(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0039006
(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 10-2024-7006211
(22) 출원일자(국제) 2022년07월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년02월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/074286
(87) 국제공개번호 WO 2023/010100
국제공개일자 2023년02월02일
(30) 우선권주장
PCT/CN2021/109041 2021년07월28일 중국(CN)
PCT/CN2022/104562 2022년07월08일 중국(CN)

(71) 출원인
엘피사이언스 (쑤저우) 바이오파마, 엘티디.
중국 215127 지앙수 쑤저우 쑤저우 인더스트리얼 파크 상티안 스트리트 218 빌딩 17
엘피사이언스 바이오파마, 엘티디.
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
(72) 발명자
루, 홍타오
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
니우, 시아오팽
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

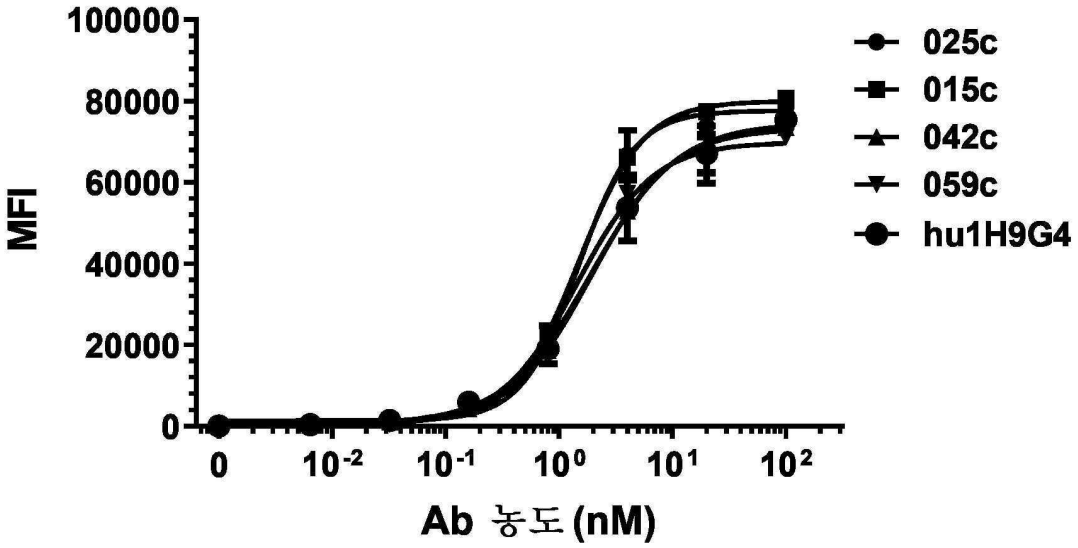
전체 청구항 수 : 총 63 항

(54) 발명의 명칭 **신규 항-SIRPA 항체**

(57) 요 약

본 개시내용은 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 그를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 그를 포함하는 제약 조성물, 및 그의 용도를 제공한다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/34 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
(72) 발명자
왕, 팽리
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
왕, 춘니안
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
자오, 진펭
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
싱, 루메이
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
왕, 하이잉
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
유, 징펭
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
리, 레이
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
우, 지하오
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
가오, 루이
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3
취우, 양성
중국 201203 상하이 푸동 하레이 로드 998 빌딩 3

명 세 서

청구범위

청구항 1

HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 SIRPα에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 그의 항원-결합 단편으로서, 여기서

a) HCDR1은 DYYMS (서열식별번호: 1)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

HCDR2는 FIKNEANGYTTESSASVKG (서열식별번호: 2)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

HCDR3은 YDYYGSNYNWYFDA (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR1은 KASQNVRTAVA (서열식별번호: 4)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR2는 LASKRHT (서열식별번호: 5)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR3은 LQHWIHPLT (서열식별번호: 6)의 아미노산 서열을 포함하고,

b) HCDR1은 X_1YYMH (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

HCDR2는 RIDPEDX_2EX_3KYAPKFQG (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

HCDR3은 G$X_{18}X_4X_5$Y (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR1은 SASSSVSSSYLY (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR2는 STSNLAS (서열식별번호: 11)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR3은 X_6QWSSYPYT (서열식별번호: 21)의 아미노산 서열을 포함하고,

c) HCDR1은 TYGMS (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

HCDR2는 WINTYSGVX_{19}TX_7ADDFX_8G (서열식별번호: 38)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

HCDR3은 DPHX_9YGX_{10}SPAWFX_{11}Y (서열식별번호: 39)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR1은 X_{12}ASQX_{13}VGIX_{14}VA (서열식별번호: 40)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR2는 SASNRX_{15}T (서열식별번호: 41)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR3은 QQYSX_{16}YPX_{17}T (서열식별번호: 42)의 아미노산 서열을 포함하고,

d) HCDR1은 EYVLS (서열식별번호: 43)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

HCDR2는 EIYPGTITTYYNEKFKG (서열식별번호: 44)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

HCDR3은 FYDYDGGWFAY (서열식별번호: 45)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR1은 SASSSVSSSDLH (서열식별번호: 46)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR2는 GTSNLAS (서열식별번호: 47)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

LCDR3은 QQWSGYPWT (서열식별번호: 48)의 아미노산 서열을 포함하고,

여기서 X_1은 A 또는 D이고; X_2는 G 또는 A이고; X_3은 T 또는 S이고; X_4는 L 또는 Y이고; X_5는 E 또는 A이고; X_6은 Y 또는 H이고; X_7은 Y 또는 C이고; X_8은 K 또는 Q이고; X_9는 Y 또는 S이고; X_{10}은 N 또는 T 또는 S이고; X_{11}은 P 또는 A 또는 V이고; X_{12}는 E 또는 K이고; X_{13}은 N 또는 I이고; X_{14}는 S 또는 A이고; X_{15}는 Y 또는 F이고; X_{16}은 S 또는 T 또는 A이고; X_{17}은 F 또는 L이고; X_{18}은 S이거나 부재하고; X_{19}는 S 또는 P인 항체 또는 그의 항원-결합

단편.

청구항 2

제1항에 있어서,

a) HCDR1이 X_1YYMH (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

b) HCDR2가 RIDPEDX$_2$EX$_3$KYAPKFQG (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

c) HCDR3이 GX$_{18}$X$_4$X$_5$Y (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

d) LCDR1이 SASSSVSSSYLY (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

e) LCDR2가 STSNLAS (서열식별번호: 11)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

f) LCDR3이 X$_6$QWSSYPYT (서열식별번호: 21)의 아미노산 서열을 포함하고,

여기서 X_1은 A 또는 D이고; X_2는 G 또는 A이고; X_3은 T 또는 S이고; X_4는 L 또는 Y이고; X_5는 E 또는 A이고; X_6은 Y 또는 H이고; X_{18}은 S이거나 부재하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서,

a) HCDR1이 AYYMH (서열식별번호: 7) 또는 DYYMH (서열식별번호: 13)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

b) HCDR2가 RIDPEDGESKYAPKFQG (서열식별번호: 8), RIDPEDGETKYAPKFQG (서열식별번호: 14) 및 RIDPEDAETKYAPKFQG (서열식별번호: 17)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고/거나,

c) HCDR3이 GSYEY (서열식별번호: 9) 또는 GLAY (서열식별번호: 15)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

d) LCDR1이 SASSSVSSSYLY (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

e) LCDR2가 STSNLAS (서열식별번호: 11)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

f) LCDR3이 YQWSSYPYT (서열식별번호: 12) 또는 HQWSSYPYT (서열식별번호: 16)의 아미노산 서열을 포함하는 것인

항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서,

a) HCDR1이 TYGMS (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

b) HCDR2가 WINTYSGVX$_{19}$TX$_7$ADDFX$_8$G (서열식별번호: 38)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

c) HCDR3이 DPHX$_9$YGX$_{10}$SPAWFX$_{11}$Y (서열식별번호: 39)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

d) LCDR1이 X$_{12}$ASQX$_{13}$VGIX$_{14}$VA (서열식별번호: 40)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

e) LCDR2가 SASNRX$_{15}$T (서열식별번호: 41)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

f) LCDR3이 QQYSX$_{16}$YPX$_{17}$T (서열식별번호: 42)의 아미노산 서열을 포함하고,

여기서 X_7은 Y 또는 C이고; X_8은 K 또는 Q이고; X_9는 Y 또는 S이고; X_{10}은 N 또는 T 또는 S이고; X_{11}은 P 또는 A 또는 V이고; X_{12}는 E 또는 K이고; X_{13}은 N 또는 I이고; X_{14}는 S 또는 A이고; X_{15}는 Y 또는 F이고; X_{16}은 S 또는 T 또는 A이고; X_{17}은 F 또는 L이고; X_{19}는 S 또는 P인

항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 5

제4항에 있어서,

a) HCDR1이 TYGMS (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

b) HCDR2가 WINTYSGVSTCADDFKG (서열식별번호: 23), WINTYSGVPTYADDFQG (서열식별번호: 28) 및 WINTYSGVPTYADDFKG (서열식별번호: 33)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고/거나,

c) HCDR3이 DPHSYGNSPAWFPY (서열식별번호: 24), DPHYYGTSPAWFAY (서열식별번호: 29) 및 DPHYYGSSPAWFVY (서열식별번호: 34)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고/거나,

d) LCDR1이 KASQNVGISVA (서열식별번호: 25), KASQIVGIAVA (서열식별번호: 30) 및 EASQIVGIAVA (서열식별번호: 35)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고/거나,

e) LCDR2가 SASNRYT (서열식별번호: 26) 및 SASNRFT (서열식별번호: 31)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고/거나,

f) LCDR3이 QQYSSYPLT (서열식별번호: 27), QQYSTYPFT (서열식별번호: 32) 및 QQYSAYPFT (서열식별번호: 37)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인

항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역이

a) 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

b) 서열식별번호: 7의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 8의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 9의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

c) 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 14 또는 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 15의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

d) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 23의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 24의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

e) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 29의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

f) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 33의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

g) 서열식별번호: 43의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 44의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 45의 서열을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄 가변 영역이

a) 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

b) 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

c) 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

d) 서열식별번호: 25의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호:

27의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

e) 서열식별번호: 30의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 31의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 32의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

f) 서열식별번호: 35의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 37의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

g) 서열식별번호: 46의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 47의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 48의 서열을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

b) 서열식별번호: 7의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 8의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 9의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

c) 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 14 또는 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 15의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

d) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 23의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 24의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 25의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 27의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

e) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 29의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 30의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 31의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 32의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

f) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 33의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 35의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 37의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

g) 서열식별번호: 43의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 44의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 45의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 46의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 47의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 48의 서열을 포함하는 LCDR3인

항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하며, 여기서

a) HFR1은 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX_{20}SGFNIK (서열식별번호: 84) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

b) HFR2는 WVQQAPGKGLEWIG (서열식별번호: 74) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

c) HFR3 서열은 RVTITADTSTX_{21}TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 85) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

d) HFR4는 WGQGTLVTVSS (서열식별번호: 76) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

e) LFR1은 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 77) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

f) LFR2는 WYQQKPGQAPKLWIY (서열식별번호: 78) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

g) LFR3은 GIPARFSGSGSGTDX$_{22}$TLTISSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 86) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

h) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 80) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

여기서 X$_{20}$은 A 또는 V이고; X$_{21}$은 N 또는 D이고; X$_{22}$는 Y 또는 F인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 10

제9항에 있어서,

a) HFR1이 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIK (서열식별번호: 83) 또는 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIK (서열식별번호: 73), 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

b) HFR2가 WVQQAPGKGLEWIG (서열식별번호: 74) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

c) HFR3 서열이 RVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 75) 또는 RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 82) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

d) HFR4가 WGQGTLVTVSS (서열식별번호: 76) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

e) LFR1이 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 77) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

f) LFR2가 WYQQKPGQAPKLWIY (서열식별번호: 78) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

g) LFR3이 GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 79) 또는 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 81) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

h) LFR4가 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 80) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 것인

항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 63, 서열식별번호: 65 및 서열식별번호: 67, 및 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 인간 SIRPα에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하는 그의 상동 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 64 및 서열식별번호: 66, 및 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 인간 SIRPα에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하는 그의 상동 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 49의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 50의 서열을 포함하거나; 또는

b) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 51의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 52의 서열을 포함하거나; 또는

c) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 53의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 54의 서열을 포함하거나; 또는

d) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 55의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 56의 서열을 포함하거나; 또는

e) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 57의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 58의 서열을 포함하거나; 또는

f) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 59의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 60의 서열을 포함하거나; 또는

g) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 61의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 62의 서열을 포함하거나; 또는

h) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 63의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 64의 서열을 포함하거나; 또는

i) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 63의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 66의 서열을 포함하거나; 또는

j) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 65의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 64의 서열을 포함하거나; 또는

k) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 67의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 64의 서열을 포함하거나; 또는

l) 중쇄 가변 영역이 서열식별번호: 67의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역이 서열식별번호: 66의 서열을 포함하는 것인

항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만 인간 SIRPα에 대한 특이적 결합 친화도는 보유하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 15

제14항에 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 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 영역, 임의로 인간 이뮤노글로불린 (Ig)의 Fc 영역, 또는 임의로 인간 IgG의 Fc 영역을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 17

제16항에 있어서, Fc 영역이 인간 IgG4로부터 유래된 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 18

제17항에 있어서, 인간 IgG4로부터 유래된 Fc 영역이 S228P 돌연변이 및/또는 L235E 돌연변이를 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화된 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 다중-특이적 항체, 재조합 항체, 키메라 항체, 표지된 항체, 2가 항체, 항-이디오타입 항체 또는 융합 단백질인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 디아바디, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv 단편, 디술피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), $(dsFv)_2$, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디술피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), 단일-쇄 항체 분자 (scFv), scFv 이량체 (2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 또는 2가 도메인 항체인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 특성을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편:

a) SIRP-알파 v1과 CD47 사이의 상호작용을 완전히 차단할 수 있음,

b) 경쟁적 ELISA에 의해 측정 시 10nM 이하 (또는 5nM 이하)의 IC50 또는 경쟁적 FACS에 의해 측정 시 0.6nM 이하 (또는 0.5nM 이하)의 IC50으로 SIRP-알파 v1과 CD47 사이의 상호작용을 차단할 수 있음;

c) SIRP-알파 v2와 CD47 사이의 상호작용을 완전히 차단할 수 있음,

d) 경쟁적 ELISA에 의해 측정 시 10nM 이하 (또는 5nM 이하)의 IC50 또는 경쟁적 FACS에 의해 측정 시 0.8nM 이하 (또는 0.7nM 이하)의 IC50으로 SIRP-알파 v2와 CD47 사이의 상호작용을 차단할 수 있음;

e) T 세포에 의한 IFNγ 분비, $CD4^+$ T 세포 증식 또는 $CD8^+$ T 세포 증식에 대해 유의한 억제를 갖지 않음;

f) SIRP 알파로의 CD47 매개된 SHP1 동원을 차단할 수 있음;

g) 표적 항체의 항체-의존성 세포성 식세포작용 (ADCP) 효과를 증가시킬 수 있음;

h) YNQKEGHFPRVTTVSDL (서열식별번호: 36), SGAGTEL (서열식별번호: 72), TNVDPVGESVS (서열식별번호: 87) 및 TNVDPVGESVSY (서열식별번호: 90)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에 결합할 수 있음.

청구항 23

서열식별번호: 53의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 54의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 24

서열식별번호: 55의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 56의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 25

서열식별번호: 61의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 62의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 27

제26항에 있어서, SIRPα 이외의 제2 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 28

제27항에 있어서, 제2 항원이 종양 항원, 종양 표면 항원, 염증 항원, 감염성 미생물의 항원인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 29

제27항에 있어서, SIRPα 상의 제2 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 접합 모이어티에 연결된 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 31

제30항에 있어서, 접합 모이어티가 클리어런스-변형제, 화학요법제, 독소, 방사성 동위원소, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지, DNA-알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜불린-결합제, 정제 모이어티 또는 다른 항암 약물을 포함하는 것인 항체 또는 그의 항원-결합 단편.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 33

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 34

제33항의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 35

제34항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 36

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 발현시키는 방법으로서, 제34항의 벡터가 발현되는 조건 하에 제35항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 37

시험관내에서 식세포작용을 유도하는 방법으로서, 임의로 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체와 조합된, 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제32항의 제약 조성물의 존재 하에, 표적 세포를 SIRPα 양성 식세포작용 세포 샘플과 접촉시켜 SIRPα 양성 식세포작용 세포에 의한 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 것을 포함하는 방법.

청구항 38

대상체에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제32항의 제약 조성물을, 임의로 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체와 조합하여, 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 데 효과적인 용량으로 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 39

대상체에서 표적 세포에 대한 표적 항체의 항체-의존성 세포성 식세포작용 (ADCP) 효과를 증가시키는 방법으로서,

대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제32항의 제약 조성물을 표적 항체와 조합하여 투여하여 표적 세포 상의 표적 항체의 ADCP를 증가시키는 것을 포함하며,

여기서 표적 항체는 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원에 결합하는 것인 방법.

청구항 40

대상체에서 표적 세포의 유도된 식세포작용으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화하는 방법으로서, 상기 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제32항의 제약 조성물을, 임의로 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 41

대상체에서 SIRPα 관련 질환 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화하는 방법으로서, 상기 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제32항의 제약 조성물을, 임의로 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 42

제37항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포가 CD47 발현 세포인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 표적 세포가 암 세포, 염증 세포, 및/또는 만성 감염 세포인 방법.

청구항 44

제39항에 있어서, 표적 항원이 종양 항원, 종양 표면 항원, 염증 항원, 감염성 미생물의 항원인 방법.

청구항 45

제39항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 14 또는 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 15의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제40항 또는 제41항에 있어서, 질환, 장애 또는 상태가 암, 고형 종양, 만성 감염, 염증성 질환, 다발성 경화증, 자가면역 질환, 신경계 질환, 뇌 손상, 신경 손상, 다혈구혈증, 혈색소증, 외상, 패혈성 쇼크, 섬유증, 아테롬성동맥경화증, 비만, 제II형 당뇨병, 이식 기능장애, 또는 관절염인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 암이 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, 두경부 편평 세포 암종, 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 (NHL), 다발성 골수종, T 또는 B 세포 림프종, GI 기관 간질종, 연부 조직 종양, 간세포성 암종, 및 선암종인 방법.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 암이 CD47-양성 암인 방법.

청구항 49

제37항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 50

제37항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 경구, 비강, 정맥내, 피하, 설하 또는 근육내 투여를 통하는 것인 방법.

청구항 51

제37항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 유효량의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 추가의 치료제가 화학요법제, 항암 약물, 방사선 요법제, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적화 요법제, 세포 요법제, 유전자 요법제, 호르몬 요법제, 항바이러스제, 항생제, 진통제, 항산화제, 금속 킬레이트화제, 시토카인, 항감염제, 및 항염증제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 53

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제32항의 제약 조성물, 및 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원에 결합하는 표적 항체를 포함하는 키트.

청구항 54

제53항에 있어서, 표적 항원이 종양 항원, 종양 표면 항원, 또는 감염원 표면 항원인 키트.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 추가의 치료제를 추가로 포함하는 키트.

청구항 56

SIRPα-양성 세포에서 SIRPα 활성을 조정하는 방법으로서, SIRPα-양성 세포를 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제32항의 제약 조성물에 노출시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 세포가 식세포작용 세포인 방법.

청구항 58

샘플에서 SIRPα의 존재 또는 양을 검출하는 방법으로서, 샘플을 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키고, 샘플에서 SIRPα의 존재 또는 양을 결정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 59

하기를 위한 의약의 제조에서의 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제32항의 제약 조성물의 용도.

i) 대상체에서 SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화하는 것;

ii) 대상체에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 것;

ii) 대상체에서 표적 세포에 대한 표적 항체의 항체-의존성 세포성 식세포작용 (ADCP) 효과를 증가시키는 것.

청구항 60

대상체에서 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 데 있어서 표적 항체를 강화시키는 방법으로서, 상기 대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 제32항의 제약 조성물을 표적 항체와 조합하여 투여하여 대상체에서 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 데 있어서 표적 항체를 강화시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 질환, 장애 또는 상태가 면역 관련 질환 또는 장애, 종양 및 암, 자가면역 질환 또는 감염성 질환인 방법.

청구항 62

제61항에 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, 패혈증, 당뇨병, 급성 관상동맥 증후군, 허혈성 재관류, 건선, 진행성 전신 경화증, 아테롬성동맥경화증, 쇼그렌 증후군, 경피증, 또는 염증성 자가면역 근염으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 63

제61항에 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, 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, 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.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 신규 항-SIRPα 항체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 신호-조절 단백질 알파 (SIRPα)는 주로 골수 세포 및 수지상 세포 상에서 발현되는 억제 수용체이다. SIRPα에 더하여, SIRP 패밀리는 또한 SIRPβ 및 SIRPɣ를 포함한 여러 다른 막횡단 당단백질을 포함한다. SIRP 패밀리의 각각의 구성원은 별개의 막횡단 및 세포질 도메인과 함께 3개의 유사한 세포외 Ig-유사 도메인을 함유한다. CD47은 세포외 N-말단 IgV 도메인, 5개의 막횡단 도메인, 및 짧은 C-말단 세포내 꼬리를 갖는 광범위하게 발현되는 막횡단 당단백질이다. CD47은 SIRPα에 대한 세포 리간드로서 기능한다. CD47이 SIRPα에 결합하면 "나를 먹지 말라"는 신호를 전달하여 식세포작용을 억제하고, 식세포 상에서 CD47 매개된 SIRPα의 결속을 차단하는 것은 "나를 먹어라"라는 신호를 보유하는 살아있는 세포의 제거를 발생시킬 수 있다. 종양 세포는 빈번하게 CD47을 과다발현하여 대식세포-매개된 파괴를 피한다. CD47과 SIRPα의 상호작용이 대식세포-매개된 식세포작용의 조절에 수반되는 것으로 밝혀졌다 (Takenaka et al., Nature Immunol., 8(12): 1313-1323, 2007). 다양한 범위의 전임상 모델에서, CD47 및 SIRPα의 상호작용을 차단하는 요법은 시험관내 암 세포의 식세포작용 및 생체내 항종양 면역 반응을 자극한다. 현재, CD47을 표적화하는 다중 작용제 (항-CD47 항체 및 SIRPα 융합 단백질)가 임상 시험으로 진행되었다. 그러나, 이들 작용제는 용혈성 빈혈 및 혈소판감소증과 연관되었다. 안전성 문제에 더하여, CD47의 보편적 발현은 또한 항원 싱크를 유발할 수 있으며, 이는 감소된 효능으로 이어진다.

[0003] 신규 항-SIRPα 항체에 대한 필요가 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0004] 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 초과의 항체를 의미한다.

[0005] 한 측면에서, 본 개시내용은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및/또는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 인간 SIRPα에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공하며, 여기서

[0006] a) HCDR1은 DYYMS (서열식별번호(SEQ ID NO): 1)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0007] HCDR2는 FIKNEANGYTTESSASVKG (서열식별번호: 2)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0008] HCDR3은 YDYYGSNYNWYFDA (서열식별번호: 3)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0009] LCDR1은 KASQNVRTAVA (서열식별번호: 4)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0010] LCDR2는 LASKRHT (서열식별번호: 5)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0011] LCDR3은 LQHWIHPLT (서열식별번호: 6)의 아미노산 서열을 포함하고,

[0012] b) HCDR1은 X_1YYMH (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0013] HCDR2는 RIDPEDX_2EX_3KYAPKFQG (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0014] HCDR3은 G$X_{18}X_4X_5$Y (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0015] LCDR1은 SASSSVSSSYLY (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0016] LCDR2는 STSNLAS (서열식별번호: 11)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0017] LCDR3은 X_6QWSSYPYT (서열식별번호: 21)의 아미노산 서열을 포함하고,

[0018] c) HCDR1은 TYGMS (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0019] HCDR2는 WINTYSGVX_{19}TX_7ADDFX_8G (서열식별번호: 38)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0020] HCDR3은 DPHX_9YGX_{10}SPAWFX_{11}Y (서열식별번호: 39)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0021] LCDR1은 X_{12}ASQX_{13}VGIX_{14}VA (서열식별번호: 40)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0022] LCDR2는 SASNRX_{15}T (서열식별번호: 41)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0023] LCDR3은 QQYSX_{16}YPX_{17}T (서열식별번호: 42)의 아미노산 서열을 포함하고,

[0024] d) HCDR1은 EYVLS (서열식별번호: 43)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0025] HCDR2는 EIYPGTITTYYNEKFKG (서열식별번호: 44)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0026] HCDR3은 FYDYDGGWFAY (서열식별번호: 45)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0027] LCDR1은 SASSSVSSSDLH (서열식별번호: 46)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0028] LCDR2는 GTSNLAS (서열식별번호: 47)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0029] LCDR3은 QQWSGYPWT (서열식별번호: 48)의 아미노산 서열을 포함하고,

[0030] 여기서 X_1은 A 또는 D이고; X_2는 G 또는 A이고; X_3은 T 또는 S이고; X_4는 L 또는 Y이고; X_5는 E 또는 A이고; X_6은 Y 또는 H이고; X_7은 Y 또는 C이고; X_8은 K 또는 Q이고; X_9는 Y 또는 S이고; X_{10}은 N 또는 T 또는 S이고; X_{11}은 P 또는 A 또는 V이고; X_{12}는 E 또는 K이고; X_{13}은 N 또는 I이고; X_{14}는 S 또는 A이고; X_{15}는 Y 또는 F이고; X_{16}은 S 또는 T 또는 A이고; X_{17}은 F 또는 L이고; X_{18}은 S이거나 부재하고; X_{19}는 S 또는 P이다.

[0031] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

[0032] a) HCDR1이 X_1YYMH (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0033] b) HCDR2가 RIDPEDX$_2$EX$_3$KYAPKFQG (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0034] c) HCDR3이 GX$_{18}$X$_4$X$_5$Y (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0035] d) LCDR1이 SASSSVSSSYLY (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0036] e) LCDR2가 STSNLAS (서열식별번호: 11)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0037] f) LCDR3이 X$_6$QWSSYPYT (서열식별번호: 21)의 아미노산 서열을 포함하고,

[0038] 여기서 X_1은 A 또는 D이고; X_2는 G 또는 A이고; X_3은 T 또는 S이고; X_4는 L 또는 Y이고; X_5는 E 또는 A이고; X_6은 Y 또는 H이고; X_{18}은 S이거나 부재한다.

[0039] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

[0040] a) HCDR1이 AYYMH (서열식별번호: 7) 또는 DYYMH (서열식별번호: 13)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0041] b) HCDR2가 RIDPEDGESKYAPKFQG (서열식별번호: 8), RIDPEDGETKYAPKFQG (서열식별번호: 14) 및 RIDPEDAETKYAPKFQG (서열식별번호: 17)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0042] c) HCDR3이 GSYEY (서열식별번호: 9) 또는 GLAY (서열식별번호: 15)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0043] d) LCDR1이 SASSSVSSSYLY (서열식별번호: 10)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0044] e) LCDR2가 STSNLAS (서열식별번호: 11)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0045] f) LCDR3이 YQWSSYPYT (서열식별번호: 12) 또는 HQWSSYPYT (서열식별번호: 16)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0046] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

[0047] a) HCDR1이 TYGMS (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0048] b) HCDR2가 WINTYSGVX$_{19}$TX$_7$ADDFX$_8$G (서열식별번호: 38)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0049] c) HCDR3이 DPHX$_9$YGX$_{10}$SPAWFX$_{11}$Y (서열식별번호: 39)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0050] d) LCDR1이 X$_{12}$ASQX$_{13}$VGIX$_{14}$VA (서열식별번호: 40)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0051] e) LCDR2가 SASNRX$_{15}$T (서열식별번호: 41)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0052] f) LCDR3이 QQYSX$_{16}$YPX$_{17}$T (서열식별번호: 42)의 아미노산 서열을 포함하고,

[0053] 여기서 X_7은 Y 또는 C이고; X_8은 K 또는 Q이고; X_9는 Y 또는 S이고; X_{10}은 N 또는 T 또는 S이고; X_{11}은 P 또는 A 또는 V이고; X_{12}는 E 또는 K이고; X_{13}은 N 또는 I이고; X_{14}는 S 또는 A이고; X_{15}는 Y 또는 F이고; X_{16}은 S 또는 T 또는 A이고; X_{17}은 F 또는 L이고; X_{19}는 S 또는 P이다.

[0054] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

[0055] a) HCDR1이 TYGMS (서열식별번호: 22)의 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0056] b) HCDR2가 WINTYSGVSTCADDFKG (서열식별번호: 23), WINTYSGVPTYADDFQG (서열식별번호: 28) 및 WINTYSGVPTYADDFKG (서열식별번호: 33)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0057] c) HCDR3이 DPHSYGNSPAWFPY (서열식별번호: 24), DPHYYGTSPAWFAY (서열식별번호: 29) 및 DPHYYGSSPAWFVY (서열식별번호: 34)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0058] d) LCDR1이 KASQNVGISVA (서열식별번호: 25), KASQIVGIAVA (서열식별번호: 30) 및 EASQIVGIAVA (서열식별번호: 35)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고/거나,

[0059] e) LCDR2가 SASNRYT (서열식별번호: 26) 및 SASNRFT (서열식별번호: 31)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노

산 서열을 포함하고/거나,

[0060] f) LCDR3이 QQYSSYPLT (서열식별번호: 27), QQYSTYPFT (서열식별번호: 32) 및 QQYSAYPFT (서열식별번호: 37)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0061] 특정 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 하기를 포함한다:

[0062] a) 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

[0063] b) 서열식별번호: 7의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 8의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 9의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

[0064] c) 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 14 또는 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 15의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

[0065] d) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 23의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 24의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

[0066] e) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 29의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

[0067] f) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 33의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 HCDR3; 또는

[0068] g) 서열식별번호: 43의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 44의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 45의 서열을 포함하는 HCDR3.

[0069] 특정 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 하기를 포함한다:

[0070] a) 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0071] b) 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0072] c) 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0073] d) 서열식별번호: 25의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 27의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0074] e) 서열식별번호: 30의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 31의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 32의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0075] f) 서열식별번호: 35의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 37의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0076] g) 서열식별번호: 46의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 47의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 48의 서열을 포함하는 LCDR3.

[0077] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기를 포함한다:

[0078] a) 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0079] b) 서열식별번호: 7의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 8의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 9의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0080] c) 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 14 또는 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 15의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번

호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0081] d) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 23의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 24의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 25의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 27의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0082] e) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 29의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 30의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 31의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 32의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0083] f) 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 33의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 35의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 37의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는

[0084] g) 서열식별번호: 43의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 44의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 45의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 46의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 47의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 48의 서열을 포함하는 LCDR3.

[0085] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 중쇄 HFR1, HFR2, HFR3 및 HFR4 중 1개 이상, 및/또는 경쇄 LFR1, LFR2, LFR3 및 LFR4 중 1개 이상을 추가로 포함하며, 여기서:

[0086] a) HFR1은 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX_{20}SGFNIK (서열식별번호: 84) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0087] b) HFR2는 WVQQAPGKGLEWIG (서열식별번호: 74) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0088] c) HFR3 서열은 RVTITADTSTX_{21}TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 85) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0089] d) HFR4는 WGQGTLVTVSS (서열식별번호: 76) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0090] e) LFR1은 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 77) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0091] f) LFR2는 WYQQKPGQAPKLWIY (서열식별번호: 78) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0092] g) LFR3은 GIPARFSGSGSGTDX$_{22}$TLTISSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 86) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0093] h) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 80) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고,

[0094] 여기서 X_{20}은 A 또는 V이고; X_{21}은 N 또는 D이고; X_{22}는 Y 또는 F이다.

[0095] 특정 실시양태에서,

[0096] a) HFR1은 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASGFNIK (서열식별번호: 83) 또는 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIK (서열식별번호: 73), 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0097] b) HFR2는 WVQQAPGKGLEWIG (서열식별번호: 74) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0098] c) HFR3 서열은 RVTITADTSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 75) 또는 RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 82) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0099] d) HFR4는 WGQGTLVTVSS (서열식별번호: 76) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0100] e) LFR1은 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 77) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0101] f) LFR2는 WYQQKPGQAPKLWIY (서열식별번호: 78) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0102] g) LFR3은 GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 79) 또는 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 81) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하고/거나,

[0103] h) LFR4는 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 80) 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함한다.

[0104] 특정 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 63, 서열식별번호: 65 및 서열식별번호: 67, 및 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 인간 SIRPα에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하는 그의 상동 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0105] 특정 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 64 및 서열식별번호: 66, 및 적어도 80% 서열 동일성을 갖지만 인간 SIRPα에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하는 그의 상동 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0106] 특정 실시양태에서,

[0107] a) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 49의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 50의 서열을 포함하거나; 또는

[0108] b) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 51의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 52의 서열을 포함하거나; 또는

[0109] c) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 53의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 54의 서열을 포함하거나; 또는

[0110] d) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 55의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 56의 서열을 포함하거나; 또는

[0111] e) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 57의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 58의 서열을 포함하거나; 또는

[0112] f) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 59의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 60의 서열을 포함하거나; 또는

[0113] g) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 61의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 62의 서열을 포함하거나; 또는

[0114] h) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 63의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 64의 서열을 포함하거나; 또는

[0115] i) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 63의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 66의 서열을 포함하거나; 또는

[0116] j) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 65의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 64의 서열을 포함하거나; 또는

[0117] k) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 67의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 64의 서열을 포함하거나; 또는

[0118] l) 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 67의 서열을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 66의 서열을 포함한다.

[0119] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 1개 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만, 인간 SIRPα에 대한 특이적 결합 친화도는 보유한다.

[0120] 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.

[0121] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 Fc 영역, 임의로 인간 이뮤노글로불린(Ig)의 Fc 영역, 또는 임의로 인간 IgG의 Fc 영역을 추가로 포함한다.

[0122] 특정 실시양태에서, Fc 영역은 인간 IgG4로부터 유래된다.

