(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년03월26일
(11) 등록번호 10-2650524
(24) 등록일자 2024년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7019398
(22) 출원일자(국제) 2017년12월08일
심사청구일자 2020년12월07일
(85) 번역문제출일자 2019년07월04일
(65) 공개번호 10-2019-0091330
(43) 공개일자 2019년08월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/065366
(87) 국제공개번호 WO 2018/107058
국제공개일자 2018년06월14일
(30) 우선권주장
62/432,503 2016년12월09일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2013056352 A1*
J Immunol., 제179권, 7741-7750면 (2007)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
알렉터 엘엘씨
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 스위트 600 오이스터 포인트 불러바드 131
(72) 발명자
핀세틱, 앤드류
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 스위트 #300 오이스터 포인트 불러바드 151 알렉터 엘엘씨 내
로젠탈, 아논
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 스위트 #300 오이스터 포인트 불러바드 151 알렉터 엘엘씨 내
이, 승주
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코 스위트 #300 오이스터 포인트 불러바드 151 알렉터 엘엘씨 내
(74) 대리인
양영준, 이상남

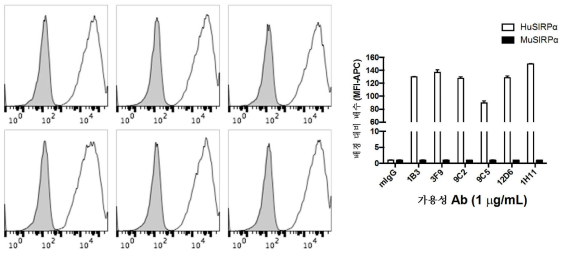
전체 청구항 수 : 총 39 항 심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 **항-SIRP-알파 항체 및 그의 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 항-SIRPA 항체, 이러한 항체를 생성하는 방법, 및 상기 항체를 채용하는 치료 용도 및 방법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/732 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/77 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 항-시그널 조절성 단백질 α (SIRPA)에 선택적으로 결합하는 단리된 항-SIRPA 항체이며, 상기 항체는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3를 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역, 및 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3를 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역을 포함하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 항체가 세포 상에서 발현된 SIRPA에의 CD47의 결합을 실질적으로 차단하지 않거나, SIRPA에의 항체의 결합이 세포 표면 상에서 발현된 SIRPA의 수준을 저하시키거나, 항체가 SIRPA의 D2 또는 D3 도메인에 결합하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, VH 영역이 서열식별번호: 52 또는 서열식별번호: 53의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, VL 영역이 서열식별번호: 59의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, VH 영역이 서열식별번호: 52 또는 서열식별번호: 53의 아미노산 서열을 포함하고, VL 영역이 서열식별번호: 59의 아미노산 서열을 포함하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 항체가 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 VH 서열 및 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 VL 서열을 포함하는 항체와 경쟁하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, 항-SIRPA 항체가 인간 SIRPA의 1종 이상의 다형성 변이체에 결합하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, 항-SIRPA 항체가, (a) SIRPA 분해, SIRPA 절단, SIRPA 내재화, SIRPA 쉐딩, SIRPA 발현의 하향조절, 또는 이들의 임의의 조합을 유도하거나; (b) 생체내에서 SIRPA의 세포 수준을 저하시키거나; (c) SIRPA의 세포 표면 클러스터링을 억제하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 9

제1항에 있어서, 항체가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 SIRPA 활성을 상쇄시키는 것인 단리된 항-SIRPA 항체:

(a) 1종 이상의 SIRPA 리간드에의 SIRPA 결합, 여기서 1종 이상의 SIRPA 리간드는 CD47, 계면활성제 단백질 A 및 D, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택됨;

(b) 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, M1 대식세포, M1 호중구, M1 NK 세포, 활성화된 M1 대식세포, 활성화된 M1 호중구, 활성화된 M1 NK 세포, M2 대식세포, M2 호중구, M2 NK 세포, 단핵

구, 파골세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 과립구, 소교세포, M1 소교세포, 활성화된 M1 소교세포, 및 M2 소교세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 세포의 증식의 저하;

(c) 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, M1 대식세포, M1 호중구, M1 NK 세포, 활성화된 M1 대식세포, 활성화된 M1 호중구, 활성화된 M1 NK 세포, M2 대식세포, M2 호중구, M2 NK 세포, 단핵구, 파골세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 과립구, 소교세포, M1 소교세포, 활성화된 M1 소교세포, 및 M2 소교세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 세포의 이동의 억제;

(d) 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, M1 대식세포, M1 호중구, M1 NK 세포, 활성화된 M1 대식세포, 활성화된 M1 호중구, 활성화된 M1 NK 세포, M2 대식세포, M2 호중구, M2 NK 세포, 단핵구, 파골세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 과립구, 소교세포, M1 소교세포, 활성화된 M1 소교세포, 및 M2 소교세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 세포의 1종 이상의 기능의 억제;

(e) 아폽토시스성 뉴런 클리어런스, 신경 조직 데브리스 클리어런스, 기능이상적 시냅스 클리어런스, 비-신경 조직 데브리스 클리어런스, 박테리아 클리어런스, 다른 외래 소체 클리어런스, 질환-유발 단백질 클리어런스, 질환-유발 펩티드 클리어런스, 및 종양 세포 클리어런스로 이루어진 군으로부터 선택되는 클리어런스 중 1종 이상의 유형의 억제; 여기서 질환-유발 단백질은 아밀로이드 베타, 올리고머성 아밀로이드 베타, 아밀로이드 베타 플라크, 아밀로이드 전구체 단백질 또는 그의 단편, Tau, IAPP, 알파-시누클레인, TDP-43, FUS 단백질, C9orf72(염색체 9 오픈 리딩 프레임 72), c9RAN 단백질, 프리온 단백질, PrPSc, 헌팅틴, 칼시토닌, 슈퍼옥시드 디스뮤타제, 아탁신, 아탁신 1, 아탁신 2, 아탁신 3, 아탁신 7, 아탁신 8, 아탁신 10, 루이 소체, 심방 나트륨이뇨 인자, 섬 아밀로이드 폴리펩티드, 인슐린, 아포지단백질 AI, 혈청 아밀로이드 A, 메딘, 프로락틴, 트랜스티레틴, 리소자임, 베타 2 마이크로글로불린, 겔솔린, 케라토에피텔린, 시스타틴, 이뮤노글로불린 경쇄 AL, S-IBM 단백질, 반복부-연관된 비-ATG(RAN) 번역 산물, 디펩티드 반복(DPR) 펩티드, 글리신-알라닌(GA) 반복 펩티드, 글리신-프롤린(GP) 반복 펩티드, 글리신-아르기닌(GR) 반복 펩티드, 프롤린-알라닌(PA) 반복 펩티드, 유비퀴틴, 및 프롤린-아르기닌(PR) 반복 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되고, 종양 세포는 방광암, 뇌암, 유방암, 결장암, 직장암, 자궁내막암, 신장암, 신세포암, 신우암, 백혈병, 폐암, 흑색종, 비-호지킨 림프종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 섬유육종, 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암으로부터의 것임;

(f) 소교세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 호중구, T 세포, T 헬퍼 세포, 및 세포독성 T 세포 중 1종 이상에 의한 종양 세포 살해의 억제;

(g) 소교세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 및 세포독성 T 세포 중 1종 이상의 항-종양 세포 증식 활성의 억제;

(h) 1종 이상의 염증성 수용체의 조정된 발현, 여기서 1종 이상의 염증성 수용체는 CD86을 포함하고, 1종 이상의 염증성 수용체는 소교세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 또는 세포독성 T 세포 중 1종 이상 상에서 발현됨;

(i) 면역억제자 수지상 세포, 면역억제자 대식세포, 면역억제자 호중구, 면역억제자 NK 세포, 골수-유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 종양-연관된 호중구, 종양-연관된 NK 세포, 및 조절성 T 세포 중 1종 이상의 기능성의 촉진 또는 구출;

(j) 면역억제자 수지상 세포, 면역억제자 대식세포, 면역억제자 호중구, 면역억제자 NK 세포, 골수-유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 종양-연관된 호중구, 종양-연관된 NK 세포, 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포, 및 조절성 T 세포 중 1종 이상의 종양 내로의 침윤의 증가;

(k) 종양, 말초 혈액, 또는 다른 림프 기관에서의 종양-촉진 골수/과립구 면역-억제성 세포 또는 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포의 수의 증가;

(l) 골수-유래된 억제자 세포 또는 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포의 종양-촉진 활성의 증진;

(m) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 또는 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포의 생존의 증진;

(n) 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 T 림프구의 활성화의 저하;

(o) 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 NK 세포의 침윤의 저하;

(p) 종양 부피의 증가;

(q) 종양 성장 속도의 증가; 및

(r) 항-종양 T 세포 반응을 조정하고, PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, TREM1, TREM2, CD39, CD73, CSF-1 수용체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 표적 단백질을 표적화하는 1종 이상의 면역-요법 또는 1종 이상의 암 백신의 효능의 저하.

청구항 10

제1항에 있어서, 항체가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 활성 중 1종 이상을 유도하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체:

(a) 종양 침윤 CD3+ T 세포의 수의 증가;

(b) 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포에서의 SIRPA의 세포 수준의 저하, 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 종양 침윤 세포이거나 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 혈액에 존재함;

(c) 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포의 수의 감소, 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 종양 침윤 세포이거나 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 혈액에 존재함;

(d) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 PD-L1 수준의 감소;

(e) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 PD-L2 수준의 감소;

(f) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 B7-H2 수준의 감소;

(g) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 B7-H3 수준의 감소;

(h) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)에서의 CD200R 수준의 감소;

(i) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 CD163 수준의 감소;

(j) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 CD206 수준의 감소;

(k) 고형 종양의 종양 성장 속도의 저하;

(l) 종양 부피의 감소;

(m) 1종 이상의 PD-1 억제제의 효능의 증가;

(n) CTLA4, 아데노신 경로, PD-L1, PD-L2, OX40, TIM3, LAG3, 및 이들의 임의의 조합 중 1종 이상을 표적화하는 1종 이상의 체크포인트 억제제 요법 또는 면역-조정 요법의 효능의 증가;

(o) 겜시타빈, 카페시타빈, 안트라시클린, 독소루비신 (아드리아마이신(Adriamycin)®), 에피루비신 (엘렌스(Ellence)®), 탁산, 파클리탁셀 (탁솔(Taxol)®), 도세탁셀 (탁소테레(Taxotere)®), 5-플루오로우라실 (5-FU), 시클로포스파미드 (시톡산(Cytoxan)®), 카르보플라틴 (파라플라틴(Paraplatin)®), 및 이들의 임의의 조합 중 1종 이상의 화학요법제의 효능의 증가;

(p) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)의 존재 하에서의 T 세포의 증식의 증가;

(q) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)의 분화, 생존, 또는 1종 이상의 기능의 억제; 및

(r) 화학적 또는 방사성 독소에 접합되는 경우에 고형 종양 및 연관된 혈관에서의 CD33-발현 면역억제자 비-종양형성성 골수 세포 또는 비-종양형성성 CD14-발현 세포의 살해.

청구항 11

제1항에 있어서, 항체가 SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 12

제11항에 있어서, 항-SIRPA 항체가 SIRPA의 세포 수준을 저하시키고 SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의

상호작용을 억제하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 14

제1항에 있어서, 항체가 인간화 항체인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 15

제1항에 있어서, 항체가 Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv 또는 scFv 단편인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 16

제1항에 있어서, 항-SIRPA 항체가 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소형을 갖는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 17

제16항에 있어서, 항체가 억제성 Fc 수용체에 결합하고, 여기서 억제성 Fc 수용체가 억제성 Fc-감마 수용체 IIB(FcγRIIB)이고, 여기서:

(a) 항-SIRPA 항체가 인간 또는 마우스 IgG1 이소형을 갖고, Fc 영역에서 N297A, D265A, D270A, L234A, L235A, G237A, P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환(여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 포함하거나, 또는 Fc 영역에서 글리신 236에 상응하는 위치에서의 아미노산 결실을 포함하거나;

(b) 항-SIRPA 항체가 IgG1 이소형을 갖고, IgG2 이소형 중쇄 불변 도메인 1(CH1) 및 힌지 영역을 포함하며, 여기서 IgG2 이소형 CH1 및 힌지 영역은 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVERKCCVECPPCP(서열식별번호: 34)의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 항체 Fc 영역은 S267E 아미노산 치환, L328F 아미노산 치환 또는 둘 다, 또는 N297A 또는 N297Q 아미노산 치환(여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 포함하거나;

(c) 항-SIRPA 항체가 IgG2 이소형을 갖고, Fc 영역에서 P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C214S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E, H268E, N297A, N297Q, A330L, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환(여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 포함하거나;

(d) 항-SIRPA 항체가 인간 또는 마우스 IgG4 이소형을 갖고, Fc 영역에서 L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E, E233P, F234V, L234A/F234A, S228P, S241P, L248E, T394D, N297A, N297Q, L235E, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환(여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 포함하거나;

(e) 항-SIRPA 항체가 하이브리드 IgG2/4 이소형을 가지며, 여기서 항체는 인간 IgG2의 아미노산 118 내지 260을 포함하는 아미노산 서열 및 인간 IgG4의 아미노산 261 내지 447(여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 포함하는 것인

단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 18

제16항에 있어서,

(a) 항-SIRPA 항체가 인간 또는 마우스 IgG1 이소형을 갖고, Fc 영역에서 N297A, N297Q, D270A, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환(여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 포함하거나;

(b) 항-SIRPA 항체가 IgG2 이소형을 갖고, Fc 영역에서 P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환(여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 포함하거나;

(c) 항-SIRPA 항체가 IgG4 이소형을 갖고, Fc 영역에서 E233P, F234V, L234A/F234A, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환(여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 포함하는 것인

단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 19

제18항에 있어서,

(a) Fc 영역이 A330L, L234F; L235E, P331S, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에서의 1개 이상의 추가적인 아미노산 치환(여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 추가로 포함하거나;

(b) Fc 영역이 M252Y, S254T, T256E, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에서의 1개 이상의 추가적인 아미노산 치환(여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 추가로 포함하거나;

(c) Fc 영역이 EU 넘버링에 따른 S228P 아미노산 치환을 추가로 포함하는 것인

단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 20

제16항에 있어서, 항-SIRPA 항체가 IgG4 이소형을 갖고, 잔기 위치 228에서의 S228P 아미노산 치환, 잔기 위치 234에서의 F234A 아미노산 치환, 및 잔기 위치 235에서의 L235A 아미노산 치환(여기서 잔기 위치의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 포함하는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 21

제1항에 있어서, 항체가 이중특이적 항체이고, 제1 및 제2 항원을 인식하며, 여기서 제1 항원은 SIRPA이고, 제2 항원은 하기 항원인 단리된 항-SIRPA 항체:

(a) 혈액-뇌-장벽을 가로지르는 수송을 용이하게 하는 항원;

(b) 트랜스페린 수용체(TR), 인슐린 수용체(HIR), 인슐린-유사 성장 인자 수용체(IGFR), 저-밀도 지단백질 수용체 관련된 단백질 1 및 2(LPR-1 및 2), 디프테리아 독소 수용체, CRM197, 라마 단일 도메인 항체, TMEM 30(A), 단백질 전달 도메인, TAT, Syn-B, 페네트라틴, 폴리-아르기닌 펩티드, 안지오펩 펩티드, 및 ANG1005로 이루어진 군으로부터 선택되는 혈액-뇌-장벽을 가로지르는 수송을 용이하게 하는 항원;

(c) 질환-유발 펩티드 또는 단백질, 또는 질환-유발 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환-유발제, 여기서 질환-유발 핵산은 안티센스 GGCCCC (G2C4) 반복부-확장 RNA이고, 질환-유발 단백질은 아밀로이드 베타, 올리고머성 아밀로이드 베타, 아밀로이드 베타 플라크, 아밀로이드 전구체 단백질 또는 그의 단편, Tau, IAPP, 알파-시누클레인, TDP-43, FUS 단백질, C9orf72(염색체 9 오픈 리딩 프레임 72), c9RAN 단백질, 프리온 단백질, PrPSc, 헌팅틴, 칼시토닌, 슈퍼옥시드 디스뮤타제, 아탁신, 아탁신 1, 아탁신 2, 아탁신 3, 아탁신 7, 아탁신 8, 아탁신 10, 루이 소체, 심방 나트륨이뇨 인자, 섬 아밀로이드 폴리펩티드, 인슐린, 아포지단백질 AI, 혈청 아밀로이드 A, 메딘, 프로락틴, 트랜스티레틴, 리소자임, 베타 2 마이크로글로불린, 겔솔린, 케라토에피텔린, 시스타틴, 이뮤노글로불린 경쇄 AL, S-IBM 단백질, 반복부-연관된 비-ATG (RAN) 번역 산물, 디펩티드 반복(DPR) 펩티드, 글리신-알라닌(GA) 반복 펩티드, 글리신-프롤린(GP) 반복 펩티드, 글리신-아르기닌(GR) 반복 펩티드, 프롤린-알라닌(PA) 반복 펩티드, 유비퀴틴, 및 프롤린-아르기닌(PR) 반복 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택됨; 또는

(d) 면역 세포 상에서 발현되는 리간드 또는 단백질, 여기서 리간드 또는 단백질은 PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73, 및 포스파티딜세린;

및 1종 이상의 종양 세포 상에서 발현되는 단백질, 지질, 폴리사카라이드, 또는 당지질로 이루어진 군으로부터 선택됨.

청구항 22

제1항에 있어서, 항-SIRPA 항체가 검출가능한 마커, 독소, 또는 치료제에 접합된 것이고, 여기서 독소는 리신, 리신 A 쇄, 독소루비신, 다우노루비신, 메이탄시노이드, 탁솔, 에티듐 브로마이드, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 디히드록시 안트라신 디온, 악티노마이신, 디프테리아 독소, 슈도모나스(Pseudomonas) 외독소(PE) A, PE40, 아브린, 아브린 A 쇄, 모덱신 A 쇄, 알파 사르신, 겔로닌, 미토겔린, 레트스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 쿠리신, 크로틴, 칼리케아미신, 사포나리아 오피시날리스(Saponaria officinalis) 억제제, 글루코코르티코이드, 아우리스타틴, 아우로마이신, 이트륨, 비스무트, 콤브레스타틴, 두오카르마이신, 돌라스타틴, cc1065, 및 시스플라틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 항-SIRPA 항체.

청구항 23

암의 치료가 필요한 개체에서의 암을 치료하는 방법에 사용하기 위한 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 항-SIRPA 항체를 포함하는 제약 조성물이며,

여기서 개체는 CD47을 발현하는 종양을 갖거나, SIRPA를 발현하는 골수 계통의 암 세포를 갖는 것인 제약 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 치료는 (a) PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, 또는 CD73을 억제하는 적어도 1종의 치료제;

(b) 항-PD-L1 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L2 항체, 항-PD-1 항체, 항-B7-H3 항체, 항-B7-H4 항체, 및 항-HVEM 항체, 항-B- 및 T-림프구 감쇠자(BTLA) 항체, 항-킬러 억제성 수용체(KIR) 항체, 항-GAL9 항체, 항-TIM-1 항체, 항-TIM3 항체, 항-TIM-4 항체, 항-A2AR 항체, 항-CD39 항체, 항-CD73 항체, 항-LAG-3 항체, 항-포스파티딜세린 항체, 항-CD27 항체, 항-CD30 항체, 항-TNFa 항체, 항-CD33 항체, 항-Siglec-5 항체, 항-Siglec-7 항체, 항-Siglec-9 항체, 항-Siglec-11 항체, 길항제성 항-TREM1 항체, 길항제성 항-TREM2 항체, 항-TIGIT 항체, 항-VISTA 항체, 항-CD2 항체, 항-CD5 항체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 항체 ;

(c) 항-CCL2 항체, 항-CSF-1 항체, 항-IL-2 항체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 항체;

(d) 효능제성 항-CD40 항체, 효능제성 항-OX40 항체, 효능제성 항-ICOS 항체, 효능제성 항-CD28 항체, 효능제성 항-TREM1 항체, 효능제성 항-TREM2 항체, 효능제성 항-CD137/4-1BB 항체, 효능제성 항-CD27 항체, 효능제성 항-글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련된 단백질 GITR 항체, 효능제성 항-CD30 항체, 효능제성 항-BTLA 항체, 효능제성 항-HVEM 항체, 효능제성 항-CD2 항체, 효능제성 항-CD5 항체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 효능제성 항체;

(e) IFN-α4, IFN-β, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, CRP, IL-20 패밀리 구성원, LIF, IFN-γ, OSM, CNTF, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, CXCL10, IL-33, MCP-1, MIP-1-베타, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 자극성 시토카인

을 투여하는 것을 추가로 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 25

제23항에 있어서, 암이 육종, 방광암, 뇌암, 유방암, 결장암, 직장암, 자궁내막암, 신장암, 신우암, 백혈병, 폐암, 흑색종, 림프종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 및 섬유육종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 26

제23항에 있어서, 암이 다형성 교모세포종; 신장 투명 세포 암종; 부신피질 암종; 방광 요로상피 암종; 미만성 거대 B-세포 림프종; 폐 선암종; 췌장 선암종, 신세포암, 비-호지킨 림프종, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 다발성 골수종, 유방 침습성 암종, 자궁경부 편평 세포 암종, 자궁경내막 선암종, 담관암종, 결장 선암종, 식도 암종, 두경부 편평 세포 암종, 신장 혐색소세포, 신장 유두상 세포 암종, 저등급 신경교종, 간세포성 암종, 폐 편평 세포 암종, 중피종, 난소 장액성 낭선암종, 췌장 선암종, 크롬친화세포종 및 부신경절종, 전립선 선암종, 직장 선암종, 피부 흑색종, 위 선암종, 고환 배세포 종양, 갑상선 암종, 흉선종, 자궁체부 자궁내막 암종, 자궁 암육종, 및 포도막 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 27

제23항에 있어서, 생리학상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 제약 조성물.

청구항 28

치매, 전두측두엽 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 혼합형 치매, 타우병증 질환, 파킨슨병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 외상성 뇌 손상, 뇌졸중, 전두측두엽 치매, 척수 손상, 헌팅턴병, 감염, 및 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환, 장애, 또는 손상의 예방, 그의 위험의 감소, 또는 그의 치료를 필요로 하는 개체에서, 상기 질환, 장애, 또는 손상을 예방하거나, 그의 위험을 감소시키거나, 또는 그를 치료하는 방법에 사용하기 위한 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 항-SIRPA 항체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 질환, 장애, 또는 손상이 암이고, 항-SIRPA 항체가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 SIRPA 활성을 억제하는 것인 제약 조성물:

(a) 면역억제자 수지상 세포, 면역억제자 대식세포, 면역억제자 호중구, 면역억제자 NK 세포, 골수 유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 종양-연관된 억제자 호중구, 종양-연관된 억제자 NK 세포, 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포, 및 조절성 T 세포 중 1종 이상의 증식, 성숙, 이동, 분화, 또는 기능성의 촉진;

(b) 면역억제자 수지상 세포, 면역억제자 대식세포, 면역억제자 호중구, 면역억제자 NK 세포, 골수 유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 종양-연관된 억제자 호중구, 종양-연관된 억제자 NK 세포, 및 조절성 T 세포 중 1종 이상의 종양 내로의 침윤의 증진;

(c) 종양, 말초 혈액, 또는 다른 림프 기관에서의 종양-촉진 골수/과립구 면역-억제성 세포 또는 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포의 수의 증가;

(d) 골수-유래된 억제자 세포(MDSC) 또는 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포의 종양-촉진 활성의 증진;

(e) 종양 또는 말초 혈액에서의 종양-촉진 시토카인의 발현의 증가, 여기서 종양-촉진 시토카인은 TGF-베타 또는 IL-10임;

(f) 종양-촉진 FoxP3+ 조절성 T 림프구의 종양 침윤의 증가;

(g) 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 T 림프구의 활성화의 저하;

(h) 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 T 림프구의 침윤의 저하;

(i) 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 NK 세포의 침윤의 저하;

(j) NK 세포의 종양 살해 잠재성의 저하;

(k) 면역 반응을 증진시키는 잠재성을 갖는 종양-특이적 B 림프구의 침윤의 저하;

(l) 종양 부피의 증가;

(m) 종양 성장 속도의 증가;

(n) 전이의 증가;

(o) 종양 재발의 속도의 증가;

(p) 항-종양 T 세포 반응을 조정하고, PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1,

CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 표적 단백질을 표적화하는 1종 이상의 면역-요법 또는 1종 이상의 암 백신의 효능의 저하;

(q) PLCɣ/PKC/칼슘 동원의 억제; 및

(r) PI3K/Akt 또는 Ras/MAPK 시그널링의 억제.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 질환, 장애, 또는 손상이 암이고, 여기서 항-SIRPA 항체가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 SIRPA 활성을 나타내는 것인 제약 조성물:

(a) 종양 침윤 CD3+ T 세포의 수의 증가;

(b) 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포에서의 CD33의 세포 수준의 저하, 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 종양 침윤 세포이거나 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 혈액에 존재함;

(c) 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포의 수의 감소, 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 종양 침윤 세포이거나 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 혈액에 존재함;

(d) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 PD-L1 수준의 감소;

(e) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 PD-L2 수준의 감소;

(f) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 B7-H2 수준의 감소;

(g) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 B7-H3 수준의 감소;

(h) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 CD200R 수준의 감소;

(i) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 CD163 수준의 감소;

(j) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)에서의 CD206 수준의 감소;

(k) 고형 종양의 종양 성장 속도의 저하;

(l) 종양 부피의 감소;

(m) 1종 이상의 PD-1 억제제의 효능의 증가;

(n) CTLA4, 아데노신 경로, PD-L1, PD-L2, OX40, TIM3, LAG3, 및 이들의 임의의 조합 중 1종 이상을 표적화하는 1종 이상의 체크포인트 억제제 요법 또는 면역-조정 요법의 효능의 증가;

(o) 겜시타빈, 카페시타빈, 안트라시클린, 독소루비신(아드리아마이신®), 에피루비신(엘렌스®), 탁산, 파클리탁셀(탁솔®), 도세탁셀(탁소테레®), 5-플루오로우라실(5-FU), 시클로포스파미드(시톡산®), 카르보플라틴(파라플라틴®), 및 이들의 임의의 조합 중 1종 이상의 화학요법제의 효능의 증가;

(p) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)의 존재 하에서의 T 세포의 증식의 증가;

(q) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포(MDSC)의 분화, 생존, 또는 1종 이상의 기능의 억제; 및

(r) 화학적 또는 방사성 독소와 접합되는 경우에 고형 종양 및 연관된 혈관에서의 CD33-발현 면역억제자 골수 세포 또는 CD14-발현 세포의 살해.

청구항 31

제28항에 있어서, 상기 질환, 장애, 또는 손상이 치매, 전두측두엽 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 혼합형 치매, 타우병증 질환, 파킨슨병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 외상성 뇌 손상, 뇌졸중, 전두측두엽 치매, 척수 손상, 및 헌팅턴병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 32

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 항-SIRPA 항체의 V_H 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티

드.

청구항 33

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 항-SIRPA 항체의 V_L 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 34

제32항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 35

제33항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터.

청구항 36

제32항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 37

제33항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 38

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 항-SIRPA 항체의 VH 영역을 코딩하는 핵산 서열 및 VL 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 숙주 세포.

청구항 39

제38항의 단리된 숙주 세포를 항체가 발현되는 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는 항-SIRPA 항체를 생산하는 방법이며, 여기서 숙주 세포가 포유동물 숙주 세포인 항-SIRPA 항체를 생산하는 방법.

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 이 출원은 2016년 12월 9일에 출원된 미국 가출원 번호 62/432,503의 우선권을 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] ASCII 텍스트 파일로의 서열 목록의 제출

[0004] 하기 ASCII 텍스트 파일의 제출의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다: 2017년 12월 7일에 생성된 서열 목록의 컴퓨터 판독가능한 형태 (CRF), 파일명 099061-1069197_SL.TXT, 70,619 바이트.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 항-SIRPA 항체 및 이러한 항체의 치료 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 포식 세포, 예컨대 대식세포 (MΦ) 및 수지상 세포 (DC)는 세포 활성화 상태, 증식, 및/또는 이펙터 기능을 조정하는 세포 표면 수용체의 복잡한 어레이를 통해 건강한 세포를 비정상 세포로부터 구별한다. 이들 수용체 중 많은 것은 제거를 위한 원하지 않는 세포를 마킹하거나 (소위 "나를 먹어라" 시그널), 정상 세포를 파괴로부터 보호하는 (소위 "나를 먹지 마라" 시그널) 다양한 리간드를 인식한다. 최근, SIRPα-CD47 축은 암 세포 생존으로부터 조혈 세포 이식의 성공적인 이식에 이르는 다양한 임상적 환경에서 대식세포에 의한 프로그래밍된 세포 제거에 있어서 중요한 결정자로서 나타났다. 이 경로에 영향을 미치는 치료제는 많은 유형의 인간 암에서 특정한 관련을 갖는 질환을 개선시키는 관련 의학적 필요를 충족시킬 수 있다.

[0008] SIRPα (시그널 조절성 단백질-α, SIRPA)는 주로 골수 세포 계통 (MΦ, DC, 과립구 등을 포함함) 내에서 발현되고, 2개의 막-근위 IgC 도메인 및 원위 IgV 도메인을 함유하는 세포외 영역을 특징으로 하는 막횡단 수용체의 SIRP 패밀리에 속한다. 이 패밀리 중에서 고유하게, SIRPA는 세포내, 세포질 면역수용체 티로신-기반 억제성 모티프 (ITIM)를 함유한다. 수용체 가교 시, 티로신-인산화된 ITIM 부위는 SHP 포스파타제를 모집하고 활성화시켜 세포 기능, 예컨대 포식작용 또는 염증성 시토카인 방출을 음성적으로 조절한다. CD47은 SIRPA에 대한 주요한 리간드로서 기능하며, 내피/상피 세포, 백혈구, 및 적혈구를 포함한 대부분의 세포 유형에서의 그의 폭넓은 발현은 이것이 "나를 먹지 마라" 시그널을 매개하여 건강한 세포를 포식세포-의존적 클리어런스로부터 보호함을 시사한다. 이 관점을 뒷받침하여, 몇몇 연구는 야생형 수여자 내로의 CD47-녹아웃 마우스로부터의 적혈구 또는 백혈구의 입양 전달이 CD47-결핍성 세포의 급속한 클리어런스를 초래함을 제시한다. 반대로, 인간 조혈 세포를 받는 면역-손상된 마우스의 다중 균주의 위치적 유전적 분석은 이종이식 모델에서 성공적인 이식을 위한 원인 인자로서 NOD 마우스에서의 *Sirp*α 대립유전자를 확인하였다. 후속 연구는 단지 NOD 마우스에서 발현된 SIRPA의 대립유전자 변이체가 인간 조혈 줄기 세포 상에서 발현된 인간 CD47에 결합하는 능력을 보유하였으며, 따라서, 대식세포-의존적 이식 거부를 억제함을 입증하였다.

[0009] SIRPA 및 CD47의 조절된 발현은 포식 세포 활성을 조정하는 항상성 제어 메카니즘을 확립한다. 예를 들어, 아폽토시스성 세포는 살아있는 세포가 비손상된 채로 남아 있게 하면서, CD47의 발현을 하향조절하여 상주 대식세포에 의한 탐식을 용이하게 한다. 마찬가지로, 염증 자극, 예컨대 LPS는 MΦ 및 DC에서의 SIRPA 발현을 저하시켜 염증 동안 그들의 활성화를 가능하게 한다. 그러나, SIRPA 및 CD47 발현의 조절이상은 암에서 보여진 바와 같이 면역-연관된 질환에 기여한다. 몇몇 종양은 정상적으로 악성 세포를 제거하는 면역 감시 메카니즘을 모면하기 위해 비-암성 세포에 비해 CD47의 발현을 유의하게 증강시킨다. 전임상 연구는 동계 종양 모델, 예컨대 B16F10 흑색종에서의 CD47의 유전적 녹다운이 면역-적격 마우스에서 종양 성장을 억제하는데 충분함을 밝혀낸다. 유사한 결과는 면역-손상된 마우스 내로 이식된 CD47-녹다운된 인간 암 세포주로 관찰되었다. 대안적으로, SIRPA-CD47 상호작용을 방해하는 생물 제제, 예컨대 항-CD47 항체는 또한 마우스 모델에서 종양 클리어런스를 증진시킨다. 상업적 항-종양 항원 항체, 예컨대 트라스투주맙 또는 리툭시맙과 조합되는 경우, 항-CD47 항체는 표준 단독요법에 비해 항-종양 반응의 상승작용적 증가를 용이하게 한다. 그러나, CD47의 편재적 발현을 고려하면, 항-CD47 항체는 그들의 치료 효능을 제한하는 오프-타겟 효과로 인해 심각한 독성 부하의 위험이 있다. 그럼에도 불구하고, 이들 연구는 암 면역요법에서 잠재적 적용을 갖는 골수 세포를 조절하는데 있어서 SIRPA-CD47 경로에 대한 중대한 역할을 확립한다.

발명의 내용

[0010] 특정 측면에서, 본 개시내용은 SIRPA를 하향-조절하는 작용제, 예를 들어, 항-SIRPA 항체를 제공한다. 이러한 작용제는 SIRPA 발현, 활성, 또는 시그널링과 연관된 질환 또는 병리증상을 치료하거나, 예방하거나, 또는 그의 위험을 감소시키는데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 인간 대식세포 및 수지상세포, 뿐만 아니라 SIRPA를 발현하는 세포주 상의 SIRPA를 하향조절할, 즉, 그의 수준을 저하시킬 수 있는 항-SIRPA 항체의 확인에 관한 것이다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 면역 억제성 SIRPA-CD47 상호작용을 길항작용하고, CD47-발현 종양 세포의 포식작용을 용이하게 하는 항-SIRPA 항체에 관한 것이다. 추가의 측면에서, 본 개시내용은 비-경쟁적 억제를 통해 CD47 결합을 방해하는 고유한 SIRPA-특이적 항체를 제공한다.

[0011] 따라서, 한 측면에서, 본 개시내용은 SIRPA에 선택적으로 결합하고 세포 표면 상에서 발현된 SIRPA를 하향-조절하는 SIRPA 항체에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 SIRPA의 세포 표면 수준을 저하시키거나, SIRPA의 세포내 수준을 저하시키거나, SIRPA의 총 수준을 저하시키거나, 또는 이들 수준의 임의의 조합을 저하시킨다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 SIRPA 분해, SIRPA 절단, SIRPA 내재화, SIRPA 쉐딩, SIRPA 발현의 하향조절, 또는 이들의 임의의 조합을 유도한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항체는 생체내에서 SIRPA의 세포 수준을 저하시킨다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 SIRPA의 세포 표면 클러스터링을 억제한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 추가의 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있는 1종 이상의 SIRPA 활성을 억제하거나; 1종 이상의 SIRPA 활성을 상쇄시킨다: (a) 1종 이상의 SIRPA 리간드에의 SIRPA 결합, 임의로 여기서 1종 이상의 SIRPA 리간드는 CD47, 계면활성제 단백질 A 및 D 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택됨; (b) 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, M1 대식세포, M1 호중구, M1 NK 세포, 활성화된 M1 대식세포, 활성화된 M1 호중구, 활성화된 M1 NK 세포, M2 대식세포, M2 호중구, M2 NK 세포, 단핵구, 파골세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 과립구, 호중구, 소교세포, M1 소교세포, 활성화된 M1 소교세포, 및 M2 소교세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 세포의 증식의 저하; (c) 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, M1 대식세포, M1 호중구, M1 NK 세포, 활성화된 M1 대식세포, 활성화된 M1 호중구, 활성화된 M1 NK 세포, M2 대식세포, M2 호중구, M2 NK 세포, 단핵구, 파골세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 과립구, 호중구, 소교세포, M1 소교세포, 활성화된 M1 소교세포, 및 M2 소교세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 세포의 이동의 억제; (d) 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, M1 대식세포, M1 호중구, M1 NK 세포, 활성화된 M1 대식세포, 활성화된 M1 호중구, 활성화된 M1 NK 세포, M2 대식세포, M2 호중구, M2 NK 세포, 단핵구, 파골세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 과립구, 호중구, 소교세포, M1 소교세포, 활성화된 M1 소교세포, 및 M2 소교세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 세포의 1종 이상의 기능의 억제; (e) 아폽토시스성 뉴런 클리어런스, 신경 조직 데브리스 클리어런스, 기능이상적 시냅스 클리어런스, 비-신경 조직 데브리스 클리어런스, 박테리아 클리어런스, 다른 외래 소체 클리어런스, 질환-유발 단백질 클리어런스, 질환-유발 펩티드 클리어런스, 및 종양 세포 클리어런스로 이루어진 군으로부터 선택되는 클리어런스 중 1종 이상의 유형의 억제; 임의로 여기서 질환-유발 단백질은 아밀로이드 베타, 올리고머성 아밀로이드 베타, 아밀로이드 베타 플라크, 아밀로

이드 전구체 단백질 또는 그의 단편, Tau, IAPP, 알파-시누클레인, TDP-43, FUS 단백질, C9orf72 (염색체 9 오픈 리딩 프레임 72), c9RAN 단백질, 프리온 단백질, PrPSc, 헌팅틴, 칼시토닌, 슈퍼옥시드 디스뮤타제, 아탁신, 아탁신 1, 아탁신 2, 아탁신 3, 아탁신 7, 아탁신 8, 아탁신 10, 루이 소체, 심방 나트륨이뇨 인자, 섬 아밀로이드 폴리펩티드, 인슐린, 아포지단백질 AI, 혈청 아밀로이드 A, 메딘, 프로락틴, 트랜스티레틴, 리소자임, 베타 2 마이크로글로불린, 겔솔린, 케라토에피텔린, 시스타틴, 이뮤노글로불린 경쇄 AL, S-IBM 단백질, 반복부-연관된 비-ATG (RAN) 번역 산물, 디펩티드 반복 (DPR) 펩티드, 글리신-알라닌 (GA) 반복 펩티드, 글리신-프롤린 (GP) 반복 펩티드, 글리신-아르기닌 (GR) 반복 펩티드, 프롤린-알라닌 (PA) 반복 펩티드, 유비퀴틴, 및 프롤린-아르기닌 (PR) 반복 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되고, 종양 세포는 방광암, 뇌암, 유방암, 결장암, 직장암, 자궁내막암, 신장암, 신세포암, 신우암, 백혈병, 폐암, 흑색종, 비-호지킨 림프종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 섬유육종, 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암으로부터의 것임; (f) 소교세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 호중구, T 세포, T 헬퍼 세포, 또는 세포독성 T 세포 중 1종 이상에 의한 종양 세포 살해의 억제; (g) 소교세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 호중구, T 세포, T 헬퍼 세포, 또는 세포독성 T 세포 중 1종 이상의 항-종양 세포 증식 활성의 억제; (h) 1종 이상의 염증성 수용체의 조정된 발현, 임의로 여기서 1종 이상의 염증성 수용체는 CD86을 포함하고, 1종 이상의 염증성 수용체는 소교세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 호중구, T 세포, T 헬퍼 세포, 또는 세포독성 T 세포 중 1종 이상 상에서 발현됨; (i) 면역억제자 수지상 세포, 면역억제자 대식세포, 면역억제자 호중구, 면역억제자 NK 세포, 골수-유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 종양-연관된 호중구, 종양-연관된 NK 세포, 및 조절성 T 세포 중 1종 이상의 기능성의 촉진 또는 구출; (j) 면역억제자 수지상 세포, 면역억제자 대식세포, 면역억제자 호중구, 면역억제자 NK 세포, 골수-유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 종양-연관된 호중구, 종양-연관된 NK 세포, 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포, 및 조절성 T 세포 중 1종 이상의 종양 내로의 침윤의 증가; (k) 종양에서의, 말초 혈액, 또는 다른 림프 기관에서의 종양-촉진 골수/과립구 면역-억제성 세포 및/또는 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포의 수의 증가; (l) 골수-유래된 억제자 세포 및/또는 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포의 종양-촉진 활성의 증진; (m) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 및/또는 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포의 생존의 증진; (n) 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 T 림프구의 활성화의 저하; (o) 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 NK 세포의 침윤의 저하; (p) 종양 부피의 증가; (q) 종양 성장 속도의 증가; 및 (r) 항-종양 T 세포 반응을 조정하는 1종 이상의 면역-요법의 효능의 저하, 임의로 여기서 1종 이상의 면역-요법은 PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, TREM1, TREM2, CD39, CD73, CSF-1 수용체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 표적 단백질을 표적화하는 면역-요법, 또는 1종 이상의 암 백신임. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 활성 중 1종 이상을 유도한다: (a) 종양 침윤 CD3+ T 세포의 수의 증가; (b) 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포에서의 SIRPA의 세포 수준의 저하, 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 종양 침윤 세포임, 또는 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 혈액에 존재함; (c) 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포의 수의 감소, 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 종양 침윤 세포임, 또는 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 혈액에 존재함; (d) 1종 이상의 세포에서의 PD-L1 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (e) 1종 이상의 세포에서의 PD-L2 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (f) 1종 이상의 세포에서의 B7-H2 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (g) 1종 이상의 세포에서의 B7-H3 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (h) 1종 이상의 세포에서의 CD200R 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (i) 1종 이상의 세포에서의 CD163 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (j) 1종 이상의 세포에서의 CD206 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (k) 고형 종양의 종양 성장 속도의 저하; (l) 종양 부피의 감소; (m) 1종 이상의 PD-1 억제제의 효능의 증가; (n) 1종 이상의 체크포인트 억제제 요법 및/또는 면역-조정 요법의 효능의 증가, 임의로 여기서 1종 이상의 체크포인트 억제제 요법 및/또는 면역-조정 요법은 CTLA4, 아데노신 경로, PD-L1, PD-L2, OX40, TIM3, LAG3, 또는 이들의 임의의 조합 중 1종 이상을 표적화함; (o) 1종 이상의 화학요법제의 효능의 증가, 임의로 여기서 1종 이상의 화학요법제는 겜시타빈, 카페시타빈, 안트라시클린, 독소루비신 (아드리아마이신(Adriamycin)®), 에피루비신 (엘렌스(Ellence)®), 탁산, 파클리탁셀 (탁솔(Taxol)®), 도세탁셀 (탁소테레(Taxotere)®), 5-플루오로우라실 (5-FU), 시클로포스파미드 (시톡산(Cytoxan)®), 카르보플라틴 (파라플라틴

(Paraplatin)®), 및 이들의 임의의 조합임; (p) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)의 존재 하에서의 T 세포의 증식의 증가; (1) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)의 분화, 생존, 및/또는 1종 이상의 기능의 억제; 및 (r) 화학적 또는 방사성 독소와 접합되는 경우에 고형 종양 및 연관된 혈관에서의 CD33-발현 면역억제자 비-종양형성성 골수 세포 및/또는 비-종양형성성 CD14-발현 세포의 살해.

[0012] 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 SIRPA의 세포 수준을 저하시키고 SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 인간 SIRPA에의 CD47의 결합을 차단한다.

[0013] 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항체는 인간 SIRPA에 선택적으로 결합하고 세포 상에서 발현된 인간 SIRPA에 결합하는 CD47의 결합을 실질적으로 차단하지 않으며, 추가로, 여기서 인간 SIRPA에의 결합은 세포 표면 상의 SIRPA의 수준을 저하시킨다. 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D1 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D2 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D3 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항-SIRPA 항체는 서열식별번호(SEQ ID NO): 2의 아미노산 서열을 포함하는 V_H 서열 및 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 V_L 서열을 포함하는 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 또는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2를 포함하는 V_H 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 a) 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 또는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR1; (b) 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 또는 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 또는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR2; 및 (c) 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 또는 서열식별번호: 11의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR3을 포함하는 V_H 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 V_H 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 9의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열식별번호: 10의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열식별번호: 11의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함하는 VH 영역을 포함한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항체는 도 14a에 제시된 V_H 영역의 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함하거나, 또는 도 14a의 V_H 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 V_H 영역을 포함한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 또는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2를 포함하는 V_L 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, V_L 영역은 (a) 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 또는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR1; (b) 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 또는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR2; 및 (c) 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 또는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, V_L 영역은 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함

하는 CDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, V_L 영역은 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, V_L 영역은 도 14b에 제시된 V_L 영역의 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 도 14b의 V_L 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 V_L 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 세포의 표면 상에서 발현된 FcγR의 수준을 감소시키는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 세포의 표면 상의 FcγRBII의 수준을 저하시키는 Fc 영역을 포함한다.

[0014] 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항체는 인간 SIRPA에 선택적으로 결합하지만, 뮤린 SIRPA에는 그렇지 않고, 세포 상에서 발현된 인간 SIRPA에 결합하는 CD47의 결합을 실질적으로 차단하지 않으며, 추가로, 여기서 인간 SIRPA에의 결합은 세포 표면 상의 SIRPA의 수준을 저하시킨다. 일부 실시양태에서, 이러한 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 V_H 서열 및 서열식별번호: 3의 아미노산 서열을 포함하는 V_L 서열을 포함하는 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D1 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D2 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D3 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 서열식별번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 또는 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2를 포함하는 V_H 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, V_H 영역은 a) 서열식별번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 또는 서열식별번호: 15의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR1; (b) 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 또는 서열식별번호: 16의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR2; 및 (c) 서열식별번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 또는 서열식별번호: 17의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, V_H 영역은 서열식별번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, V_H 영역은 서열식별번호: 15의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열식별번호: 17의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항체는 도 14c의 V_H 영역의 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함하거나; 또는 도 14c의 V_H 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 V_H 영역을 포함한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, V_L 영역은 서열식별번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 또는 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2를 포함한다. 일부 실시양태에서, V_L 영역은 a) 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 또는 서열식별번호: 12의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR1; (b) 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 또는 서열식별번호: 13의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR2; 및 (c) 서열식별번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 2개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 14의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3, 또는 서열식별번호: 14의 아미노산 서열과 적어도 약 90% 동일성을 갖는 CDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, V_L 영역은 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 12의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1; 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 13의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및 서열식별번호: 4의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3 또는 1개 이하의 아미노산 치환을 갖는 서열식별번호: 14의 아미노산 서열

을 포함하는 CDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, V_L 영역은 서열식별번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, 서열식별번호: 7의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2, 및 서열식별번호: 8의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3을 포함한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, V_L 영역은 도 14d의 VL 영역의 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 도 14d의 V_L 영역의 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 V_L 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 세포의 표면 상의 FcγR의 수준을 저하시키는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 세포의 표면 상의 FcγRBII의 수준을 저하시키는 Fc 영역을 포함한다.

[0015] 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 추가의 측면에서, 본 개시내용의 단리된 항-SIRPA는 SIRPA에의 결합에 대해 3F9, 9C2, 8A9, 8F4, 1E2, 7H9, 및 4D8로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D1 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D2 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D3 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항-SIRPA 항체는 3F9, 9C2, 8A9, 8F4, 1E2, 7H9, 및 4D8로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 항체와 본질적으로 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 단리된 항-SIRPA 항체는 V_H 영역 및 V_L 영역을 포함하며, V_H 영역, V_L 영역, 또는 둘 다는 3F9, 9C2, 8A9, 8F4, 1E2, 7H9, 및 4D8로 이루어진 군으로부터 선택되는 모노클로날 항체의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 CDR을 포함한다.

[0016] 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 모노클로날 항체이다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 인간화 항체이다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv 또는 scFv 단편; 또는 다가 항체이고, 항체는 IgG 부류, IgM 부류, 또는 IgA 부류의 것이다.

