 들어, hu025.021, hu025.033, hu025.023, hu025.059, hu025.060, hu26.H1L1, hu26.H1L2, hu26.H1L2 (S92A), C71, C71v38, C239, C492, C570, 570h3, C446, C2811, C1778, C1793, C2855, C2713 및 C2719)는 각각 상응하는 모 항체와 유사한 활성을 갖는 것으로 예상될 수 있다.
- [0796] 1.5.1 친화도 검출
- [0797] 인간화 항체를 표면 플라즈몬 공명 기술 (비아코어 시스템)을 사용하여 인간 SIRP α v1, 인간 SIRP α v2에 대한 결합 친화도에 대해 특징화하였다. 회합 및 해리 곡선을 1:1 결합 모델로 피팅하고, 각각의 항체에 대한 Ka/Kd/KD 값을 계산하였다. 각각의 항체에 대한 Ka/Kd/KD 값의 친화도 데이터를 도 16에 요약한다.
- [0798] 1.7 CD47/SIRP α 상호작용 차단 활성 검출
- [0799] 인간화 항체를 CD47 및 SIRP α 상호작용을 차단하는 능력에 대해 경쟁적 ELISA 검정 (상기 기재된 방법 참조)으로 시험하였다. 도 17에 제시된 바와 같이, 시험된 바와 같은 모든 인간화 항체는 인간 CD47과 상이한 인간 SIRP α 변이체 사이의 상호작용을 차단하는 C25의 모 항체와 유사한 활성을 보유하는 것으로 확인되었다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 IC<sub>50</sub> 및 최고 차단 백분율을 도 17에 요약한다.
- [0800] 또한 인간화 항체 및 일부 공지된 항-SIRP α 항체의 차단 활성을 추가로 비교하기 위해 경쟁적 FACS 검정을 설정하였다. 간략하게, 항체 및 mFc 태그부착된 인간 CD47 ECD 재조합 단백질을 인간 SIRP α v1 또는 인간 SIRP α v2를 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포와 함께 공동-인큐베이션하였다. 세척 후에, 염료 표지된 항-마우스 Fc 제2 항체 (시그마)를 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 형광 강도를 검출하였다. SIRP α 발현된 CHOK1 세포에 대한 인간 CD47 ECD 재조합 단백질 결합의 차단에 의해 차단 비를 결정하였다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 IC<sub>50</sub> 및 최고 차단 백분율을 도 18에 요약한다.
- [0801] 1.8 SHP-1 동원 검정
- [0802] CD47/SIRP α 매개되는 "나를 먹지 말라"는 신호전달을 차단하는 인간화 항체의 효능을 세포-기반 SHP-1 동원 검정 (상기 기재된 방법 참조)에 의해 평가하였다. 시험된 바와 같은 모든 인간화 항체는 SIRP α 세포내 꼬리로의 SHP-1 동원을 유발하는 CD47 결속을 차단하는, C25의 모 항체와 유사한 활성을 보유하는 것으로 확인되었다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 IC<sub>50</sub> 및 최고 차단 백분율을 도 19에 요약한다.
- [0803] 1.9 시험관내 식세포작용 검정
- [0804] 시험관내 기능 검증을 위해, SIRP α 항체 및 PD-L1 항체 또는 리톡시맙의 조합물을 SIRPA 동형접합 v1/v1 (도 21a 및 도 21b) 및 v2/v2 (도 21c 및 도 21d) 개체로부터 수득된 MO 대식세포를 사용하는 식세포작용 검정에서 시험하였다. 시험된 바와 같은 모든 인간화 항체는 PD-L1 항체 또는 리톡시맙의 존재 하에 PD-L1을 안정적으로 발현하는 Raji 세포의 대식세포 매개된 ADCP를 강화시키는, 025c의 모 항체와 유사한 활성을 보유하는 것으로 확인되었다.
- [0805] 2. 항-SIRP α 항체의 완전 차단제, 부분 차단제 및 비-차단제로의 카테고리화
- [0806] 경쟁적 ELISA 검정을 사용하여 정제된 키메라 항체가 CD47 및 SIRP α 상호작용을 차단할 수 있는지 결정하였다. 간략하게, 항체 및 mFc 태그부착된 인간 CD47 ECD 재조합 단백질을 ELISA 마이크로플레이트 코팅된 인간 SIRP α v1 ECD 재조합 단백질과 함께 공동-인큐베이션하였다. 세척 후에, HRP 표지된 항-마우스 Fc 제2 항체 (시그마)를 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 100 μl/웰의 TMB 용액 (바이오테크놀로지)을

첨가하였다. 실온에서 15분 동안 인큐베이션 후, 1N HCl 50  $\mu$ l를 첨가하여 반응을 정지시켰다. OD 450nm을 판독하였다. ELISA 마이크로플레이트 코팅된 인간 CD47 ECD 재조합 단백질에 대한 인간 SIRP  $\alpha$  ECD 재조합 단백질 결합의 차단에 의해 차단 비를 결정하였다. 도 22는 025 또는 C25가 90% 초과 최대 차단 백분율을 가져 완전 차단제로서 정의되고, 050 또는 C50이 0에 근접한 최대 차단 백분율을 가져 비-차단제로서 정의되고, 035 또는 C35가 그 사이의 최대 차단 백분율을 가져 부분 차단제로서 정의된다는 것을 보여준다 (표 10).

[0807] 표 10. 상이한 항-SIRP  $\alpha$  클론의 CD47 및 SIRP  $\alpha$  차단 특성

CD47- SIRP $\alpha$ 상호작용 차단 활성	항- SIRP $\alpha$ 클론
완전 차단제	C25, C15, C42, C59, C73
부분 차단제	C35
비-차단제	C50

[0808]

[0809] 3. 완전 차단제 C25, C15, C42, C59 및 C73, 부분 차단제 C35 및 비-차단제 C50을 사용한 조합 요법 및 이중 특이적 분자

[0810] 인간 PDL1 발현이 결여된 인간 Raji 림프종 세포에서 상이한 CD47 및 SIRP  $\alpha$  차단 항체를 시험하거나, 또는 인간 PDL1을 발현하는 Raji를 형광 염료 CFSE로 표지하고, 인간 대식세포-콜로니 자극 인자 (M-CSF) 처리된 단핵구 유래 대식세포와 함께 이소형 대조군, 항-PDL1 항체, 항-SIRP  $\alpha$  항체 C25, C35 C50, 항-PDL1 및 항-SIRP  $\alpha$  항체의 조합물 또는 C25, C35, C50 기반 항-PDL1/SIRP  $\alpha$  이중특이적 항체의 존재 하에 인큐베이션하였다. 2시간 후, 대식세포를 수거하고, 형광 표지된 항-인간 대식세포 항체로 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. CD11b+CFSE+ 이중 양성 사건은 포식된 CFSE-표지된 종양 세포를 갖는 대식세포를 확인시켜 준다. 각각의 샘플은 상이한 색으로 나타내어진다. 식세포 지수가 3개의 개별 샘플에 대해 제시된다.

[0811] 도 11a에 제시된 바와 같이, 항-SIRP  $\alpha$  부분 차단 항체 C35 및 비-차단 항체 C50은 Raji/PDL1 세포에 대해 단독-처리로 ~40% 식세포작용을 유도하였고; 항-SIRP  $\alpha$  완전 항체 C25 단독처리는 식세포작용을 거의 유도하지 않았다. 항-PDL1 및 항-SIRP  $\alpha$  항체 C25의 조합물 또는 C25 기반 BiME는 식세포작용을 유의하게 개선시켰다. 항-PDL1 및 항-SIRP  $\alpha$  항체 C35, C50의 조합물 또는 기반 BiME는 상승작용적 식세포작용 효과를 나타내지 않았다.

[0812] Raji (PDL1 음성) 세포에 대한 식세포작용 검정에서 (도 11b), 항-SIRP  $\alpha$  부분 차단 항체 C35 및 비-차단 항체 C50 단독처리는 Raji (PDL1 음성) 세포에 대해 식세포작용을 여전히 유도할 수 있었고; 항-SIRP  $\alpha$  완전 항체 C25 단독처리는 식세포작용을 거의 유도하지 않았다. 항-PDL1 및 항-SIRP  $\alpha$  항체 C25의 조합물 또는 C25 기반 PDL1/SIRP  $\alpha$  이중특이적 항체는 종양 세포 상에서의 PDL1 발현의 결여로 인해 식세포작용을 유도하지 않았다. 항-PDL1 및 항-SIRP  $\alpha$  항체 C35의 조합물 또는 C50 기반 BiME는 C35 또는 C50 항체 단독처리와 유사한 식세포작용 효과를 나타내었다.

[0813] 결과는 항-SIRP  $\alpha$  항체 C35 또는 C50 단독처리, 조합물 또는 이중특이적 항체가 C25 항체와 비교하여 표적 항원 발현과 독립적으로 종양 세포 식세포작용을 유도할 수 있다는 것을 나타내었다. 항-SIRP  $\alpha$  항체 C25 기반 이중 특이적 항체의 특성은 보다 특이적이고 안전한 특성을 제공한다.

[0814] 실험 데이터를 하기 표 11에 요약하였다.