[0123] 특정 실시양태에서, 인간 IgG4로부터 유래된 Fc 영역은 S228P 돌연변이 및/또는 L235E 돌연변이를 포함한다.

[0124] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 인간화된다.

[0125] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 다중-특이적 항체, 재조합 항체, 키메라 항체, 표지된 항체, 2가 항체, 항-이디오타입 항체 또는 융합 단백질이다.

[0126] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 디아바디, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv 단편, 디술피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), $(dsFv)_2$, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디술피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), 단일-쇄 항체 분자 (scFv), scFv 이량체 (2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 또는 2가 도메인 항체이다.

[0127] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 특성을 갖는다:

[0128] a) SIRP-알파 v1과 CD47 사이의 상호작용을 완전히 차단할 수 있음,

[0129] b) 경쟁적 ELISA에 의해 측정 시 10nM 이하 (또는 5nM 이하)의 IC50 또는 경쟁적 FACS에 의해 측정 시 0.6nM 이하 (또는 0.5nM 이하)의 IC50으로 SIRP-알파 v1과 CD47 사이의 상호작용을 차단할 수 있음;

[0130] c) SIRP-알파 v2와 CD47 사이의 상호작용을 완전히 차단할 수 있음,

[0131] d) 경쟁적 ELISA에 의해 측정 시 10nM 이하 (또는 5nM 이하)의 IC50 또는 경쟁적 FACS에 의해 측정 시 0.8nM 이하 (또는 0.7nM 이하)의 IC50으로 SIRP-알파 v2와 CD47 사이의 상호작용을 차단할 수 있음;

[0132] e) T 세포에 의한 IFNγ 분비, $CD4^+$ T 세포 증식 또는 $CD8^+$ T 세포 증식에 대해 유의한 억제를 갖지 않음;

[0133] f) SIRP 알파로의 CD47 매개된 SHP1 동원을 차단할 수 있음;

[0134] g) 표적 항체의 항체-의존성 세포성 식세포작용 (ADCP) 효과를 증가시킬 수 있음;

[0135] h) YNQKEGHFPRVTTVSDL (서열식별번호: 36), SGAGTEL (서열식별번호: 72), TNVDPVGESVS (서열식별번호: 87) 및 TNVDPVGESVSY (서열식별번호: 90)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에 결합할 수 있음.

[0136] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 서열식별번호: 53의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 54의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0137] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 서열식별번호: 55의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 56의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0138] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 서열식별번호: 61의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 62의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0139] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다.

[0140] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SIRPα 이외의 제2 항원에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0141] 특정 실시양태에서, 제2 항원은 종양 항원, 종양 표면 항원, 염증 항원, 감염성 미생물의 항원이다.

[0142] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SIRPα 상의 제2 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0143] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 1개 이상의 접합 모이어티에 연결된다.

[0144] 특정 실시양태에서, 접합 모이어티는 클리어런스-변형제, 화학요법제, 독소, 방사성 동위원소, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지, DNA-알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜불린-결합제, 정제 모이어티 또는 다른 항암 약물을 포함한다.

[0145] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0146] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0147] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 본원에 제공된 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0148] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 본원에 제공된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0149] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 발현시키는 방법을 제공하며, 이는 본원에 제공된 벡터가 발현되는 조건 하에 본원에 제공된 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0150] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 시험관내에서 식세포작용을 유도하는 방법을 제공하며, 이는 임의로 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체와 조합된, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본원에 제공된 제약 조성물의 존재 하에, 표적 세포를 SIRPα 양성 식세포작용 세포 샘플과 접촉시켜 SIRPα 양성 식세포작용 세포에 의한 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 것을 포함한다.

[0151] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본원에 제공된 제약 조성물을, 임의로 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체와 조합하여, 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 데 효과적인 용량으로 투여하는 것을 포함한다.

[0152] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 표적 세포에 대한 표적 항체의 항체-의존성 세포성 식세포작용 (ADCP) 효과를 증가시키는 방법을 제공하며, 이는

[0153] 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본원에 제공된 제약 조성물을 표적 항체와 조합하여 투여하여 표적 세포 상의 표적 항체의 ADCP를 증가시키는 것을 포함하고,

[0154] 여기서 표적 항체는 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원에 결합한다.

[0155] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 표적 세포의 유도된 식세포작용으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본원에 제공된 제약 조성물을, 임의로 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0156] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본원에 제공된 제약 조성물을, 임의로 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0157] 특정 실시양태에서, 표적 세포는 CD47 발현 세포이다.

[0158] 특정 실시양태에서, 표적 세포는 암 세포, 염증 세포, 및/또는 만성 감염 세포이다.

[0159] 특정 실시양태에서, 표적 항원은 종양 항원, 종양 표면 항원, 염증 항원, 감염성 미생물의 항원이다.

[0160] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 14 또는 서열식별번호: 17의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 15의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.

[0161] 특정 실시양태에서, 질환, 장애 또는 상태는 암, 고형 종양, 만성 감염, 염증성 질환, 다발성 경화증, 자가면역 질환, 신경계 질환, 뇌 손상, 신경 손상, 다혈구혈증, 혈색소증, 외상, 폐혈성 쇼크, 섬유증, 아테롬성동맥경화증, 비만, 제II형 당뇨병, 이식 기능장애, 또는 관절염이다.

[0162] 특정 실시양태에서, 암은 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, 두경부 편평 세포 암종, 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 (NHL), 다발성 골수종, T 또는 B 세포 림프종, GI 기관 간질종, 연부 조직 종양, 간세포성 암종, 및 선암종이다.

[0163] 특정 실시양태에서, 암은 CD47-양성 암이다.

[0164] 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0165] 특정 실시양태에서, 투여는 경구, 비강, 정맥내, 피하, 설하 또는 근육내 투여를 통한다.

[0166] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 치료 유효량의 추가의 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0167] 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 화학요법제, 항암 약물, 방사선 요법제, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적화 요법제, 세포 요법제, 유전자 요법제, 호르몬 요법제, 항바이러스제, 항생제, 진통제, 항산화제, 금속 킬레이트화제, 시토카인, 항감염제, 및 항염증제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0168] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본원에 제공된 제약 조성물, 및 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원에 결합하는 표적 항체를 포함하는 키트를 제공한다.

[0169] 특정 실시양태에서, 표적 항원은 종양 항원, 종양 표면 항원, 또는 감염원 표면 항원이다.

[0170] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 키트는 추가의 치료제를 추가로 포함한다.

[0171] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 SIRPα-양성 세포에서 SIRPα 활성을 조정하는 방법을 제공하며, 이는 SIRPα-양성 세포를 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본원에 제공된 제약 조성물에 노출시키는 것을 포함한다.

[0172] 특정 실시양태에서, 세포는 식세포작용 세포이다.

[0173] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 샘플에서 SIRPα의 존재 또는 양을 검출하는 방법을 제공하며, 이는 샘플을 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키고, 샘플에서 SIRPα의 존재 또는 양을 결정하는 것을 포함한다.

[0174] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 하기를 위한 의약의 제조에서의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본원에 제공된 제약 조성물의 용도를 제공한다:

[0175] i) 대상체에서 SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화하는 것;

[0176] ii) 대상체에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 것;

[0177] ii) 대상체에서 표적 세포에 대한 표적 항체의 항체-의존성 세포성 식세포작용 (ADCP) 효과를 증가시키는 것.

[0178] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 데 있어서 표적 항체를 강화시키는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 본원에 제공된 제약 조성물을 표적 항체와 조합하여 투여하여 대상체에서 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 데 있어서 표적 항체를 강화시키는 것을 포함한다.

[0179] 특정 실시양태에서, 질환, 장애 또는 상태는 면역 관련 질환 또는 장애, 종양 및 암, 자가면역 질환, 또는 감염성 질환이다.

[0180] 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.

[0181] 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, 자궁경

부암, 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, 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, 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 악성종양이다.

도면의 간단한 설명

[0182] 도 1은 CHOK1-인간 SIRPα v1 세포에 대한 항-SIRPα 항체 025c, 015c, 042c, 059c, hu1H9G4 (도 1a), 071c, 073c (도 1b) 및 293F-인간 SIRPα v1 세포에 대한 005c (도 1c)의 FACS 결합 곡선을 보여준다.

도 2는 CHOK1-인간 SIRPα v2 세포에 대한 항-SIRPα 항체 025c, 015c, 042c, 071c, 073c, hu1H9G4 (도 2a), 025c, 059c, 005c, HEFLB (도 2b)의 FACS 결합 곡선을 보여준다.

도 3은 CHOK1-인간 SIRPβ 세포에 대한 항-SIRPα 항체의 FACS 결합 곡선 (도 3c), 및 인간 SIRPβ ECD (도 3a 및 3b) 및 인간 SIRPβ1 ECD (도 3d 및 3e)의 재조합 단백질에 대한 그의 ELISA 결합 곡선을 보여준다.

도 4는 293F-인간 SIRPγ 세포에 대한 항-SIRPα 항체의 FACS 결합 곡선 (도 4a 및 도 4b) 및 시노 SIRPγ ECD의 재조합 단백질에 대한 그의 ELISA 결합 곡선 (도 4c)을 보여준다.

도 5는 C57BL/6 마우스 SIRPα ECD의 재조합 단백질에 대한 항-SIRPα 항체의 ELISA 결합 (도 5a) 및 CHOK1-시노 SIRPα 세포에 대한 그의 FACS 결합 곡선 (도 5b 및 도 5c)을 보여준다.

도 6은 경쟁적 ELISA 검정에 의해 측정된 바와 같은 항-SIRPα 항체 025c, 015c, 042c, 059c, 071c, 073c, hu1H9G4 (도 6a), 025c, 005c, 059c (도 6b)의 CD47 및 SIRPα v1 상호작용 차단 활성을 보여준다.

도 7은 경쟁적 ELISA 검정에 의해 측정된 바와 같은 항-SIRPα 항체 025c, 059c (도 7a), 025c, 015c, 042c, 071c, 073c, hu1H9G4 (도 7b)의 CD47 및 SIRPα v2 상호작용 차단 활성을 보여준다.

도 8은 SHP-1 동원 검정의 원리 (도 8a) 및 이러한 검정에 의해 측정된 바와 같은 항-SIRPα 항체의 SHP-1 동원 차단 활성 (도 8b)을 보여준다.

도 9는 HDX-MS에 의해 측정된 바와 같은 항-SIRPα 항체 025c (도 9a), 042c (도 9b), 073c (도 9c), hu1H9G4 (도 9d), HEFLB (도 9e)의 잠재적인 결합 에피토프를 보여준다.

도 10은 표시된 항체의 존재 하에서의 인간 대식세포에 의한 Raji 세포 (도 10a), DLD1 세포 (도 10b), 및 Raji/PD-L1 세포 (도 10c 및 도 10d)의 식세포작용을 보여준다.

도 11은 표시된 항체의 존재 하에서의 인간 M0 분극화된 대식세포 (도 11a) 또는 인간 M1 분극화된 대식세포 (도 11b)에 의한 Raji/PD-L1 세포의 식세포작용을 보여준다.

도 12는 항-SIRPα 처리 및 항-CLDN18.2 처리의 조합의 활성을 평가하기 위한 생체내 동계 마우스 결장 암종 모델의 결과를 보여준다. 도 12a는 연구 종료 시의 각각의 종양의 중량을 보여주고, 도 12b는 각각의 연구 군에 대한 평균 종양 부피 성장 곡선을 보여주고, 도 12c는 각각의 종양에 대한 개별적인 부피 성장 곡선을 보여준다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

도 13은 항-SIRPα 항체의 존재 하에 동종이형 수지상 세포가 T 세포 IFNγ 분비 (도 13a), CD4+ T 세포 (도 13b) 및 CD8+ T 세포 (도 13c)의 증식 비를 자극하였음을 보여준다.

도 14는 CHOK1-인간 SIRPα v1 세포 (도 14a), CHOK1-인간 SIRPα v2 세포 (도 14b), CHOK1-인간 SIRPβ 세포 (도 14c), 및 293F-SIRPγ 세포 (도 14d)에 대한 인간화 항체의 FACS 결합 곡선을 보여준다.

도 15는 경쟁적 ELISA 검정에 의해 측정된 바와 같은 인간화 항체의 CD47 및 SIRPα 상호작용 차단 활성을 보여

준다. (도 15a) 인간 CD47 및 인간 SIRPα v1 상호작용 차단, (도 15b) 인간 CD47 및 인간 SIRPα v2 상호작용 차단.

도 16은 경쟁적 FACS 검정에 의해 측정된 바와 같은 인간화 항체의 CD47 및 SIRPα 상호작용 차단 활성을 보여준다. (도 16a) 인간 CD47 및 인간 SIRPα v1 상호작용 차단, (도 16b) 인간 CD47 및 인간 SIRPα v2 상호작용 차단.

도 17은 SHP-1 동원 검정에 의해 측정된 바와 같은 인간화 항체의 SHP-1 동원 차단 활성을 보여준다.

도 18은 표시된 항체의 존재 하에서의 인간 대식세포에 의한 Raji/PD-L1 세포의 식세포작용을 보여준다. (도 18a, 도 18c 및 도 18e) 항-SIRPα 항체 플러스 항-PD-L1 항체의 존재 하에서의 SIRPA 동형접합 v1/v1 (a), SIRPA 동형접합 v2/v2 (c) 또는 SIRPA 이형접합 v1/v2 (e) 공여자로부터의 인간 대식세포에 의한 Raji/PD-L1 세포의 식세포작용, (도 18b 및 도 18d) 항-SIRPα 항체 플러스 리툭시맙의 존재 하에서의 인간 대식세포 SIRPA 동형접합 v1/v1 (b) 또는 SIRPA 동형접합 v2/v2 (d) 공여자에 의한 Raji/PD-L1 세포의 식세포작용.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0183] 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.

[0184] 정의

[0185] 본원에 사용된 용어 "항체"는 특이적 항원에 결합하는 임의의 이뮤노글로불린, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다가 항체, 2가 항체, 1가 항체, 다중특이적 항체, 또는 이중특이적 항체를 포함한다. 천연 무손상 항체는 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함한다. 포유동물 중쇄는 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 분류되고, 각각의 중쇄는 가변 영역 (VH) 및 제1, 제2, 제3 및 임의로 제4 불변 영역 (각각 CH1, CH2, CH3, CH4)으로 이루어지고; 포유동물 경쇄는 λ 또는 κ로 분류되며, 각각의 경쇄는 가변 영역 (VL) 및 불변 영역으로 이루어진다. 항체는 "Y" 형상을 갖고, Y의 줄기는 디술피드 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 LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3을 포함하고, 중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2, HCDR3을 포함함). 본원에 개시된 항체 및 항원-결합 단편에 대한 CDR 경계는 카바트(Kabat), IMGT, 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); Chothia, C. et al., Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. et al., Sequences of Proteins of immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, 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 CDR 보다 더 고도로 보존되고 고도로 가변성인 루프를 지지하는 스캐폴드를 형성하는 프레임워크 영역 (FR) (LFR1, LFR2, LFR3, 및 LFR4를 포함한 경쇄 FR, HFR1, HFR2, HFR3, 및 HFR4를 포함한 중쇄 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.

[0186] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 그의 임의의 항원-결합 단편을 포괄한다. 본원에 사용된 용어 "항원-결합 단편"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 단편의 예는 비제한적으로 디아바디, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv 단편, 디술피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), $(dsFv)_2$, 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 단편은 모 항체가 결합하는 동일한 항원에 결합할 수 있다.

[0187] 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.

[0188] "Fab'"는 힌지 영역의 부분을 포함하는 Fab 단편을 지칭한다.

[0189] "$F(ab')_2$"는 Fab'의 이량체를 지칭한다.

[0190] (예를 들어 IgG, IgA 또는 IgD 이소형의) 항체와 관련하여 "Fc"는 디술피드 결합을 통해 제2 중쇄의 제2 및 제3 불변 도메인에 결합된 제1 중쇄의 제2 및 제3 불변 도메인으로 이루어진 항체의 부분을 지칭한다. IgM 및 IgE 이소형의 항체와 관련하여 Fc는 제4 불변 도메인을 추가로 포함한다. 항체의 Fc 부분은 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 담당하지만, 항원 결합에서는 기능하지 않는다.

[0191] 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.

[0192] "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)).

[0193] "단일-쇄 Fv-Fc 항체" 또는 "scFv-Fc"는 항체의 Fc 영역에 연결된 scFv로 이루어진 조작된 항체를 지칭한다.

[0194] "낙타화 단일 도메인 항체", "중쇄 항체" 또는 "HCAb"는 2개의 V_H 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., 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)).

[0195] "나노바디"는 중쇄 항체로부터의 VHH 도메인 및 2개의 불변 도메인, CH2 및 CH3으로 이루어진 항체 단편을 지칭한다.

[0196] "디아바디" 또는 "dAb"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 포함하며, 여기서 단편은 동일한 폴리펩티드 쇄에서 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 쇄 상의 2개의 도메인 사이의 쌍형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 쇄의 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.

[0197] "도메인 항체"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.

[0198] 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 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.

[0199] 본원에 사용된 "이중특이적" 항체는 2개의 상이한 모노클로날 항체로부터 유래된 단편을 갖고 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 인공 항체를 지칭한다. 2개의 에피토프는 동일한 항원 상에 존재할 수 있거나, 또는 2개의 상이한 항원 상에 존재할 수 있다.

[0200] 특정 실시양태에서, "scFv 이량체"는 또 다른 V_H-V_L 모이어티와 이량체화된 V_H-V_L (펩티드 링커에 의해 연결됨)을 포함하여, 하나의 모이어티의 V_H가 다른 모이어티의 V_L과 배위하고 동일한 항원 (또는 에피토프) 또는 상이한 항원 (또는 에피토프)을 표적화할 수 있는 2개의 결합 부위를 형성하게 된, 2가 디아바디 또는 이중특이적 scFv (BsFv)이다. 다른 실시양태에서, "scFv 이량체"는 V_{L1}-V_{H2} (펩티드 링커에 의해 연결됨)와 회합된 V_{H1}-V_{L2} (또한 펩티드 링커에 의해 연결됨)를 포함하여, V_{H1} 및 V_{L1}이 배위하고, V_{H2} 및 V_{L2}가 배위하며, 각각의 배위된 쌍이 상이한 항원 특이성을 갖게 된, 이중특이적 디아바디이다.

[0201] "dsFv"는 단일 경쇄의 가변 영역과 단일 중쇄의 가변 영역 사이의 연결이 디술피드 결합인 디술피드-안정화된 Fv 단편을 지칭한다. 일부 실시양태에서, "$(dsFv)_2$" 또는 "(dsFv-dsFv')"는 3개의 펩티드 쇄를 포함한다: 펩티드 링커 (예를 들어 긴 가요성 링커)에 의해 연결되고 디술피드 가교를 통해 각각 2개의 V_L 모이어티에 결합된 2개의 V_H 모이어티. 일부 실시양태에서, dsFv-dsFv'는 각각의 디술피드 쌍형성된 중쇄 및 경쇄가 상이한 항원 특이성을 갖는 이중특이체이다.

[0202] 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 단편을 의미한다. 예시적인 예에서, 키메라 항체는 인간으로부터 유래된 불변 영역 및 비-인간 동물, 예컨대 마우스로부터의 가변 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-인간 동물은 포유동물, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양, 기니 피그 또는 햄스터이다.

[0203] 본원에 사용된 용어 "인간화"는 항체 또는 항원-결합 단편이 비-인간 동물로부터 유래된 CDR, 인간으로부터 유래된 FR 영역, 및 적용가능한 경우에, 인간으로부터 유래된 불변 영역을 포함하는 것을 의미한다.

[0204] 본원에 사용된 용어 "친화도"는 이뮤노글로불린 분자 (즉, 항체) 또는 그의 단편과 항원 사이의 비-공유 상호작용의 강도를 지칭한다.

[0205] 본원에 사용된 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합한다"는 2개의 분자 사이의, 예컨대 예를 들어 항체와 항원 사이의 비-무작위 결합 반응을 지칭한다. 특이적 결합은 결합 친화도에서 특징화될 수 있으며, 예를 들어 K_D 값, 즉 항원과 항원-결합 분자 사이의 결합이 평형에 도달하였을 때의 해리율 대 회합률의 비 (k_{off}/k_{on})에 의해 나타내어질 수 있다. K_D는 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. $\leq 10^{-6}$ M (예를 들어 $\leq 5x10^{-7}$ M, $\leq 2x10^{-7}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 5x10^{-8}$ M, $\leq 2x10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5x10^{-9}$ M, $\leq 4x10^{-9}$M, $\leq 3x10^{-9}$M, $\leq 2x10^{-9}$ M, 또는 $\leq 10^{-9}$ M)의 K_D 값은 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 SIRPα (예를 들어 인간 SIRPα) 사이의 특이적 결합을 나타낼 수 있다.

[0206] 본원에 사용된 "인간 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는" 능력은 인간 SIRPα와 제2 항-SIRPα 항체 사이의 결합 상호작용을 임의의 검출가능한 정도로 억제하는 제1 항체 또는 항원-결합 단편의 능력을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 인간 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 항원-결합 단편은 인간 SIRPα와 제2 항-SIRPα 항체 사이의 결합 상호작용을 적어도 85%, 또는 적어도 90% 억제한다. 특정 실시양태에서, 이러한 억제는 95% 초과, 또는 99% 초과일 수 있다.

[0207] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 상의 원자 또는 아미노산의 특정 기를 지칭한다. 2종의 항체는 이들이 항원에 대해 경쟁적 결합을 나타내는 경우에 항원 내의 동일하거나 밀접하게 관련된 에피토프에 결합할 수 있다. 에피토프는 선형 또는 입체형태적일 수 있다 (즉, 이격된 아미노산 잔기를 포함함). 예를 들어, 항체 또는 항원-결합 단편이 항원에 대한 참조 항체의 결합을 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 차단하는 경우에, 항체 또는 항원-결합 단편은 참조 항체와 동일한/밀접하게 관련된 에피토프에 결합하는 것으로 간주될 수 있다.

[0208] 본원에 사용된 용어 "아미노산"은 각각의 아미노산에 특이적인 측쇄와 함께 아민 ($-NH_2$) 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

[0209]

[0210] 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 아미노산 잔기 (예를 들어 Cys, Ser, Thr, Asn 및 Gln) 중에서, 산성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 Asp, Glu) 중에서, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 잔기 (예를 들어 His, Lys 및 Arg) 중에서, 또는 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 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.

[0211] 본원에 사용된 용어 "상동"은 최적으로 정렬된 경우에 또 다른 서열에 대해 적어도 60% (예를 들어 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 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.

[0212] 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. 다시 말해서, 아미노산 서열 (또는 핵산 서열)의 퍼센트 (%) 서열 동일성은 그것이 비교되는 참조 서열에 대해 동일한 아미노산 잔기 (또는 염기)의 수를 후보 서열 또는 참조 서열 중 더 짧은 것에서의 아미노산 잔기 (또는 염기)의 총 수로 나눔으로써 계산될 수 있다. 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.

[0213] 본원에 사용된 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역의 그의 이펙터, 예컨대 C1 복합체 및 Fc 수용체에 대한 결합에

기인하는 생물학적 활성을 지칭한다. 예시적인 이펙터 기능은 항체 및 C1 복합체 상의 C1q의 상호작용에 의해 매개되는 보체 의존성 세포독성 (CDC); 이펙터 세포 상의 Fc 수용체에 대한 항체의 Fc 영역의 결합에 의해 매개되는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 및 식세포작용을 포함한다. 이펙터 기능은 다양한 검정, 예컨대 Fc 수용체 결합 검정, C1q 결합 검정 및 세포 용해 검정을 사용하여 평가될 수 있다.

[0214] "단리된" 물질은 인간의 손에 의해 천연 상태로부터 변경되었다. "단리된" 조성물 또는 물질이 천연에서 발생하는 경우에, 이는 그의 원래 환경으로부터 변화 또는 제거되었거나, 또는 둘 다이다. 예를 들어, 살아있는 동물에 천연적으로 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 그의 천연 상태의 공존 물질로부터 충분히 분리하여 실질적으로 순수한 상태로 존재하도록 한 경우에 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드는 "단리된" 것이다. "단리된 핵산 서열"은 단리된 핵산 분자의 서열을 지칭한다. 특정 실시양태에서, "단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편"은 전기영동 방법 (예컨대 SDS-PAGE, 등전 포커싱, 모세관 전기영동) 또는 크로마토그래피 방법 (예컨대 이온 교환 크로마토그래피 또는 역상 HPLC)에 의해 결정된 바와 같이, 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 순도를 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 지칭한다.

[0215] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 유전 요소가 그러한 유전 요소의 발현이 일어나도록, 예컨대 유전 요소에 의해 코딩된 단백질, RNA 또는 DNA를 생산하도록, 또는 유전 요소를 복제하도록 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, 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. 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 제한되지는 않는, 세포 내로의 그의 진입을 보조하는 물질을 포함할 수 있다. 벡터는 발현 벡터 또는 클로닝 벡터일 수 있다. 본 개시내용은 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 본원에 제공된 핵산 서열, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 1개의 프로모터 (예를 들어, SV40, CMV, EF-1α), 및 적어도 1개의 선택 마커를 함유하는 벡터 (예를 들어, 발현 벡터)를 제공한다.

[0216] 본원에 사용된 어구 "숙주 세포"는 외인성 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터가 도입될 수 있거나 도입된 세포를 지칭한다.

[0217] 용어 "대상체"는 인간 및 비-인간 동물을 포함한다. 비-인간 동물은 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물 및 비-포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 마우스, 래트, 고양이, 토끼, 양, 개, 소, 닭, 양서류 및 파충류를 포함한다. 언급된 경우를 제외하고는, 용어 "환자" 또는 "대상체"는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0218] 용어 "항종양 활성"은 종양 세포 증식, 생존율 또는 전이 활성의 감소를 의미한다. 예를 들어, 항종양 활성은 요법의 부재 하의 대조군과 비교하여, 요법 동안 발생하는 비정상 세포의 성장 속도의 저하 또는 종양 크기 안정성 또는 감소, 또는 요법으로 인한 보다 긴 생존에 의해 제시될 수 있다. 이러한 활성은 이종이식편 모델, 동종이식편 모델, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 모델, 및 항종양 활성을 조사하기 위한 관련 기술분야에 공지된 다른 공지된 모델을 포함하나 이에 제한되지는 않는 허용되는 시험관내 또는 생체내 종양 모델을 사용하여 평가될 수 있다.

[0219] 본원에 사용된 질환, 장애 또는 상태의 "치료하는" 또는 "치료"는 질환, 장애 또는 상태의 예방 또는 완화, 질환, 장애 또는 상태의 발병 또는 발생 속도의 둔화, 질환, 장애 또는 상태의 발생 위험의 감소, 질환, 장애 또는 상태와 연관된 증상의 발생의 예방 또는 지연, 질환, 장애 또는 상태와 연관된 증상의 감소 또는 종료, 질환, 장애 또는 상태의 완전 또는 부분 퇴행의 생성, 질환, 장애 또는 상태의 치유, 또는 그의 일부 조합을 포함한다.

[0220] 용어 "진단", "진단하다" 또는 "진단하는"은 병리학적 상태, 질환 또는 병태의 확인, 예컨대 SIRPα 관련 질환의 확인을 지칭하거나, 또는 특정한 치료 요법으로부터 이익을 얻을 수 있는 SIRPα 관련 질환을 갖는 대상체의 확인을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 진단은 SIRPα의 비정상적인 양 또는 활성의 확인을 함유한다. 일부 실시양태에서, 진단은 대상체에서의 암 또는 자가면역 질환의 확인을 지칭한다.

[0221] 본원에 사용된 용어 "생물학적 샘플" 또는 "샘플"은 예를 들어 물리적, 생화학적, 화학적 및/또는 생리학적 특징에 기초하여 특징화 및/또는 확인되는 세포 엔티티 및/또는 다른 분자 엔티티를 함유하는, 관심 대상체로부터

수득되거나 유래된 생물학적 조성물을 지칭한다. 생물학적 샘플은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법에 의해 수득된 대상체의 세포, 조직, 기관 및/또는 생물학적 유체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 유체 샘플이다. 일부 실시양태에서, 유체 샘플은 전혈, 혈장, 혈청, 점액 (비강 배액 및 점액질 포함), 복막액, 흉막액, 흉부액, 타액, 소변, 활액, 뇌척수액 (CSF), 흉강천자액, 복부액, 복수 또는 심막액이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체의 심장, 간, 비장, 폐, 신장, 피부 또는 혈관으로부터 수득된 조직 또는 세포이다.

[0222] 본원에 사용된 "SIRPα"는 주로 골수 세포, 수지상 세포 및 또한 줄기 세포 또는 뉴런에 의해 발현되는 신호 조절 단백질 (SIRP) 패밀리로부터의 조절 막 당단백질을 지칭한다. SIRPα의 구조는 세포외 도메인 및 세포질 도메인을 포함한다. SIRPα의 세포외 도메인은 막-원위 Ig 가변-유사 (IgV) 폴드, 및 2개의 막-근위 Ig 불변-유사 (IgC) 폴드로 이루어진다. SIRPα의 IgV 도메인은 CD47의 세포외 Ig-도메인의 결합을 담당한다. 특정 실시양태에서, SIRPα는 인간 SIRPα이다. 인간 SIRPα를 코딩하는 유전자는 다형성 유전자이고, 인간 집단에서 여러 변이체가 기재되었다. 가장 흔한 단백질 변이체는 SIRPα v1 및 SIRPα v2 (수탁 번호 NP_542970 (P78324) 및 CAA71403)이다. 본원에 사용된 바와 같은 SIRPα는 다른 동물 종, 예컨대 특히 마우스, 및 시노몰구스로부터의 것일 수 있다. 무스 무스쿨루스(Mus musculus) (마우스) SIRPα 단백질의 예시적인 서열은 NCBI Ref Seq No. NP_031573, 또는 BAA20376.1, 또는 BAA13521.1에 개시되어 있다. 시노몰구스 (원숭이) SIRPα 단백질의 예시적인 서열은 NCBI Ref Seq No. NP_001271679에 개시되어 있다.

[0223] SIRPα에 더하여, SIRP 패밀리는 또한 SIRPβ 및 SIRPγ를 포함한 여러 다른 막횡단 당단백질을 포함한다. SIRP 패밀리의 각각의 구성원은 별개의 막횡단 및 세포질 도메인을 갖는 3개의 유사한 세포외 Ig-유사 도메인을 함유한다. SIRP 베타 유전자에 의해 코딩되는 "SIRPβ"는 DNAX 활성화 단백질 12 또는 DAP12로 불리는 막횡단 단백질과의 회합을 통한 그의 세포질 꼬리의 세포내 신호전달에 의해 양성 신호를 생성한다. DAP12의 세포질 꼬리는 SIRPβ1을 활성화 기구에 연결하는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)를 보유한다. SIRPg로도 명명되는 "SIRPγ"는 SIRPG 유전자에 의해 코딩되고, 세포외 Ig 도메인에서 SIRPα 및 SIRPβ와 고도로 상동성이지만, SIRPγ의 세포질 꼬리는 특유하다. SIRPγ는 또한 CD47에 결합하지만 SIRPα보다 더 낮은 친화도로 결합하는 것으로 나타났다.

[0224] 용어 "항-SIRPα 항체"는 SIRPα (예를 들어 인간 또는 원숭이 SIRPα)에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 지칭한다. 용어 "항-인간 SIRPα 항체"는 인간 SIRPα에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 지칭한다.

[0225] 본원에 사용된 "SIRPα 관련" 질환, 장애 또는 상태는 SIRPα의 증가 또는 감소된 발현 또는 활성에 의해 유발되거나, 그에 의해 악화되거나, 또는 달리 그와 연관된 임의의 질환 또는 상태를 지칭한다. 일부 실시양태에서, SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태는 면역-관련 장애, 예컨대, 예를 들어, 자가면역 질환이다. 일부 실시양태에서, SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태는 과도한 세포 증식과 관련된 장애, 예컨대 예를 들어 암이다. 특정 실시양태에서, SIRPα 관련 질환 또는 상태는 SIRPα 유전자 및/또는 SIRPα 서명 유전자의 발현 또는 과다발현을 특징으로 한다. 특정 실시양태에서, SIRPα 관련 질환 또는 상태는 CD47의 발현 또는 과다발현을 특징으로 한다.

[0226] 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.

[0227] 본원에 사용된 용어 "SIRPα-양성 세포"는 세포의 표면 상에 SIRPα를 발현하는 세포 (예를 들어 식세포작용 세포)를 지칭한다. 일부 실시양태에서, "SIRPα-양성 세포"는 또한 세포의 표면 상에 SIRPβ 또는 SIRPγ를 발현할 수 있다.

[0228] 항-SIRPα 항체

[0229] 본 개시내용은 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 및 항원-결합 단편은 SIRPα에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0230] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 생물층 간섭측정 기술 (옥테트 시스템)을 사용하여 10^{-7} M 이하, $8x10^{-8}$ M 이하, $5x10^{-8}$ M 이하, $2x10^{-8}$ M 이하, $8x10^{-9}$ M 이하, $5x10^{-9}$ M 이하, $2x10^{-9}$ M 이하, 10^{-9} M 이하, $8x10^{-10}$ M 이하, $7x10^{-10}$ M 이하, 또는 $6x10^{-10}$ M 이하, 또는 $5x10^{-10}$ M 이하, 또는 $4x10^{-10}$ M 이하의 K_D 값으로 인간 SIRPα에 특이적으로 결합한다. 옥테트 시스템은 생물층 간섭측정 (BLI) 기술을 기초로 하며, 예를 들어 문헌 [Sultana A. et al., Current protocols in protein science, 02 Feb 2015,

79:19.25.1-19.25.26]을 참조한다. 특정 실시양태에서, K_D 값은 본 개시내용의 실시예 5.2.5에 기재된 바와 같은 방법에 의해 측정된다.