[0017] 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 IgG 부류, IgM 부류, 또는 IgA 부류의 것이다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소형을 갖는다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항체는 억제성 Fc 수용체에 결합한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 억제성 Fc 수용체는 억제성 Fc-감마 수용체 IIB (FcγRIIB)이다. 일부 실시양태에서, 항체는 세포 표면 상의 FcγRIIB의 수준을 저하시킨다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서: (a) 항-SIRPA 항체는 인간 또는 마우스 IgG1 이소형을 갖고, Fc 영역에서 N297A, D265A, D270A, L234A, L235A, G237A, P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, 및 이들의 임의의 조합 (여기서 잔기의 넘버링은 EU 또는 카바트(Kabat) 넘버링에 따름)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하거나, 또는 Fc 영역에서 글리신 236에 상응하는 위치에 아미노산 결실을 포함하거나; (b) 항-SIRPA 항체는 IgG1 이소형을 갖고, IgG2 이소형 중쇄 불변 도메인 1(CH1) 및 힌지 영역을 포함하며, 임의로 여기서 IgG2 이소형 CH1 및 힌지 영역은 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVERKCCVECPPCP (서열식별번호: 34)의 아미노산 서열을 포함하며, 임의로 여기서 항체 Fc 영역은 S267E 아미노산 치환, L328F 아미노산 치환, 또는 둘 다, 및/또는 N297A 또는 N297Q 아미노산 치환 (여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 포함하거나; (c) 항-SIRPA 항체는 IgG2 이소형을 갖고, Fc 영역에서 P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C214S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E, H268E, N297A, N297Q, A330L, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환 (여기서 잔기의 넘버링은 EU 또는 카바트 넘버링에 따름)을 포함하거나; (d) 항-SIRPA 항체는 인간 또는 마우스 IgG4 이소형을 갖고, Fc 영역에서 L235A, G237A, S228P, L236E, S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E, E233P, F234V, L234A/F234A, S228P, S241P, L248E, T394D, N297A, N297Q, L235E, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환 (여기서 잔기의 넘버링은 EU 또는 카바트 넘버링에 따름)을 포함하거나; (e) 항-SIRPA 항체는 하이브리드 IgG2/4 이소형을 가지며, 임의로 여기서 항체는 인간 IgG2의 아미노산 118 내지 260 및 인간 IgG4의 아미노산 261 내지 447을 포함하는 아미노산 서열 (여기서 잔기의 넘버링은 EU 또는 카바트 넘버링에 따름)을 포함한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서: (a) 항-SIRPA 항체는 인간 또는 마우스

IgG1 이소형을 갖고, Fc 영역에서 N297A, N297Q, D270A, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환 (여기서 잔기의 넘버링은 EU 또는 카바트 넘버링에 따름)을 포함하거나; (b) 항-SIRPA 항체는 IgG2 이소형을 갖고, Fc 영역에서 P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환 (여기서 잔기의 넘버링은 EU 또는 카바트 넘버링에 따름)을 포함하거나; (c) 항-SIRPA 항체는 IgG4 이소형을 갖고, Fc 영역에서 E233P, F234V, L234A/F234A, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환 (여기서 잔기의 넘버링은 EU 또는 카바트 넘버링에 따름)을 포함한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서: (a) Fc 영역은 A330L, L234F; L235E, P331S, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에서의 1개 이상의 추가적인 아미노산 치환 (여기서 잔기의 넘버링은 EU 또는 카바트 넘버링에 따름)을 추가로 포함하거나; (b) Fc 영역은 M252Y, S254T,T256E, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에서의 1개 이상의 추가적인 아미노산 치환 (여기서 잔기의 넘버링은 EU 또는 카바트 넘버링에 따름)을 추가로 포함하거나; (c) Fc 영역은 EU 또는 카바트 넘버링에 따른 S228P 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항체는 IgG4 이소형을 갖는다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 잔기 위치 228에서의 S228P 아미노산 치환, 잔기 위치 234에서의 F234A 아미노산 치환, 및 잔기 위치 235에서의 L235A 아미노산 치환 (여기서 잔기 위치의 넘버링은 EU 또는 카바트 넘버링에 따름)을 포함한다.

[0018] 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 이중특이적 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 제1 및 제2 항원을 인식하며, 여기서 제1 항원은 SIRPA이고, 제2 항원은 하기 항원이다: (a) 혈액-뇌-장벽을 가로지르는 수송을 용이하게 하는 항원; (b) 트랜스페린 수용체 (TR), 인슐린 수용체 (HIR), 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGFR), 저-밀도 지단백질 수용체 관련된 단백질 1 및 2 (LPR-1 및 2), 디프테리아 독소 수용체, CRM197, 라마 단일 도메인 항체, TMEM 30(A), 단백질 전달 도메인, TAT, Syn-B, 페네트라틴, 폴리-아르기닌 펩티드, 안지오펩 펩티드, 및 ANG1005로 이루어진 군으로부터 선택되는 혈액-뇌-장벽을 가로지르는 수송을 용이하게 하는 항원; (c) 질환-유발 펩티드 또는 단백질, 또는 질환-유발 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환-유발제, 여기서 질환-유발 핵산은 안티센스 GGCCCC (G2C4) 반복부-확장 RNA이고, 질환-유발 단백질은 아밀로이드 베타, 올리고머성 아밀로이드 베타, 아밀로이드 베타 플라크, 아밀로이드 전구체 단백질 또는 그의 단편, Tau, IAPP, 알파-시누클레인, TDP-43, FUS 단백질, C9orf72 (염색체 9 오픈 리딩 프레임 72), c9RAN 단백질, 프리온 단백질, PrPSc, 헌팅틴, 칼시토닌, 슈퍼옥시드 디스뮤타제, 아탁신, 아탁신 1, 아탁신 2, 아탁신 3, 아탁신 7, 아탁신 8, 아탁신 10, 루이 소체, 심방 나트륨이뇨 인자, 섬 아밀로이드 폴리펩티드, 인슐린, 아포지단백질 AI, 혈청 아밀로이드 A, 메딘, 프로락틴, 트랜스티레틴, 리소자임, 베타 2 마이크로글로불린, 겔솔린, 케라토에피텔린, 시스타틴, 이뮤노글로불린 경쇄 AL, S-IBM 단백질, 반복부-연관된 비-ATG (RAN) 번역 산물, 디펩티드 반복 (DPR) 펩티드, 글리신-알라닌 (GA) 반복 펩티드, 글리신-프롤린 (GP) 반복 펩티드, 글리신-아르기닌 (GR) 반복 펩티드, 프롤린-알라닌 (PA) 반복 펩티드, 유비퀴틴, 및 프롤린-아르기닌 (PR) 반복 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택됨; 및 (d) 면역 세포 상에서 발현되는 리간드 및/또는 단백질, 여기서 리간드 및/또는 단백질은 PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73, 및 포스파티딜세린; 및 1종 이상의 종양 세포 상에서 발현되는 단백질, 지질, 폴리사카라이드, 또는 당지질로 이루어진 군으로부터 선택됨.

[0019] 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 접합된 항체이다. 예를 들어, 항-SIRPA 항체는 검출가능한 마커, 독소, 또는 치료제에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 리신, 리신 A 쇄, 독소루비신, 다우노루비신, 메이탄시노이드, 탁솔, 에티듐 브로마이드, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 디히드록시 안트라신 디온, 악티노마이신, 디프테리아 독소, 슈도모나스(Pseudomonas) 외독소 (PE) A, PE40, 아브린, 아브린 A 쇄, 모덱신 A 쇄, 알파 사르신, 겔로닌, 미토겔린, 레트스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 쿠리신, 크로틴, 칼리케아미신, 사포나리아 오피시날리스(Saponaria officinalis) 억제제, 글루코코르티코이드, 아우리스타틴, 아우로마이신, 이트륨, 비스무트, 콤브레스타틴, 두오카르마이신, 돌라스타틴, cc1065, 및 시스플라틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 독소에 접합된다.

[0020] 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 추가의 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 아밀로이드 베타, 올리고머성 아밀로이드 베타, 아밀로이드 베타 플라크, 아밀로이드 전구체 단백질 또는 그의 단편, Tau, IAPP, 알파-시누클레인, TDP-43, FUS 단백질, C9orf72 (염색체 9 오픈 리딩 프레임 72), 프리온 단백질, PrPSc, 헌팅틴, 칼시토닌, 슈퍼옥시드 디스뮤타제, 아탁신, 아탁신 1, 아탁신 2, 아탁신 3, 아탁신 7, 아탁신 8, 아탁신 10, 루이 소체, 심방 나트륨이뇨 인자, 섬 아밀로이드 폴리펩티드, 인슐린, 아포지단백질 AI, 혈청 아밀로이드 A, 메딘, 프로락틴, 트랜스티레틴, 리소자임, 베타 2 마이크로글로불린, 겔솔린, 케라토에피텔린, 시스타틴, 이뮤노글로불린 경쇄 AL, S-IBM 단백질, 반복부-연관된 비-ATG (RAN) 번역 산물, 디펩티드 반복 (DPR) 펩티드, 글리신-알라닌 (GA) 반복 펩티드, 글리신-프롤린 (GP) 반복 펩티드, 글리신-아르기닌 (GR) 반복 펩티드, 프롤린-알라닌 (PA) 반복 펩티드, 유비퀴틴, 및 프롤린-아르기닌 (PR) 반복 펩티드, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환-유발 단백질에 특이적으로 결합하는 1종 이상의 항체와; 또는 PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73, TREM1, TREM2, CD33, Siglec-5, Siglec-7, Siglec-9, Siglec-11, 포스파티딜세린, 질환-유발 핵산, 안티센스 GGCCCC (G2C4) 반복부-확장 RNA, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역조정성 단백질에 결합하는 1종 이상의 항체와 조합으로 사용된다.

[0021] 추가의 측면에서, 본 개시내용은 조절성 T 세포, 종양-포매된 면역억제자 수지상 세포, 종양-포매된 면역억제자 대식세포, 골수-유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 급성 골수성 백혈병 (AML) 세포, 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 세포, 또는 만성 골수성 백혈병 (CML) 세포의 활성, 기능성, 또는 생존의 감소를 필요로 하는 개체에게 SIRPA에 결합하거나 또는 그와 상호작용하는 작용제, 예를 들어, 상기 기재된 실시양태 중 임의의 것의 항체의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체에서 상기 세포의 활성, 기능성, 또는 생존을 저하시키는 방법을 제공한다.

[0022] 추가적인 측면에서, 본 개시내용은 1종 이상의 면역 세포의 생존, 성숙, 기능성, 이동, 또는 증식의 유도 또는 촉진을 필요로 하는 개체에게 SIRPA의 세포 수준을 저하시키거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하거나, 또는 이들 둘 다를 하는 작용제, 예를 들어, 상기 기재된 실시양태 중 임의의 것의 항체의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체에서 1종 이상의 면역 세포의 생존, 성숙, 기능성, 이동, 또는 증식을 유도하거나 또는 촉진시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 면역 세포는 수지상 세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, 소교세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0023] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 상기 기재된 실시양태 중 임의의 것의 항-SIRPA 항체의 치료적 유효량을 CD47을 발현하는 종양을 갖는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0024] 추가적인 측면에서, 본 발명은 SIRPA의 세포 수준을 저하시키는 작용제, 예를 들어, 상기 기재된 실시양태 중 임의의 것의 항-SIRPA 항체의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, 또는 CD73을 억제하는 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료제는 PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, 또는 CD73을 억제하는 항체이다.

[0025] 추가적인 측면에서, 본 발명은 SIRPA의 세포 수준을 저하시키는 작용제, 예를 들어, 상기 기재된 실시양태 중 임의의 것의 항-SIRPA 항체의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 억제성 체크포인트 분자에 특이적으로 결합하는 적어도 1종의 항체, 및/또는 1종 이상의 표준 또는 연구 항암 요법을 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 억제성 체크포인트 분자에 특이적으로 결합하는 적어도 1종의 항체는 항-SIRPA 항체와 조합으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 억제성 체크포인트 분자에 특이적으로 결합하는 적어도 1종의 항체는 항-PD-L1 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L2 항체, 항-PD-1 항체, 항-B7-H3 항체, 항-B7-H4 항체, 및 항-HVEM 항체, 항-B- 및 T-림프구 감쇠자 (BTLA) 항체, 항-킬러 억제성 수용체 (KIR) 항체, 항-GAL9 항체, 항-TIM-1 항체, 항-TIM3 항체, 항-TIM-4 항체, 항-A2AR 항체, 항-CD39 항체, 항-CD73 항체, 항-LAG-3 항체, 항-포스파티딜세린 항체, 항-CD27 항체, 항-CD30 항체, 항-TNFa 항체, 항-CD33 항체, 항-Siglec-5 항체, 항-Siglec-7 항체, 항-Siglec-9 항체, 항-Siglec-11 항체, 길항제성 항-TREM1 항체, 길항제성 항-TREM2 항체, 항-TIGIT 항체, 항-VISTA 항체, 항-CD2 항체, 항-CD5 항체, 및

이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 1종 이상의 표준 또는 연구 항암 요법은 방사선요법, 세포독성 화학요법, 표적화된 요법, 이마티닙 요법, 트라스투주맙 요법, 에타네르셉트 요법, 입양 세포 전달 (ACT) 요법, 키메라 항원 수용체 T 세포 전달 (CAR-T) 요법, 백신 요법, 및 시토카인 요법으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0026] 선행하는 방법 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 방법은 억제성 시토카인에 특이적으로 결합하는 적어도 1종의 항체를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 억제성 시토카인에 특이적으로 결합하는 적어도 1종의 항체는 선행하는 실시양태 중 어느 하나의 항-SIRPA 항체와 조합으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 억제성 시토카인에 특이적으로 결합하는 적어도 1종의 항체는 항-CCL2 항체, 항-CSF-1 항체, 항-IL-2 항체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 방법은 자극성 체크포인트 단백질에 특이적으로 결합하는 적어도 1종의 효능제성 항체를 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 자극성 체크포인트 단백질에 특이적으로 결합하는 적어도 1종의 효능제성 항체는 선행하는 실시양태 중 임의의 것의 항-SIRPA 항체와 조합으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 자극성 체크포인트 단백질에 특이적으로 결합하는 적어도 1종의 효능제성 항체는 효능제 항-CD40 항체, 효능제 항-OX40 항체, 효능제 항-ICOS 항체, 효능제 항-CD28 항체, 효능제성 항-TREM1 항체, 효능제성 항-TREM2 항체, 효능제 항-CD137/4-1BB 항체, 효능제 항-CD27 항체, 효능제 항-글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련된 단백질 GITR 항체, 효능제 항-CD30 항체, 효능제 항-BTLA 항체, 효능제 항-HVEM 항체, 효능제 항-CD2 항체, 효능제 항-CD5 항체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 방법은 적어도 1종의 자극성 시토카인을 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 자극성 시토카인은 IFN-α4, IFN-β, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, CRP, IL-20 패밀리 구성원, LIF, IFN-γ, OSM, CNTF, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, CXCL10, IL-33, MCP-1, MIP-1-베타, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0027] 추가의 측면에서, 본 개시내용은 선행하는 실시양태 중 어느 하나의 항-SIRPA 항체의 치료적 유효량을 SIRPA를 발현하는 골수 계통의 암 세포를 갖는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0028] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 선행하는 실시양태 중 어느 하나의 항-SIRPA 항체의 치료적 유효량을 암을 갖는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이며, 여기서 암은 육종, 방광암, 뇌암, 유방암, 결장암, 직장암, 자궁내막암, 신장암, 신우암, 백혈병, 폐암, 흑색종, 림프종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 및 섬유육종으로 이루어진 군으로부터 선택되거나; 또는 여기서 암은 다형성 교모세포종; 신장 투명 세포 암종; 부신피질 암종; 방광 요로상피 암종; 미만성 거대 B-세포 림프종; 폐 선암종; 췌장 선암종, 신세포암, 비-호지킨 림프종, 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 다발성 골수종, 유방 침습성 암종, 자궁경부 편평 세포 암종, 자궁경내막 선암종, 담관암종, 결장 선암종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 식도 암종, 두경부 편평 세포 암종, 신장 혐색소세포, 신장 유두상 세포 암종, 저등급 신경교종, 간세포성 암종, 폐 편평 세포 암종, 중피종, 난소 장액성 낭선암종, 췌장 선암종, 크롬친화세포종 및 부신경절종, 전립선 선암종, 직장 선암종, 피부 흑색종, 위 선암종, 고환 배세포 종양, 갑상선 암종, 흉선종, 자궁체부 자궁내막 암종, 자궁 암육종, 및 포도막 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPa 항체는 세포독성제에 접합되고/거나 ADCC를 유도한다.

[0029] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 선행하는 실시양태 중 어느 하나의 항-SIRPA 항체 및 생리학상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 암의 치료에 사용하기 위한; 및/또는 암 치료용 의약을 제조하는 방법에 사용하기 위한 선행하는 실시양태 중 어느 하나의 항-SIRPA 항체를 제공한다.

[0030] 추가의 측면에서, 본 개시내용은 치매, 전두측두엽 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 혼합형 치매, 타우병증 질환, 파킨슨병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 외상성 뇌 손상, 뇌졸중, 전두측두엽 치매, 척수 손상, 헌팅톤병, 감염, 및 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환, 장애, 또는 손상의 예방, 그의 위험의 감소, 또는 그의 치료를 필요로 하는 개체에게 SIRPA의 세포 수준을 저하시키거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하거나, 또는 이들 둘 다를 하는 작용제의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 질환, 장애, 또는 손상을 예방하거나, 그의 위험을 감소시키거나, 또는 그를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환, 장애, 또는 손상은 암이고, 작용제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 SIRPA 활성을 억제한다: (a) 면역억제자 수지상 세포, 면역억제자 대식세포, 면역억제자 호중구, 면역억제자 NK 세포, 골수 유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 종양-연관된 억제자 호중구, 종양-연관된 억제자 NK 세

포, 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포, 및 조절성 T 세포 중 1종 이상의 증식, 성숙, 이동, 분화, 및/또는 기능성의 촉진; (b) 면역억제자 수지상 세포, 면역억제자 대식세포, 면역억제자 호중구, 면역억제자 NK 세포, 골수 유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 종양-연관된 억제자 호중구, 종양-연관된 억제자 NK 세포, 및 조절성 T 세포 중 1종 이상의 종양 내로의 침윤의 증진; (c) 종양에서의, 말초 혈액, 또는 다른 림프 기관에서의 종양-촉진 골수/과립구 면역-억제성 세포 및/또는 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포의 수의 증가; (d) 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC) 및/또는 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포의 종양-촉진 활성의 증진; (e) 종양에서의 또는 말초 혈액에서의 종양-촉진 시토카인의 발현의 증가, 임의로 여기서 종양-촉진 시토카인은 TGF-베타 또는 IL-10임; (f) 종양-촉진 FoxP3+ 조절성 T 림프구의 종양 침윤의 증가; (g) 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 T 림프구의 활성화의 저하; (h) 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 T 림프구의 침윤의 저하; (i) 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 NK 세포의 침윤의 저하; (j) NK 세포의 종양 살해 잠재성의 저하; (k) 면역 반응을 증진시키는 잠재성을 갖는 종양-특이적 B 림프구의 침윤의 저하; (l) 종양 부피의 증가; (m) 종양 성장 속도의 증가; (n) 전이의 증가; (o) 종양 재발의 속도의 증가; (p) 항-종양 T 세포 반응을 조정하는 1종 이상의 면역-요법의 효능의 저하, 임의로 여기서 1종 이상의 면역-요법은 PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 표적 단백질을 표적화하는 면역-요법, 또는 1종 이상의 암 백신임; (q) PLCɣ/PKC/칼슘 동원의 억제; 및 (r) PI3K/Akt, Ras/MAPK 시그널링의 억제. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 질환, 장애, 또는 손상은 암이고, 작용제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 SIRPA 활성을 나타낸다: (a) 종양 침윤 CD3+ T 세포의 수의 증가; (b) 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포에서의 CD33의 세포 수준의 저하, 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 종양 침윤 세포임, 또는 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 혈액에 존재함; (c) 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포의 수의 감소, 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 종양 침윤 세포임, 또는 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 혈액에 존재함; (d) 1종 이상의 세포에서의 PD-L1 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (e) 1종 이상의 세포에서의 PD-L2 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (f) 1종 이상의 세포에서의 B7-H2 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (g) 1종 이상의 세포에서의 B7-H3 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (h) 1종 이상의 세포에서의 CD200R 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (i) 1종 이상의 세포에서의 CD163 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (j) 1종 이상의 세포에서의 CD206 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; (k) 고형 종양의 종양 성장 속도의 저하; (l) 종양 부피의 감소; (m) 1종 이상의 PD-1 억제제의 효능의 증가; (n) 1종 이상의 체크포인트 억제제 요법 및/또는 면역-조정 요법의 효능의 증가, 임의로 여기서 1종 이상의 체크포인트 억제제 요법 및/또는 면역-조정 요법은 CTLA4, 아데노신 경로, PD-L1, PD-L2, OX40, TIM3, LAG3, 또는 이들의 임의의 조합 중 1종 이상을 표적화함; (o) 1종 이상의 화학요법제의 효능의 증가, 임의로 여기서 1종 이상의 화학요법제는 겜시타빈, 카페시타빈, 안트라시클린, 독소루비신 (아드리아마이신®), 에피루비신 (엘렌스®), 탁산, 파클리탁셀 (탁솔®), 도세탁셀 (탁소테레®), 5-플루오로우라실 (5-FU), 시클로포스파미드 (시톡산®), 카르보플라틴 (파라플라틴®), 및 이들의 임의의 조합임; (p) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)의 존재 하에서의 T 세포의 증식의 증가; (q) 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)의 분화, 생존, 및/또는 1종 이상의 기능의 억제; 및 (r) 화학적 또는 방사성 독소와 접합되는 경우에 고형 종양 및 연관된 혈관에서의 CD33-발현 면역억제자 골수 세포 및/또는 CD14-발현 세포의 살해. 일부 실시양태에서, 암은 SIRPA 또는 1종 이상의 SIRPA 리간드를 발현한다.

[0031] 추가의 측면에서, 본 개시내용은 SIRPA를 하향-조절하는 작용제를 포함하는, 질환, 장애, 또는 손상을 치료하거나, 예방하거나, 또는 그의 위험을 저하시키는 방법이며, 여기서 질환, 장애, 또는 손상은 치매, 전두측두엽 치매, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 혼합형 치매, 타우병증 질환, 파킨슨병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 외상성 뇌 손상, 뇌졸중, 전두측두엽 치매, 척수 손상, 및 헌팅톤병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 작용제는 SIRPA를 하향조절하는 항-SIRPA 항체, 예를 들어, 선행하는 실시양태 중 어느 하나의 것이다.

[0032] 추가의 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 실시양태 중 어느 하나의 항-SIRPA 항체의 V_H 영역을 코딩하는

핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및/또는 본원에 기재된 실시양태 중 어느 하나의 항-SIRPA 항체의 V_L 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 V_H 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 또는 V_L 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 V_H 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 V_L 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 추가적인 측면에서, 본 개시내용은 V_H 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포 또는 V_L 영역을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 V_H 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 V_L 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 선행하는 실시양태 중 어느 하나의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 추가의 측면에서, 본 개시내용은 선행하는 실시양태 중 임의의 것의 숙주 세포를 항체가 발현되는 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는, 항-SIRPA 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 포유동물 숙주 세포이다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1a는 리간드-결합 도메인 내의 분기형 잔기를 도시하는 인간 SIRPA 단백질 (v1 (서열식별번호: 1) 및 v2 (서열식별번호: 45))의 2개의 가장 통상적인 대립유전자 사이의 아미노산 서열 정렬을 제시한다. 수탁 번호는 각각 NP542970 및 CAA71403이다.

도 1b는 2가지 단백질 사이의 상동성을 도시하는 인간 SIRPA v1 단백질 (서열식별번호: 1) 및 인간 SIRPB1 단백질 (서열식별번호: 46) 사이의 아미노산 서열 정렬을 제시한다. 수탁 번호는 각각 NP542970 및 O00241이다.

도 2는 2가지 단백질 사이의 상동성을 도시하는 인간 SIRPA 단백질 (서열식별번호: 1) 및 마우스 SIRPA 단백질 (서열식별번호: 47) 사이의 아미노산 서열 정렬을 제시한다. 수탁 번호는 각각 NP542970 및 Q6P6I8이다.

도 3a는 인간 SIRPA (HuSIRPA) 또는 마우스 SIRPA (MuSIRPA) 중 어느 하나를 발현하는 설치류 중국 햄스터 난소 세포주 (CHO)에 결합하는 선택된 SIRPA 항체의 좌측 패널 상의 FACS 히스토그램을 제시한다. 음영처리된 히스토그램은 CHO-MuSIRPA 세포를 나타낸다. 흑색으로 윤곽화된 히스토그램은 CHO-HuSIRPA 세포를 나타낸다. 우측 패널은 MuSIRPA에 비해 HuSIRPA에 결합하는 SIRPA 항체의 상대 MFI 값을 제시한다. 결과는 배경 대비 배수로서 표현된다. 배경 수준은 y-축 상에 1로 설정된다. 항체 mIgG는 이소형 음성 대조군이다. 도 3b는 1차 인간 대식세포에 결합하는 선택된 SIRPA 항체의 FACS 히스토그램을 제시한다. 항체 mIgG는 음성 이소형 대조군을 나타낸다. 음영처리된 히스토그램은 단지 항-마우스 IgG 2차 항체로 염색된 세포를 나타낸다. 흑색으로 윤곽화된 히스토그램은 SIRPA 양성 세포 집단을 나타낸다. 도 3c는 재조합 가용성 HuSIRPA 단백질에 결합하는 지시된 항-SIRPA 항체의 표면 플라스몬 공명 센서그램을 제시한다. CM5 칩 상에 고정화된 항-마우스 IgG 항체는 항-SIRPA 항체를 포획하였으며, His-태그부착된 가용성 HuSIRPA 단백질의 계열 희석액은 항체 상으로 유동하였다. Kd 값을 곡선 피팅 분석에 의해 결정하였다. 도 3d는 CHO 세포 상에서 과발현된 인간 SIRPA에의 증가하는 농도의 항-SIRPA 항체의 결합을 제시한다. 데이터를 그래프 패드 프리즘(Graph Pad Prism)으로 S자형 곡선으로 피팅함으로써 EC50 값을 계산하였다.

도 4a는 항-SIRPA 항체 (파선 히스토그램) 또는 마우스 IgG1 이소형 대조군 (실선 흑색으로 윤곽화된 히스토그램) 중 어느 하나의 존재 하에서 CHO-HuSIRPA 세포에 결합하는 재조합 가용성 인간 CD47 (HuCD47)의 FACS 히스토그램을 제시한다. His-태그부착된 HuCD47을 PE-표지된 항-HIS 태그 2차 항체로 검출하였다. 음성 대조군 (음영처리된 히스토그램)으로서, CHO-HuSIRPA 세포를 HuCD47의 부재 하에서 항-HIS 태그 PE 2차 항체로 염색하였다. 도 4b는 지시된 항-SIRPA 항체 또는 마우스 IgG1 이소형 대조군의 존재 하에서 CHO-HuSIRPA 세포에 결합하는 HuCD47의 상대 MFI 값을 제시한다. 결과는 HuCD47 및 항체로 처리된 샘플의 MFI 값을 HuCD47의 부재 하에서 항-HIS 태그 PE로 염색된 세포의 MFI 값으로 나눔으로써 배경 대비 배수로서 도시된다.

도 5a는 세포-기반 리포터 검정에서의 인간 SIRPA-의존적 루시페라제 발현의 유도를 제시한다. BWZ/NFAT-루시페라제 리포터 세포 (BWZ)를 인간 SIRPA-DAP12 키메라를 안정하게 발현하도록 조작하였다 (BWZ-HuSIRPA). 세포를 증가하는 농도의 플레이트-결합된 재조합 HuCD47로 자극하였다. 단지 HuSIRPA 키메라를 발현하는 세포만이 발광 시그널에 의해 측정된 바와 같이 루시페라제 발현을 용량-의존적 방식으로 유도하였다. 결과는 배경 대비 배수로서 표현된다. 배경 수준은 y-축 상에 1로 설정된다. 도 5b는 세포-기반 리포터 검정에서의 HuSIRPA-의

존적 루시페라제 발현에 영향을 미치는 CD47-차단 및 CD47-비-차단 항-SIRPA 항체의 능력을 제시한다. BWZ-HuSIRPA 세포를 플레이트-결합된 CD47 단백질과 함께 또는 없이 웰 상에 시딩하였다. 모든 CD47-차단 항체 (1B3, 12D6, 1H11, 5F7)는 발광 시그널을 강력하게 억제한다. 2가지 CD47-비-차단 항-SIRPA 항체는 루시페라제 발현을 감소시키지 않았다. 결과는 배경 대비 배수로서 표현된다. 배경 수준은 y-축 상에 1로 설정된다.

도 6a는 세포-기반 리포터 검정에서의 인간 SIRPA-의존적 또는 인간 SIRPB1-의존적 루시페라제 발현의 유도를 제시한다. BWZ-HuSIRPA 및 BWZ-HuSIRPB1 리포터 세포를 플레이트-결합된 전장 항-SIRPA 항체 또는 mIgG1 이소형 대조군으로 자극하였다. CD47-차단 항-SIRPA 항체는 SIRPA-발현 및 SIRPB1-발현 리포터 세포 둘 다를 활성화시킨 반면, CD47-비-차단 항-SIRPA 항체 (3F9 및 9C2)는 단지 BWZ-HuSIRPA 세포만을 특이적으로 활성화시켰다. 도 6b는 재조합 가용성 HuSIRPA 항원 또는 HuSIRPB1 항원에 결합하는 지시된 항-SIRPA 항체의 표면 플라스몬 공명 센서그램을 제시한다. CM5 칩 상에 고정화된 항-마우스 IgG 항체는 항-SIRPA 항체를 포획하였으며, 등몰 농도의 항원은 포획된 항체 상으로 유동하였다.

도 7a는 항체 자극에 반응하는 1차 인간 대식세포에서의 SIRPA 수용체 하향-조절을 제시한다. 세포를 가용성 전장 이소형 대조군 또는 가용성 전장 항-SIRPA 항체 중 어느 하나로 처리하고, 이어서 별개의 에피토프 빈에 결합하는 다이라이트650(DyLight650)-접합된 항-SIRPA 참조 항체 (SA56-DyL650)로 염색하였다. 도 7b는 CD47-비-차단 항체로 처리된 1차 인간 대식세포에서의 SIRPA 수용체 하향-조절을 제시한다. 비교를 위해, 대식세포를 또한 2가지 CD47-차단 항체 (12D6 및 5F7)로 처리하였다. 결과는 항-SIRPA 항체로 처리된 샘플의 MFI 값을 이소형 대조군으로 처리된 샘플의 MFI 값으로 나눔으로써 참조 항체 결합의 퍼센트로서 제시된다.

도 8a는 이펙터 세포로서 대식세포 및 표적으로서 pHrodo-표지된 종양 세포로의 살아있는 세포 포식작용 검정을 확립한다. 만노스 결합 렉틴인 비오티닐화된 렌스 쿨리나리스 아글루티닌 (LCA: Lens culinaris agglutinin)을 아비딘-접합된 pHrodo 레드 염료와 복합체화하였다. 그 후, 세포 표면을 세포막 상의 LCA 결합 탄수화물 구조를 통해 pHrodo로 코팅하기 위해, LCA-pHrodo 복합체를 Raji 세포 (인간 B-세포 림프종 주)와 혼합하였다. 단독으로 또는 항-CD20 항체로 옵소닌화된 표지된 Raji 세포 (Raji-Red)를 대식세포와 2:1 비로 혼합하고, 2시간 동안 인큐베이션하여 세포의 포식작용을 허용하였다. CD14-APC+/PE+ 대식세포의 퍼센트를 FACS 분석에 의해 카운팅함으로써 포식 활성을 측정하였다. 도 8b는 CD47-비-차단 항-SIRPA 항체로 처리된 대식세포의 증진된 포식 활성을 제시한다. 대식세포를 5 μg/mL의 3F9, 9C2, 1B3 (CD47-차단제), 또는 이소형 대조군을 갖는 2.5% FBS RPMI 배지에서 밤새 배양하였다. 단독으로 또는 항-CD20 항체로 옵소닌화된 Raji-Red 세포를 대식세포와 2:1 비로 혼합하고, 포식 활성을 이전에 기재된 바와 같이 결정하였다. 도 8c는 CD47-차단 항-SIRPA 항체로 처리된 대식세포의 증진된 포식 활성을 제시한다. 대식세포를 5 μg/mL의 12D6, 9C5, 1H11, 5F7, 1B3, 3F9 (CD47-비-차단제) 또는 이소형 대조군을 갖는 2.5% FBS RPMI 배지에서 밤새 배양하였다. 포식 활성을 상기 기재된 바와 같이 측정하였다.

도 9a는 항체 자극에 반응하는 1차 인간 단핵구에서의 SIRPA 수용체 하향-조절을 제시한다. 세포를 가용성 전장 이소형 대조군 또는 항-SIRPA 항체, 3F9 중 어느 하나로 처리하고, 이어서 별개의 에피토프 빈에 결합하는 다이라이트650-접합된 항-SIRPA 참조 항체 (SA56-DyL650)로 염색하였다. 도 9b는 2명의 건강한 공여자 (HD)로부터 단리된 1차 인간 단핵구로부터의 호흡 폭발을 제시한다. 세포를 가용성 전장 마우스 IgG1 이소형 대조군 또는 항-SIRPA 항체 3F9 및 9C2로 자극하였다. 모든 실험에서, 세포를 2 μM의 형광 지시제, CM-H2DCFDA로 표지함으로써 반응성 산소 종 (ROS)의 생산을 모니터링하였다. 도 9c는 CD47-비-차단 항체로 밤새 자극된 1차 인간 단핵구로부터의 IL-8 분비를 제시한다. 상청액을 수집하고, 시토카인 농도를 제조자 (이바이오사이언스 (eBioscience))에 의해 지시된 바와 같은 표준 ELISA 프로토콜에 의해 결정하였다.

도 10a는 huSIRPA-tg 마우스에서의 FACS 염색에 의한 말초 혈액 단핵구 (실선) 및 과립구 (파선)에서의 마우스 및 인간 SIRPA의 발현을 제시한다. 인간 SIRPA를 항-hSIRPα/β-APC (클론 SE5A5, 바이오레전드(Biolegend))로 검출하고; 마우스 SIRPA를 항-mSIRPα-APC (클론 p84, 바이오레전드)로 검출하였다. 이소형 염색은 음영처리된 히스토그램으로서 나타내어진다. 도 10b는 Raji B 세포 림프종 세포로 피하로 삽입된 huSIRPA-tg 마우스의 종양 부피 측정을 제시한다. 군당 3마리의 마우스는 $5x10^5$ 또는 $1x10^6$개의 Raji 세포 중 어느 하나를 받았다. 고형 종양 형성을 1주당 2회 캘리퍼스 측정에 의해 결정하였다. 도 10c는 3F9 (실선 히스토그램) 또는 이소형 대조군 (음영처리된 히스토그램) 항체 중 어느 하나의 10 mg/kg이 투여된 마우스로부터의 말초 혈액 세포에서의 huSIRPA 발현을 제시한다. 도 10c의 상부 패널은 3F9와는 상이한 에피토프에 결합하는 항체인 상업적 항-hSIRPα/β-APC (클론 SE5A5, 바이오레전드)로의 huSIRPA의 검출을 나타낸다. 도 10c의 하부 패널은 3F9와 동일한 에피토프에 결합하는 항체인 내부적으로 생성된 항-hSIRPα-다이라이트 650 (클론 9C2)으로의

huSIRPA의 검출을 나타낸다. 도 10d는 생체내에서의 항체 처리 후의 비장세포에서의 huSIRPA 발현의 하향조절을 제시한다. 도 10d의 상부 패널은 항-마우스 F4/80 FITC 및 항-마우스 CD11b 퍼시픽 블루(Pacific Blue)로 염색된 마우스 비장으로부터의 단일-세포 현탁액의 게이팅 전략을 나타낸다. 도 10d의 하부 패널은 2가지 비장 골수 집단 (F4/80LoCD11bLo 및 F4/80HiCD11bHi)으로부터의 huSIRPA 발현을 제시한다. 실선 히스토그램은 이소형 대조군 항체가 투여된 마우스에서의 huSIRPA 발현을 제시하는 반면, 파선 히스토그램은 3F9가 투여된 마우스에서의 huSIRPA 발현을 제시한다.

도 11a는 생체내에서의 항체 처리 후의 종양-연관된 골수 세포에서의 huSIRPA 발현의 하향조절을 제시한다. 도 11a의 상부 패널은 항-마우스 F4/80 FITC 및 항-마우스 CD11b 퍼시픽 블루로 염색된 종양으로부터의 단일-세포 현탁액의 게이팅 전략을 제시한다. 도 11a의 하부 패널은 2가지 비장 골수 집단 (F4/80+ 및 CD11b+)으로부터의 huSIRPA 발현을 제시한다. 실선 히스토그램은 이소형 대조군 항체가 투여된 마우스에서의 huSIRPA 발현을 나타내는 반면, 파선 히스토그램은 3F9가 투여된 마우스에서의 huSIRPA 발현을 제시한다. 도 11b는 huSIRPA-tg 마우스 내로 피하로 주사된 Raji-루시페라제 림프종 세포의 방사휘도 값을 제시한다. 제10일에, 마우스를 방사휘도 값에 기반하여 처리군 또는 대조군으로 무작위화하고, 연구 종료까지 3-4일마다 10 mg/kg으로 3F9 또는 마우스 IgG1 항체의 복강내 주사로 투약하였다. 투약 개시 후의 종양 발광 값을 무작위화의 일에 발광 값으로에 대해 보정하고, 유의성에 대해 선형 회귀에 의해 분석하였다.

도 12a는 생체내에서의 항체 처리 후의 MDA-MB-231 종양-함유 인간화 마우스로부터 수확된 huSIRPA 발현 huCD45+huCD14+ 세포의 하향조절을 제시한다. 도 12a의 상부 패널은 이소형 대조군, 3F9, 또는 키트루다 (Keytruda) (펨브롤리주맙, 머크(Merck)) 중 어느 하나의 복강내 주사가 투여된 마우스로부터의 말초 혈액 huCD45+huCD14+ 세포에서의 huSIRPA 발현 수준을 제시한다. 도 12a의 하부 패널은 이소형 대조군, 3F9, 또는 키트루다 (펨브롤리주맙, 머크) 중 어느 하나의 복강내 주사가 투여된 마우스로부터의 종양 침윤 huCD45+huCD14+ 세포에서의 huSIRPA 발현 수준을 제시한다. 도 12b는 이소형 대조군, 3F9, 또는 키트루다 (펨브롤리주맙, 머크) 중 어느 하나의 복강내 주사가 투여된 마우스로부터의 말초 혈액에 (도 12b, 상부 패널) 또는 종양 내에 (도 12b, 하부 패널) 존재하는 huCD45+ huCD14+ 세포의 퍼센트를 제시한다. 도 12c는 인간화 마우스의 혈액에서의 인간 $CD45^{+}$ 세포의 %가 SIRPA 항체 3F9로의 투약 후에 저하되는 것을 제시하는 데이터를 제공한다. 데이터는 공여자, 초기 혈액 파라미터 (CD45, CD33, CD3), 초기 동물 중량, 및 초기 종양 부피에 대해 보정한다. 대조군 (muIgG1)에 비해 다중 선형 회귀 (R*lm*() 함수)에 의한 ***p<0.002.

도 13a는 다양한 제대혈 공여자 (공여자 5031, 5048, 129)로부터의 인간 면역 줄기 세포로 이식된 NSG 마우스에서의 평균 종양 부피를 플롯팅한다. 인간화 마우스를 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231로 피하로 삽입하고, 제-1일에서의 종양 부피, huCD34+ 줄기 세포 공여자, 무작위화 전의 체중, 및 무작위화 전의 huC45+ 이식 속도에 기반하여 처리군 또는 대조군으로 무작위화하였다. 마우스를 4일마다 40 mg/kg으로의 마우스 IgG1 또는 3F9 중 어느 하나 또는 5일마다 10 mg/kg의 키트루다의 복강내 주사로 투약하였다. 회색 실선은 이소형 대조군-처리된 마우스의 평균 종양 부피를 나타내고, 흑색 실선은 키트루다-처리된 마우스의 평균 종양 부피를 나타내고, 흑색 파선은 3F9-처리된 마우스의 평균 종양 부피를 나타낸다. 도 13b는 huCD34+ 줄기 세포 공여자에 의한 인간화 NSG 마우스에서의 평균 종양 부피를 플롯팅한다. 도 13b의 상부 패널은 공여자 5031 및 5048로부터의 줄기 세포로 이식된 처리군 및 대조군 마우스로부터의 평균 종양 부피를 제시한다. 도 13b의 하부 패널은 공여자 129로부터의 줄기 세포로 이식된 처리군 및 대조군 마우스로부터의 평균 종양 부피를 나타낸다. 회색 실선은 이소형 대조군-처리된 마우스의 평균 종양 부피를 나타내고, 흑색 실선은 키트루다-처리된 마우스의 평균 종양 부피를 나타내고, 흑색 파선은 3F9-처리된 마우스의 평균 종양 부피를 제시한다.

도 14a는 3F9의 중쇄 가변 도메인의 잠재적 인간화 서열을 열거한다. 인간화 서열은 IGHV3-23*01 수용자 프레임워크 및 IGHJ4*01 연결 영역에 기반한다. 도 14a는 출현의 순서대로 각각 서열식별번호: 48 내지 53을 개시한다. 도 14b는 3F9의 경쇄 가변 도메인의 잠재적 인간화 서열을 열거한다. 인간화 서열은 IGKV3-11*01 수용자 프레임워크 및 IGKJ2*01 연결 영역에 기반한다. 도 14b는 출현의 순서대로 각각 서열식별번호: 54 내지 60을 개시한다. 도 14c는 9C2의 중쇄 가변 도메인의 잠재적 인간화 서열을 열거한다. 인간화 서열은 IGHV1-46*01 수용자 프레임워크 및 IGHJ4*01 연결 영역에 기반한다. 도 14c는 출현의 순서대로 각각 서열식별번호: 61, 49 및 62-67을 개시한다. 도 14d는 9C2의 경쇄 가변 도메인의 잠재적 인간화 서열을 열거한다. 인간화 서열은 IGKV3-11*01 수용자 프레임워크 및 IGKJ2*01 연결 영역에 기반한다. 도 14d는 출현의 순서대로 각각 서열식별번호: 68, 55 및 69-74를 개시한다. CDR 서열은 볼드체로 언급된다. CDR 정의는 웹사이트 www.bioinf.org.uk/abs/로부터의 AbM이다. "b"는 매복된 측쇄를 언급하고; "p"는 부분적으로 매복된 것을 언급하고; "i"는 VH 및 VL 도메인 사이의 계면에서의 측쇄를 언급한다. 인간 및 뮤린 생식계열 사이의 서열 차이는

별표 (*)에 의해 언급된다. 프레임워크에서의 잠재적 추가적인 돌연변이는 하기 서열로 언급된다. CDR 서열의 잠재적 변화는 하기 각각의 CDR 서열로 언급된다. 이들은 아스파라긴 (N) 탈아미드화를 방지할 수 있다.

도 15a 및 15b는 엔도S(EndoS)로의 처리에 의한 3F9의 탈글리코실화 (16A) 및 탈글리코실화가 항원 인식 (16B)에 대해 영향을 갖지 않았음을 제시한다.

도 16은 3F9의 둘 다의 글리코형이 이소형 대조군-처리된 대식세포에 비해 SIRPA의 표면 발현을 유의하게 하향 조절하였지만, 탈글리코실화된 형태는 글리코실화된 형태에 비해 부분적으로 감소된 활성을 나타내었음을 예시하는 데이터를 제공한다.

도 17a 및 17b는 대조군 또는 3F9 항체로 처리된 대식세포 상의 FcγRIIIA (패널 18A, CD16) 및 FcγRIIA/B (패널 18B, CD32A/B)의 표면 발현 수준을 예시하는 데이터를 제공한다. 이 분석을 위한 FcγRII를 검출하는데 사용된 항체는 활성화 수용체 (FcγRIIA)를 억제성 수용체 (FcγRIIB)로부터 구별하지 않는다.

도 18은 3F9의 글리코실화된 및 탈글리코실화된 형태로 처리된 대식세포 상의 수용체-특이적 항체를 사용한 FcγRIIA (좌측 패널) 및 FcγRIIB (우측 패널)의 세포 표면 수준을 예시하는 데이터를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] **용어**

[0035] 본원에 사용된 바와 같은 단수 형태는 내용이 명백하게 달리 나타내지 않는다면 복수 지칭대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "항체"에 대한 지칭은 임의로 2종 이상의 이러한 분자의 조합을 포함하는 등이다.

[0036] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 이 기술 분야의 통상의 기술자에게 용이하게 공지된 각각의 값에 대한 통상적인 오차 범위를 지칭한다.

[0037] 용어 "항체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되며, 이들이 바람직한 항원-결합 활성을 나타내는 한, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체, 예컨대 이중특이적 항체, 및 항체 단편을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 항체 구조를 포괄한다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 균질한 항체의 집단으로부터 얻어진 항체를 지칭하며, 즉, 집단을 포함하는 개별적 항체는, 예를 들어, 천연 발생 돌연변이를 함유하거나 모노클로날 항체 제제의 생산 동안 발생하는 가능한 변이체 항체를 제외하고는 (이러한 변이체는 일반적으로 소량으로 존재함) 동일하고/거나 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지정된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와 대조적으로, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지정된다. 따라서, 변형어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 얻어진 것으로서의 항체의 특징을 지시하며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체의 생산을 요구하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-제시 방법, 및 인간 이뮤노글로불린 좌위의 전부 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 동물을 이용하는 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 기법에 의해 제조될 수 있다.

[0039] "항체 단편"은 무손상 항체의 부분을 포함하며, 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체 외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$; 디아바디; 선형 항체; 단일-쇄 항체 분자, 예컨대 scFv 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0040] 참조 항체와 "동일한 에피토프에 결합하는" 또는 "동일한 결합 특이성을 갖는" 항체는 경쟁 검정에서 그의 항원에의 참조 항체의 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 지칭하며, 역으로, 참조 항체는 경쟁 검정에서 그의 항원에의 항체의 결합을 50% 이상 차단한다. 동일한 에피토프에 결합하는 항체는 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합할 수 있거나, 에피토프의 부분에 결합할 수 있다. 예시적인 경쟁 검정은 본원에서 제공된다.

[0041] 본원에 사용된 바와 같은 "V-영역"은 B-세포 분화 동안 중쇄 및 경쇄 V-영역 유전자의 재배열의 결과로서 절편이 V-절편에 첨가되는, CDR3 및 프레임워크 4를 포함하여, 프레임워크 1, CDR1, 프레임워크 2, CDR2, 및 프레임워크 3의 절편을 포함하는 항체 가변 영역 도메인을 지칭한다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같은 "상보성-결정 영역 (CDR)"은 경쇄 및 중쇄 가변 영역에 의해 확립된 4개의 "프레임워크" 영역을 가로막는 각각의 쇄에서의 3개의 초가변 영역 (HVR)을 지칭한다. CDR은 항원의 에피토프에의 결합에 대한 1차 기여자이다. 각각의 쇄의 CDR은 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 넘버링된 CDR1, CDR2, 및

CDR3으로 지칭되며, 또한 특정한 CDR이 위치하는 쇄에 의해 확인된다. 따라서, VH CDR3은 그것이 발견되는 항체의 중쇄의 가변 도메인에 위치하는 반면, VL CDR1은 그것이 발견되는 항체의 경쇄의 가변 도메인으로부터의 CDR1이다. 용어 "CDR"은 "HVR"과 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

[0043] CDR 및 프레임워크 영역의 아미노산 서열은 관련 기술분야의 다양한 널리 공지된 정의, 예를 들어, 카바트, 코티아(Chothia), 국제 이뮤노제네틱스(ImMunoGeneTics) 데이터베이스 (IMGT), 및 AbM을 사용하여 결정될 수 있다 (예를 들어, 존슨(Johnson) 등, 상기 문헌; 문헌 [Chothia & Lesk, 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901-917]; [Chothia C. et al., 1989, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature 342, 877-883]; [Chothia C. et al., 1992, structural repertoire of the human VH segments J. Mol. Biol. 227, 799-817]; [Al-Lazikani et al., J.Mol.Biol 1997, 273(4)] 참조). 항원 결합 부위의 정의는 또한 하기에 기재되어 있다: 문헌 [Ruiz et al., IMGT, the international ImMunoGeneTics database. Nucleic Acids Res., 28, 219-221 (2000)]; 및 [Lefranc,M.-P. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. Nucleic Acids Res. Jan 1;29(1):207-9 (2001)]; [MacCallum et al., Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography, J. Mol. Biol., 262 (5), 732-745 (1996)]; 및 [Martin et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 86, 9268-9272 (1989)]; [Martin, et al., Methods Enzymol., 203, 121-153, (1991)]; [Pedersen et al., Immunomethods, 1, 126, (1992)]; 및 [Rees et al., In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)]. 카바트 넘버링에 의해 결정된 바와 같은 CDR에 대한 참고문헌은, 예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)]에 기반한다. 코티아 CDR은 코티아에 의해 정의된 바와 같이 결정된다 (예를 들어, 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)] 참조).

[0044] "에피토프" 또는 "항원 결정자"는 항체가 결합하는 항원 상의 부위를 지칭한다. 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된 인접한 아미노산 또는 비인접한 아미노산으로부터 둘 다 형성될 수 있다. 인접한 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매에의 노출 시에 보유되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 전형적으로 변성 용매로의 처리 시 소실된다. 에피토프는 전형적으로 고유한 공간 입체형태의 적어도 3개, 및 보다 통상적으로, 적어도 5 또는 8-10개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간 입체형태를 결정하는 방법은, 예를 들어, x-선 결정학 및 2-차원 핵 자기 공명을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)]을 참조한다.

[0045] "Fc 영역"은 천연 이뮤노글로불린의 제1 불변 영역을 제외한 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 지칭한다. 상기 용어는 천연 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함한다. 따라서, 천연 이뮤노글로불린의 맥락에서 "Fc 영역"은 전형적으로 IgA, IgD, 및 IgG의 마지막 2개의 불변 영역 이뮤노글로불린 도메인, 및 IgE 및 IgM의 마지막 3개의 불변 영역 이뮤노글로불린 도메인, 및 이들 도메인에 대한 가요성 힌지 N-말단을 지칭한다. IgA 및 IgM에 대해, Fc는 J 쇄를 포함할 수 있다. IgG에 대해, 천연 Fc는 이뮤노글로불린 도메인 Cγ2 및 Cγ3 및 Cγ1과 Cγ 사이의 힌지를 포함한다. Fc 영역의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로 문헌 [Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.)]에서와 같은 EU 지수에 따른 넘버링을 사용하여, 그의 카르복시-말단에 대한 잔기 C226 또는 P230을 포함하는 것으로 정의됨이 관련 기술분야에서 이해된다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 또는 카바트 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은, 예를 들어, 항체의 생산 또는 정제 동안, 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산을 재조합적으로 조작함으로써 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단, 및 K447 잔기를 갖는 및 갖지 않는 항체의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 항체에 사용하기에 적합한 천연-서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 용어 "Fc 영역"은 Fc 영역의 천연 발생 대립유전자 변이체 뿐만 아니라 이펙터 기능을 조정하는 변형을 포함한다. Fc 영역은 또한 생물학적 기능에 대한 변경을 초래하지 않는 변이체를 포함한다. 예를 들어, 1개 이상의 아미노산은 생물학적 기능의 실질적인 소실 없이 이뮤노글로불린의 Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단으로부터 결실될 수 있다.