[0815] 표 11. 실시예 10 및 12로부터의 실험 결과의 요약

시험된 세포주	단독요법	조합물	BiME	실시예
K562 백혈병 종양 세포 (- 인간 PDL1)	C25: 식세포작용을 거의 유도하지 않음 항-PDL1 항체 C71: 식세포작용을 거의 유도하지 않음	C25+C71: 상승작용적 효과 없음	C25+C71: 상승작용적 효과 없음	10
K562 백혈병 종양 세포 (+ 인간 PDL1)	항-PDL1 항체 C71: ~20% 식세포작용; C25: 식세포작용을 거의 유도하지 않음	C25+C71: 상승작용적 효과	C25+C71: 상승작용적 효과	10
인간 Raji 림프종 세포 (- 인간 PDL1)	C25: 식세포작용을 거의 유도하지 않음 항-PDL1 항체 C71: 식세포작용을 거의 유도하지 않음	C25+C71: 상승작용적 효과 없음	C25+C71: 상승작용적 효과 없음	12
	C35 및 C50: ~40% 식세포작용을 유도함	C35+C71 또는 C50+C71: 단독요법과 유사함	C35+C71, 또는 C50+C71: 단독요법과 유사함	
인간 Raji 림프종 세포 (+ 인간 PDL1)	C25: 식세포작용을 거의 유도하지 않음	C25: 상승작용적 효과	C25: 상승작용적 효과	12
	C35 또는 C50: ~40% 식세포작용을 유도함 항-PDL1 항체 C71: ~20% 식세포작용을 유도함	C35+C71; 또는 C50+C71: 단독요법과 유사함	C35+C71; 또는 C50+C71: 단독요법과 유사함	

[0816]

인간 CD47 및 인간 클라우딘18.2를 발현하는 마우스 MC38 결장 종양 세포	항-클라우딘18.2 항체 hu28H1L2: ~25% 식세포작용을 유도함 항-SIRP $\alpha$ 항체 C25: 식세포작용을 거의 유도하지 않음	C25+ hu28H1L2: 상승작용적 효과	C25+ hu28H1L2: 보다 강한 상승작용적 효과	4
---	--	-------------------------	-------------------------------	---

[0817]

[0818]

실시예 4에 제시된 바와 같이, 항-클라우딘18.2 및 항-SIRP $\alpha$  항체 C25의 조합물 또는 C25 기반 BiME는 또한, 비-클라우딘18.2 발현 세포에 비해 클라우딘18.2를 발현하는 세포에 대해 선택적으로 식세포작용을 유의하게 개선시킨다.

[0819]

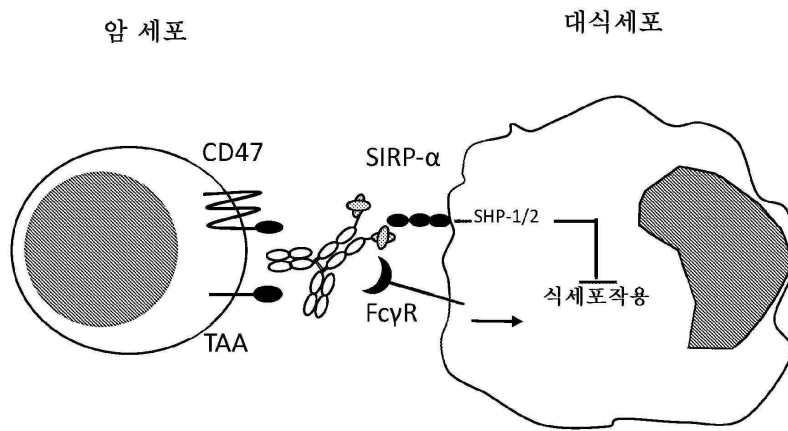
또한, 도 20a 및 도 21a에 제시된 바와 같이, C15, C42, C59 또는 C73 및 표적 항원 (예를 들어, PD-L1, 클라우딘18.2)을 표적화하는 항체의 조합물은 표적 항원 (예를 들어, PD-L1, 클라우딘18.2) 비-발현 세포에 비해 표적 항원을 발현하는 세포에 대해 선택적 식세포작용을 가질 것으로 예상된다. 또한 완전 차단제 C15, C42, C59 및 C73을 사용하여 ES028-001, ES028-005, ES028-009, ES028-013, ES019-020, ES019-024, ES019-025, ES019-026, ES019-029, ES019-072, ES019-073 및 ES019-079와 같은 형태로 제공되는 다중-특이적 분자를 제조할 수 있고, 이는 표적 항원 (예를 들어, PD-L1, 클라우딘18.2) 비-발현 세포에 비해 표적 항원을 발현하는 세포에 대해 유사한 선택적 식세포작용을 가질 것으로 예상될 수 있다.

[0820]

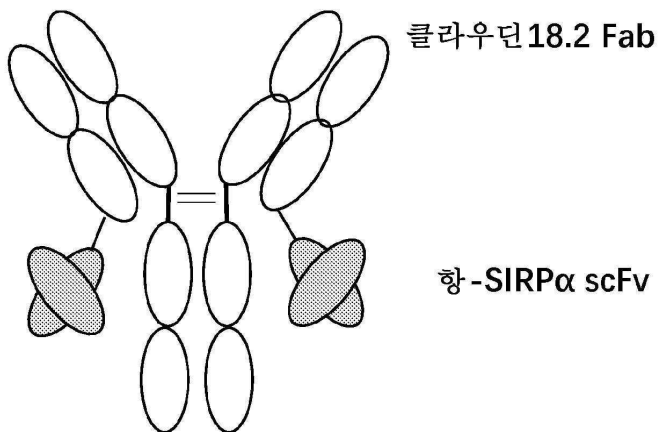
비록 대식세포가 본 명세서 전반에 걸쳐 예시되지만, 본원에 기재된 다중-특이적 분자, 조성물 및 방법은 골수 세포 계통의 세포, 예컨대 수지상 세포에 적용가능하다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 바와 같이 세포 대 세포 기준으로 부차적인 최적화 및 변화가 구상되며, 이는 본 개시내용의 범주 내로 고려된다.