[0231] 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 인간 SIRPα에 대한 결합은 또한 "반수 최대 유효 농도" (EC_{50}) 값으로 나타내어질 수 있고, 이는 최대 결합의 50%가 관찰되는 항체의 농도를 지칭한다. EC_{50} 값은 관련 기술분야에 공지된 결합 검정, 예를 들어 직접 또는 간접 결합 검정, 예컨대 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA), 유동 세포측정 검정 및 다른 결합 검정에 의해 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 측정 시 0.5 nM 이하, 0.2 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.09 nM 이하, 0.08 nM 이하, 0.07 nM 이하, 0.06 nM 이하 또는 0.05 nM 이하의 EC_{50} (즉, 50% 결합 농도)으로 인간 SIRPα v1 또는 인간 SIRPα v2에 특이적으로 결합한다.

[0232] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 FACS 검정에 의해 측정 시 4 nM 이하 (예를 들어, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 1.5 nM 이하, 1.0 nM 이하)의 EC_{50}으로 인간 SIRPα v1에 특이적으로 결합한다.

[0233] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 FACS 검정에 의해 측정 시 12.1 nM 이하 (예를 들어, 6 nM 이하, 5 nM 이하, 4 nM 이하, 3 nM 이하, 2 nM 이하, 1 nM 이하, 0.9 nM 이하, 0.8 nM 이하, 0.7 nM 이하)의 EC_{50}으로 인간 SIRPα v2에 특이적으로 결합한다.

[0234] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 마우스 SIRPα에 대해 특이적 결합을 갖지 않는다. 마우스 SIRPα에 대해 "특이적 결합을 갖지 않는" 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 마우스 SIRPα에 대해 검출가능한 결합을 나타내지 않거나 또는 동등한 검정 조건 하에 대조군 항체에 대한 것과 대등한 수준으로 마우스 SIRPα에 대한 결합을 나타내는 것이다. 대조군 항체는 마우스 SIRPα에 결합하지 않는 것으로 공지된 임의의 항체일 수 있다.

[0235] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 FACS 검정에 의해 측정 시 40 nM 이하 (예를 들어 30 nM 이하, 1 nM 이하, 0.9 nM 이하, 0.8 nM 이하, 0.7 nM 이하, 0.4 nM 이하)의 EC_{50}으로 SIRPβ에 특이적으로 결합한다.

[0236] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 ELISA 검정에 의해 측정 시 3 nM 이하 (예를 들어, 2 nM 이하, 0.9 nM 이하, 0.8 nM 이하, 0.7 nM 이하, 0.5 nM 이하, 0.4 nM 이하, 0.3 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.05 nM 이하)의 EC_{50}으로 SIRPβ ECD에 특이적으로 결합한다.

[0237] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 FACS 검정에 의해 측정 시 80 nM 이하 (예를 들어 50 nM 이하, 40 nM 이하, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하, 0.3 nM 이하)의 EC_{50}으로 SIRPγ에 결합한다.

[0238] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SIRP-알파와 CD47 사이의 상호작용을 완전히 차단할 수 있다. 2개의 상호작용하는 분자 사이의 "상호작용을 완전히 차단한다"는 것은 항체가 2개의 상호작용하는 분자 사이의 결합을 적어도 80% 억제할 수 있다는 것, 또는 2개의 분자의 상호작용에 의해 유도되는 신호 전달을 적어도 50% 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.

[0239] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SIRP-알파 v1과 CD47 사이의 상호작용을 완전히 차단할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쟁적 ELISA 검정법에 의해 측정 시 SIRP-알파 v1과 CD47 사이의 결합을 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 차단할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쟁적 FACS 검정에 의해 측정 시 SIRP-알파 v1과 CD47 사이의 결합을 적어도 97% 또는 적어도 98% 차단할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쟁적 ELISA 검정에 의해 측정 시 4nM 이하 (또는 3nM 이하)의 IC50으로 또는 경쟁적 FACS 검정에 의해 측정 시 0.6 nM 이하 (또는 0.5 nM 이하)의 IC50으로 SIRP-알파 v1과 CD47 사이의 상호작용을 차단할 수 있다.

[0240] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SIRP-알파 v2와 CD47 사이의 상호작용을 완전히 차단할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단

편은 경쟁적 ELISA 검정법에 의해 측정 시 SIRP-알파 v2와 CD47 사이의 결합을 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% 또는 98% 차단할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쟁적 FACS 검정에 의해 측정 시 SIRP-알파 v2와 CD47 사이의 결합을 적어도 98% 또는 적어도 99% 차단할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 경쟁적 ELISA 검정에 의해 측정 시 55nM 이하 (또는 6nM 이하, 5nM 이하, 3nM 이하 또는 2nM 이하)의 IC50으로 또는 경쟁적 FACS 검정에 의해 측정 시 3nM 이하 (또는 2nM 이하)의 IC50으로 SIRP-알파 v2와 CD47 사이의 상호작용을 차단할 수 있다.

[0241] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SIRP-알파와 CD47의 상호작용에 의해 유도되는 신호 전달을 적어도 50%, 60%, 70%, 또는 80% 차단할 수 있다.

[0242] 특정 실시양태에서, 항체는 SIRP-알파와 CD47 사이의 상호작용에 의해 유도되는 신호 전달을 차단할 수 있지만, SIRP-알파와 CD47 사이의 결합은 유의하게 차단하지 않는다. 다시 말해서, SIRP-알파 및 CD47은 이러한 항-SIRP-알파 항체의 존재 하에 서로 결합할 수 있지만, 이들은 신호 전달에서 덜 효과적이게 된다.

[0243] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 T 세포에 의한 IFNɣ 분비, $CD4^+$ T 세포 증식 또는 $CD8^+$ T 세포 증식에 대해 유의한 억제를 갖지 않는다. SIRPɣ-CD47 상호작용을 통한 항원-제시 세포에 대한 인간 T 세포의 부착이 T 세포 증식을 공동-자극하는 것으로 보고되어 있다. T 세포 증식은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여, 예를 들어 본 개시내용의 실시예 4.2.9에 기재된 것과 같은 T 세포 증식 검정에 의해, 예를 들어 증식 집단을 결정하기 위한 셀트레이스 바이올렛(CellTrace Violet) (라이프 테크놀로지스(Life Technologies)) 표지를 사용함으로써 결정될 수 있다. 본 개시내용에 제시된 바와 같이, 인간 SIRPɣ에 대한 결합 활성과 관계없이, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포의 증식을 유의하게 감소시키거나 IFNɣ 분비에 영향을 미치지 않는다.

[0244] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 대조군 항체 (예를 들어, SIRPα에 결합하지 않고 T 세포 증식에 영향을 미치지 않는 것으로 공지된 항체)에 의해 수득된 대조군 수준에 비해, T 세포에 의한 IFNɣ 분비, $CD4^+$ T 세포 증식 또는 $CD8^+$ T 세포 증식에 대해 50% 이하 (또는 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 또는 10% 이하)의 억제를 나타낸다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 T 세포에 의한 IFNɣ 분비, $CD4^+$ T 세포 증식 또는 $CD8^+$ T 세포 증식에 대해 검출가능한 억제를 나타내지 않는다.

[0245] 특정 실시양태에서, 단일 작용제로서 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 특정 CD47-발현 세포 예컨대 Raji 세포의 식세포작용을 유도하지 않는다.

[0246] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 표적 항체의 항체-의존적 세포성 식세포작용 (ADCP) 효과를 증가시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적 항체는 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원에 결합하고, 표적 세포에 대한 표적 항체의 ADCP 효과가 증가된다. 특정 실시양태에서, 표적 세포는 또한 CD47을 발현한다.

[0247] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 YNQKEGHFPRVTTVSDL (서열식별번호: 36)의 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에 결합할 수 있다.

[0248] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SGAGTEL (서열식별번호: 72), 및/또는 TNVDPVGESVS (서열식별번호: 87)의 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에 결합할 수 있다.

[0249] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 TNVDPVGESVSY (서열식별번호: 90)의 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에 결합할 수 있다.

[0250] 예시적인 항-SIRPα 항체

[0251] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 항체 005, 015, 025, 042, 071, 073 및/또는 059의 1개 이상의 (예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의) CDR 서열을 포함하는 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 항체 005, 015, 025, 042, 071, 073 및/또는 059의 키메라 항체, 인간화 항체, 항체 유도체 및 항체 변이체를 제공한다.

[0252] 본원에 사용된 항체 "005" 및 "005c"는 각각 서열식별번호: 49의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열

식별번호: 50의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 하이브리도마 항체 및 키메라 항체를 지칭한다.

[0253] 본원에 사용된 항체 "015" 및 "015c"는 각각 서열식별번호: 51의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 52의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 하이브리도마 항체 및 키메라 항체를 지칭한다.

[0254] 본원에 사용된 항체 "025" 및 "025c"는 각각 서열식별번호: 53의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 54의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 하이브리도마 항체 및 키메라 항체를 지칭한다.

[0255] 본원에 사용된 항체 "042" 및 "042c"는 각각 서열식별번호: 55의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 56의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 하이브리도마 항체 및 키메라 항체를 지칭한다.

[0256] 본원에 사용된 항체 "059" 및 "059c"는 각각 서열식별번호: 57의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 58의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 하이브리도마 항체 및 키메라 항체를 지칭한다.

[0257] 본원에 사용된 항체 "071" 및 "071c"는 각각 서열식별번호: 59의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 60의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 하이브리도마 항체 및 키메라 항체를 지칭한다.

[0258] 본원에 사용된 항체 "073" 및 "073c"는 각각 서열식별번호: 61의 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 62의 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 모노클로날 하이브리도마 항체 및 키메라 항체를 지칭한다.

[0259] 하기 표 1은 항체 005, 015, 025, 042, 071, 073, 059, 005c, 015c, 025c, 042c, 059c, 071c 및 073의 CDR 아미노산 서열을 보여준다. 표 1의 CDR 경계는 카바트의 정의에 의해 정의되거나 확인되었지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 CDR이 또한 다른 정의, 예컨대 IMGT, 코티아 또는 알-라지카니를 사용하여 정의될 수 있거나, 또는 2종 이상의 정의를 사용하여 혼합된 방식으로 정의될 수 있다는 것을 인지할 수 있다. 하기 표 2는 항체 005, 015, 025, 042, 071, 073, 059, 005c, 015c, 025c, 042c, 059c, 071c 및 073의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 보여준다.

[0260] 표 1. 7개의 항체의 CDR 아미노산 서열

[0261]

항체 ID	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
005/ 005c	SEQ ID NO: 1 DYYMS	SEQ ID NO: 2 FIKNEANG YTTESSAS VKG	SEQ ID NO: 3 YDYYGSNY NWYFDA	SEQ ID NO: 4 KASQNVR TAVA	SEQ ID NO: 5 LASKRHT	SEQ ID NO: 6 LQHWIHP LT
015/ 015c	SEQ ID NO: 7 AYYMH	SEQ ID NO: 8 RIDPEDGE SKYAPKFQ G	SEQ ID NO: 9 GSYEY	SEQ ID NO: 10 SASSSVSSS YLY	SEQ ID NO: 11 STSNLAS	SEQ ID NO: 12 YQWSSYP YT
025/ 025c	SEQ ID NO: 13 DYYMH	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15 GLAY	SEQ ID NO: 10 SASSSVSSS YLY	SEQ ID NO: 11 STSNLAS	SEQ ID NO: 16 HQWSSYP YT

		RIDPEDGE TKYAPKFQ G				
		SEQ ID NO: 17 RIDPEDAE TKYAPKFQ G				
	SEQ ID NO: 18 X_1YYMH	**SEQ ID NO: 19** RIDPEDX_2E X_3KYAPKF QG	**SEQ ID NO: 20** G$X_{18}X_4X_5$Y			**SEQ ID NO: 21** X_6QWSSY PYT
042/ 042c	**SEQ ID NO: 22** TYGMS	**SEQ ID NO: 23** WINTYSG VSTCADDF KG	**SEQ ID NO: 24** DPHSYGN SPAWFPY	**SEQ ID NO: 25** KASQNVGI SVA	**SEQ ID NO: 26** SASNRYT	**SEQ ID NO: 27** QQYSSYP LT
071/ 071c	**SEQ ID NO: 22** TYGMS	**SEQ ID NO: 28** WINTYSG VPTYADDF QG	**SEQ ID NO: 29** DPHYYGTS PAWFAY	**SEQ ID NO: 30** KASQIVGI AVA	**SEQ ID NO: 31** SASNRFT	**SEQ ID NO: 32** QQYSTYP FT
073/ 073c	**SEQ ID NO: 22** TYGMS	**SEQ ID NO: 33** WINTYSG VPTYADDF KG	**SEQ ID NO: 34** DPHYYGSS PAWFVY	**SEQ ID NO: 35** EASQIVGI AVA	**SEQ ID NO: 26** SASNRYT	**SEQ ID NO: 37** QQYSAYP FT
		SEQ ID NO: 38 WINTYSG VX_{19}TX_7A DDFX_8G	**SEQ ID NO: 39** DPHX_9YG X_{10}SPAWF X_{11}Y	**SEQ ID NO: 40** X_{12}ASQX_{13}VGIX_{14}V A	**SEQ ID NO: 41** SASNRX_{15} T	**SEQ ID NO: 42** QQYSX_{16} YPX_{17}T
059/ 059c	**SEQ ID NO: 43** EYVLS	**SEQ ID NO: 44** EIYPGTITT YYNEKFKG	**SEQ ID NO: 45** FYDYDGG WFAY	**SEQ ID NO: 46** SASSSVSSS DLH	**SEQ ID NO: 47** GTSNLAS	**SEQ ID NO: 48** QQWSGY PWT

[0262]

[0263] X_1은 A 또는 D이고; X_2는 G 또는 A이고; X_3은 T 또는 S이고; X_4는 L 또는 Y이고; X_5는 E 또는 A이고; X_6은 Y 또는 H이고; X_7은 Y 또는 C이고; X_8은 K 또는 Q이고; X_9는 Y 또는 S이고; X_{10}은 N 또는 T 또는 S이고; X_{11}은 P 또는 A 또는 V이고; X_{12}는 E 또는 K이고; X_{13}은 N 또는 I이고; X_{14}는 S 또는 A이고; X_{15}는 Y 또는 F이고; X_{16}은 S 또는 T 또는 A이고; X_{17}은 F 또는 L이고; X_{18}은 S이거나 부재하고; X_{19}는 S 또는 P이다.

[0264] 표 2. 7개 항체의 가변 영역 아미노산 서열

항체 ID	중쇄 가변 영역	경쇄 가변 영역
005/005c	**SEQ ID NO: 49** EVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAA SGFTFTDYYMSWVRQPPGKALEW LGFIKNEANGYTTESSASVKGRFTIS RDNSQSILYLQMNALRAEDSATYY CARYDYYGSNYNWYFDAWGTGT TVTVSS	**SEQ ID NO: 50** DIVMTQSQKFMSPSVGDRVSITCKAS QNVRTAVAWYQQKPGQSPKVLIHLA SKRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNV QSEDLADYFCLQHWIHPLTFGAGTKL ELK
015/015c	**SEQ ID NO: 51** EVQLQQSGVEVVQPGASVKLSCT ASGFNIEAYYMHWVKQRTEQGLE WIGRIDPEDGESKYAPKFQGKAT MTADTSSSTAYLQLSSLTSDDTAVY YCVRGSYEYWGQGTTLTVSS	**SEQ ID NO: 52** QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASS SVSSSYLYWYQQKPGSSPKLWIYSTSN LASGVPPRFSGSGSGTSYSLTISSMQA EDAASYFCYQWSSYPYTFGGGTKLEIK
025/025c	**SEQ ID NO: 53** EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTA SGFNIKDYYMHWVKQRTEQGLE WIGRIDPEDGETKYAPKFQGKATIT ADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYC DRGLAYWGQGTLVTVSA	**SEQ ID NO: 54** QIVLTQSPAIMSASPGEKVTLTCSASS SVSSSYLYWYQQKPGSSPKLWIYSTSN LASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEA EDAASYFCHQWSSYPYTFGGGTKLEI K
042/042c	**SEQ ID NO: 55** QIQLVQSGPELKKPGETVKISCRAS GYTFTTYGMSWVKQAPGKGLRW MGWINTYSGVSTCADDFKGRFAF SLETSATTAYLQIHNLTNEDTATYF CARDPHSYGNSPAWFPYWGQGT LVTVSA	**SEQ ID NO: 56** DIVMTQSQKFMSTTIRDRVSITCKAS QNVGISVAWYQQKSGQSPKLLIYSAS NRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNM QSEDLADYFCQQYSSYPLTFGSGTKLA IK
059/059c	**SEQ ID NO: 57** QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCK ASGYTFSEYVLSWVKQRTGQGLE WIGEIYPGTITTYYNEKFKGKATLTA DKSSNTAYIQLTSLTSEDSAVYFCG RFYDYDGGWFAYWGQGTLLTVSA	**SEQ ID NO: 58** ENVLTQSPEKMAVSLGQKVTMTCSA SSSVSSSDLHWYQQKSGASPKPLIHG TSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSV EAEDAATYYCQQWSGYPWTFGGGT NLEIK
071/071c	**SEQ ID NO: 59** QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFTTYGMSWVKQAPGKGLKW MVWINTYSGVPTYADDFQGRFAF SLETSASTSYLQINNLRNEDTATYFC ARDPHYYGTSPAWFAYWGQGTL VTVSA	**SEQ ID NO: 60** DIVMTQSQKFMSTTIGDRVIITCKASQ IVGIAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNR FTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQS EDLADYFCQQYSTYPFTFGSGTKLEIK
073/073c	**SEQ ID NO: 61** QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS GYTFTTYGMSWVKQAPGKGLKW MVWINTYSGVPTYADDFKGRFAF SLETSASTSYLQINNLKNEDTATYFC ARDPHYYGSSPAWFVYWGQGTL VTVSA	**SEQ ID NO: 62** DIVMTQSQKFMSTTIGDRVSITCEAS QIVGIAVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS NRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNM QSEDLANYFCQQYSAYPFTFGSGTKL EVK

[0265]

[0266]

[0267] 각각의 항체 005, 015, 025, 042, 059, 071, 073, 005c, 015c, 025c, 042c, 059c, 071c 및 073이 SIRPα에 결합할 수 있고 항원-결합 특이성이 주로 CDR1, CDR2 및 CDR3 영역에 의해 제공된다는 것을 고려하여, 항체 005, 015, 025, 042, 059, 071, 073, 005c, 015c, 025c, 042c, 059c, 071c 및 073의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 서열 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3 서열은 "혼합 및 매칭"되어 (즉, 상이한 항체로부터의 CDR이 혼합 및 매칭될 수 있지만, 각각의 항체는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3 및 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 함유하여야 함) 본 개시내용의 항-SIRPα 결합 분자를 생성할 수 있다. 이러한 "혼합 및 매칭"된 항체의 SIRPα 결합은 상기 및 실시예에 기재된 결합 검정을 사용하여 시험될 수 있다. 바람직하게는, VH CDR 서열이 혼합 및 매칭되는 경우에, 특정한 VH 서열

로부터의 HCDR1, HCDR2 및/또는 HCDR3 서열은 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 마찬가지로, VL CDR 서열이 혼합 및 매칭되는 경우에, 특정한 VL 서열로부터의 LCDR1, LCDR2 및/또는 LCDR3 서열은 바람직하게는 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 신규한 VH 및 VL 서열은 1개 이상의 VH 및/또는 VL CDR 영역 서열을 모노클로날 하이브리도마 항체 005, 015, 025, 042, 059, 071 및 073에 대해 또는 키메라 항체 005c, 015c, 025c, 042c, 059c, 071c 및 073c에 대해 본원에 개시된 CDR 서열로부터의 구조적으로 유사한 서열로 치환함으로써 생성될 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다.

[0268] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1, 7, 13, 18, 22 및 43으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 2, 8, 14, 17, 19, 23, 28, 33, 38 및 44로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열식별번호: 3, 9, 15, 20, 24, 29, 34, 39 및 45로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR3, 및/또는 서열식별번호: 4, 10, 25, 30, 35, 40 및 46으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 5, 11, 26, 31, 41 및 47로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 6, 12, 16, 21, 27, 32, 37, 42 및 48로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0269] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 X_1YYMH (서열식별번호: 18)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1; RIDPEDX$_2$EX$_3$KYAPKFQG (서열식별번호: 19)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; GX$_{18}$X$_4$X$_5$Y (서열식별번호: 20)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3; 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1; 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 X$_6$QWSSYPYT (서열식별번호: 21)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며, 여기서 X_1은 A 또는 D이고; X_2는 G 또는 A이고; X_3은 T 또는 S이고; X_4는 L 또는 Y이고; X_5는 E 또는 A이고; X_6은 Y 또는 H이고; X_{18}은 S이거나 부재하는 것인, 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0270] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 7 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR1; 및/또는 서열식별번호: 8, 14, 및 17로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR2; 및/또는 서열식별번호: 9 및 15로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1; 및/또는 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2; 및/또는 서열식별번호: 12 및 16으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0271] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 22의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1; WINTYSGVX$_{19}$TX$_7$ADDFX$_8$G (서열식별번호: 38)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2; DPHX$_9$YGX$_{10}$SPAWFX$_{11}$Y (서열식별번호: 39)의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3; X$_{12}$ASQX$_{13}$VGIX$_{14}$VA (서열식별번호: 40)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1; SASNRX$_{15}$T (서열식별번호: 41)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2; QQYSX$_{16}$YPX$_{17}$T (서열식별번호: 42)의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며, 여기서 X_7은 Y 또는 C이고; X_8은 K 또는 Q이고; X_9는 Y 또는 S이고; X_{10}은 N 또는 T 또는 S이고; X_{11}은 P 또는 A 또는 V이고; X_{12}는 E 또는 K이고; X_{13}은 N 또는 I이고; X_{14}는 S 또는 A이고; X_{15}는 Y 또는 F이고; X_{16}은 S 또는 T 또는 A이고; X_{17}은 F 또는 L이고; X_{19}는 S 또는 P인 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0272] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1; 및/또는 서열식별번호: 23, 28, 및 33으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR2; 및/또는 서열식별번호: 24, 29, 및 34로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR3; 및/또는 서열식별번호: 25, 30, 및 35의 서열을 포함하는 LCDR1; 및/또는 서열식별번호: 31, 및 26으로 이루어진 군으로부터 선택된 LCDR2; 및/또는 서열식별번호: 27, 32 및 37로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0273] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 3의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0274] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 7의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 8의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 9의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별

번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0275] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 13의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 14 또는 17의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 15의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 16의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0276] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 23의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 24의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 25의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 27의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0277] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 28의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 29의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 30의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 31의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 32의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0278] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 22의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 33의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 34의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 35의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 26의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 37의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0279] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 43의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열식별번호: 44의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열식별번호: 45의 서열을 포함하는 HCDR3, 서열식별번호: 46의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열식별번호: 47의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열식별번호: 48의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0280] CDR은 항원 결합을 담당하는 것으로 공지되어 있다. 그러나, 6개의 CDR 모두가 필수적이거나 변화가능하지 않은 것은 아닌 것으로 밝혀졌다. 다시 말해서, 항-SIRPα 항체 005, 015, 025, 042, 059, 071 및 073 또는 항-SIRPα 키메라 항체 005c, 015c, 025c, 042c, 059c, 071c 및 073c에서 1개 이상의 CDR을 대체하거나 변화시키거나 변형시키는 것이 가능하지만, 이는 SIRPα에 대한 특이적 결합 특이성 및/또는 친화도를 실질적으로 보유한다.

[0281] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 항체 및 그의 항원-결합 단편이 SIRPα에 특이적으로 결합할 수 있는 한, 적합한 프레임워크 영역 (FR) 서열을 포함한다. 상기 표 1에 제공된 CDR 서열은 마우스 항체로부터 수득되지만, 이는 관련 기술분야에 공지된 적합한 방법, 예컨대 재조합 기술을 사용하여 임의의 적합한 종, 예컨대 특히 마우스, 인간, 래트, 토끼의 임의의 적합한 FR 서열에 그라프팅될 수 있다.

[0282] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 인간화된다. 인간화 항체 또는 항원-결합 단편은 인간에서의 그의 감소된 면역원성에 있어서 바람직하다. 인간화 항체는 비-인간 CDR 서열이 인간 또는 실질적으로 인간 FR 서열에 그라프팅되기 때문에 그의 가변 영역에서 키메라이다. 항체 또는 항원-결합 단편의 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).

[0283] 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 그라프팅하기 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. Mot. Biol. 196:901] 참조). 대안적으로, 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크를 비-인간 CDR의 그라프팅에 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).

[0284] 하기 표 3은 hu025.021, hu025.023, hu025.033, hu025.059 및 hu025.060으로 지정된, 항체 025에 대한 5종의 인간화 항체의 CDR 아미노산 서열을 보여준다. CDR 경계는 카바트의 정의에 의해 정의되거나 확인되었다. 하

기 표 3은 5종의 인간화 항체 hu025.021, hu025.023, hu025.033, hu025.059 및 hu025.060의 6개의 CDR에 대한 아미노산 서열을 보여준다. 하기 표 4는 5종의 인간화 항체 hu025.021, hu025.023, hu025.033, hu025.059 및 hu025.060의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 보여준다. 하기 표 5는 5종의 인간화 항체 hu025.021, hu025.023, hu025.033, hu025.059 및 hu025.060의 FR 아미노산 서열을 보여준다.

[0285] 표 3. 5개의 인간화 항체의 CDR 아미노산 서열

항체		CDR1	CDR2	CDR3
hu025.021 / hu025.023 / hu025.033 / hu025.059 / hu025.060	HCDR	**SEQ ID NO: 13** DYYMH	**SEQ ID NO: 17** RIDPEDAETKYAPKFQG	**SEQ ID NO: 15** GLAY
	LCDR	**SEQ ID NO: 10** SASSSVSSSYLY	**SEQ ID NO: 11** STSNLAS	**SEQ ID NO: 16** HQWSSYPYT

[0286]

[0287] 표 4. 5개의 인간화 항체의 가변 영역 아미노산 서열

항체	VH	VL
hu025.021	**SEQ ID NO: 63** EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSG FNIKDYYMHWVQQAPGKGLEWIGR IDPEDAETKYAPKFQGRVTITADTSTN TAYMELSSLRSEDTAVYYCDRGLAYW GQGTLVTVSS	**SEQ ID NO: 64** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASS SVSSSYLYWYQQKPGQAPKLWIYST SNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL EPEDFAVYYCHQWSSYPYTFGQGT KLEIK
hu025.023	**SEQ ID NO: 63** EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSG FNIKDYYMHWVQQAPGKGLEWIGR IDPEDAETKYAPKFQGRVTITADTSTN TAYMELSSLRSEDTAVYYCDRGLAYW GQGTLVTVSS	**SEQ ID NO: 66** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASS SVSSSYLYWYQQKPGQAPKLWIYST SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCHQWSSYPYTFGQGT KLEIK
hu025.033	**SEQ ID NO: 65** EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSG FNIKDYYMHWVQQAPGKGLEWIGR IDPEDAETKYAPKFQGRVTITADTSTD TAYMELSSLRSEDTAVYYCDRGLAYW GQGTLVTVSS	**SEQ ID NO: 64** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASS SVSSSYLYWYQQKPGQAPKLWIYST SNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL EPEDFAVYYCHQWSSYPYTFGQGT KLEIK
hu025.059	**SEQ ID NO: 67** EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASG FNIKDYYMHWVQQAPGKGLEWIGR IDPEDAETKYAPKFQGRVTITADTSTN TAYMELSSLRSEDTAVYYCDRGLAYW GQGTLVTVSS	**SEQ ID NO: 64** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASS SVSSSYLYWYQQKPGQAPKLWIYST SNLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISSL EPEDFAVYYCHQWSSYPYTFGQGT KLEIK
hu025.060	**SEQ ID NO: 67** EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKASG FNIKDYYMHWVQQAPGKGLEWIGR IDPEDAETKYAPKFQGRVTITADTSTN TAYMELSSLRSEDTAVYYCDRGLAYW GQGTLVTVSS	**SEQ ID NO: 66** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASS SVSSSYLYWYQQKPGQAPKLWIYST SNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSL EPEDFAVYYCHQWSSYPYTFGQGT KLEIK

[0288]

[0289] 표 5. 5개의 인간화 항체의 FR 아미노산 서열

항체		FR1	FR2	FR3	FR4

[0290]

hu025.021	HFR	**SEQ ID NO: 73** EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCK**V**SGFNIK	**SEQ ID NO: 74** WVQQAPGKGLEWIG	**SEQ ID NO: 75** RVTITADTST**N**TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR	**SEQ ID NO: 76** WGQGTLVTVSS
	LFR	**SEQ ID NO: 77** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	**SEQ ID NO: 78** WYQQKPGQAPKLWIY	**SEQ ID NO: 79** GIPARFSGSGSGTD**Y**TLTISSLEPEDFAVYYC	**SEQ ID NO: 80** FGQGTKLEIK
hu025.023	HFR	**SEQ ID NO: 73** EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCK**V**SGFNIK	**SEQ ID NO: 74** WVQQAPGKGLEWIG	**SEQ ID NO: 75** RVTITADTST**N**TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR	**SEQ ID NO: 76** WGQGTLVTVSS
	LFR	**SEQ ID NO: 77** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	**SEQ ID NO: 78** WYQQKPGQAPKLWIY	**SEQ ID NO: 81** GIPARFSGSGSGTD**F**TLTISSLEPEDFAVYYC	**SEQ ID NO: 80** FGQGTKLEIK
hu025.033	HFR	**SEQ ID NO: 73** EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCK**V**SGFNIK	**SEQ ID NO: 74** WVQQAPGKGLEWIG	**SEQ ID NO: 82** RVTITADTST**D**TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR	**SEQ ID NO: 76** WGQGTLVTVSS
	LFR	**SEQ ID NO: 77** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	**SEQ ID NO: 78** WYQQKPGQAPKLWIY	**SEQ ID NO: 79** GIPARFSGSGSGTD**Y**TLTISSLEPEDFAVYYC	**SEQ ID NO: 80** FGQGTKLEIK
hu025.059	HFR	**SEQ ID NO: 83** EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCK**A**SGFNIK	**SEQ ID NO: 74** WVQQAPGKGLEWIG	**SEQ ID NO: 75** RVTITADTST**N**TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR	**SEQ ID NO: 76** WGQGTLVTVSS
	LFR	**SEQ ID NO: 77** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	**SEQ ID NO: 78** WYQQKPGQAPKLWIY	**SEQ ID NO: 79** GIPARFSGSGSGTD**Y**TLTISSLEPEDFAVYYC	**SEQ ID NO: 80** FGQGTKLEIK
hu025.060	HFR	**SEQ ID NO: 83** EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCK**A**SGFNIK	**SEQ ID NO: 74** WVQQAPGKGLEWIG	**SEQ ID NO: 75** RVTITADTST**N**TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR	**SEQ ID NO: 76** WGQGTLVTVSS
	LFR	**SEQ ID NO: 77** EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	**SEQ ID NO: 78** WYQQKPGQAPKLWIY	**SEQ ID NO: 81** GIPARFSGSGSGTD**F**TLTISSLEPEDFAVYYC	**SEQ ID NO: 80** FGQGTKLEIK
	HFR	**SEQ ID NO: 84** EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCK**X_{20}**SGFNIK		**SEQ ID NO: 85** RVTITADTST**X_{21}**TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR	

[0291]

	LFR			**SEQ ID NO: 86** GIPARFSGSGSGTD**X_{22}**TLTISSLEPEDFAVYYC	

[0292]

[0293] X_{20}은 A 또는 V이고; X_{21}은 N 또는 D이고; X_{22}는 Y 또는 F이다.

[0294] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 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 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 인간 중쇄 HFR1-4 및/또는 경쇄 LFR1-4를 포함한다.

[0295] 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 상

응하는 잔기로 치환된다. 이는 특정 실시양태에서 결합 특징을 최적화하기 위해 (예를 들어, 결합 친화도를 증가시키기 위해) 인간화 항체 또는 그의 단편을 비-인간 모 항체 구조에 밀접하게 근사화하는 데 바람직할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 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 서열 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 쇄에 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 인간 FR 서열의 1개 이상의 아미노산은 결합 친화도를 증가시키기 위해 무작위로 돌연변이된다. 특정 실시양태에서, 인간 FR 서열의 1개 이상의 아미노산은 결합 친화도를 증가시키기 위해 모 비-인간 항체의 상응하는 아미노산(들)으로 복귀 돌연변이된다.

[0296] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKX$_{20}$SGFNIK (서열식별번호: 84)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR1, WVQQAPGKGLEWIG (서열식별번호: 74)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR2, RVTITADTSTX$_{21}$TAYMELSSLRSEDTAVYYCDR (서열식별번호: 85)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 중쇄 HFR3, 및 WGQGTLVTVSS (서열식별번호: 76)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하며, 여기서 X$_{20}$은 A 또는 V이고; X$_{21}$은 N 또는 D인 중쇄 HFR4를 포함하는 인간화 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0297] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (서열식별번호: 77)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR1, WYQQKPGQAPKLWIY (서열식별번호: 78)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR2, GIPARFSGSGSGTDX$_{22}$TLTISSLEPEDFAVYYC (서열식별번호: 86)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하는 경쇄 LFR3, 및 FGQGTKLEIK (서열식별번호: 80)의 서열 또는 그의 적어도 80% 서열 동일성의 상동 서열을 포함하며, 여기서 X$_{22}$는 Y 또는 F인 경쇄 LFR4를 포함하는 인간화 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0298] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 73 및 83으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 HFR1, 서열식별번호: 74의 서열을 포함하는 중쇄 HFR2, 서열식별번호: 75 및 82로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 HFR3, 및 서열식별번호: 76의 서열을 포함하는 중쇄 HFR4; 및/또는 서열식별번호: 77로 이루어진 군으로부터의 서열을 포함하는 경쇄 LFR1, 서열식별번호: 78로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 LFR2, 서열식별번호: 79 및 81로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 LFR3, 및 서열식별번호: 80으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 LFR4를 포함하는 인간화 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 또한 제공한다.