[0046] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 FcR은 전형적으로 천연 인간 FcR 또는 변이체이다.

[0047] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종이형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연

서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역 뿐만 아니라 그의 천연 발생 변이체를 포함한다.

[0048] "변이체 Fc 영역"은 적어도 1개의 아미노산 변형, 바람직하게는 1개 이상의 아미노산 치환(들)에 의해 천연 서열 Fc 영역의 그것과는 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역에 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에, 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에 비해 적어도 1개의 아미노산 치환, 예를 들어 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 및 바람직하게는 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역과 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 80% 동일성, 및 가장 바람직하게는 그와 적어도 약 90% 동일성, 보다 바람직하게는 그와 적어도 약 95% 동일성을 가질 것이다.

[0049] "길항제" 항체, 또는 "억제성" 항체는 항체가 항원에 결합한 후 항원의 1종 이상의 활성 또는 기능을 억제하거나 또는 감소시키는 (예를 들어, 저하시키는) 항체, 예컨대 본 개시내용의 항-SIRPA 항체이다. 일부 실시양태에서, 길항제 항체는 항원에의 1종 이상의 리간드의 결합을 차단할 수 있다. 일부 실시양태에서, 길항제 항체 또는 억제성 항체는 항원의 1종 이상의 활성 또는 기능; 및/또는 항원에의 리간드의 결합을 실질적으로 또는 완전히 억제한다.

[0050] (K_D)로 약칭되는 용어 "평형 해리 상수"는 해리 속도 상수 (k_d, 시간$^{-1}$)를 회합 속도 상수 (k_a, 시간$^{-1}$ M^{-1})로 나눈 것을 지칭한다. 평형 해리 상수는 임의의 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 바이오센서 시스템, 예컨대 37℃에서 수행된 비아코어(Biacore)® 시스템을 사용하여 표면 플라스몬 공명 분석에 의해 측정된 바와 같이 약 50 nM 미만, 전형적으로 약 25 nM 미만, 또는 10 nM 미만, 예를 들어, 약 5 nM 미만 또는 약 1 nM 미만 및 종종 약 100 pM 미만의 K_D를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 2가 항체로서 결정된 바와 같이 5 x 10^{-5} M 미만, 10^{-5} M 미만, 5 x 10^{-6} M 미만, 10^{-6} M 미만, 5 x 10^{-7} M 미만, 10^{-7} M 미만, 5 x 10^{-8} M 미만, 10^{-8} M 미만, 5 x 10^{-9} M 미만, 10^{-9} M 미만, 5 x10^{-10} M 미만, 10^{-10} M 미만, 5 x 10^{-11} M 미만, 10^{-11} M 미만, 5 x 10^{-12} M 미만, 10^{-12} M 미만, 5 x 10^{-13} M 미만, 10^{-13} M 미만, 5 x 10^{-14} M 미만, 10^{-14} M 미만, 5 x 10^{-15} M 미만, 또는 10^{-15} M 미만 또는 그 미만의 K_D를 갖는다. 본 발명의 맥락에서, "개선된" K_D는 보다 낮은 K_D를 지칭한다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "2가 분자"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 2가 분자는 2가 항체 또는 그의 2가 단편이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 2가 분자는 2가 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 2가 분자는 IgG이다. 일반적으로, 모노클로날 항체는 2가 기본 구조를 갖는다. IgG 및 IgE는 단지 1개의 2가 단위를 갖는 반면, IgA 및 IgM은 다수의 2가 단위 (각각 2개 및 5개)로 이루어지며, 따라서 보다 높은 결합가를 갖는다. 이 2가성은 항원에 대한 항체의 결합력을 증가시킨다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "2가 결합" 또는 "에 2가로 결합하다"는 그의 항원에의 2가 분자의 둘 다의 항원-결합 부위의 결합을 지칭한다. 바람직하게는, 2가 분자의 둘 다의 항원-결합 부위는 동일한 항원 특이성을 공유한다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "결합가"는 항원에 대한 항체의 상이한 결합 부위의 수를 지칭한다. 1가 항체는 항원에 대한 1개의 결합 부위를 포함한다. 2가 항체는 동일한 항원에 대한 2개의 결합 부위를 포함한다.

[0054] 단백질 또는 펩티드를 지칭하는 경우, 어구 항원 또는 표적에 "특이적으로 (또는 선택적으로) 결합하다" 또는 "과 특이적으로 (또는 선택적으로) 면역반응성인"은 그에 의해 항체가 관심의 항원 또는 표적에 결합하는 결합 반응을 지칭한다. 본 발명의 맥락에서, 항체는 전형적으로 다른 항원에 대한 그의 친화도보다 적어도 100배 더 큰 K_D로 SIRPA에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 다른 항원에 대한 그의 친화도보다 적어도 100배 더 큰 K_D로 인간 SIRPA에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 마우스 및 인간 SIRPA에 결합한다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 "특이적 결합" 또는 "선택적 결합"은 (그것이 이를 포함할 수는 있지만) 반드시 배타적 결합을 요구하지는 않는다. 표적에 특이적으로 결합하는 항체는 적어도 약 10^{3} M^{-1} 또는 10^{4} M^{-1}, 때때로 약 10^{5} M^{-1} 또는 10^{6} M^{-1}, 다른 예에서, 약 10^{6} M^{-1} 또는 10^{7} M^{-1}, 약 10^{8} M^{-1} 내지 10^{9} M^{-1}, 또는 약 10^{10} M^{-1} 내지 10^{11} M^{-1} 또는 그 초과의 회합 상수를 가질 수 있다. 다양한 면역검정 형식은 특정한 단백질과 특이적으로 면역반응성인 항체를 선택하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 고체-상 ELISA 면역검정은 단백질과 특이적으로

면역반응성인 모노클로날 항체를 선택하는데 통상적으로 사용된다. 예를 들어, 면역검정 형식의 설명 및 특이적 면역반응성을 결정하는데 사용될 수 있는 조건에 대해서는, 문헌 [Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York]을 참조한다.

[0055] 본 발명의 항-SIRPA 항체는 SIRPA를 발현하는 세포의 세포 표면 상에 존재하는 SIRPA의 수준을 "하향조절한다". 따라서, 본 개시내용에 사용된 바와 같은 "하향-조절"은 SIRPA를 발현하는 세포, 예를 들어, 인간 대식세포의 세포 표면 상에 존재하는 SIRPA의 수준을 감소시키는 항체의 능력을 지칭한다. 본 발명의 항-SIRPA 항체는 세포 표면 상에서 검출되는 SIRPA의 수준이 이소형-매칭된 대조군 항체에 비해 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90% 저하되는 경우에 SIRPA를 하향-조절하는 것으로 간주된다.

[0056] "단리된" 항체, 예컨대 본 개시내용의 항-SIRPa 항체는 그의 생산 환경 (예를 들어, 천연적으로 또는 재조합적으로)의 성분으로부터 확인되고/거나, 분리되고/거나, 회수된 것이다. 바람직하게는, 단리된 폴리펩티드는 그의 생산 환경으로부터의 모든 다른 오염물 성분과의 회합이 없다. 그의 생산 환경으로부터의 오염물 성분, 예컨대 재조합 형질감염된 세포로부터 초래된 것들은 전형적으로 항체에 대한 연구, 진단 또는 치료 용도를 방해할 물질이며, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 (1) 예를 들어, 로우리(Lowry) 방법에 의해 결정된 바와 같이 항체의 95 중량% 초과로, 및 일부 실시양태에서, 99 중량% 초과로; (2) 스피닝 컵 서열분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시(Coomassie) 블루, 또는 바람직하게는, 은 염색을 사용하여 비-환원 또는 환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의해 균질성까지 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 천연 환경의 적어도 1종의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 T 세포 내의 계내 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드 또는 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0057] 2개 이상의 폴리펩티드 서열의 맥락에서 용어 "동일한" 또는 퍼센트 "동일성"은 비교 창 또는 지정된 영역에 비해 최대 상응성에 대해 비교되고 정렬되는 경우, 특정된 영역에 비해 동일하거나, 동일한 (예를 들어, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과) 동일성인 아미노산 잔기의 특정된 백분율을 갖는 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정하는 목적을 위한 정렬은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈라인(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하는 것들을 포함한 다양한 방법으로 수행될 수 있다. 퍼센트 서열 동일성 및 서열 유사성을 결정하기에 적합한 알고리듬의 예는 문헌 [Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977)] 및 [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]에 기재된 BLAST 2.0 알고리듬이다. 따라서, 본 발명의 목적을 위해, BLAST 2.0은 핵산 서열 또는 폴리펩티드 서열에 대한 퍼센트 서열을 결정하는 것으로 기재된 디폴트 파라미터와 함께 사용될 수 있다.

[0058] **본 발명의 특정 측면의 개관.**

[0059] 본 개시내용은 SIRPA 및/또는 SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 작용제 (예를 들어, 항-SIRPA 항체); 이러한 작용제 (예를 들어, 항-SIRPA 항체)를 제조 및 사용하는 방법; 이러한 작용제 (예를 들어, 항-SIRPA 항체)를 함유하는 제약 조성물; 이러한 작용제 (예를 들어, 항-SIRPA 항체)를 코딩하는 핵산; 및 이러한 작용제 (예를 들어, 항-SIRPA 항체)를 코딩하는 핵산을 함유하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0060] SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 본 개시내용의 작용제는 하기 특징 중 하나 이상을 갖는 분자이다: (1) 1종 이상의 SIRPA 활성의 억제 또는 감소; (2) 그의 리간드 중 1종 이상에의 SIRPA의 결합을 억제하거나 또는 감소시키는 능력; (3) SIRPA-발현 세포에서의 SIRPA 발현을 (예컨대 mRNA 수준에서 및/또는 단백질 수준에서) 감소시키는 능력; (4) SIRPA 단백질과 상호작용하거나, 그에 결합하거나, 그를 인식하는 능력; (5) SIRPA 단백질과 특이적으로 상호작용하거나 또는 그에 결합하는 능력; 및 (6) 본원에 기재되거나 고려되는 질환 또는 장애의 임의의 측면을 치료하거나, 개선시키거나, 예방하는 능력.

[0061] SIRPA의 생산을 억제하는 예시적인 작용제는, 제한 없이, SIRPA 합성 및/또는 방출을 특이적으로 억제하는 화합물, SIRPA에 대해 지정된 안티센스 분자, 또는 SIRPA를 코딩하는 핵산에 대해 지정된 짧은 간섭 RNA (siRNA) 분자를 포함한다. 1종 이상의 SIRPA 활성을 억제하는 추가의 예시적인 작용제는, 제한 없이, SIRPA 단백질에 특이적으로 결합하는 항-SIRPA 항체, 1종 이상의 SIRPA 활성을 특이적으로 억제하는 화합물, 예컨대 소분자 억제제 및/또는 펩티드 억제제, 1종 이상의 리간드에의 SIRPA 결합을 특이적으로 억제하는 화합물, SIRPA 구조적 유사체, 또는 SIRPA에 결합하는 RNA 또는 DNA 압타머를 포함한다. 일부 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 작용제는 알로스테릭 억제제이다.

일부 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 작용제는 오르토스테릭 억제제이다.

[0062] 특정 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 작용제는, 제한 없이, 소 펩티드 또는 펩티드-유사 분자, 가용성 펩티드, 및 합성 비-펩티딜 유기 또는 무기 화합물을 포함한 소분자 억제제이다. 소분자 억제제는 약 100 내지 약 20,000 달톤 (Da), 약 500 내지 약 15,000 Da, 약 1000 내지 약 10,000 Da 중 임의의 것의 분자량을 가질 수 있다. 1종 이상의 SIRPA 활성을 갖는 소분자의 억제 효과를 생성하고 시험하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 이러한 방법은 SIRPA 활성에 대한 소분자 억제제의 효과를 평가하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 방법 및 검정 중 임의의 것은 SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 소분자 억제제에 대해 스크리닝하는데 사용될 수 있다.

[0063] 특정 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 작용제는 SIRPA를 코딩하는 핵산을 표적화함으로써 기능적 SIRPA의 발현을 차단하거나 또는 저하시킬 수 있는 적어도 1종의 안티센스 분자를 포함한다. SIRPA의 핵산 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 SIRPA는 NCBI 수탁 번호 NM_080792 또는 Y10375.1에 제시된 바와 같은 핵산 서열을 가질 수 있으며, 마우스 SIRPA는 NCBI 수탁 번호 BC062197에 제시된 바와 같은 핵산 서열을 가질 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드 분자의 제조를 위한 방법은 공지되어 있으며, 이러한 방법은 다른 폴리뉴클레오티드와 교차-반응하지 않고 SIRPA mRNA 중 1종 이상에 특이적으로 결합할 안티센스 올리고뉴클레오티드를 제조하는데 사용될 수 있다. 표적화의 예시적인 부위는 개시 코돈, 5' 조절 영역, 임의의 보존된 컨센서스 영역을 포함한 코딩 서열, 및 3' 비번역된 영역을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 길이로 약 10 내지 약 100 뉴클레오티드, 길이로 약 15 내지 약 50 뉴클레오티드, 길이로 약 18 내지 약 25 뉴클레오티드, 또는 그 초과이다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 뉴클레아제 저항성 등을 증가시키는 화학적 변형, 예컨대, 예를 들어, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 포스포로티오에이트 연결 및 2'-O-당 변형을 추가로 포함한다.

[0064] 특정 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 작용제는 SIRPA를 코딩하는 핵산을 표적화함으로써 기능적 SIRPA의 발현을 차단하거나 또는 저하시킬 수 있는 적어도 1종의 siRNA 분자를 포함한다. siRNA 분자의 제조를 위한 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 이러한 방법은 다른 폴리뉴클레오티드와 교차-반응하지 않고 SIRPA mRNA를 특이적으로 표적화할 siRNA 분자를 제조하는데 사용될 수 있다. siRNA 분자는 전형적인 고체상 올리고뉴클레오티드 합성과 같은 방법에 의해 생성될 수 있으며, 종종 siRNA 작용제의 반감기 및/또는 효능을 증가시키고/거나, 보다 강건한 전달 제형을 허용하는 화학적 변형을 혼입할 것이다. 대안적으로, siRNA 분자는 siRNA의 세포내 전사를 위한 발현 카세트를 코딩하는 벡터를 사용하여 전달된다.

[0065] 특정 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 작용제는 SIRPA와 결합하거나 또는 물리적으로 상호작용하고, SIRPA 및 그의 리간드 중 1종 이상 사이의 상호작용을 차단하는 RNA 또는 DNA 압타머이다. 특정 실시양태에서, 압타머는 SIRPA의 성숙한 형태에 결합하는 적어도 1종의 RNA 또는 DNA 압타머를 포함한다.

[0066] 특정 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 작용제는 적어도 1종의 Siglec-9 구조적 유사체를 포함한다. 용어 "SIRPA 구조적 유사체"는 SIRPA의 그것의 일부와 유사한 3차원 구조를 갖고, 시험관내에서 또는 생체내에서 생리학적 조건 하에서 1종 이상의 CD3 리간드에 결합하며, 여기서 결합이 SIRPA 생물학적 활성을 적어도 부분적으로 억제하는 것인 화합물을 지칭한다. 적합한 SIRPA 구조적 유사체는 리간드, 예컨대 본 개시내용의 SIRPA 리간드에 결합하는 SIRPA의 분자적 모델링을 통해 설계되고 합성될 수 있다. SIRPA 구조적 유사체는 개선된 친화도 및 생물학적 효과를 얻는 동일하거나 상이한 구조의 임의의 바람직한 조합으로의 단량체, 이량체, 또는 보다 높은 차수의 다량체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 작용제는 SIRPA의 아미노산 서열에 결합하거나, 그와 상호작용한다.

[0067] 특정 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 작용제는 가용성 SIRPA 수용체 단백질, 가용성 SIRPA-Fc 융합 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 작용제는 1종 이상의 SIRPA 리간드에 결합하고, 그에 의해 SIRPA 리간드 및 SIRPA 수용체 사이의 상호작용을 방지한다.

[0068] *검정*

[0069] SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 작용제는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법, 예컨대, 예를 들어, 방사성표지된 억제제 검정, 광학 검정, 단백질 결합 검정, 생화학적 스크리닝 검정, 면역검정, 질량 이동 측정 검정, 형광 검정, 및/또는 형광발생 펩티드 절단 검정을 사용하여 확인되고/거나 특징화될 수 있다.

[0070] 결합 검정 및 다른 검정

[0071] 특정 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준을 저하시키고/거나, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드 사이의 상호작용을 억제하는 작용제는 SIRPA 작용제 후보의 상호작용의 존재 및/또는 SIRPA에 대한 결합 친화도를 검출하기 위한 관련 기술분야에 널리 공지된 기법에 의해 확인될 수 있다.

[0072] 특정 실시양태에서, SIRPA와 상호작용하는 작용제는 방사성표지된 억제제 검정을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 공지된 양의 방사성표지된 작용제 후보를 공지된 양의 고정화된 SIRPA 및 완충제와 함께 인큐베이션할 수 있다. 이어서, 고정화된 SIRPA를 완충제로 세척할 수 있고, 고정화된 SIRPA를 관련 기술분야에 공지된 기법, 예컨대, 예를 들어, 감마 카운터를 사용하여 방사성표지된 SIRPA 작용제 후보의 잔류 존재에 대해 측정할 수 있다. 방사성표지된 물질의 존재를 지시하는 측정은 방사성표지된 작용제 후보가 SIRPA와 상호작용하고/거나, 그에 결합할 수 있음을 지시할 수 있다.

[0073] 특정 실시양태에서, SIRPA와 상호작용하는 작용제는 광학 기법을 사용하여 확인될 수 있다. SIRPA-상호작용 작용제를 검출하는 예시적인 광학 기법은, 예를 들어, SIRPA를 비색 공명 그래프팅 표면에 부착시킴으로써, 광이 취해야 하는 광학 경로의 변화로 인한 반사광의 파장을 이동시키고, 이어서 후보 작용제가 SIRPA와 상호작용하도록 허용되는 경우에 반사광의 파장의 추가적인 변화를 측정하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 작용제가 SIRPA와 함께 인큐베이션된 경우에 반사광의 측정된 파장의 변화가 없는 것은 작용제 후보가 SIRPA와 상호작용할 수 없음을 지시할 수 있다. 작용제 후보가 SIRPA와 함께 인큐베이션된 경우에 반사광의 측정된 파장의 변화는 작용제 후보가 SIRPA에 결합하고/거나, 그와 상호작용할 수 있음을 지시할 수 있다.

[0074] 특정 실시양태에서, SIRPA와 상호작용하는 작용제는 단백질-결합 검정을 사용하여 확인될 수 있다. SIRPA-결합 작용제를 검출하는 예시적인 단백질-결합 검정은, 예를 들어, 작용제 후보의 존재 하에서의 SIRPA의 공동-면역침전을 포함할 수 있다. 예를 들어, SIRPA를 완충제에서 작용제 후보와 함께 인큐베이션하고, 이어서 관련 기술분야에 공지된 세척 절차 동안 잠재적으로 상호작용 작용제 후보와 함께, SIRPA를 포획하는데 특이적인 고정화된 분자, 예컨대, 예를 들어, 항-SIRPA 항체를 사용하여 작용제 후보의 존재 하에서 SIRPA를 포획하고 SIRPA를 결합시킬 수 있다. 이어서, 잠재적으로 상호작용하는 작용제 후보와 함께 SIRPA를 방출시킬 수 있고, 작용제 후보의 존재를 작용제 후보 특징에 기반하여 예를 들어, 질량 분광법 및/또는 웨스턴 블롯과 같은 기법에 의해 검출할 수 있다.

[0075] 특정 실시양태에서, SIRPA와 상호작용하는 작용제는 관련 기술분야에 널리 공지된 생화학적 및/또는 면역검정 검정을 사용하여 확인될 수 있다. 예시적인 기법은, 예를 들어, 예를 들어, 웨스턴 블롯, 면역염색, 및 공동-면역침전과 같은 기법을 사용하여 SIRPA 농도 및/또는 단백질 반감기의 변화를 정량적으로 측정하는 검정을 포함할 수 있다. 예를 들어, 작용제 후보를 SIRPA를 함유하는 샘플, 예컨대 SIRPA를 발현하는 세포와 함께 인큐베이션할 수 있고, 이어서 SIRPA 단백질 양 및/또는 세포 수준을 시간 과정 연구 동안 시점에서 측정할 수 있다. 대조군 처리에 비해 단백질 양, 세포 수준, 및/또는 단백질 반감기의 변화는 SIRPA 작용제 후보가 SIRPA 반감기 및/또는 활성을 변경시킬 수 있음을 지시할 수 있다.

[0076] 특정 실시양태에서, 질량 이동 측정 검정을 사용하여 SIRPA와 상호작용하는 작용제를 확인할 수 있다. 예시적인 질량 이동 측정 검정은, 예를 들어, 강하게 및/또는 공유적으로 결합된 SIRPA 작용제의 존재를 작용제 후보가 SIRPA와 상호작용하고 있는 경우에 SIRPA 질량의 변화를 질량 분광계와 같은 기기 (그러나 이에 제한되지는 않음)를 사용함으로써 측정함으로써 검출하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 질량 이동 검정은 작용제 후보 상호작용의 성질에 따라 전체 단백질 및/또는 펩티드-기반 분석에 대해 수행될 수 있다. SIRPA에의 상기 작용제 후보의 첨가와 상관되는 질량 이동의 검출은 작용제 후보가 SIRPA와 상호작용하거나 그렇지 않으면 이를 억제할 수 있음을 지시할 수 있다. 추가적으로, 예시적인 질량 이동 측정 검정은, 예를 들어, 작용제 후보가 SIRPA와 상호작용하는 경우에 각각의 작용제 후보 질량과 상관되는 SIRPA에 대한 질량의 첨가를 예를 들어, 표면 플라스몬 공명과 같은 기법을 사용하여 검출하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 광의 굴절 지수의 변화를 측정하고, 센서 표면에 부착된 SIRPA의 질량의 변화와 상관시킬 수 있다.

[0077] 특정 실시양태에서, 화학적 가교 검정을 사용하여 SIRPA와 상호작용하는 SIRPA 작용제를 확인할 수 있다. 예를

들어, 작용제 후보를 SIRPA와 함께 생체내에서 또는 시험관내에서, SIRPA와 상호작용하는 작용제 후보를 상기 SIRPA 분자에 공유적으로 연결할 수 있는 분자 가교제와 함께 인큐베이션할 수 있다. 이어서, 질량 분광법 및/또는 웨스턴 블롯과 같은 기법 (그러나 이에 제한되지는 않음)을 사용하여 SIRPA와 상호작용하거나 그렇지 않으면 이를 억제할 수 있는 작용제 후보를 확인할 수 있다. 예를 들어, 작용제 후보와 공유적을 가교된 SIRPA의 검출은 작용제 후보가 SIRPA와 상호작용하거나 그렇지 않으면 이를 억제할 수 있음을 지시할 수 있다.

[0078] 특정 실시양태에서, SIRPA와 상호작용하는 작용제는 형광 검정을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 공지된 양의 형광 작용제 후보를 공지된 양의 고정화된 SIRPA 및 완충제와 함께 인큐베이션할 수 있다. 이어서, 고정화된 SIRPA를 완충제로 세척할 수 있고, 고정화된 SIRPA를 관련 기술분야에 공지된 기법, 예컨대 형광 검출 (그러나 이에 제한되지는 않음)을 사용하여 형광 SIRPA 작용제 후보의 잔류 존재에 대해 측정할 수 있다. 형광 물질의 존재를 지시하는 측정은 형광 작용제 후보가 SIRPA와 상호작용하고/거나 이에 결합할 수 있음을 지시할 수 있다.

[0079] 관련 기술분야에 공지되고 본원 (예를 들어, 실시예 2-11)에 기재된 검정은 본 개시내용의 SIRPA 작용제의 생물학적 활성을 확인하고 시험하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 Siglec-9 활성을 조정하는 SIRPA 작용제의 능력을 시험하기 위한 검정이 제공된다.

[0080] **항-SIRP-알파 (SIRPA) 항체**

[0081] *본 개시내용의 특정 항-SIRPA 항체의 측면의 간단한 개관*

[0082] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 적어도 부분적으로 세포 SIRPA를 하향 조절하는 항체의 능력에 기인한 1종 이상의 길항제성 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 단리된 SIRPA 항체는 SIRPA에 선택적으로 결합하고, SIRPA를 하향-조절한다. 일부 실시양태에서, 항체는 세포 상에서 발현된 SIRPA에의 SIRPA 리간드, 예를 들어, CD47의 결합을 차단하지 않는다. 대안적인 실시양태에서, 항체는 SIRPA에의 SIRPA 리간드, 예를 들어, CD47의 결합을 차단한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 항체, 인간화 항체, 이중특이적 항체, 다가 항체, 또는 키메라 항체이다. 이러한 항체의 예시적인 설명은 본 개시내용 전반에 걸쳐 발견된다. 일부 실시양태에서, 항체는 제1 항원 및 제2 항원을 인식하는 이중특이적 항체이다.

[0083] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 또한 본원에서 "다형성" 변이체로 지칭되는 인간 대립유전자 변이체를 포함한 인간 SIRPA에 선택적으로 결합하지만, 마우스 SIRPA에는 그렇지 않으며, SIRPB에는 결합하지 않는다. 도 1a는 리간드-결합 도메인 내의 분기형 잔기를 도시하는 인간 SIRPA 단백질 (v1 및 v2, 수탁 번호는 각각 NP542970 및 CAA71403임)의 2개의 가장 통상적인 대립유전자 사이의 아미노산 서열 정렬을 제시한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 SIRPB 또는 마우스 SIRPA에는 존재하지 않지만 인간 SIRPA의 대립유전자 변이체에 존재하는 선형 또는 입체형태적 에피토프에 결합한다. 도 1b는 2가지 단백질 사이의 상동성을 도시하는, 수탁 번호가 각각 NP542970 및 O00241인 인간 SIRPA v1 단백질 및 인간 SIRPB1 단백질 사이의 아미노산 서열 정렬을 제시한다. 도 2는 2가지 단백질 사이의 상동성을 도시하는, 수탁 번호가 각각 NP542970 및 Q6P6I8인 인간 SIRPA 단백질 및 마우스 SIRPA 단백질 사이의 아미노산 서열 정렬을 제시한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 인간 및 마우스 SIRPA에 선택적으로 결합하며, SIRPB에 결합하지 않는다.

[0084] SIRPA는 단일-경로 유형 I 막 단백질이다. 인간 SIRPA의 아미노산 서열 (서열식별번호: 1) 내에서, 세포외 도메인은 아미노산 잔기 31-373에 위치하고; 막횡단 도메인은 아미노산 잔기 374-394에 위치하고; 세포내 도메인은 아미노산 잔기 395-504에 위치한다.

[0085] 인간 SIRPA는 각각 D1 도메인, D2 도메인, 및 D3 도메인으로 지칭되는 Ig 슈퍼 패밀리 (IgSF) 도메인의 단일 V-세트 및 2개의 C1-세트를 포함한다. D1 도메인은 인간 SIRPA의 아미노산 잔기 32-137을 포함하고; D2 도메인은 인간 SIRPA의 아미노산 잔기 148-247을 포함하고; D3 도메인은 인간 SIRPA의 아미노산 잔기 254-348을 포함한다.

[0086] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 SIRPA의 D1 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 1의 인간 SIRPA 아미노산 서열의 아미노산 잔기 32-137을 포함하는 인간 SIRPA의 D1 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 인간 SIRPA의 D1 도메인 내의 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 인간 SIRPA의 D1 도메인 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 에피토프는 서열식별번호: 1의 인간 SIRPA 아미노산 서열의 아미노산 잔기 32-137, 아미노산 잔기 32-52, 아미노산 잔기 55-121, 아미노산 잔기 58-73, 아미노산 잔기 68-83, 아미노산 잔기

78-93, 아미노산 잔기 88-103, 아미노산 잔기 98-113, 아미노산 잔기 108-123, 및 아미노산 잔기 118-133으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0087] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 SIRPA의 D2 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 1의 인간 SIRPA 아미노산 서열의 아미노산 잔기 148-247을 포함하는 인간 SIRPA의 D2 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 인간 SIRPA의 D2 도메인 내의 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 인간 SIRPA의 D2 도메인 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 에피토프는 서열식별번호: 1의 인간 SIRPA 아미노산 서열의 아미노산 잔기 148-247, 아미노산 잔기 148-168, 아미노산 잔기 158-173, 아미노산 잔기 168-183, 아미노산 잔기 170-228, 아미노산 잔기 178-193, 아미노산 잔기 188-203, 아미노산 잔기 198-213, 아미노산 잔기 208-223, 아미노산 잔기 218-233, 및 아미노산 잔기 228-243으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 SIRPA의 D3 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 1의 인간 SIRPA 아미노산 서열의 아미노산 잔기 254-348을 포함하는 인간 SIRPA의 D3 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 인간 SIRPA의 D3 도메인 내의 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 인간 SIRPA의 D3 도메인 내의 에피토프에 결합하며, 여기서 에피토프는 서열식별번호: 1의 인간 SIRPA 아미노산 서열의 아미노산 잔기 254-348, 아미노산 잔기 254-274, 아미노산 잔기 264-279, 아미노산 잔기 274-289, 아미노산 잔기 273-331, 아미노산 잔기 281-315, 아미노산 잔기 281-337, 아미노산 잔기 284-299, 아미노산 잔기 294-309, 아미노산 잔기 304-319, 아미노산 잔기 314-329, 아미노산 잔기 324-339, 및 아미노산 잔기 334-348로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D1 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D2 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 SIRPA, 예를 들어, 인간 SIRPA의 D3 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 표 2에서 3F9로서 지정된 항체의 CDR을 갖는 항체에 의해 결합되는 동일한 SIRPA 에피토프 또는 SIRPA 에피토프의 일부에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 SIRPA에의 결합에 대해 3F9와 경쟁하며, 3F9와 동일한 에피토프의 전부 또는 일부에 결합하는, 표 2에서 9C2로서 지정된 항체의 CDR을 갖는 항체에 의해 결합되는 동일한 SIRPA 에피토프 또는 SIRPA 에피토프의 일부에 결합한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 표 2에서 3F9로서 지정된 항체의 CDR을 갖는 항체에 의해 결합되는 동일한 SIRPA 에피토프 또는 SIRPA 에피토프의 일부에 결합하며, 표 2에서 9C2로 지정된 항체의 CDR을 갖는 항체에 의해 결합되는 동일한 에피토프 또는 SIRPA 에피토프의 일부에 결합한다.

[0090] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 인간 SIRPA에의 결합에 대해 3F9 및 9C2와 경쟁한다.

[0091] 바람직한 실시양태에서, 선행하는 3개의 단락의 각각의 항체는 SIRPA에의 CD47 결합을 차단하지 않는다.

[0092] *SIRPA 하향-조절*

[0093] 본 개시내용의 특정 측면은 SIRPA를 하향-조절하는, 즉, 그의 세포 수준을 저하시키는 항-SIRPA 항체에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드, 예를 들어, CD47 사이의 상호작용 (예를 들어, 결합)을 억제하지 않고 SIRPA의 세포 수준을 저하시킨다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 SIRPA의 세포 수준을 저하시키며, SIRPA 및 1종 이상의 SIRPA 리간드, 예를 들어, CD47 사이의 상호작용 (예를 들어, 결합)을 억제한다.

[0094] SIRPA의 세포 수준은, 제한 없이, SIRPA의 세포 표면 수준, SIRPA의 세포내 수준, 및 SIRPA의 총 수준을 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준의 저하는 SIRPA의 세포 표면 수준의 저하를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 항-SIRPA 항체는 그것이 본원에 기재되거나 관련 기술분야에 공지된 임의의 시험관내 세포-기반 검정 또는 적합한 생체내 모델에 의해, 예를 들어 SIRPA의 세포 표면 수준을 측정하는 유동 세포측정, 예컨대 형광-활성화된 세포 분류 (FACS)를 이용하여 측정된 바와 같이 SIRPA의 세포 표면 수준의 25% 이상의 저하를 유도하는 경우, SIRPA의 세포 표면 수준을 저하시킨다. 일부 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준의 저하는 SIRPA의 세포내 수준의 저하를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 항-SIRPA 항체는 그것이 본원에 기재되거나 관련 기술분야에 공지된 임의의 시험관내 세포-기반 검정 또는 적합한 생체내 모델, 예를 들어 면역염색, 웨스턴 블롯 분석, 공동-면역침전, 및 세포 세포측정에 의해 측정된 바와 같이 SIRPA의 세포내 수준의 25% 이상의 저하를 유도하는 경우, Siglec-9의 세포내 수준을 저하시킨다. 일부 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준의 저하

는 SIRPA의 총 수준의 저하를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 항-SIRPA 항체는 그것이 본원에 기재되거나 관련 기술분야에 공지된 임의의 시험관내 세포-기반 검정 또는 적합한 생체내 모델, 예를 들어 면역염색, 웨스턴 블롯 분석, 공동-면역침전, 및 세포 세포측정에 의해 측정된 바와 같이 SIRPA의 총 수준의 25% 이상의 저하를 유도하는 경우, SIRPA의 총 수준을 저하시킨다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 SIRPA 분해, SIRPA 절단, SIRPA 내재화, SIRPA 쉐딩, SIRPA 발현의 하향조절, 또는 이들의 임의의 조합을 유도한다. 일부 실시양태에서, SIRPA의 세포 수준은 SIRPA 세포 검정을 이용하여 1차 세포 (예를 들어, 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 단핵구, 소교세포, 및 대식세포) 상에서 또는 세포주 상에서 측정된다.

[0095] 일부 실시양태에서, 하향조절 항-SIRPA 항체는 37℃에서 항체에의 인간 대식세포의 4시간의 노출 후에, 200 nM 이하, 전형적으로 100 nM 이하의 IC_{50}을 갖는다 (세포 표면 상에서 발현된 SIRPA의 50%가 하향조절됨). 일부 실시양태에서, SIRPA는 본 발명의 항체에의 적어도 24시간의 노출 동안 하향-조절되어 잔류한다. 세포는 임의의 기술, 예를 들어, 유동 세포측정을 사용하여 SIRPA 표면 발현에 대해 분석될 수 있다.

[0096] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 항-SIRPA 항체의 부재 하에서의 SIRPA의 세포 수준에 비해 SIRPA의 세포 수준을 적어도 25%, 적어도 26%, 적어도 27%, 적어도 28%, 적어도 29%, 적어도 30%, 적어도 31%, 적어도 32%, 적어도 33%, 적어도 34%, 적어도 35%, 적어도 36%, 적어도 37%, 적어도 38%, 적어도 39%, 적어도 40%, 적어도 41%, 적어도 42%, 적어도 43%, 적어도 44%, 적어도 45%, 적어도 46%, 적어도 47%, 적어도 48%, 적어도 49%, 적어도 50%, 적어도 51%, 적어도 52%, 적어도 53%, 적어도 54%, 적어도 55%, 적어도 56%, 적어도 57%, 적어도 58%, 적어도 59%, 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 그 초과만큼 저하시킨다.

[0097] 선행하는 단락에 요약된 하향-조절 활성 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 SIRPA의 세포 표면 클러스터링을 억제한다.

[0098] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 SIRPA를 하향-조절하지만, SIRPA에의 SIRPA 리간드, 예를 들어, CD47의 결합을 차단하지 않는다. 본 발명의 맥락에서, SIRPA에의 CD47의 결합을 차단하지 않는 항체는 항체가 CD47 및 SIRPA를 발현하는 세포와 함께 인큐베이션되는 경우, SIRPA에의 CD47 결합의 유의한 저하를 초래하지 않는 항체를 지칭한다. SIRPA에의 CD47 결합의 맥락에서 "유의한 저하"는 SIRPA에 결합하지 않는 이소형-매칭된 대조군 항체의 존재 하에서의 SIRPA에의 CD47 결합에 비해 30% 이하, 전형적으로 적어도 25%, 적어도 20%, 적어도 15%, 또는 적어도 10% 또는 그 미만의 결합의 저하를 지칭한다. 차단 활성을 평가하는 예시적인 검정은 실시예에 제시된다. 예를 들어, 인간 SIRPA를 발현하는 세포, 예를 들어, 인간 대식세포는 인간 SIRPA를 발현하도록 변형된 CHO 세포와 같은 세포이며, 이를 96-웰 플레이트에 10^5 세포/웰로 플레이팅하고, 세척하고, 1.0 μg/ml의 모노클로날 항체 또는 이소형 대조군을 함유하는 형광 활성화 세포 분류를 위한 100 μl 완충제에서 인큐베이션한다. 그 후, 세포를 세척하고, 가용성 인간 CD47과 함께 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션한다. 그 후, 세포를 표면-결합된 CD47에 대해 분석한다.

[0099] 대안적으로, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 SIRPA를 하향-조절하지만, SIRPA에의 CD47의 결합을 차단한다. CD47 결합을 차단하는 항체는 전형적으로 CD47 결합을 50% 이상, 전형적으로 75%, 또는 90% 이상 차단한다.

[0100] *SIRPA 활성의 억제*

[0101] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA항체는 제한 없이 하기를 포함한 SIRPA의 1종 이상의 활성을 억제한다: 1종 이상의 SIRPA 리간드에의 SIRPA 결합, 임의로 여기서 1종 이상의 SIRPA 리간드는 CD47, 계면활성제 단백질 A 및 D 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택됨; 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, M1 대식세포, M1 호중구, M1 NK 세포, 활성화된 M1 대식세포, 활성화된 M1 호중구, 활성화된 M1 NK 세포, M2 대식세포, M2 호중구, M2 NK 세포, 단핵구, 파골세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 과립구, 호중구, 소교세포, M1 소교세포, 활성화된 M1 소교세포, 및 M2 소교세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 세포의 증식의 저하; 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, M1 대식세포, M1 호중구, M1 NK 세포, 활성화된 M1 대식세포, 활성화된 M1 호중구, 활성화된 M1 NK 세포,

M2 대식세포, M2 호중구, M2 NK 세포, 단핵구, 파골세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 과립구, 호중구, 소교세포, M1 소교세포, 활성화된 M1 소교세포, 및 M2 소교세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 세포의 이동의 억제; 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, M1 대식세포, M1 호중구, M1 NK 세포, 활성화된 M1 대식세포, 활성화된 M1 호중구, 활성화된 M1 NK 세포, M2 대식세포, M2 호중구, M2 NK 세포, 단핵구, 파골세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 과립구, 호중구, 소교세포, M1 소교세포, 활성화된 M1 소교세포, 및 M2 소교세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 세포의 1종 이상의 기능의 억제; 아폽토시스성 뉴런 클리어런스, 신경 조직 데브리스 클리어런스, 기능이상적 시냅스 클리어런스, 비-신경 조직 데브리스 클리어런스, 박테리아 클리어런스, 다른 외래 소체 클리어런스, 질환-유발 단백질 클리어런스, 질환-유발 펩티드 클리어런스, 및 종양 세포 클리어런스로 이루어진 군으로부터 선택되는 클리어런스 중 1종 이상의 유형의 억제; 임의로 여기서 질환-유발 단백질은 아밀로이드 베타, 올리고머성 아밀로이드 베타, 아밀로이드 베타 플라크, 아밀로이드 전구체 단백질 또는 그의 단편, Tau, IAPP, 알파-시누클레인, TDP-43, FUS 단백질, C9orf72 (염색체 9 오픈 리딩 프레임 72), c9RAN 단백질, 프리온 단백질, PrPSc, 헌팅틴, 칼시토닌, 슈퍼옥시드 디스뮤타제, 아탁신, 아탁신 1, 아탁신 2, 아탁신 3, 아탁신 7, 아탁신 8, 아탁신 10, 루이 소체, 심방 나트륨이뇨 인자, 섬 아밀로이드 폴리펩티드, 인슐린, 아포지단백질 AI, 혈청 아밀로이드 A, 메딘, 프로락틴, 트랜스티레틴, 리소자임, 베타 2 마이크로글로불린, 겔솔린, 케라토에피텔린, 시스타틴, 이뮤노글로불린 경쇄 AL, S-IBM 단백질, 반복부-연관된 비-ATG (RAN) 번역 산물, 디펩티드 반복 (DPR) 펩티드, 글리신-알라닌 (GA) 반복 펩티드, 글리신-프롤린 (GP) 반복 펩티드, 글리신-아르기닌 (GR) 반복 펩티드, 프롤린-알라닌 (PA) 반복 펩티드, 유비퀴틴, 및 프롤린-아르기닌 (PR) 반복 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되고, 종양 세포는 방광암, 뇌암, 유방암, 결장암, 직장암, 자궁내막암, 신장암, 신세포암, 신우암, 백혈병, 폐암, 흑색종, 비-호지킨 림프종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 섬유육종, 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암으로부터의 것임; 소교세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 호중구, T 세포, T 헬퍼 세포, 또는 세포독성 T 세포 중 1종 이상에 의한 종양 세포 살해의 억제; 소교세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 호중구, T 세포, T 헬퍼 세포, 또는 세포독성 T 세포 중 1종 이상의 항-종양 세포 증식 활성의 억제; 1종 이상의 염증성 수용체의 조정된 발현, 임의로 여기서 1종 이상의 염증성 수용체는 CD86을 포함하고, 1종 이상의 염증성 수용체는 소교세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, 수지상 세포, 골수-유래된 수지상 세포, 호중구, T 세포, T 헬퍼 세포, 또는 세포독성 T 세포 중 1종 이상 상에서 발현됨; 면역억제자 수지상 세포, 면역억제자 대식세포, 면역억제자 호중구, 면역억제자 NK 세포, 골수-유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 종양-연관된 호중구, 종양-연관된 NK 세포, 및 조절성 T 세포 중 1종 이상의 기능성의 촉진 또는 구출; 면역억제자 수지상 세포, 면역억제자 대식세포, 면역억제자 호중구, 면역억제자 NK 세포, 골수-유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 종양-연관된 호중구, 종양-연관된 NK 세포, 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포, 및 조절성 T 세포 중 1종 이상의 종양 내로의 침윤의 증가; 종양에서의, 말초 혈액, 또는 다른 림프 기관에서의 종양-촉진 골수/과립구 면역-억제성 세포 및/또는 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포의 수의 증가; 골수-유래된 억제자 세포 및/또는 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포의 종양-촉진 활성의 증진; 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 및/또는 비-종양형성성 CD45+CD14+ 골수 세포의 생존의 증진; 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 T 림프구의 활성화의 저하; 종양 살해 잠재성을 갖는 종양-특이적 NK 세포의 침윤의 저하; 종양 부피의 증가; 종양 성장 속도의 증가; 및 항-종양 T 세포 반응을 조정하는 1종 이상의 면역-요법의 효능의 저하, 임의로 여기서 1종 이상의 면역-요법은 PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, TREM1, TREM2, CD39, CD73, CSF-1 수용체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 표적 단백질을 표적화하는 면역-요법, 또는 1종 이상의 암 백신임.

[0102] 상기 다른 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 활성 중 1종 이상을 유도한다: 종양 침윤 CD3+ T 세포의 수의 증가; 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포에서의 SIRPA의 세포 수준의 저하, 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 종양 침윤 세포임, 또는 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 혈액에 존재함; 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포의 수의 감소, 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 종양 침윤 세포임, 또는 임의로 여기서 비-종양형성성 CD14+ 골수 세포는 혈액에 존재함; 1종 이상의 세포에서의 PD-L1 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; 1종 이상의 세포에서의 PD-L2 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; 1종 이상의 세포에서의 B7-H2 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; 1종 이상

의 세포에서의 B7-H3 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; 1종 이상의 세포에서의 CD200R 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; 1종 이상의 세포에서의 CD163 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; 1종 이상의 세포에서의 CD206 수준의 감소, 임의로 여기서 1종 이상의 세포는 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)임; 고형 종양의 종양 성장 속도의 저하; 종양 부피의 감소; 1종 이상의 PD-1 억제제의 효능의 증가; 1종 이상의 체크포인트 억제제 요법 및/또는 면역-조정 요법의 효능의 증가, 임의로 여기서 1종 이상의 체크포인트 억제제 요법 및/또는 면역-조정 요법은 CTLA4, 아데노신 경로, PD-L1, PD-L2, OX40, TIM3, LAG3, 또는 이들의 임의의 조합 중 1종 이상을 표적화함; 1종 이상의 화학요법제의 효능의 증가, 임의로 여기서 1종 이상의 화학요법제는 겜시타빈, 카페시타빈, 안트라시클린, 독소루비신 (아드리아마이신®), 에피루비신 (엘렌스®), 탁산, 파클리탁셀 (탁솔®), 도세탁셀 (탁소테레®), 5-플루오로우라실 (5-FU), 시클로포스파미드 (시톡산®), 카르보플라틴 (파라플라틴®), 및 이들의 임의의 조합임; 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)의 존재 하에서의 T 세포의 증식의 증가; 비-종양형성성 골수-유래된 억제자 세포 (MDSC)의 분화, 생존, 및/또는 1종 이상의 기능의 억제; 및 화학적 또는 방사성 독소에 접합되는 경우에 고형 종양 및 연관된 혈관에서의 CD33-발현 면역억제자 비-종양형성성 골수 세포 및/또는 비-종양형성성 CD14-발현 세포의 살해.

[0103] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 조절성 T 세포, 종양-포매된 면역억제자 수지상 세포, 종양-포매된 면역억제자 대식세포, 골수-유래된 억제자 세포, 종양-연관된 대식세포, 급성 골수성 백혈병 (AML) 세포, 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 세포, 또는 만성 골수성 백혈병 (CML)의 활성, 기능성, 또는 생존을 저하시킨다.

[0104] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 개체에서의 1종 이상의 면역 세포, 예를 들어, 수지상 세포, 대식세포, 호중구, NK 세포, 소교세포, T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 면역 세포의 생존, 성숙, 기능성, 이동, 또는 증식을 유도하거나 또는 촉진시킨다.

[0105] 본원에 사용된 바와 같은 SIRPA의 수준은 SIRPA를 코딩하는 유전자의 발현 수준; SIRPA를 코딩하는 1개 이상의 전사체의 발현 수준; SIRPA 단백질의 발현 수준; 및/또는 세포 내에 및/또는 세포 표면 상에 존재하는 SIRPA 단백질의 양을 지칭할 수 있다. 유전자 발현, 전사, 번역, 및/또는 단백질 풍부도 또는 국재화의 수준을 측정하는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법은 SIRPA의 수준을 결정하는데 사용될 수 있다.

[0106] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 단리된 항-SIRPA 항체는 뮤린 항체이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 단리된 항-SIRPA 항체는 인간 항체, 인간화 항체, 이중특이적 항체, 모노클로날 항체, 다가 항체, 또는 키메라 항체이다. 이러한 항체의 예시적인 설명은 본 개시내용 전반에 걸쳐 발견된다.

[0107] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 인간 대립유전자 변이체 (**도 1a**, 수탁 번호 NP542970 및 CAA71403)를 포함한 인간 SIRPA에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 인간 SIRPA를 포함한 영장류 SIRPA에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 인간 SIRPA 및 영장류 SIRPA 둘 다에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 인간 SIRPA에 특이적으로 결합하고, 뮤린 SIRPA와 교차-반응한다.

[0108] *CD47 결합을 차단하지 않는 SIRPA를 하향-조절하는 항체의 HVR 서열*

[0109] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 SIRPA를 하향-조절하며, SIRPA에의 CD47 결합을 차단하지 않는다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 항체 3F9의 HVR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 11에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 11에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 1, 2, 또는 3개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 11에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 서열식별번호: 11에 제시된 서열에 비해 치환된 1 또는 2개의 아미노산을 갖는다. 일부 실시양태에서, 1 또는 2개의 아미노산은 서열식별번호: 11에 비해 결실된다. 일부 실시양태에서, HVR3은 서열식별번호: 11의 아미노산 서열과 적어도 65% 동일성 또는 적어도 75% 동일성을 갖는다.

[0110] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-SIRPA 항체의 중쇄 가변 영역은 선행하는 단락에 제시된 바와 같은 HVR3 및

표 3에 제시된 바와 같은 항체 3F9의 HVR1 및/또는 HVR2를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 9의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 9의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 서열식별번호: 9의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, HVR2는 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 10의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2는 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 10의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2는 서열식별번호: 10의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 동일성을 갖는다.

[0111] 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 11의 HVR3, 서열식별번호: 9의 HVR1, 및 서열식별번호: 10의 HVR2를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0112] 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 표 2에 제시된 바와 같은 항체 3F9의 HVR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 8에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 1, 2, 또는 3개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 8에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 서열식별번호: 8에 제시된 서열에 비해 치환된 1 또는 2개의 아미노산을 갖는다. 일부 실시양태에서, 1 또는 2개의 아미노산은 서열식별번호: 8에 비해 결실된다. 일부 실시양태에서, HVR3은 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 65% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, HVR3은 서열식별번호: 8의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다.

[0113] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-SIRPA 항체의 경쇄 가변 영역은 선행하는 단락에 제시된 바와 같은 HVR3 및 표 2에 제시된 바와 같은 항체 3F9의 HVR1 및/또는 HVR2를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개; 또는 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 6의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 6의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 6의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 서열식별번호: 6의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, HVR2는 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 7의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2는 서열식별번호: 7의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 85% 동일성을 갖는다.