도면

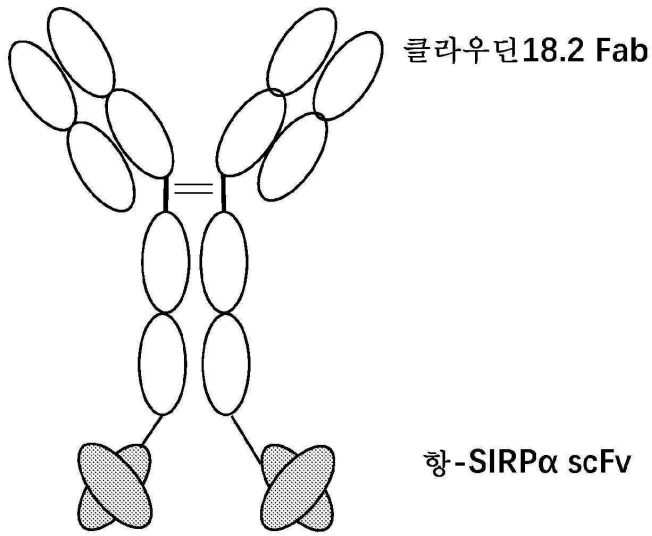
도면1



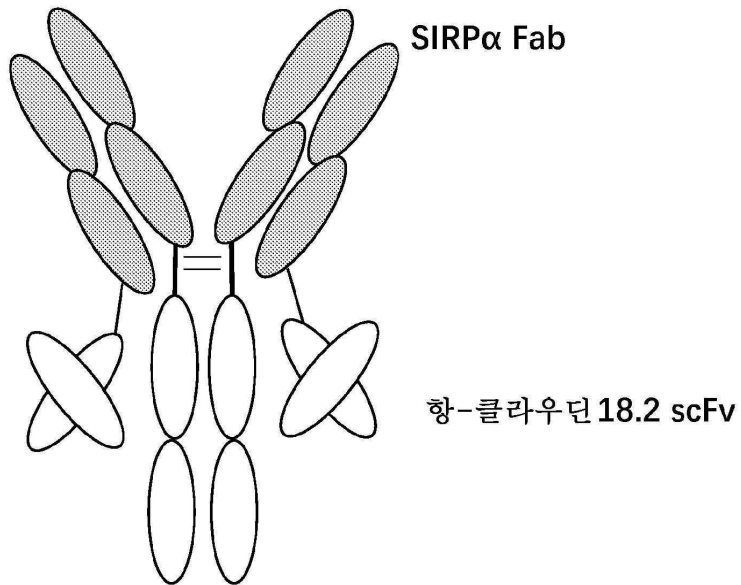
도면2a



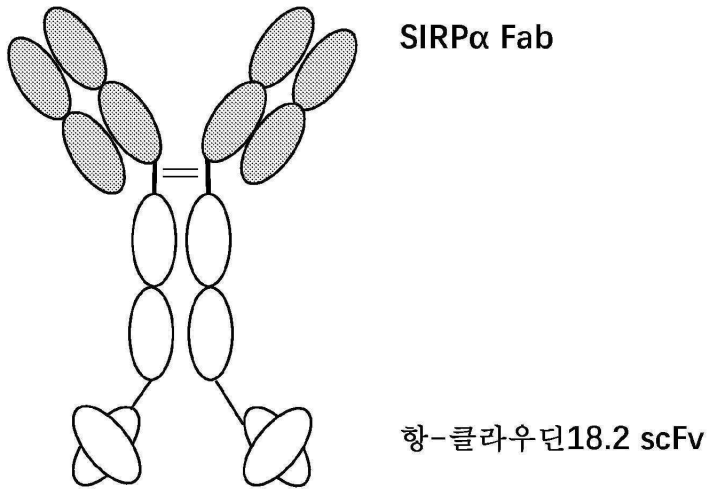
도면2b



도면2c

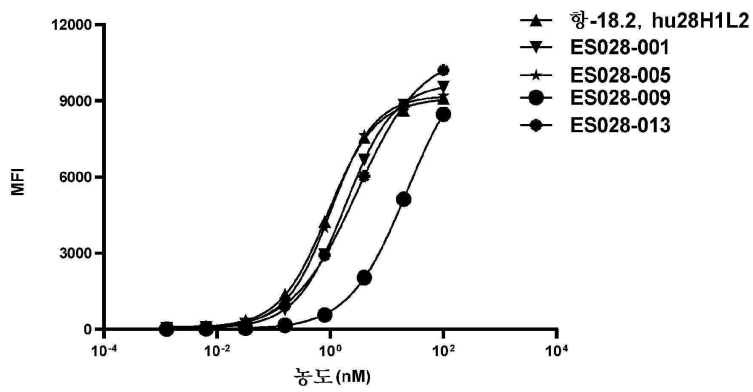


도면2d



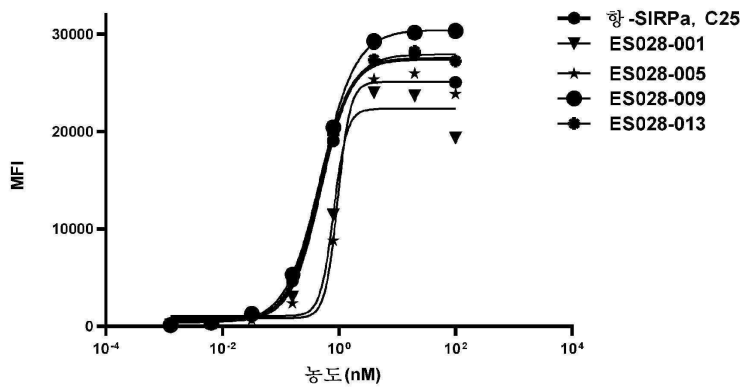
도면3a

Raji/h클라우딘18.2 세포에 대한 FACS 결합

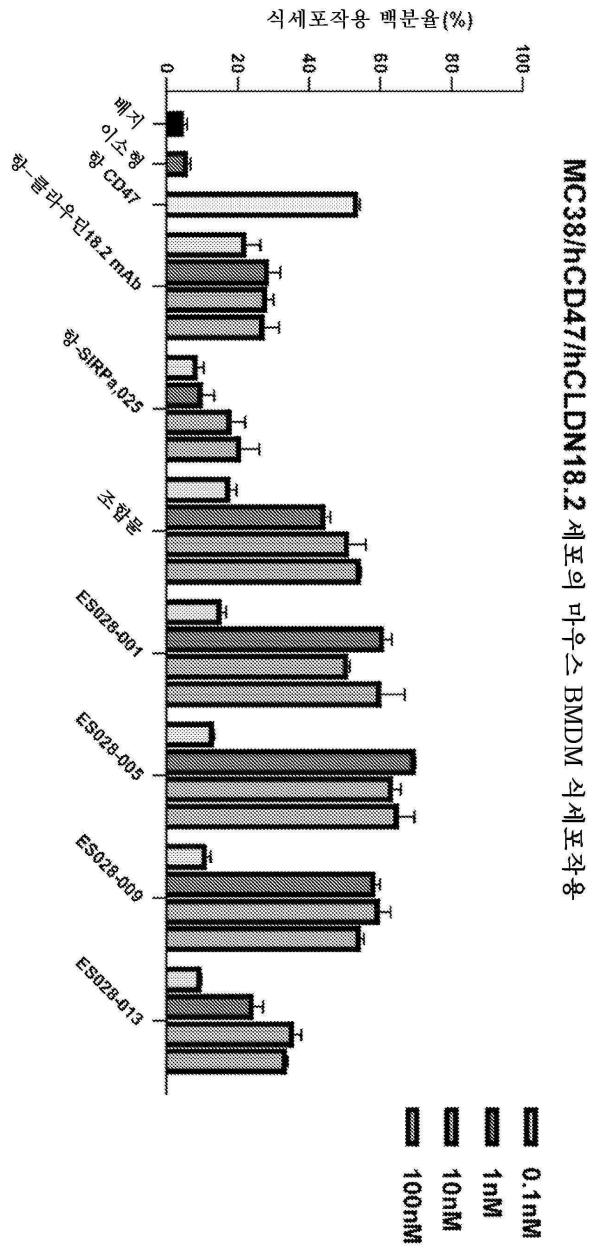


도면3b

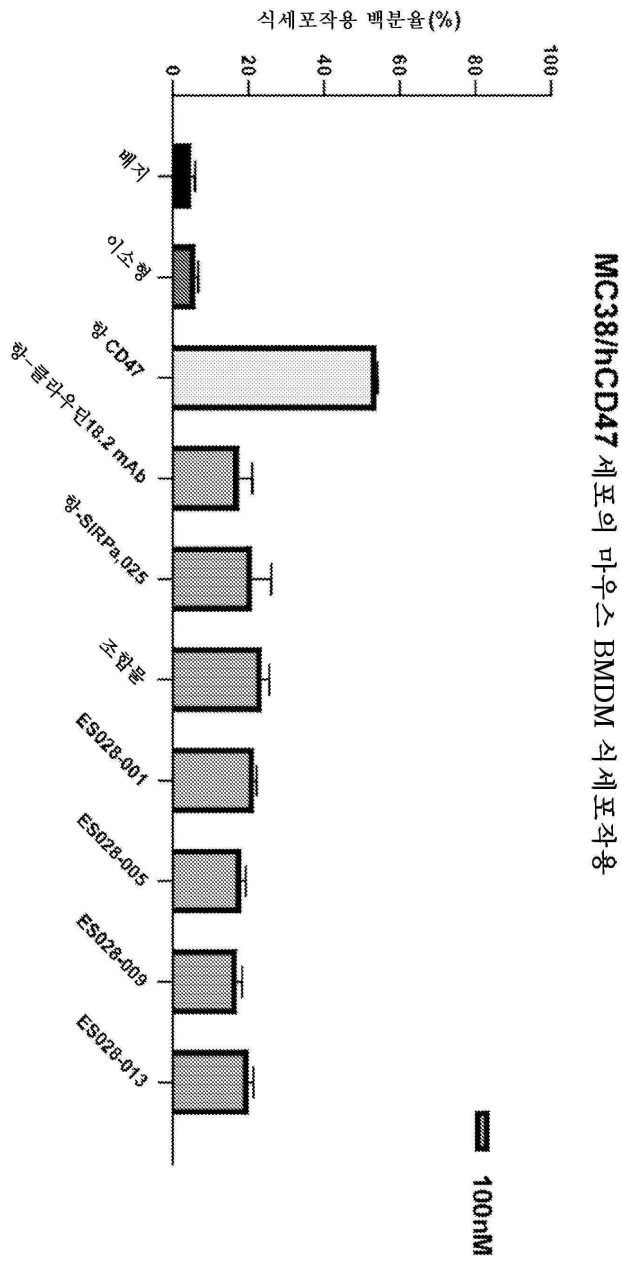
CHO-K1/SIRPα FACS 결합



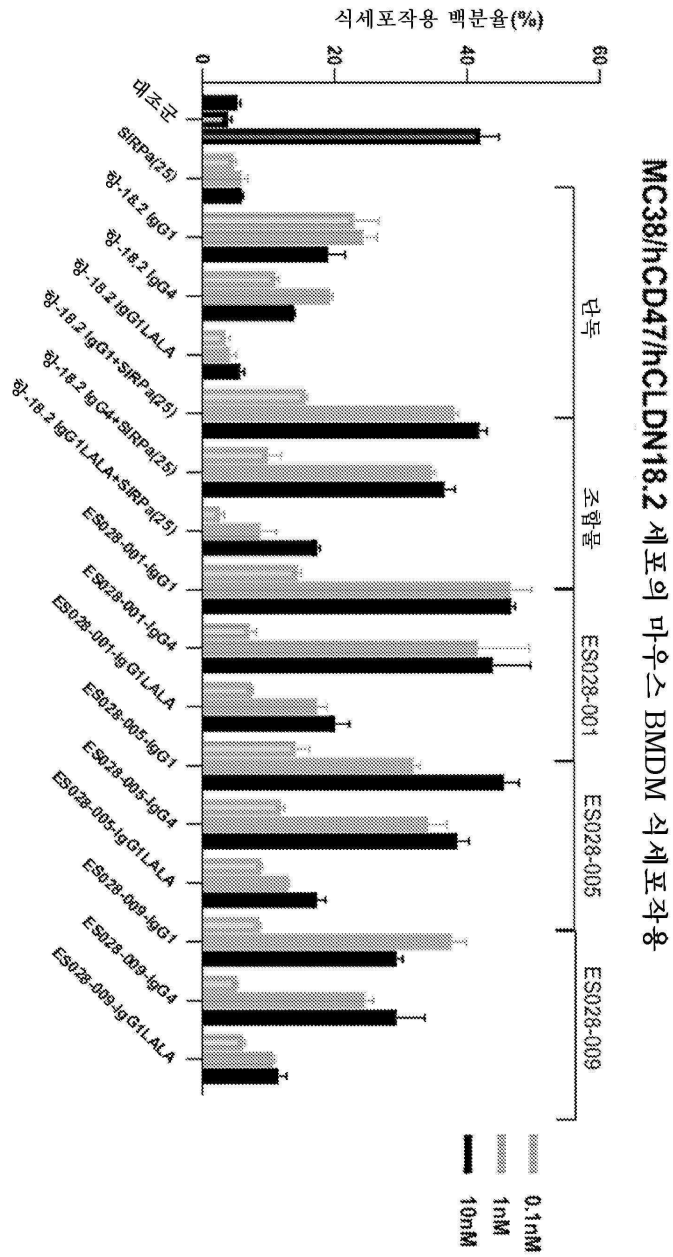
도면4a



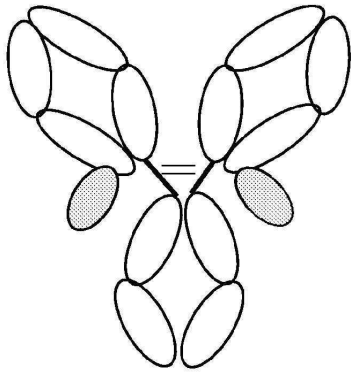
도면4b



도면5



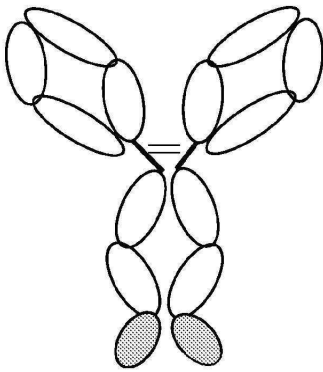
도면6a



항-SIRP $\alpha$  Fab

항-PDL1 sdAb

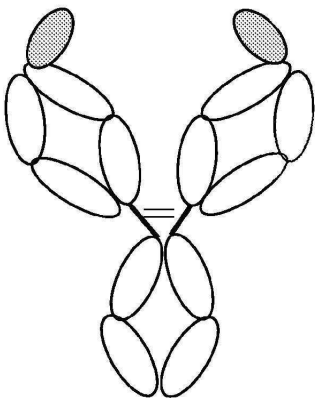
도면6b



항-SIRP $\alpha$  Fab

항-PDL1 sdAb

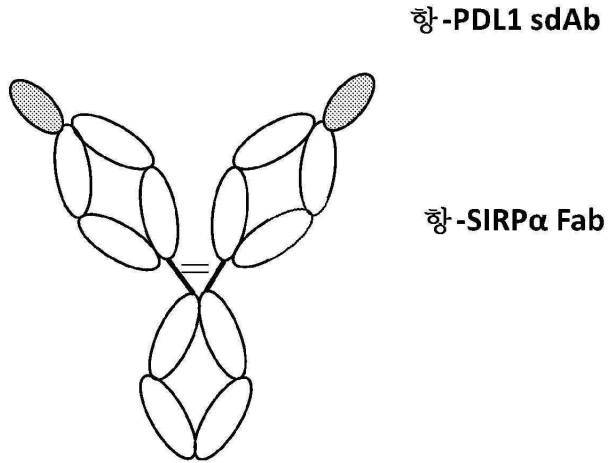
도면6c



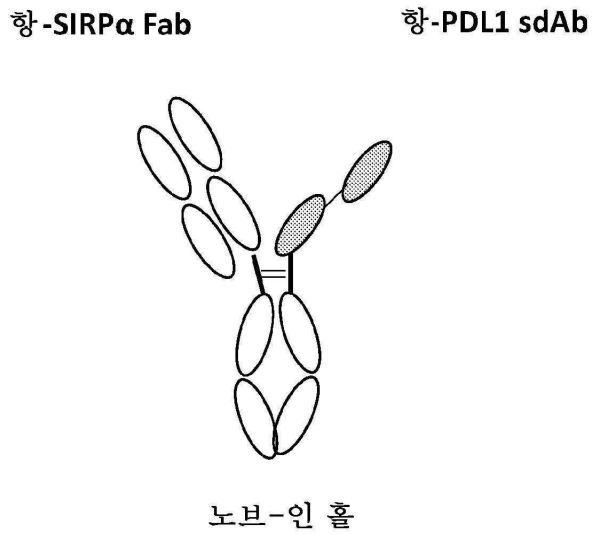
항-PDL1 VHH

항-SIRP $\alpha$  Fab

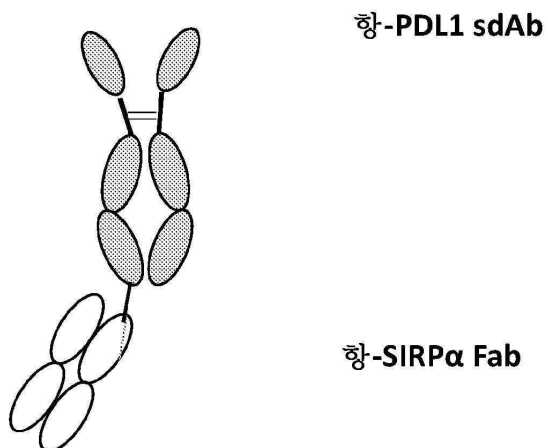
도면6d



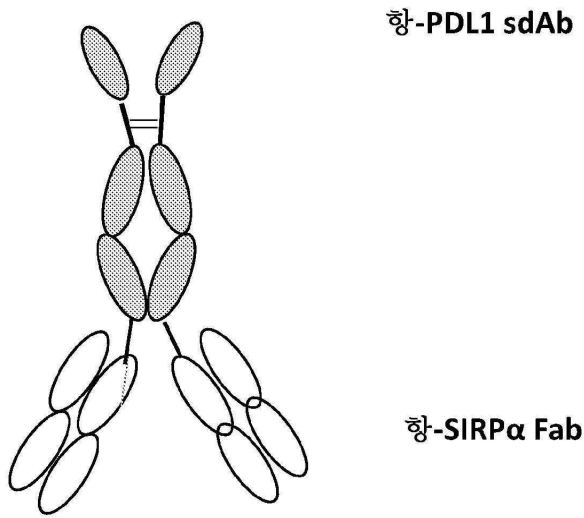
도면6e



도면6f

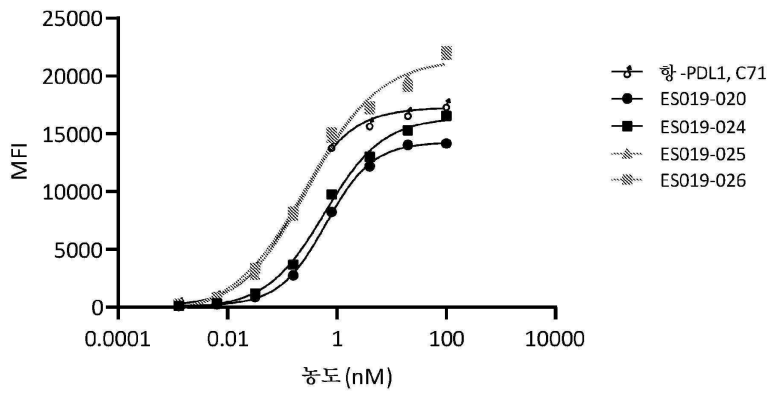


도면6g



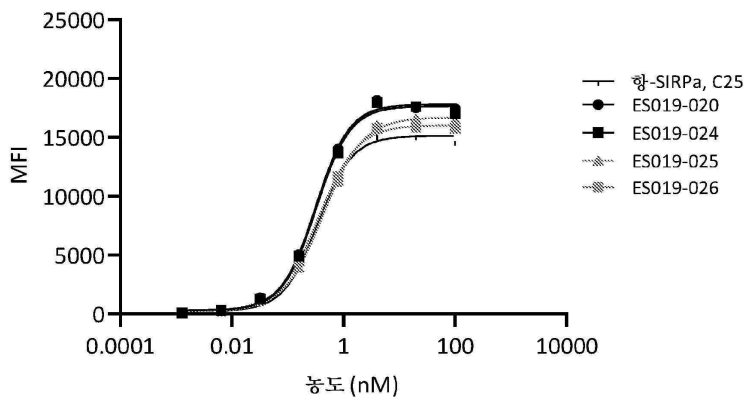
도면7a

Raji/hPDL1 세포에 대한 FACS 결합

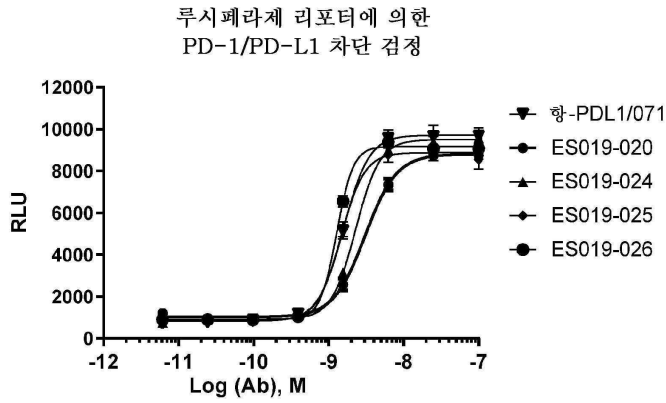


도면7b