[0299] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 hu025.021-VH/hu025.023-VH (서열식별번호: 63), hu025.033-VH (서열식별번호: 65) 및 hu025.059-VH/hu025.060-VH (서열식별번호: 67)로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 내에 함유된 HFR1, HFR2, HFR3, 및/또는 HFR4 서열을 포함하는 인간화 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0300] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 hu025.021-VL/hu025.033-VL/hu025.059-VL (서열식별번호: 64), 및 hu025.023-VL/hu025.060-VL (서열식별번호: 66)로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 영역 내에 함유된 LFR1, LFR2, LFR3, 및/또는 LFR4 서열을 포함하는 인간화 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0301] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 63, 서열식별번호: 65, 및 서열식별번호: 67로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 가변 도메인 서열; 및/또는 서열식별번호: 64 및 서열식별번호: 66으로 이루어진 군으로부터 선택된 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다.

[0302] 본 개시내용은 또한 하기를 포함하는, 025의 예시적인 인간화 항체를 제공한다:

[0303] 1) 서열식별번호: 63의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 64의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 "hu025.021";

[0304] 2) 서열식별번호: 63의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 66의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 "hu025.023";

[0305] 3) 서열식별번호: 65의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 64의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 "hu025.033";

[0306] 4) 서열식별번호: 67의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 64의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 "hu025.059"; 및

[0307] 5) 서열식별번호: 67의 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 66의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 "hu025.060".

[0308] 이들 예시적인 인간화 항-SIRPα 항체는 SIRPα에 대해 특이적 결합 능력 또는 친화도를 보유하였고, 그러한 측면에서 모 마우스 항체 025와 적어도 대등하거나 또는 심지어 그보다 더 우수하였다. 상세한 정보는 실시예 5.2에 제공된다.

[0309] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 및 항원-결합 단편은 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 및/또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 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).

[0310] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 이뮤노글로불린 (Ig) 불변 영역을 추가로 포함하고, 이는 임의로 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 CH1, 힌지 및/또는 CH2-CH3 영역 (또는 임의로 CH2-CH3-CH4 영역)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 중쇄 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 Cκ 또는 Cλ를 포함한다. 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 불변 영역은 야생형 불변 영역 서열과 동일하거나 또는 1개 이상의 돌연변이에 있어서 상이할 수 있다.

[0311] 특정 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 Fc 영역을 포함한다. Fc 영역은 항체의 이펙터 기능, 예컨대 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC) 및 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 매개하는 것으로 공지되어 있다. 상이한 Ig 이소형의 Fc 영역은 이펙터 기능을 유도하는 상이한 능력을 갖는다. 예를 들어, IgG1 및 IgG3의 Fc 영역은 IgG2 및 IgG4의 것보다 더 효과적으로 ADCC 및 CDC 둘 다를 유도하는 것으로 인식되었다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 및 그의 항원-결합 단편은 ADCC 또는 CDC를 유도할 수 있는 IgG1 또는 IgG3 이소형의 Fc 영역; 또는 대안적으로, 감소되거나 고갈된 이펙터 기능을 갖는 IgG4 또는 IgG2 이소형의 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 야생형 인간 IgG4 Fc 영역 또는 다른 야생형 인간 IgG4 대립유전자를 포함한다.

[0312] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 감소된 이펙터 기능을 갖는다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG1 이소형의 Fc 영역을 포함하고, 이펙터 기능을 감소시키거나 제거하기 위해 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. IgG1에서의 예시적인 이러한 치환(들)은 234, 235, 237, 및 238, 268, 297, 309, 330, 및 331로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 있을 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG1 이소형의 것이고, N297A, N297Q, N297G, L235E, L234A, L235A, L234F, L235E, P331S, 및 그의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0313] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG2 이소형의 것이고, H268Q, V309L, A330S, P331S, V234A, G237A, P238S, H268A, 및 그의 임의의 조합 (예를 들어 H268Q/V309L/A330S/P331S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S)으로 이루어진 군으로부터 선택된, 이펙터 기능을 감소시키거나 제거하기 위한 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0314] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG4 이소형의 것이고, 이펙터 기능을 감소시키거나 제거하기 위한 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. IgG4에서의 예시적인 이러한 치환(들)은 228, 234, 235,237, 238, 265, 297, 322, 329 및 331로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 있을 수 있다. 이러한 치환(들)의 예는 비제한적으로 S228P, L235E, L234A, L235A, N297A, N297Q, N297G, P329G, K322Q, P331S, D265A, G237A, P238S 및 그의 임의의 조합을 포함한다.

[0315] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 및 항원-결합 단편은 IgG4 이소형의 것이고, 228 및 235 중 1개 이상의 지점에서 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 및 항원-결합 단편은 IgG4 이소형의 것이고, Fc 영역에서 S228P 돌연변이를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 및 항원-결합 단편은 IgG4 이소형의 것이고, Fc 영역에서 L235E 돌연변이를 포함한다.

[0316] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG2/IgG4 교차 이소형의 것이다. IgG2/IgG4 교차 이소형의 예는 문헌 [Rother RP et al., Nat Biotechnol 25:1256-1264 (2007)]에 기재되

어 있다.

[0317] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 진단 및/또는 치료 용도를 제공하기에 충분한 인간 SIRPα에 대한 특이적 결합 친화도를 갖는다.

[0318] 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 이중특이적 항체, 다중-특이적 항체, 표지된 항체, 2가 항체, 항-이디오타입 항체 또는 융합 단백질일 수 있다. 재조합 항체는 동물에서보다는 재조합 방법을 사용하여 시험관내에서 제조된 항체이다.

[0319] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0320] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 53의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 54의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0321] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 55의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 56의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0322] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 61의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 62의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 인간 SIRPα에의 결합에 대해 경쟁하는 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0323] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 HEFLB 또는 hu1H9G4가 결합하는 것과 상이한 에피토프에 결합하는 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0324] 본원에 사용된 "HEFLB"는 서열식별번호: 68의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 69의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0325] 본원에 사용된 "hu1H9G4"는 서열식별번호: 70의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 71의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0326] 표 6은 HEFLB 및 hu1H9G4의 VH 및 VL 아미노산 서열을 보여준다.

[0327] 표 6. HEFLB 및 hu1H9G4의 가변 영역 아미노산 서열

[0328]

항체	VH	VL
HEFLB	SEQ ID NO: 68 EVQLVQSGAEVKKPGESLRISC KASGYSFTSYWVHWVRQMPG KGLEWMGNIDPSDSDTHYSPSF QGHVTLSVDKSISTAYLQLSSL KASDTAMYYCVRGGTGTLAYF AYWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 69 DVVMTQSPLSLPVTLGQPASI SCRSSQSLVHSYGNTYLYWF QQRPGQSPRLLIYRVSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCFQGTHVPYT FGGGTKVEIK
hu1H9G4	SEQ ID NO: 70 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWITWVKQAPG QGLEWIGDIYPGSGSTNHIEKF KSKATLTVDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCATGYGSSYGYFD YWGQGTLVTVSS	SEQ ID NO: 71 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASENIYSYLAWYQQKPG KAPKLLIYTAKTLAEGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQHQYGPPFTFGQGTK LEIK

[0329] 항체 변이체

[0330] 본원에 제공된 항체 및 그의 항원-결합 단편은 또한 본원에 제공된 항체 서열의 다양한 변이체를 포괄한다.

[0331] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 상기 표 1 및 3에 제공된 바와 같은 CDR 서열 중 1개 이상, 상기 표 2 및 4에 제공된 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 비-CDR 서열 중 1개 이상, 및/또는 불변 영역 (예를 들어 Fc

영역)에서 1개 이상의 변형 또는 치환을 포함한다. 이러한 변이체는 그의 모 항체의 SIRPα에 대한 결합 특이성을 보유하지만, 변형(들) 또는 치환(들)에 의해 부여되는 1가지 이상의 바람직한 특성을 갖는다. 예를 들어, 항체 변이체는 개선된 항원-결합 친화도, 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.

[0332] 모 항체 서열은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"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.

[0333] 친화도 변이체

[0334] 항체의 친화도 변이체는 상기 표 1 및 3에 제공된 바와 같은 1개 이상의 CDR 서열, 상기 표 5에 제공된 바와 같은 1개 이상의 FR 서열, 또는 상기 표 2 및 4에 제공된 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열에서 변형 또는 치환을 함유할 수 있다. CDR 영역이 가변 영역에서 2개의 FR 영역과 플랭킹되어 있다는 것이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있기 때문에, FR 서열은 상기 표 1 및 3의 CDR 서열 및 상기 표 2 및 4의 가변 영역 서열에 기초하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 확인될 수 있다. 친화도 변이체는 모 항체의 SIRPα에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하거나, 또는 심지어 모 항체에 비해 개선된 SIRPα 특이적 결합 친화도를 갖는다. 특정 실시양태에서, CDR 서열, FR 서열 또는 가변 영역 서열에서의 치환(들) 중 적어도 1개 (또는 모두)는 보존적 치환을 포함한다.

[0335] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 표 1 및 3에 제공된 CDR 서열, 및 상기 표 2 및 4에 제공된 가변 영역 서열에서 1개 이상의 아미노산 잔기가 치환될 수 있지만, 생성된 항체 또는 항원-결합 단편은 SIRPα에 대한 결합 친화도 또는 결합 능력을 여전히 보유하거나, 또는 심지어 개선된 결합 친화도 또는 능력을 갖는다는 것을 이해할 것이다. 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법을 사용하여 이러한 목적을 달성할 수 있다. 예를 들어, 항체 변이체 (예컨대 Fab 또는 scFv 변이체)의 라이브러리를 생성하고, 파지 디스플레이 기술에 의해 발현시킨 다음, 인간 SIRPα에 대한 결합 친화도에 대해 스크리닝할 수 있다. 또 다른 예로, 인간 SIRPα에 대한 항체의 결합을 실질적으로 시뮬레이션하고, 결합 계면을 형성하는 항체 상의 아미노산 잔기를 확인하기 위해 컴퓨터 소프트웨어가 사용될 수 있다. 이러한 잔기는 결합 친화도의 감소를 방지하기 위해 치환에서 회피될 수 있거나, 또는 보다 강한 결합을 제공하기 위해 치환을 위해 표적화될 수 있다.

[0336] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 인간화 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 CDR 서열 중 1개 이상 및/또는 FR 서열 중 1개 이상에서 1개 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 친화도 변이체는 CDR 서열 및/또는 FR 서열에서 총 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 치환을 포함한다.

[0337] 특정 실시양태에서, 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 상기 표 1 및 3에 열거된 것 (또는 것들)에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖지만 SIRPα에 대한 특이적 결합 친화도를 그의 모 항체와 유사하거나 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준으로 보유하는 1, 2, 또는 3개의 CDR 서열을 포함한다.

[0338] 특정 실시양태에서, 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 상기 표 2 및 4에 열거된 것 (또는 것들)에 대해 적어도 80% (예를 들어 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖지만 SIRPα에 대한 특이적 결합 친화도를 그의 모 항체와 유사하거나 또는 그보다 훨씬 더 높은 수준으로 보유하는 1개 이상의 가변 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 표 2 및 4에 열거된 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.

[0339] 글리코실화 변이체

[0340] 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 또한 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 글리코실화 정도를 증가 또는 감소시키기 위해 수득될 수 있는 글리코실화 변이체를 포괄한다.

[0341] 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 글리코실화 부위를 도입하거나 제거하는 1개 이상의 변형을 포함할 수 있다. 글리코실화 부위는 탄수화물 모이어티 (예를 들어 올리고사카라이드 구조)가 부착될 수 있는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기이다. 항체의 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.

[0342] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 및 항원-결합 단편은 글리코실화 부위를 제거하기 위해 N297에서 돌연변이 (예를 들어 N297A, N297Q 또는 N297G)를 포함한다.

[0343] 시스테인-조작된 변이체

[0344] 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 또한 1개 이상의 도입된 유리 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 시스테인-조작 변이체를 포괄한다.

[0345] 유리 시스테인 잔기는 디술피드 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 또는 그의 항원-결합 단편을 조작하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 WO2006/034488을 참조한다.

[0346] Fc 변이체

[0347] 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 또한, 예를 들어 변경된 이펙터 기능 예컨대 ADCC 및 CDC를 제공하기 위해 Fc 영역 및/또는 힌지 영역에 1개 이상의 아미노산 잔기 변형 또는 치환을 포함하는 Fc 변이체를 포괄한다. 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.

[0348] 본원에 제공된 항체 또는 항원-결합 단편의 CDC 활성은 또한, 예를 들어 C1q 결합 및/또는 CDC를 개선 또는 감소시킴으로써 변경될 수 있다 (예를 들어, Fc 영역 변이체의 다른 예에 관한 WO99/51642; 문헌 [Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO94/29351 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).

[0349] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소형의 것일 수 있고, 본원에 개시된 바와 같은 감소된 이펙터 기능을 갖는다.

[0350] 특정 실시양태에서, 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 네오나탈 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 pH-의존적 결합을 개선시키는 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 또는 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); 및 Hinton, P. et al., J. Immunology, 176:346-356 (2006)]을 참조한다.

[0351] 특정 실시양태에서, 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 이종이량체화를 용이하게 하고/거나 촉진하기 위해 Fc 영역의 계면 내에 1개 이상의 아미노산 치환(들)을 포함한다. 이들 변형은 제1 Fc 폴리펩티드 내로의 돌출부 및 제2 Fc 폴리펩티드 내로의 공동의 도입을 포함하며, 여기서 돌출부는 공동 내에 위치하여 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 상호작용을 촉진하여 이종이량체 또는 복합체를 형성하도록 할 수 있다. 이들 변형을 갖는 항체를 생성하는 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,731,168에 기재된 바와 같이 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0352] 항원-결합 단편

[0353] 항-SIRPα 항원-결합 단편이 또한 본원에 제공된다. 다양한 유형의 항원-결합 단편이 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 CDR이 상기 표 1 및 3에 제시되어 있고 가변 서열이 상기 표 2 및 4에 제시되어 있는 예시적인 항체 및 그의 상이한 변이체 (예컨대 친화도 변이체, 글리코실화 변이체, Fc 변이체, 시스테인-조작 변이체 등)를 포함한, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체에 기초하여 개발될 수 있다.

[0354] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항원-결합 단편은 디아바디, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, Fv 단편, 디술피드 안정화된 Fv 단편 (dsFv), $(dsFv)_2$, 이중특이적 dsFv (dsFv-dsFv'), 디술피드 안정화된 디아바디 (ds 디아바디), 단일-쇄 항체 분자 (scFv), scFv 이량체 (2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체이다.

[0355] 다양한 기술이 이러한 항원-결합 단편의 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), 상기 논의된 바와 같은 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 스크리닝 (예를 들어, ScFv의 경우) 및 $F(ab')_2$ 단편을 형성하기 위한 2개의 Fab'-SH 단편의 화학적 커플링 (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))을 포함한다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0356] 특정 실시양태에서, 항원-결합 단편은 scFv이다. scFv의 생성은 예를 들어 WO 93/16185; 미국 특허 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).

[0357] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 2가, 4가, 6가 또는 다가이다. 2가 초과의 임의의 분자는, 예를 들어 3가, 4가, 6가 등을 포괄한 다가로 간주된다.

[0358] 2가 분자는 2개의 결합 부위가 둘 다 동일한 항원 또는 동일한 에피토프에 대한 결합에 대해 특이적인 경우에 단일특이적일 수 있다. 이는, 특정 실시양태에서, 1가 대응물보다 항원 또는 에피토프에 대한 더 강한 결합을 제공한다. 유사하게, 다가 분자도 또한 단일특이적일 수 있다. 특정 실시양태에서, 2가 또는 다가 항원-결합 모이어티에서, 결합 부위의 제1 가 및 결합 부위의 제2 가는 구조적으로 동일하거나 (즉, 동일한 서열을 가짐), 또는 구조적으로 상이하다 (즉, 동일한 특이성을 갖지만 상이한 서열을 가짐).

[0359] 2개의 결합 부위가 상이한 항원 또는 에피토프에 대해 특이적인 경우, 2가는 또한 이중특이적일 수 있다. 이는 또한 다가 분자에 적용된다. 예를 들어, 3가 분자는 2개의 결합 부위가 제1 항원 (또는 에피토프)에 단일특이적이고 제3 결합 부위가 제2 항원 (또는 에피토프)에 특이적인 경우에 이중특이적일 수 있다.

[0360] 이중특이적 항체

[0361] 특정 실시양태에서, 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 이중특이적이다.

[0362] 특정 실시양태에서, 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SIRPα 이외의 제2 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제2 항원은 종양 항원, 종양 표면 항원, 또는 감염원 표면 항원이다. 특정 실시양태에서, 제2 항원은 CD19, CD20, CD22, CD24, CD25, CD30, CD33, CD38, CD44, CD52, CD56, CD70, CD96, CD97, CD99, CD123, CD279 (PD-1), CD274 (PD-L1), GPC-3, B7-H3, B7-H4, TROP2, CLDN18.2, EGFR, HER2, CD117, C-Met, PTHR2 및 HAVCR2 (TIM3)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0363] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 이중특이적 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SIRPα 상의 제2 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0364] 접합체

[0365] 일부 실시양태에서, 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 1개 이상의 접합 모이어티를 추가로 포함한다. 접합 모이어티는 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 연결될 수 있다. 접합 모이어티는 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 부착될 수 있는 모이어티이다. 다양한 접합 모이어티가 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 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 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 링커를 통해 1개 이상의 접합체에 연결될 수 있다.

[0366] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 1개 이상의 접합 모이어티에 대한 결합에 이용될 수 있는 에피토프 결합 부분 외에 특이적 부위를 함유하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 이러한 부위는 접합 모이어티에 대한 공유 연결을 용이하게 하기 위해 1개 이상의 반응성 아미노산 잔기, 예컨대 예를 들어 시스테인 또는 히스티딘 잔기를 포함할 수 있다.

[0367] 특정 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 접합 모이어티에 간접적으로, 또는 또 다른 접합 모이어티를 통해 연결될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 비오틴에 접합된 다음, 아비딘에 접합된 제2 접합체에 간접적으로 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 클리어런스-변형제 (예를 들어 반감기를 연장시키는 중합체, 예컨대 PEG), 화학요법제, 독소, 방사성 동위원소, 란타나이드, 검출가능한 표지 (예를 들어 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지), DNA-알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜불린-결합제, 정제 모이어티 또는 다른 항암 약물을 포함한다.

[0368] "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, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신 및 그의 유사체, 항대사물 (예를 들어, 메토트렉세이트, 6-메르캅토퓨린, 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 튜불린-결합제를 포함한다.

[0369] 검출가능한 표지의 예는 형광 표지 (예를 들어 플루오레세인, 로다민, 단실, 피코에리트린, 또는 텍사스 레드), 효소-기질 표지 (예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 루시페라제, 글루코아밀라제, 리소자임, 사카라이드 옥시다제 또는 β-D-갈락토시다제), 방사성동위원소 (예를 들어 ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, ^{3}H, ^{111}In, ^{112}In, ^{14}C, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{86}Y, ^{88}Y, ^{90}Y, ^{177}Lu, ^{211}At, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, 및 ^{32}P, 다른 란타나이드), 발광 표지, 발색단 모이어티, 디곡시게닌, 비오틴/아비딘, DNA 분자 또는 검출용 금을 포함할 수 있다.

[0370] 특정 실시양태에서, 접합 모이어티는 항체의 반감기를 증가시키는 것을 돕는 클리어런스-변형제일 수 있다. 예시적인 예는 수용성 중합체, 예컨대 PEG, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체 등을 포함한다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착되는 중합체의 수는 다양할 수 있고, 1개 초과의 중합체가 부착되는 경우에, 이는 동일하거나 상이한 분자일 수 있다.

[0371] 특정 실시양태에서, 접합 모이어티는 정제 모이어티, 예컨대 자기 비드일 수 있다.

[0372] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 접합체를 위한 베이스로서 사용된다.

[0373] 폴리뉴클레오티드 및 재조합 방법

[0374] 본 개시내용은 본원에 제공된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본원에 사용된 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 및 그의 중합체를 지칭한다. 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).

[0375] 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열분석된다. 코딩 DNA는 또한 합성 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0376] 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드는 추가의 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해, 관련 기술분야에 공지된 재조합 기술을 사용하여 벡터 내로 삽입될 수 있다. 많은 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 1개 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 (예를 들어 SV40, CMV, EF-1α), 및 전사 종결 서열 중 1개 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0377] 본 개시내용은 본원에 제공된 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 1개의 프로모터 (예를 들어 SV40, CMV, EF-1α), 및 적어도 1개의 선택 마커를 코딩한다. 벡터의 예는 레트로바이러스 (렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스 (예를 들어, 단순 포진 바이러스), 폭스바이러스, 바큘로바이러스, 유두종바이러스, 파포바바이러스 (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.

[0378] 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 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.

[0379] 원핵생물에 더하여, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모가 항-SIRPα 항체-코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미세스 세레비지아에(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. 드로소필라룸(K. drosophilarum) (ATCC 36,906), 케이. 써모톨레란스(K. thermotolerans), 및 케이. 마르시아누스(K. marxianus); 야로위아(yarrowia) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(Pichia pastoris) (EP 183,070); 칸디다(Candida); 트리코더마 레에시아(Trichoderma reesia) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa); 슈완니오미세스(Schwanniomyces) 예컨대 슈완니오미세스 옥시덴탈리스(Schwanniomyces occidentalis); 및 사상 진균 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.

[0380] 본원에 제공된 글리코실화된 항체 또는 그의 항원-단편의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) (모충), 아에데스 아에깁티(Aedes aegypti) (모기), 아에데스 알보픽투스(Aedes albopictus) (모

기), 드로소필라 멜라노가스터(Drosophila melanogaster) (과실파리), 및 봄빅스 모리(Bombyx mori)와 같은 숙주로부터의 수많은 바큘로바이러스 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.

[0381] 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); 차이니즈 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 실시양태에서, 숙주 세포는 포유동물 배양된 세포주, 예컨대 CHO, BHK, NS0, 293 및 그의 유도체이다.

[0382] 숙주 세포는 항-SIRPα 항체 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, 항체는 관련 기술분야에 공지된 상동 재조합에 의해 생산될 수 있다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 생산할 수 있다.

[0383] 본 개시내용은 또한 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 발현시키는 방법을 제공하며, 이는 본 개시내용의 벡터가 발현되는 조건 하에 본원에 제공된 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다. 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 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)™ 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, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0384] 재조합 기술을 사용할 때, 항체는 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 페닐메틸술포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재 하에 약 30분에 걸쳐 해동시킨다. 세포 파편은 원심분리에 의해 제거할 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우에, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 일반적으로 먼저 상업적으로 입수가능한 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.

[0385] 세포로부터 제조된 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편은, 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.

[0386] 특정 실시양태에서, 고체 상에 고정된 단백질 A는 항체 및 그의 항원-결합 단편의 면역친화성 정제에 사용된다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 종 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. 항체가 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, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전이 또한 회수될 항체에 따라 이용가능하다.

[0387] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 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.

[0388] 제약 조성물

[0389] 본 개시내용은 추가로 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0390] 본원에 개시된 제약 조성물에 사용하기 위한 제약상 허용되는 담체는, 예를 들어 제약상 허용되는 액체, 겔 또는 고체 담체, 수성 비히클, 비수성 비히클, 항미생물제, 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.

[0391] 적합한 성분은, 예를 들어 항산화제, 충전제, 결합제, 붕해제, 완충제, 보존제, 윤활제, 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 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 접합체를 포함하는 조성물 중 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌의 포함은 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 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 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌을 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 항체 또는 항원-결합 단편을 1종 이상의 항산화제, 예컨대 메티오닌과 혼합함으로써 본원에 제공된 항체 또는 항원-결합 단편의 산화를 방지하고/거나, 그의 보관 수명을 연장시키고/거나, 그의 효능을 개선시키는 방법이 추가로 제공된다.

[0392] 추가로 예시하기 위해, 제약상 허용되는 담체는, 예를 들어 수성 비히클, 예컨대 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 등장성 덱스트로스 주사액, 멸균수 주사액, 또는 덱스트로스 및 락테이트화 링거 주사액, 비수성 비히클, 예컨대 식물성 기원의 고정 오일, 목화씨 오일, 옥수수 오일, 참깨 오일, 또는 땅콩 오일, 정박테리아 또는 정진균 농도의 항미생물제, 등장화제, 예컨대 염화나트륨 또는 덱스트로스, 완충제, 예컨대 포스페이트 또는 시트레이트 완충제, 항산화제, 예컨대 중황산나트륨, 국부 마취제, 예컨대 프로카인 히드로클로라이드, 현탁화제 및 분산제, 예컨대 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 또는 폴리비닐피롤리돈, 유화제, 예컨대 폴리소르베이트 80 (트윈-80), 격리제 또는 킬레이트화제, 예컨대 EDTA (에틸렌디아민테트라아세트산) 또는 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, 덱스트로스, 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 모노라

우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트 또는 시클로덱스트린을 포함할 수 있다.

[0393] 제약 조성물은 액체 용액, 현탁액, 에멀젼, 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.

[0394] 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 주사가능한 조성물로 제제화된다. 주사가능한 제약 조성물은 임의의 통상적인 형태, 예컨대 예를 들어 액체 용액, 현탁액, 에멀젼, 또는 액체 용액, 현탁액 또는 에멀젼을 생성하는 데 적합한 고체 형태로 제조될 수 있다. 주사용 제제는 주사용으로 준비된 멸균 및/또는 비-발열성 용액, 멸균 건조 가용성 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 에멀젼을 포함할 수 있다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0395] 특정 실시양태에서, 단위-용량 비경구 제제는 앰플, 바이알 또는 바늘을 갖는 시린지 내에 포장된다. 비경구 투여를 위한 모든 제제는, 관련 기술분야에 공지되어 있고 실시되는 바와 같이 멸균성이어야 하고 발열성이 아니어야 한다.

[0396] 특정 실시양태에서, 멸균 동결건조된 분말은 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 항원-결합 단편을 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, 덱스트로스, 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 항-SIRPα 항체 또는 그의 항원-결합 단편 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℃ 내지 실온에서 저장될 수 있다.

[0397] 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.

[0398] 키트

[0399] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 키트를 제공한다.

[0400] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원에 결합하는 표적 항체를 포함하는 키트를 제공한다. 특정 실시양태에서, 표적 세포는 CD47을 발현하는 종양 세포, 염증 세포, 및/또는 만성 감염 세포일 수 있다.

[0401] 특정 실시양태에서, 표적 항원은 종양 항원, 종양 표면 항원, 또는 감염원 표면 항원이다.

[0402] 특정 실시양태에서, 키트는 추가의 치료제를 추가로 포함한다. 추가의 치료제는 항암 치료제, 항염증제 또는 항감염제일 수 있다.

[0403] 특정 실시양태에서, 추가의 치료제는 화학요법제, 항암 약물, 방사선 요법, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적화 요법, 세포 요법, 유전자 요법, 호르몬 요법, 항바이러스제, 항생제, 진통제, 항산화제, 금속 킬레이트화제 및 시토카인으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0404] 이러한 키트는, 원하는 경우에, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 바와 같은, 다양한 통상적인 제약 키트 성분 중 1종 이상, 예컨대 예를 들어 1종 이상의 제약상 허용되는 담체를 갖는 용기, 추가의 용기 등을 추가로 포함할 수 있다. 투여될 성분의 양, 투여를 위한 가이드라인 및/또는 성분을 혼합하는 것에 대한 가이드라인을 나타내는 삽입물 또는 라벨로서의 지침서가 또한 키트에 포함될 수 있다.

[0405] 사용 방법

[0406] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 시험관내에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 방법을 제공하며, 이는 본

원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 존재 하에 표적 세포를 SIRPα 양성 식세포작용 세포 샘플과 접촉시켜 SIRPα 양성 식세포작용 세포에 의한 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 것을 포함한다.

[0407] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 시험관내에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 방법을 제공하며, 이는 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체의 존재 하에 표적 세포를 SIRPα 양성 식세포작용 세포 샘플과 접촉시켜 SIRPα 양성 식세포작용 세포에 의한 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 것을 포함한다.

[0408] 일부 실시양태에서, 표적 세포는 CD47 발현 세포이다.

[0409] 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 데 효과적인 용량으로 투여하는 것을 포함한다.

[0410] 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을, 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체와 조합하여, 표적 세포의 식세포작용을 유도하는 데 효과적인 용량으로 투여하는 것을 포함한다.

[0411] 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 표적 세포에 대한 표적 항체의 항체-의존성 세포성 식세포작용 (ADCP) 효과를 증가시키는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 Fc 영역을 갖는 표적 항체와 조합하여 투여하여 표적 세포 상의 표적 항체의 ADCP를 증가시키는 것을 포함하고, 여기서 표적 항체는 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원에 결합한다. 특정 실시양태에서, 표적 항체는 표적 세포 상에서 발현된 표적 항원에 결합하고, 표적 세포에 대한 표적 항체의 ADCP 효과가 증가된다. 표적 세포는 CD47을 발현하는 종양 세포, 염증 세포, 및/또는 만성 감염 세포일 수 있다.

[0412] 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 데 있어서 표적 항체 (예를 들어, 항-CD20 항체, 항-PD-L1 항체 및 항-클라우딘18.2 항체)를 강화시키는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 표적 항체 (예를 들어, 항-CD20 항체, 항-PD-L1 항체 및 항-클라우딘18.2 항체)와 조합하여 투여하여 대상체에서 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 데 있어서 표적 항체를 강화시키는 것을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "강화시키다" 또는 "강화시키는"은 치료 효능을 증가시키는 것을 지칭한다.

[0413] 특정 실시양태에서, 표적 항체는 Fc 영역을 갖는다. 특정 실시양태에서, 질환, 장애 또는 상태는 면역 관련 질환 또는 장애, 종양 및 암, 자가면역 질환, 또는 감염성 질환이다. 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.

[0414] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에 의해 치료가능한 상태 또는 장애는 종양 및 암을 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, 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, 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, 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 전이를 포함한다.

[0415] 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 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0416] 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 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을, 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0417] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0418] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 상기 대상체에게 치료 유효량의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을, SIRPα 관련 질환과 연관된 표적 세포 상의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 표적 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0419] 일부 실시양태에서, 표적 세포는 CD47 발현 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 암 세포, 염증 세포, 및/또는 만성 감염 세포를 포함한다.

[0420] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 표적 항체와 조합되어 사용되는 경우에, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 비-표적 세포 (예를 들어 표적 항원을 발현하지 않는 것)에 비해 표적 세포의 선택적 식세포작용을 유도할 수 있다.

[0421] 일부 실시양태에서, 표적 세포는 표적 항원을 발현한다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 종양 항원, 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.

[0422] 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 SIRPα v1에 대해 동형접합이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 SIRPα v2에 대해 동형접합이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 이형접합 SIRPα v1/v2이다.

[0423] 일부 실시양태에서, 대상체는 암, 고형 종양, 만성 감염, 염증성 질환, 다발성 경화증, 자가면역 질환, 신경계 질환, 뇌 손상, 신경 손상, 다혈구혈증, 혈색소증, 외상, 패혈성 쇼크, 섬유증, 아테롬성동맥경화증, 비만, 제II형 당뇨병, 이식 기능장애, 또는 관절염으로 이루어진 군으로부터 선택된 질환, 장애 또는 상태를 갖는다.

[0424] 일부 실시양태에서, 암은 CD47-양성 암이다. 일부 실시양태에서, 치료될 대상체는 CD47-양성 암을 갖는 것으로 확인되었다. 본원에 사용된 "CD47-양성" 암은 암 세포에서 CD47 단백질을 발현하거나, 또는 정상 세포에서 예상되는 것보다 유의하게 더 높은 수준으로 암 세포에서 CD47을 발현하는 것을 특징으로 하는 암을 지칭한다. 관심 생물학적 샘플에서의 CD47의 존재 및/또는 양은 생물학적 샘플이 유래된 대상체가 항-SIRPα 항체에 반응할 가능성이 있는지 나타낼 수 있다. 대상체로부터의 시험 생물학적 샘플에서 CD47의 존재 및/또는 양을 결정하기 위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 시험 생물학적 샘플은 발현된 CD47 단백질에 결합하고 이를 검출하는 항-CD47 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 노출될 수 있다. 대안적으로, CD47은 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 CD47의 존재 또는 상향조절된 수준은 반응성의 가능성을 나타낸다. 본원에 사용된 용어 "상향조절된"은 동일한 방법을 사용하여 검출된 바와 같은 참조 샘플에서의 CD47 발현 수준과 비교하여 시험 샘플에서의 CD47의 발현 수준의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 이상 또는 그 초과의 전반적 증가를 지칭한다. 참조 샘플은 건강한 또는 비-이환 개체로부터 수득된 대조군 샘플, 또는 시험 샘플이 수득된 동일한 개체로부터 수득된 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. 참조 수준은 또 다른 유전자 (예를 들어 하우스 키핑 유전자)의 발현 수준에 대해 임의로 정규화된, 동일

한 조직 유형의 정상 세포에서 발견되는 CD47 발현의 수준일 수 있다. 대안적으로, 참조 수준은 건강한 대상체에서 발견되는 CD47 발현의 수준일 수 있다. 참조 샘플은 건강한 또는 비-이환 개체로부터 수득된 대조군 샘플, 또는 시험 샘플이 수득된 동일한 개체로부터 수득된 건강한 또는 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.