[0114] 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 8의 HVR3, 서열식별번호: 6의 HVR1, 및 서열식별번호: 7의 HVR2를 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 표 3에 제시된 바와 같은 항체 3F9의 HVR3, HVR2, 및 HVR1을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 표 2에 제시된 바와 같은 항체 3F9의 HVR3, HVR2, 및 HVR1을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 적어도 1개의 HVR이 3F9의 상응하는 HVR에 비해 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산만큼 3F9의 HVR과는 상이한 3F9의 6개의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 3F9의 상응하는 HVR에 비해 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산만큼 3F9의 상응하는 HVR과는 상이한 2개의 HVR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 3F9의 상응하는 HVR에 비해 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산만큼 3F9의 상응하는 HVR과는 상이한 3개의 HVR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 3F9의 상응하는 HVR에 비해 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산만큼 3F9의 상응하는 HVR과는 상이한 4개의 HVR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 3F9의 상응하는 HVR에 비해 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산만큼 3F9의 상응하는 HVR과는 상이한 5개의 HVR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 3F9의 상응하는 HVR에 비해 각각의 HVR에서 1, 2, 또는 3개의 아미노산 변화; 또는 1 또는 2개의 아미노산 변화를 포함한다.

[0116] 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 항체 9C2의 HVR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 17에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 1, 2, 또는 3개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 7에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 서열식별번호: 17에 제시된 서열에 비해 치환된 1 또는 2개의 아미노산을 갖는다. 일부 실시양태에

서, 1 또는 2개의 아미노산은 서열식별번호: 17에 비해 결실된다. 일부 실시양태에서, HVR3은 서열식별번호: 17의 아미노산 서열과 적어도 65% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, HVR3은 서열식별번호: 17의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다.

[0117] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-SIRPA 항체의 중쇄 가변 영역은 선행하는 단락에 제시된 바와 같은 HVR3 및 표 3에 제시된 바와 같은 항체 9C2의 HVR1 및/또는 HVR2를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 15의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 15의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 서열식별번호: 15의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, HVR2는 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 16의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2는 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 16의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR은 서열식별번호: 16의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90% 동일성을 갖는다.

[0118] 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 17의 HVR3, 서열식별번호: 15의 HVR1, 및 서열식별번호: 16의 HVR2를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.

[0119] 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 표 2에 제시된 바와 같은 항체 9C2의 HVR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 14에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 1, 2, 또는 3개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 4에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR3은 서열식별번호: 14에 제시된 서열에 비해 치환된 1 또는 2개의 아미노산을 갖는다. 일부 실시양태에서, 1 또는 2개의 아미노산은 서열식별번호: 14에 비해 결실된다. 일부 실시양태에서, HVR3은 서열식별번호: 14의 아미노산 서열과 적어도 65% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, HVR3은 서열식별번호: 14의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다.

[0120] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-SIRPA 항체의 경쇄 가변 영역은 선행하는 단락에 제시된 바와 같은 HVR3 및 표 2에 제시된 바와 같은 항체 9C2의 HVR1 및/또는 HVR2를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 12의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 12의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR1은 서열식별번호: 12의 아미노산 서열과 적어도 70% 동일성, 적어도 80% 동일성, 또는 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, HVR2는 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산이 치환된, 예를 들어, 보존적으로 치환된 서열식별번호: 13의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR2는 서열식별번호: 13의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 85% 동일성을 갖는다.

[0121] 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 서열식별번호: 14의 HVR3, 서열식별번호: 12의 HVR1, 및 서열식별번호: 13의 HVR2를 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0122] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 표 3에 제시된 바와 같은 항체 9C2의 HVR3, HVR2, 및 HVR1을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 표 2에 제시된 바와 같은 항체 9C2의 HVR3, HVR2, 및 HVR1을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 9C2의 상응하는 HVR에 비해 1, 2 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산만큼 9C2의 HVR과는 상이한 적어도 1개의 HVR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 9C2의 상응하는 HVR에 비해 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산만큼 9C2의 상응하는 HVR과는 상이한 2개의 HVR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 9C2의 상응하는 HVR에 비해 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산만큼 9C2의 상응하는 HVR과는 상이한 3개의 HVR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 3F9의 상응하는 HVR에 비해 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산만큼 9C2의 상응하는 HVR과는 상이한 4개의 HVR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 9C2의 상응하는 HVR에 비해 1, 2, 또는 3개의 아미노산; 또는 1 또는 2개의 아미노산만큼 9C2의 상응하는 HVR과는 상이한 5개의 HVR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 9C2의 상응하는 HVR에 비해 각각의 HVR에서 1, 2, 또는 3개의 아미노산 변화; 또는 1 또는 2개의 아미노산 변화를 포함한다.

[0123] 일부 실시양태에서, 3F9로부터의 경쇄 CDR2 (서열식별번호: 7)에 존재하는 N 잔기는 Q, S, A, 또는 D로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표 2에서 3F9로부터의 경쇄 CDR3 (서열식별번호: 8)에서의 N 잔기는 Q, S, A, 또

는 D로 치환될 수 있다. 일부 예에서, 경쇄 CDR2 및 CDR3 둘 다에서의 N 잔기는 Q, S, A, 또는 D로 치환된다. 일부 실시양태에서, 3F9로부터의 경쇄 CDR3 (서열식별번호: 8)에서의 C는 A, S, 또는 L로 치환될 수 있다.

[0124] 일부 실시양태에서, 9C2로부터의 중쇄 CDR1 (서열식별번호: 15)에 존재하는 N 잔기는 Q, S, 또는 A로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 9C2로부터의 중쇄 CDR2 (서열식별번호: 16)에 존재하는 1개 또는 둘 다의 N 잔기는 Q, S, 또는 A로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 17의 중쇄 CDR3 잔기 Asp-Gly (DG)의 D는 A, S, 또는 E로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 9C2로부터의 경쇄 CDR2 (서열식별번호: 13)에서의 N 잔기는 Q, S, D, 또는 A로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 9C2로부터의 경쇄 CDR3 (서열식별번호: 14)에서의 N 잔기는 Q, S, D, 또는 A로 치환될 수 있다. 서열식별번호: 14의 경쇄 CDR3은 또한 9C2 경쇄 CDR3에서의 Trp 잔기에 대해 치환된 H, Y, 또는 F 잔기를 함유할 수 있다.

[0125] *항체 프레임워크*

[0126] 본원에 기재된 항체 중 임의의 것은 프레임워크, 바람직하게는 인간 이뮤노글로불린 프레임워크를 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 항체는 상기 실시양태 중 임의의 것에서와 같은 HVR을 포함하고, 수용자 인간 프레임워크, 예를 들어, 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크를 추가로 포함한다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크는 인간 항체의 일부일 수 있거나, 비-인간 항체는 1개 이상의 내인성 프레임워크를 인간 프레임워크 영역(들)으로 대체함으로써 인간화될 수 있다. 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은 "최량-적합" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993)] 참조); 경쇄 또는 중쇄 가변 영역의 특정한 하위군의 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)]; 및 [Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993)] 참조); 인간 성숙 (체세포적으로 돌연변이된) 프레임워크 영역 또는 인간 생식계열 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조); 및 스크리닝 FR 라이브러리로부터 유래된 프레임워크 영역 (예를 들어, 문헌 [Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997)] 및 [Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996)] 참조)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0127] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 3F9의 결합 특이성을 갖고, 상기 기재된 바와 같은 중쇄 HVR1, HVR2, 및 HVR3 서열을 포함하며, 또한 도 14a에 제시된 바와 같은 적어도 1개의 중쇄 프레임워크, 예를 들어, 도 14a의 hSB-3F9-H1 또는 hSB-3F9-H2 서열을 포함한다. 이 맥락에서 "프레임워크"는 FR1, FR2, FR3, 및 FR4 서열을 지칭하며, CDR 서열을 배제한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 도 14a에 제시된 프레임워크와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 프레임워크를 가지며, 여기서 퍼센트 동일성은 CDR을 배제하고 FR1, FR2, FR3, 및 FR4 서열에 기반하여 결정된다.

[0128] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 3F9의 결합 특이성을 갖고, 상기 기재된 바와 같은 경쇄 HVR1, HVR2, 및 HVR3 서열을 포함하며, 또한 도 14b에 제시된 바와 같은 적어도 1개의 경쇄 프레임워크, 예를 들어, 도 14b의 hSB-3F9-L1, hSB-3F9-L2, 또는 hsB-3F9-L3 서열을 포함한다. 이 맥락에서 "프레임워크"는 FR1, FR2, FR3, 및 FR4 서열을 지칭하며, CDR 서열을 배제한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 도 14b에 제시된 프레임워크와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 프레임워크를 가지며, 여기서 퍼센트 동일성은 CDR을 배제하고 FR1, FR2, FR3, 및 FR4 서열에 기반하여 결정된다.

[0129] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 2개의 선행하는 단락에 제시된 바와 같은 V_H 영역 및 V_L 영역을 포함한다.

[0130] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 9C2의 결합 특이성을 갖고, 상기 기재된 바와 같은 중쇄 HVR1, HVR2, 및 HVR3 서열을 포함하며, 또한 도 14c에 제시된 바와 같은 적어도 1개의 중쇄 프레임워크, 예를 들어, 도 14c의 hSB-9C2-H1, hSB-9C2-H2, hSB-9C2-H3, 또는 hSB-9C2-H4 서열을 포함한다. 이 맥락에서 "프레임워크"는 FR1, FR2, FR3, 및 FR4 서열을 지칭하며, CDR 서열을 배제한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 도 14c에 제시된 프레임워크와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 프레임워크를 가지며, 여기서 퍼센트 동일성은 CDR을 배제하고 FR1, FR2, FR3, 및 FR4에 기반하여 결정된다.

[0131] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 3F9의 결합 특이성을 갖고, 상기 기재된 바와 같은 경쇄 HVR1, HVR2,

및 HVR3 서열을 포함하며, 또한 도 14d에 제시된 바와 같은 적어도 1개의 경쇄 프레임워크, 예를 들어, 도 14d의 hSB-9C2-L1, hSB-9C2-L2, hSB-9C2-L3, 또는 hSB-9C2-L 서열을 포함한다. 이 맥락에서 "프레임워크"는 FR1, FR2, FR3, 및 FR4 서열을 지칭하며, CDR 서열을 배제한다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 도 14d에 제시된 프레임워크와 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 프레임워크를 가지며, 여기서 퍼센트 동일성은 CDR을 배제하고 FR1, FR2, FR3, 및 FR4에 기반하여 결정된다.

[0132] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 2개의 선행하는 단락에 제시된 바와 같은 V_H 영역 및 V_L 영역을 포함한다.

[0133] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-SIRPA 항체는 도 10a-10d에 나타내어진 CDR 및 프레임워크 영역 서열에 비해 1개 이상의 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치환은 보존적 치환이다. 예시적인 치환은 하기에 제공된다:

[0134] **아미노산 치환**

원래 잔기	예시적인 치환	빈번한 치환
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; 노르류신	leu
Leu (L)	노르류신; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 노르류신	leu

[0135]

[0136] 일부 실시양태에서, 치환은 비-보존적 치환일 수 있다. 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 기반하여 군으로 나누어진다:

[0137] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0138] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0139] (3) 산성: asp, glu;

[0140] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0141] (5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0142] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0143] 일부 실시양태에서, 비-보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 또 다른 부류에 대해 교환하는 것을 수반한다.

[0144] 항체의 적절한 입체형태를 유지하는데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기는 또한 분자의 산화적 안정성을 개선시키고, 비정상적인 가교를 방지하기 위해 일반적으로 세린으로 치환될 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)은 그의 안정성을 개선시키기 위해 항체에 첨가될 수 있다 (특히 항체가 항체 단편, 예컨대 Fv 단편인 경우). 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 도 14a-14d에 제시된 서열의 1개 이상의 C 잔기에 치환을 포함한다.

[0145] 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 또한 잠재적 탈아미드화 부위인 N 잔기에서의 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-SIRPA 항체는 도 14a-14d에 제시된 서열의 1개 이상의 N 잔기에 치환을 포함한다.

[0146] 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 W 잔기에 치환을 포함하는데, 이는 W 잔기가 산화에 감수성일 수 있기 때문이다. 일부 실시양태에서, 치환은 도 14a-14d에 제시된 서열의 1개 이상의 W 잔기에 있다.

[0147] 일부 실시양태에서, 이소아스파르테이트 형성에 감수성일 수 있는 Asp-Gly (DG) 서열을 함유하는 항-SIRPA 항체는 Gly에 대해 치환된 A 또는 S 또는 Asp에 대해 치환된 E를 가질 수 있다.

[0148] *항-SIRPA1 항체 결합 친화도*

[0149] 본 개시내용의 항-SIRPA는 SIRPA에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화도를 가질 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체의 해리 상수 (K_D)는 약 0.05 내지 약 100 nM이다. 예를 들어, 항체의 K_D는 약 100 nM, 약 50 nM, 약 10 nM, 약 1 nM, 약 900 pM, 약 800 pM, 약 790 pM, 약 780 pM, 약 770 pM, 약 760 pM, 약 750 pM, 약 740 pM, 약 730 pM, 약 720 pM, 약 710 pM, 약 700 pM, 약 650 pM, 약 600 pM, 약 590 pM, 약 580 pM, 약 570 pM, 약 560 pM, 약 550 pM, 약 540 pM, 약 530 pM, 약 520 pM, 약 510 pM, 약 500 pM, 약 450 pM, 약 400 pM, 약 350 pM 약 300 pM, 약 290 pM, 약 280 pM, 약 270 pM, 약 260 pM, 약 250 pM, 약 240 pM, 약 230 pM, 약 220 pM, 약 210 pM, 약 200 pM, 약 150 pM, 약 100 pM, 또는 약 50 pM 중 임의의 것 내지 약 2 pM, 약 5 pM, 약 10 pM, 약 15 pM, 약 20 pM, 또는 약 40 pM 중 임의의 것이다.

[0150] 일부 실시양태에서, 인간 SIRPA에의 결합에 대한 항-SIRPA의 K_D는 약 200 nM 이하, 약 100 nM 이하, 약 50 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하일 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 SIRPA에 대한 항-SIRPA 항체의 Kd는 약 100 pM 이하 또는 약 50 pM 이하, 약 10 pM 미만, 또는 약 1 pM 미만이다. 일부 실시양태에서, 결합 친화도는 약 1 pM 내지 약 200 nM의 범위이다. 일부 실시양태에서, K_D는 약 1 pM 내지 약 100 nM의 범위이다.

[0151] 일부 실시양태에서, 인간 SIRPA에 대한 항-SIRPA 항체의 K_D는 15 nM 미만, 14.5 nM 미만, 14 nM 미만, 13.5 nM 미만, 13 nM 미만, 12.9 nM 미만, 12.8 nM 미만, 12.7 nM 미만, 12.6 nM 미만, 12.5 nM 미만, 12.4 nM 미만, 12.3 nM 미만, 12.2 nM 미만, 12.1 nM 미만, 12 nM 미만, 11.5 nM 미만, 11 nM 미만, 10.9 nM 미만, 10.8 nM 미만, 10.7 nM 미만, 10.6 nM 미만, 10.5 nM 미만, 10.4 nM 미만, 10.3 nM 미만, 10.2 nM 미만, 10.1 nM 미만, 10 nM 미만, 9.5 nM 미만, 9 nM 미만, 8.5 nM 미만, 8 nM 미만, 7.5 nM 미만, 7 nM 미만, 6.9 nM 미만, 6.8 nM 미만, 6.7 nM 미만, 6.6 nM 미만, 6.5 nM 미만, 6.4 nM 미만, 6.3 nM 미만, 6.2 nM 미만, 6.1 nM 미만, 6 nM 미만, 5.5 nM 미만, 5 nM 미만, 4.5 nM 미만, 4 nM 미만, 3.5 nM 미만, 3.4 nM 미만, 3.3 nM 미만, 3.2 nM 미만, 3.1 nM 미만, 3 nM 미만, 2.9 nM 미만, 2.8 nM 미만, 2.7 nM 미만, 2.6 nM 미만, 2.5 nM 미만, 2.4 nM 미만, 2.3 nM 미만, 2.2 nM 미만, 2.1 nM 미만, 2 nM 미만, 1.9 nM 미만, 1.8 nM 미만, 1.7 nM 미만, 1.6 nM 미만, 1.5 nM 미만, 1.4 nM 미만, 1.3 nM 미만, 1.2 nM 미만, 1.1 nM 미만, 1 nM 미만, 0.95 nM 미만, 또는 0.9 nM 미만이다. 일부 실시양태에서, 해리 상수는 약 50 nM 내지 약 100 pM의 범위이다.

[0152] 해리 상수는 임의의 생화학적 또는 생물물리학적 기법, 예컨대 ELISA, 표면 플라스몬 공명 (SPR), 생물-층 간섭측정 (예를 들어, 포르테바이오(ForteBio)에 의한 옥테트(Octet) 시스템 참조), 등온선 적정 열량측정 (ITC), 시차 주사 열량측정 (DSC), 원편광 이색성 (CD), 정지-유동 분석, 및 비색 또는 형광 단백질 용융 분석을 포함한 임의의 분석적 기법을 통해 결정될 수 있다.

[0153] *항체 단편*

[0154] 본 개시내용의 특정 측면은 단편이 SIRPA 결합 활성을 보유하는 본원에 기재된 바와 같은 SIRPA 항체의 단편에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv 또는 scFv 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 다가 형식으로 제공된다.

[0155] *다가 항체.*

[0156] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-SIRPA 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의한 2가 항체보다 더 빠르게 내재화되는 다가 형식일 수 있다. 본 개시내용의 항-SIRPA 항체 또는 그의 항체 단편은 3개 이상의 항원 결합 부위 (예를 들어, 4가 항체)를 갖는 다가 항체 (이는 IgM 부류 이외의 것임)일 수 있으며, 이는 항체의 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 용이하게 생산될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 전형적인 실시양태에서, 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역을 포함한다. 이 시나리오에서, 항체는 Fc 영역 및 Fc 영역에 대한 아미노-말단에 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 다가 항체는 3 내지 8개, 예를 들어, 4개의 항원 결합 부위를 함유한다. 다가 항체는 적어도 1개의 폴리펩티드 쇄 (및 바람직하게는 2개의 폴리펩티드 쇄)를 함유하며, 여기서 폴리펩티드 쇄 또는 쇄들은 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다.

[0157] *이중특이적 및 다중-특이적 항체*

[0158] 본 개시내용의 특정 측면은 본원에 기재된 바와 같은 항-SIRPA 항체를 포함하는 이중특이적 항체, 또는 다중-특이적 항체 및 제2 항원 또는 제2 SIRPA 에피토프에 결합하는 항체에 관한 것이다. 이중특이적 및 다중-특이적 항체는 임의의 방법을 사용하여 생성될 수 있다.

[0159] 일부 실시양태에서, 항체는 본 개시내용에 기재된 바와 같은 항-SIRPA 항체의 가변 영역을 포함하는 이중특이적 항체 및 제2 항원에 결합하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, 또는 CD73으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질이다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 하기이다: 혈액-뇌-장벽을 가로지르는 수송을 용이하게 하는 항원; 트랜스페린 수용체 (TR), 인슐린 수용체 (HIR), 인슐린-유사 성장 인자 수용체 (IGFR), 저-밀도 지단백질 수용체 관련된 단백질 1 및 2 (LPR-1 및 2), 디프테리아 독소 수용체, CRM197, 라마 단일 도메인 항체, TMEM 30(A), 단백질 전달 도메인, TAT, Syn-B, 페네트라틴, 폴리-아르기닌 펩티드, 안지오펩 펩티드, 및 ANG1005로 이루어진 군으로부터 선택되는 혈액-뇌-장벽을 가로지르는 수송을 용이하게 하는 항원; 질환-유발 펩티드 또는 단백질, 또는 질환-유발 핵산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환-유발제, 여기서 질환-유발 핵산은 안티센스 GGCCCC (G2C4) 반복부-확장 RNA이고, 질환-유발 단백질은 아밀로이드 베타, 올리고머성 아밀로이드 베타, 아밀로이드 베타 플라크, 아밀로이드 전구체 단백질 또는 그의 단편, Tau, IAPP, 알파-시누클레인, TDP-43, FUS 단백질, C9orf72 (염색체 9 오픈 리딩 프레임 72), c9RAN 단백질, 프리온 단백질, PrPSc, 헌팅틴, 칼시토닌, 슈퍼옥시드 디스뮤타제, 아탁신, 아탁신 1, 아탁신 2, 아탁신 3, 아탁신 7, 아탁신 8, 아탁신 10, 루이 소체, 심방 나트륨이뇨 인자, 섬 아밀로이드 폴리펩티드, 인슐린, 아포지단백질 AI, 혈청 아밀로이드 A, 메딘, 프로락틴, 트랜스티레틴, 리소자임, 베타 2 마이크로글로불린, 겔솔린, 케라토에피텔린, 시스타틴, 이뮤노글로불린 경쇄 AL, S-IBM 단백질, 반복부-연관된 비-ATG (RAN) 번역 산물, 디펩티드 반복 (DPR) 펩티드, 글리신-알라닌 (GA) 반복 펩티드, 글리신-프롤린 (GP) 반복 펩티드, 글리신-아르기닌 (GR) 반복 펩티드, 프롤린-알라닌 (PA) 반복 펩티드, 유비퀴틴, 및 프롤린-아르기닌 (PR) 반복 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택됨; 또는 면역 세포 상에서 발현되는 리간드 및/또는 단백질, 여기서 리간드 및/또는 단백질은 PD1/PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, PD-L1, CTLA4, PD-L2, PD-1, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, CD73, 및 포스파티딜세린; 및 1종 이상의 종양 세포 상에서 발현되는 단백질, 지질, 폴리사카라이드, 또는 당지질로 이루어진 군으로부터 선택됨.

[0160] *Fc 영역*

[0161] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 Fc 영역을 포함한다. 예를 들어, 항체는 IgG 부류, IgM 부류, 또는 IgA 부류의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소형을 갖는다. 전형적으로, Fc 영역은 천연 인간 Fc 영역 또는 그의 변이체이다.

[0162] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 Fc 감마 수용체에 결합하는 능력을 보유한다. 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 SIRPA의 클러스터링 및 일시적 자극을 초래하는 특색을 가질 수 있다. 이러한 항체는

이어서 SIRPA 분해, SIRPA 탈감작, SIRPA 절단, SIRPA 내재화, SIRPA 쉐딩, SIRPA의 리소좀 분해 또는 다르게는 SIRPA의 하향-조절을 유도함으로써 SIRPA 발현 및/또는 SIRPA의 1종 이상의 활성의 보다 장기 억제제로서 작용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 세포의 표면 상의 Fc 감마 수용체의 수준을 저하시킨다.

[0163] 일부 실시양태에서, Fc 영역은 대립유전자 변이체 및 대안적으로 이들 수용체의 스플라이싱된 형태를 포함한 수용체, 예컨대 FcγRI, FcγRII, 및 FcγRIII 하위부류에 결합하는 Fc 영역이다. FcγRII 수용체는 FcγRIIA ("활성화 수용체") 및 FcγRIIB ("억제 수용체")를 포함하며, 이들은 그의 세포질 도메인에 있어서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 FcγRIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 ("ITAM")를 함유한다. 억제 수용체 FcγRIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기반 억제 모티프 ("ITIM")를 함유한다 (예를 들어, 문헌 [M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)]에서 검토되어 있다. FcR은 또한 항체의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다.

[0164] Fc 영역은, 예를 들어, Fc 수용체에 결합하는데 있어서 Fc 영역의 활성에 영향을 미치는 1개 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0165] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 억제성 Fc 수용체에 결합한다. 특정 실시양태에서, 억제성 Fc 수용체는 억제성 Fc-감마 수용체 IIB (FcγIIB)이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 세포의 표면 상의 억제성 Fc-감마 수용체 IIB의 발현의 수준을 저하시킨다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 1개 이상의 변형을 함유한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, Fc 영역은 1개 이상의 아미노산 치환 (예를 들어, 동일한 이소형의 야생형 Fc 영역에 비해)을 함유한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 치환은 V234A (Alegre et al., (1994) Transplantation 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) Cell Immunol, 200:16-26), G237A (Cole et al. (1999) Transplantation, 68:563-571), H268Q, V309L, A330S, P331S (US 2007/0148167; Armour et al. (1999) Eur J Immunol 29: 2613-2624; Armour et al. (2000) The Haematology Journal 1(Suppl.1):27; Armour et al. (2000) The Haematology Journal 1(Suppl.1):27), C232S, 및/또는 C233S (White et al.(2015) Cancer Cell 27, 138-148), S267E, L328F (Chu et al., (2008) Mol Immunol, 45:3926-3933), M252Y, S254T, 및/또는 T256E로부터 선택되며, 여기서 아미노산 위치는 EU 또는 카바트 넘버링 규정에 따른다.

[0166] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 일부 실시양태에서, C127S 또는 C2214S 아미노산 치환을 함유하는 중쇄 불변 도메인을 갖는 IgG2 이소형을 가지며, 여기서 아미노산 위치는 EU 또는 카바트 넘버링 규정에 따른다 (White et al.,(2015) Cancer Cell 27, 138-148; Lightle et al., (2010) PROTEIN SCIENCE 19:753-762; 및 WO2008079246).

[0167] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 IgG1 이소형을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 감마 수용체-결합 항체는 억제성 Fc 수용체에 결합한다. 특정 실시양태에서, 억제성 Fc 수용체는 억제성 Fc-감마 수용체 IIB (FcγIIB)이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 세포의 표면 상에서 발현되는 억제성 Fc-감마 수용체 IIB의 수준을 저하시킨다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 1개 이상의 변형을 함유한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, Fc 영역은 1개 이상의 아미노산 치환 (예를 들어, 동일한 이소형의 야생형 Fc 영역에 비해)을 함유한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 치환은 N297A (Bolt S et al. (1993) Eur J Immunol 23:403-411), D265A (Shields et al. (2001) R. J. Biol. Chem. 276, 6591-6604), D270A, L234A, L235A (Hutchins et al. (1995) Proc Natl Acad Sci USA, 92:11980-11984; Alegre et al., (1994) Transplantation 57:1537-1543. 31; Xu et al., (2000) Cell Immunol, 200:16-26), G237A (Alegre et al. (1994) Transplantation 57:1537-1543. 31; Xu et al. (2000) Cell Immunol, 200:16-26), P238D, L328E, E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, L234V, L234F, L235E (McEarchern et al., (2007) Blood, 109:1185-1192), P331S (Sazinsky et al., (2008) Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105:20167-20172), S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, 및/또는 T394D로부터 선택되며, 여기서 아미노산 위치는 EU 또는 카바트 넘버링 규정에 따른다.

[0168] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 IgG1 이소형을 갖고, IgG2 이소형 중쇄 불변 도메인 1 (CH1) 및 힌지 영역을 포함한다 (White et al., (2015) Cancer Cell 27, 138-148). 특정 실시양태에서, IgG2 이소형 CH1 및 힌지 영역은 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP (서열식별번호: 34)의 아미노산 서열을 함유한다. 일부 실시양태에서, 항체 Fc 영역은 S267E 아미노

산 치환, L328F 아미노산 치환, 또는 둘 다, 및/또는 N297A 또는 N297Q 아미노산 치환을 함유하며, 여기서 아미노산 위치는 EU 또는 카바트 넘버링 규정에 따른다.

[0169] 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 IgG2 이소형을 갖고, Fc 영역에서 P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, V309L, A330S, P331S, C214S, C232S, C233S, S267E, L328F, M252Y, S254T, T256E, H268E, N297A, N297Q, A330L, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따른다.

[0170] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 IgG4 이소형을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 IgG4 불변 영역을 함유하고, 1개 이상의 아미노산 치환 (예를 들어, 동일한 이소형의 야생형 Fc 영역에 비해)을 함유하는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 치환은 L235A, G237A, S228P, L236E (Reddy et al., (2000) J Immunol,164:1925-1933), S267E, E318A, L328F, M252Y, S254T, T256E, E233P, F234V, L234A/F234A, S228P, S241P, L248E, T394D, N297A, N297Q, L235E, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택되며, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따른다.

[0171] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 하이브리드 IgG2/4 이소형을 갖는다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 IgG2의 아미노산 118 내지 260 및 인간 IgG4의 아미노산 261 내지 447을 포함하는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따른다.

[0172] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 인간 또는 마우스 IgG1 이소형을 갖고, Fc 영역에서 N297A, N297Q, D270A, D265A, L234A, L235A, C226S, C229S, P238S, E233P, L234V, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, L234F, L235E, P331S, T394D, A330L, M252Y, S254T, T256E, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따른다.

[0173] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 IgG2 이소형을 갖고, Fc 영역에서 P238S, V234A, G237A, H268A, H268Q, H268E, V309L, N297A, N297Q, A330S, P331S, C232S, C233S, M252Y, S254T, T256E, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따른다.

[0174] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 IgG4 이소형을 갖고, Fc 영역에서 E233P, F234V, L234A/F234A, L235A, G237A, E318A, S228P, L236E, S241P, L248E, T394D, M252Y, S254T, T256E, N297A, N297Q, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 위치에서의 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따른다.

[0175] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 A330L, L234F; L235E, P331S, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에서의 1개 이상의 추가적인 아미노산 치환을 추가로 포함하는 Fc 영역을 포함하며, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따른다.

[0176] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 M252Y, S254T, T256E, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에서의 1개 이상의 추가적인 아미노산 치환을 추가로 포함하는 Fc 영역을 포함하며, 여기서 잔기의 넘버링은 EU 넘버링에 따른다.

[0177] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 EU 넘버링에 따른 S228P 아미노산 치환을 추가로 포함하는 Fc 영역을 포함한다.

[0178] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 IgG4 이소형을 갖고, 잔기 위치 228에서의 S228P 아미노산 치환, 잔기 위치 234에서의 F234A 아미노산 치환, 및 잔기 위치 235에서의 L235A 아미노산 치환 (여기서 잔기 위치의 넘버링은 EU 넘버링에 따름)을 포함한다.

[0179] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 이펙터 기능을 조정하고/거나, 항체의 혈청 반감기를 증가시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 불변 영역 상의 Fc 수용체 결합 부위는 항체-의존적 세포-매개된 세포독성을 감소시키기 위해 특정 Fc 수용체, 예컨대 FcγRI, FcγRII, 및/또는 FcγRIII에 대한 결합 친화도를 제거하거나 또는 감소시키도록 변형되거나 또는 돌연변이될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이펙터 기능은 항체의 Fc 영역의 (예를 들어, IgG의 CH 2 도메인에서) N-글리코실화를 제거함으로써 억제된다. 일부 실시양태에서, 이펙터 기능은 PCT WO 99/58572 및 문헌 [Armour et al., Molecular Immunology 40: 585-593 (2003)]; [Reddy et al., J. Immunology 164:1925-1933 (2000)]에 기재된 바와 같이 인간 IgG의 영역, 예컨대 233 내지 236, 297,

및/또는 327 내지 331을 변형시킴으로써 억제된다. 다른 실시양태에서, 이펙터 기능, 예컨대 ADCC를 활성화시키지 않고 인접한 세포 상의 SIRPA 항체의 클러스터링을 증가시키는 ITIM-함유 FcγRIIb (CD32b)를 향한 결합 선택성을 증가시키도록 이펙터 기능을 변형시키도록 본 개시내용의 항-SIRPA 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0180] 일부 실시양태에서, 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 5,739,277에 기재된 바와 같이 구조 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히 항체 단편) 내로 혼입할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "구조 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기의 증가를 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다.

[0181] *다른 아미노산 서열 변형*

[0182] 본 개시내용의 항-SIRPA 항체, 또는 그의 항체 단편의 아미노산 서열 변형은 또한 고려된다. 예를 들어, 항체 또는 항체 단편의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0183] 일부 실시양태에서, 추가적인 아미노산 서열은 항-SIRPA 항체의 아미노 말단 또는 카르복시 말단에 융합될 수 있다. 그 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체, 세포독성 폴리펩티드에의 융합, 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 효소 또는 폴리펩티드에의 융합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0184] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는, 예를 들어, 1개 이상의 돌연변이 부위를 결실시켜 특정 탄수화물 모이어티에 의한 글리코실화를 방지하고/거나, 1개 이상의 글리코실화 부위를 첨가하여 바람직한 탄수화물 모이어티를 도입함으로써, 항체의 원래 글리코실화 패턴을 변경시키도록 돌연변이될 수 있다.

[0185] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결된 또는 O-연결된 중 어느 하나이다. N-연결된은 아스파라긴 잔기의 측쇄에의 탄수화물 모이어티의 부착을 지칭한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 아스파라긴 측쇄에의 탄수화물 모이어티의 효소적 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드에서의 이들 트리펩티드 서열 중 어느 하나의 존재는 잠재적 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 히드록시아미노산, 가장 통상적으로 세린 또는 트레오닌에의 당 N-아세틸갈락토스아민, 갈락토스, 또는 크실로스 중 1종의 부착을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신도 또한 사용될 수 있다.

[0186] 항체에의 글리코실화 부위의 첨가는 편리하게는 아미노산 서열을 그것이 상기-바람직한 트리펩티드 서열 중 1개 이상을 함유하도록 변경시킴으로써 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위를 위한). 변경은 또한 원래 항체의 서열에의 1개 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가, 또는 그에 의한 치환에 의해 이루어질 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위를 위한).

[0187] *다른 항체 변형*

[0188] 본 개시내용의 항-SIRPA 항체, 또는 그의 항체 단편은 추가적인 모이어티, 예를 들어, 항체의 유도체화를 위한 모이어티, 항체에 접합되는 약물 모이어티 등을 함유하도록 더 변형될 수 있다. 항체의 유도체화에 적합한 모이어티의 예는 수용성 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체 중 어느 하나), 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공-중합체, 폴리옥시에틸화된 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이들의 혼합물이다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 그의 안정성으로 인해 제조에 있어서 이점을 가질 수 있다. 중합체는 임의의 분자량의 것일 수 있으며, 분지되거나 비분지될 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 다양할 수 있으며, 1개 초과의 중합체가 부착되는 경우, 이들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선되어야 할 항체의 특정한 특성 또는 기능, 항체 유도체가 정의된 조건 하에서 요법에 사용될 것인지 여부 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 고려사항에 기반하여 결정될 수 있다. 이러한 기법 및 다른 적합한 제형은 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000)]에 개시되어 있다.

[0189] 일부 실시양태에서, 세포독성제 또는 약물은, 예를 들어, 세포 표면 상에 SIRPA를 발현하는 암, 예컨대 다발성 골수종 또는 다른 암의 치료를 위해 본 발명의 항-SIRPA 항체에 접합될 수 있다. 항체를 접합시키는 기법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Jane de Lartigue, OncLive July 5, 2012; ADC Review on

antibody-drug conjugates]; 및 [Ducry et al., (2010). Bioconjugate Chemistry 21 (1): 5-13] 참조). 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 리신, 리신 A 쇄, 독소루비신, 다우노루비신, 메이탄시노이드, 탁솔, 에티듐 브로마이드, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜키신, 디히드록시 안트라신 디온, 악티노마이신, 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소 (PE) A, PE40, 아브린, 아브린 A 쇄, 모덱신 A 쇄, 알파 사르신, 겔로닌, 미토겔린, 레트스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 쿠리신, 크로틴, 칼리케아미신, 사포나리아 오피시날리스 억제제, 글루코코르티코이드, 아우리스타틴, 아우로마이신, 이트륨, 비스무트, 콤브레스타틴, 두오카르마이신, 돌라스타틴, cc1065, 및 시스플라틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 독소에 접합된다.

[0190] **핵산, 벡터, 및 숙주 세포**

[0191] 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 통상적으로 재조합 방법을 사용하여 생산된다. 따라서, 일부 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 항-SIRPA 항체 중 임의의 것을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산; 이러한 핵산 및 항체-코딩 핵산을 복제하고/거나, 항체를 발현하는데 사용되는 핵산이 도입된 숙주 세포를 포함하는 벡터를 제공한다. 이러한 핵산은 항-SIRPA 항체의 V_L을 함유하는 아미노산 서열 및/또는 V_H를 함유하는 아미노산 서열 (예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 코딩할 수 있다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 (1) V_L 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 V_H 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 벡터, 또는 (2) V_L 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 제1 벡터 및 V_H 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 제2 벡터를 함유한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵생물, 예를 들어, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포; 또는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 림프 세포 (예를 들어, Y0, NS0, Sp20 세포)이다. 본 개시내용의 숙주 세포는 또한, 제한 없이, 단리된 세포, 시험관내 배양된 세포, 및 생체외 배양된 세포를 포함한다.

[0192] 추가의 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 항-SIRPA 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 선행하는 단락에 기재된 바와 같은 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건 하에서 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 이어서 숙주 세포 (또는 숙주 세포 배양 배지)로부터 회수된다.

[0193] 본 개시내용의 항체, 또는 그의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 적합한 벡터는 클로닝 벡터 및 발현 벡터를 포함한다. 선택된 클로닝 벡터는 사용되도록 의도되는 숙주 세포에 따라 다양할 수 있지만, 유용한 클로닝 벡터는 일반적으로 자기-복제하는 능력을 갖고/거나, 특정한 제한 엔도뉴클레아제에 대한 단일 표적을 가질 수 있고/거나, 벡터를 함유하는 클론을 선택하는데 사용될 수 있는 마커에 대한 유전자를 운반할 수 있다. 그 예는 플라스미드 및 박테리아 바이러스, 예를 들어, pUC18, pUC19, 블루스크립트(Bluescript) (예를 들어, pBS SK+) 및 그의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 파지 DNA, 및 셔틀 벡터, 예컨대 pSA3 및 pAT28을 포함한다. 이들 및 많은 다른 클로닝 벡터는 상업적 판매자, 예컨대 바이오라드(BioRad), 스트라타진(Stratagene), 및 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 입수가능하다.

[0194] 발현 벡터는 일반적으로 본 개시내용의 핵산을 함유하는 복제가능한 폴리뉴클레오티드 구축물이다. 발현 벡터는 에피솜으로서 또는 염색체 DNA의 일체 부분으로서 숙주 세포에서 복제가능할 수 있다. 적합한 발현 벡터는 플라스미드, 아데노바이러스, 아데노-연관된 바이러스, 레트로바이러스를 포함한 바이러스 벡터, 및 임의의 다른 벡터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0195] 본원에 기재된 바와 같은 항-SIRPA 항체를 발현하기에 적합한 숙주 세포는 원핵생물 또는 진핵생물 세포 둘 다를 포함한다. 예를 들어, 항-SIRPA 항체는 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 경우, 박테리아에서 생산될 수 있다. 발현 후, 항체는 가용성 분획 중 박테리아 세포 페이스트로부터 단리될 수 있으며, 추가로 정제될 수 있다. 대안적으로, 숙주 세포는 진핵생물 미생물, 예컨대 그의 글리코실화 경로가 "인간화"되어 부분적으로 또는 전체적으로 인간 글리코실화 패턴을 갖는 항체의 생산을 초래하는 진균 및 효모 균주를 포함한 필라멘트성 진균 또는 효모, 척추동물, 무척추동물, 및 식물 세포를 포함한 진핵생물 숙주 세포일 수 있다. 무척추동물 세포의 예는 곤충 세포를 포함한다. 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 다수의 바큘로바이러스 균주가 확인되었다. 식물 세포 배양물은 또한 숙주 세포로서 이용될 수 있다.

[0196] 일부 실시양태에서, 척추동물 숙주 세포는 본 개시내용의 항-SIRPA 항체를 생산하는데 사용된다. 예를 들어, 포유동물 세포주, 예컨대 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 주 (COS-7); 인간 배아 신장 주 (예를 들어, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]에 기재된 바와 같은 293 또는 293 세포); 아기 햄스터 신장 세포 (BHK); 마우스 세르톨리 세포 (예를 들어, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]에 기재된 바와 같은 TM4 세포); 원숭이 신장 세포 (CV1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76); 인간 자궁경부 암

종 세포 (HELA); 개 신장 세포 (MDCK); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A); 인간 폐 세포 (W138); 인간 간 세포 (Hep G2); 마우스 유방 종양 (MMT 060562); 예를 들어, 문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]에 기재된 바와 같은 TRI 세포; MRC 5 세포; 및 FS4 세포는 항-SIRPA 항체를 발현하는데 사용될 수 있다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는 DHFR-CHO 세포 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))를 포함한 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포; 및 골수종 세포주, 예컨대 Y0, NS0 및 Sp2/0을 포함한다. 항체 생산에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주의 검토를 위해서는, 예를 들어, 문헌 [Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)]을 참조한다.

[0197] **제약 조성물 및 항-SIRPA 항체를 사용한 치료**

[0198] *제약 조성물*

[0199] 항-SIRPA 항체는 항체를 적절한 제약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 배합함으로써 치료적 투여를 위해 다양한 제형 내로 혼입될 수 있으며, 고체, 반-고체, 액체 또는 기체성 형태 중 제제로 제형화될 수 있다. 이러한 제형의 예는, 제한 없이, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 좌제, 주사, 흡입제, 겔, 미소구, 및 에어로졸을 포함한다. 제약 조성물은 바람직한 제형에 따라, 동물 또는 인간 투여를 위한 제약 조성물을 제형화하는데 통상적으로 사용되는 비히클인 희석제의 제약학적으로-허용되는 비-독성 담체를 포함할 수 있다. 희석제는 조합물의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않도록 선택된다. 이러한 희석제의 예는, 제한 없이, 증류수, 완충수, 생리학적 염수, PBS, 링거 용액, 덱스트로스 용액, 및 행크 용액을 포함한다. 본 개시내용의 제약 조성물 또는 제형은 다른 담체, 아주번트, 또는 비-독성, 비치료적, 비면역원성 안정화제, 부형제 등을 추가로 포함할 수 있다. 조성물은 또한 생리학적 조건에 근사한 추가적인 물질, 예컨대 pH 조정제 및 완충제, 독성 조정제, 습윤화제 및 세정제를 포함할 수 있다.

[0200] 본 개시내용의 제약 조성물은 또한 임의의 다양한 안정화제, 예컨대 예를 들어 항산화제를 포함할 수 있다. 제약 조성물이 폴리펩티드를 포함하는 경우, 폴리펩티드는 폴리펩티드의 생체내 안 정성을 증진시키거나, 다르게는 그의 약리학적 특성을 증진시키는 (예를 들어, 폴리펩티드의 반감기를 증가시키고, 그의 독성을 감소시키고, 용해도 또는 흡수를 증진시키는) 다양한 널리 공지된 화합물과 복합체화될 수 있다. 이러한 변형 또는 복합체화제의 예는, 제한 없이, 술페이트, 글루코네이트, 시트레이트 및 포스페이트를 포함한다. 조성물의 폴리펩티드는 또한 그들의 생체내 속성을 증진시키는 분자와 복합체화될 수 있다. 이러한 분자는, 제한 없이, 탄수화물, 폴리아민, 아미노산, 다른 펩티드, 이온 (예를 들어, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 망간), 및 지질을포함한다.

[0201] 다양한 유형의 투여에 적합한 제형의 추가의 예는 문헌 [Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 22nd ed. (2012)]에서 발견될 수 있다.

[0202] 경구 투여를 위해, 활성 성분은 고체 투여 형태, 예컨대 캡슐, 정제, 및 분말로, 또는 액체 투여 형태, 예컨대 엘릭시르, 시럽, 및 현탁액으로 투여될 수 있다. 활성 성분(들)은 불활성 성분 및 분말화된 담체, 예컨대 글루코스, 락토스, 수크로스, 만니톨, 전분, 셀룰로스 또는 셀룰로스 유도체, 스테아르산마그네슘, 스테아르산, 나트륨 사카린, 활석, 탄산마그네슘과 함께 젤라틴 캡슐에 캡슐화될 수 있다. 바람직한 색상, 맛, 안정성, 완충 능력, 분산 또는 다른 공지된 바람직한 특색을 제공하기 위해 첨가될 수 있는 추가적인 불활성 성분의 예는 적색 산화철, 실리카 겔, 나트륨 라우릴 술페이트, 이산화티타늄, 및 식용 백색 잉크이다. 유사한 희석제는 압축 정제를 제조하는데 사용될 수 있다. 정제 및 캡슐 둘 다는 시간의 기간에 걸친 의약의 연속적 방출을 제공하기 위해 서방형 산물로서 제조될 수 있다. 압축 정제는 임의의 불쾌한 맛을 마스킹하고, 정제를 대기로부터 보호하기 위해 당 코팅되거나 필름 코팅될 수 있거나, 위장관에서의 선택적 붕괴를 위해 장용-코팅될 수 있다. 경구 투여용 액체 투여 형태는 환자 수용성을 증가시키기 위해 착색 및 향미를 함유할 수 있다.

[0203] 비경구 투여에 적합한 제형은 수성 및 비-수성, 등장성 멸균 주사 용액을 포함하며, 이는 항산화제, 완충제, 정균제, 및 제형을 의도되는 수여자의 혈액과 등장성이 되게 하는 용질, 및 현탁화제, 가용화제, 증점제, 안정화제, 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액을 포함한다.

[0204] 제약 조성물을 제형화하는데 사용되는 성분은 바람직하게는 고순도의 것이며, 잠재적으로 유해한 오염물 (예를 들어, 적어도 국가 식품 (NF) 등급, 일반적으로 적어도 분석 등급, 및 보다 전형적으로 적어도 제약 등급)이 실질적으로 없다. 더욱이, 생체내 사용을 위해 의도되는 조성물은 통상적으로 멸균성이다. 주어진 화합물이 사용 전에 합성되어야 하는 정도까지, 생성된 산물은 전형적으로 합성 또는 정제 공정 동안 존재할 수 있는 임의

의 잠재적으로 독성제, 특히 임의의 내독소가 실질적으로 없다. 비경구 투여용 조성물은 또한 멸균성이고, 실질적으로 등장성이며, GMP 조건 하에서 제조된다.

[0205] 제형은 뇌 또는 중추 신경계에서의 체류 및 안정화를 위해 최적화될 수 있다. 작용제가 두개 구획 내로 투여되는 경우, 작용제는 구획에서 보유되고, 혈액 뇌 장벽을 확산하거나 다르게는 횡단하지 않는 것이 바람직하다. 안정화 기법은 분자량의 증가를 달성하기 위해 가교, 다량체화, 또는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리아크릴아미드, 중성 단백질 운반체 등과 같은 기에의 연결을 포함한다.

[0206] 체류를 증가시키기 위한 다른 전략은 생체분해성 또는 생체침식성 삽입물에서의 항체, 예컨대 본 개시내용의 항-SIRPA 항체의 포착을 포함한다. 치료적 활성제의 방출의 속도는 중합체성 매트릭스를 통한 수송, 및 삽입물의 생체분해의 속도에 의해 제어된다. 중합체 장벽을 통한 약물의 수송은 또한 화합물 용해도, 중합체 친수성, 중합체 가교의 정도, 중합체 장벽을 약물에 보다 투과성이 되도록 하는 물 흡수 시 중합체의 팽창, 삽입물의 기하구조 등에 의해 영향을 받을 것이다. 삽입물은 삽입의 부위로서 선택되는 영역의 크기 및 형상과 상응하는 치수의 것이다. 삽입물은 입자, 쉬트, 패치, 플라크, 섬유, 미세캡슐 등일 수 있으며, 선택되는 삽입의 부위와 혼화성인 임의의 크기 또는 형상의 것일 수 있다.

[0207] 삽입물은 중합체성 매트릭스를 통해 분포되거나, 활성제의 저장소가 중합체성 매트릭스에 의해 캡슐화되는 경우에 캡슐화된 활성제를 가질 수 있다. 채용되는 중합체성 조성물의 선택은 투여의 부위, 바람직한 치료의 기간, 환자 내성, 치료되는 질환의 성질 등에 따라 다양할 것이다. 중합체의 특징은 삽입의 부위에서의 생체분해성, 관심의 작용제의 혼화성, 캡슐화의 용이성, 생리학적 환경에서의 반감기를 포함할 것이다.

[0208] 채용될 수 있는 생체분해성 중합체성 조성물은 단량체를 포함한, 분해되는 경우에 생리학상 허용되는 분해 산물을 초래하는 유기 에스테르 또는 에테르일 수 있다. 그것만으로 또는 다른 단량체와 조합으로의 무수물, 아미드, 오르토에스테르 등은 용도를 발견할 수 있다. 중합체는 축합 중합체일 것이다. 중합체는 가교되거나 비-가교될 수 있다. 단독중합체 또는 공중합체 중 어느 하나인 히드록시지방족 카르복실산의 중합체, 및 폴리사카라이드가 특히 흥미롭다. 관심의 폴리에스테르 중에는 D-락트산, L-락트산, 라세미 락트산, 글리콜산, 폴리카프로락톤, 및 이들의 조합의 중합체가 포함된다. L-락테이트 또는 D-락테이트를 채용함으로써, 느리게 생체분해되는 중합체가 달성되지만, 분해는 라세미체로 실질적으로 증진된다. 글리콜산 및 락트산의 공중합체는 생체분해의 속도가 글리콜산 대 락트산의 비에 의해 제어되는 경우에 특히 흥미롭다. 가장 급속하게 분해되는 공중합체는 대략 등량의 글리콜산 및 락트산을 가지며, 여기서 각각의 단독중합체는 분해에 대해 보다 저항성이다. 글리콜산 대 락트산의 비는 또한 삽입물의 취성에 영향을 미칠 것이며, 여기서 보다 가요성 삽입물은 보다 큰 기하구조에 바람직하다. 관심의 폴리사카라이드 중에서, 알긴산칼슘, 및 관능화된 셀룰로스, 특히 수불용성이고, 약 5 kD 내지 500 kD의 분자량을 특징으로 하는 카르복시메틸셀룰로스 에스테르 등이 있다. 생체분해성 히드로겔은 또한 본 발명의 삽입물에 채용될 수 있다. 히드로겔은 전형적으로 액체를 흡수하는 능력을 특징으로 하는 공중합체 물질이다. 채용될 수 있는 예시적인 생체분해성 히드로겔은 문헌 [Heller in: Hydrogels in Medicine and Pharmacy, N. A. Peppes ed., Vol. III, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1987, pp 137-149]에 기재되어 있다.