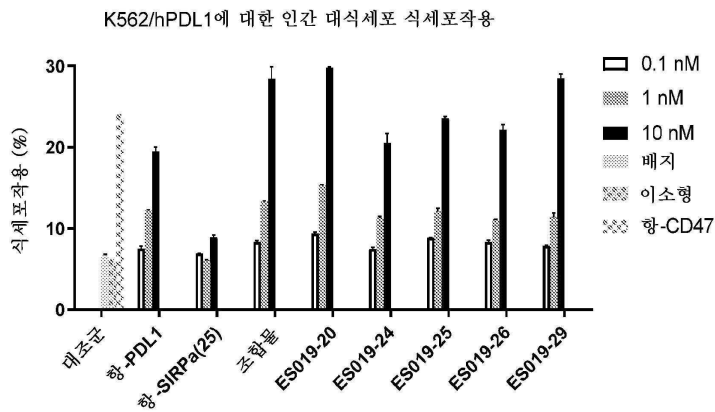
CHO-K1/SIRPα 세포 FACS 결합



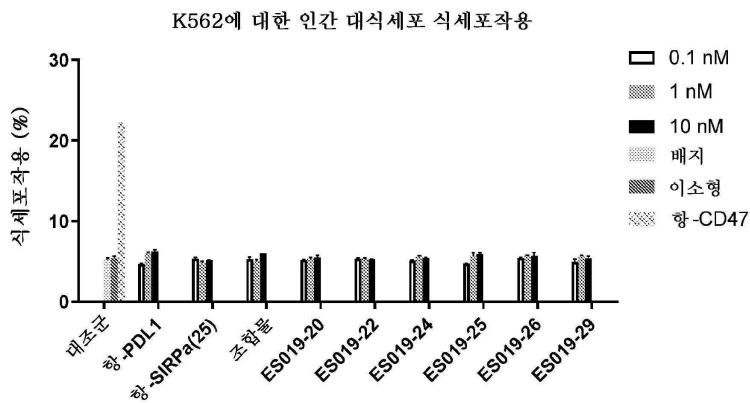
도면8



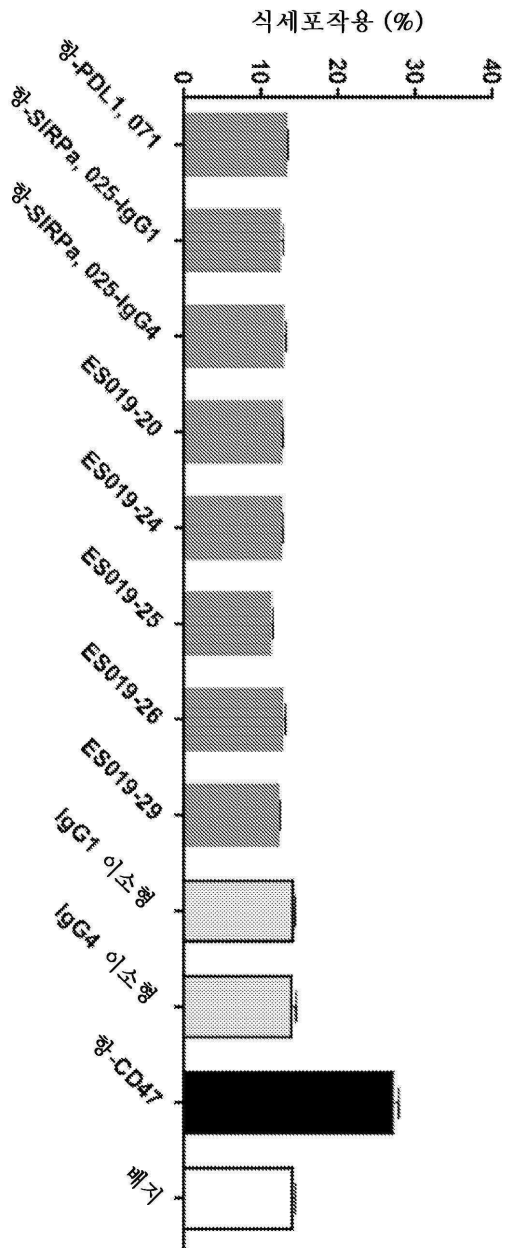
도면9a



도면9b

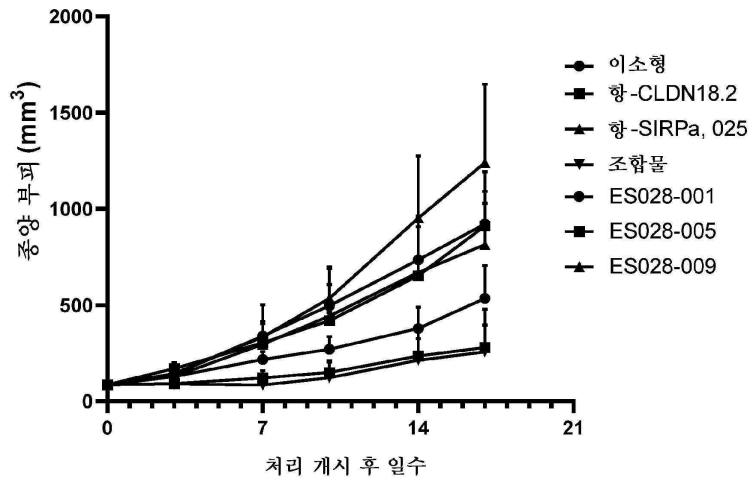


도면9c

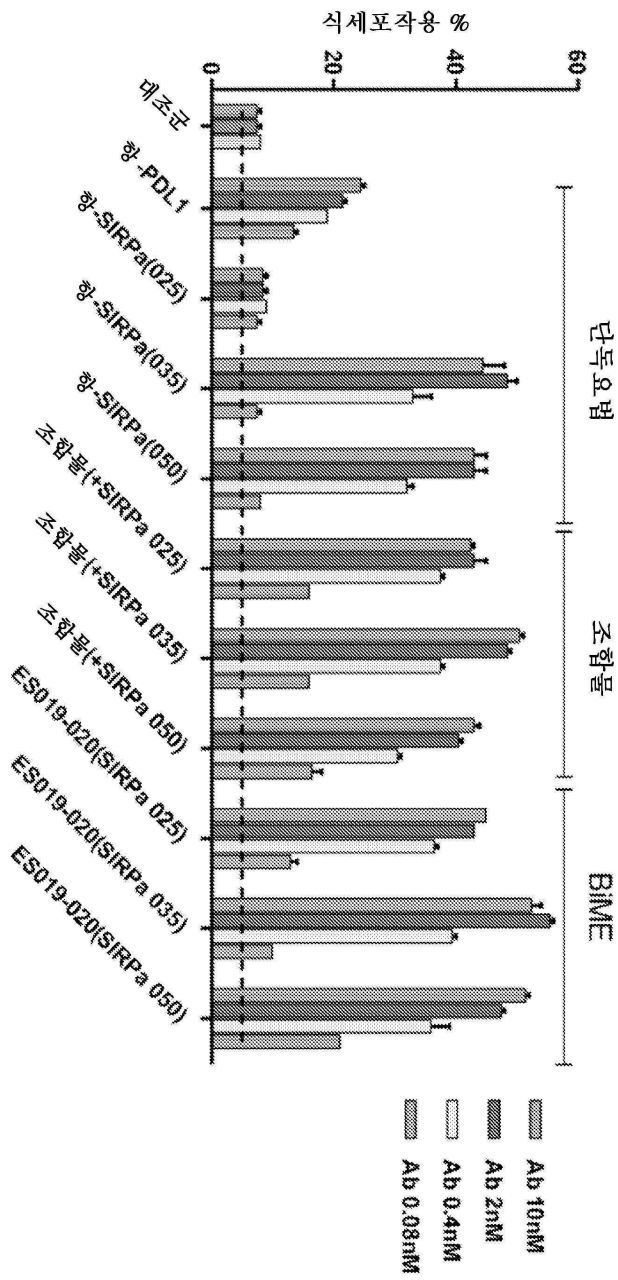


Jurkat에 대한 인간 대식세포 식세포작용

도면10

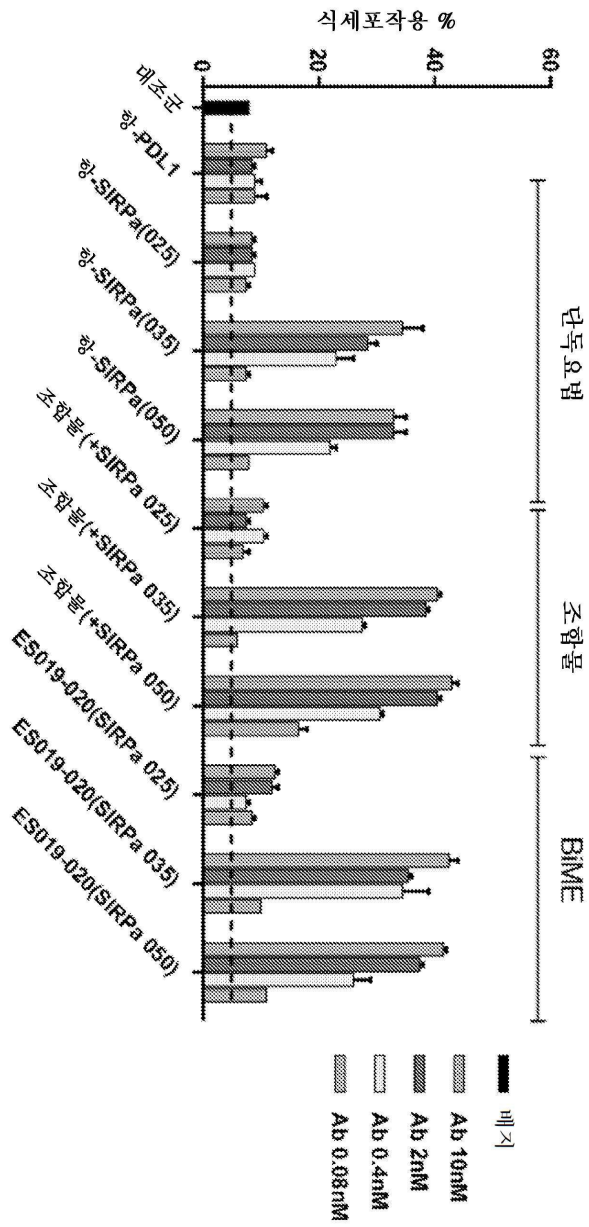


도면11a



Raji/PDL1에 대한 상이한 SIRPα의 식세포작용

도면11b



도면12

Ab	CHOK1-hSIRP $\alpha$ v1		CHOK1-hSIRP $\alpha$ v2	
	EC <sub>50</sub> (nM)	평균 MFI	EC <sub>50</sub> (nM)	평균 MFI
C15	1.49	79989	1.58	50062
C25	1.49	77587	1.34	51608
C42	1.90	73225	4.21	54782
C59	1.45	69840	12.03	19608
C73	1.50	67794	2.12	47326

도면13

Ab	인간 CD47/SIRP $\alpha$ v1 상호작용 차단		인간 CD47/SIRP $\alpha$ v2 상호작용 차단	
	IC <sub>50</sub> (nM)	최고 차단 (%)	IC <sub>50</sub> (nM)	최고 차단 (%)
C15	2.32	96.4	2.45	96.71
C25	2.12	96.5	2.21	96.54
C42	3.60	97.1	4.49	94.64
C59	2.63	97.0	54.06	84.4
C73	2.74	95.1	4.92	82.76

N/A는 이용가능한 데이터가 없음을 의미함

도면14

Ab	SHP-1 동원 차단	
	IC <sub>50</sub> (nM)	최고 차단 (%)
C15	0.09	73.51
C25	0.28	84.53
C42	0.99	70.00
C59	0.07	66.92
C73	5.66	51.25

도면15