[0425] 특정의 이들 실시양태에서, 표적 항체 또는 1종 이상의 추가의 치료제와 조합되어 투여되는 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 표적 항체 또는 1종 이상의 추가의 치료제와 동시에 투여될 수 있고, 특정의 이들 실시양태에서 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 표적 항체 또는 추가의 치료제(들)는 동일한 제약 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 그러나, 표적 항체 또는 추가의 치료제와 "조합되어" 투여되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 작용제와 동시에 또는 그와 동일한 조성물로 투여되어야 하는 것은 아니다. 표적 항체 또는 또 다른 작용제 전에 또는 그 후에 투여되는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은, 항체 또는 항원-결합 단편 및 표적 항체 또는 제2 작용제가 상이한 경로를 통해 투여되는 경우에도, 어구가 본원에 사용된 바와 같이 그러한 작용제와 "조합되어" 투여되는 것으로 간주된다. 가능한 경우에, 본원에 개시된 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 조합되어 투여되는 표적 항체 또는 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.

[0426] 또 다른 측면에서, 대상체에서 SIRPα 활성의 조정으로부터 이익을 얻을 질환, 장애 또는 상태를 치료하는 방법이 제공되며, 이는 치료 유효량의 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및/또는 본원에 제공된 제약 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 상태는 SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태이다.

[0427] 본원에 제공된 항체 또는 항원-결합 단편의 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 요건에 의해 지시되는 바와 같이 관련 기술분야의 통상의 기술자 (예를 들어, 의사 또는 수의사)에 의해 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다.

[0428] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 항원-결합 단편은 약 0.01 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 치료 유효 투여량으로 투여될 수 있다. 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.

[0429] 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.

[0430] 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 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.

[0431] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 단독으로 또는 치료 유효량의 추가의 치료제와 조합되어 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 추가의 치료제, 예를 들어 화학요법제, 항암 약물, 방사선 요법, 면역요법제, 항혈관신생제, 표적화 요법, 세포 요법, 유전자 요법, 호르몬 요법, 항바이러스제, 항생제, 진통제, 항산화제, 금속 킬레이트화제 또는 시토카인과 조합되어 투여될 수 있다.

[0432] 본원에 사용된 용어 "면역요법"은 질환, 예컨대 암과 싸우도록 면역계를 자극하거나 또는 일반적인 방식으로 면역계를 부스팅하는 유형의 요법을 지칭한다. 면역요법의 예는, 비제한적으로, 체크포인트 조정제, 입양 세포 전달, 시토카인, 종양용해 바이러스 및 치료 백신을 포함한다.

[0433] "표적화 요법"은 암과 연관된 특이적 분자, 예컨대 암 세포에 존재하지만 정상 세포에는 존재하지 않거나 또는 암 세포에 보다 풍부한 특이적 단백질, 또는 암 성장 및 생존에 기여하는 암 미세환경 내의 표적 분자에 대해 작용하는 유형의 요법이다. 표적화된 요법은 치료제를 종양에 표적화함으로써, 정상 조직이 치료제의 효과를

받지 않게 한다.

[0434] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 추가로 SIRPα-양성 세포에서 SIRPα 활성을 조정하는 방법을 제공하며, 이는 SIRPα-양성 세포를 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 노출시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, SIRPα-양성 세포는 식세포작용 세포 (예를 들어 대식세포)이다.

[0435] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 샘플에서 SIRPα의 존재 또는 양을 검출하는 방법을 제공하며, 이는 샘플을 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키고, 샘플에서 SIRPα의 존재 또는 양을 결정하는 것을 포함한다.

[0436] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태를 진단하는 방법을 제공하며, 이는 a) 대상체로부터 수득된 샘플을 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; b) 샘플에서 SIRPα의 존재 또는 양을 결정하는 단계; 및 c) SIRPα의 존재 또는 양을 대상체에서의 SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태의 존재 또는 상태와 상관시키는 단계를 포함한다.

[0437] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태를 검출하는 데 유용한, 임의로 검출가능한 모이어티와 접합된, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 사용에 대한 지침서를 추가로 포함할 수 있다.

[0438] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태를 치료, 예방 또는 완화하기 위한 의약의 제조에서의, SIRPα 관련 질환, 장애 또는 상태를 진단하기 위한 진단 시약의 제조에서의, 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 용도를 제공한다.

[0439] 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 발명의 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.

[0440] 실시예:

[0441] 실시예 1. 시약 생성

[0442] 1.1 참조 항체 생성

[0443] 항-SIRPα 참조 항체 HEFLB (US20140242095 참조), 또는 hu1H9G4 (WO2019/023347A1 참조)의 가변 영역을 코딩하는 DNA 서열을 인간 IgG 불변 영역을 발현하는 벡터 내로 클로닝하였다. HEFLB 및 hu1H9G4의 가변 영역 아미노산 서열은 본 개시내용의 표 6에 제시된다. 발현 플라스미드 형질감염된 Expi293 세포 (인비트로젠(Invitrogen))를 37℃에서 5일 동안 배양하였다. 이어서, 배양 배지를 수집하고, 원심분리하여 세포 펠릿을 제거하였다. 수거한 상청액을 단백질 A 친화성 크로마토그래피 칼럼을 사용하여 정제하였다. HEFLB 및 hu1H9G4는 둘 다 불변 영역에서 S228P 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 모노클로날 항체이다.

[0444] 1.2. SIRPα, SIRPβ 및 SIRPγ 안정적 발현 세포주 생성

[0445] 전장 인간 SIRPα v1 (NP_542970), 인간 SIRPβ (O00241), 시노 SIRPα (NP_001271679), 또는 C57BL/6 마우스 SIRPα (NP_031573)를 코딩하는 DNA 서열을 각각 pIRES 벡터 (클론테크(Clontech)) 내로 클로닝하였다. 인간 SIRPγ (Q9P1W8) 발현 플라스미드를 시노 바이올로지칼(Sino Biological)로부터 구입하였다 (HG16111-CF).

[0446] 인간 SIRPα v1 또는 인간 SIRPγ 발현 플라스미드로 형질감염된 293F 세포 (인비트로젠)를 선택적으로 배양하고, 안정한 클론을 수득하고, 확인하였다.

[0447] 유사한 방식으로, 인간 SIRPα v1, 인간 SIRPβ, 시노 SIRPα 또는 C57BL/6 마우스 SIRPα 발현 플라스미드로 형질감염된 CHOK1 세포 (인비트로젠)를 선택적으로 배양하고, 안정한 클론을 수득하고, 확인하였다.

[0448] 외인성 인간 SIRPα v2 (CAA71403.1)를 안정하게 발현하는 CHOK1 세포주를 키인노(KYinno)로부터 구입하였다 (KC-1720).

[0449] 1.3. 재조합 단백질 생성

[0450] 인간 IgG Fc (hFc) 태그부착된 인간 CD47 세포외 도메인 (ECD, NP_001768.1, M1-E141), 인간 SIRPα v1 ECD (NP_542970, M1-R370), 인간 SIRPα v2 ECD (CAA71403.1, M1-R369), 또는 인간 SIRPγ ECD (Q9P1W8, M1-P360)의 재조합 단백질은 켐파트너(Chempartner)에 의해 생성되었다. 6xHis 태그부착된 C57BL/6 마우스 SIRPα ECD, 인간 SIRPβL ECD (NP_001129316.1) 및 마우스 인간 IgG Fc (mFc) 태그부착된 인간 CD47 ECD, 인간 SIRPα v1의 재조합 단백질은 바이오인트론(Biointron)으로부터 구입하였다. 6xHis 태그부착된 인간 SIRPα v1 ECD, 인간 SIRPα v2 ECD, 인간 SIRPβ ECD (O00241)의 재조합 단백질은 시노 바이올로지칼로부터 구입하였다.

[0451] 실시예 2. 항체 생성

[0452] 2.1. 단백질 면역화를 위한 면역원의 제조

[0453] hFc 태그부착된 인간 SIRPα v1 ECD 재조합 단백질을 단백질 면역화를 위한 면역원으로서 사용하였다 (실시예 1.3 참조).

[0454] 2.2. 세포 면역화를 위한 면역원의 제조

[0455] 인간 SIRPα v1을 안정적으로 발현하는 293F 세포를 세포 면역화를 위한 면역원으로서 사용하였다 (실시예 1.2 참조).

[0456] 2.3. 유전자 면역화를 위한 면역원의 제조

[0457] 전장 인간 SIRPα v1 단백질 (NP_542970)을 코딩하는 DNA 서열을 pCP 벡터 (켐파트너) 내로 클로닝하였다. 이어서, 제조된 플라스미드를 유전자 면역화를 위한 면역원으로서 콜로이드성 금 탄환 (바이오-라드(Bio-Rad)) 상에 코팅하였다.

[0458] 2.4. 면역화

[0459] Balb/c 및 SJL/J 마우스 (SLAC)를 인간 SIRPα v1 ECD 재조합 단백질을 사용하는 단백질 면역화, 인간 SIRPα v1을 안정적으로 발현하는 293F 세포를 사용하는 세포 면역화, 및 인간 SIRPα v1 발현 플라스미드로 코팅된 금 탄환을 사용하는 유전자 면역화의 3가지 상이한 전략에 의해 면역화시켰다. 인간 SIRPα v1 ECD 재조합 단백질과 함께 ELISA 검정 및 인간 SIRPα v1을 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포와 함께 FACS 검정을 사용하여 면역화된 마우스의 혈청 역가를 검출하였다. 높은 혈청 역가를 갖는 마우스를 하이브리도마 융합을 위해 선택하였다.

[0460] 2.5. 하이브리도마 생성

[0461] 최종 부스팅 5일 후에, 마우스를 희생시키고, 비장 세포를 수집하였다. 1% (v/v) NH_4OH를 첨가하여 적혈구를 용해시켰다. 이어서, 세척된 비장 세포를 고효율 전기-융합 또는 PEG 방법에 의해 SP2/0 마우스 골수종 세포 (ATCC)와 융합시켰다. 세포 융합 후, 융합된 세포를 20% FBS 및 1% HAT를 함유하는 200 μl DMEM 배지가 담긴 96-웰 플레이트에 $2x10^4$개 세포/웰의 밀도로 시딩하였다.

[0462] 2.6. 하이브리도마 스크리닝

[0463] 융합 10-12일 후, 융합 플레이트를 우선, 인간 SIRPα v1 및 v2 ECD 재조합 단백질을 사용한 ELISA 검정 또는 인간 SIRPα v1을 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포를 사용한 아큐멘 검정 (TTP 랩테크(TTP Labtech))에 의해 스크리닝하였다. 양성 웰로부터의 하이브리도마 세포를 제2 스크리닝을 위해 24-웰 플레이트 내로 증폭시켰다. 제2 스크리닝에서, 인간 SIRPα v1 및 v2 ECD 재조합 단백질을 사용한 ELISA 검정 및 인간 SIRPα v1을 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포를 사용한 FACS 검정에 의해 결합 활성을 평가하였다. 상이한 인간 SIRPα 변이체에 대해 최고 결합 활성을 갖는 클론을 서브클로닝을 위해 선택하였다. 또한, 제2 스크리닝에서 하이브리도마 특징화를 위해 인간 SIRPα/β/γ에 대한 특이성, 종 교차 반응성, CD47 및 SIRPα 상호작용 차단 활성을 또한 검출하였다 (특징화 검정의 방법에 대해서는 실시예 3 참조).

[0464] 2.7. 하이브리도마 서브클론

[0465] 각각의 선택된 클론의 하이브리도마 세포를 96-웰 플레이트에 한계 희석에 의해 1개 세포/웰의 밀도로 시딩하였다. 하이브리도마 1차 스크리닝과 동일한 방식으로 플레이트를 스크리닝하였다 (실시예 2.6 참조). 양성 단일 클론을 골라내고, 하이브리도마 제2 스크리닝과 동일한 방식으로 특징화하였다 (실시예 2.6 참조). 이어서, 최고 결합 활성을 갖는 모노클로날 하이브리도마 세포주를 추가의 하이브리도마 항체 생산, 특징화 및 서열분석을 위해 수득하였다. 총 7개의 항체 클론이 기능적 히트로서 확인되었고, 이들 클론으로부터 정제된 하이브리도마

항체를 각각 005, 015, 025, 042, 059, 071, 및 073으로 배정하였다 (실시예 3).

[0466] 실시예 3. 항체 특징화

[0467] 3.1. 하이브리도마 항체 생산 및 정제

[0468] 배양 약 14일 후에, 하이브리도마 세포 배양 배지를 수집하고, 원심분리하여 세포를 제거하였다. 0.22 μm PES 막을 통해 여과하고 pH를 7.4로 조정한 후, 수거한 상청액을 단백질 A 친화성 크로마토그래피 칼럼 (GE)에 로딩하였다. 항체를 0.1 M 시트레이트 나트륨 완충제 (pH3.0)에 의해 용리시킨 후, 트리스 완충제 (pH8.0)를 사용하여 즉시 중화시켰다. PBS 완충제로 투석한 후, 항체 농도를 나노 드롭 (써모 피셔(Thermo Fisher))에 의해 결정하였다. 단백질의 순도를 SDS-PAGE 및 HPLC-SEC (애질런트(Agilent))에 의해 평가하였다. 내독소 수준을 엔도크롬-K 키트 (찰스 리버(Charles River))로 검출하였다.

[0469] 3.2. 결합 특이성 검출

[0470] 인간 SIRPα 변이체에 대한 정제된 하이브리도마 항체의 결합 특이성을 Fc 태그부착된 인간 SIRPα v1 ECD 및 인간 SIRPα v2 ECD의 재조합 단백질을 사용하여 ELISA 검정에 의해 검출하였다. 간략하게, 항체를 ELISA 마이크로플레이트 코팅된 항원과 함께 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후에, 양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP) 표지된 항-마우스 IgG 제2 Ab (시그마)를 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 100μl/웰의 TMB 용액 (바이오테크놀로지(Biotechnology))을 첨가하였다. 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 1N HCl 50μl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. OD 450 nm을 판독하고, EC_{50}을 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산하였다. HEFLB 및 7종의 기능적 항체의 결합 특이성 특성을 표 8에 요약한다. HEFLB 이외에, 시험된 바와 같은 모든 항체는 인간 SIRPα v1 및 인간 SIRPα v2 둘 다에 결합하였다. HEFLB는 인간 SIRPα v1에만 결합할 수 있고, 인간 SIRPα v2에는 결합할 수 없었다.

[0471] 3.3. 종 교차 반응성 검출

[0472] 인간, 시노 및 마우스 SIRPα에 대한 정제된 하이브리도마 항체의 종 교차 반응성을 인간 SIRPα v1, CHOK1-시노 SIRPα 및 C57BL/6 마우스 SIRPα를 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포를 사용하여 FACS 검정에 의해 결정하였다. 간략하게, 항체를 $2x10^5$개의 표적 세포와 함께 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후에, 형광 표지된 항-마우스 IgG 제2 항체 (라이프 테크놀로지스)를 첨가하고, 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 기하 중앙 형광 강도를 검출하고, EC_{50}을 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산하였다. HEFLB 및 7종의 기능적 항체의 종 교차 반응성 특성을 표 8에 요약한다. HEFLB 이외에, 시험된 바와 같은 모든 항체는 시노 SIRPα에 결합할 수 있었다. 시험된 항체 중 어떠한 것도 C57BL/6 마우스 SIRPα에 결합할 수 없었다.

[0473] 3.4. CD47/SIRPα 상호작용 차단 활성 검출

[0474] 경쟁적 ELISA 검정을 사용하여 정제된 하이브리도마 항체가 CD47 및 SIRPα 상호작용을 차단할 수 있는지 결정하였다. 간략하게, 항체 및 비오틴 표지된 가용성 인간 SIRPα v1 ECD 재조합 단백질을 ELISA 마이크로플레이트 코팅된 인간 CD47 ECD 재조합 단백질과 함께 공동-인큐베이션하였다. 세척 후에, HRP 표지된 스트렙타비딘 (HRP-SA, 시그마)을 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 100μl/웰의 TMB 용액 (바이오테크놀로지)을 첨가하였다. 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 1N HCl 50μl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. OD 450nm을 판독하였다. ELISA 마이크로플레이트 코팅된 인간 CD47 ECD 재조합 단백질에 대한 비오틴 표지된 인간 SIRPα v1 ECD 재조합 단백질 결합의 차단에 의해 차단 비를 결정하였다. 그래프패드 프리즘 9.0을 사용하여 계산된 IC_{50} 및 최고 차단 비를 표 8에 요약한다. 005 이외에, 시험된 바와 같은 모든 항체는 인간 CD47 및 인간 SIRPα v1 상호작용을 차단할 수 있었다.

[0475] 3.5. 적혈구응집 활성 검출

[0476] 항-CD47 항체는 적혈구 (RBC) 적혈구응집을 촉진할 수 있고, 이는 잠재적인 안전성 위험으로 이어진다. 정제된 하이브리도마 항체의 적혈구응집 활성을 시험하였다. 간략하게, 인간 RBC를 PBS 중 10%로 희석하고, 100nM 항체의 존재 하에 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 적혈구응집의 증거는 비-침강 RBC의 존재에 의해 입증되며, 이는 비-적혈구응집 RBC의 점상 적색 점과 비교하여 헤이즈로서 나타난다. 적혈구응집 지수는 항체의 부재 하의 것에 대해 정규화된, 항체의 존재 하의 RBC 펠릿의 면적을 정량화함으로써 결정하였다. 표 8에 요약된 바와 같이, 모든 7종의 기능적 항체는 적혈구응집 활성을 나타내지 않았다.

[0477] 3.6. SHP-1 동원 검출

[0478] CD47/SIRPα 매개되는 "나를 먹지 말라"는 신호전달을 차단하는 정제된 하이브리도마 항체의 효능을 세포-기반 SHP-1 동원 검정에 의해 평가하였다 (도 8a). 전장 인간 SIRPα 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 SIRPα-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. 베타-gal 효소 활성의 차단에 의해 차단 비를 결정하였다. 표 8에 요약된 바와 같이, 항-SIRPα 하이브리도마 항체 005, 015, 025, 042, 059, 071, 및 073은 CD47/SIRPα 매개되는 "나를 먹지 말라"는 신호전달을 강력하게 파괴하였다. 이들 7개의 항체를 기능적 히트로서 간주하였다.

[0479] 3.7. 하이브리도마 서열분석

[0480] 모노클로날 하이브리도마 세포로부터 단리된 총 RNA를 스마트스크립(SMARTScribe) 리버스 트랜스크립타제의 기술 매뉴얼에 따라 이소형-특이적 안티센스 프라이머 또는 범용 프라이머를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. 이어서, cDNA를 주형으로서 사용하여 젠스크립트(GenScript)의 cDNA 말단 급속 증폭 (RACE)의 표준 작동 절차 (SOP)에 따라 중쇄 및 경쇄의 항체 단편을 증폭시켰다. 증폭된 항체 단편을 표준 클로닝 벡터 내로 개별적으로 클로닝하였다. 콜로니 PCR을 수행하여 정확한 크기의 삽입물을 갖는 클론을 스크리닝하고, 삽입물 단편을 DNA 서열분석에 의해 분석하였다. 마지막으로, 컨센서스 서열은 중쇄 및 경쇄의 항체 가변 영역으로서 확인되었다.

[0481] 실시예 4. 키메라 항체 생성 및 특징화

[0482] 4.1. 키메라 항체 생성 및 생산

[0483] 하이브리도마 서열분석 결과에 따라, 마우스 항-SIRPα 기능적 히트를 특징화를 위해 S228P 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 키메라 항체로 전환시켰다. 간략하게, 중쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA 서열을 S228P 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 중쇄 불변 영역을 보유하는 pcDNA3.4-hIgG4P 벡터 (바이오인트론) 내로 클로닝하였다. 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA 서열은 인간 카파 경쇄 불변 영역을 보유하는 pcDNA3.4-hIgGk 벡터 (바이오인트론) 내로 클로닝하였다. 항체 중쇄 및 경쇄 발현 플라스미드로 공동-형질감염시킨 Expi293 세포 (라이프 테크놀로지스)를 37℃에서 5일 동안 확장시켰다. 생성된 키메라 항체는 본원에서 005c, 015c, 025c, 042c, 059c, 071c 및 073c로 지칭되며, 여기서 접미어 "c"는 키메라를 나타낸다.

[0484] 4.2. 키메라 항체 특징화

[0485] 4.2.1 결합 특이성 검출

[0486] 인간 SIRPα v1을 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포 (도 1a 및 1b) 또는 293F 세포 (도 1c) 및 인간 SIRPα v2를 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포 (도 2a 및 2b)를 사용하는 FACS 검정에 의해 인간 SIRPα 변이체에 대한 정제된 키메라 항체의 결합 활성을 검출하였다. 도 1a, 1b, 및 1c에 제시된 바와 같이, 시험된 바와 같은 모든 항체는 세포 표면 인간 SIRPα v1에 강하게 결합하였다. 도 2에 제시된 바와 같이, HEFLB 이외에, 시험된 바와 같은 모든 항체는 세포 표면 인간 SIRPα v2에 결합하였다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 EC_{50} 및 최고 신호를 표 9에 요약한다.

[0487] 인간 SIRPβ ECD (도 3a 및 3b), 인간 SIRPβ1 ECD (도 3d 및 3e)의 재조합 단백질을 사용하는 ELISA 검정, 및 인간 SIRPβ를 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포를 사용하는 FACS 검정 (도 3c)에 의해 SIRPβ 및 SIRPβ1에 대한 정제된 키메라 항체의 결합 활성을 검출하였다. 도 3a 내지 3c에 제시된 바와 같이, 시험된 바와 같은 모든 항체는 인간 SIRPβ에 상이한 수준으로 결합하였고, 그 중 042c, 071c 및 073c는 보다 약한 결합을 가졌다. 도 3d 및 3e에 제시된 바와 같이, 시험된 바와 같은 모든 항체는 인간 SIRPβ1에 강하게 결합하였다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 EC_{50} 및 최고 신호를 표 10에 요약한다.

[0488] SIRPγ에 대한 정제된 키메라 항체의 결합 활성을 시노 SIRPγ ECD의 재조합 단백질을 사용하는 FACS 검정 (도 4c) 및 인간 SIRPγ를 안정적으로 발현하는 293F 세포를 사용하는 FACS 검정 (도 4a 및 4b)에 의해 검출하였다. 도 4a 및 4b에 제시된 바와 같이, 시험된 바와 같은 모든 항체는 인간 SIRPγ에 상이한 수준으로 결합하고, 그 중 042c, 059c, 071c 및 073c는 매우 약한 결합을 가졌다. 도 4c에 제시된 바와 같이, 005c, 042c 및 073c는 시노 SIRPγ에 대해 매우 약한 결합을 가졌고, 이는 인간 SIRPγ에 대한 그의 결합 활성과 상관되었다. 그래프

패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 EC_{50} 및 최고 신호를 표 11에 요약한다.

[0489] 4.2.2 종 교차 반응성 검출

[0490] 정제된 키메라 항체의 종 교차 반응성을 C57BL/6 마우스 SIRPα ECD의 재조합 단백질을 사용하는 ELISA 검정 (도 5a) 및 시노 SIRPα를 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포를 사용하는 FACS 검정 (도 5b 및 5c)에 의해 검출하였다. 시험된 바와 같은 모든 항체는 시노 SIRPα에 상이한 수준으로 결합하였지만, C57BL/6 마우스 SIRPα에 대해서는 어떠한 종 교차 반응성도 갖지 않았다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 EC_{50} 및 최고 신호를 표 12에 요약한다.

[0491] 4.2.3. CD47/SIRPα 상호작용 차단 활성 검출

[0492] 경쟁적 ELISA 검정을 사용하여 정제된 키메라 항체가 CD47 및 SIRPα 상호작용을 차단할 수 있는지 결정하였다. 간략하게, 항체 및 mFc 태그부착된 인간 CD47 ECD 재조합 단백질을 ELISA 마이크로플레이트 코팅된 인간 SIRPα v1 ECD (도 6a 및 6b) 또는 인간 SIRPα v2 ECD (도 7a 및 7b) 재조합 단백질과 함께 공동-인큐베이션하였다. 세척 후에, HRP 표지된 항-마우스 Fc 제2 항체 (시그마)를 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 100μl/웰의 TMB 용액 (바이오테크놀로지)을 첨가하였다. 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 1N HCl 50μl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. OD 450nm을 판독하였다. ELISA 마이크로플레이트 코팅된 인간 SIRPα ECD 재조합 단백질에 대한 인간 CD47 ECD 재조합 단백질 결합의 차단에 의해 차단 비를 결정하였다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 IC_{50} 및 최고 차단 비를 표 13에 요약한다. 005 이외에, 시험된 바와 같은 모든 항체는 인간 CD47과 상이한 인간 SIRPα 변이체 사이의 상호작용을 차단할 수 있었다.

[0493] 4.2.4. SHP-1 동원 검정

[0494] CD47/SIRPα 매개되는 "나를 먹지 말라"는 신호전달을 차단하는 정제된 키메라 항체의 효능을 세포-기반 SHP-1 동원 검정 (도 8b, 실시예 3.6에 기재된 방법 참조)에 의해 평가하였다. IC_{50} 및 최고 차단 비를 그래프패드 프리즘 9.0을 사용하여 계산하였다. 표 14에 요약된 바와 같이, 시험된 바와 같은 모든 항체가 CD47/SIRPα 매개되는 "나를 먹지 말라"는 신호전달을 상이한 수준으로 파괴할 수 있었다. 특히, 005c는 CD47 및 SIRPα 상호작용을 차단하지 않지만, 이는 SIRPα 세포내 꼬리로의 SHP-1 동원을 유발하는 CD47 결속을 억제할 수 있었다.

[0495] 4.2.5. 친화도 검출

[0496] 정제된 키메라 항체를 생물층 간섭측정 기술 (옥테트 시스템)을 사용하여 인간 SIRPα v1, 인간 SIRPα 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 표 15에 요약한다.

[0497] 4.2.6. 에피토프 분석

[0498] 경쟁적 ELISA 검정을 정제된 키메라 항체의 에피토프 비닝에 사용하였다. 간략하게 과량의 경쟁자 항체 및 mFc 태그부착된 인간 SIRPα v1 ECD 재조합 단백질을 ELISA 마이크로플레이트 코팅된 항체와 함께 공동-인큐베이션하였다. 세척 후에, HRP 표지된 항-마우스 Fc 제2 항체 (시그마)를 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 100μl/웰의 TMB 용액 (바이오테크놀로지)을 첨가하였다. 실온에서 15분 동안 인큐베이션한 후, 1N HCl 50μl를 첨가하여 반응을 정지시켰다. OD 450nm을 판독하였다. 경쟁 비를 계산하였다. SIRPα에의 결합에 대해 서로 경쟁할 수 있는 항체는 관련된 결합 에피토프를 가질 수 있다. 표 16에 제시된 바와 같이, 025c는 인간 SIRPα에 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.

[0499] 025c, 042c, 073c, HEFLB 및 hu1H9G4의 에피토프 맵핑을 수소 중수소 교환 질량 분광측정법 (HDX-MS)을 사용하여 추가로 수행하였다. 도 9a에 제시된 바와 같이, 025c 결합은 His 태그부착된 인간 SIRPα v1 ECD의 YNQKEGHFPRVTTVSDL 영역의 더 적은 수소 중수소 교환 비를 발생시켰고, 이는 이들 아미노산이 025c가 결합하는 데 중요할 수 있다는 것을 나타낸다. 도 9b에 제시된 바와 같이, 042c 결합은 His 태그부착된 인간 SIRPα v1 ECD의 SGAGTEL 및 TNVDPVGESVS의 2개의 영역의 더 적은 수소 중수소 교환 비를 발생시켰고, 이는 이들 아미노산이 042c가 결합하는 데 중요할 수 있다는 것을 나타낸다. 도 9c에 제시된 바와 같이, 073c 결합은 His 태그부착된 인간 SIRPα v1 ECD의 TNVDPVGESVSY 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 SIRPα

ECD의 IgV 도메인에 위치하지 않고, 이는 042c 및 073c가 CD47과 SIRPα의 상호작용을 차단하는 알로스테릭 항체로서 작용할 수 있거나 또는 042c 및 073c의 차단 활성이 입체 장애 효과라는 것을 나타낸다. 도 9d에 제시된 바와 같이, hu1H9G4 결합은 His 태그부착된 인간 SIRPα v1 ECD의 YNQKEGHFPRVTTVSDL 영역의 더 적은 수소 중수소 교환 비를 발생시켰고, 이는 이들 아미노산이 hu1H9G4가 결합하는 데 중요할 수 있다는 것을 나타낸다. 도 9e에 제시된 바와 같이, HEFLB 결합은 his 태그부착된 인간 SIRPα v1 ECD의 VGPIQW 영역의 더 적은 수소 중수소 교환 비를 발생시켰고, 이는 이들 아미노산이 HEFLB가 결합하는 데 중요할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0500] 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.

[0501] 4.2.7. 시험관내 식세포작용 검정

[0502] 정제된 키메라 항체의 기능 효능을 유동 세포측정법 기반 식세포작용 검정에 의해 평가하였다. 간략하게, 상이한 SIRPA 유전자형을 갖는 M0 비분극화된 또는 M1 분극화된 인간 단핵구 유래 대식세포를 시험된 바와 같은 항체의 존재 하에서 셀트레이스 바이올렛 (라이프 테크놀로지스) 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 IFNγ 및 100 ug/ml LPS를 추가의 2 내지 4일 배양 동안 첨가하였다. 부착 세포를 M1 분극화된 대식세포로서 수거하였다.

[0503] 도 10a에 제시된 바와 같이, 015c, 025c, 042c,059c, 071c 및 073c는 SIRPA 이형접합 v1/v2 개체로부터 수득된 M0 대식세포에 의한 Raji 세포의 종양 세포 흡수를 증진시키는 단일 작용제 활성을 나타내지 않았다. 그러나, 리툭시맙 (항-CD20 항체)의 존재 하에서, 인간 CD47과 인간 SIRPα 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.

[0504] 도 10b에 제시된 바와 같이, 059c 이외에, 세툭시맙 (항-EGFR 항체)의 존재와 관계없이, 시험된 바와 같은 모든 다른 정제된 항체는 SIRPA 동형접합 v2/v2 개체로부터 수득된 M0 대식세포에 의한 DLD-1 세포의 종양 세포 흡수를 효과적으로 증진시켰다.

[0505] SIRPα 항체 플러스 PD-L1 항체의 조합물을 SIRPA 동형접합 v1/v1 (도 10c) 또는 v2/v2 (도 10d) 개체로부터 수득된 M0 대식세포를 사용하는 식세포작용 검정에서 시험하였다. PD-L1 항체의 존재 하에, 005c, 025c, 042c 및 073c는 PD-L1을 안정적으로 발현하는 Raji 세포의 대식세포 매개된 ADCP를 효과적으로 강화시켰다.

[0506] 025c 플러스 PD-L1 항체 C71 및 025c 플러스 리툭시맙의 조합물을 또한 SIRPA 동형접합 v1/v1 개체로부터 수득된 M0 비분극화된 또는 M1 분극화된 대식세포를 사용하는 식세포작용 검정에서 시험하였다. M1 분극화된 대식세포 (도 11b)는 M0 비분극화된 대식세포 (도 11a)와 비교하여 보다 약한 식세포작용 능력을 나타내었다. 대식세포 분극 상태와 관계없이, PD-L1 항체 또는 리툭시맙의 존재 하에, 025c는 PD-L1을 안정적으로 발현하는 Raji 세포의 대식세포 매개된 ADCP를 효과적으로 강화시켰다. PD-L1 중쇄 항체 C71은 하기 제시된 VH 아미노산 서열을 갖는다:

[0507] 항-PD-L1 중쇄 항체 C71.VH, 서열식별번호: 91:

EVQVVESGGGLVQSGGSLKLSCAGSGFTESAGFMVWHRQVPGKERELVAL
IATPSGSTNYADSVKGRFTISRDNGKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNIRGYWGQGTL

[0508] VTVSS

[0509] 이들 데이터는 본원에 제공된 항체 또는 그의 항원-결합 단편이 특정 종양 세포의 표적 항원에 특이적인 항체와 조합되어 사용되는 경우에, 이러한 종양 세포의 대식세포 매개된 ADCP를 강화시킨다는 것을 시사한다.

[0510] 4.2.8. 생체내 항종양 활성

[0511] 인간 CD47/인간 SIRPα 이중 녹-인 마우스에 인간 CD47 및 인간 클라우딘18.2 (CLDN18.2)를 안정적으로 발현하는 MC38 세포를 접종하였다. 처리군은 비히클 (PBS), 이소형 대조군, 10 mg/kg (mpk) 항-CLDN18.2 mAb (22E12) 및 10 mpk 항-CLDN18.2 mAb (22E12) 플러스 3 또는 10 mpk 항-SIRPα mAb의 조합물을 포함하였다. 종

양이 70-75 mm^3의 평균 부피에 도달하였을 때 처리를 개시하였다. 마우스에게 5회 동안 1주 2회 복강내로 (IP) 투여하였다. 종양 부피를 1주에 2회 측정하였다. 최종 투여 3일 후에, 마우스를 희생시키고, 종양을 칭량하였다. 상이한 처리군의 평균 종양 중량/부피를 이소형 대조군의 것과 비교하는 일원 또는 이원 anova에 의해 통계를 수행하였다. 도 12a 및 12b에 제시된 바와 같이, 10 mpk 항-CLDN18.2 mAb (22E12) 플러스 10 mpk 항-SIRPα의 조합물은 MC38 종양 성장을 유의하게 억제하였다. 10 mpk 025c 조합물 군에서 6개의 종양 중 6개, 3 mpk 042c 조합물 군에서 6개의 종양 중 1개, 및 10 mpk 042c 조합물 군에서 6개의 종양 중 2개가 축소되었다 (도 12c). 항-CLDN18.2 mAb (22E12)의 VH 및 VL 아미노산 서열이 하기에 제시된다:

[0512] 항-CLDN18.2 mAb (22E12) VH, 서열식별번호: 88

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNWVHWVRQAPGQGLEWMGEINPTNARSN

YNEKFKKRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARIYYGNSFAHWGQGTLVTVSS

[0513]

[0514] 항-CLDN18.2 mAb (22E12) VL, 서열식별번호: 89

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNAGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWSS

[0515] TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNNYYYPLTFGGGTKLEIK

[0516] 4.2.9. 혼합 림프구 반응 검정 (MLR)

[0517] SIRPγ-CD47 상호작용을 통한 항원-제시 세포에 대한 인간 T 세포의 부착이 T 세포 증식을 공동-자극하는 것으로 보고되었다. 정제된 키메라 항체 중 일부는 인간 SIRPγ에 강하게 결합하기 때문에 (도 4), T 세포 증식 및 활성화를 방해할 가능성을 배제하기 위해, 정제된 키메라 항체를 MLR 검정에서 시험하였다. 간략하게, 셀트레이스 바이올렛 표지된 인간 1차 T 세포를 시험관내에서 생성한 동종 성숙 수지상 세포로 5일 동안 자극하였다. 표시된 항체를 시험 시작부터 포화 농도 (100 nM)로 첨가하였다. 셀트레이스 바이올렛 저염색을 사용하여 증식 집단을 결정하였다. IFNγ 분비를 인간 IFN 감마 키트 (시스바이오(Cisbio))를 사용하여 결정하였다. 도 13에 제시된 바와 같이, 인간 SIRPγ에 대한 결합 활성과 관계없이, 015c, 025c, 042c, 059c, 071c 및 073c는 IFNγ 분비 (도 13a), $CD4^+$ T 세포 증식 (도 13b), 및 $CD8^+$ T 세포 증식 (도 13c)에 대해 유의한 영향을 나타내지 않았다. 예상된 바와 같이, 항-SIRPγ 항체 LSB2.20 (바이오레전드(Biolegend))은 T 세포 활성화의 강력한 억제제이다. 특히, hu1H9G4는 본 검정에서 IFNγ 분비 및 T 세포 증식의 명백한 억제를 나타내었다.