[0209] 본 개시내용의 항-SIRPA 항체를 함유하는 본 개시내용의 제약 조성물은 항-SIRPA 항체로의 치료를 필요로 하는 개체, 바람직하게는 인간에게 공지된 방법에 따라, 예컨대 볼루스로서 또는 시간의 기간에 걸친 연속 주입에 의한 정맥내 투여, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 두개내, 척수내, 피하, 관절내, 윤활막내, 경막내, 경구, 국소, 또는 흡입 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0210] 본 개시내용의 제약 조성물의 투여량 및 바람직한 약물 농도는 구상되는 특정한 용도에 따라 다양할 수 있다. 적절한 투여량 또는 투여 경로의 결정은 널리 통상의 기술자의 기술 내에 있다. 동물 실험은 인간 요법을 위한 유효 용량의 결정을 위한 신뢰성 있는 지침을 제공한다. 유효 용량의 종간 스케일링은 문헌 [Mordenti, J. and Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics," In *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds, Pergamon Press, New York 1989, pp.42-46]에 기재된 원칙에 따라 수행될 수 있다.

[0211] 본 개시내용의 항-SIRPA항체 중 임의의 것의 생체내 투여를 위해, 통상적인 투여량은 투여 경로에 따라, 1일당 개체의 체중의 약 10 ng/kg 내지 약 100 mg/kg 이상, 바람직하게는 약 1 mg/kg/일 내지 10 mg/kg/일로 다양할 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복된 투여를 위해, 치료되는 질환, 장애, 또는 상태의 중증도에 따라, 치료는 증상의 바람직한 억제가 달성될 때까지 지속된다.

[0212] 예시적인 투약 레지멘은 약 2 mg/kg의 항-SIRPA 항체의 초기 용량, 이어서 2주마다 약 1 mg/kg의 매주 유지 용량을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 다른 투여량 레지멘은 의사가 달성하기 원하는 약동학적 분해의 패턴에 따라 유용할 수 있다. 예를 들어, 1주에 1 내지 21회를 개체에게 투약하는 것은 본원에서 고려된다. 특정 실시양태에서, 약 3 μg/kg 내지 약 2 mg/kg (예컨대 약 3 μg/kg, 약 10 μg/kg, 약 30 μg/kg, 약 100 μg/kg, 약 300 μg/kg, 약 1 mg/kg, 및 약 2/mg/kg)의 범위의 투약이 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 투약 빈도는 1일당 3회, 1일당 2회, 1일당 1회, 2일마다 1회, 매주 1회, 2주마다 1회, 4주마다 1회, 5주마다 1회, 6주마다 1회, 7주마다 1회, 8주마다 1회, 9주마다 1회, 10주마다 1회, 또는 매월 1회, 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 또는 그 초과이다. 요법의 진행은 통상적인 기법 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다. 투여되는 항-SIRPA 항체를 포함한 투약 레지멘은 사용되는 용량에 독립적으로 시간에 걸쳐 다양할 수 있다.

[0213] 특정한 항-SIRPA 항체에 대한 투여량은 항-SIRPA 항체의 1회 이상의 투여가 주어진 개체에서 경험적으로 결정될 수 있다. 개체는 항-SIRPA 항체의 증분적 용량이 주어진다. 항-SIRPA 항체의 효능을 평가하기 위해, 본 개시내용의 질환, 장애, 또는 상태 (예를 들어, 암)의 임상적 증상이 모니터링될 수 있다.

[0214] 본 개시내용의 항-SIRPA 항체의 투여는, 예를 들어, 수여자의 생리학적 상태, 투여의 목적이 치료적인지 예방적인지 여부, 및 통상의 실시자에게 공지된 다른 인자에 따라 연속적이거나 간헐적일 수 있다. 항-SIRPA 항체의 투여는 본질적으로 시간의 미리 선택된 기간에 걸쳐 연속적일 수 있거나, 일련의 이격된 용량으로일 수 있다.

[0215] 상이한 제형이 상이한 치료 및 상이한 장애에 유효할 것이며, 구체적인 기관 또는 조직을 치료하도록 의도되는 투여가 또 다른 기관 또는 조직에 대한 그것과는 상이한 방식으로의 전달을 필요로 할 수 있음은 본 개시내용의 범위 내에 있다. 더욱이, 투여량은 1회 이상의 별개의 투여에 의해, 또는 연속적 주입에 의해 투여될 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복된 투여를 위해, 상태에 따라, 치료는 질환 증상의 바람직한 억제가 일어날 때까지 지속된다. 그러나, 다른 투여량 레지멘은 유용할 수 있다. 이 요법의 진행은 통상적인 기법 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0216] 본 발명의 한 측면에서, SIRPA를 하향-조절하는 작용제, 예를 들어, 항-SIRPA 항체는 치료제로서 사용된다. 이러한 작용제는 대상체에서의 SIRPA 발현, 활성 및/또는 시그널링과 연관된 질환 또는 병리증상을 치료하고/거나, 경감시키고/거나, 예방하기 위해 투여된다. 치료 레지멘은 SIRPA 발현, 활성 및/또는 시그널링과 연관된 질환 또는 장애, 예를 들어, 암 또는 다른 신생물성 장애를 앓고 있는 (또는 발생할 위험이 있는) 대상체, 예를 들어, 인간 환자를 표준 방법을 사용하여 확인함으로써 수행된다. 일부 실시양태에서, SIRPA 발현, 활성, 및/또는 시그널링과 연관된 병리증상을 갖는 세포는 SIRPA 리간드, 예를 들어, CD47을 발현한다. 일부 실시양태에서, SIRPA 발현, 활성, 및/또는 시그널링과 연관된 병리증상을 갖는 세포는 SIRPA를 발현한다.

[0217] 하기 추가로 상세화된 바와 같이, SIRPA를 하향-조절하는 작용제, 예를 들어, 항-SIRPA 항체는 SIRPA 발현, 활성, 또는 시그널링과 연관된 질환 또는 병리증상을 치료하는데 사용되는 추가적인 치료제와 조합으로 사용될 수 있다. 용어 "조합으로" 및 "함께"는 본 개시내용에서 상호교환가능하게 사용된다. 추가적인 치료제는 SIRPA를 하향-조절하는 작용제, 예를 들어, 항-SIRPA 항체 전에, 후에, 또는 그와 공동으로 투여될 수 있다.

[0218] 본 개시내용의 한 측면에서, 예를 들어, 세포 표면 상의 SIRPA의 발현을 저하시키지만, SIRPA에의 리간드, 예를 들어, CD47의 결합을 실질적으로 차단하지 않는 항-SIRPA 항체를 포함하는 항-SIRPA 항체 제제는 인간 대상체에게 투여된다. 항체의 투여는 리간드 결합, 예를 들어, CD47 결합에 의해 매개되는 SIRPA의 발현, 활성 및/또는 시그널링 기능을 무효화하거나, 억제하거나, 방해할 수 있다. 한 실시양태에서, SIRPA 발현과 연관된 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 SIRPA를 발현하는 암, 예컨대 골수 세포의 혈액학적 증식성 장애를 갖는 환자에게 투여된다. 전형적인 실시양태에서, 항-SIRPA 항체는 CD47을 발현하는 암을 갖는 환자에게 투여된다.

[0219] 특정 실시양태에서, 암은 편평 세포 암종, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 편평 비-소세포 폐암 (NSCLC), 비-편평 NSCLC, 신경교종, 위장암, 신장암 (예를 들어 투명 세포 암종), 난소암, 간암, 결장직장암, 자궁내막암, 신장암 (예를 들어, 신세포 암종 (RCC)), 전립선암 (예를 들어 호르몬 불응성 전립선 선암종), 갑상선암, 신경모세포종, 췌장암, 교모세포종 (다형성 교모세포종), 자궁경부암, 위암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장 암종, 및 두경부암 (또는 암종), 위암, 배세포 종양, 소아 육종, 부비동비강 자연 킬러, 흑색종 (예를 들어, 전이성 악성 흑색종, 예컨대 피부 또는 안구내 악성 흑색종), 골암, 피부암, 자궁암, 항문 영역의 암, 고환암, 자궁관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁경부의 암종, 질의 암종, 음문의 암종, 식도의 암, 소장의 암, 내분비계의 암, 부갑상선의 암, 부신의 암, 연조직의 육종, 요도의 암, 음경의 암, 아동의 고형 종양, 요관의 암, 신우의 암종, 중추 신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척수 축 종양, 뇌 줄기 신경교종, 뇌하수체

선종, 카포시 육종, 표피모양 암, 편평 세포 암, T-세포 림프종, 석면에 의해 유도된 것들을 포함한 환경적으로-유도된 암, 바이러스-관련된 암 (예를 들어, 인간 유두종 바이러스 (HPV)-관련된 종양), 및 2가지 주요 혈액 세포 계통, 즉, 골수 세포주 (과립구, 적혈구, 혈소판, 대식세포 및 비만 세포를 생산함) 또는 림프 세포주 (B, T, NK 및 형질 세포를 생산함) 중 어느 하나로부터 유래된 혈액학적 악성종양, 예컨대 모든 유형의 백혈병, 림프종, 및 골수종, 예를 들어, 급성, 만성, 림프구성 및/또는 골수성 백혈병, 예컨대 급성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 및 만성 골수성 백혈병 (CML), 비분화된 AML (M0), 골수모구성 백혈병 (M1), 골수모구성 백혈병 (M2; 세포 성숙을 가짐), 전골수구성 백혈병 (M3 또는 M3 변이체 [M3V]), 골수단핵구성 백혈병 (호산구증가증을 갖는 M4 또는 M4 변이체 [M4E]), 단핵구성 백혈병 (M5), 적백혈병 (M6), 거대모구성 백혈병 (M7), 단리된 과립구성 육종, 및 녹색종; 림프종, 예컨대 호지킨 림프종 (HL), 비-호지킨 림프종 (NHL), B 세포 혈액학적 악성종양, 예를 들어, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 림프형질세포모양 림프종, 단핵구모양 B-세포 림프종, 점막-연관된 림프모양 조직 (MALT) 림프종, 역형성 (예를 들어, Ki 1+) 거대-세포 림프종, 성인 T-세포 림프종/백혈병, 외투 세포 림프종, 혈관 면역모세포성 T-세포 림프종, 혈관중심성 림프종, 장 T-세포 림프종, 1차 종격 B-세포 림프종, 전구체 T-림프모구성 림프종, T-림프모구성; 및 림프종/백혈병 (T-Lbly/T-ALL), 말초 T-세포 림프종, 림프모구성 림프종, 이식후 림프증식성 장애, 진성 조직구성 림프종, 원발성 중추 신경계 림프종, 원발성 삼출 림프종, 림프모구성 림프종 (LBL), 림프 계통의 조혈 종양, 급성 림프모구성 백혈병, 미만성 거대 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 소포성 림프종, 미만성 조직구성 림프종 (DHL), 면역모구성 거대 세포 림프종, 전구체 B-림프모구성 림프종, 피부 T-세포 림프종 (CTLC) (균상 식육종 또는 세자리 증후군으로도 지칭됨), 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증을 갖는 림프형질세포모양 림프종 (LPL); 골수종, 예컨대 IgG 골수종, 경쇄 골수종, 비분비성 골수종, 스몰더링 골수종 (무통성 골수종으로도 지칭됨), 고립성 형질세포종, 및 다발성 골수종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모발상 세포 림프종; 골수 계통의 조혈 종양, 섬유육종 및 횡문근종육종을 포함한 중간엽 기원의 종양; 고환종, 기형암종, 별아교세포종, 신경초종을 포함한 중추 및 말초 신경의 종양; 섬유육종, 횡문근종육종, 및 골육종을 포함한 중간엽 기원의 종양; 및 흑색종, 색소성 건피증, 각질가시세포종, 고환종, 갑상선 소포성 암 및 기형암종을 포함한 다른 종양, 림프 계통의 조혈 종양, 예를 들어 T-세포 장애, 예컨대 소세포 및 대뇌모양 세포 유형을 포함한 T-전림프구성 백혈병 (T-PLL)을 포함하나 이에 제한되지 않는 T-세포 및 B-세포 종양; 바람직하게는 T-세포 유형의 거대 과립 림프구 백혈병 (LGL); a/d T-NHL 간비장 림프종; 말초/흉선후 T 세포 림프종 (다형성 및 면역모구성 하위유형); 혈관중심성 (비내) T-세포 림프종; 두경부의 암, 신장암, 직장암, 갑상선의 암; 급성 골수성 림프종, 뿐만 아니라 상기 암의 임의의 조합이다. 본 발명의 항-SIRPA 항체는 또한 전이성 암을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0220] 일부 실시양태에서, 암은 육종, 방광암, 뇌암, 유방암, 결장암, 직장암, 자궁내막암, 신장암, 신우암, 백혈병, 폐암, 흑색종, 림프종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 및 섬유육종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0221] 일부 실시양태에서, 암은 다형성 교모세포종; 신장 투명 세포 암종; 부신피질 암종; 방광 요로상피 암종; 미만성 거대 B-세포 림프종; 폐 선암종; 췌장 선암종, 신세포암, 비-호지킨 림프종, 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 다발성 골수종, 유방 침습성 암종, 자궁경부 편평 세포 암종, 자궁경내막 선암종, 담관암종, 결장 선암종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 식도 암종, 두경부 편평 세포 암종, 신장 혐색소세포, 신장 유두상 세포 암종, 저등급 신경교종, 간세포성 암종, 폐 편평 세포 암종, 중피종, 난소 장액성 낭선암종, 췌장 선암종, 크롬친화세포종 및 부신경절종, 전립선 선암종, 직장 선암종, 피부 흑색종, 위 선암종, 고환 배세포 종양, 갑상선 암종, 흉선종, 자궁체부 자궁내막 암종, 자궁 암육종, 및 포도막 흑색종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0222] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 체크포인트 억제제로서 작용하는 치료제와 함께 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 체크포인트 억제제는 PD1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, 및 CD73을 표적화한다. 전형적인 실시양태에서, 치료제는 D1, PDL1, CD40, OX40, ICOS, CD28, CD137/4-1BB, CD27, GITR, CTLA4, PD-L2, B7-H3, B7-H4, HVEM, LIGHT, BTLA, CD30, TIGIT, VISTA, KIR, GAL9, TIM1, TIM3, TIM4, A2AR, LAG3, DR-5, CD2, CD5, CD39, 또는 CD73으로부터 선택되는 체크포인트 억제제에 대한 항체이다. 일부 실시양태에서, 체크포인트 억제제에 대한 항체의 조합물은 본 발명의 항-SIRPA 항체와 함께 투여된다.

[0223] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 자극성 체크포인트 단백질에 특이적으로 결합하는 적어도 1종의 효능제성 항체, 예를 들어, 효능제 항-CD40 항체, 효능제 항-OX40 항체, 효능제 항-ICOS 항체, 효능제 항-CD28 항체, 효능제성 항-TREM1 항체, 효능제성 항-TREM2 항체, 효능제 항-CD137/4-1BB 항체, 효능제 항-CD27

항체, 효능제 항-글루코코르티코이드-유도된 TNFR-관련된 단백질 GITR 항체, 효능제 항-CD30 항체, 효능제 항-BTLA 항체, 효능제 항-HVEM 항체, 효능제 항-CD2 항체, 효능제 항-CD5 항체, 및 이들의 임의의 조합과 함께 투여될 수 있다.

[0224] 일부 실시양태에서, 본 발명의 항-SIRPA 항체는 방사선 요법 및/또는 화학치료제와 조합으로 투여된다. 화학치료제는, 예를 들어, 하기 군을 포함한다: 항-대사물/항암제, 예컨대 피리미딘 유사체 (5-플루오로우라실, 플록수리딘, 카페시타빈, 겜시타빈 및 시타라빈) 및 퓨린 유사체, 폴레이트 길항제 및 관련된 억제제 (메토트렉세이트, 페메트렉시드, 머캅토퓨린, 티오구아닌, 펜토스타틴 및 2-클로로데옥시아데노신 (클라드리빈)); 천연 산물, 예컨대 빈카 알칼로이드 (빈블라스틴, 빈크리스틴, 및 비노렐빈), 미소관 장애제, 예컨대 탁산 (파클리탁셀, 도세탁셀), 빈크리스틴, 빈블라스틴, 노코다졸, 에포틸론, 에리불린 및 나벨빈을 포함한 항증식제/항유사분열제; 에피디포도필로톡신 (에토포시드, 테니포시드); DNA 손상제 (악티노마이신, 암사크린, 안트라시클린, 블레오마이신, 부술판, 캄프토테신, 카르보플라틴, 클로람부실, 시스플라틴, 시클로포스파미드, 시톡산, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 헥사메틸멜라민옥살리플라틴, 이포스파미드, 멜팔란, 머클로레타민, 미토마이신, 미토크산트론, 니트로소우레아, 플리카마이신, 프로카르바진, 탁솔, 탁소테레, 테모졸아미드, 테니포시드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 에토포시드 (VP 16)); DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제 (아자시티딘); 항생제, 예컨대 닥티노마이신 (악티노마이신 D), 다우노루비신, 독소루비신 (아드리아마이신), 이다루비신, 안트라시클린, 미토크산트론, 블레오마이신, 플리카마이신 (미트라마이신) 및 미토마이신; 효소 (L-아스파라긴을 전신적으로 대사하고, 그들 자신의 아스파라긴을 합성하는 능력을 갖지 않는 세포를 고갈시키는 L-아스파라기나제); 항혈소판제; 항증식성/항유사분열성 알킬화제, 예컨대 질소 머스타드 (메클로레타민, 시클로포스파미드 및 유사체, 멜팔란, 클로람부실), 에틸렌이민 및 메틸멜라민 (헥사메틸멜라민 및 티오테파), 알킬 술포네이트 (부술판), 니트로소우레아 (카르무스틴 (BCNU) 및 유사체, 스트렙토조신), 트리아젠 (다카르바진 (DTIC)); 항증식성/항유사분열성 항대사물, 예컨대 엽산 유사체 (메토트렉세이트); 백금 배위 착체 (시스플라틴, 카르보플라틴), 프로카르바진, 히드록시우레아, 미토탄, 아미노글루테티미드; 호르몬, 호르몬 유사체 (에스트로겐, 타목시펜, 고세렐린, 비칼루타미드, 닐루타미드) 및 아로마타제 억제제 (레트로졸, 아나스트로졸); 항응고제 (헤파린, 합성 헤파린 염 및 트롬빈의 다른 억제제); 섬유소용해제 (예컨대 조직 플라스미노겐 활성화제, 스트렙토키나제 및 우로키나제), 아스피린, 디피리다몰, 티클로피딘, 클로피도그렐, 압식시맙; 항이동제; 항분비제 (브레벨딘); 면역억제제 (시클로스포린, 타크롤리무스 (FK-506), 시롤리무스 (라파마이신), 아자티오프린, 미코페놀레이트 모페틸); 항-혈관신생 화합물 (TNP470, 게니스테인, 포말리도미드) 및 성장 인자 억제제 (혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 억제제, 예컨대 지브-아플리베르셉트; 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 억제제); 아폽토시스 단백질 (IAP) 길항제의 억제제 (비리나판트); 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제 (보리노스타트, 로미뎁신, 키다미드, 파노비노스타트, 모세티노스타트, 아벡시노스타트, 벨리노스타트, 엔티노스타트, 레스미노스타트, 기비노스타트, 퀴시노스타트, SB939); 프로테아솜 억제제 (익사조밉); 안지오텐신 수용체 차단제; 산화질소 공여자; 안티-센스 올리고뉴클레오티드; 항체 (트라스투주맙, 파니투무맙, 페르투주맙, 세툭시맙, 아달리무맙, 골리무맙, 인플릭시맙, 리툭시맙, 오크렐리주맙, 오파투무맙, 오비누투주맙, 알렘투주맙, 압식시맙, 아틀리주맙, 다클리주맙, 데노수맙, 에팔리주맙, 엘로투주맙, 로벨리주맙, 루플리주맙, 우스테키누맙, 비실리주맙, 겜투주맙 오조가미신, 브렌툭시맙 베도틴); 키메라 항원 수용체; 세포 주기 억제제 (플라보피리돌, 로스코비틴, 브리오스타틴-1) 및 분화 유도제 (트레티노인); mTOR 억제제, 토포이소머라제 억제제 (독소루비신 (아드리아마이신), 암사크린, 캄프토테신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 에니포시드, 에피루비신, 에토포시드, 이다루비신, 이리노테칸 (CPT-11) 및 미토크산트론, 토포테칸, 이리노테칸), 코르티코스테로이드 (코르티손, 덱사메타손, 히드로코르티손, 메틸페드니솔론, 프레드니손, 및 프레니솔론); PARP 억제제 (니라파립, 올라파립); 초점성 부착 키나제 (FAK) 억제제 (데팍티닙 (VS-6063), VS-4718, VS-6062, GSK2256098); 성장 인자 시그널 전달 키나제 억제제 (세디라닙, 갈루니세르팁, 로실레티닙, 반데타닙, 아파티닙, EGF816, AZD4547); c-Met 억제제 (카프마티닙, INC280); ALK 억제제 (세리티닙, 크리조티닙); 미토콘드리아 기능이상 유도제, 독소, 예컨대 콜레라 독소, 리신, 슈도모나스 외독소, 보르데텔라 페르투시스(Bordetella pertussis) 아데닐레이트 시클라제 독소, 또는 디프테리아 독소, 및 카스파제 활성화제; 및 크로마틴 장애제. 일부 실시양태에서, 화학치료제는 B-Raf 억제제, MEK 억제제, VEGF 억제제, VEGFR 억제제, 티로신 키나제 억제제, 항-유사분열제, 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0225] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 입양 세포 전달 (ACT) 요법, 키메라 항원 수용체 T 세포 전달 (CAR-T) 요법, 백신 요법, 및/또는 시토카인 요법과 조합으로 투여된다.

[0226] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 억제성 시토카인, 예를 들어, 억제성 시토카인, 예컨대 항-

CCL2 항체, 항-CSF-1 항체, 또는 항-IL-2 항체에 특이적으로 결합하는 적어도 1종의 항체와 조합으로 투여된다.

[0227] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-SIRPA 항체는 적어도 1종의 자극성 시토카인과 조합으로 투여된다. 선행하는 실시양태 중 임의의 것과 조합될 수 있는 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 자극성 시토카인은 IFN-α4, IFN-β, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, CRP, IL-20 패밀리 구성원, LIF, IFN-ɣ, OSM, CNTF, GM-CSF, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-23, CXCL10, IL-33, MCP-1, MIP-1-베타, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0228] 일부 실시양태에서, SIRPA를 하향-조절하는 작용제, 예를 들어, 항-SIRPA 항체는 신경학적 장애를 갖는 환자에게 투여되거나, 신경학적 장애의 위험을 감소시키거나, 발생을 감속시키거나, 또는 예방하기 위해 투여된다. 일부 실시양태에서, 신경학적 장애는 전두측두엽 치매, 알츠하이머병, 또는 혈관성 치매를 포함한 치매이다. 일부 실시양태에서, 환자는 경도 인지 손상을 갖는다.

[0229] 일부 실시양태에서, SIRPA를 하향-조절하는 작용제, 예를 들어, 항-SIRPA 항체는 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 헌팅톤병, 타우병증 질환, 또는 다발성 경화증을 갖는 환자에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 작용제는 크루츠펠트-야콥병, 정상압 수두증, 나수-하콜라병, 뇌졸중, 감염, 외상성 뇌 손상, 진행성 핵상 마비, 권투선수 치매 (만성 외상성 뇌병증), 염색체 17과 관련된 파킨슨증, 리티코-보디그병 (괌의 파킨슨-치매 복합증), 엉킴-우세 치매, 신경절교종 및 신경절세포종, 수막혈관종증, 아급성 경화성 범뇌염, 납중독 뇌병증, 결절성 경화증, 할러보르덴-스파츠병, 리포푸신증, 픽병, 피질기저 변성, 은친화성 입자 질환 (AGD), 전두측두엽 변성, 루이 소체를 갖는 치매, 다계통 위축증, 샤이-드래거 증후군, 진행성 핵상 마비, 또는 피질 기저 신경절 변성을 갖는 환자에게 투여된다.

[0230] 실시예

[0231] 하기 실시예는 단지 예시로서 제공되는 것이지, 제한하고자 하는 것이 아니다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본질적으로 유사한 결과를 생성하도록 변화되거나 변형될 수 있는 다양한 중요하지 않은 파라미터를 용이하게 인식할 것이다.

[0232] 실시예 1: 항-SIRPA 항체의 생산

[0233] 인간 SIRPA 프레단백질의 아미노산 서열은 하기 서열식별번호: 1에 제시된다. 인간 SIRPA는 서열식별번호: 1의 아미노 잔기 1-30에 위치한 시그널 펩티드를 함유한다. 인간 SIRPA는 서열식별번호: 1의 아미노 잔기 32-137에 위치한 세포외 이뮤노글로불린-유사 가변-유형 (IgV) 도메인; 서열식별번호: 1의 아미노 잔기 148-247 및 254-348에 위치한 추가적인 세포외 이뮤노글로불린-유사 불변-유형 (IgC) 도메인 서열; 서열식별번호: 1의 아미노 잔기 374-394에 위치한 막횡단 도메인; 및 서열식별번호: 1의 아미노 잔기 395-504에 위치한 세포내 도메인을 함유한다.

[0234] SIRPAv1 아미노산 서열 (SEQ ID NO: 1):

```
        10         20         30         40         50
MEPAGPAPGR LGPLLCLLLA ASCAWSGVAG EEELQVIQPD KSVLVAAGET
        60         70         80         90        100
ATLRCTATSL IPVGPIQWFR GAGPGRELIY NQKEGHFPRV TTVSDLTKRN
       110        120        130        140        150
NMDFSIRIGN ITPADAGTYY CVKFRKGSPD DVEFKSGAGT ELSVRAKPSA
       160        170        180        190        200
PVVSGPAARA TPQHTVSFTC ESHGFSPRDI TLKWFKNGNE LSDFQTNVDP
       210        220        230        240        250
VGESVSYSIH STAKVVLTRE DVHSQVICEV AHVTLQGDPL RGTANLSETI
       260        270        280        290        300
RVPPTLEVTQ QPVRAENQVN VTCQVRKFYP QRLQLTWLEN GNVSRTETAS
       310        320        330        340        350
TVTENKDGTY NWMSWLLVNV SAHRDDVKLT CQVEHDGQPA VSKSHDLKVS
       360        370        380        390        400
AHPKEQGSNT AAENTGSNER NIYIVVGVVC TLLVALLMAA LYLVRIRQKK
       410        420        430        440        450
AQGSTSSTRL HEPEKNAREI TQDTNDITYA DLNLPKGKKP APQAAEPNNH
       460        470        480        490        500
TEYASIQTSP QPASEDTLTY ADLDMVHLNR TPKQPAPKPE PSFSEYASVQ

VPRK
```

[0235]

[0236] SIRPA-CD47 복합체의 결정 구조 분석은 SIRPA의 IgV 도메인에서의 β-쉬트 가닥을 연결하는 가변 루프에 대한

리간드 결합 부위를 해석한다. CD47-결합 계면은 아미노산 잔기 S59-P65, L96-F104, 및 K123-D130으로 이루어진다.

[0237] SIRPA의 다중 다형성은 인간에서 확인되었다. SIRPA v1 및 v2로 지칭되는 2가지 가장 통상적인 변이체의 아미노산 서열의 정렬을 2-원 블라스트에 의해 생성하였다 (**도 1a**). 서열에서의 대부분의 변이는 리간드 결합 부위 너머에 놓여 있기 때문에, 둘 다의 SIRPA 변이체는 유사한 친화도로 CD47에 결합하는 것으로 보고되어 있다. 대안적으로, SIRP 패밀리의 또 다른 구성원, SIRPB1은 SIRPA와 높은 서열 상동성을 공유하지만, CD47에 결합하지 못한다. SIRPAv1 및 SIRPB1의 아미노산 서열의 정렬을 2-원 블라스트에 의해 생성하였으며 (**도 1b**), 이는 둘 다의 단백질의 세포외 도메인 (리더 서열을 제외함)이 ~90% 동일성을 공유함을 제시한다. 그러나, 단일 A57M 치환은 CD47에의 SIRPB1 결합을 방지하기 위해 S59-P65 리간드-결합 계면을 재배열하는데 충분하다. 더욱이, CD47 결합은 단지 NOD 마우스에 의해 발현되는 마우스 SIRPA의 단일 대립유전자 변이체를 인식하는 인간 CD47과 고도로 종-특이적이다. 인간 SIRPAv1 및 C57BL6 SIRPA의 아미노산 서열의 정렬을 2-원 블라스트에 의해 생성하였으며 (**도 2**), 이는 둘 다의 단백질의 세포외 도메인 (리더 서열을 제외함)이 ~60% 동일성을 공유함을 제시한다.

[0238] ***항-SIRPA 항체 생산***

[0239] *면역화 절차*

[0240] 급속 프라임 방법: 4마리의 50-일령 암컷 BALB/c 마우스를 하기 절차를 사용하여 면역화하였다. 인간 SIRPA 항원을 함유하지만 아주번트를 함유하지 않는 일련의 피하 수성 주사를 19일의 기간에 걸쳐 주었다. 마우스를 랩 프로덕츠(Lab Products)로부터의 환기된 랙 시스템에서 하우징하였다. 모든 4마리의 마우스를 제19일에 안락사시키고, 림프구를 하이브리도마 세포주 생성을 위해 수확하였다.

[0241] 표준 방법: 4마리의 50-일령 암컷 BALB/c 또는 NZB/W 마우스를 하기 절차를 사용하여 면역화하였다. 마우스를 랩 프로덕츠로부터의 환기된 랙 시스템에서 하우징하였다. 마우스를 마우스당 25 μg 단백질 항원의 CpG-ODN 아주번트에 혼합된 인간 SIRPA 항원 (총 부피 마우스당 125 μL)으로 3주마다 복강내로 주사하였다. 시험 출혈을 제2 부스트 후 7일에 복재 정맥의 절개에 의해 수행하였다. 시험 출혈 (면역 혈청)을 간접적 ELISA 검정에 의해 시험하여 융합을 위한 가장 우수한 2마리의 반응하는 마우스를 결정하였다. 마우스는 융합 전에 역가를 평가하기 위해 부스트 후 7일에 제3 및 제4 부스트 및 또 다른 시험 출혈을 요구할 수 있다. 항체 역가가 충분히 높은 경우, 가장 우수한 2마리의 반응하는 마우스에게 측면 꼬리 정맥을 통해 최종 정맥내 부스트를 주었다. IV 부스트 후 4일에 마우스를 융합을 위해 안락사시켰다. 비장을 수확하고, 비장으로부터 단리된 림프구를 하이브리도마를 생산하기 위한 융합 공정에 사용하였다.

[0242] *하이브리도마 발생*

[0243] 림프구를 단리하고, 표준 로슈(Roche) 프로토콜에 따라 폴리-에틸렌 글리콜 (PEG 1500)의 존재 하에서 뮤린 SP2/0 골수종 세포와 융합시켰다. 융합된 세포를 단일-단계 클로닝 방법 (HAT 선택)을 사용하여 배양하였다. 이 방법은 하이브리도마 선택 및 클로닝을 하나의 단계로 조합하는 반-고체 메틸셀룰로스-기반 HAT 선택적 배지를 사용한다. 단일 세포-유래된 하이브리도마는 성장하여 반-고체 배지 상에 모노클로날 콜로니를 형성한다. 융합 이벤트 후 10일에, 948개의 생성된 하이브리도마 클론을 96-웰 조직 배양 플레이트로 옮기고, 중간-로그 성장이 도달될 때까지 (5일) HT 함유 배지에서 성장시켰다.

[0244] *하이브리도마 스크리닝*

[0245] 948개의 하이브리도마로부터의 조직 배양 상청액을 스크리닝 항원 상에서 간접적 ELISA에 의해 시험하고 (1차 스크리닝), 염소 항-IgG/IgM(H&L)-HRP를 사용하여 2차로 IgG 및 IgM 항체 둘 다에 대해 프로빙하고, TMB 기질로 발색시켰다. 이 검정에서 >0.2 OD의 클론을 다음 라운드의 시험에 대해 취하였다. 양성 배양물을 스크리닝 항원 상에서 재시험하여 분비를 확인하고, 무관한 항원 (인간 트랜스페린) 상에서 시험하여 비-특이적 또는 "점착성" mAb를 제거하고, 가성 양성을 배제하였다. 관심의 모든 클론을 항체 트래핑 ELISA에 의해 이소형분석하여 이들이 IgG 또는 IgM 이소형인지를 결정하였다.

[0246] *하이브리도마 세포 배양*

[0247] 관심의 하이브리도마 세포주를 96-웰 플레이트로의 이동 후 32일 동안 24-웰 배양 플레이트에서의 배양에서 유지하였다. 이는 안정성 기간으로 지칭되며, 클론이 안정하고 분비하면서 잔류하는지 여부를 시험한다. 이 안정성 기간 동안, 관심의 모든 클론의 일시적 동결된 세포주 백업을 -80℃ 저장 동안 수행한다 (6개월 생존가능

함). 하이브리도마를 이 기간 동안 분비 및 특이성에 대해 주기적으로 시험하였다.

[0248] *서브클로닝*

[0249] 상부 하이브리도마 세포주 (클론)를 모노클로날성을 보장하기 위해 서브클로닝하였다. 모 클론을 단일-단계 클로닝 시스템을 사용하여 플레이트 아웃함으로써 서브클로닝을 수행하였다. 24 내지 90개의 서브클론을 96-웰 배양 플레이트로 옮겼다. 서브클론을 간접적 ELISA 및 항체 트래핑 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 각각의 모 체에 대한 상부 서브클론을 배양에서의 확장을 위해 취하였다. <50% 클로날인 임의의 모 클론은 제2 라운드의 서브클로닝이 수행되었다.

[0250] 그 후, 항체를 SIRPA 결합에 대해 스크리닝하였다. 인간 SIRPA에의 결합에 대해 양성인 항체를 다수의 세포 유형에서 리간드 결합을 차단하는 능력 및 리간드-유도된 SIRPA 활성을 억제하는 능력에 대해 시험하였다. 각각의 항체의 이소형 및 빈 범주를 **표 1**에 열거한다. **표 1**에서, "ND"는 빈 범주가 결정되지 않은 항체를 지칭한다.

[0251] **표 1: 항-인간 SIRPA 항체에 대한 이소형 및 에피토프 빈 범주**

AB ID	이소형	빈
3F9	mIgG1	3
9C2	mIgG1	3
8A9	mIgG	3
12D6	mIgG	1
8F4	mIgG	2
1E2	mIgG	2
7H9	mIgG	2
4D8	mIgG	3

[0252]

[0253] *항체 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열*

[0254] 표준 기법을 사용하여, 생성된 항체의 경쇄 가변 및 중쇄 가변 도메인을 코딩하는 아미노산 서열을 결정하였다. 항체의 EU 또는 카바트 경쇄 HVR 서열은 **표 2-5**에 제시된다. 항체의 EU 또는 카바트 경쇄 HVR 서열은 **표 2**에 제시된다. 항체의 EU 또는 카바트 중쇄 HVR 서열은 **표 3**에 제시된다. 항체의 EU 또는 카바트 경쇄 프레임워크 (FR) 서열은 **표 4**에 제시된다. 항체의 EU 또는 카바트 중쇄 프레임워크 (FR) 서열은 **표 5**에 제시된다.

3F9: 중쇄 가변 도메인 서열
EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQT
PEKRLEWVATISDYGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMSSLRSEDTAL
YYCARPPYDDYYGGFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:2)

3F9: 경쇄 가변 도메인 서열
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYSYMHWY
QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQH
NRELPCTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:3)

9C2: 중쇄 가변 도메인 서열
EFQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSLTGYNMNWVKQS
RGKSLEWIGNINPHYGSSTYNQNFKDKATLTVDKSSSAAYMQFNSLTSEDSAVY
YCAREGYDGVFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:4)

9C2: 경쇄 가변 도메인 서열
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPG
SSPKPWIYVTSNLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNP
RTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:5)

8A9: 중쇄 가변 도메인 서열
QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQR
PGQGLEWIGVIDPSDSYTNYNQKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVY
YCTRSGYGKYDFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:35)

8A9: 경쇄 가변 도메인 서열
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWY
QQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQH
NWEIPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:36)

8F4: 중쇄 가변 도메인 서열
QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASDYTFTDYSMHWVKQA
PGKDLKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFAFSLEASASTAYLQINNLKNEDTATY
FCARHGYPHYYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:37)

8F4: 경쇄 가변 도메인 서열
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVPTAVAWYQQKP
GQSPKALIYLASNRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSEDLADYFCLQHWNY
PRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:38)

1E2: 중쇄 가변 도메인 서열
EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFSFSSYAMSWVRQT
PAKRLEWVATISGSGGYTYYPDSMKGRFTISRDNAKDILYLQMSSLRSEDTAMY
YCARDPRYTTLYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:39)

1E2: 경쇄 가변 도메인 서열
NIMMTQSPSFLAVSAGEKVTMSCKSSQSIFSGSNQKNYLA
WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC
HQHLSSCTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:40)

[0255]

7H9: 중쇄 가변 도메인 서열
DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGFSISRGYDWHWIRH
FPGNILEWMGYITYSGISNYNPSLKSRISITHDTSKNHFFLRLNSVTAEDTATY
YCARGGGAWFTYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:41)

7H9: 경쇄 가변 도메인 서열
DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSISDSLHWYHQKS
HESPRLLIKYASQSISGIPSRFSAGGSGSDFTLTINSVEPEDVGVYYCQNGHSL
PWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:42)

4D8: 중쇄 가변 도메인 서열
EVKLEESGGGLVKPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQS
PEKGLEWVAEIRGKTTNYATYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSFSTEDTG
IYYCTRRNWGFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:43)

4D8: 경쇄 가변 도메인 서열
DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQTIGTSIHWYQQRT
NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQTNSW
PLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:44)

[0256]

[0257] **표 2: 항-SIRPA 항체의 EU 또는 카바트 경쇄 HVR 서열**

Ab ID	HVR L1	HVR L2	HVR L3
3F9	RASKSVSSSGYSY MH (SEQ ID NO:6)	LASNLES (SEQ ID NO:7)	QHNRELPCT (SEQ ID NO:8)
9C2	RASSSVS-YMH (SEQ ID NO:12)	VTSNLAS (SEQ ID NO:13)	QQWSSNPRT (SEQ ID NO:14)

[0258]

[0259] **표 3: 항-SIRPA 항체의 EU 또는 카바트 중쇄 HVR 서열**

Ab ID	HVR H1	HVR H2	HVR H3
3F9	GFTFSSYAMS (SEQ ID NO:9)	TISDYGGSYTY (SEQ ID NO:10)	PPYDDYYGGFAY (SEQ ID NO:11)
9C2	GYSLTGYNMN (SEQ ID NO:15)	NINPHYGSST (SEQ ID NO:16)	EGYDGVFDY (SEQ ID NO:17)

[0260]

[0261] **표 4: 항-SIRPA 항체의 EU 또는 카바트 경쇄 프레임워크 서열**

Ab ID	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
3F9	DIVLTQSPASLAV SLGQRATISC (SEQ ID NO:22)	WYQQKPGQPP KLLIY (SEQ ID NO:23)	GVPARFSGSGSGTD FTLNIHPVEEEDAAT YYC (SEQ ID NO:24)	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:25)
9C2	QIVLSQSPAILSAS PGEKVTMTC (SEQ ID NO:30)	WYQQKPGSSP KPWIY (SEQ ID NO:31)	GVPTRFSGSGSGTSY SLTISRVEAEDAATY YC (SEQ ID NO:32)	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:33)

[0262]

[0263] **표 5: 항-SIRPA 항체의 EU 또는 카바트 중쇄 프레임워크 서열**

Ab ID	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
3F9	EVKLVESGGGLV KPGGSLKLSCAAS (SEQ ID NO:18)	WVRQTPEKRL EWVA (SEQ ID NO:19)	YPDSVKGRFTISRDN AKYTLYLQMSSLRS EDTALYYCAR (SEQ ID NO:20)	WGQGTLVT VSA (SEQ ID NO:21)
9C2	EFQLQQSGAELV KPGASVKISCKAS (SEQ ID NO:26)	WVKQSRGKSL EWIG (SEQ ID NO:27)	YNQNFKDKATLTV DKSSSAAYMQFNSL TSEDSAVYYCAR (SEQ ID NO:28)	WGQGTTLT VSS (SEQ ID NO:29)

[0264]

[0265] 실시예 2: 항-SIRPA 항체의 특징화

[0266] SIRPA 항체의 초기 특징화는 이후로 CHO-huSIRPA로 지칭되는, 설치류 중국 햄스터 난소 세포주 상에 편위적으로 발현된 인간 수용체에 결합하는 그들의 능력의 스크리닝, 이어서 1차 인간 대식세포에 대한 스크리닝을 포함하였다. 세포를 수확하고, 96-웰 플레이트에 10^5 세포/웰로 플레이팅하고, 세척하고, Fc 차단 시약 및 1.0 μg/ml의 지시된 모노클로날 항체를 함유하는 100 μl FACS 완충제에서 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 2회 세척하고, 1:200 희석된 APC-접합된 2차 항체를 함유하는 FACS 완충제에서 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 차가운 FACS 완충제에서 2회 세척하고, BD FACS 칸토 상에서 획득하였다. 데이터 분석 및 평균 형광 강도 (MFI) 값 또는 % 양성 세포의 계산을 플로우조(FlowJo) (트리스타(TreeStar)) 소프트웨어 버전 10.0.7로 수행하였다.

[0267] 몇몇 항체, 예를 들어, 3F9 및 9C2는 FACS 분석을 통해 검출된 양성 SIRPA 항체 염색에 의해 지시된 바와 같이 CHO-huSIRPA에의 결합을 입증하였다 (흑색으로 윤곽화된 히스토그램) (**도 3a**). 음성 이소형 대조군 (나타내지 않음)은 세포에 결합하지 않았다. 마찬가지로, 3F9 및 9C2는 마우스 SIRPA를 고도로 과발현하는 CHO 세포 (CHO-mSIRPA)에 결합하지 않았으며 (**도 3a**, 음영처리된 히스토그램), 이는 인간 항원에 대한 항체의 특이성을 확인시켜 준다. 중요하게는, 3F9 및 9C2는 또한 생체내 효능을 위한 주요한 표적 세포 집단인 1차 인간 대식세포에 결합하였다 (**도 3b**). SIRPA 항체에 의해 결합된 세포주에 대한 MFI 값을 **도 3a**에 그래프화하고, 표 6에 열거하며, 이는 전형적으로 배경 수준에 비해 >100배의 MFI 값을 제시한다.

[0268] **표 6: 배경 대비 배수로서 열거되는 세포 표면 수용체에 결합하는 항-huSIRPA 항체의 MFI 값**

AB ID	CHO-HuSIRPα	CHO-MuSIRPα
mIgG	1	1
1B3	129.9542	0.985036
3F9	136.6835	0.998266
9C2	127.6125	0.981093
9C5	89.64852	0.98305
12D6	128.3982	0.979942
1H11	149.9567	0.972255

[0269]

[0270] 3F9 및 9C2에 대한 항원 친화도 측정을 표준 표면 플라스몬 공명 (SPR) 기법으로 획득하였다 (**도 3c**). 결합 연구를 비아코어 T200 (지이(GE))을 사용하여 수행하였다. 항-마우스 IgG 포획 항체를 표준 NHS/EDC 활성화를 사용하여 CM5 센서 칩에 아민 커플링시켰다. SIRPA 항체를 1x HBS-EP+ 러닝 완충제에서 50 nM로 희석하고, 센서 칩 표면 상으로 포획하였다. 재조합 가용성 인간 SIRPA 항원의 계열 희석액을 포획된 SIRPA 항체 상으로 주사하여 센서그램 자취를 기록하였다. 참조 세포 뿐만 아니라 완충제 주사로부터 RU 값을 뺌으로써 데이터를 가공하였다. 결합 곡선을 1:1 상호작용 모델로 전체적으로 피팅하여 **표 7**에 열거된 동역학 상수를 생성하였다. 3F9 및 9C2는 각각 $1.0x10^{-8}$ 및 $8.0x10^{-8}$ M의 K_D로 단량체성 인간 SIRPA 항원에 결합하였다.

[0271] **표 7: 항-huSIRPA 항체의 회합 속도, 해리 속도, 및 평형 결합 상수**

AB ID	k_{on}	k_{off}	K_D
3F9	5.5e4 $(Ms)^{-1}$	5.7e-4 s^{-1}	10 nM
9C2	5.4e4 $(Ms)^{-1}$	4.5e-3 s^{-1}	80 nM

[0272]

[0273] 세포-기반 친화도 측정을 또한 수행하여 세포 표면 항원에 대한 3F9 및 9C2의 겉보기 친화도를 확인하였다. 모노클로날 항체의 계열 희석액을 10^5개의 CHO-huSIRPA 세포에 첨가하고, 4℃에서 결합 평형을 달성하게 하였다. 형광적으로 표지된 2차 항체의 첨가 및 간단한 세척 단계 후, 적정된 항체 농도의 함수로서의 MFI 값을 FACS 분석을 통해 기록하였다 (**도 3d**). 곡선을 그래프패드 프리즘 6 소프트웨어로 비선형 회귀 분석을 사용하여 피팅하였다. 3F9 및 9C2로의 세포-기반 적정 실험은 각각 2.6 nM 및 1.6 nM의 EC50 값을 생성하였다.

[0274] 실시예 3: CD47-차단 및 비-차단 SIRPA 항체의 확인

[0275] 포식 세포 이펙터 기능을 억제하는데 있어서 SIRPA-CD47 경로의 역할을 고려하여, 지금까지 기재된 모든 길항제성 요법은 수용체-리간드 상호작용을 억제하는 경쟁적 억제에 의존한다. 유사하게, 이 출원에서의 SIRPA 항체를 CHO-huSIRPA에의 CD47 결합을 차단하는 그들의 능력에 대해 스크리닝하였다. 세포를 수확하고, 96-웰 플레이트에 10^5 세포/웰로 플레이팅하고, 세척하고, 1.0 μg/ml의 지시된 모노클로날 항체 또는 이소형 대조군을 함유하는 100 μl FACS 완충제에서 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 세척하고, 250 nM His-태그부착된 가용성 인간 CD47을 함유하는 FACS 완충제에서 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 다시 세척하고, PE-접합된 항-His 태그 모노클로날 항체로 염색하여 표면 결합된 CD47을 검출하였다. 데이터 분석 및 MFI 값 또는 % 양성 세포의 계산을 플로우조 (트리스타) 소프트웨어 버전 10.0.7로 수행하였다.

[0276] **도 4a**에 제시된 바와 같이, 가용성 CD47은 FACS 분석을 통한 양성 PE-염색에 의해 지시된 바와 같이 CHO-huSIRPA 세포에 특이적으로 결합하였다 (흑색으로 윤곽화된 히스토그램). CD47-His의 부재 하에서, 항-His 태그 항체는 세포에 결합하지 못하였다 (음영처리된 히스토그램). CHO-huSIRPA 세포를 지시된 SIRPA 항체와 함께 예비-인큐베이션한 경우, 몇몇 클론, 예를 들어 12D6 및 1B3은 가용성 CD47 결합의 거의 완전한 차단을 나타내었다 (파선 히스토그램). 그러나, 3F9 및 9C2는 CHO-huSIRPA 세포에의 가용성 CD47 결합을 억제하지 않는 2가지 고유한 클론을 나타낸다. 가용성 CD47에 의해 결합된 세포에 대한 MFI 값을 **도 4b**에 배경 대비 배수로서 그래프화하며, 이는 3F9 및 9C2가 CD47 상호작용을 방해하지 않음을 확인시켜 준다.

[0277] 실시예 4: SIRPA 항체는 SIRPA-의존적 유전자 발현을 조정한다

[0278] 리간드 차단에 추가적으로, SIRPA 항체를 또한 NFAT (활성화된 T-세포의 핵 인자) 프로모터의 제어 하에서 루시페라제 리포터 유전자를 사용하여 CD47-유도된 유전자 발현을 억제하는 능력에 대해 스크리닝하였다. 마우스 흉선 림프종 T 림프구로부터 유래된 세포주 BW5147.G.1.4 (ATCC® TIB48™)를 시그날 렌티(Cignal Lenti) NFAT-루시페라제 바이러스 (퀴아젠(Qiagen)), 및 SIRPA의 세포내 ITIM 모티프가 DAP12의 세포내 ITAM 모티프로 치환된 인간 SIRPA-DAP12 키메라를 발현하는 렌티바이러스로 감염시켰다. 가용성 인간 CD47 단백질을 PBS에 계열 희석하고, 조직 배양 플레이트 상으로 흡착시켰다. 세척 후, huSIRPA/DAP12 키메라를 발현하는 10^5개의 NFAT-루시페라제 리포터 세포 (BWZ-huSIRPA)를 플레이트 상으로 시딩하고, 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 원글로(OneGlo) 시약 (프로메가(Promega))을 각각의 웰에 첨가하고, 샘플을 플레이트 진탕기 상에서 실온에서 3분 동안 인큐베이션함으로써 루시페라제 활성을 측정하였다. 발광 시그널을 GEN5™ 2.04 소프트웨어를 사용하는 바이오텍 시너지(BioTek Synergy)™ 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 정량화하였다.