Ab	CHOK1-hSIRP $\alpha$ v1		CHOK1-hSIRP $\alpha$ v2	
	EC <sub>50</sub> (nM)	최고 MFI	EC <sub>50</sub> (nM)	최고 MFI
hu025.021	1.08	56405	0.87	46450
hu025.023	1.13	57807	0.81	45824
hu025.033	0.99	53789	0.62	39793
hu025.059	1.05	59377	0.75	47252
hu025.060	0.84	61472	0.80	48846
C25	1.22	64734	0.99	52966

도면16

항원	항체	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
인간 SIRP $\alpha$ v1	025c	6.02E+05	9.24E-04	1.53E-09
	hu025.21	5.99E+05	1.83E-03	3.05E-09
	hu025.23	6.43E+05	1.72E-03	2.67E-09
	hu025.59	5.36E+05	1.23E-03	2.29E-09
인간 SIRP $\alpha$ v2	hu025.60	5.60E+05	1.11E-03	1.99E-09
	025c	1.51E+06	2.54E-03	1.69E-09
	hu025.21	1.65E+06	5.60E-03	3.39E-09
	hu025.23	1.77E+06	4.92E-03	2.78E-09
인간 SIRP $\alpha$ v2	hu025.59	1.42E+06	3.92E-03	2.76E-09
	hu025.60	1.47E+06	3.44E-03	2.34E-09

도면17

Ab	인간 CD47/SIRPα v1 상호작용 차단		인간 CD47/SIRPα v2 상호작용 차단	
	IC <sub>50</sub> (nM)	최고 차단 (%)	IC <sub>50</sub> (nM)	최고 차단 (%)
025c	2.03	97.5	1.86	98.6
hu025.021	2.07	97.7	1.96	98.3
hu025.023	2.60	97.2	2.07	98.0
hu025.033	2.22	97.2	1.88	98.3
hu025.059	2.48	97.1	2.03	98.3
hu025.060	2.15	95.2	1.88	97.0