[0518] 실시예 5. 항체 인간화

[0519] 5.1. 인간화

[0520] CDR 그라프팅 방법을 025c의 인간화에 사용하였다. 간략하게, IGHV1-69-2*01 및 IGKV3-11*01을 먼저 원래의 마우스 항체 서열에 대한 그의 상동성에 기초하여 각각 중쇄 및 경쇄에 대한 인간화 주형으로서 선택하였다. 이어서, 카바트 및 코티아 시스템의 조합을 사용하여 정의된 중쇄 CDR1을 제외하고, 카바트 정의를 사용하여 CDR을 정의하였다. 그라프팅을 위해, 잠재적 핫스팟 제거된 CDR 및 025c로부터의 정규 잔기의 상이한 조합을 주형에 그라프팅하고, 생성된 변이체 (불변 영역에서 S228P 돌연변이를 갖는 인간 IgG4 항체)를 96-웰 고처리량 단백질 발현 시스템을 통해 발현시켰다. 생산된 모든 변이체를 FACS 검정에 의해 시험하여, 인간 SIRPα v1 및 인간 SIRPα v2에 대한 최고 결합제를 추가의 특징화를 위해 선택하였다. 가장 우수한 결합 활성을 갖는 수득된 인간화 항체는 hu025.021, hu025.023, hu025.033, hu025.059 및 hu025.060으로 지정되며, 여기서 접두어 "hu"는 "인간화"를 나타내고, 접미어의 숫자는 인간화 항체의 일련번호를 표시한다.

[0521] 5.2. 인간화 항체의 특징화

[0522] 5.2.1. 결합 특이성 검출

[0523] 인간 SIRPα v1 (도 14a), 인간 SIRPα v2 (도 14b), 또는 인간 SIRPβ (도 14c)를 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포 및 인간 SIRPγ (도 14d)를 안정적으로 발현하는 293F 세포를 사용하는 FACS 검정에 의해 인간 SIRPα 변이체에 대한 인간화 항체의 결합 활성을 검출하였다. 시험된 바와 같은 모든 인간화 항체는 SIRP 패밀리 구성원에 결합하는 025c의 모 항체와 유사한 활성을 보유하는 것으로 확인되었다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 EC_{50} 및 최고 신호를 표 17에 요약한다.

[0524] 5.2.2. CD47/SIRPα 상호작용 차단 활성 검출

[0525] 인간화 항체를 CD47 및 SIRPα 상호작용을 차단하는 능력에 대해 경쟁적 ELISA 검정 (실시예 4.2.3.에 기재된 방법 참조)으로 시험하였다. 도 15에 제시된 바와 같이, 시험된 바와 같은 모든 인간화 항체는 인간 CD47과 상이한 인간 SIRPα 변이체 사이의 상호작용을 차단하는 025c의 모 항체와 유사한 활성을 보유하는 것으로 확인되었다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 IC_{50} 및 최고 차단 비를 표 18에 요약한다.

[0526] 또한 인간화 항체 및 참조 항체의 차단 활성을 추가로 비교하기 위해 경쟁적 FACS 검정을 설정하였다. 간략하게, 항체 및 mFc 태그부착된 인간 CD47 ECD 재조합 단백질을 인간 SIRPα v1 (도 16a) 또는 인간 SIRPα v2 (도 16b)를 안정적으로 발현하는 CHOK1 세포와 함께 공동-인큐베이션하였다. 세척 후에, 염료 표지된 항-마우스 Fc 제2 항체 (시그마)를 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 형광 강도를 검출하였다. SIRPα 발현된 CHOK1 세포에 대한 인간 CD47 ECD 재조합 단백질 결합의 차단에 의해 차단 비를 결정하였다. Hu1H9G4는 인간 CD47 및 인간 SIRPα v2 상호작용을 차단하는 보다 약한 활성을 나타내었다. 특히, HEFLB는 인간 SIRPα v2에 대해 전혀 작용하지 않았다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 IC_{50} 및 최고 차단 비를 표 19에 요약한다.

[0527] 5.2.4. SHP-1 동원 검정

[0528] CD47/SIRPα 매개되는 "나를 먹지 말라"는 신호전달을 차단하는 인간화 항체의 효능을 세포-기반 SHP-1 동원 검정 (도 17, 실시예 3.6에 기재된 방법 참조)에 의해 평가하였다. 시험된 바와 같은 모든 인간화 항체는 SIRPα 세포내 꼬리로의 SHP-1 동원을 유발하는 CD47 결속을 차단하는, 025c의 모 항체와 유사한 활성을 보유하는 것으로 확인되었다. 그래프패드 프리즘9.0을 사용하여 계산된 IC_{50} 및 최고 차단 비를 표 20에 요약한다.

[0529] 5.2.5. 친화도 검출

[0530] 인간화 항체를 표면 플라즈몬 공명 기술 (비아코어 시스템)을 사용하여 인간 SIRPα v1, 인간 SIRPα 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 표 21에 요약한다.

[0531] 5.2.6. 시험관내 식세포작용 검정

[0532] 시험관내 기능 검증을 위해, SIRPα 항체 플러스 PD-L1 항체 또는 리툭시맙의 조합물을 SIRPA 동형접합 v1/v1 (도 18a 및 18b), v2/v2 (도 18c 및 18d) 또는 이형접합 v1/v2 개체로부터 수득된 M0 대식세포를 사용하는 식세포작용 검정에서 시험하였다 (실시예 4.2.7에 기재된 방법 참조). 시험된 바와 같은 모든 인간화 항체는 PD-L1 항체 또는 리툭시맙의 존재 하에 PD-L1을 안정적으로 발현하는 Raji 세포의 대식세포 매개된 ADCP를 강화시키는, 025c의 모 항체와 유사한 활성을 보유하는 것으로 확인되었다. 참조 항체 및 005c를 또한 이들 검정에서 나란히 시험하였다. 도 18a 및 18b에 제시된 바와 같이, SIRPα 세포내 꼬리로의 SHP-1 동원을 유발하는 CD47 결속은 차단할 수 있지만 CD47 및 SIRPα 상호작용은 차단할 수 없는 005c는 PD-L1 항체 또는 리툭시맙의 존재 하에 PD-L1을 안정적으로 발현하는 Raji 세포의 대식세포 매개된 ADCP를 효과적으로 강화시켰다. 도 18c, 18d 및 18e에 제시된 바와 같이, 인간 SIRPα v2에 결합할 수 없는 HEFLB는 SIRPA 동형접합 v2/v2 및 이형접합 v1/v2 개체로부터 수득된 대식세포에 대해 전혀 작용하지 않았다.

[0533] 표 8. 항-SIRPα 하이브리도마 항체 특징 요약

[0534]

항체	FACS			ELISA (EC_{50}, nM)		hCD47/hSIRPα v1 상호작용 차단 (IC_{50}, nM)	적혈구 응집	SHP-1 동원 (% 차단)	
	CHOK1-인간 SIRPα v1 (EC_{50}, nM)	CHOK1-시노 SIRPα (MFI, 10nM)	CHOK1-C57BL/6 마우스 SIRPα (MFI, 100nM)	α V1	α V2			시험 I	시험 II
005	1.8	5972	-	0.11	0.12	-	-	71.02	82.65
015	1	10823	-	0.1	0.15	0.3	-	83.59	89.61
025	0.9	8561	-	0.04	0.06	0.15	-	83.92	91.21
042	0.2	6848	-	0.03	0.03	0.14	-	84.83	76.11
059	0.1	5843	-	0.03	0.1	0.12	-	77.53	80.22
071	0.2	8371	-	0.03	0.02	0.17	-	77.22	72.57
073	0.2	7850	-	0.03	0.03	0.16	-	76.93	75.93
HEFLB	11.2	-	-	0.17	-	0.5	-	46.80	50.30

[0535] 마이너스 기호는 특이적 신호 없음 또는 활성 없음을 의미함

[0536] 표 9. 인간 SIRPα v1 및 인간 SIRPα v2에 대한 항-SIRPα 키메라 항체의 결합

Ab	293F-hSIRPα v1		CHOK1-hSIRPα v2	
	EC_{50} (nM)	최고 MFI	EC_{50} (nM)	최고 MFI
005c	3.88	49859	5.47	53333
Ab	CHOK1-hSIRPα v1		CHOK1-hSIRPα v2	
	EC_{50} (nM)	최고 MFI	EC_{50} (nM)	최고 MFI
015c	1.49	79989	1.58	50062
025c	1.49	77587	1.34	51608
042c	1.90	73225	4.21	54782
059c	1.45	69840	12.03	19608
071c	2.60	76483	3.31	46725
073c	1.50	67794	2.12	47326
hu1H9G4	1.93	74571	0.85	18671

[0537]

[0538] 표 10. 인간 SIRPβ 및 인간 SIRPβ1에 대한 항-SIRPα 키메라 항체의 결합

Ab	hSIRPβ ECD		CHOK1-hSIRPβ		hSIRPβ1 ECD	
	EC_{50} (nM)	최고 OD450	EC_{50} (nM)	최고 MFI	EC_{50} (nM)	최고 OD450
015c	0.04	2.97	N/A	N/A	0.40	3.10
025c	0.04	3.10	0.38	10932	0.31	2.80
042c	0.23	3.23	39.83	3913	0.39	2.69
059c	0.03	2.75	N/A	N/A	0.70	3.35
071c	1.53	2.98	N/A	N/A	0.30	2.66
073c	2.14	3.07	22.95	2629	0.27	2.64
hu1H9G4	0.03	3.22	0.30	7145	0.24	2.74

[0539]

[0540] N/A는 이용가능한 데이터 없음을 의미함.

[0541] 표 11. 인간 SIRPγ 및 시노 SIRPγ에 대한 항-SIRPα 키메라 항체의 결합

Ab	293F-인간 SIRPγ		시노 SIRPγ ECD	
	EC_{50} (nM)	최고 MFI	EC_{50} (nM)	최고 OD450
005c	N/A	N/A	특이적 결합 없음	
015c	0.09	3300	N/A	N/A
025c	0.11	3223	0.36	3.07
042c	49.55	1700	20.53	1.22
059c	34.07	2859	N/A	N/A
071c	77.78	730.6	N/A	N/A
073c	12.57	727.9	45.52	0.92
hu1H9G4	0.52	2715	0.48	1.81

[0542]

[0543] N/A는 이용가능한 데이터 없음을 의미함.

[0544] 표 12. 시노 SIRPα 및 마우스 SIRPα에 대한 항-SIRPα 키메라 항체의 결합

Ab	C57BL/6 마우스 SIRPα ECD, OD450, 100 nM	CHOK1-시노 SIRPα	
		EC_{50} (nM)	최고 MFI
015c	특이적 결합 없음	0.69	29658
025c		0.69	30840
042c		2.95	32393
059c		17.21	17389
071c		2.64	32321
073c		1.76	30735
hu1H9G4	0.23	0.72	14887

[0545]

[0546] 표 13. 항-SIRPα 키메라 항체의 CD47/SIRPα 상호작용 차단 활성

Ab	인간 CD47/SIRPα v1 상호작용 차단		인간 CD47/SIRPα v2 상호작용 차단	
	IC_{50} (nM)	최고 차단 (%)	IC_{50} (nM)	최고 차단 (%)
005c	차단 없음		N/A	N/A
015c	2.32	96.4	2.45	96.71
025c	2.12	96.5	2.21	96.54
042c	3.60	97.1	4.49	94.64
059c	2.63	97.0	54.06	84.4
071c	2.86	94.1	5.10	76.35
073c	2.74	95.1	4.92	82.76
hu1H9G4	1.91	97.5	5.74	98.2

[0547]

[0548] N/A는 이용가능한 데이터 없음을 의미함.

[0549] 표 14. 항-SIRPα 키메라 항체의 SHP-1 동원 차단 활성

Ab	SHP-1 동원 차단	
	IC_{50} (nM)	최고 차단 (%)
005c	3.85	76.40
015c	0.09	73.51
025c	0.28	84.53
042c	0.99	70.00
059c	0.07	66.92
071c	2.97	44.50
073c	5.66	51.25
hu1H9G4	0.10	59.49

[0550]

[0551] 표 15. 항-SIRPα 키메라 항체 친화도 요약

항원	항체	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
인간 SIRPα v1	015c	8.97E+05	3.03E-04	3.38E-10
	025c	6.36E+05	1.56E-03	2.46E-09
	042c	5.93E+05	5.45E-03	9.20E-09
	059c	9.44E+05	2.13E-03	2.25E-09
	071c	5.48E+05	3.27E-03	5.97E-09
	073c	4.99E+05	3.03E-03	6.07E-09
	hu1H9G4	7.95E+05	2.77E-03	3.48E-09
인간 SIRPα v2	015c	1.24E+06	1.17E-03	9.37E-10
	025c	1.10E+06	2.93E-03	2.67E-09
	042c	6.16E+05	3.78E-03	6.14E-09

[0552]

[0553] 표 16. 항-SIRPα 키메라 항체 에피토프 빈닝 요약

% 경쟁			
코팅 mAb / 경쟁자	025c	042c	hu1H9G4
025c	93.0	19.1	15.3
042c	8.9	99.9	29.8
hu1H9G4	14.5	82.6	90.5
073c	9.1	93.8	37.7

[0554]

[0555] 표 17. SIRP 패밀리 구성원에 대한 항-SIRPα 인간화 항체의 결합

Ab	CHOK1-hSIRPα v1		CHOK1-hSIRPα v2		CHOK1-hSIRPβ		293F-hSIRPγ	
	EC_{50} (nM)	최고 MFI	EC_{50} (nM)	최고 MFI	EC_{50} (nM)	최고 MFI	EC_{50} (nM)	최고 MFI
hu025.021	1.08	56405	0.87	46450	72043	0.68	0.21	22134
hu025.023	1.13	57807	0.81	45824	72753	0.66	0.20	22420
hu025.033	0.99	53789	0.62	39793	69743	0.80	0.21	20933
hu025.059	1.05	59377	0.75	47252	73084	0.67	0.20	22666
hu025.060	0.84	61472	0.80	48646	71249	0.75	0.22	22192
025c	1.22	64734	0.99	52966	72279	0.65	0.20	22782

[0556]

[0557] 표 18. 경쟁적 ELISA에 의해 측정된 항-SIRPα 인간화 항체의 CD47/SIRPα 상호작용 차단 활성

Ab	인간 CD47/SIRPα v1 상호작용 차단		인간 CD47/SIRPα v2 상호작용 차단	
	IC_{50} (nM)	최고 차단 (%)	IC_{50} (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

[0558]

[0559] 표 19. 경쟁적 FACS에 의해 측정된 항-SIRPα 인간화 항체의 CD47/SIRPα 상호작용 차단 활성

Ab	인간 CD47/SIRPα v1 상호작용 차단		인간 CD47/SIRPα v2 상호작용 차단	
	IC_{50} (nM)	최고 차단 (%)	IC_{50} (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
HEFLB	0.94	97.6	차단 없음	
hu1H9G4	0.44	97.2	5.61	98.7

[0560]

[0561] 표 20. 항-SIRPα 인간화 항체의 SHP-1 동원 차단 활성

Ab	SHP-1 동원 차단	
	IC_{50} (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

[0562]

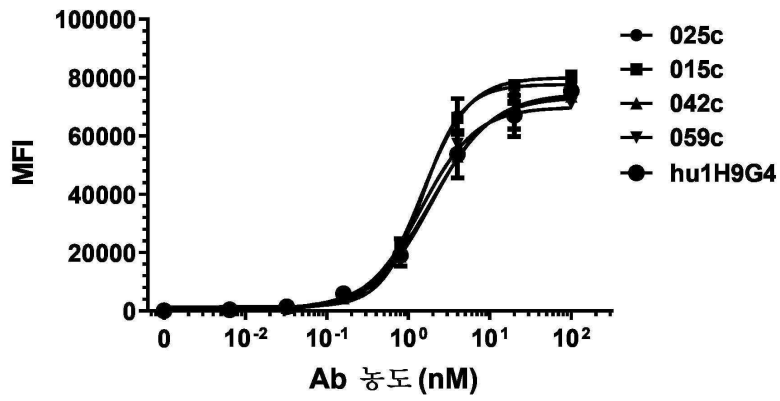
[0563] 표 21. 항-SIRPα 인간화 항체 친화도 요약

항원	항체	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
인간 SIRPα 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
	hu025.60	5.60E+05	1.11E-03	1.99E-09
인간 SIRPα v2	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
	hu025.59	1.42E+06	3.92E-03	2.76E-09
	hu025.60	1.47E+06	3.44E-03	2.34E-09

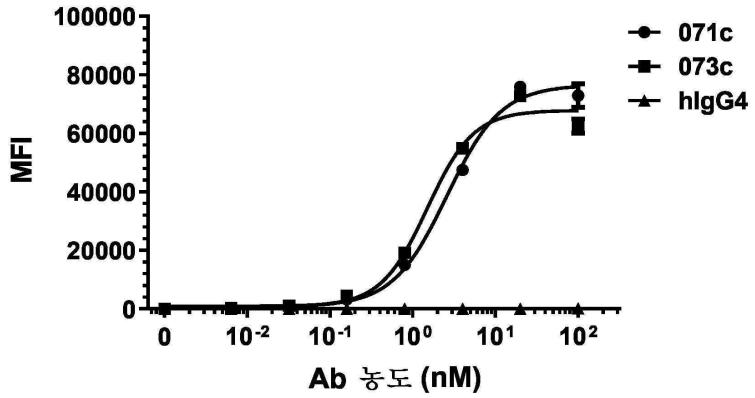
[0564]