[0279] **도 5a**에 제시된 바와 같이, 플레이트-결합된 인간 CD47은 키메라 인간 SIRPA/DAP12를 발현하는 리포터 세포에서 루시페라제 활성을 용량-의존적 방식으로 유도하였다. 중요하게는, SIRPA/DAP12 발현이 결여된 모 BWZ 리포터 세포는 CD47에 반응하여 발광 시그널을 방출하지 않았으며, 이는 키메라 수용체가 리간드 결합을 통해 개시되는 시그널링 이벤트를 모방함을 입증한다. 다음으로, 항-SIRPA 항체를 BWZ-huSIRPA 리포터 세포에서 CD47-의존적 루시페라제 활성을 차단하는 그들의 능력에 대해 평가하였다. 상기 기재된 바와 같이, 가용성 인간 CD47 단백질을 PBS에 희석하고, 96-웰 조직 배양 플레이트 상으로 흡착시켰다. 세척 후, 10^5개의 BWZ-huSIRPA 리포터 세포를 이소형 대조군 항체 또는 지시된 항-SIRPA 항체 중 어느 하나를 갖는 플레이트 상으로 시딩하고, 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. **도 5b**는 이전에 기재된 CD47 결합 검정에 따라, CHO-huSIRPA 세포에의 CD47 결합을 차단하는 항-SIRPA 항체, 예컨대 12D6 및 5F7이 또한 리포터 세포에서 CD47-의존적 루시페라제 활성을 억제함을

입증한다. 마찬가지로, CHO-huSIRPA 세포에의 CD47 결합을 차단하지 않는 항-SIRPA 항체, 예컨대 9C2 및 3F9는 또한 BWZ-huSIRPA 세포에서 CD47-의존적 루시페라제 활성을 억제하지 않는다. 더욱이, 항-SIRPA 항체는 용액에서 시그널링을 유도하지 않는데, 이는 가용성 SIRPA 항체와 함께 인큐베이션된 리포터 세포가 플레이트-결합된 CD47의 부재 하에서 발광 시그널을 방출하지 않기 때문이다.

[0280] 실시예 5: SIRPA-특이적 항체의 확인

[0281] SIRPA 항체의 초기 특징화는 1차 인간 골수 세포에 결합할 수 있는 CD47-차단 및 비-차단 항체의 부류를 확인하였다. 그러나, SIRPα 및 SIRPβ1 사이의 높은 서열 상동성 (~90% 동일성)을 고려하여, SIRPA-특이적 결합은 이상적인 항-SIRPA 리드 항체의 중요한 특색으로 남아 있다. SIRPA 항체를 SIRPβ1 교차-반응성에 대해 스크리닝하기 위해, BWZ-NFAT/루시페라제 리포터 세포를 인간 SIRPβ1을 발현하는 렌티바이러스로 형질도입하였다. SIRPα와는 달리, SIRPβ1은 전체 세포 표면 국재화를 위해 DAP12 어댑터의 공동-발현을 요구한다. 그 결과, BWZ-huSIRPβ1 세포를 또한 인간 DAP12를 별개로 발현하는 렌티바이러스로 형질도입하였다. 루시페라제 활성화를 시험하기 위해, 선택된 SIRPA 항체 또는 이소형 대조군을 10 μg/mL의 PBS에 희석하고, 조직 배양 플레이트 상으로 흡착시켰다. 세척 후, huSIRPA/DAP12 키메라 (BWZ-huSIRPA) 또는 huSIRPβ1 + DAP12 (BWZ-huSIRPβ1) 중 어느 하나를 발현하는 10^5개의 NFAT-루시페라제 리포터 세포를 플레이트 상으로 시딩하고, 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 원글로 시약 (프로메가)을 각각의 웰에 첨가하고, 샘플을 플레이트 진탕기 상에서 실온에서 3분 동안 인큐베이션함으로써 루시페라제 활성을 측정하였다. 발광 시그널을 GEN5™ 2.04 소프트웨어를 사용하는 바이오텍 시너지™ 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 정량화하였다.

[0282] **도 6a**에 제시된 바와 같이, 플레이트-결합된 SIRPA 항체는 키메라 인간 SIRPA/DAP12를 발현하는 리포터 세포에서 루시페라제 활성을 플레이트-결합된 CD47로 이전에 관찰된 것과 유사한 정도로 유도하였다. 그러나, 대부분의 SIRPA 항체는 또한 BWZ-huSIRPβ1 리포터 세포에서 루시페라제 활성을 유도하였으며, 이는 이들 항체가 SIRPα 및 SIRPβ1 둘 다와 교차-반응함을 지시한다. 흥미롭게도, 2가지 항체 클론, 3F9 및 9C2는 BWZ-huSIRPA 세포를 특이적으로 활성화시켰지만, BWZ- huSIRPβ1은 그렇지 않으며, 이는 이들 2가지 클론이 고유한 SIRPA-특이적 항체를 나타냄을 시사한다. 이 관찰을 확인하기 위해, 본 발명자들은 비아코어 T200 (지이)으로 SPR-기반 결합 연구를 수행하였다. 항-마우스 IgG 포획 항체를 표준 NHS/EDC 활성화를 사용하여 CM5 센서 칩에 아민 커플링시켰다. SIRPA 항체, 3F9 또는 9C2 중 어느 하나를 1x HBS-EP+ 러닝 완충제에 50 nM로 희석하고, 센서 칩 표면 상으로 포획하였다. 등몰 농도의 재조합 가용성 인간 SIRPA 항원 또는 인간 SIRPB1 항원을 포획된 SIRPA 항체 상으로 주사하여 센서그램 자취를 기록하였다. 참조 세포 뿐만 아니라 완충제 주사로부터 RU 값을 뺌으로써 데이터를 가공하였다. **도 6b**에서의 센서그램은 포획된 항체 3F9 및 9C2 상으로의 SIRPA 항원의 주사 후에 반응 단위의 증가를 명백하게 제시한다. 대조적으로, 포획된 항체 상으로 유동하는 SIRPB1 항원은 상기 배경의 결합 반응을 간신히 기록한다. 따라서, **도 6a 및 6b**로부터의 결과는 SIRPA-특이적 항체로서 클론 3F9 및 9C2를 확인한다.

[0283] 실시예 6: SIRPA-특이적 항체는 인간 대식세포에서 SIRPα의 세포 표면 발현을 저하시킨다

[0284] 면역 세포의 표면 상에서 발현되는 특정 ITIM/ITAM 수용체를 표적화하는 항체가 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 호중구, 및/또는 소교세포 상의 상기 수용체의 표면 수준을 감소시킬 수 있음이 빈번히 관찰된다.

[0285] SIRPα의 세포 표면 발현을 감소시키는 항-SIRPA 항체의 능력을 1차 인간 대식세포 (huMac) 상에서 평가하였다. 인간 단핵구를 건강한 공여자의 말초 혈액으로부터 단리하고, 시험관내에서 대식세포로 분화시켰다. 분화 후, 10^5개의 huMac를 수확하고, 1-5 μg/ml의 이소형 대조군 또는 가용성 항-SIRPA 항체 중 어느 하나를 갖는 96-웰 조직 배양 플레이트 상으로 시딩하였다. 세포를 4시간 처리 또는 밤샘 인큐베이션 후에 유동 세포측정에 의해 SIRPα 표면 발현에 대해 분석하였다. SIRPα 발현을 9C2 및 3F9와는 별개의 에피토프 빈에 속하는 다이라이트 650-접합된 항-인간 SIRPA 항체를 사용하여 검출하였다.

[0286] **도 7a**에 제시된 바와 같이, SIRPA-특이적 항체, 3F9 및 9C2는 이소형 대조군-처리된 대식세포에 비해 SIRPα 발현을 ~90% 유의하게 감소시킨다. FACS 분석은 수용체 하향-조절이 항체 첨가 후 수시간 내에 발생하며, 밤샘 처리를 통해 지속됨을 밝혀낸다. 이는 단지 수용체 발현을 50% 이하 감소시키는 CD47-차단 항체, 예를 들어 1B3 또는 3D2와는 대조적이다. 항체 클론 3F9 및 9C2는 또한 CD47-비-차단 항체이기 때문에, 다른 CD47-비-차단 항체를 수용체 하향-조절에 대해 스크리닝하였다. **도 7b**는 대부분의 경우, 전체로서의 CD47-비-차단 항체가 SIRPα 발현을 ~90% 이상 유의하게 감소시켰음을 제시한다. 다시, 이전의 관찰과 일치하게, CD47-차단 항체는 그에 비해 이 예 5F7 및 12D6에서 수용체 하향조절에 있어서 덜 효과적이었다. 따라서, **도 7a 및 7b**는 비-리간

드 차단 SIRPA 항체의 정의적 특징으로서 SIRPα의 하향조절을 확립한다. 수용체 발현을 감소시킴으로써, 이들 항체는 관련 기술분야에서 이전에 탐구되지 않은 신규한 메카니즘인 비-경쟁적 억제를 통해 SIRPα-CD47 시그널링 경로를 길항작용할 수 있다.

[0287] 실시예 7: SIRPα 하향-조절은 인간 대식세포에 의한 종양 세포의 포식작용을 증진시킨다

[0288] 종양 세포는 CD47의 상향조절을 통해 면역 감시를 모면함으로써 억제 시그널을 포식 세포에 전달한다. 따라서, 길항제성 항체는 이 억제를 상쇄시켜 종양 세포 포식작용을 증진시킨다. SIRPA 항체가 수용체 하향조절에 의해 SIRPα 시그널링을 효과적으로 억제하는지를 결정하기 위해, 종양 세포 포식작용 검정을 pHrodo 형광의 획득에 기반하여 개발하였다. 레드 아비딘 (인비트로젠)은 산성 환경, 예컨대 파고솜에서 형광을 획득하는 형광발생 마커인 pHrodo 레드 염료로 접합된 스트렙타비딘 분자이다. 표적 종양 세포 표지화를 위해, 500 nM 레드 아비딘을 15 nM 비오티닐화된 렌스 쿨리나리스 아글루티닌 (LCA; 벡터 랩스(Vector Labs))과 혼합하였다. 그 후, 레드 아비딘-LCA 복합체를 얼음 상에서 혈청-무함유 RPMI 배지에서 250,000 Raji 세포와 1:1 부피 비로 혼합하였다. LCA의 당-결합 특성은 레드 아비딘을 종양 세포 표면 상의 탄수화물 구조에 연결시킨다. 간단한 세척 단계 후, 레드 아비딘-LCA-표지된 Raji 세포를 혈청-무함유 RPMI 배지에서 단핵구-유래된 인간 대식세포와 혼합하고, 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 대식세포를 수집하고, 얼음 상에서 FcγR-차단 항체를 함유하는 FACS 완충제에서 항-CD14 APC로 염색하였다. APC/pHrodo-이중 양성 대식세포의 퍼센트를 카운팅함으로써 포식 활성을 측정하였다. 대조군으로서, 비표지된 Raji 세포를 대식세포와 혼합하여 배경 형광을 확립하였다.

[0289] **도 8a(i-ii)**는 이 검정의 타당성을 확립한다. 단핵구-유래된 대식세포를 96-웰 조직 배양 플레이트 상으로 10^5 세포/웰로 시딩하고, 이소형 대조군 항체로 밤새 처리하였다. 다음 날, 250,000개의 레드 아비딘-표지된 Raji 세포 또는 비표지된 Raji 세포를 2시간 동안 대식세포와 혼합하고, 이어서 유동 세포측정에 의해 분석하였다. **도 8a(i)**에서의 히스토그램은 대식세포를 비표지된 세포 (음영처리된 히스토그램)에 비해 레드 아비딘-표지된 Raji 세포 (실선 흑색으로 윤곽화된 히스토그램)와 공동-배양한 경우에 관찰되는 pHrodo-형광의 이동을 입증한다. 그러나, 이 이동된 집단은 단지 총 $CD14^+$ 대식세포의 ~5%를 나타낸다 (**도 8aii**). 항-CD20 항체 (리툭시맙)로의 레드 아비딘-표지된 Raji 세포의 옵소닌화는 종양 세포 클리어런스를 증진시키는 항체-의존적 포식작용과 일치하게 $pHrodo^+$ 대식세포 집단을 훨씬 더 이동시킨다 (파선 윤곽화된 히스토그램). 리툭시맙의 첨가의 결과로서, $pHrodo^+$ 대식세포는 포식 활성의 거의 4배 증가인 총 $CD14^+$ 대식세포의 ~20%를 나타낸다.

[0290] SIRPA 항체를 시험하기 위해, 대식세포를 지시된 후보 항체 또는 이소형 대조군으로 밤새 처리하였다. 다음 날, 표지된 Raji 세포를 처리된 대식세포에 첨가하고, 이어서 포식 활성의 정량화를 수행하였다. **도 8b**에 제시된 바와 같이, 3F9 및 9C2 둘 다는 이소형 처리된 대식세포에 비해 $CD14^+/pHrodo^+$-대식세포의 집단을 각각 2.5배 및 1.5배 증가시켰다. 리툭시맙-옵소닌화된 Raji 세포를 3F9- 또는 9C2-처리된 대식세포에 첨가한 조합 요법은 이소형-처리된 대식세포에 비해 종양 세포 탐식을 더 증진시켰다. 리툭시맙 단독은 비처리된 세포에 비해 포식 활성을 ~4배 증가시킨 반면, 리툭시맙 + 3F9 또는 리툭시맙 + 9C2 처리는 포식작용을 각각 7배 및 6배 증강시켰다. 3F9 및 9C2는 CD47 결합을 경쟁적으로 억제하지 않는 SIRPA-특이적 항체이기 때문에, **도 8c**는 CD47-차단 대 CD47-비-차단 항체로 처리된 대식세포의 포식 활성을 비교한다. CD47-차단 항체 중에서, 단지 12D6 및 5F7은 상기 이소형 처리된 대식세포에 비해 종양 세포 흡수를 ~30-40% 유의하게 증가시켰다. 그에 비해, 3F9-처리된 대식세포의 포식 활성은 2배 증가하였다. 따라서, **도 8a-c**로부터의 결과는 대식세포 상의 SIRPα의 항체-매개된 하향조절이 종양 세포의 포식적 흡수를 증진시킴을 확립한다. SIRPA 항체를 항-종양 항원 항체와 조합하는 것은 이펙터 세포에 의한 종양 세포 클리어런스를 더 강화시킨다. 마지막으로, CD47 상호작용을 경쟁적으로 억제하는 항-SIRPA 항체와 비교하여, SIRPα 발현을 감소시킴으로써 CD47 결합을 비-경쟁적으로 억제하는 항체는 대식세포에 의한 종양 세포의 탐식을 자극하는 우수한 능력을 입증한다.

[0291] 실시예 8: SIRPα 하향-조절은 1차 인간 단핵구를 활성화시킨다

[0292] 대식세포는 항-SIRPA 요법에 반응하여 종양 세포 클리어런스를 유도하는 주요한 이펙터 세포 집단일 수 있지만, SIRPA 항체는 SIRPα를 발현하는 다중 골수 세포 계통을 결속할 것이다. 이들 세포 중에서, 말초 혈액에 집단화하며, 따라서, 생체내에서 항체 투여 시 검정 표적 결속에 용이하게 접근가능한 단핵구가 있다. 잠재적 바이오마커를 확인하기 위해, 1차 단핵구를 건강한 공여자의 말초 혈액으로부터 단리하고, 항체 처리 후 활성화 마커에 대해 검정하였다.

[0293] SIRPα의 표면 발현을 감소시키는 항-SIRPA 항체의 능력을 단핵구에 대해 입증하였다. 단리 후, 10^5개의 단핵구를 5 μg/ml의 이소형 대조군 또는 가용성 항-SIRPA 항체 중 어느 하나를 갖는 96-웰 조직 배양 플레이트 상으로 시딩하였다. 세포를 밤샘 인큐베이션 후에 유동 세포측정에 의해 SIRPα 표면 발현에 대해 분석하였다. SIRPα 발현을 별개의 에피토프 빈에 속하는 다이라이트650-접합된 항-인간 SIRPA 항체를 사용하여 검출하였다. **도 9a**는 3F9가 이소형 대조군 처리된 세포에 비해 SIRPα의 표면 발현을 50% 감소시킴을 제시한다. 수용체 하향조절은 대식세포에서 이전에 관찰된 것보다 단핵구에서 덜 강건한 것으로 보이지만, 단핵구를 염증성 매개자의 생산, 예를 들어 반응성 산소 종 (ROS) 및 전염증성 시토카인의 생산에 대해 검정하였다. ROS 생산을 검출하기 위해, 10^5개의 단핵구를 10 μg/ml의 이소형 대조군 또는 가용성 항-SIRPA 항체 중 어느 하나를 갖는 96-웰 조직 배양 플레이트 상으로 시딩하였다. 이어서, 세포를 2 μM의 형광 염료, CM-H2DCFDA로 표지하였다. 37℃에서 1시간의 항체-매개된 자극 후, 세포에서의 상대 형광 단위를 여기 파장 495 nm 및 방출 파장 530 nm에서 측정하였다. 자극된 세포의 비형광 지수를 배지 단독에서 및/또는 이소형 대조군 항체와 함께 인큐베이션된 표지된 세포의 배경 형광의 삭감에 의해 얻었다. 플레이트를 GEN5™ 2.04 소프트웨어를 사용한 바이오텍 시너지™ 마이크로플레이트 판독기로 판독하였다. **도 9b**는 SIRPA-특이적 항체, 3F9 및 9C2가 2명의 건강한 공여자로부터 단리된 단핵구에서 ROS 생산을 자극하였음을 제시한다. 추가적으로, **도 9c**는 SIRPα-하향조절 항체로 밤새 처리된 10^5개의 단핵구가 상승된 양의 IL-8을 생산함을 제시한다. 따라서, **도 9a-c**로부터의 결과는 수용체 표면 발현을 감소시키는 것에 추가적으로, 항-SIRPA 항체가 또한 세포를 보다 활성 표현형을 향해 극성화할 수 있음을 시사한다.

[0294] 실시예 9: SIRPA-특이적 항체는 생체내에서 SIRPα의 세포 표면 발현을 저하시킨다

[0295] 항-SIRPA 항체가 생체내 모델 시스템에서 수용체의 세포 표면 발현을 감소시키는지를 결정하기 위해, RAG2-결핍성 및 IL2R γ 쇄-결핍성 배경에서 인간 SIRPA 유전자를 코딩하는 인간 BAC 트랜스제닉 마우스를 얻었다. huSIRPA의 발현 수준을 유동 세포측정에 의해 마우스 골수 세포 상에서 분석하였다. **도 10a**에 제시된 바와 같이, 마우스 말초 혈액으로부터 단리된 단핵구 및 과립구는 인간 SIRPA, 뿐만 아니라 내인성 마우스 SIRPA를 발현하였다. 골수 세포로부터 유래된 대식세포 및 수지상 세포는 또한 huSIRPA를 발현한다. 따라서, huSIRPA-tg 마우스는 마우스 세포에서 인간 SIRPA의 발현 패턴을 충실하게 개괄한다. 더욱이, huSIRPA가 그의 억제 기능을 보유하였는지를 결정하기 위해, huSIRPA-tg 마우스를 인간 CD47을 과발현하는 인간 B 세포 림프종 세포주인 Raji 세포로 삽입하였다. **도 10b**에 제시된 바와 같이, Raji 세포의 피하 투여는 고형 종양 형성을 초래하며, 이는 huSIRPA-tg 마우스가 CD47+ 인간 세포의 이식을 뒷받침함을 시사한다.

[0296] 생체내에서 항체-매개된 수용체 하향조절을 시험하기 위해, huSIRPA-tg 마우스는 10 mg/kg의 3F9 (항-SIRPA 항체) 또는 MOPC21 (마우스 IgG1 이소형 대조군)의 단일 복강내 (i.p.) 주사를 받았다. 다음 날, 혈액 샘플을 마우스로부터 헤파린-코팅된 수집 튜브 내로 채혈하고, FACS 분석을 위해 프로세싱하였다. 추가적으로, 비장을 또한 수확하고, FACS 분석을 위해 프로세싱하였다. 간략하게, 혈액 및 비장세포 샘플을 ACK 용해 완충제에서 5분 동안 인큐베이션하여 적혈구를 용해시킨 후, 차가운 PBS로 광범위하게 세척하였다. 그 후, 세포를 FACS 완충제 (PBS +2% FBS + Fc 수용체 차단 용액)에 재현탁시켰다. 말초 혈액 골수 세포를 항-마우스 CD11b-퍼시픽 블루, 및 항-인간 SIRPα/β-APC (클론 SE5A5) 또는 다이라이트 650-접합된 9C2 중 어느 하나로 염색하고, 인간 SIRPA-특이적 항체를 하이브리도마 스크린을 통해 확인하였다. 데이터를 BD FACS 칸토™ II 세포측정기 (벡톤 디킨슨(Becton Dickinson)) 상에서 획득하고, 플로우조 소프트웨어로 분석하였다. **도 10c**에 제시된 바와 같이, 항-인간 SIRPα/β-APC로 표지된 CD11b+ 혈액 단핵구 및 과립구 상의 게이팅은 3F9 처리가 이소형 대조군-처리된 마우스와 비교할 경우에 둘 다의 세포 유형 상의 huSIRPA의 세포 표면 수준을 저하시키지 못함을 밝혀낸다. 그러나, 3F9 처리는 9C2-다이라이트 650을 말초 혈액 세포 상의 huSIRPA의 결합으로부터 차단한다. 3F9 및 9C2는 동일한 에피토프에 결합하기 때문에, 이 차단은 3F9가 발현을 하향조절하지 않고 말초 혈액 세포 상의 수용체를 점유함을 입증한다.

[0297] 마우스 비장으로부터의 단일-세포 현탁액을 또한 이소형 대조군- 및 3F9-처리된 동물로부터 얻었다. 비장세포를 항-마우스 CD11b-퍼시픽 블루, 항-마우스 F4/80-FITC, 및 항-인간 SIRPα/β-APC (클론 SE5A5)로 염색하였다. 데이터를 BD FACS 칸토™ II 세포측정기 (벡톤 디킨슨) 상에서 획득하고, 플로우조 소프트웨어로 분석하였다. **도 10d**에 제시된 바와 같이, 2가지 주요 골수 세포 집단을 F4/80 및 CD11b 마커에 기반하여 비장에서 확인하였다: $F4/80^{Lo}$ $CD11b^{+/-}$ 집단 (가능하게는 적색 속질 대식세포) 및 $F4/80^{Hi}$ $CD11b^{Hi}$ 집단. 둘 다의 집단은 huSIRPA를 발현하지만, 대조군-처리된 마우스에서 입증된 바와 같이, 3F9 처리는 주로 $F4/80^{Lo}$ $CD11b^{+/-}$ 세포에서

huSIRPA 발현을 하향조절하였다. 추가적으로, F4/80^{Lo} CD11b^{-} 집단은 단지 3F9-처리된 마우스의 비장에서 확장된다. huSIRPA의 미미한 저하가 F4/80^{Hi} CD11b^{Hi} 비장 집단에서 관찰된다.

[0298] 이들 결과는 huSIRPA-tg 마우스를 이용하는 경우, 항-SIRPA 항체가 생체내에서 huSIRPA를 결속하며, 골수 세포 상의 수용체를 기능적으로 하향조절함을 입증하였다. 결과는 huSIRPA 항체, 3F9가 말초 혈액 세포 및 비장 골수 세포 상의 huSIRPA를 결속하지만, 세포 유형-의존적 또는 상황-의존적 방식으로 수용체를 내재화함을 입증한다.

[0299] 실시예 10: BAC-트랜스제닉 마우스 모델에서의 항-SIRPA 항체의 항-종양 효과

[0300] huSIRPA-tg 마우스로의 파일럿 실험을 수행하여 항-SIRPA 항체의 항-종양 효과를 평가하였다. 대략 8-12 주령의 12마리의 huSIRPA-tg 암컷 마우스를 매트리겔(Matrigel) 용액에서 혼합된 500,000개의 Raji-루시페라제 세포로 우측 옆구리 상에 편측으로 삽입하였다. 종양 이식을 삽입후 7 내지 10일에 시작하여 종양 부피의 캘리퍼스 측정 및 생체발광 영상화에 의해 모니터링하였다. 제10일에, 종양이 부피로 대략 80-120 mm^{3}에 도달한 경우, 마우스를 복강내 주사에 의해 D-루시페린 기질을 투여하고, 생체내 영상화 시스템으로 영상화하였다. 이어서, 마우스를 Raji 세포로부터의 루시페라제 시그널의 평균 방사휘도 (광자/초/cm^2/sr) 값에 기반하여 처리군 또는 대조군 (군당 6마리의 마우스)으로 무작위화하였다. 제10일에 시작하여, 마우스는 3F9 (항-SIRPA) 또는 마우스 IgG1 대조군 항체 중 어느 하나의 10 mg/kg의 복강내 주사를 연구의 기간 동안 2x/주로 받았다. 마우스를 매일 관찰하고, 디지털 저울을 사용하여 매주 2회 칭량하였다. 대조군의 평균 종양 부피가 1500 mm^{3}에 도달한 경우에 연구를 종결하였다. 연구 종료 시 종양을 수확하고, FACS 분석을 위해 프로세싱하였다. 간략하게, 종양 샘플을 37℃에서 30분 동안 콜라게나제로 처리하였다. 샘플을 세포 여과기를 통해 해리시키고, PBS 중 2% FBS에 재현탁시켰다. 샘플 중의 적혈구를 ACK 용해 완충제를 사용하여 용해시킨 후, 세포를 PBS 중 2% FBS에서 세척하였다. 세포를 혈구계를 사용하여 카운팅하고, 100만개의 세포를 얼음 상에서 30분 동안 플루오로크롬-접합된 항체로 염색한 후, PBS 중 2% FBS로 세척하였다. 세포를 PBS 중 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 모든 염색된 세포를 FACS 칸토 (비디 바이오사이언시즈(BD Biosciences)) 상에서 분석하고, 데이터를 플로우조 소프트웨어 (트리스타)로 분석하였다. 종양-침윤 골수 세포를 항-마우스 CD11b-퍼시픽 블루, 항-마우스 F4/80-FITC, 및 항-인간 SIRPα/β-APC (클론 SE5A5)로 염색하였다. **도 11a**에 제시된 바와 같이, 2가지 주요 골수 집단을 F4/80 및 CD11b 마커에 기반하여 확인하였다: F4/80^{+} CD11b^{+} 집단 (F4/80^{+} 세포) 및 F4/80^{-} CD11b^{+} 집단 (CD11b^{+} 세포). 이소형 대조군-처리된 마우스에서 제시된 바와 같이, 둘 다의 집단은 huSIRPA를 발현한다. 그러나, 3F9 처리는 단지 F4/80^{-} CD11b^{+} 세포에서 huSIRPA 발현을 하향조절한 반면, F4/80^{+} CD11b^{+} 세포에서의 huSIRPA 발현은 저하되지 않았다.

[0301] **도 11b**에 제시된 바와 같이, 항-SIRPA 항체, 3F9를 투여하는 것은 생물발광 영상화에 의해 종양 부하를 측정하는 경우, 비히클 대조군-처리된 동물에 비해 생체내에서 종양 성장을 억제하는 것으로 보였다. 평균 방사휘도 값의 선형 회귀 분석은 제10일에 처리전 방사휘도 값에 대해 보정한 경우, 효능에 대한 거의-유의한 경향이 제17일에 나타남을 지시한다 (p=0.06). 이 경향은 후속 측정에서 계속되지만 (0.16, 0.77 및 0.18의 p-값으로), 종양 성장의 가변성 및 이용가능한 huSIRPA-tg 마우스의 제한된 수를 고려하면, 이 연구는 바람직한 유의성 수준에 도달하기에는 통계적으로 역부족이다.

[0302] 실시예 11: 인간화 마우스 모델에서의 항-SIRPA 항체의 항-종양 효과

[0303] 골수 및 림프 세포 구획을 포함한 인간 면역 세포 계통을 재구성하는 인간 제대혈-유래된 CD34+ 조혈 줄기 세포로 이식된 면역손상된 암컷 NSG 마우스 (Jax)는 항-SIRPA 항체의 면역 조정 능력을 측정하기 위한 플랫폼으로서 기능하였다. 성숙한 인간 면역 세포의 성공적인 이식은 주사후 12주에 말초 혈액에서 >25%의 huCD45+ 세포로서 정의된다. 인간화 마우스를 추가적으로 말초 혈액에서 인간 CD14+, 인간 CD11b+, 및 인간 CD33+ 세포의 높은 세포 카운트에 대해 스크리닝하였다.

[0304] 면역-종양학 효능 연구를 위해, 인간화 마우스를 이 모델 시스템에서 체크포인트 억제제 요법에 반응하는 삼중-음성 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231 세포로 우측 옆구리 상에 피하로 삽입하였다. 처리전 종양 부피를 종양이 감지가능하게 될 경우에 디지털 캘리퍼스에 의해 측정하고, 마우스를 종양 부피가 제-1일에 60-120 mm^{3}에 도달할 경우에 처리군 또는 대조군 (군당 12마리의 마우스)으로 무작위화하였다. 제0일에 시작하여, 마우스는 연구의 기간 동안 4일마다 3F9 (항-SIRPA) 또는 마우스 IgG1 대조군 항체 중 어느 하나의 40 mg/kg의 복강내 주사

를 받았다. 제3 군은 대신 연구의 기간 동안 5일마다 10 mg/kg의 펨브롤리주맙 (키트루다, 머크)의 복강내 주사를 받았다. 체중, 임상적 관찰, 및 디지털 캘리퍼스 측정을 용량 개시 후 매주 2회 기록하였다. 연구를 대조군의 평균 종양 부피가 2000 mm^3에 도달한 경우에 종결하였다. 종료 시, 혈액, 비장 및 종양을 수확하고, FACS 분석을 위해 프로세싱하였다. 간략하게, 종양 샘플을 37℃에서 30분 동안 콜라게나제로 처리하였다. 비장 및 종양 샘플을 세포 여과기를 통해 해리시키고, PBS 중 2% FBS에 재현탁시켰다. 샘플 중의 적혈구를 ACK 용해 완충제를 사용하여 용해시킨 후, 세포를 PBS 중 2% FBS에서 세척하고, 얼음 상에서 30분 동안 플루오로크롬-접합된 항체로 염색하였다. 세포를 PBS 중 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 모든 염색된 세포를 FACS 칸토 (비디 바이오사이언시즈) 상에서 분석하고, 데이터를 플로우조 소프트웨어 (트리스타)로 분석하였다.

[0305] **도 12a**에 제시된 바와 같이, SIRPA 항체, 3F9로의 처리는 이소형 대조군-처리된 또는 키트루다-처리된 마우스 중 어느 하나와 비교할 경우, 종양-함유 인간화 마우스에서 말초 혈액 huCD45+ huCD14+ 골수 세포에서의 SIRPA의 세포 표면 수준을 감소시켰다. 그러나, SIRPA의 세포 표면 발현 수준은 종양내 huCD45+ huCD14+ 골수 세포 상에서 감소되지 않았다. 이들 결과는 항체-매개된 수용체 하향조절이 세포 유형-의존적 또는 상황-의존적 방식으로 일어난 huSIRPA-tg 마우스에서의 이전의 관찰과 흡사하다.

[0306] **도 12b**에 제시된 바와 같이, SIRPA 항체, 3F9로의 처리는 이소형 대조군-처리된 또는 키트루다-처리된 마우스 중 어느 하나와 비교할 경우, 종양-함유 인간화 마우스에서 말초 혈액 huCD45+ huCD14+ 골수 세포의 백분율을 감소시켰다. 대조적으로, 3F9 및 키트루다 둘 다는 종양내 huCD45+ huCD14+ 골수 세포의 백분율을 증가시켰다. 더욱이, 3F9 처리는 이소형 대조군과 비교할 경우, 종양-함유 인간화 마우스의 말초 혈액에서의 인간 CD45+ 백혈구의 전체적인 백분율 (**도 12c**)을 저하시켰다.

[0307] 이 모델 시스템에서 종양 성장에 영향을 미치는 처리 양상 외의 다양한 인자를 설명하기 위해, R의 *lm()* 함수로의 다중 선형 회귀 분석을 이용하여 종양 부피를 1) huCD34+ 줄기 세포 공여자, 2) 제-1일에서의 종양 부피, 3) 무작위화 전의 동물 체중, 및 4) 무작위화 전의 huCD45+ 세포의 이식 속도의 차이에 대해 보정하였다. **도 13a**는 각각의 시점에 대한 군당 평균 종양 부피를 플롯팅한다. 3F9 및 키트루다 처리군 둘 다는 이소형 대조군에 비해 초기 및 후기 시점에서 종양 부피를 유의하게 감소시키지만, 효과는 대부분 제22일 내지 제28일에 관찰된다. **도 13b**에 제시된 바와 같이, huCD34+ 줄기 세포 공여자에 의한 종양 부피 측정의 그래프화는 공여자 5031 및 5048로부터의 인간 면역 세포로 이식된 마우스가 이소형 대조군에 비해 3F9 또는 키트루다 중 어느 하나로 처리된 경우에 종양 성장을 유의하게 억제하였음을 밝혀낸다. 대조적으로, 공여자 129로부터의 인간 면역 세포로 이식된 마우스는 이소형 대조군에 비해 어느 처리군에서도 종양 부피의 임의의 유의한 감소를 기록하지 않았다. 그러나, 공여자 129 수여자로부터의 대조군에서의 평균 종양 부피는 공여자 5031 및 5048로부터의 대조군보다 더 낮았음을 주목한다. 이러한 종양 성장의 공여자-대-공여자 가변성은 이 플랫폼에서의 결과를 적절히 해석하기 위한 적절한 대조군에 대한 필요성을 강조한다.

[0308] 상기 제시된 데이터는 SIRPA 항체, 3F9가 생체내에서 수용체를 결속하며, 특이적 세포 집단에서 SIRPA 하향조절을 유도함을 확립한다. 순환 및 종양 침윤 면역 세포 둘 다의 분석은 3F9 처리가 종양에서 CD14+ 세포의 수반 증가와 함께 말초 혈액에서 CD14+ 골수 세포를 저하시켰음을 밝혀낸다. 혈액 및 종양에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 저하시킨 키트루다와는 달리, 3F9는 T 세포 수에 유의하게 영향을 미치지 않았으며, 이는 이것이 주로 골수 구획에 대해 작용함을 시사한다. 중요하게는, 3F9를 갖는 골수 세포 집단에서의 수용체 하향조절 및 변화는 키트루다 요법에 필적하는 종양 성장의 유의한 억제와 상관되었다. 함께 취해져, 이들 연구는 인간 암을 치료하기 위한 치료제로서 항-SIRPA 항체의 전임상 효능을 뒷받침한다.

[0309] 실시예 12: 3F9 및 9C2의 인 실리코 항체 인간화

[0310] 항체 인간화는 인간 투여에서 면역원성을 방지하기 위해 서열 및 구조적 관계를 통해 인간 항체와 가장 흡사한 상이한 종에서 생성된 항체를 형질전환시키는데 사용된다. 상이한 종으로부터의 항체는 인간 항체 프레임워크 상으로의 비-인간 항체의 특이성-결정 영역 (SDR)의 그래프팅을 허용하는 특징적인 서열 및 구조적 특색을 공유한다. 이는 비-인간 항체의 특이성의 보유를 초래한다. 인간화 프로세스는 프레임워크 영역 및 SDR을 포함한 비-인간 항체 서열 및 특색의 확인을 포함한다. 하기 기준은 항체를 인간화하는데 사용된다: 1) 비-인간 및 공지된 인간 항체 사이의 프레임워크 영역에서의 퍼센트 유사성, 2) 비-인간 및 공지된 인간 항체 사이의 SDR에서의 길이 유사성, 3) 인간 항체의 프레임워크 영역을 생성하는데 사용되는 유전자, 및 4) 인간화에서 및 치료제로서 인간 항체 프레임워크의 이전의 용도. 프레임워크 영역 및 SDR 길이에서의 유사성은 차이가 항체의 특이성을 변경시킬 수 있는 항체에서의 구조적 차이를 생성할 수 있기 때문에 중요하다. 인간 항체의 프레임워크를 생성하는데 사용되는 특이적 유전자는 항체의 안정성 및 특이성에 유익하거나 또는 유해한 것으로 공지되어 있

으며, 그에 따라 선택적으로 사용되거나 회피된다. 마지막으로, 우수한 반감기로 우수하게 내성화되는 인간 치료제에 사용되는 것들을 포함한 이전에 성공적인 인간화 프레임워크는 장래의 성공적인 인간화를 위한 후보일 가능성이 있다.

[0311] **도 14a-d**에 제시된 바와 같이, 인간화 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열을 SIRPA 항체, 3F9 및 9C2에 대해 확인하였다. 3F9 중쇄 가변 도메인에 대한 제1 인간화 서열 (hSB-3F9-H1; **도 14a**)은 인간 프레임워크에 대한 변화를 갖지 않는 "CDR-스왑"이다. 후속의 인간화 중쇄 서열 (hSB-3F9-H2)은 프레임워크 잔기를 변경시킨다 (그 위의 서열에 비해 볼드체로 제시된 변화). **도 14b**에서, hSB-3F9-L1은 인간 프레임워크에 대한 변화를 갖지 않는 경쇄 가변 도메인의 "CDR-스왑"이다. 후속의 인간화 경쇄 서열은 프레임워크 잔기를 변경시킨다 (그 위의 서열에 비해 볼드체로 제시된 변화; 회색 박스친 잔기는 이전의 버전으로부터의 것임). 3F9로부터의 경쇄 CDR은 또한 잠재적 탈아미드화 부위 (#로 표시됨)를 함유하며, 이는 Q, S, A, 또는 D로 치환될 수 있다. 추가적으로, 3F9에 대한 가변 도메인은 위치 96에 잠재적 유리 Cys를 함유하며, 이는 잠재적으로 제조 동안 문제를 초래할 수 있다. 이 부위는 항원 결합이 변경되지 않는 한, A, S, 또는 L 잔기로 치환될 수 있다. **도 14c**에서, hSB-9C2-H1은 인간 프레임워크에 대한 변화를 갖지 않는 중쇄 가변 도메인의 "CDR-스왑"이다. 후속의 인간화 중쇄 서열은 프레임워크 잔기를 변경시킨다 (그 위의 서열에 비해 볼드체로 제시된 변화; 회색 박스친 잔기는 이전의 버전으로부터의 것임). 9C2로부터의 중쇄 CDR은 또한 잠재적 탈아미드화 부위 (#로 표시됨)를 함유하며, 이는 Q, S, 또는 A로 치환될 수 있다. 9C2는 또한 CDR-H3에 Asp-Gly (DG) 서열 (@로 표시됨)을 함유하며, 이는 이소아스파르테이트 형성에 감수성일 수 있다. 이 부위는 항원 결합이 변경되지 않는 한, A, S, 또는 E 잔기로 치환될 수 있다. **도 14d**에서, hSB-9C2-L1은 인간 프레임워크에 대한 변화를 갖지 않는 경쇄 가변 도메인의 "CDR-스왑"이다. 후속의 인간화 경쇄 서열은 프레임워크 잔기를 변경시킨다 (그 위의 서열에 비해 볼드체로 제시된 변화; 회색 박스친 잔기는 이전의 버전으로부터의 것임). 9C2로부터의 경쇄 CDR은 잠재적 탈아미드화 부위 (#로 표시됨)를 함유하며, 이는 Q, S, D, 또는 A로 치환될 수 있다. 9C2는 또한 CDR-L3에 Trp 잔기 (^로 표시됨)를 함유하며, 이는 산화에 감수성일 수 있다. 이 부위는 항원 결합이 변경되지 않는 한, H, Y, 또는 F 잔기로 치환될 수 있다.

[0312] 실시예 13: 항-SIRPA 항체 결합 부위의 에피토프 지도화

[0313] 항-SIRPA 항체의 에피토프 지도화를 인간 SIRPA cDNA 서열의 숏건 돌연변이유발에 의해 생성된 알라닌-스캐닝 라이브러리를 사용하여 수행한다. C-말단 V5 에피토프 태그를 코딩하는 SIRPA 발현 구축물을 고-처리량 알라닌 스캐닝 돌연변이유발 (문헌 [Davidson and Doranz, 2014 Immunology 143, 13-20]에 개요됨)로 처리하여 포괄적 돌연변이 라이브러리를 생성한다. SIRPA 세포외 도메인을 나타내는 잔기의 각각 (아미노산 31-374)은 대부분 알라닌으로 돌연변이되는 반면, 알라닌 코돈은 세린으로 돌연변이되었다.

[0314] 384-웰 마이크로플레이트에 어레이된 SIRPA 돌연변이체 라이브러리 클론을 개별적으로 HEK-293T 세포 내로 형질감염시키고, 22시간 동안 발현한다. 항체를 소화시켜 Fab를 생성한 후, 세포를 10% 정상 염소 혈청 (NGS) (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세인트 루이스)에 희석된 Fab와 함께 인큐베이션한다. 라이브러리 스크리닝 전에, 시그널이 검출의 선형 범위 내임을 보장하기 위해, 1차 Fab 농도를 야생형 SIRPA를 발현하는 세포에 대한 독립적 면역형광 적정 곡선을 사용하여 결정한다. Fab를 10% NGS 중 7.5 μg/ml 알렉사플루오르 488-접합된 2차 항체 (잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories), 미국 펜실베니아주 웨스트그로브)를 사용하여 검출한다. 세포를 PBS로 2회 세척하고, 0.1% BSA (시그마-알드리치, 미국 미주리주 세인트 루이스)를 갖는 셀스트리퍼(Cellstripper) (셀그로(Cellgro), 미국 버지니아주 마나사스)에 재현탁시킨다. 일부의 경우, 증가된 pH, 증가된 온도, 및 증가된 해리 시간을 포함한 보다 높은 엄격성 조건이 사용된다. 평균 세포 형광을 인텔리시트(Intellicyt) 고 처리량 유동 세포측정기 (HTFC, 인텔리시트, 미국 뉴멕시코주 알부퀘르크)를 사용하여 검출한다. 야생형 SIRPA 단백질 반응성에 비한 각각의 돌연변이체 클론에 대한 Fab 반응성을 모의-형질감염된 대조군으로부터의 시그널을 삭감하고, 야생형 SIRPA 형질감염된 대조군으로부터의 시그널에 대해 정규화함으로써 계산한다.

[0315] 라이브러리 클론 내의 돌연변이된 잔기는 이들이 시험 Fab의 반응성을 뒷받침하지 않지만, 상업적으로 입수가능한 참조 항체, MAB4546 (알앤디 시스템즈(R&D Systems)), 또는 추가적인 항-SIRPA Fab의 반응성을 뒷받침하는 경우, Fab 결합 에피토프에 "중요한" 것으로서 확인된다. 이 반대-스크린 전략은 국소적으로 미스폴딩되거나 발현 결함을 갖는 SIRPA 돌연변이체의 배제를 용이하게 한다.

[0316] 실시예 14: 항-SIRPA 항체에 의한 FcγRIIB 하향조절

[0317] 관심의 표적 항원에 추가적으로, 골수 계통의 세포는 또한 치료 항체의 Fc 도메인에 결합할 수 있는 다수의 Fc

수용체를 발현한다. FcɣR 수용체 (FcɣR)는 Fc-의존적 이펙터 기능을 매개하는 가장 우수하게 특징화되고 가장 강력한 수용체 부류를 구성한다. FcɣR은 ITAM-연관된 활성화 수용체 (FcɣRI, FcɣRIIA, 및 FcɣRIIIA) 및 ITIM-함유 억제성 수용체 (FcɣRIIB) 둘 다를 포함하며, 동일한 세포 상의 활성화/억제성 수용체의 공동-발현은 세포 활성화에 대한 역치를 확립한다. 일반적으로, 면역 복합체에 의한 활성화 FcɣR의 라이게이션은 세포 활성화 및 후속의 이펙터 기능의 유도를 초래하는 몇몇 시그널링 캐스케이드를 개시한다. 이들 활성은 골수 세포 유형 사이에 다양하지만, 항체-의존적 세포성 세포독성, 항체-의존적 세포성 포식작용, 및 몇몇 전염증성 시토카인 및 케모카인의 상향조절 등을 포함할 수 있다. 대조적으로, 면역 복합체에 의한 억제성 수용체, FcɣRIIB의 라이게이션은 조직 항성성의 유지를 뒷받침하는 활성화 FcɣR의 면역자극성 시그널을 상쇄시킨다. 예를 들어, 몇몇 연구는 FcɣRIIB의 유전적 녹아웃이 면역 복합체-매개된 염증의 뮤린 모델에서 증진된 전염증성 대식세포 활성을 초래함을 입증한다. FcɣRIIB는 억제 활성을 갖는 유일한 FcɣR이기 때문에, 이는 골수 세포에 의한 FcɣR-매개된 염증을 조절하는데 있어서 중추적 역할을 한다. 종양 미세환경의 맥락에서, FcɣRIIB 발현 수준은 종양-연관된 대식세포의 극성 상태 및 생체내에서 대식세포 이펙터 기능의 조절을 결정할 수 있다.

[0318] FcɣR이 항-SIRPA 항체의 시험관내 활성에 참여하는지 여부를 평가하기 위해, 항체 3F9를 엔도S (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))로 처리하여 Fc-연결된 글리칸을 제거하였다. 효소 반응은 Fc 글리칸 상의 만노스 잔기를 검출하는 **도 15a**에서 LCA 블롯에 의해 제시된 바와 같은 탄수화물 구조를 완전히 절단하였다. 중요하게는, 탈글리코실화 반응은 3F9 및 탈글리코실화된 3F9 둘 다가 세포-기반 결합 검정에서 필적하게 SIRPA에 결합하였기 때문에, 항원 인식에 영향을 미치지 않았다 (**도 15b**). 이어서, 1차 인간 대식세포 (huMac) 상의 SIRPA의 세포 표면 발현을 감소시키는 탈글리코실화된 3F9의 능력을 글리코실화된 3F9와 비교하였다. 간략하게, 인간 단핵구를 2명의 건강한 공여자 (HD 1 및 HD 2)의 말초 혈액으로부터 단리하고, 시험관내에서 대식세포로 분화시켰다. 분화 후, 10^5개의 huMac를 수확하고, 증가하는 농도의 항-SIRPA 항체를 갖는 96-웰 조직 배양 플레이트 상으로 시딩하였다. 세포를 밤샘 인큐베이션 후 유동 세포측정에 의해 SIRPA 표면 발현에 대해 분석하였다. 수용체 발현을 9C2 및 3F9와는 별개의 에피토프 빈에 속하는 다이라이트650-접합된 항-인간 SIRPA 항체를 사용하여 검출하였다.

[0319] **도 16**에 제시된 바와 같이, 3F9의 둘 다의 글리코형은 이소형 대조군-처리된 대식세포에 비해 SIRPA의 표면 발현을 유의하게 하향조절하였다. 그러나, 둘 다의 공여자에서, 탈글리코실화된 3F9 변이체는 글리코실화된 항체에 비해 부분적으로 감소된 활성을 나타내었다. 예를 들어, 3F9는 HD 1 및 HD 2에서 SIRPA 발현을 각각 90% 및 85%만큼 많이 하향조절한 반면; 탈글리코실화된 3F9는 동일한 공여자 대식세포에서 단지 각각 70% 및 75% 수용체 하향조절을 달성하였다. 이 발견은 항-SIRPA 항체, 예컨대 3F9가 최대 활성을 위해 FcɣR 결속을 필요로 함을 시사한다.