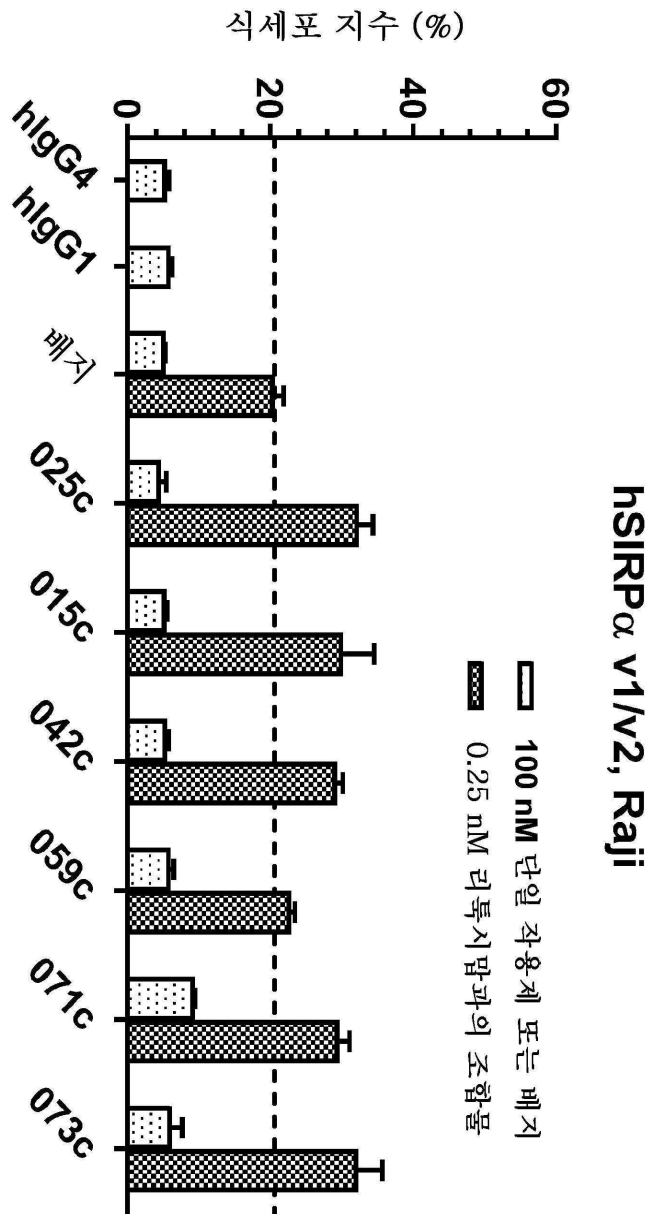
도면18

Ab	인간 CD47/SIRP $\alpha$ v1 상호작용 차단		인간 CD47/SIRP $\alpha$ v2 상호작용 차단	
	IC <sub>50</sub> (nM)	최고 차단 (%)	IC <sub>50</sub> (nM)	최고 차단 (%)
025c	0.40	97.6	0.63	99.7
hu025,023	0.57	97.7	0.75	100
hu025,060	0.53	98.7	0.77	99.8

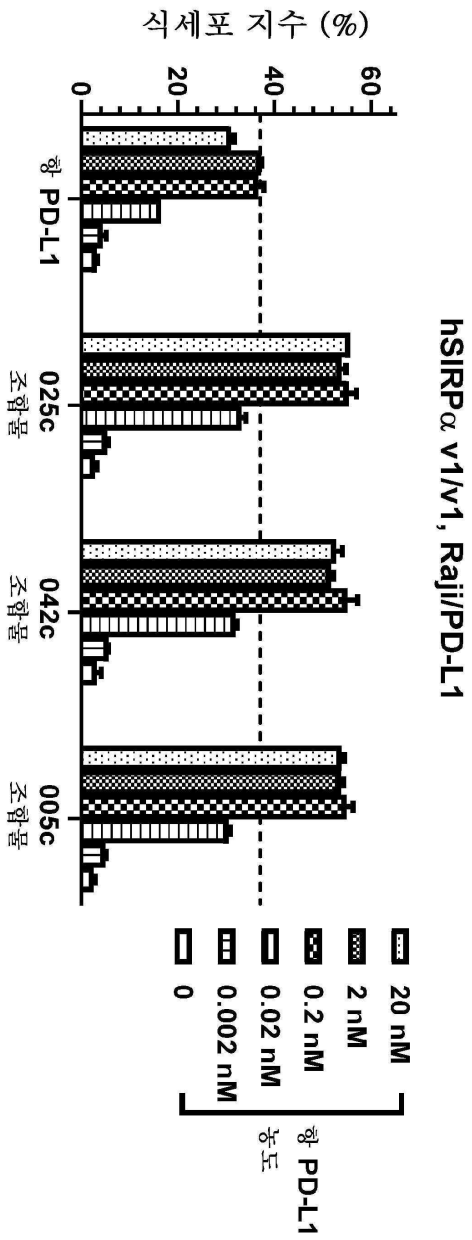
도면19

Ab	SHP-1 동원 차단	
	IC <sub>50</sub> (nM)	최고 차단 (%)
hu025.021	0.10	86.28
hu025.023	0.10	85.55
hu025.033	0.19	84.53
hu025.059	0.10	78.85
hu025.060	0.09	87.52
025c	0.08	86.98