도면

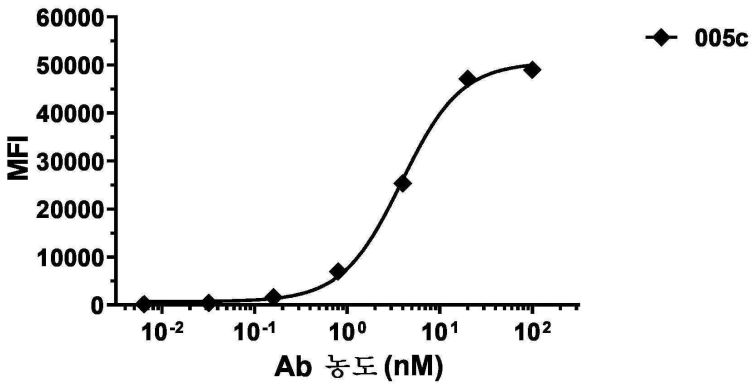
도면1a



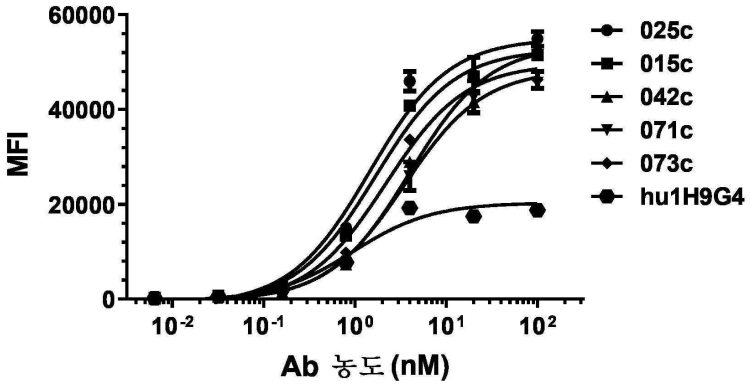
도면1b



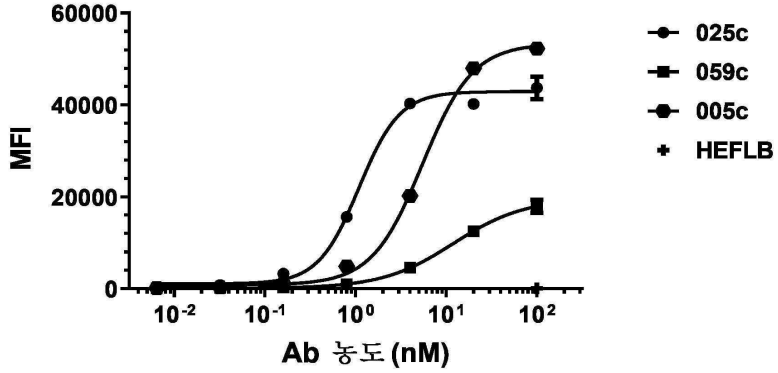
도면1c



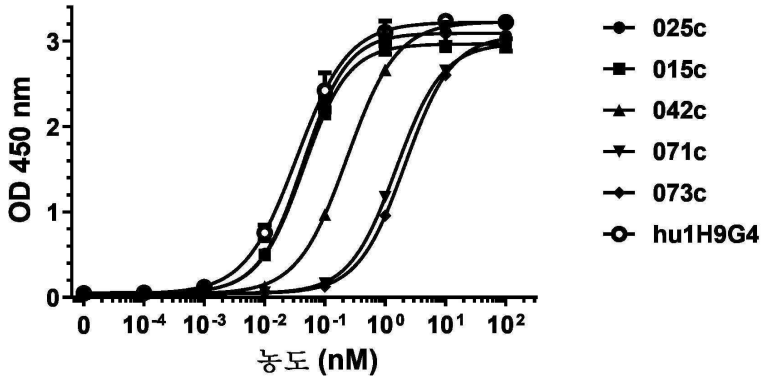
도면2a



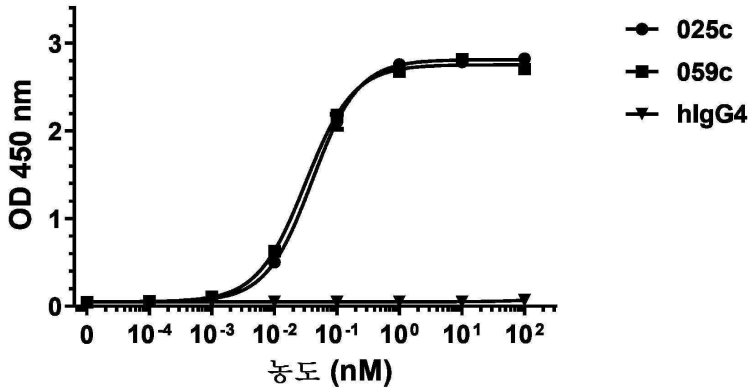
도면2b



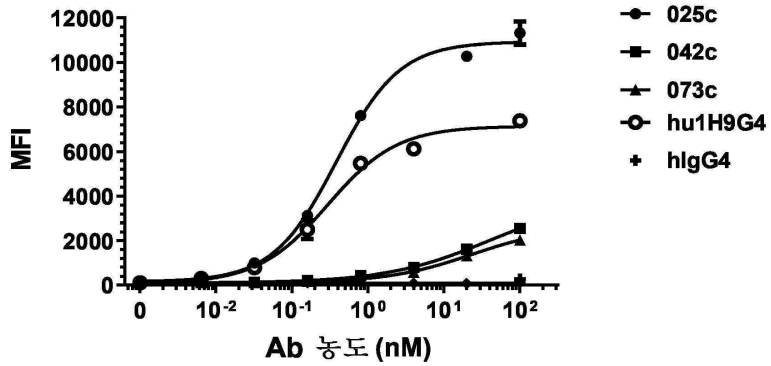
도면3a



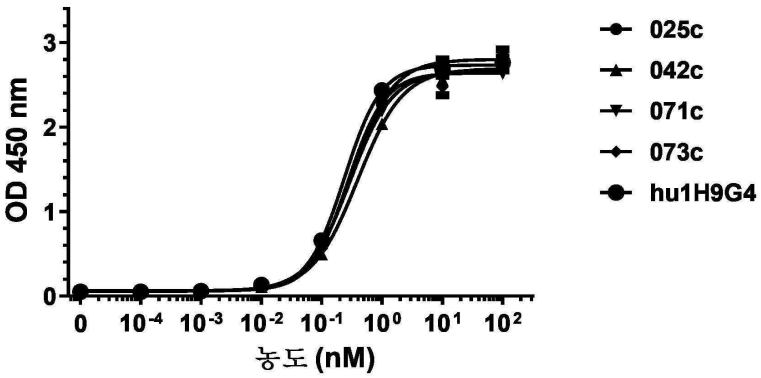
도면3b



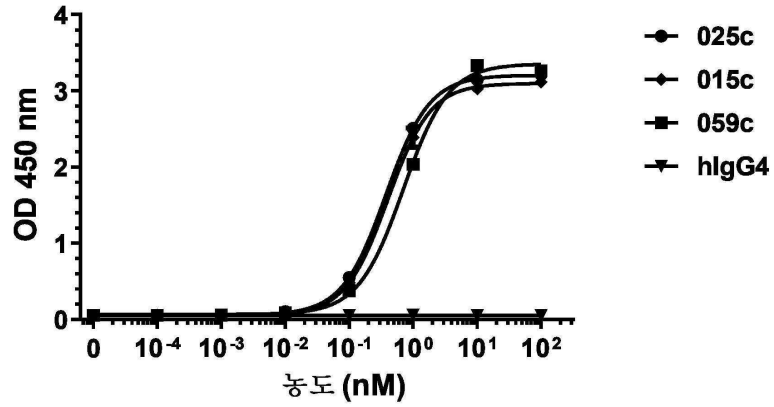
도면3c



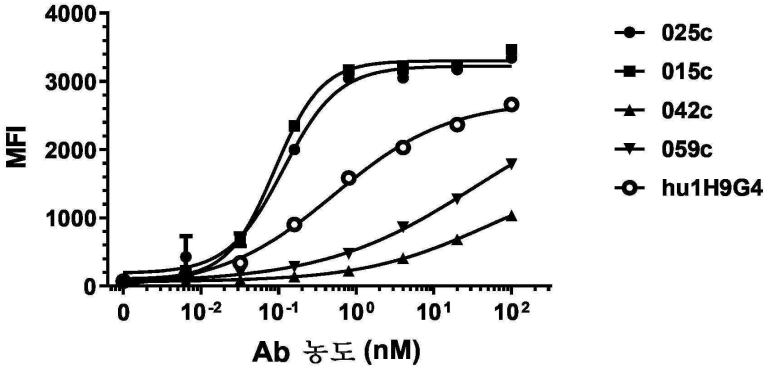
도면3d



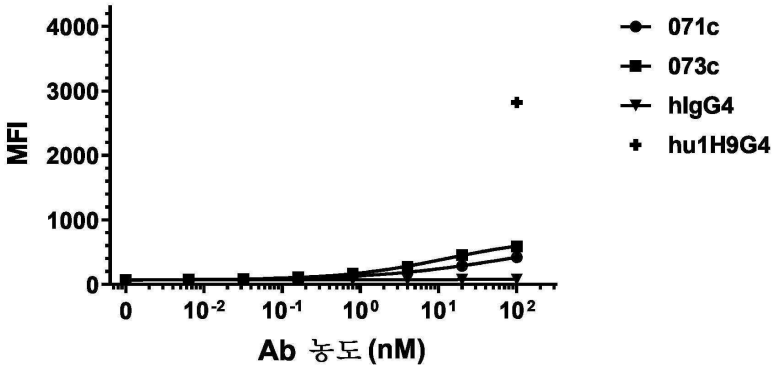
도면3e



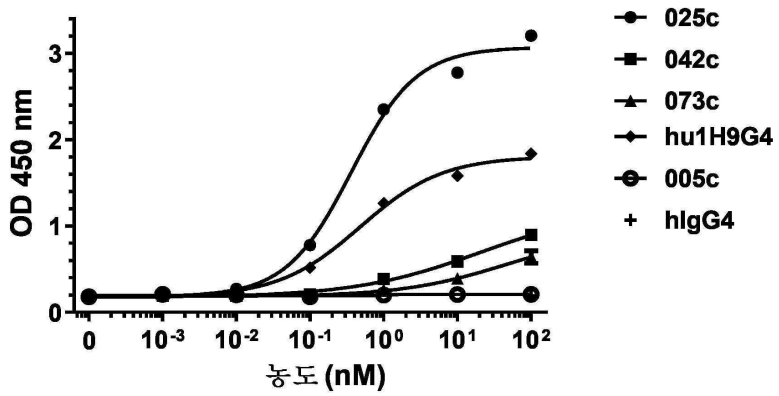
도면4a



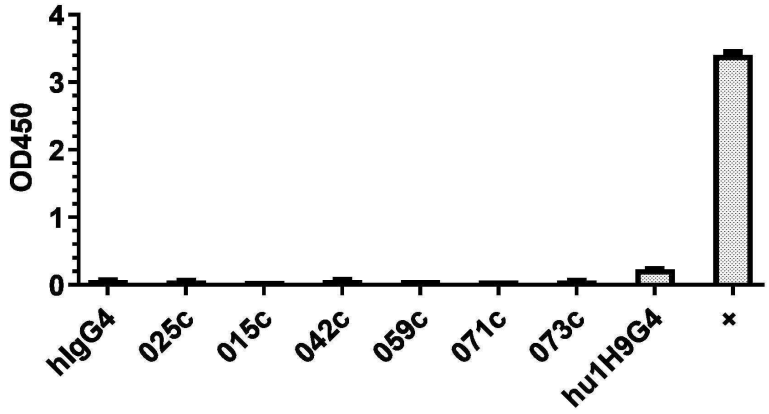
도면4b



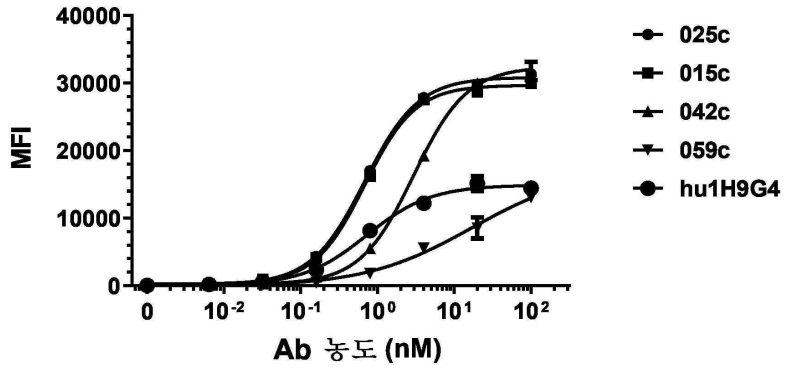
도면4c



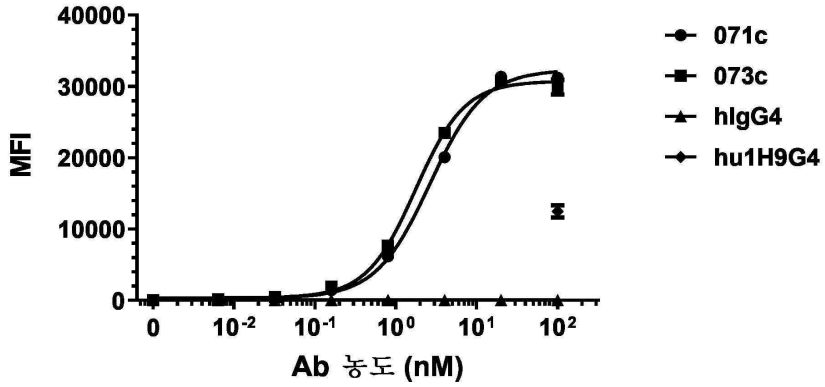
도면5a



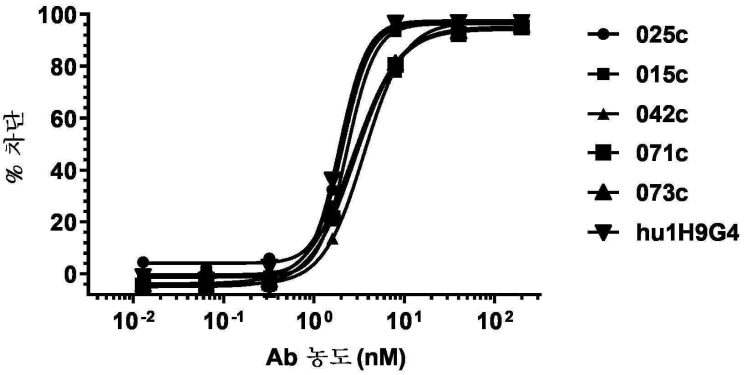
도면5b



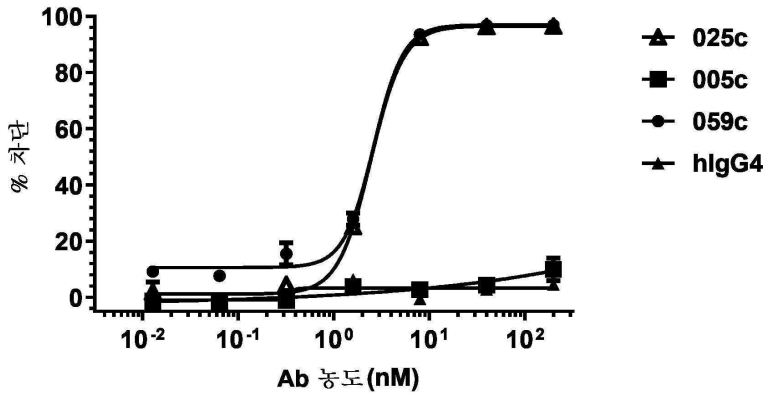
도면5c



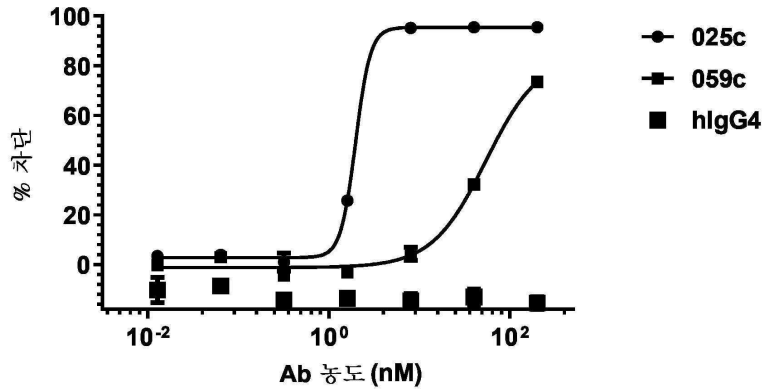
도면6a



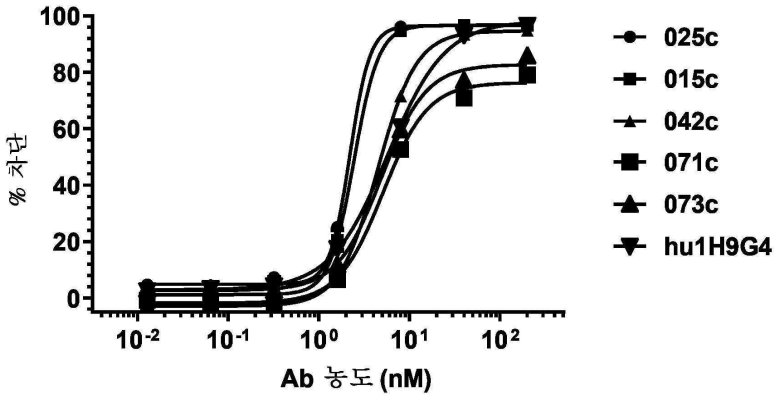
도면6b



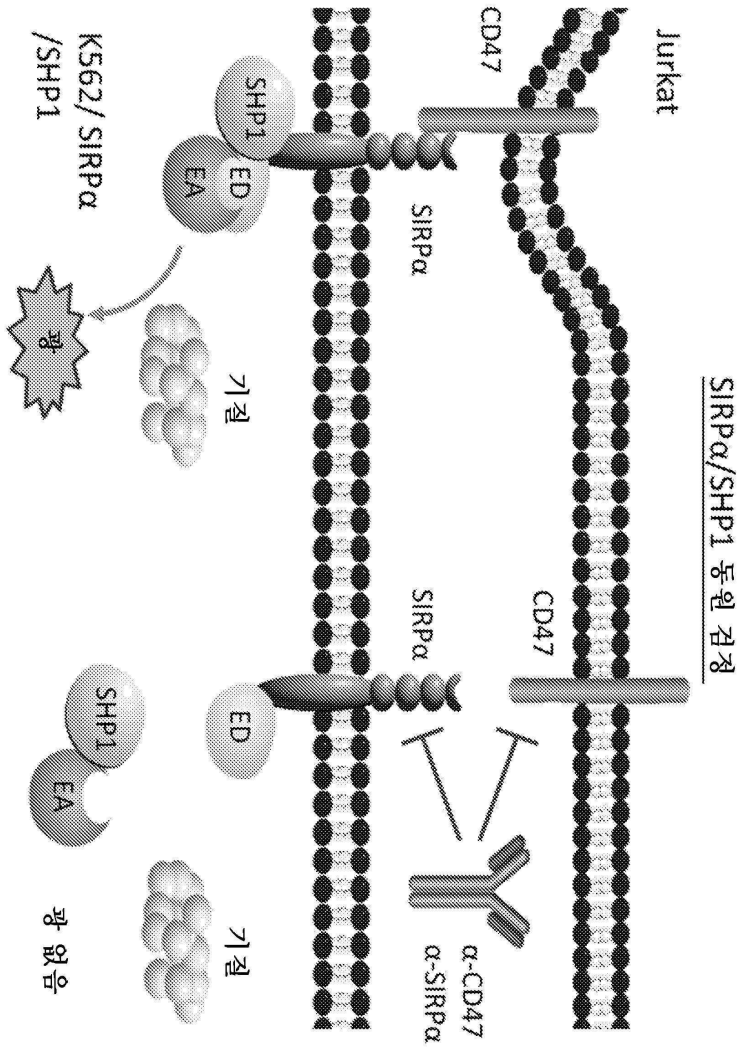
도면7a


100
80
60
40
20
0
% 차단
10-2
100
102
Ab 농도 (nM)
025c
059c
hIgG4

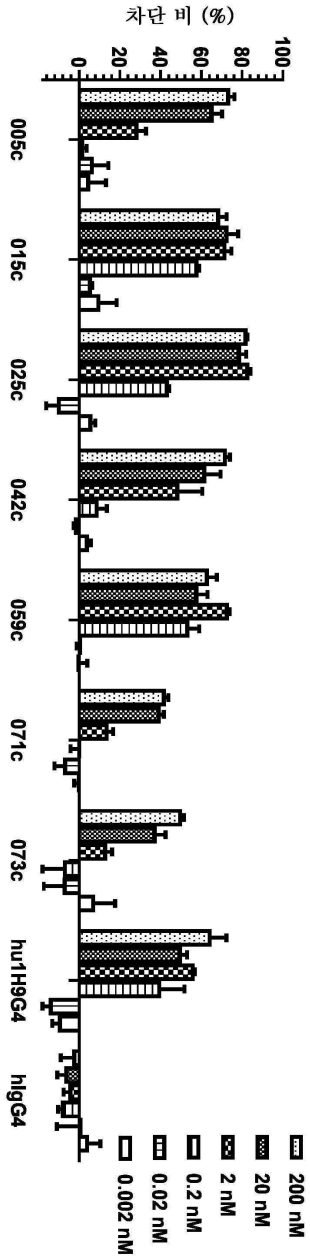
도면7b


100
80
60
40
20
0
% 차단
10-2
10-1
100
101
102
Ab 농도 (nM)
025c
015c
042c
071c
073c
hu1H9G4

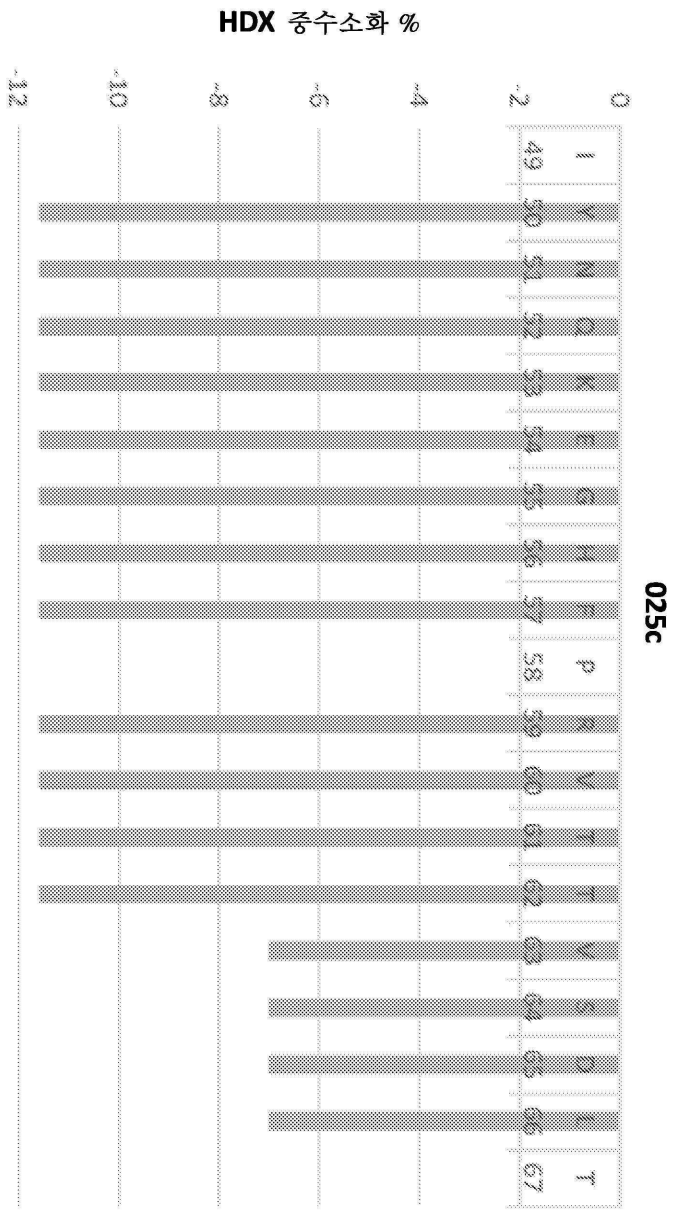
도면8a


SIRPα/SHP1 동원 검정
Jurkat
CD47
SIRPα
CD47
SIRPα
α-CD47
α-SIRPα
K562/ SIRPα
/SHP1
SHP1
ED
EA
기질
광
SHP1
EA
ED
기질
광 없음

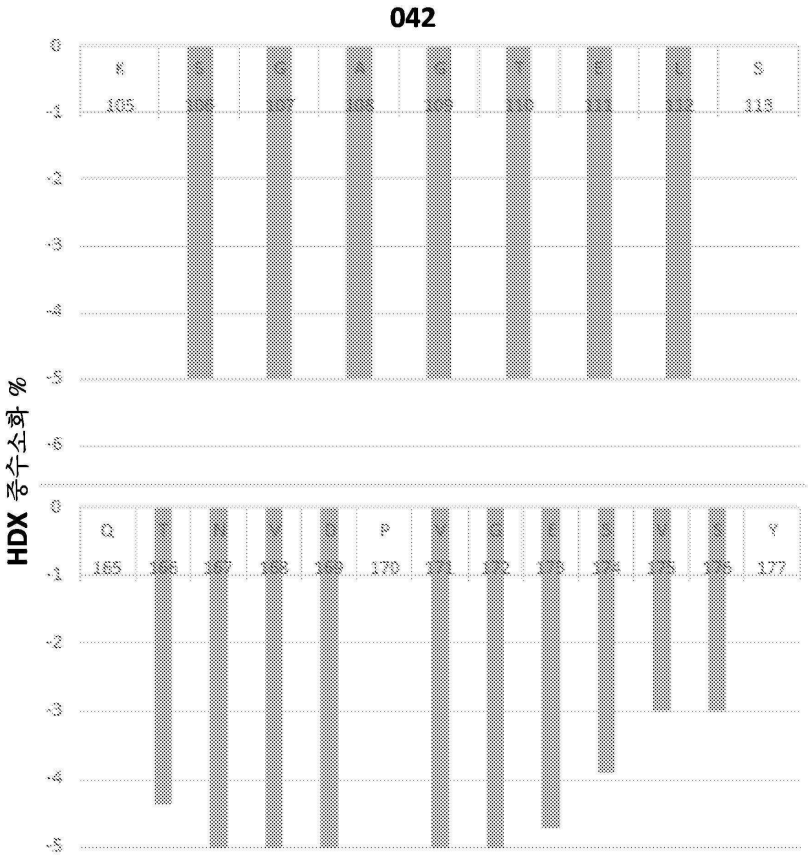
도면8b


차단 비 (%)
0
20
40
60
80
100
005c
015c
025c
042c
059c
071c
073c
hu1H9G4
hIgG4
200 nM
20 nM
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM

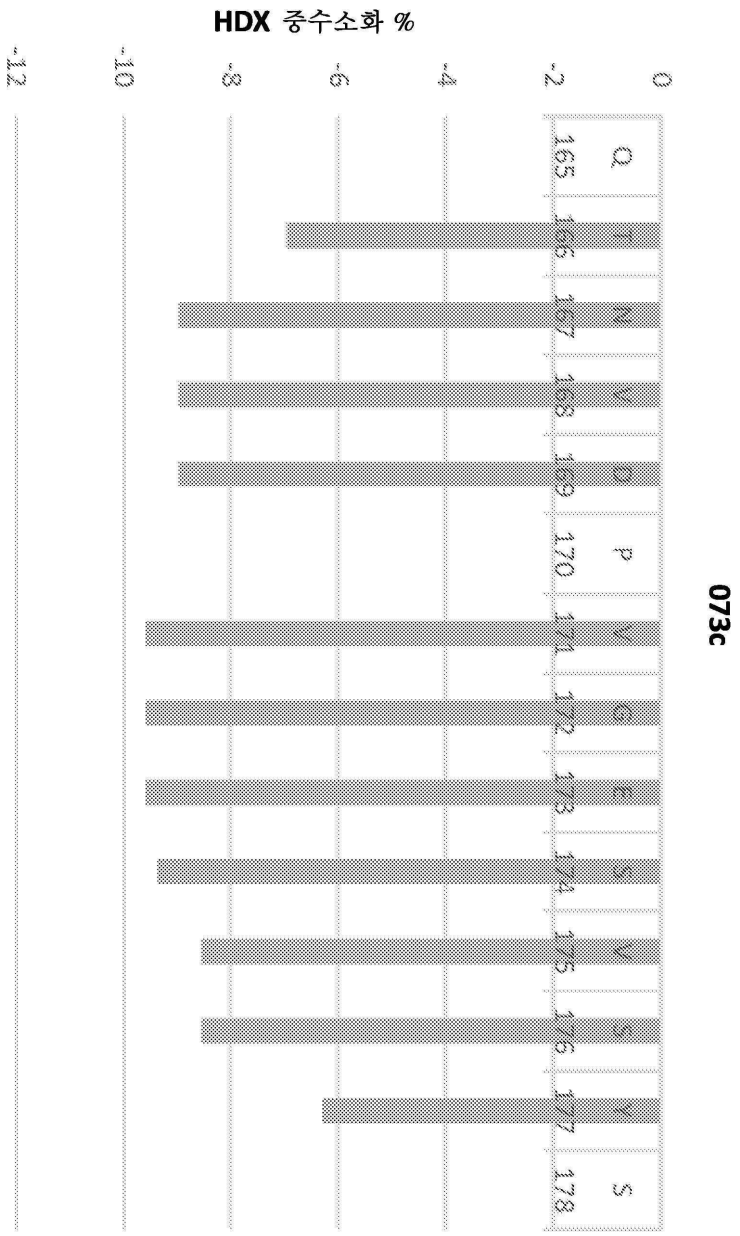
도면9a


HDX 중수소화 %
-12
-10
-8
-6
-4
-2
0
025c
I 49
K 50
N 51
Q 52
K 53
E 54
Q 55
K 56
K 57
P 58
K 59
K 60
T 61
T 62
K 63
E 64
D 65
E 66
T 67

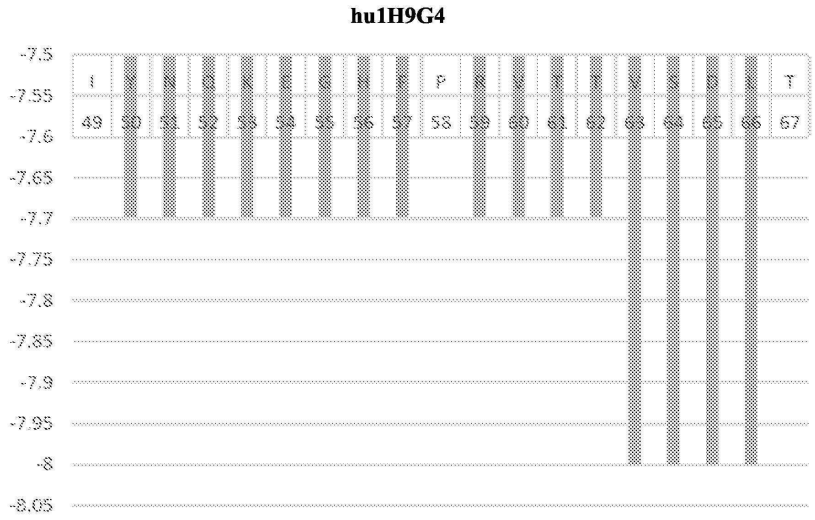
도면9b



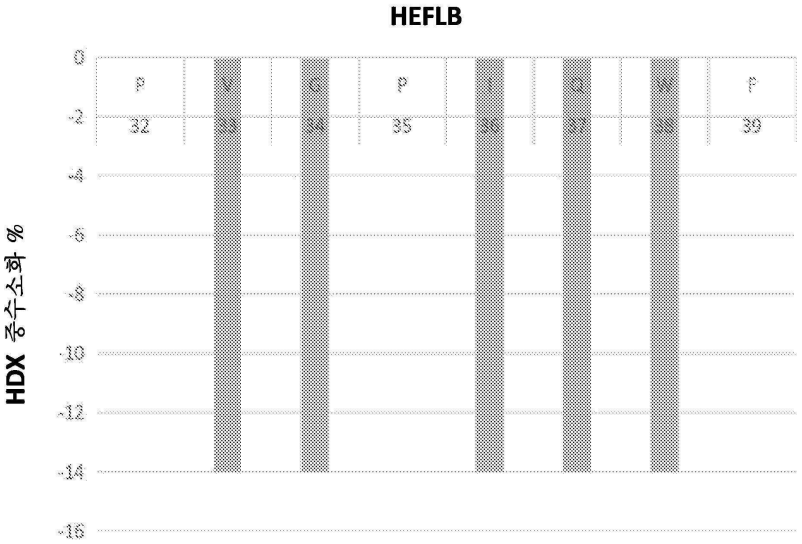
도면9c


HDX 중수소화 %
-12
-10
-8
-6
-4
-2
0
165 Q
166 T
167 N
168 V
169 D
170 P
171 K
172 G
173 E
174 S
175 V
176 S
177 A
178 S
073c

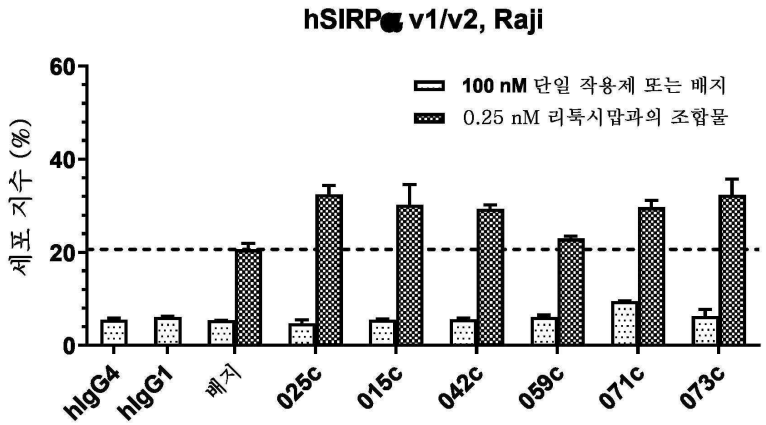
도면9d



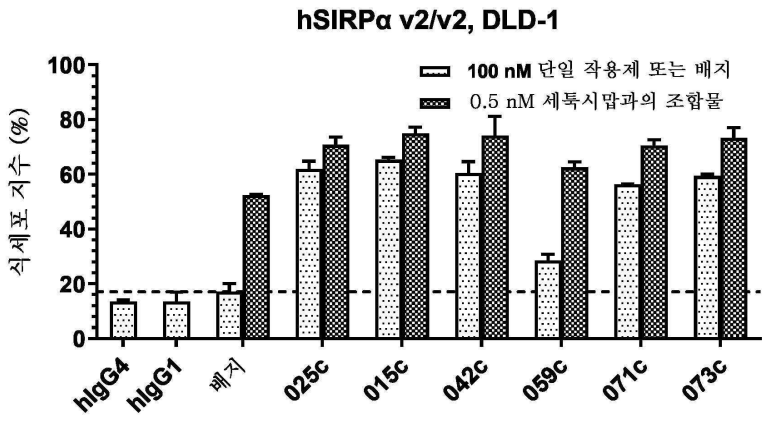
도면9e



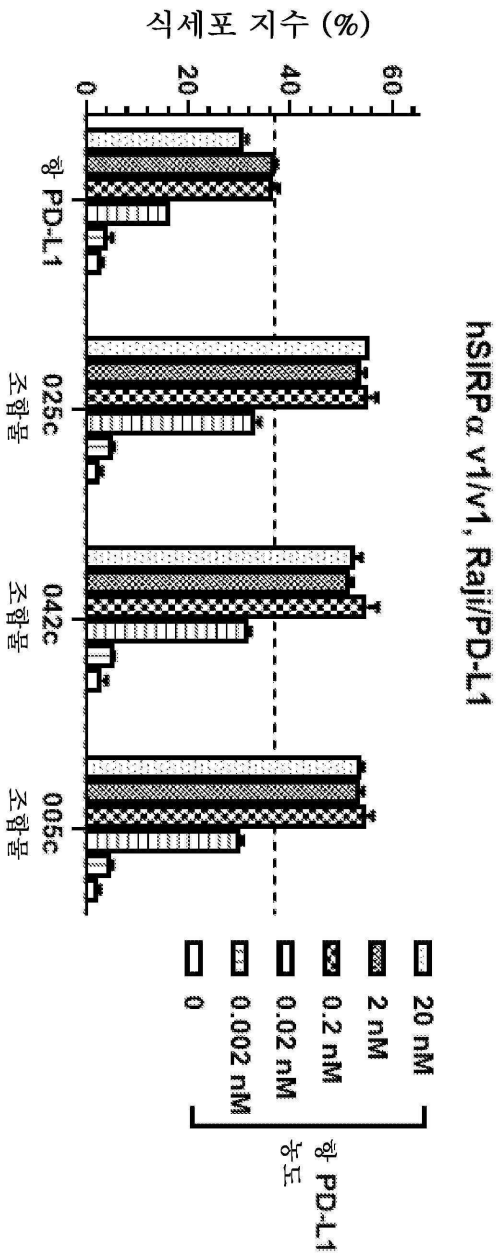
도면10a



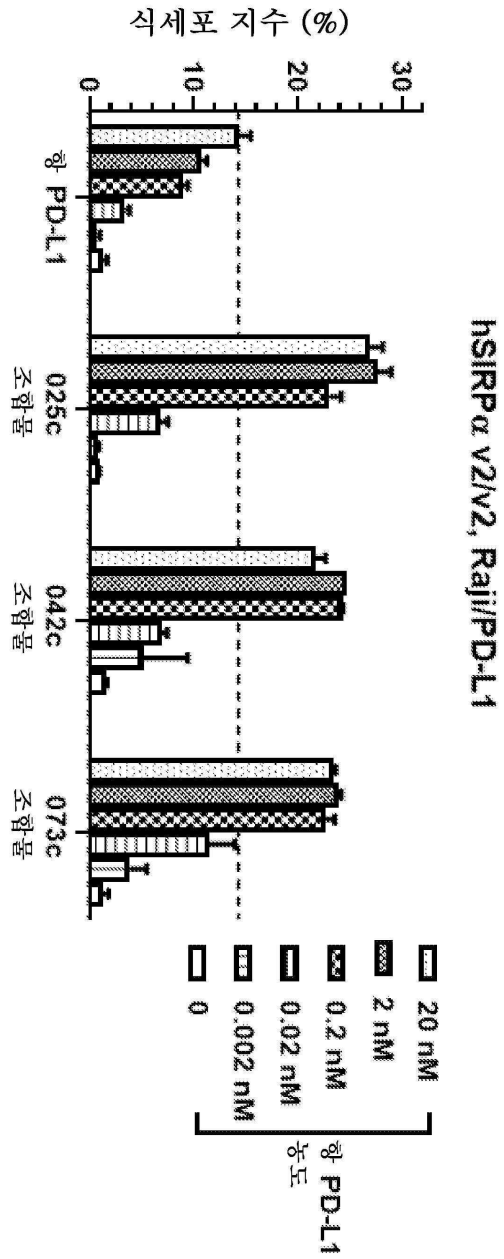
도면10b


hSIRPα v2/v2, DLD-1
100 nM 단일 작용제 또는 배지
0.5 nM 세툭시맙과의 조합물
식세포 지수 (%)
100
80
60
40
20
0
hIgG4
hIgG1
배지
025c
015c
042c
059c
071c
073c

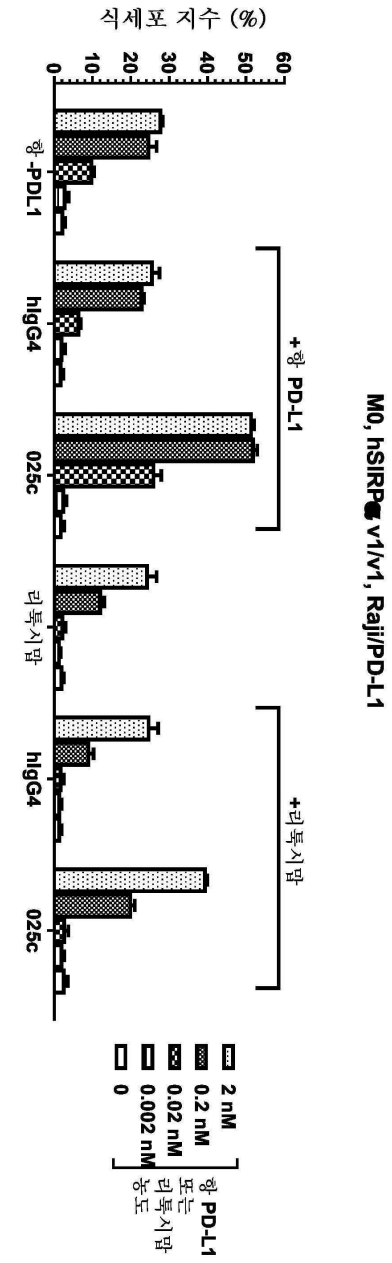
도면10c


식세포 지수 (%)
0
20
40
60
항 PD-L1
조합물 025c
조합물 042c
조합물 005c
hSIRPα v1/v1, Raji/PD-L1
20 nM
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM
0
항 PD-L1 농도

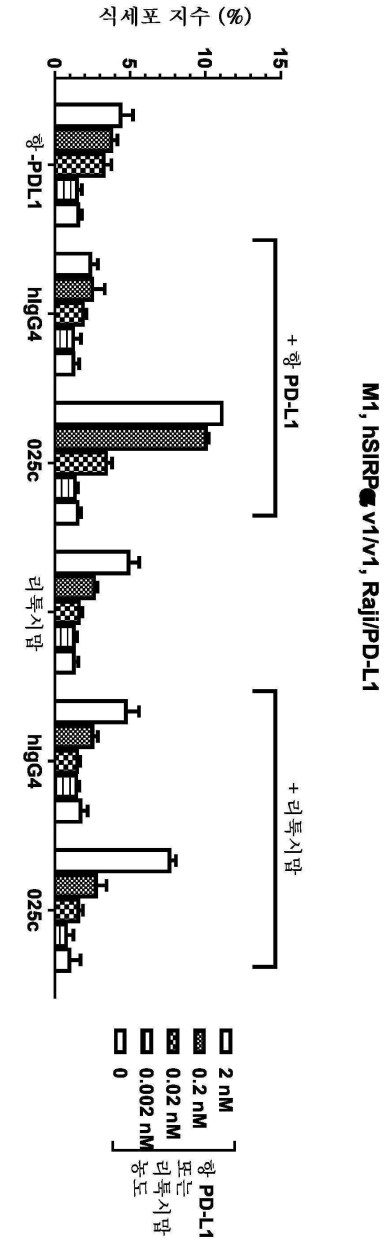
도면10d


식세포 지수 (%)
0
10
20
30
항 PD-L1
025c 조합물
042c 조합물
073c 조합물
hSIRPα v2/v2, Raji/PD-L1
20 nM
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM
0
항 PD-L1 농도

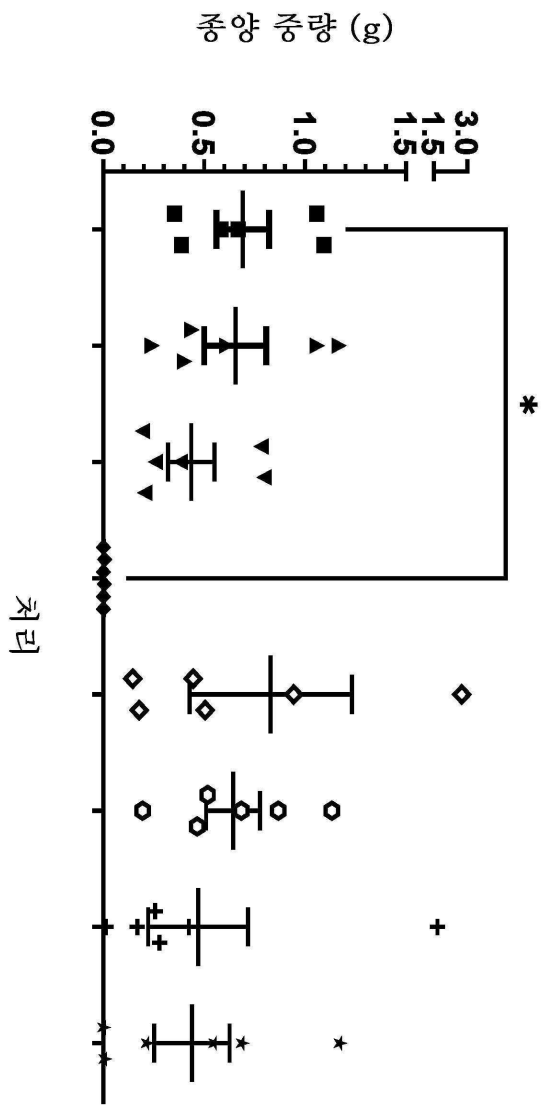
도면11a


식세포 지수 (%)
0
10
20
30
40
50
60
항 -PDL1
hIgG4
025c
리툭시맙
hIgG4
025c
+항 PD-L1
+리툭시맙
M0, hSIRPα v1/v1, Raji/PD-L1
항 PD-L1 또는 리툭시맙 농도
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM
0

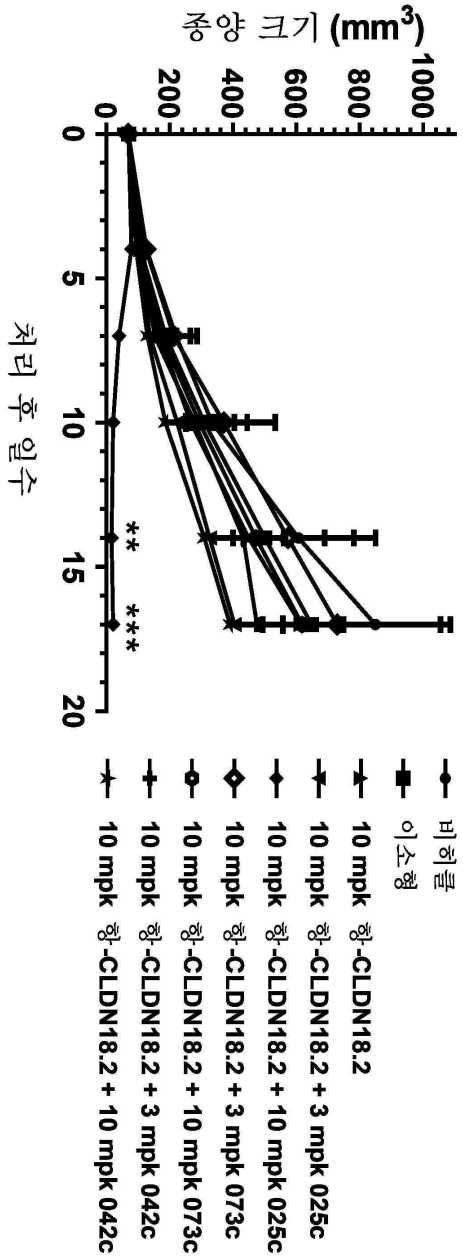
도면11b


식세포 지수 (%)
0
5
10
15
항-PDL1
hIgG4
025c
리툭시맙
hIgG4
025c
+ 항 PD-L1
+ 리툭시맙
M1, hSIRPγ v1/v1, Raji/PD-L1
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM
0
항 PD-L1 또는 리툭시맙 농도