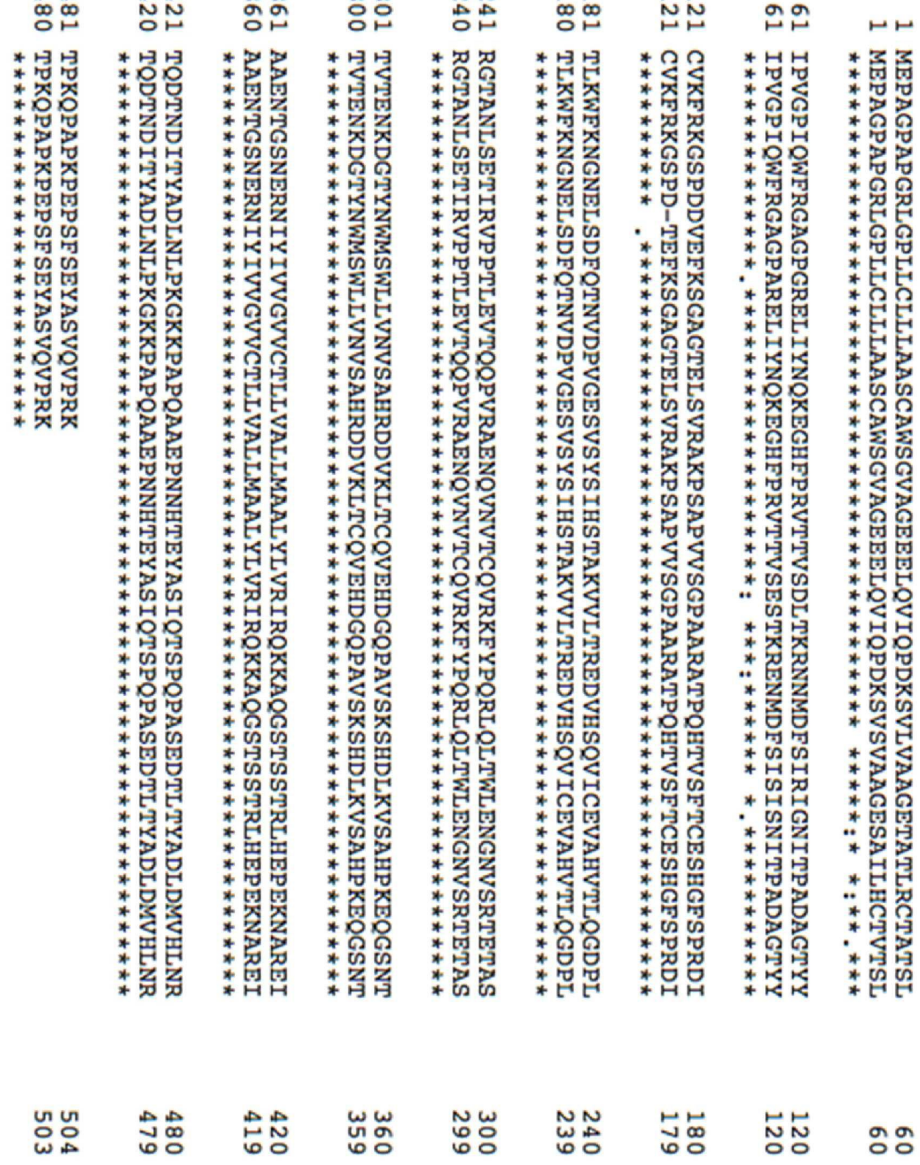
[0320] 어느 FcɣR이 3F9의 시험관내 활성에 기여하는지를 결정하기 위해, 2명의 건강한 공여자로부터 얻어진 단핵구-유래된 대식세포를 이소형 대조군 항체 또는 항-SIRPA 항체, 3F9 중 어느 하나로 밤새 처리하고, FcɣRIIIA (CD16) 및 FcɣRIIA/B (CD32A/B)의 표면 발현 수준에 대해 평가하였다. **도 17a**에 제시된 바와 같이, 3F9 처리는 이소형 대조군-처리된 대식세포에 비해 FcɣRIIIA의 표면 발현을 중간정도로 감소시켰다. 대조적으로, FcɣRIIA/B의 실질적인 하향조절은 이소형 대조군-처리된 세포에 비해 3F9-처리된 대식세포에 대해 명백하였다 (**도 17b**).

[0321] FcɣRII (클론 FUN-2; 바이오레전드)의 표면 수준을 측정하는데 사용되는 검출 항체는 활성화 수용체 (FcɣRIIA)를 억제성 수용체 (FcɣRIIB)로부터 구별하지 않기 때문에, 이 검정을 수용체-특이적 항체로 반복하였다. 이전에 기재된 바와 같이, 2명의 건강한 공여자로부터 얻어진 단핵구-유래된 대식세포를 이소형 대조군 항체 또는 지시된 3F9의 글리코형 중 어느 하나로 밤새 처리하였다. **도 18**은 3F9가 이소형 대조군-처리된 세포에 비해 대식세포에서 FcɣRIIA를 ~70-85% 유의하게 하향조절하였음을 제시한다. 이 효과는 항체의 탈글리코실화가 수용체 하향조절을 무효화하기 때문에 Fc 도메인에 의존적이었다. 그러나, FcɣRIIB의 표면 발현을 평가하는 경우, 3F9 처리는 이소형 대조군-처리된 대식세포에 비해 억제성 수용체의 발현을 거의 비검출가능한 수준으로 감소시켰다 (**도 18**). 심지어 3F9의 탈글리코실화된 형태는 FcɣRIIB의 강건한 하향조절을 나타내었으며, 이는 3F9의 뮤린 IgG1 이소형이 인간 FcɣRIIB와 우선적으로 회합할 수 있음을 시사한다. 이론에 구애되지는 않지만, 하향조절을 위한 2가지 ITIM-함유 수용체 (SIRPA 및 FcɣRIIB)를 표적화함으로써, 3F9는 대식세포를 활성화된 표현형을 향해 극성화할 수 있다. 종양 생물학의 맥락에서, 종양전 표현형으로부터 항-SIRPA 항체를 갖는 항-종양 표현형을 향한 종양 미세환경에서의 종양-연관된 대식세포의 재프로그래밍은 따라서 암 면역요법의 유망한 방식을 나타낸다.

[0322] 본 명세서에 인용된 모든 특허, 특허 출원, 수탁 번호, 및 다른 공개된 참고 문헌은 그의 관련성에 있어서 그들이 본원에 인용된 요지의 그들의 개시내용에 대해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

도면

도면1a



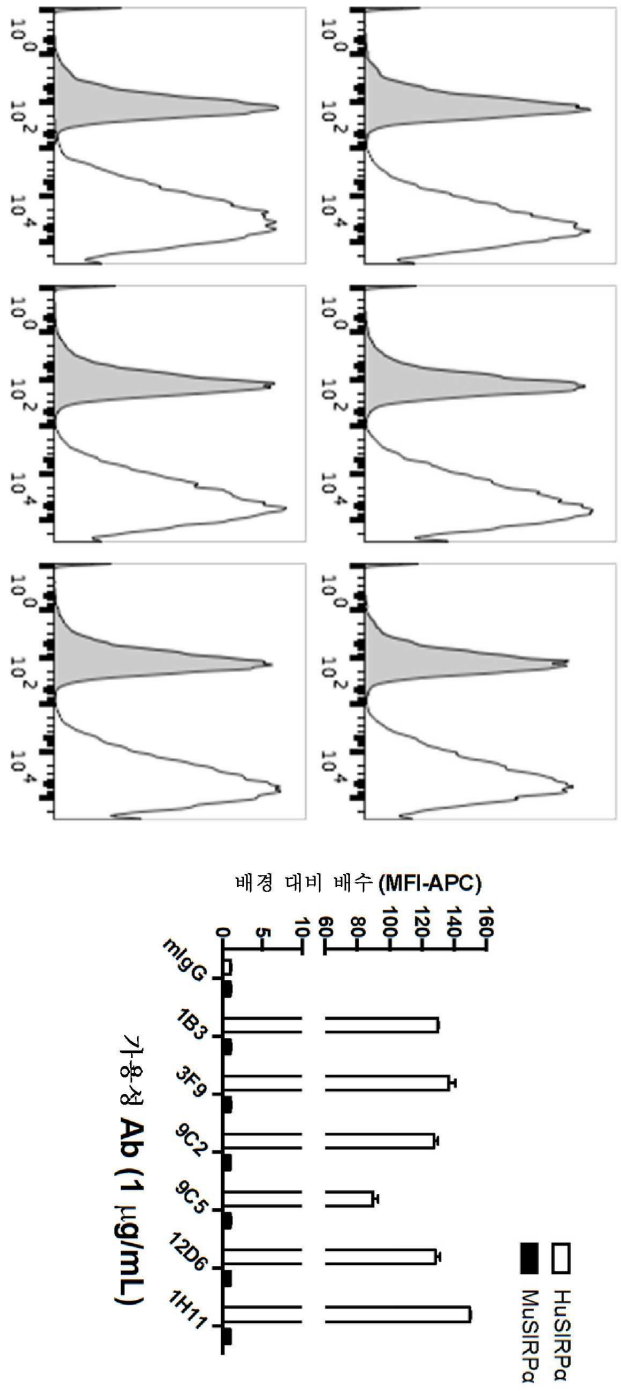
도면1b

```
MEPAGPAPGRLGPLLCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSL 60
MPVPASWPHLPSPFL-LMTLLLGRLTGVAGEDELQVIQPEKSVSVAAGESATLRCAMTSL 59
*   .  *   .*:* *:       :*****:*******:*** *****:*****: ***

IPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYY 120
IPVGPIMWFRGAGAGRELIYNQKEGHFPRVTTVSELTKRNNLDFSISISNITPADAGTYY 119
****** ****** ********************:******:**** *.***********

CVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPRDI 180
CVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAVRATPEHTVSFTCESHGFSPRDI 179
************************************.****:*****************

TLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTREDVHSQVICEVAHVTLQGDPL 240
TLKWFKNGNELSDFQTNVDPAGDSVSYSIHSTARVVLTRGDVHSQVICEIAHITLQGDPL 239
*******************.*:**********:***** *********:**:*******

RGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSRTETAS 300
RGTANLSEAIRVPPTLEVTQQPMRAENQANVTCQVSNFYPRGLQLTWLENGNVSRTETAS 299
********:*************:*****.****** :***: ******************

TVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVSAHPKEQGSNT 360
TLIENKDGTYNWMSWLLVNTCAHRDDVVLTCQVEHDGQQAVSKSYALEISAHQKEHGSDI 359
*: ****************..****** ********** *****: *::*** **:**:

AAENTGSNERNIYIVVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREI 420
THEAALAPTAPLLVALLLGPKLLLVVGVSAIYICWKQKA---------------------- 398
: * : :    : :.: :  .**:.: ::*:*:   ::

TQDTNDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQPASEDTLTYADLDMVHLNR 480
------------------------------------------------------------


TPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK 504
-------------------------
```

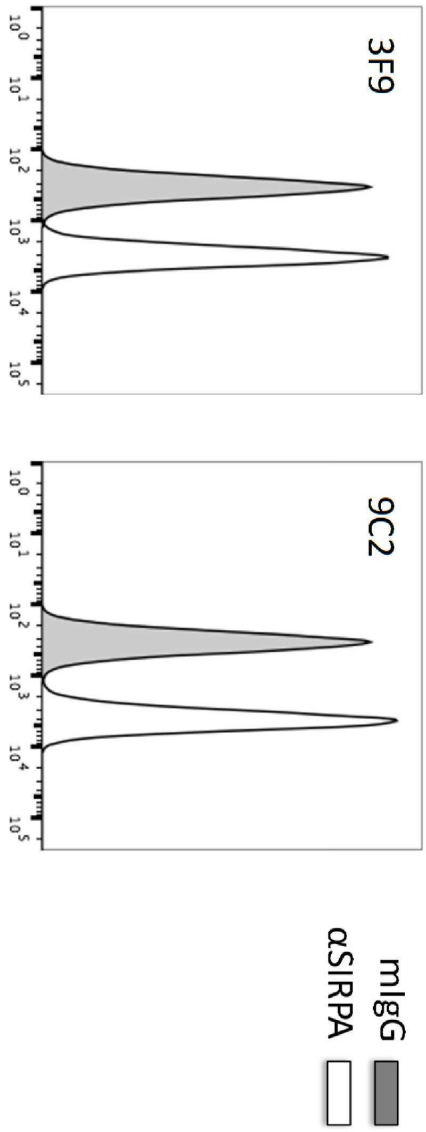
도면2

1 MEPAGPAPGRLGPL-LCLLLAASCAWSGVAGEEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATS 59
1 MEPAGPAPGRLGPLLLCLLLSASCFCTGATG-KELKVTQPEKSVSVAAGDSTVLNCTLTS 59
60 LIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTY 119
60 LLPVGPIRWYRGVGPSRLLIYSFAGEYVPRIRNVSDTTKRNNMDFSIRISNVTPADAGIY 119
120 YCVKFRKGSP-DDVEFKSGAGTELSVRAKPSAPVVSGPAARATPQHTVSFTCESHGFSPR 178
120 YCVKFQKGSSEPDTEIQSGGGTEVYVLAKPSPPEVSGPADRGIPDQKVNFTCKSHGFSPR 179
179 DITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAKVVLTREDVHSQVICEVAHVTLQGD 238
180 NITLKWFKDGQELHPLETTVNPSGKNVSYNISSTVRVVLNSMDVNSKVICEVAHITLDRS 239
239 PLRGTANLSETIRVPPTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSRTET 298
240 PLRGIANLSNFIRVSPTVKVTQQSPTSMNQVNLTCRAERFYPEDLQLIWLENGNVSRNDT 299
299 ASTVTENKDGTYNWMSWLLVNVSAHRDDVKLTCQVEHDGQPAVSKSHDLKVSAHPKEQGS 358
300 PKNLTKNTDGTYNYTSLFLVNSSAHREDVVFTCQVKHDQQPALTRNHTVLGFAHSSDQGS 359
359 NT-AAENTGSNERNIYIVVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNA 417
360 MQTFPDNNATHNWNVFIGVGVACALLVVLLMAALYLLRIKQKKAKGSTSSTRLHEPEKNA 419
418 REITQ----DTNDITYADLNLPKGKKPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPQPASEDTLTYAD 472
420 REITQIQDTNDINDITYADLNLPKEKKPAPRAPEPNNHTEYASIETGKVPRPEDTLTYAD 479
473 LDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK 504
480 LDMVHLSRA--QPAPKPEPSFSEYASVQVQRK 509

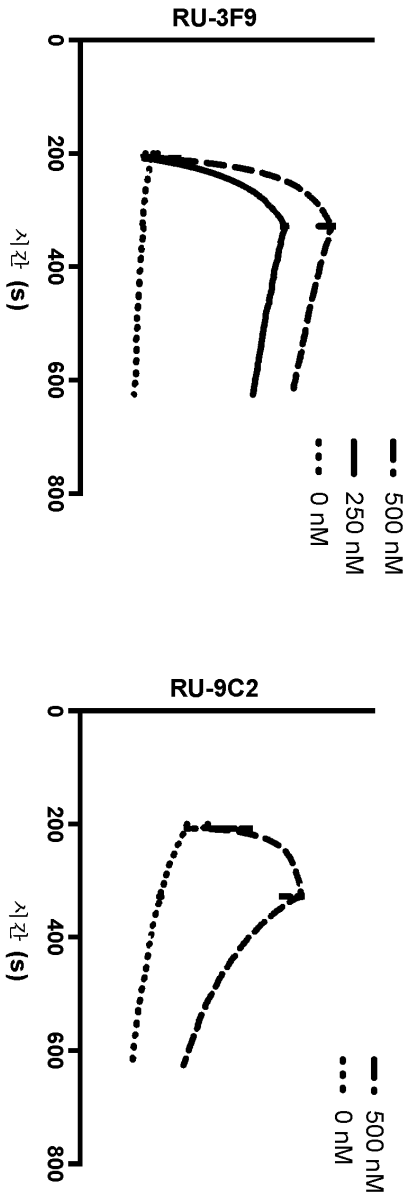
도면3a


배경 대비 배수 (MFI-APC)
0
5
10
60
80
100
120
140
160
mIgG
1B3
3F9
9C2
9C5
12D6
1H11
가용성 Ab (1 μg/mL)
HuSIRPα
MuSIRPα

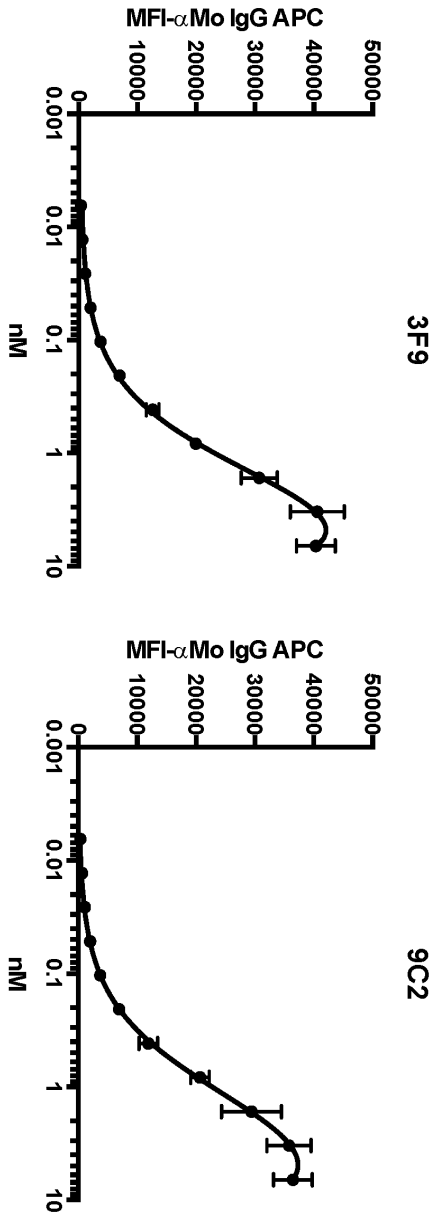
도면3b



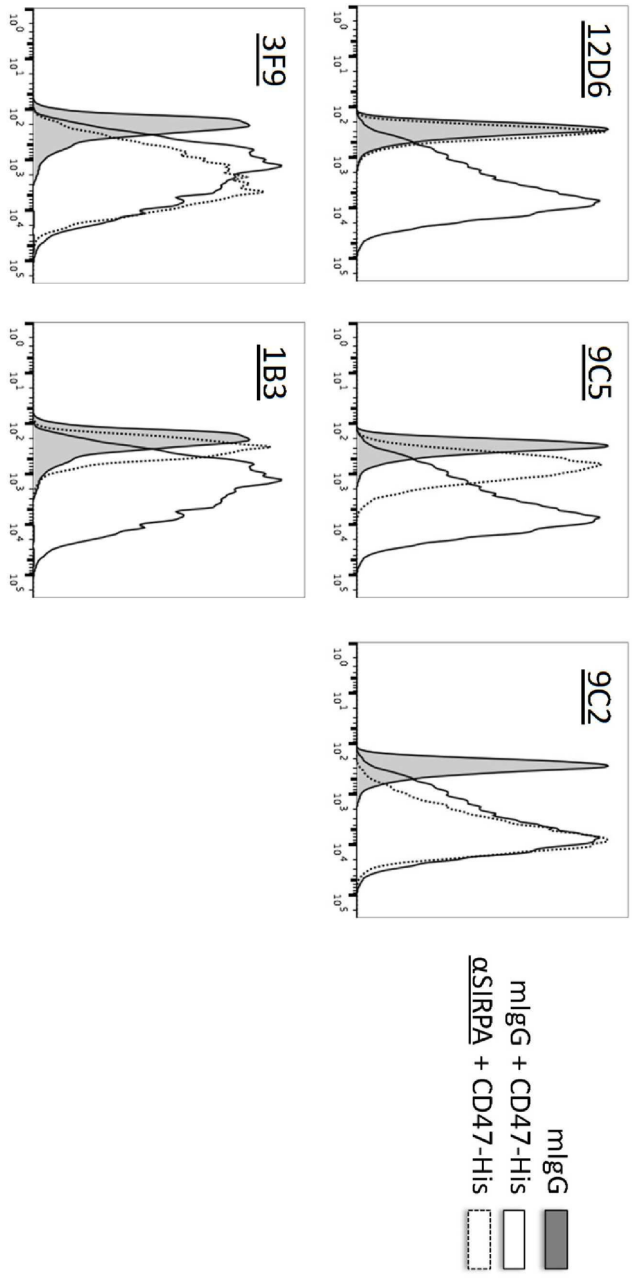
도면3c


RU-3F9
0
200
400
600
800
시간 (s)
0 nM
250 nM
500 nM
RU-9C2
0
200
400
600
800
시간 (s)
0 nM
500 nM

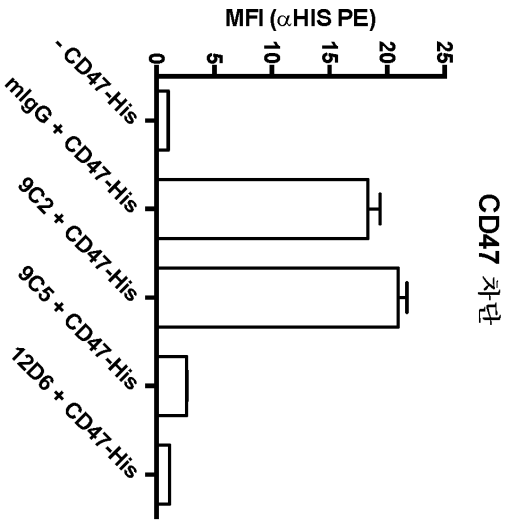
도면3d

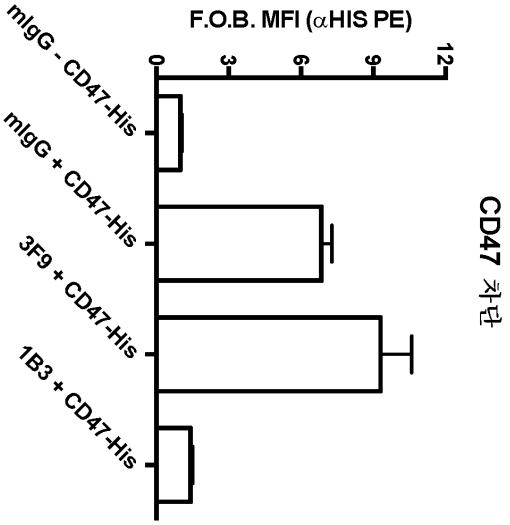

MFI-αMo IgG APC
0
10000
20000
30000
40000
50000
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
3F9
MFI-αMo IgG APC
0
10000
20000
30000
40000
50000
0.001
0.01
0.1
1
10
nM
9C2

도면4a

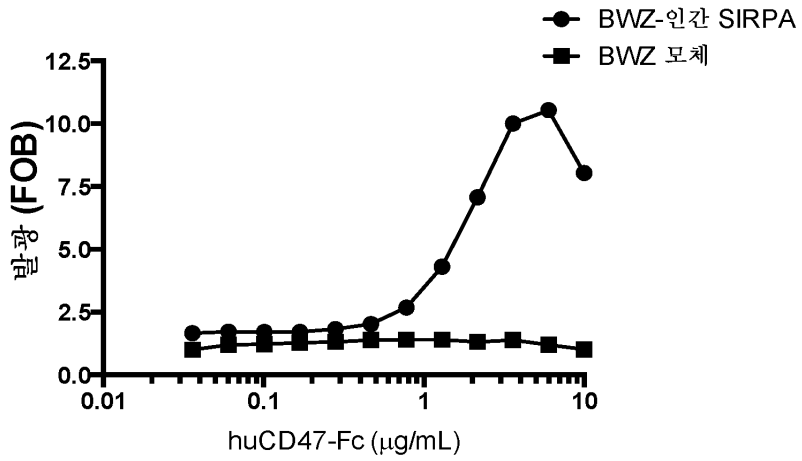


도면4b

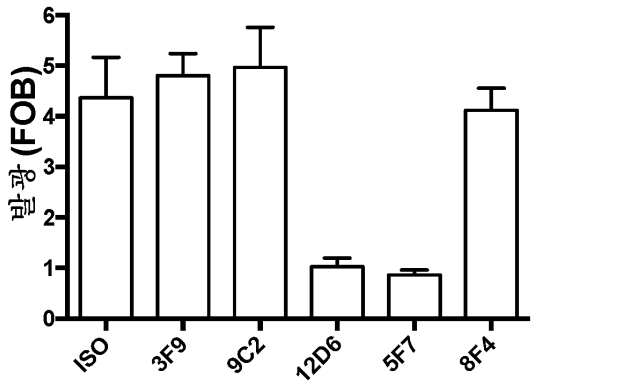

MFI (αHIS PE)
0
5
10
15
20
25
- CD47-His
mIgG + CD47-His
9C2 + CD47-His
9C5 + CD47-His
12D6 + CD47-His
CD47 차단

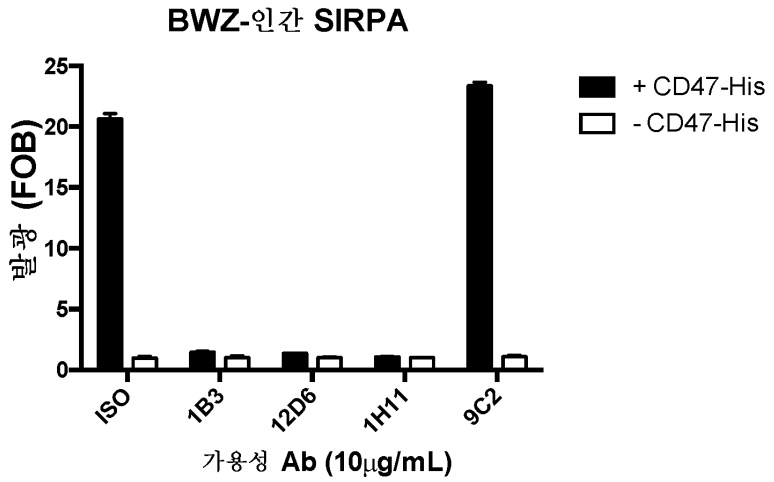

F.O.B. MFI (αHIS PE)
0
3
6
9
12
mIgG - CD47-His
mIgG + CD47-His
3F9 + CD47-His
1B3 + CD47-His
CD47 차단

도면5a

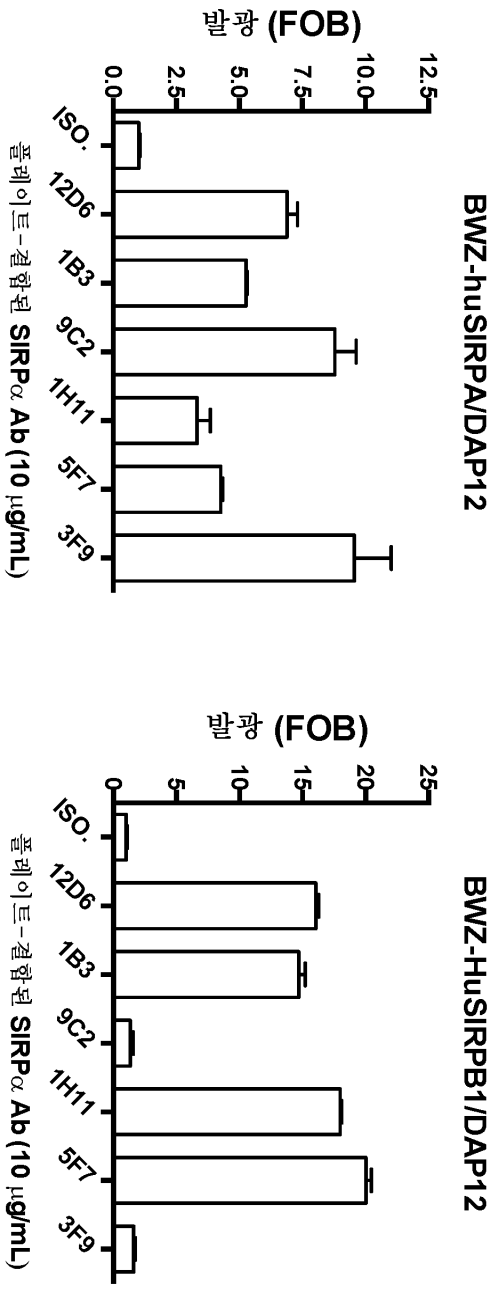

BWZ-인간 SIRPA
BWZ 모체
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
형광 (FOB)
0.01
0.1
1
10
huCD47-Fc (μg/mL)

도면5b

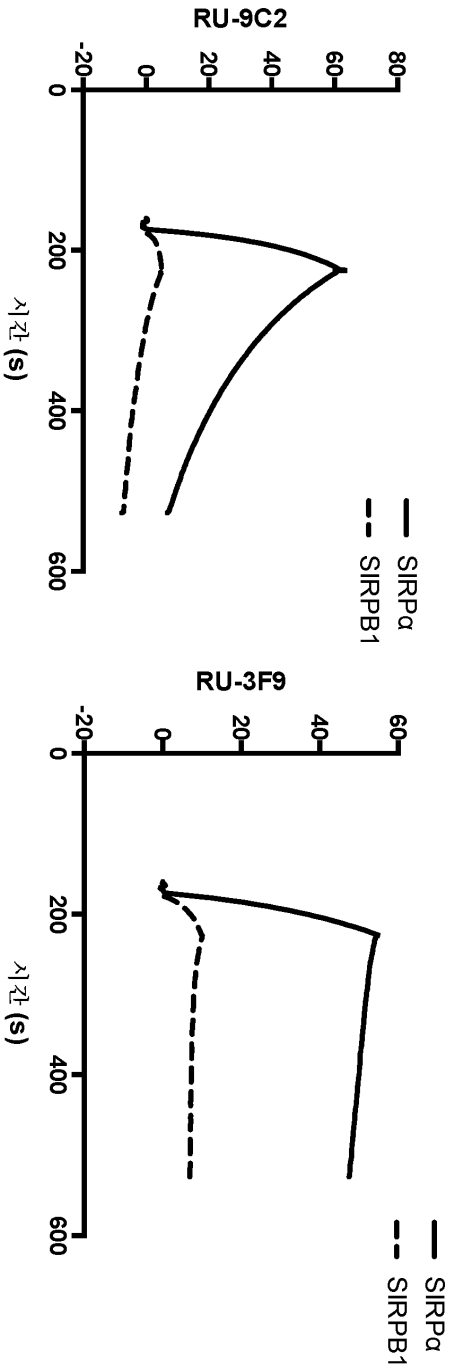

6
5
4
3
2
1
0
형광 (FOB)
ISO
3F9
9C2
12D6
5F7
8F4
가용성 항-SIRPα Ab + 플레이트-결합된 CD47-His


BWZ-인간 SIRPA
25
20
15
10
5
0
형광 (FOB)
+ CD47-His
- CD47-His
ISO
1B3
12D6
1H11
9C2
가용성 Ab (10μg/mL)

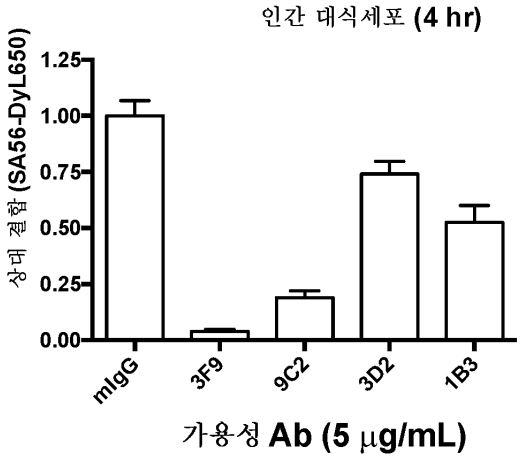
도면6a

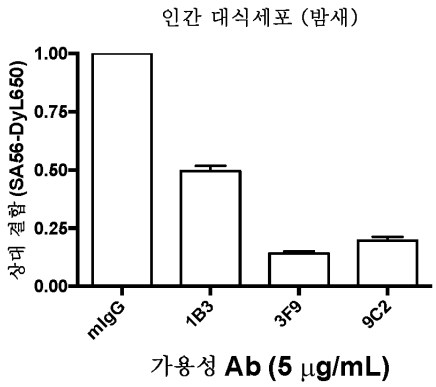

BWZ-huSIRPA/DAP12
발광 (FOB)
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
ISO.
12D6
1B3
9C2
1H11
5F7
3F9
플레이트-결합된 SIRPα Ab (10 μg/mL)
BWZ-HuSIRPB1/DAP12
발광 (FOB)
0
5
10
15
20
25
ISO.
12D6
1B3
9C2
1H11
5F7
3F9
플레이트-결합된 SIRPα Ab (10 μg/mL)

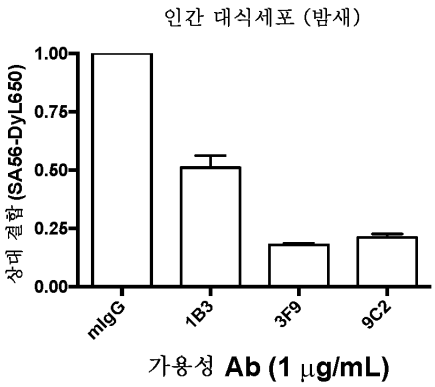
도면6b


RU-9C2
-20
0
20
40
60
80
0
200
400
600
시간 (s)
SIRPα
SIRPB1
RU-3F9
-20
0
20
40
60
0
200
400
600
시간 (s)
SIRPα
SIRPB1

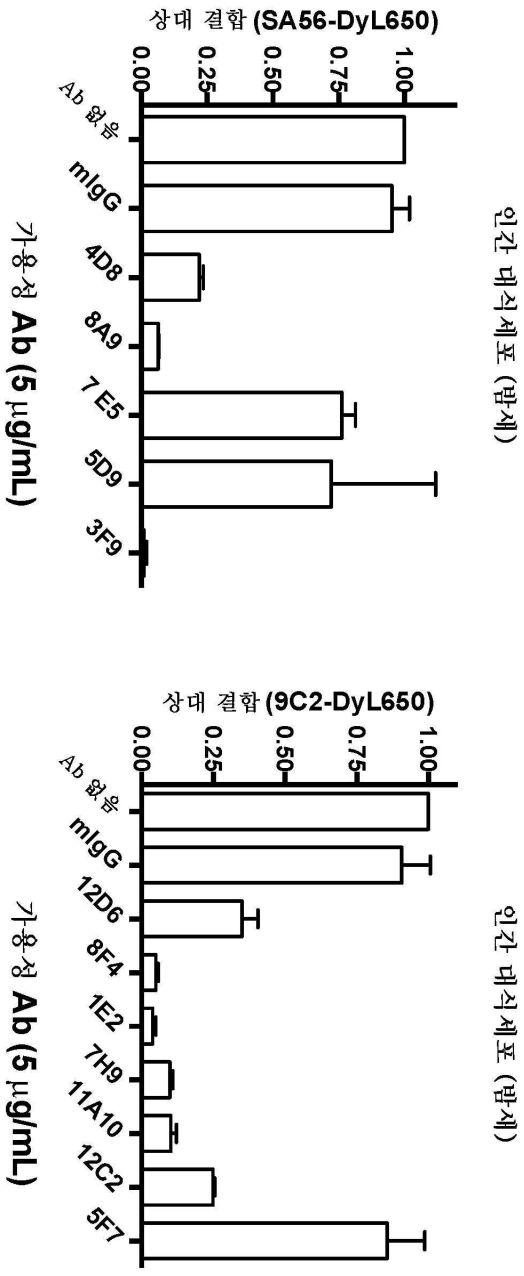
도면7a


인간 대식세포 (4 hr)
상대 결합 (SA56-DyL650)
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
mIgG
3F9
9C2
3D2
1B3
가용성 Ab (5 μg/mL)

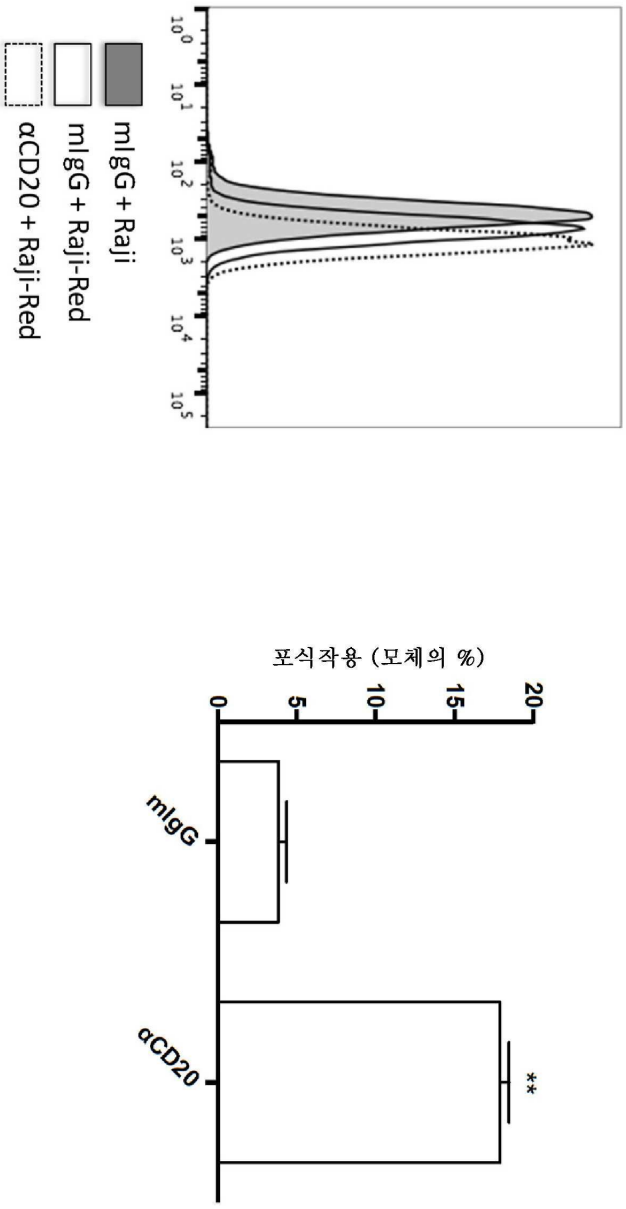

인간 대식세포 (밤새)
상대 결합 (SA56-DyL650)
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
mIgG
1B3
3F9
9C2
가용성 Ab (5 μg/mL)


인간 대식세포 (밤새)
상대 결합 (SA56-DyL650)
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
mIgG
1B3
3F9
9C2
가용성 Ab (1 μg/mL)

도면7b

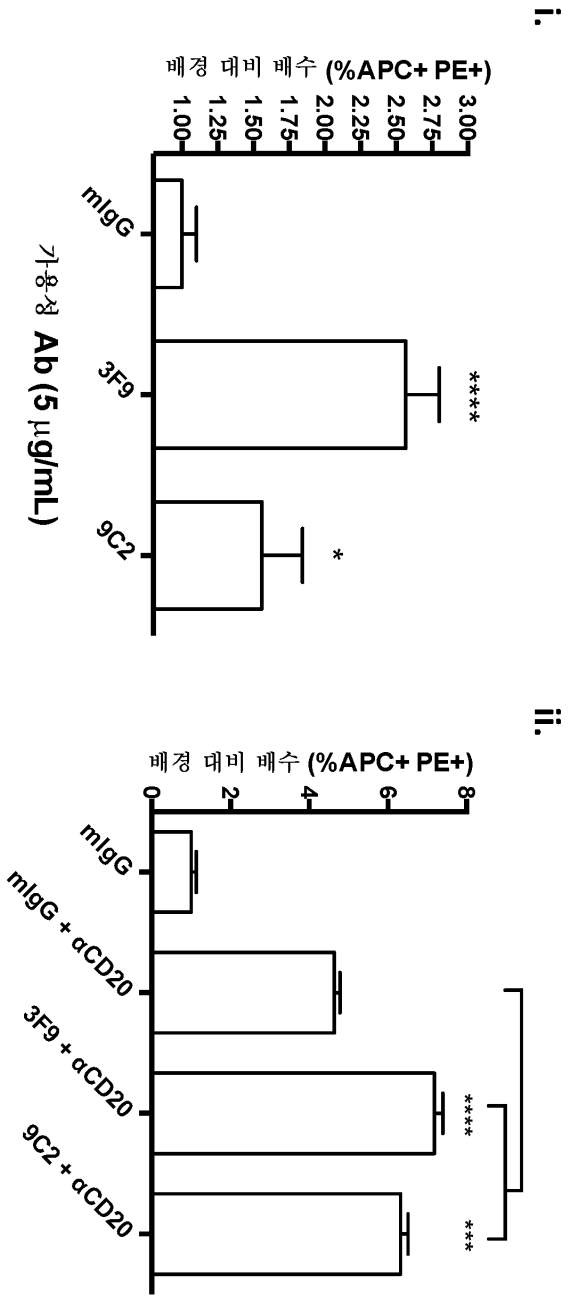

상대 결합 (SA56-DyL650)
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
Ab 없음
mIgG
4D8
8A9
7E5
5D9
3F9
가용성 Ab (5 μg/mL)
인간 대식세포 (밥세)
상대 결합 (9C2-DyL650)
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
Ab 없음
mIgG
12D6
8F4
1E2
7H9
11A10
12C2
5F7
가용성 Ab (5 μg/mL)
인간 대식세포 (밥세)

도면8a

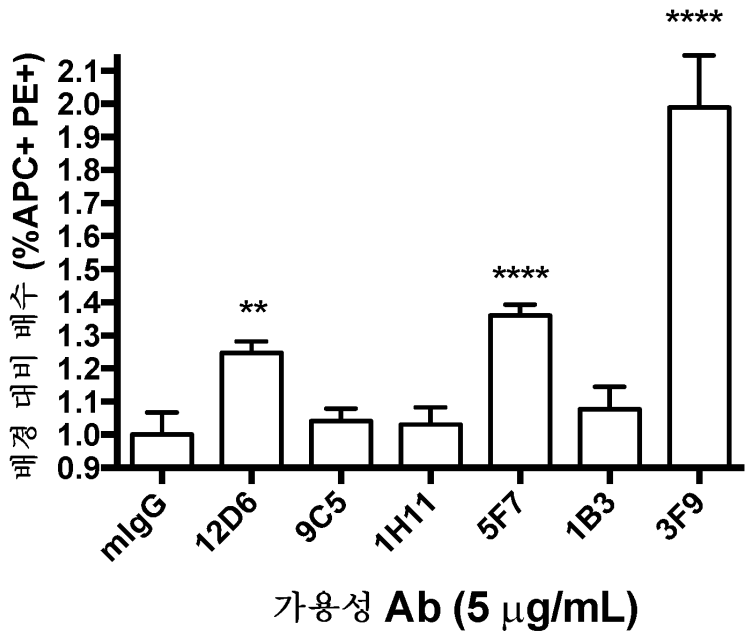


CD20을 갖는 phrodo-표지된 Raji 세포의 증진된 포식작용

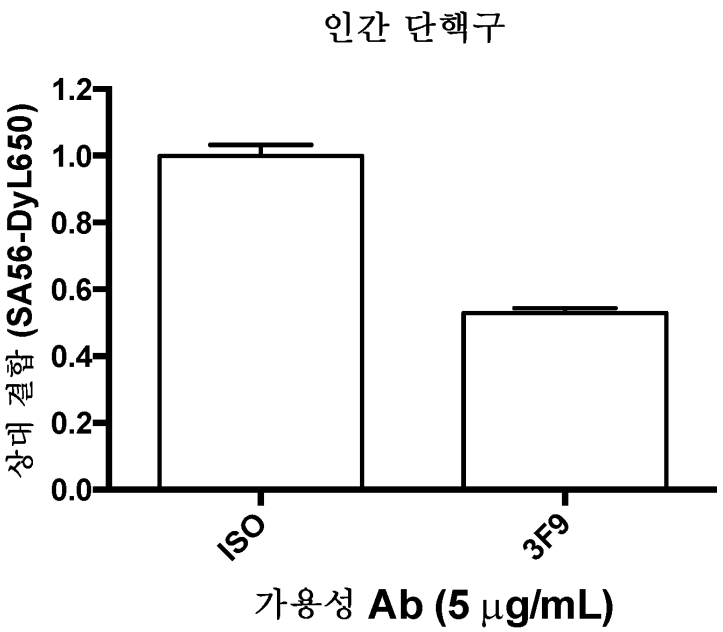
도면8b


i.
배경 대비 배수 (%APC+ PE+)
1.00
1.25
1.50
1.75
2.00
2.25
2.50
2.75
3.00
가용성 Ab (5 μg/mL)
mIgG
3F9
9C2
****
*
ii.
배경 대비 배수 (%APC+ PE+)
0
2
4
6
8
mIgG
mIgG + αCD20
3F9 + αCD20
9C2 + αCD20
****
***

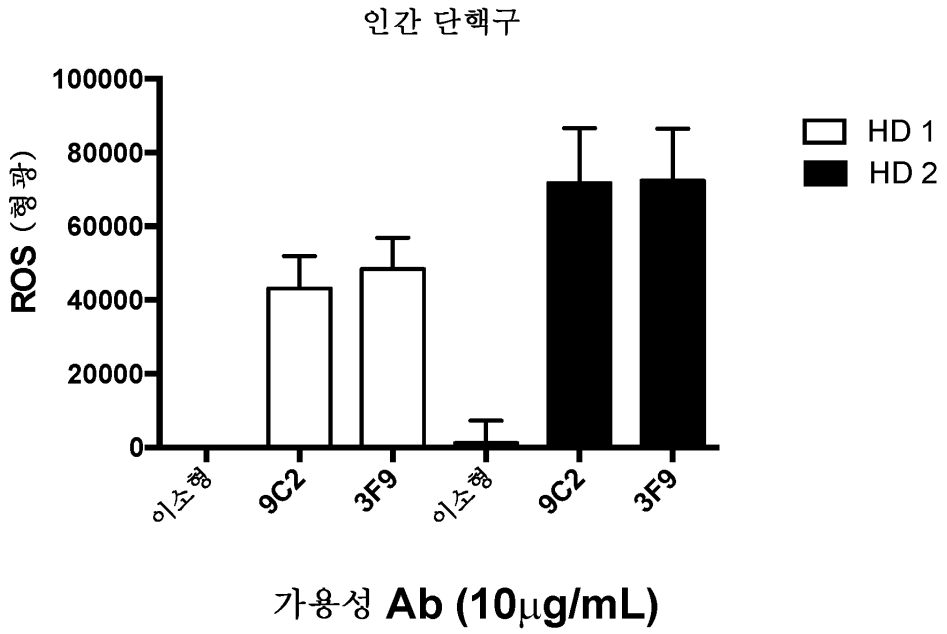
도면8c


****
**
****
배경 대비 배수 (%APC+ PE+)
2.1
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
mIgG
12D6
9C5
1H11
5F7
1B3
3F9
가용성 Ab (5 μg/mL)

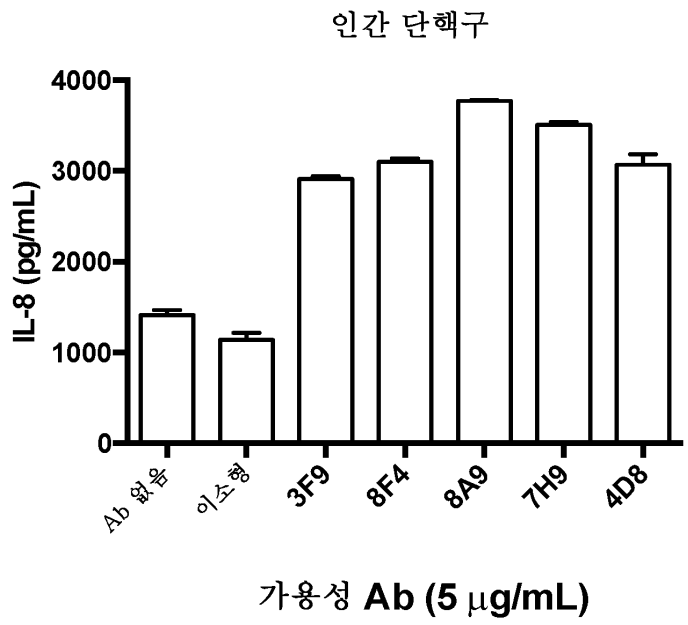
도면9a


인간 단핵구
상대 결합 (SA56-DyL650)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
ISO
3F9
가용성 Ab (5 μg/mL)

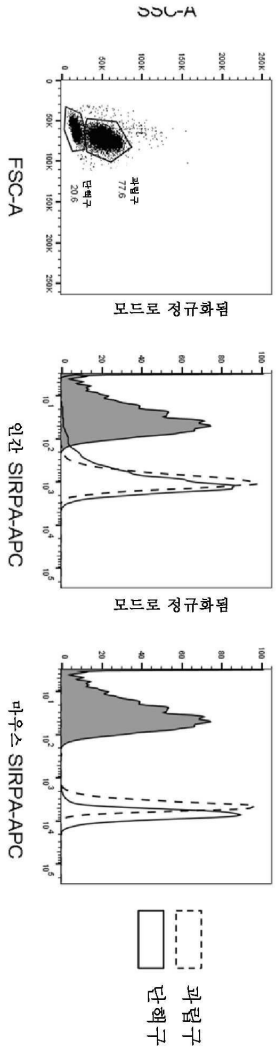
도면9b


인간 단핵구
ROS (형광)
100000
80000
60000
40000
20000
0
이소형
9C2
3F9
이소형
9C2
3F9
HD 1
HD 2
가용성 Ab (10μg/mL)

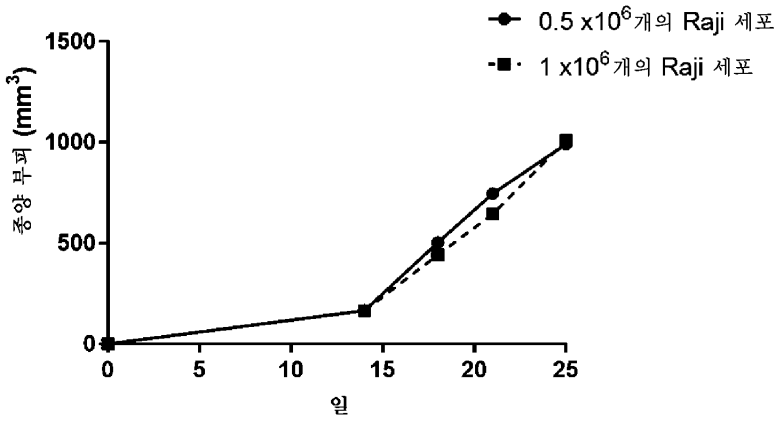
도면9c


인간 단핵구
IL-8 (pg/mL)
4000
3000
2000
1000
0
Ab 없음
이소형
3F9
8F4
8A9
7H9
4D8
가용성 Ab (5 μg/mL)