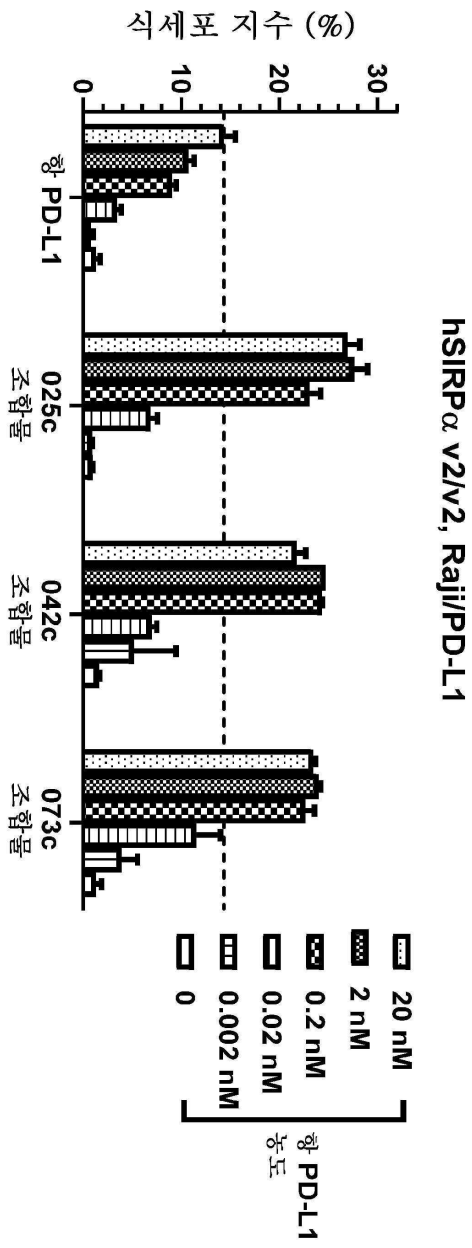
도면20a



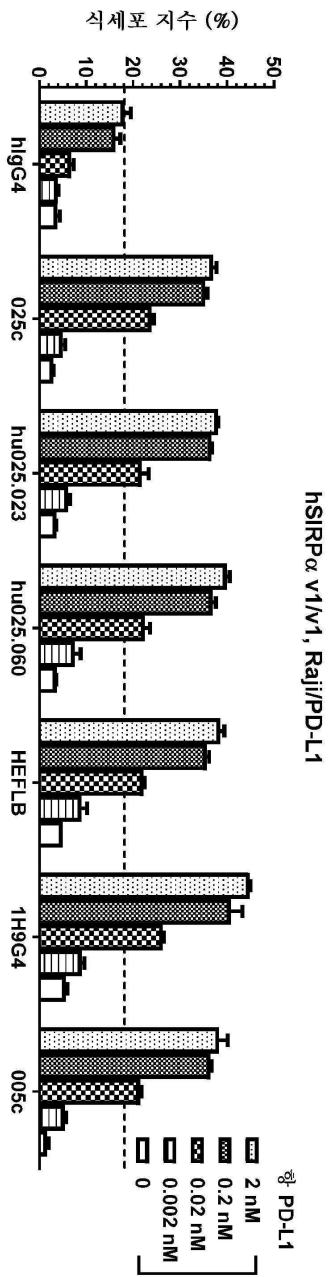
도면20b



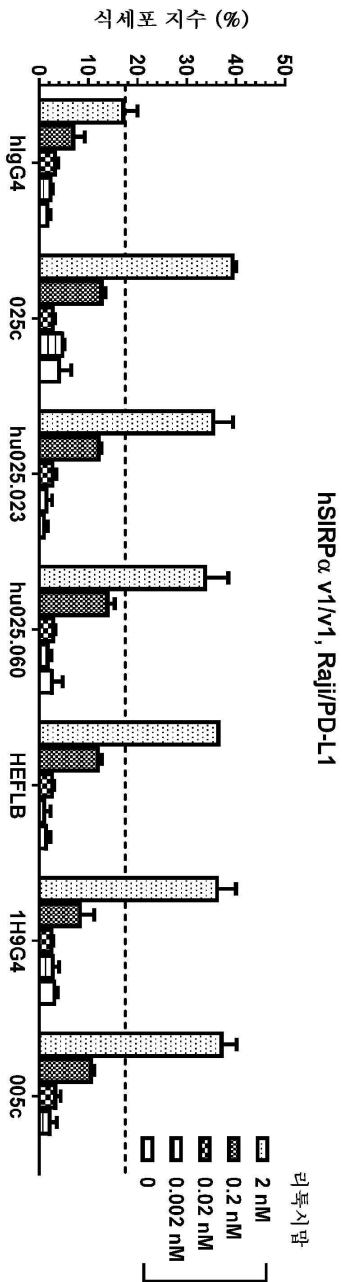
도면20c



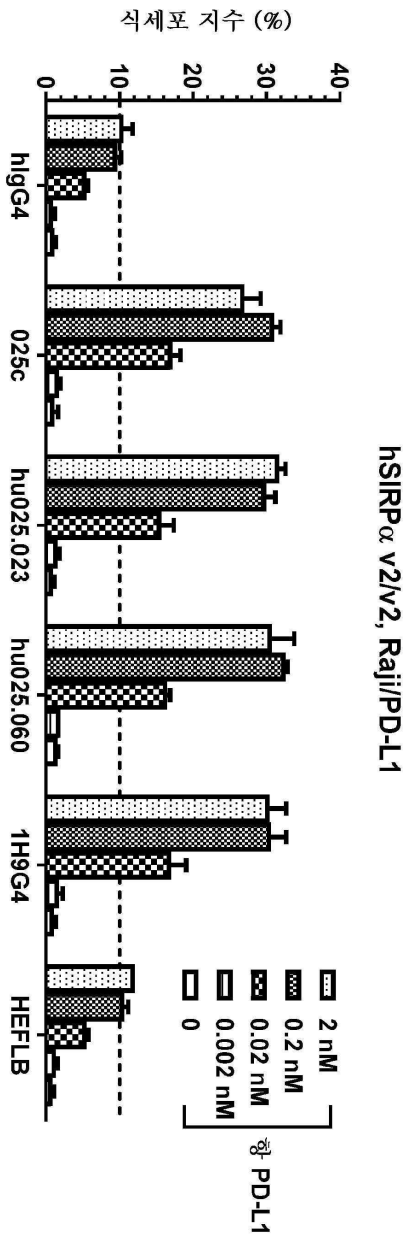
도면21a



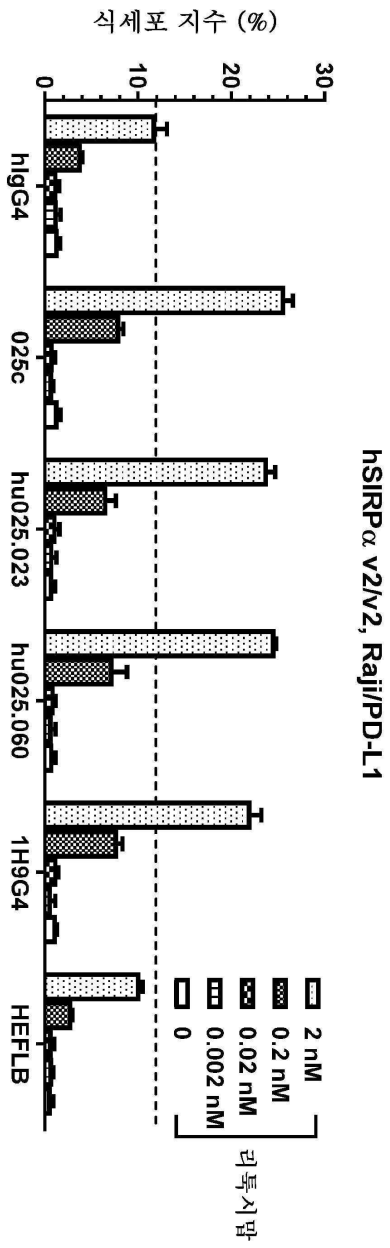
도면21b



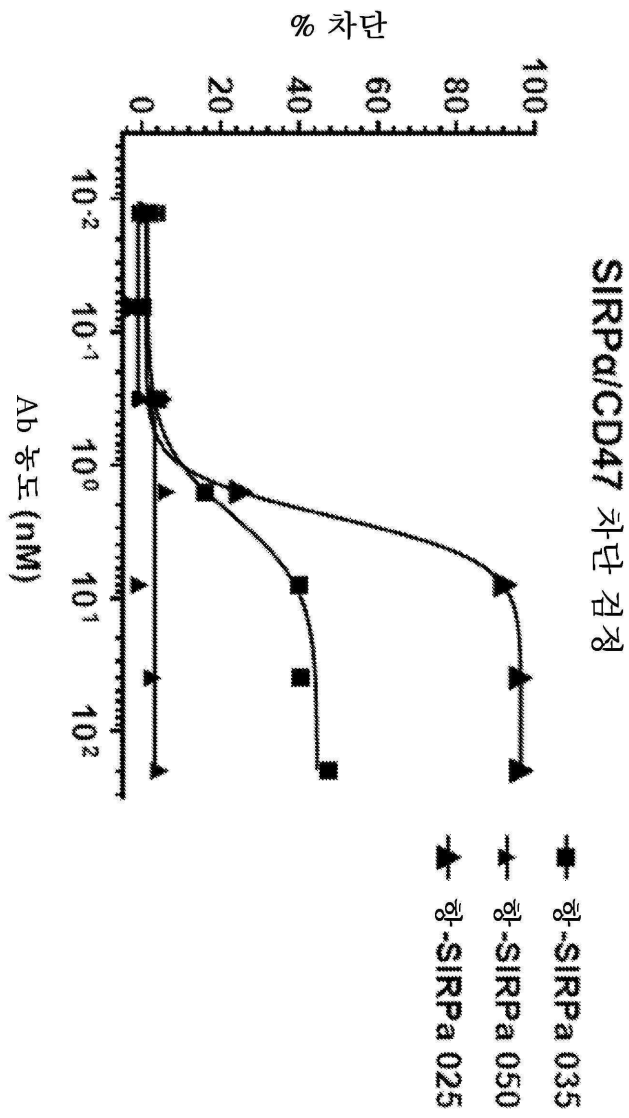
도면21c



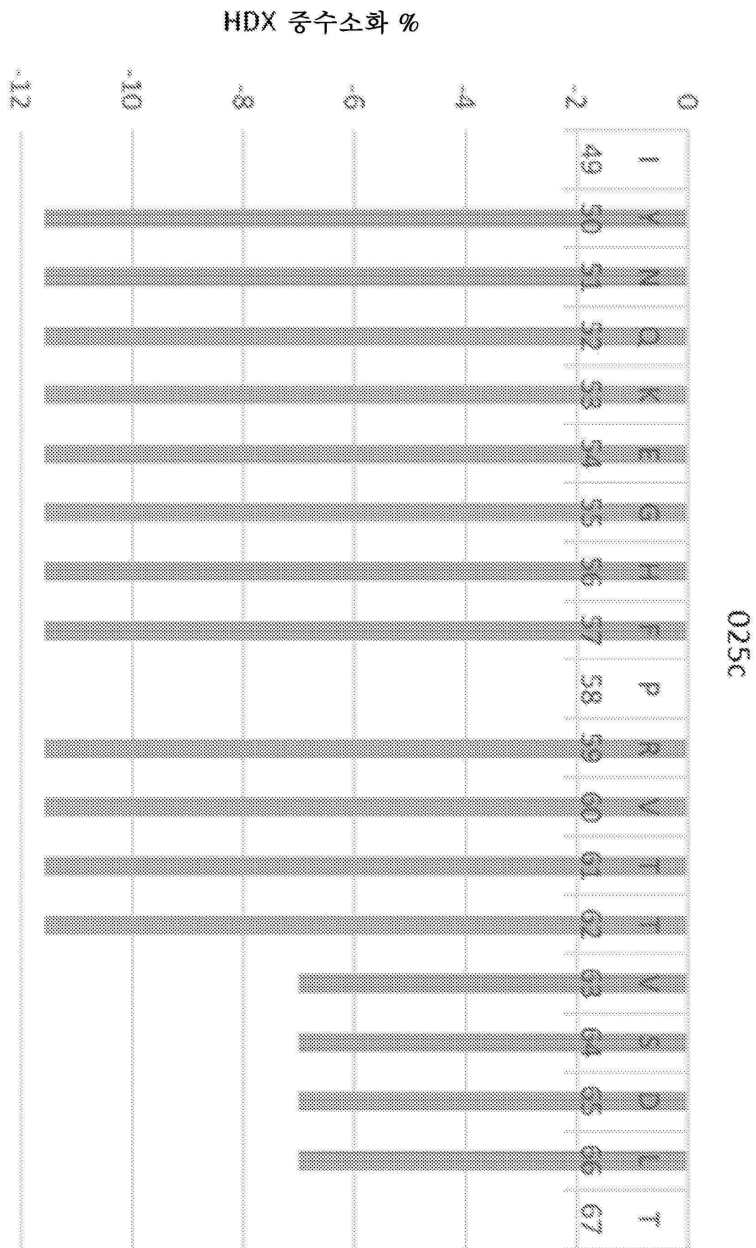