도면12a

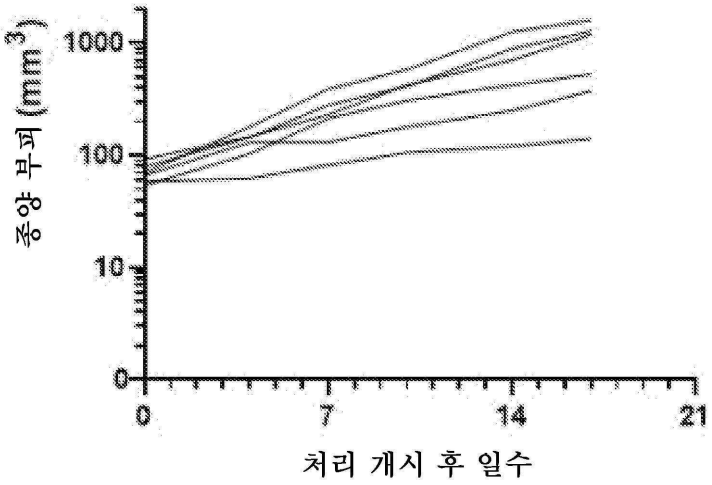


도면12b

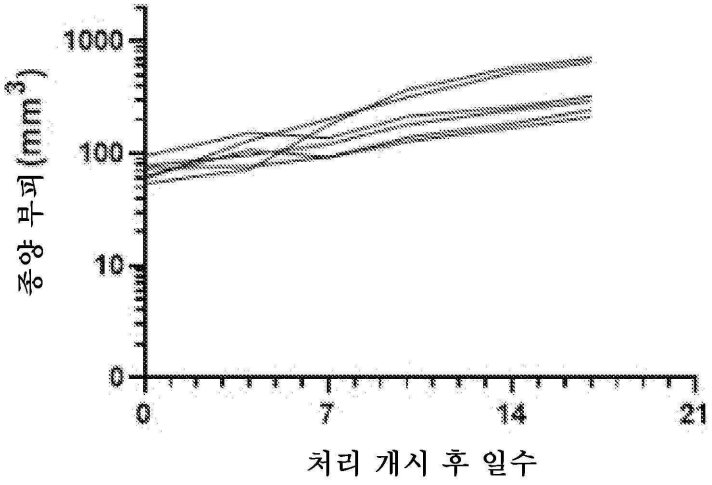

종양 크기 (mm3)
0
200
400
600
800
1000
처리 후 일수
0
5
10
15
20
**
***
비히클
이소형
10 mpk 항-CLDN18.2
10 mpk 항-CLDN18.2 + 3 mpk 025c
10 mpk 항-CLDN18.2 + 10 mpk 025c
10 mpk 항-CLDN18.2 + 3 mpk 073c
10 mpk 항-CLDN18.2 + 10 mpk 073c
10 mpk 항-CLDN18.2 + 3 mpk 042c
10 mpk 항-CLDN18.2 + 10 mpk 042c

도면12ca

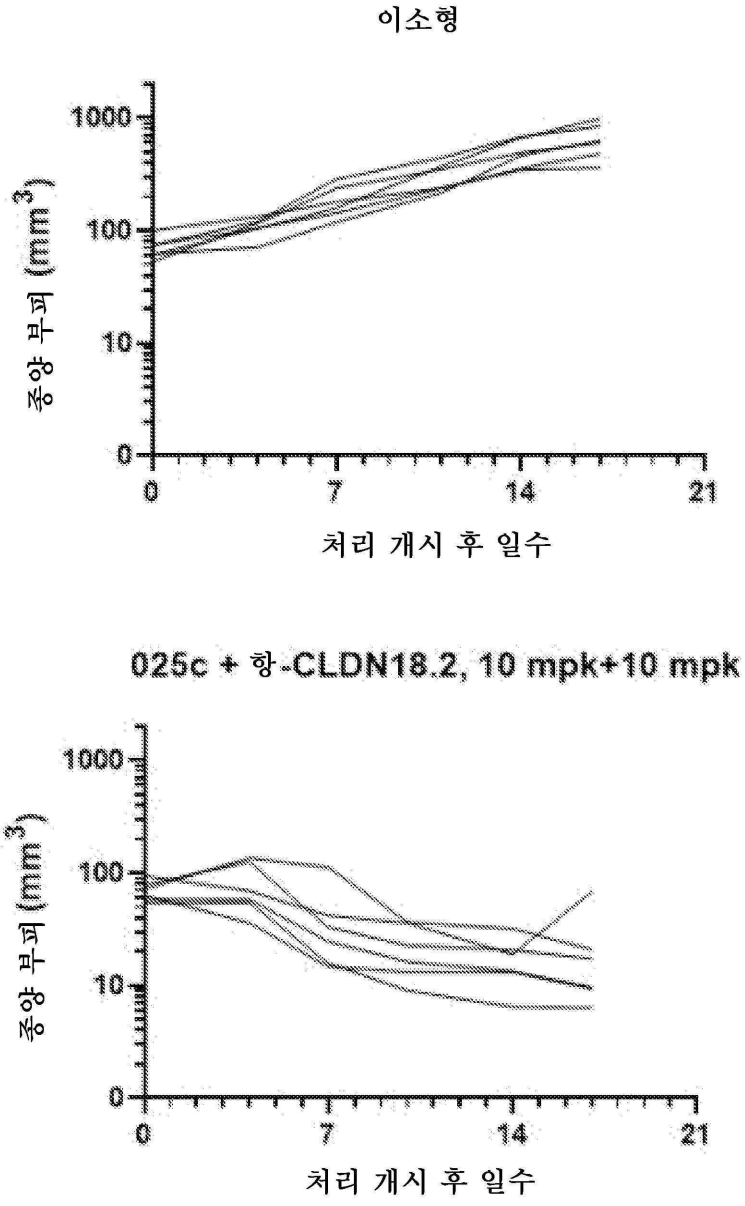
비히클



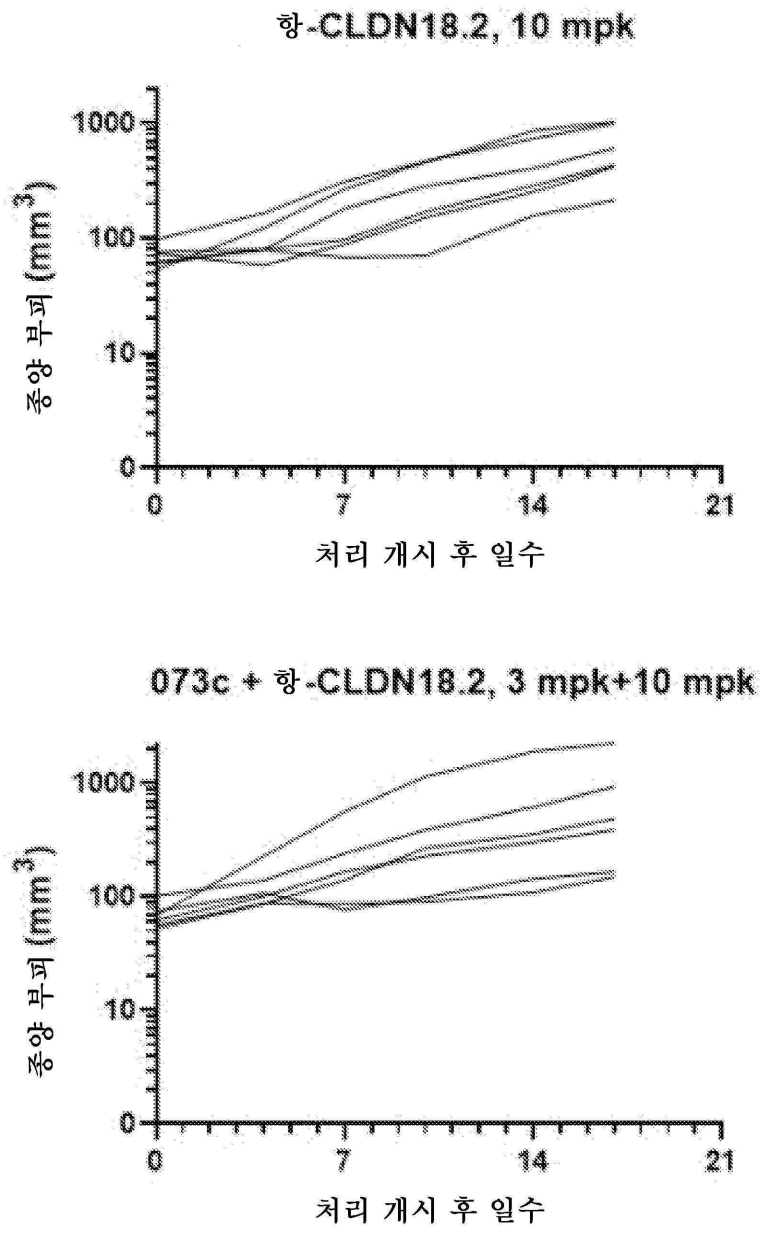
025c + 항-CLDN18.2, 3 mpk+10 mpk



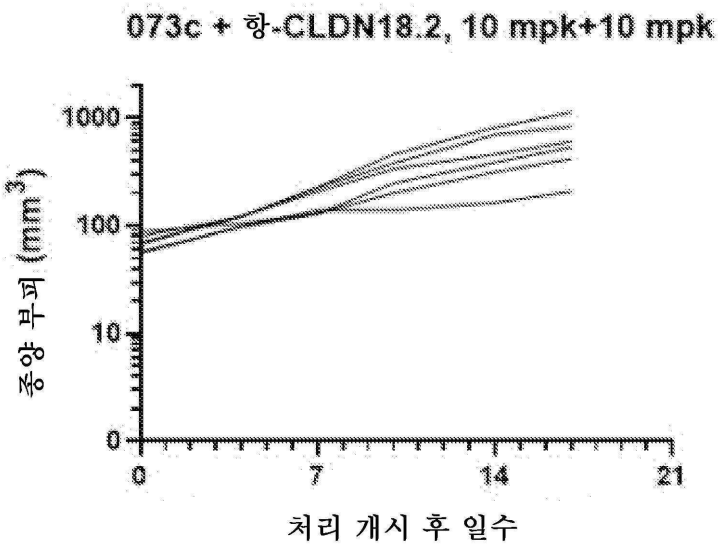
도면12cb

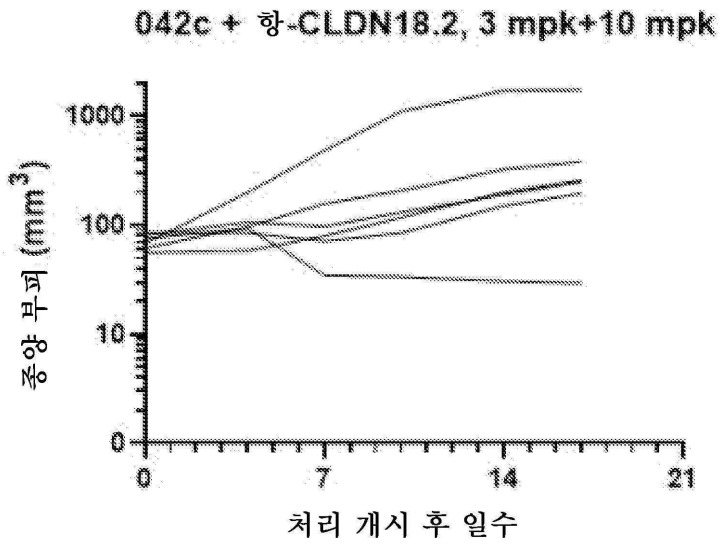

이소형
종양 부피 (mm3)
1000
100
10
0
0
7
14
21
처리 개시 후 일수
025c + 항-CLDN18.2, 10 mpk+10 mpk
종양 부피 (mm3)
1000
100
10
0
0
7
14
21
처리 개시 후 일수

도면12cc

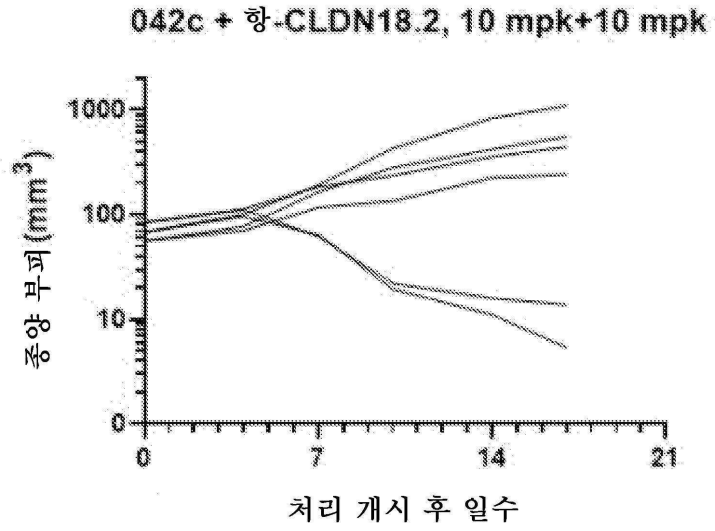

항-CLDN18.2, 10 mpk
종양 부피 (mm3)
1000
100
10
0
0
7
14
21
처리 개시 후 일수
073c + 항-CLDN18.2, 3 mpk+10 mpk
종양 부피 (mm3)
1000
100
10
0
0
7
14
21
처리 개시 후 일수

도면12cd

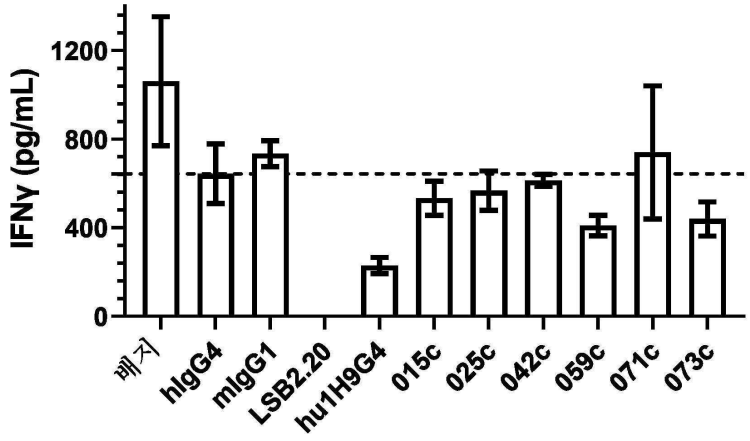

073c + 항-CLDN18.2, 10 mpk+10 mpk
종양 부피 (mm3)
1000
100
10
0
0
7
14
21
처리 개시 후 일수


042c + 항-CLDN18.2, 3 mpk+10 mpk
종양 부피 (mm3)
1000
100
10
0
0
7
14
21
처리 개시 후 일수

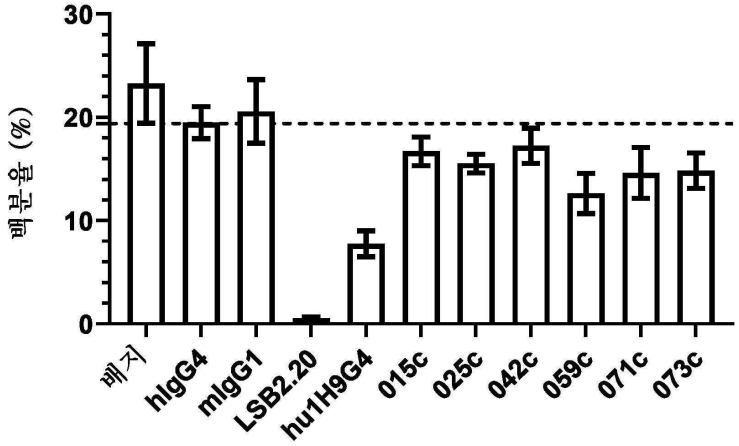
도면12ce



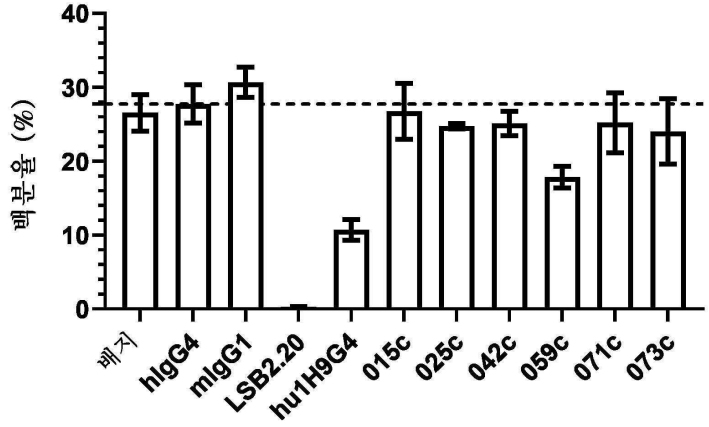
도면13a



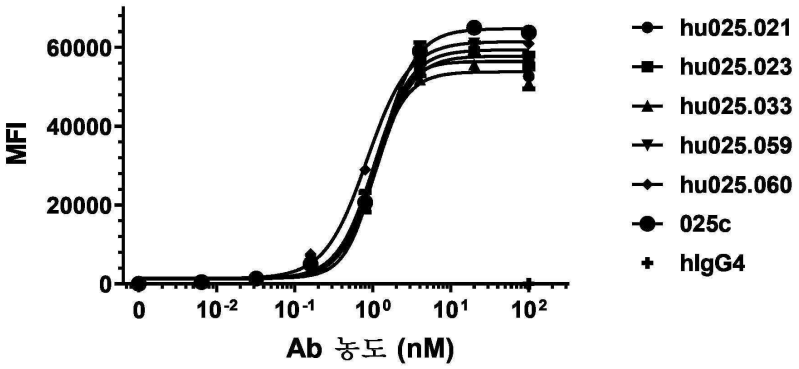
도면13b



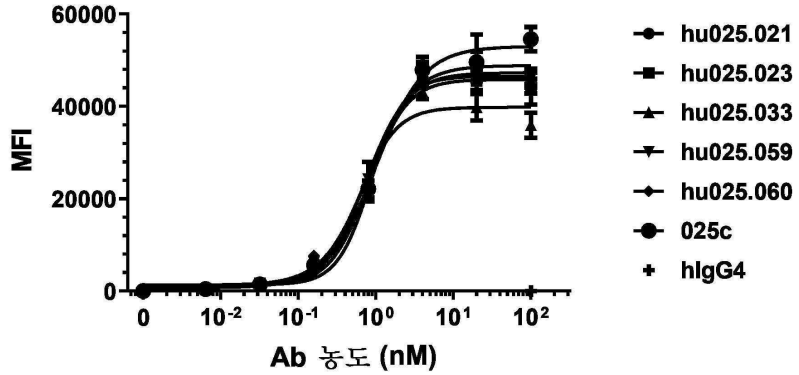
도면13c



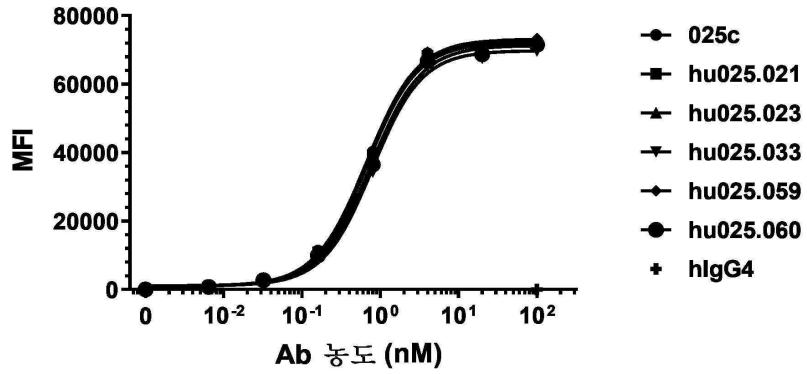
도면14a



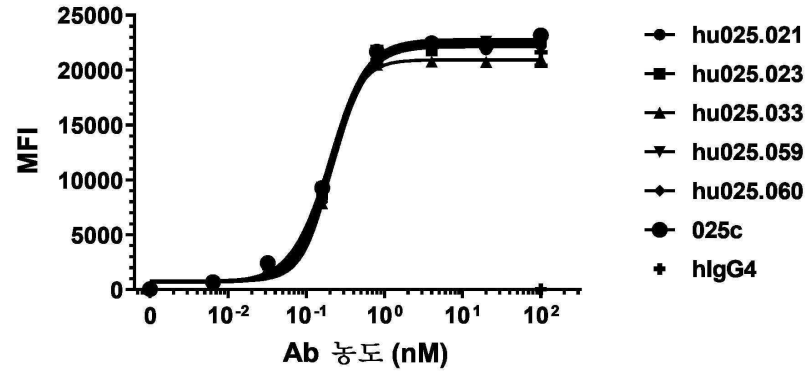
도면14b



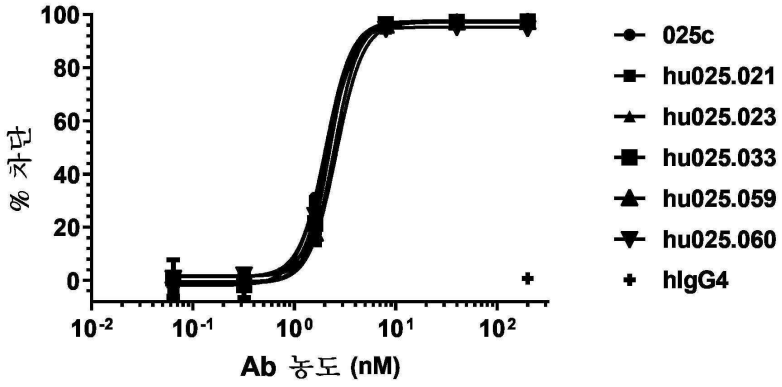
도면14c



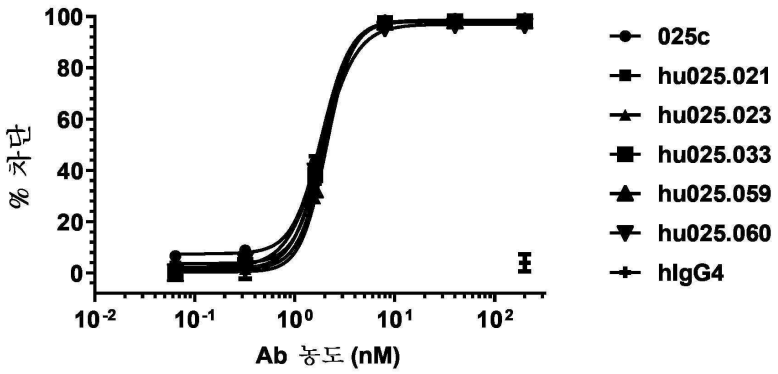
도면14d



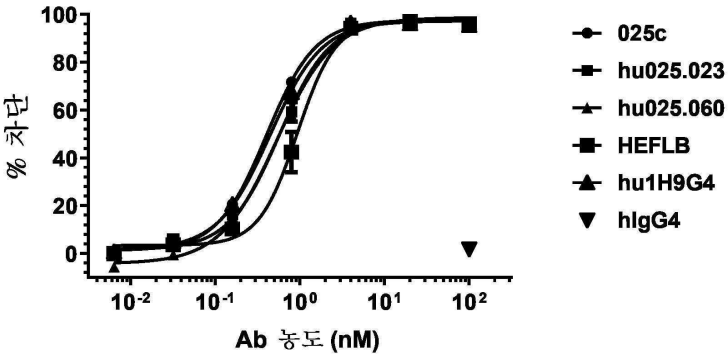
도면15a



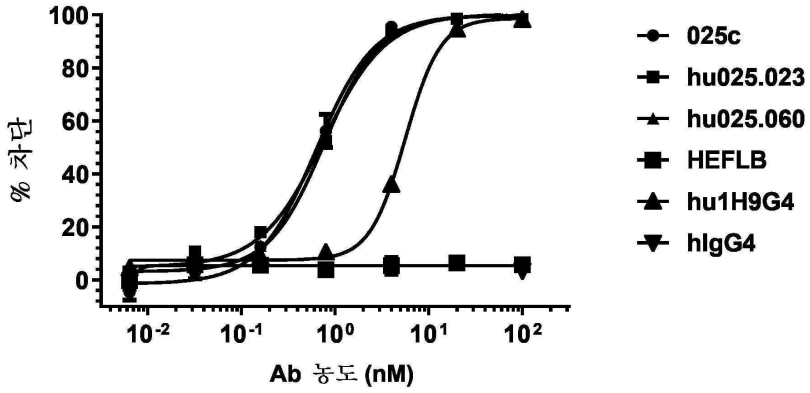
도면15b



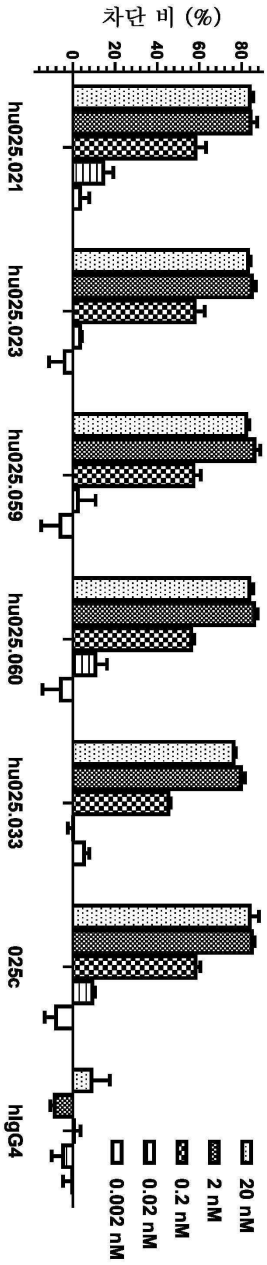
도면16a



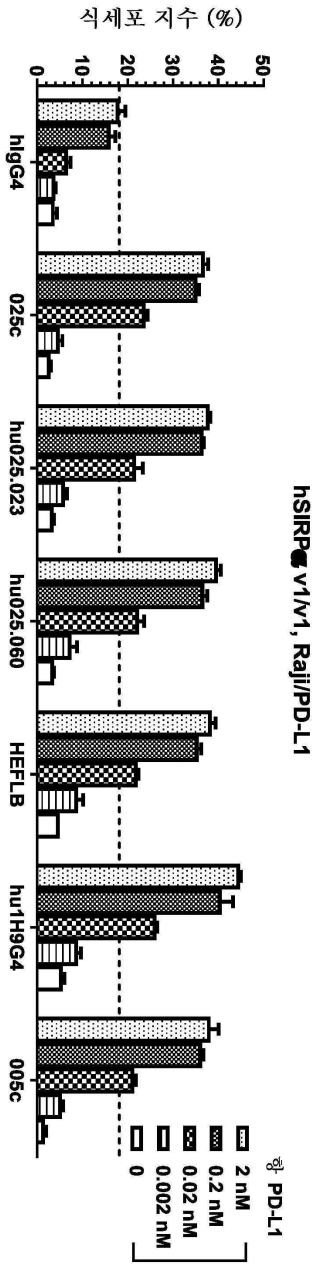
도면16b



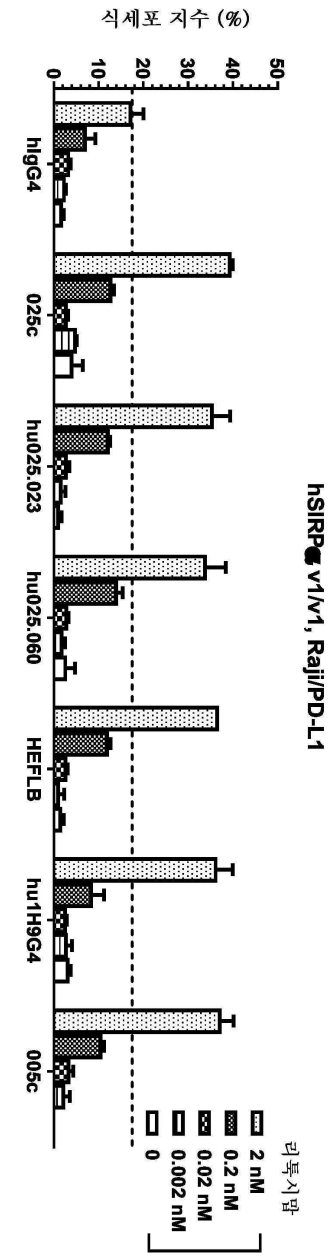
도면17


차단 비 (%)
0
20
40
60
80
hu025.021
hu025.023
hu025.059
hu025.060
hu025.033
025c
hIgG4
20 nM
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM

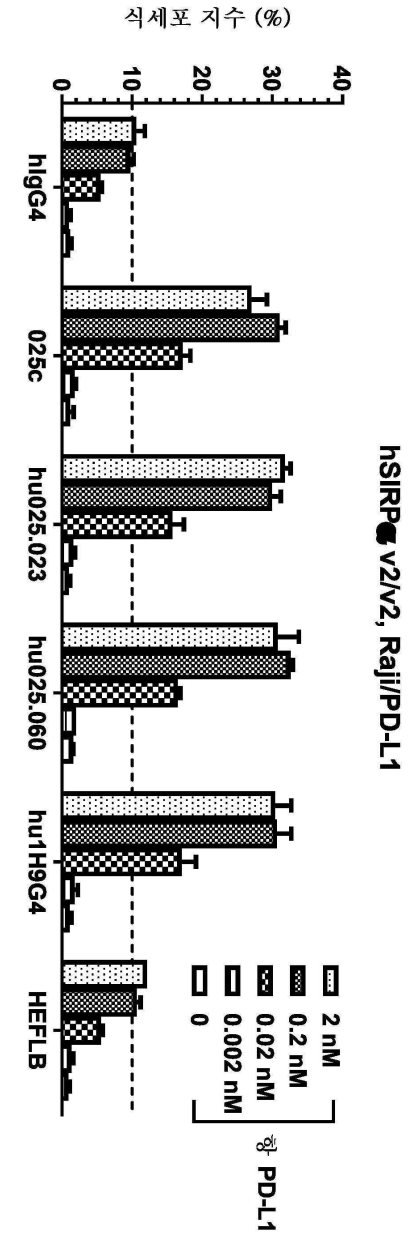
도면18a


식세포 지수 (%)
0
10
20
30
40
50
hIgG4
025c
hu025.023
hu025.060
HEFLB
hu1H9G4
005c
hSIRPα v1/v1, Raji/PD-L1
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM
0
hPD-L1

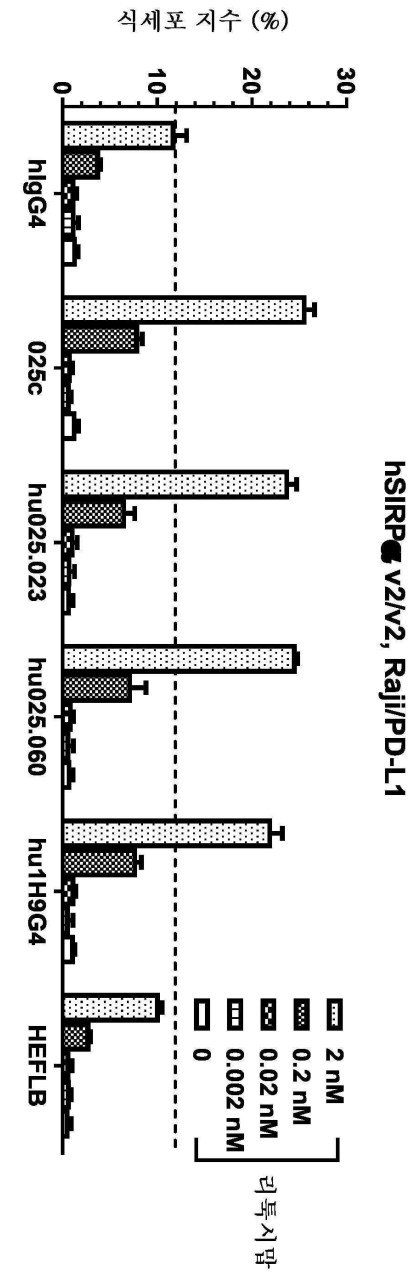
도면18b


식세포 지수 (%)
0
10
20
30
40
50
hIgG4
025c
hu025.023
hu025.060
HEFLB
hu1H9G4
005c
hSIRPα v1/v1, Raji/PD-L1
리툭시맙
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM
0

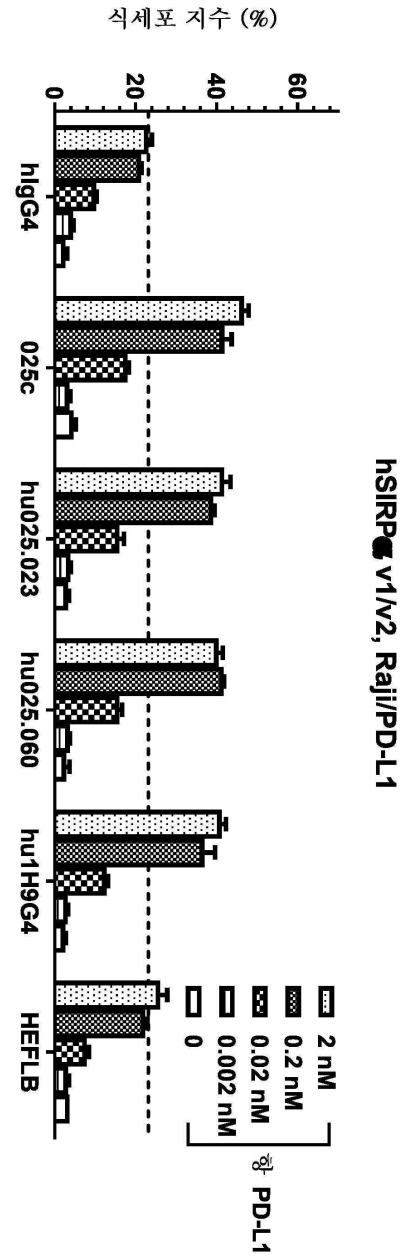
도면18c


식세포 지수 (%)
0
10
20
30
40
hIgG4
025c
hu025.023
hu025.060
hu1H9G4
HEFLB
hSIRPα v2/v2, Raji/PD-L1
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM
0
항 PD-L1

도면18d


식세포 지수 (%)
0
10
20
30
hIgG4
025c
hu025.023
hu025.060
hu1H9G4
HEFLB
hSIRPα v2/v2, Raji/PD-L1
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM
0
리툭시맙

도면18e


식세포 지수 (%)
0
20
40
60
hIgG4
025c
hu025.023
hu025.060
hu1H9G4
HEFLB
hSIRPα v1/v2, Raji/PD-L1
2 nM
0.2 nM
0.02 nM
0.002 nM
0
항 PD-L1

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.