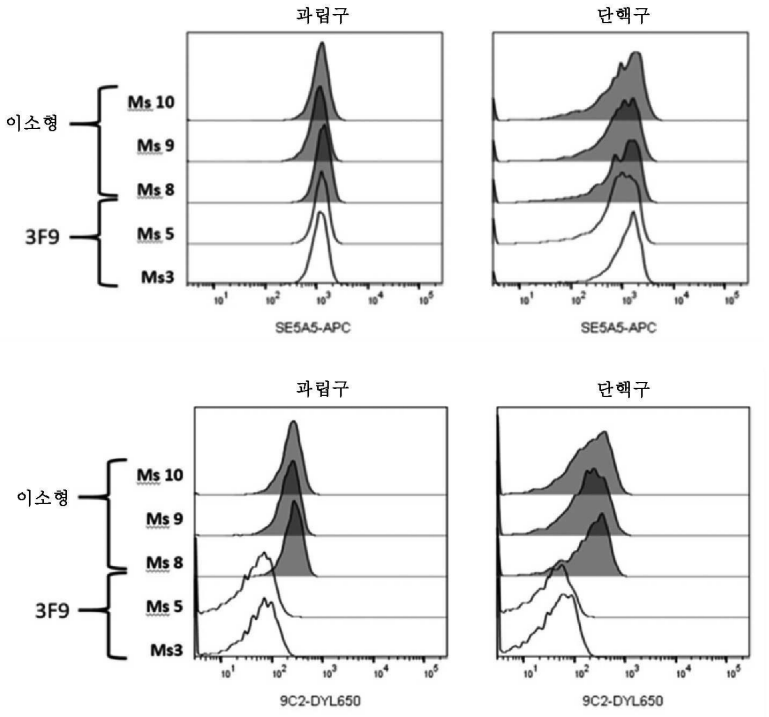
도면10a


SSC-A
FSC-A
모드로 정규화됨
인간 SIRPA-APC
모드로 정규화됨
마우스 SIRPA-APC
단핵구
과립구

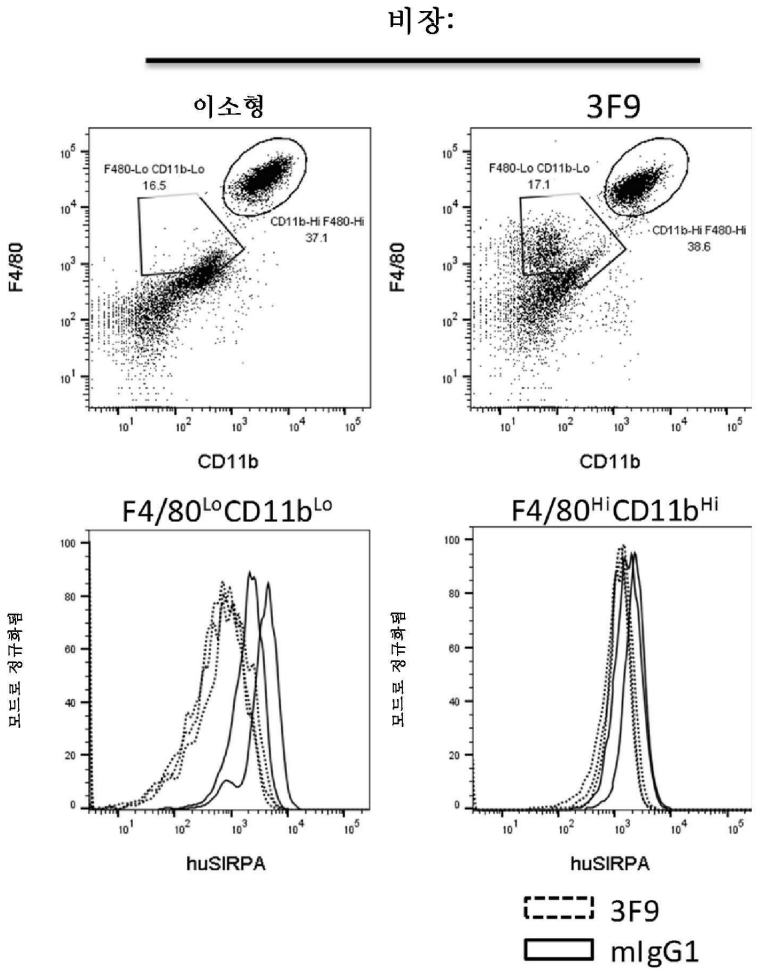
도면10b


0.5 x10^6개의 Raji 세포
1 x10^6개의 Raji 세포
종양 부피 (mm^3)
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
일

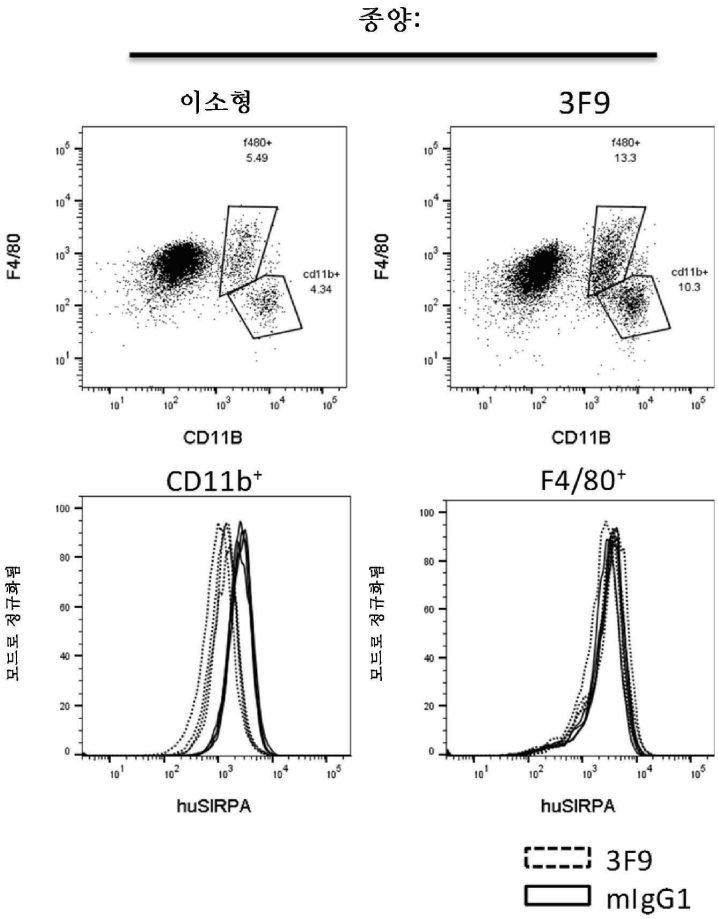
도면10c


과립구
단핵구
이소형
3F9
Ms 10
Ms 9
Ms 8
Ms 5
Ms3
SE5A5-APC
SE5A5-APC
과립구
단핵구
이소형
3F9
Ms 10
Ms 9
Ms 8
Ms 5
Ms3
9C2-DYL650
9C2-DYL650

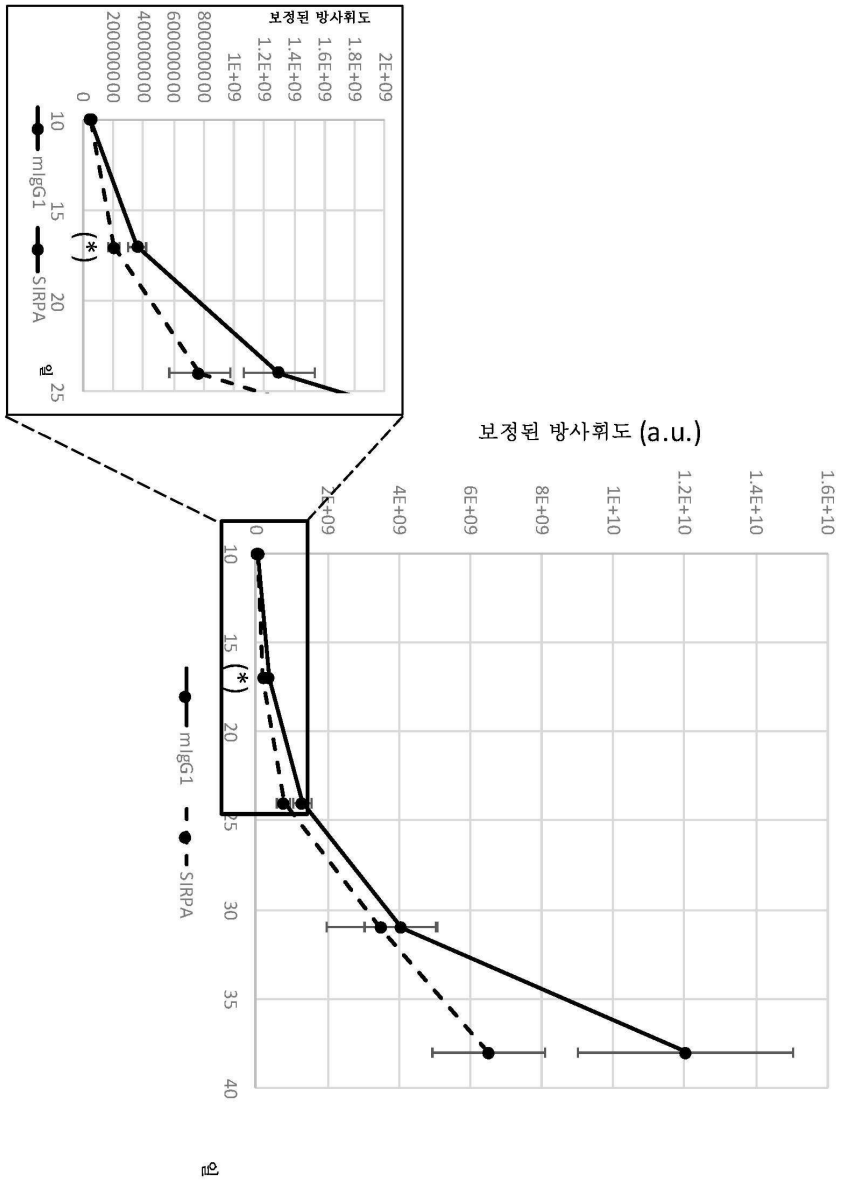
도면10d


비장:
이소형
3F9
F480-Lo CD11b-Lo
16.5
CD11b-Hi F480-Hi
37.1
F480-Lo CD11b-Lo
17.1
CD11b-Hi F480-Hi
38.6
F4/80
CD11b
F4/80LoCD11bLo
F4/80HiCD11bHi
모드로 정규화됨
huSIRPA
3F9
mIgG1

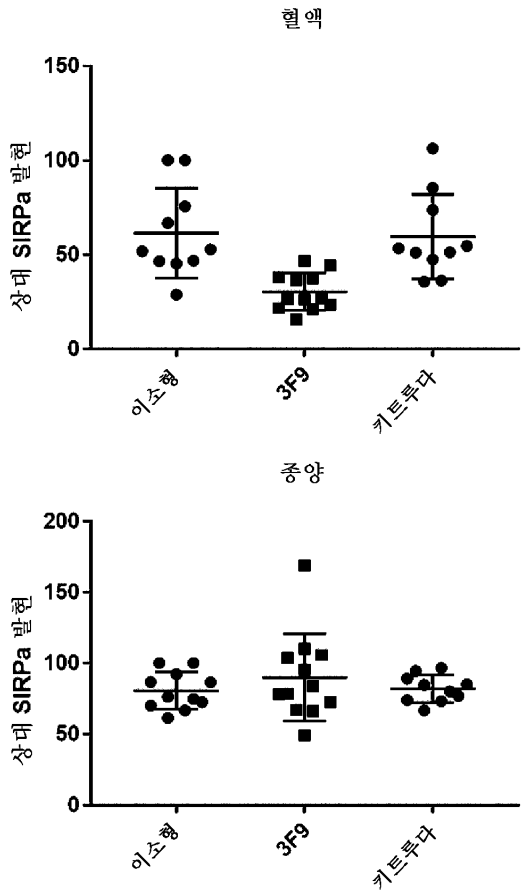
도면11a


종양:
이소형
3F9
f480+
5.49
cd11b+
4.34
f480+
13.3
cd11b+
10.3
F4/80
CD11B
CD11b+
F4/80+
모드로 정규화됨
huSIRPA
3F9
mIgG1

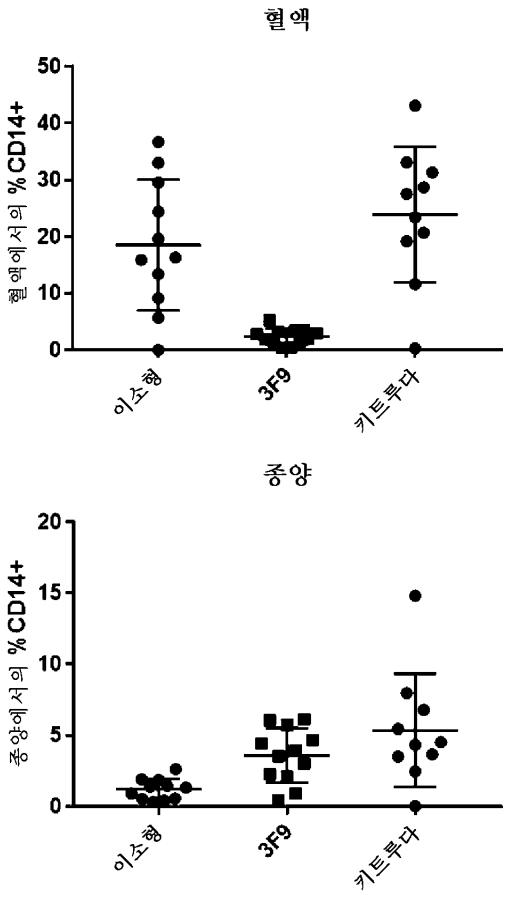
도면11b



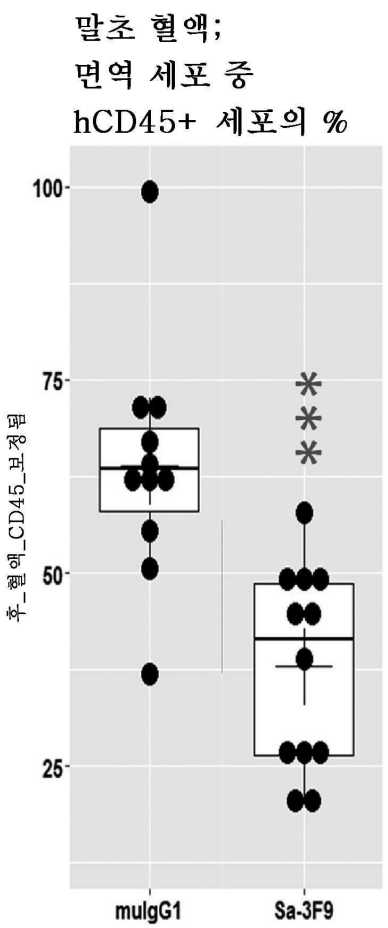
도면12a


혈액
상대 SIRPa 발현
150
100
50
0
이소형
3F9
키트루다
종양
상대 SIRPa 발현
200
150
100
50
0
이소형
3F9
키트루다

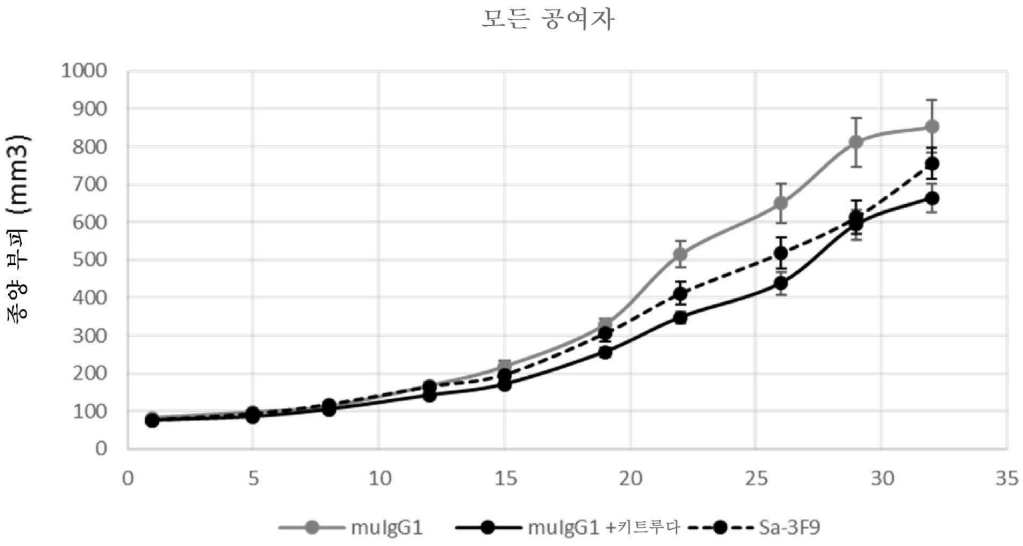
도면12b


혈액
혈액에서의 % CD14+
50
40
30
20
10
0
이소형
3F9
키트루다
종양
종양에서의 % CD14+
20
15
10
5
0
이소형
3F9
키트루다

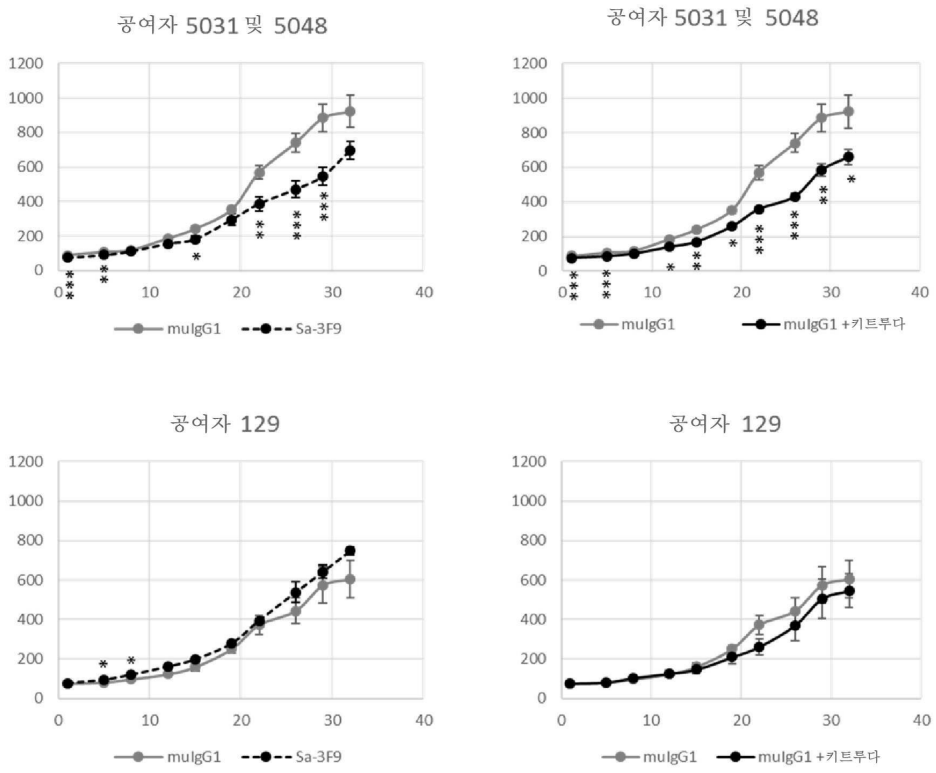
도면12c


말초 혈액;
면역 세포 중
hCD45+ 세포의 %
100
75
50
25
후_혈액_CD45_보정됨
muIgG1
Sa-3F9

도면13a


모든 공여자
종양 부피 (mm3)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
30
35
muIgG1
muIgG1 +키트루다
Sa-3F9

도면13b


공여자 5031 및 5048
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
muIgG1
Sa-3F9
공여자 5031 및 5048
muIgG1
muIgG1 +키트루다
공여자 129
muIgG1
Sa-3F9
공여자 129
muIgG1
muIgG1 +키트루다

IGHV3-23*01 수용자 프레임워크에 기초한 잠재적 인간화 서열 (AbM CDR 정의)

```
IGHV3-23*01 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG
            RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
연결 영역              IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS

seq                  10        20        30        40        50        60
AbM                  10        20        30        40        50  ab
                  b b b     p     p b b b   b b    b  bi i     i ibb  b
SB-3F9       EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS GFTFSSYAMS WVRQTPEKRLEWVA TISDYGGSYTY
               * *       *     *                   * * *    *
IGHV3-23*01  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVS AISG-SGGSTY
hSB-3F9-H1   EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVS TISDYGGSYTY
hSB-3F9-H2   EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVA TISDYGGSYTY


seq                  70        80        90        100       110       120
AbM          60        70        80  abc       90        100abcd       110
                  i  b    b b b x    b b b  b     bibibb               i   b b b
SB-3F9       YPDSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMSSLRSEDTALYYCAR PPYDDYYGGFAY WGQGTLVTVSA
                *             * *      *   *    *    *                      *
IGHV3-23*01  YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
hSB-3F9-H1   YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK PPYDDYYGGFAY WGQGTLVTVSS
hSB-3F9-H2   YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR PPYDDYYGGFAY WGQGTLVTVSS
              P                                 L
```

도면14a

도면14b

IGKV3-11*01 수용자 프레임워크에 기초한 잠재적 인간화 서열 (AbM CDR 정의)

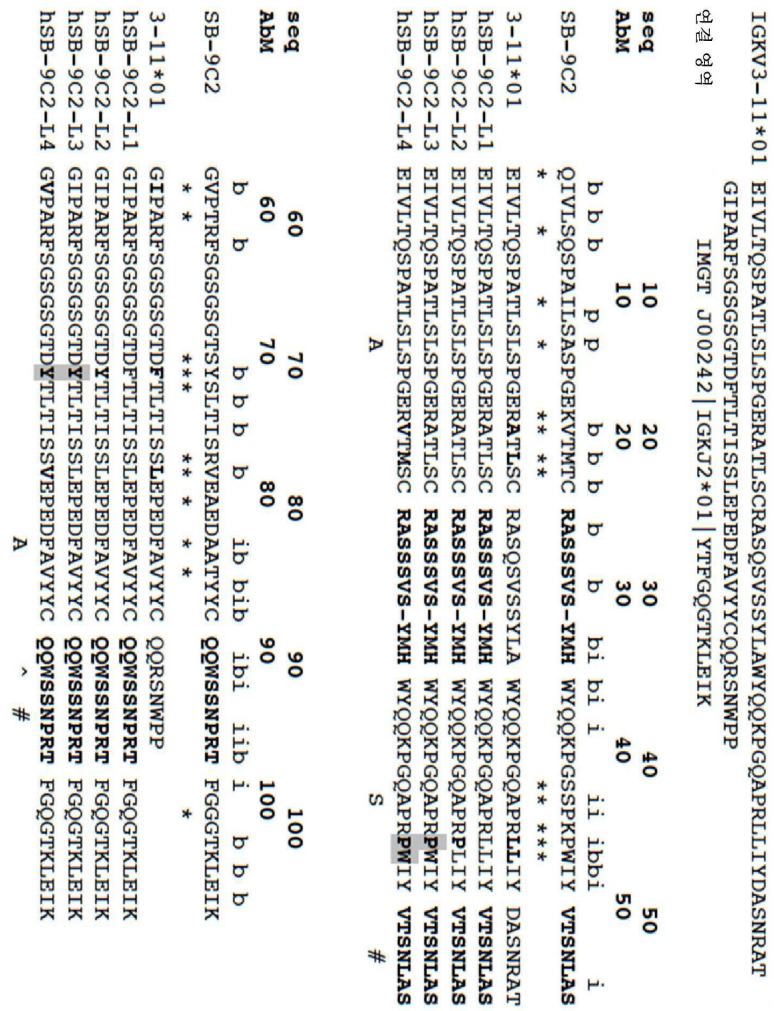
```
IGKV3-11*01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
            GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPP
연결 영역          IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGQGTKLEIK

seq                 10        20        30        40        50        60
AbM                 10        20        30abcd        40        50
            b b b    p p     b b b  b   b       bi bi i    ii ibbi      i
SB-3F9      DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC RASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQPPKLLIY LASNLES
            *        * ** * *   *                          * *
3-11*01     EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVS----SYLA WYQQKPGQAPRLLIY DASNRAT
hSB-3F9-L1  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQAPRLLIY LASNLES
hSB-3F9-L2  EIVLTQSPATLSLSPGERATISC RASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQAPRLLIY LASNLES
hSB-3F9-L3  EIVLTQSPATLSLSPGERATISC RASKSVSSSGYSYMH WYQQKPGQAPRLLIY LASNLES
                       V                                P          #

seq                 70        80        90        100       110
AbM           60        70        80        90        100
            b   b        b b b  b    ib bib  ibi  iib i   b b b
SB-3F9      GVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC QHNRELPCT FGGGTKLEIK
            *                * *** *  * *                *
3-11*01     GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQRSNWPP
hSB-3F9-L1  GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QHNRELPCT FGQGTKLEIK
hSB-3F9-L2  GVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYYC QHNRELPCT FGQGTKLEIK
hSB-3F9-L3  GVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFAVYYC QHNRELPST FGQGTKLEIK
                                     A        #    ^
```

도면14c

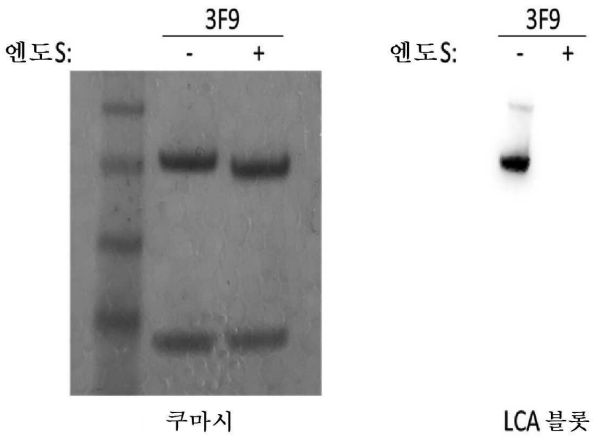
IGHV1-46*01 수용자 프레임워크에 기초한 잠재적 인간화 서열 (AbM CDR 정의)

```
IGHV1-46*01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQG
            RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
연결 영역          IMGT J00256|IGHJ4*01|YFDYWGQGTLVTVSS

seq                 10        20        30        40        50
AbM                 10        20        30        40        50  a
             b b b     p     p b b b   b b    b  bi i     i ibb  b
SB-9C2      EFQLQQSGAELVKPGASVKISCKAS GYSLTGYNMN WVKQSRGKSLEWIG NINPHYGSST
            **  *     **       *                 * ** **   *
IGHV1-46*01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMH WVRQAPGQGLEWMG IINPSGGSTS
hSB-9C2-H1  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYSLTGYNMN WVRQAPGQGLEWMG NINPHYGSST
hSB-9C2-H2  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYSLTGYNMN WVRQAPGQGLEWIG NINPHYGSST
hSB-9C2-H3  QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKAS GYSLTGYNMN WVRQAPGQGLEWIG NINPHYGSST
hSB-9C2-H4  QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKAS GYSLTGYNMN WVRQAPGQGLEWIG NINPHYGSST
             F         V                    #                  # #

seq        60        70        80        90        100        110
AbM         60        70        80  abc      90        100a        110
             i  b   b b b x    b b b  b     bibibb            i   b b b
SB-9C2      YNQNFKDKATLTVDKSSSAAYMQFNSLTSEDSAVYYCAR EGYDGVFDY WGQGTTLTVSS
             * * **** * * * * **  ***  *   *                      *
IGHV1-46*01 YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR
hSB-9C2-H1  YAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR EGYDGVFDY WGQGTLVTVSS
hSB-9C2-H2  YAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR EGYDGVFDY WGQGTLVTVSS
hSB-9C2-H3  YAQKFQGRATLTVDTSTSTAYMEFSSLRSEDTAVYYCAR EGYDGVFDY WGQGTLVTVSS
hSB-9C2-H4  YAQKFQGRATLTVDKSTSTAYMEFSSLRSEDTAVYYCAR EGYDGVFDY WGQGTLVTVSS
             N                                        @
```

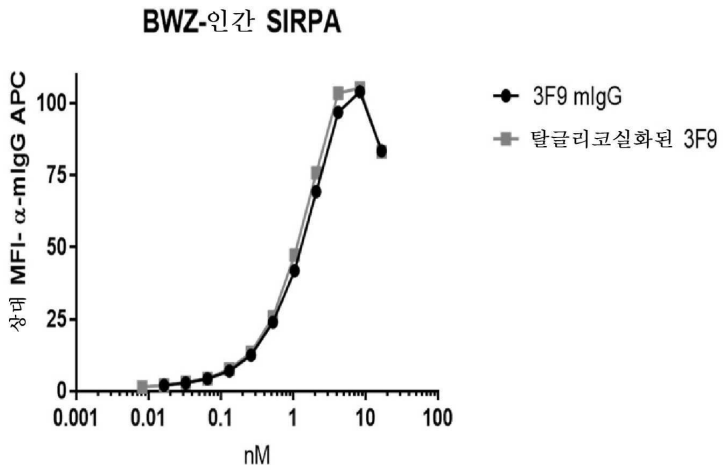
도면14d


IGKV3-11*01 수용자 프레임워크에 기초한 잠재적 인간화 서열 (AbM CDR 정의)
IGKV3-11*01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPP
언결 영역 IMGT J00242|IGKJ2*01|YTFGQGTKLEIK
seq 10 20 30 40 50
AbM 10 20 30 40 50
SB-9C2 QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTC RASSSVS-YMH WYQQKPGSSPKPWIY VTSNLAS
3-11*01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY DASNRAT
hSB-9C2-L1 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASSSVS-YMH WYQQKPGQAPRLLIY VTSNLAS
hSB-9C2-L2 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASSSVS-YMH WYQQKPGQAPRLIY VTSNLAS
hSB-9C2-L3 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASSSVS-YMH WYQQKPGQAPRPWIY VTSNLAS
hSB-9C2-L4 EIVLTQSPATLSLSPGERVTMSC RASSSVS-YMH WYQQKPGQAPRPWIY VTSNLAS
seq 60 70 80 90 100
AbM 60 70 80 90 100
SB-9C2 GVPTRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC QQWSSNPRT FGGGTKLEIK
3-11*01 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQRSNWPP
hSB-9C2-L1 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPRT FGQGTKLEIK
hSB-9C2-L2 GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPRT FGQGTKLEIK
hSB-9C2-L3 GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC QQWSSNPRT FGQGTKLEIK
hSB-9C2-L4 GVPARFSGSGSGTDYTLTISSVEPEDFAVYYC QQWSSNPRT FGQGTKLEIK

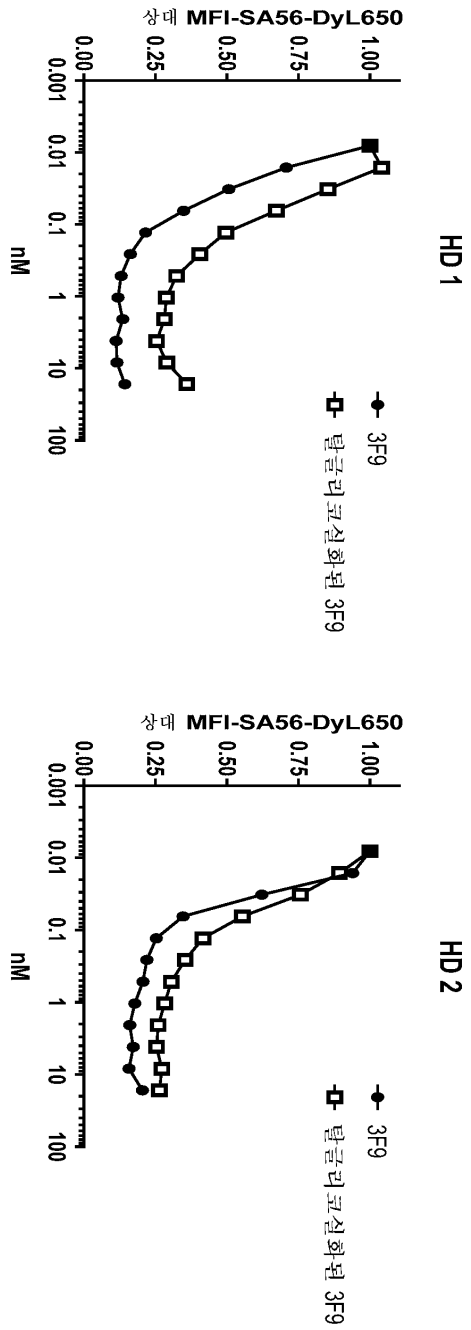
도면15a


3F9
엔도S: - +
쿠마시
3F9
엔도S: - +
LCA 블롯

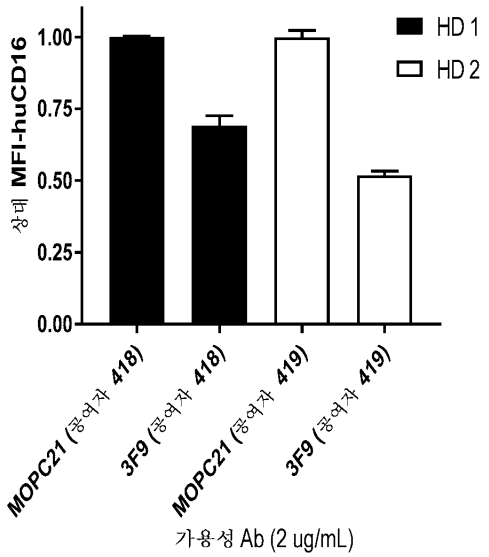
도면15b


BWZ-인간 SIRPA
상대 MFI- α-mIgG APC
100
75
50
25
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
nM
3F9 mIgG
탈글리코실화된 3F9

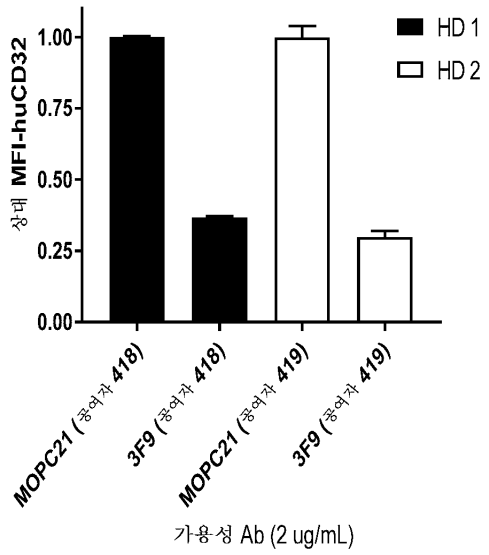
도면16


HD 1
상대 MFI-SA56-DyL650
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
nM
0.001
0.01
0.1
1
10
100
3F9
탈글리코실화된 3F9
HD 2
상대 MFI-SA56-DyL650
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
nM
0.001
0.01
0.1
1
10
100
3F9
탈글리코실화된 3F9

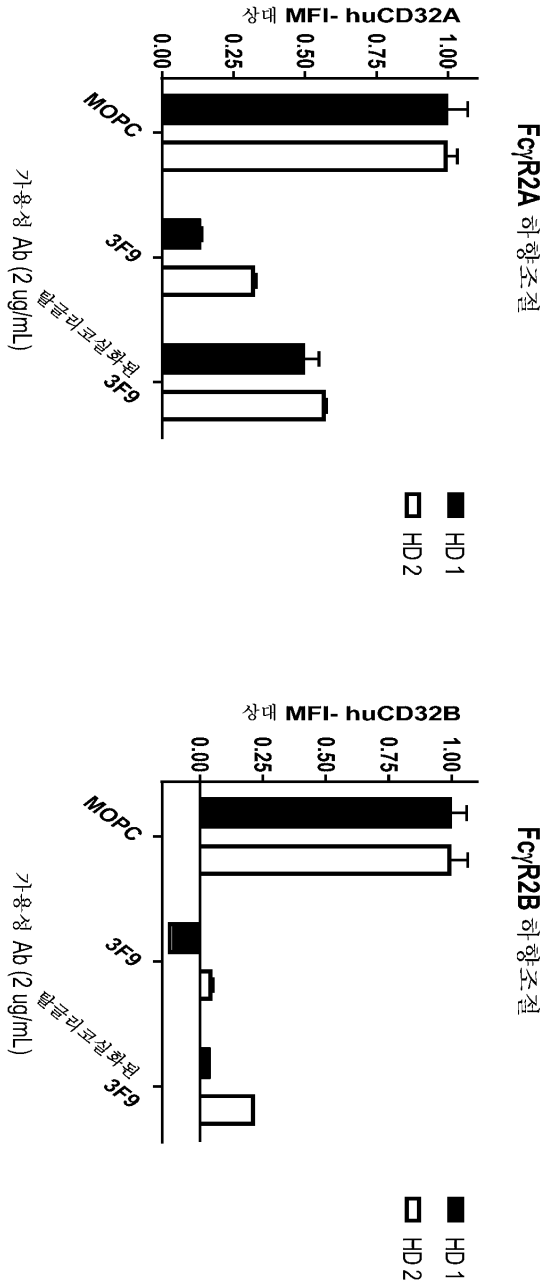
도면17a


HD 1
HD 2
상대 MFI-huCD16
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
MOPC21 (공여자 418)
3F9 (공여자 418)
MOPC21 (공여자 419)
3F9 (공여자 419)
가용성 Ab (2 ug/mL)

도면17b


HD 1
HD 2
상대 MFI-huCD32
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
MOPC21 (공여자 418)
3F9 (공여자 418)
MOPC21 (공여자 419)
3F9 (공여자 419)
가용성 Ab (2 ug/mL)

도면18



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ALECTOR LLC

<120> ANTI-SIRP-ALPHA ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 099061-1069197

<140><141><150> 62/432,503

<151> 2016-12-09

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 504

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Cys
1 5 10 15
Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu
20 25 30

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

Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Gly Asn Ile Thr
100 105 110
Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly Ser
115 120 125
Pro Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val
130 135 140
Arg Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg Ala
145 150 155 160

Thr Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser
165 170 175
Pro Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Ser
180 185 190
Asp Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr Ser
195 200 205

Ile His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His Ser
210 215 220

Gln Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro Leu
225 230 235 240
Arg Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro Thr Leu
245 250 255
Glu Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val Thr
260 265 270
Cys Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp Leu
275 280 285

Glu Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr Glu
290 295 300
Asn Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn Val
305 310 315 320
Ser Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His Asp
325 330 335
Gly Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser Ala His
340 345 350

Pro Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Ser Asn
355 360 365
Glu Arg Asn Ile Tyr Ile Val Val Gly Val Val Cys Thr Leu Leu Val
370 375 380
Ala Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Val Arg Ile Arg Gln Lys Lys
385 390 395 400
Ala Gln Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu Lys Asn
405 410 415

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

450 455 460

Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu Asp Met Val His Leu Asn Arg

465 470 475 480

Thr Pro Lys Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro Ser Phe Ser Glu Tyr

485 490 495

Ala Ser Val Gln Val Pro Arg Lys

500

<210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 2

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asp Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser

50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Tyr Thr Leu

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 3

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg

85 90 95

Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Arg Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro His Tyr Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 5

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Val Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400

> 6

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His

1 5 10 15

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 7

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 8

Gln His Asn Arg Glu Leu Pro Cys Thr

1 5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10

Thr Ile Ser Asp Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr

1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 11

Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 12

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 13

Val Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 14

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr

1 5

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 15

Gly Tyr Ser Leu Thr Gly Tyr Asn Met Asn

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 16

Asn Ile Asn Pro His Tyr Gly Ser Ser Thr

1 5 10

<

210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 17

Glu Gly Tyr Asp Gly Val Phe Asp Tyr

1 5

<210> 18

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 19

Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 20

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 20

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

1 5 10 15

Lys Tyr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr

20 25 30

Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg

35

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 21

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

1 5 10

<210> 22

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 22

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

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys

20

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 23

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 24

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 24

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 25

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 26

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 27

Trp Val Lys Gln Ser Arg Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 28

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 28

Tyr Asn Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser

1 5 10 15

Ser Ser Ala Ala Tyr Met Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser

20 25 30

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

35

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 29

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 30

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 30

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
20

<210> 31

<211> 15

<212>
PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 31

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 32

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 32

Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 33

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 34

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

100 105 110

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 35

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

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

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Arg Ser Gly Tyr Gly Lys Tyr Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 36

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 36

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Ser Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Asn Trp

85 90 95

Glu Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 37

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 37

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Asp Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ala Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg His Gly Tyr Pro His Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 38
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 38

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

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

<210> 39
<211> 121

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 39

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Ala Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asp Ile Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 40

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Ser Gly

20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

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

100 105 110

<210> 41

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 41

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Phe Ser Ile Ser Arg Gly

20 25 30

Tyr Asp Trp His Trp Ile Arg His Phe Pro Gly Asn Ile Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Thr Tyr Ser Gly Ile Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr His Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Phe

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gly Ala Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

100 105 110

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 42

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

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 43

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 43

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

20 25 30
Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Gly Lys Thr Thr Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Phe Ser Thr Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Arg Asn Trp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 44

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Ser

20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Asn Ser Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 45

<211> 503

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Cys
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ala Ser Cys Ala Trp Ser Gly Val Ala Gly Glu Glu
20 25 30

Glu Leu Gln Val Ile Gln Pro Asp Lys Ser Val Ser Val Ala Ala Gly
35 40 45

Glu Ser Ala Ile Leu His Cys Thr Val Thr Ser Leu Ile Pro Val Gly
50 55 60

Pro Ile Gln Trp Phe Arg Gly Ala Gly Pro Ala Arg Glu Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Asn Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Glu Ser
85 90 95

Thr Lys Arg Glu Asn Met Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn Ile Thr
100 105 110

Pro Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly Ser
115 120 125

Pro Asp Thr Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg
130 135 140

Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Ala Arg Ala Thr
145 150 155 160

Pro Gln His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser Pro
165 170 175

Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Ser Asp
180 185 190

Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Val Gly Glu Ser Val Ser Tyr Ser Ile
195 200 205

```
His Ser Thr Ala Lys Val Val Leu Thr Arg Glu Asp Val His Ser Gln
    210                 215                 220

Val Ile Cys Glu Val Ala His Val Thr Leu Gln Gly Asp Pro Leu Arg
225                 230                 235                 240
Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Thr Ile Arg Val Pro Pro Thr Leu Glu
                245                 250                 255
Val Thr Gln Gln Pro Val Arg Ala Glu Asn Gln Val Asn Val Thr Cys
            260                 265                 270
Gln Val Arg Lys Phe Tyr Pro Gln Arg Leu Gln Leu Thr Trp Leu Glu
        275                 280                 285

Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Val Thr Glu Asn
    290                 295                 300
Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn Val Ser
305                 310                 315                 320
Ala His Arg Asp Asp Val Lys Leu Thr Cys Gln Val Glu His Asp Gly
                325                 330                 335
Gln Pro Ala Val Ser Lys Ser His Asp Leu Lys Val Ser Ala His Pro
            340                 345                 350

Lys Glu Gln Gly Ser Asn Thr Ala Ala Glu Asn Thr Gly Ser Asn Glu
        355                 360                 365
Arg Asn Ile Tyr Ile Val Val Gly Val Val Cys Thr Leu Leu Val Ala
    370                 375                 380
Leu Leu Met Ala Ala Leu Tyr Leu Val Arg Ile Arg Gln Lys Lys Ala
385                 390                 395                 400
Gln Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu Lys Asn Ala
                405                 410                 415

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

450 455 460

Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu Asp Met Val His Leu Asn Arg Thr
465 470 475 480

Pro Lys Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro Ser Phe Ser Glu Tyr Ala
485 490 495

Ser Val Gln Val Pro Arg Lys
500

<210> 46

<211> 398

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Pro Val Pro Ala Ser Trp Pro His Leu Pro Ser Pro Phe Leu Leu
1 5 10 15

Met Thr Leu Leu Leu Gly Arg Leu Thr Gly Val Ala Gly Glu Asp Glu
20 25 30

Leu Gln Val Ile Gln Pro Glu Lys Ser Val Ser Val Ala Ala Gly Glu
35 40 45

Ser Ala Thr Leu Arg Cys Ala Met Thr Ser Leu Ile Pro Val Gly Pro
50 55 60

Ile Met Trp Phe Arg Gly Ala Gly Ala Gly Arg Glu Leu Ile Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Glu Gly His Phe Pro Arg Val Thr Thr Val Ser Glu Leu Thr
85 90 95

Lys Arg Asn Asn Leu Asp Phe Ser Ile Ser Ile Ser Asn Ile Thr Pro
100 105 110

Ala Asp Ala Gly Thr Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Arg Lys Gly Ser Pro
115 120 125

Asp Asp Val Glu Phe Lys Ser Gly Ala Gly Thr Glu Leu Ser Val Arg
130 135 140

Ala Lys Pro Ser Ala Pro Val Val Ser Gly Pro Ala Val Arg Ala Thr

145 150 155 160

Pro Glu His Thr Val Ser Phe Thr Cys Glu Ser His Gly Phe Ser Pro
165 170 175
Arg Asp Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Ser Asp
180 185 190
Phe Gln Thr Asn Val Asp Pro Ala Gly Asp Ser Val Ser Tyr Ser Ile
195 200 205
His Ser Thr Ala Arg Val Val Leu Thr Arg Gly Asp Val His Ser Gln
210 215 220

Val Ile Cys Glu Ile Ala His Ile Thr Leu Gln Gly Asp Pro Leu Arg
225 230 235 240
Gly Thr Ala Asn Leu Ser Glu Ala Ile Arg Val Pro Pro Thr Leu Glu
245 250 255
Val Thr Gln Gln Pro Met Arg Ala Glu Asn Gln Ala Asn Val Thr Cys
260 265 270
Gln Val Ser Asn Phe Tyr Pro Arg Gly Leu Gln Leu Thr Trp Leu Glu
275 280 285

Asn Gly Asn Val Ser Arg Thr Glu Thr Ala Ser Thr Leu Ile Glu Asn
290 295 300
Lys Asp Gly Thr Tyr Asn Trp Met Ser Trp Leu Leu Val Asn Thr Cys
305 310 315 320
Ala His Arg Asp Asp Val Val Leu Thr Cys Gln Val Glu His Asp Gly
325 330 335
Gln Gln Ala Val Ser Lys Ser Tyr Ala Leu Glu Ile Ser Ala His Gln
340 345 350

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

<210> 47

<211> 509

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Met Glu Pro Ala Gly Pro Ala Pro Gly Arg Leu Gly Pro Leu Leu Leu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Asp Ser Thr Val Leu Asn Cys Thr Leu Thr Ser Leu Leu Pro Val Gly

50 55 60

Pro Ile Arg Trp Tyr Arg Gly Val Gly Pro Ser Arg Leu Leu Ile Tyr

65 70 75 80

Ser Phe Ala Gly Glu Tyr Val Pro Arg Ile Arg Asn Val Ser Asp Thr

85 90 95

Thr Lys Arg Asn Asn Met Asp Phe Ser Ile Arg Ile Ser Asn Val Thr

100 105 110

Pro Ala Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Cys Val Lys Phe Gln Lys Gly Ser

115 120 125

Ser Glu Pro Asp Thr Glu Ile Gln Ser Gly Gly Gly Thr Glu Val Tyr

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Ile Pro Asp Gln Lys Val Asn Phe Thr Cys Lys Ser His Gly Phe

165 170 175

Ser Pro Arg Asn Ile Thr Leu Lys Trp Phe Lys Asp Gly Gln Glu Leu

180 185 190

His Pro Leu Glu Thr Thr Val Asn Pro Ser Gly Lys Asn Val Ser Tyr

195 200 205

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

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

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

385 390 395 400
Lys Lys Ala Lys Gly Ser Thr Ser Ser Thr Arg Leu His Glu Pro Glu
405 410 415
Lys Asn Ala Arg Glu Ile Thr Gln Ile Gln Asp Thr Asn Asp Ile Asn
420 425 430
Asp Ile Thr Tyr Ala Asp Leu Asn Leu Pro Lys Glu Lys Lys Pro Ala
435 440 445
Pro Arg Ala Pro Glu Pro Asn Asn His Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Glu

450 455 460

Thr Gly Lys Val Pro Arg Pro Glu Asp Thr Leu Thr Tyr Ala Asp Leu
465 470 475 480

Asp Met Val His Leu Ser Arg Ala Gln Pro Ala Pro Lys Pro Glu Pro
485 490 495

Ser Phe Ser Glu Tyr Ala Ser Val Gln Val Gln Arg Lys
500 505

<210> 48

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221>

source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 48

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

50 55 60

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

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

Ala Lys

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 49

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 50

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 50

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asp Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
50 55 60

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

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

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 51

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 51

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Lys

<210> 52

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 52

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Asp Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Lys Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 53

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 53

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asp Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Glu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Pro Pro Tyr Asp Asp Tyr Tyr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54
<211> 96
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"
<400> 54
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95
<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"
<400> 55
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 56
<211> 111
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 56

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

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

<210> 57
<211> 96
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 57

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

<210> 58

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 58

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg

85 90 95

Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 59

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 59

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

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
35 40 45

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

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

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg
85 90 95

Glu Leu Pro Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 60

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 60

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Gly Tyr Gly Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Val Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg

85 90 95

Glu Leu Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 61

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 61

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Asn Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg

<210> 62

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Arg Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro His Tyr Gly Ser Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 63

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 63

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg

<210> 64

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 64

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

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

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 65

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 65

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro His Tyr Gly Ser Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 66

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 66

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro His Tyr Gly Ser Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 67

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 67

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asn Ile Asn Pro His Tyr Gly Ser Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68

<211> 96

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 68

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro

85 90 95

<210> 69

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 69

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr

35 40 45

Val Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr

85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 70

<211> 96

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 70

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

<210> 71

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 71

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

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

<210> 72
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
<400> 72
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

<210> 73
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 73

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 74

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 74

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

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Val Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Ser Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105