도면21d



도면22

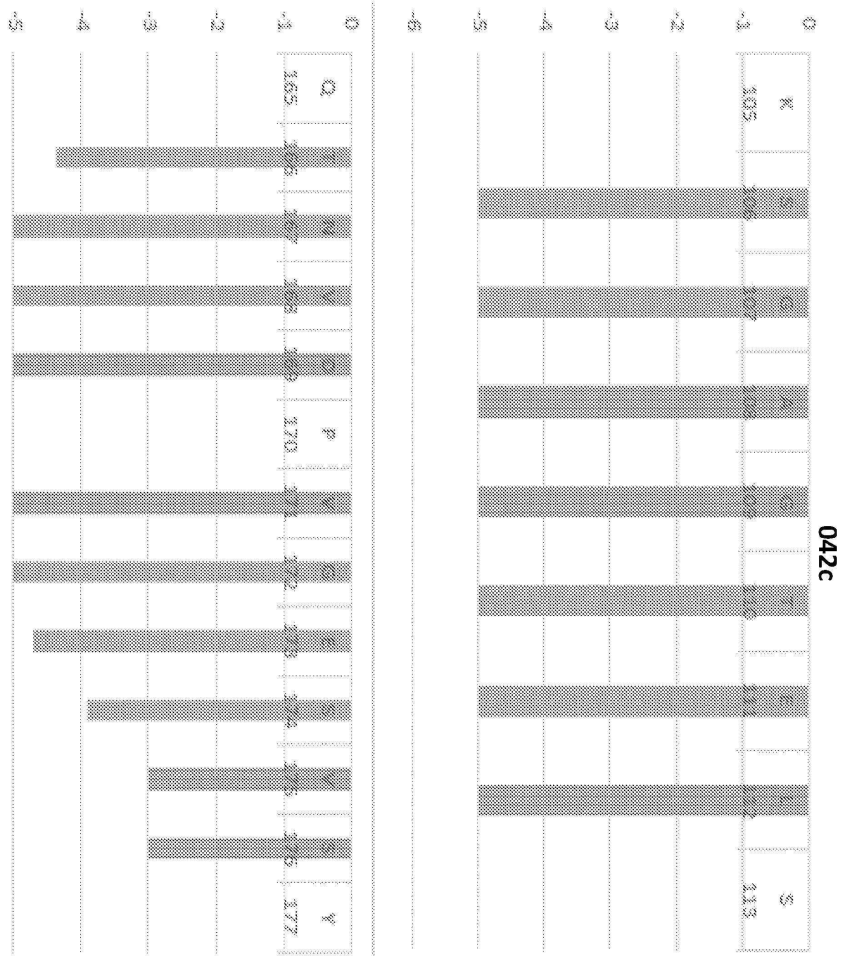


도면23a

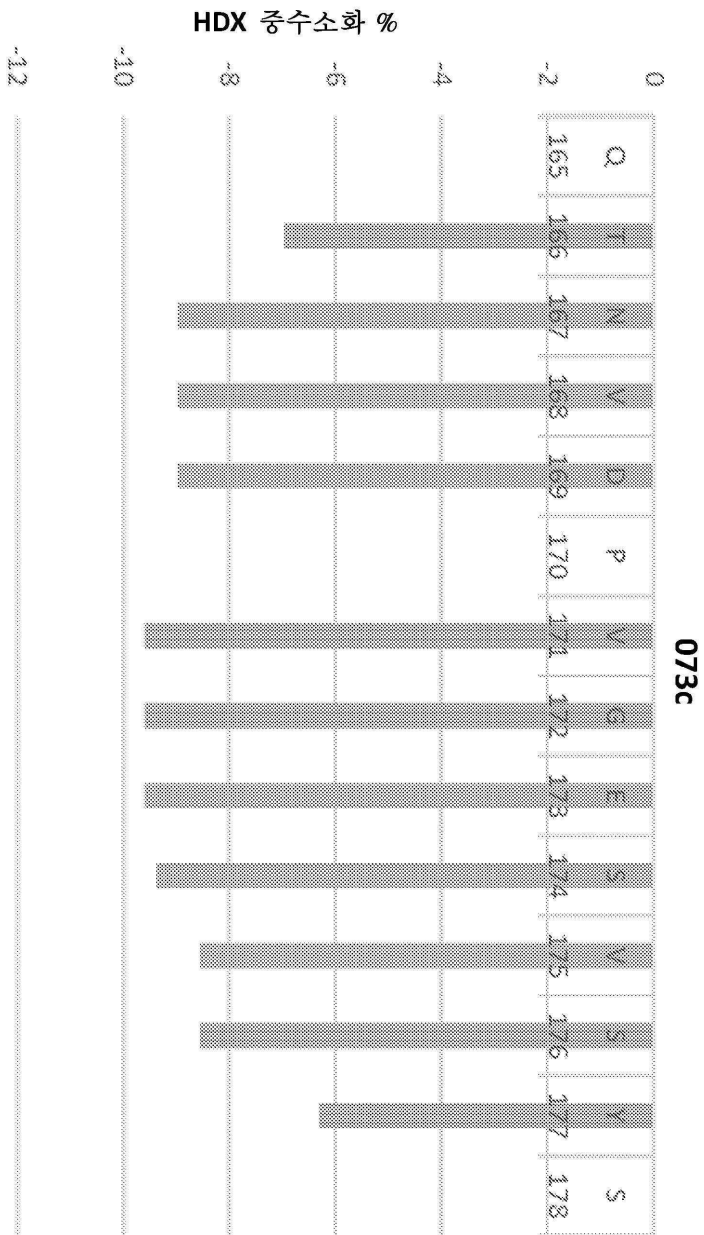


도면23b

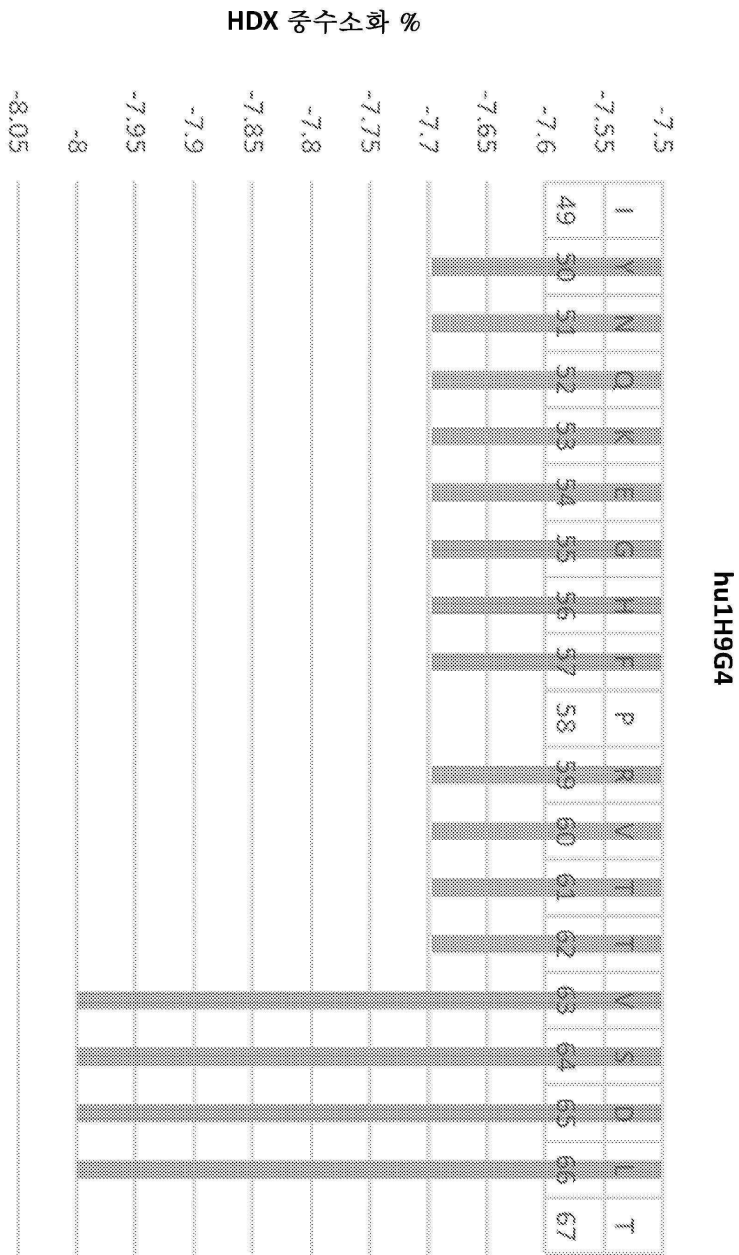
HDX 중수소화 %



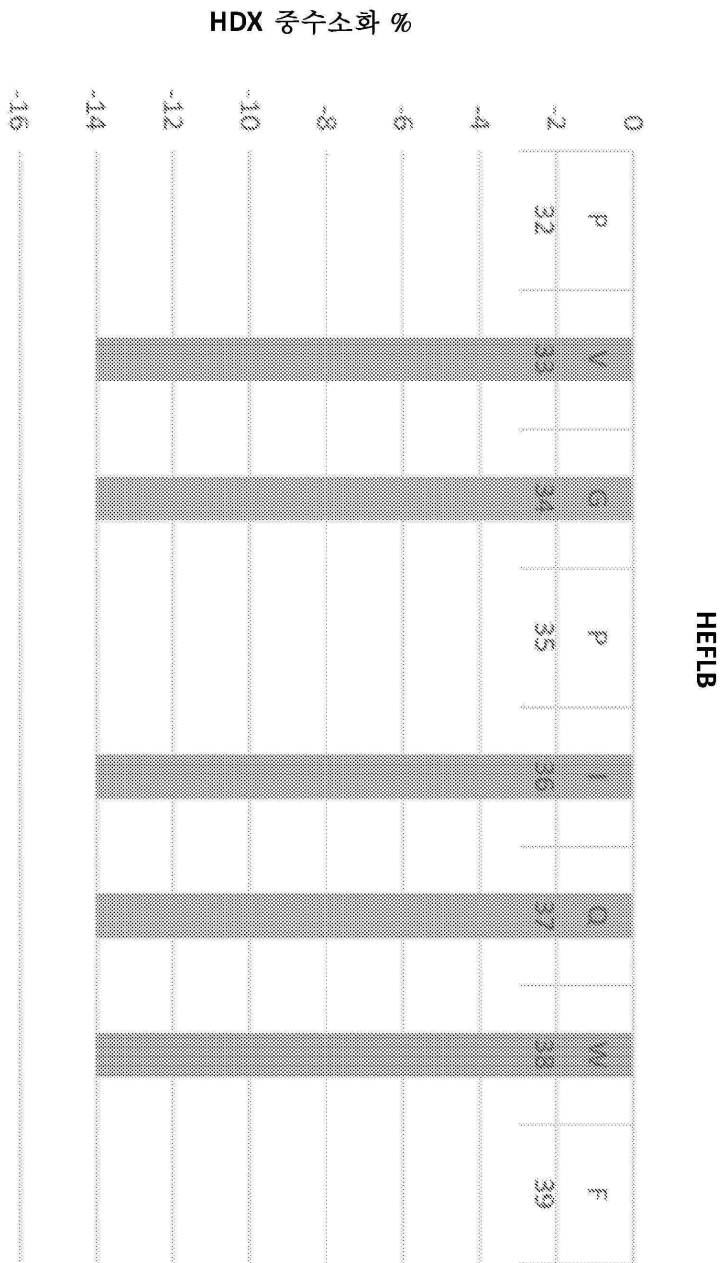
도면23c



도면23d



도면23e



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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