

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0035452

(43) 공개일자 2022년03월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7005069
- (22) 출원일자(국제) 2020년07월17일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년02월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2020/042668
- (87) 국제공개번호 WO 2021/016128
국제공개일자 2021년01월28일
- (30) 우선권주장
62/876,579 2019년07월19일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
은코리스폰스 인크.
미국 98104 워싱턴주 시애틀 콜롬비아 스트리트
1124 스위트 300
- (72) 발명자
푸리 카말 디.
미국 98104 워싱턴주 시애틀 콜롬비아 스트리트
1124 스위트 300
찬드라세카란 시다스
미국 98104 워싱턴주 시애틀 콜롬비아 스트리트
1124 스위트 300
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

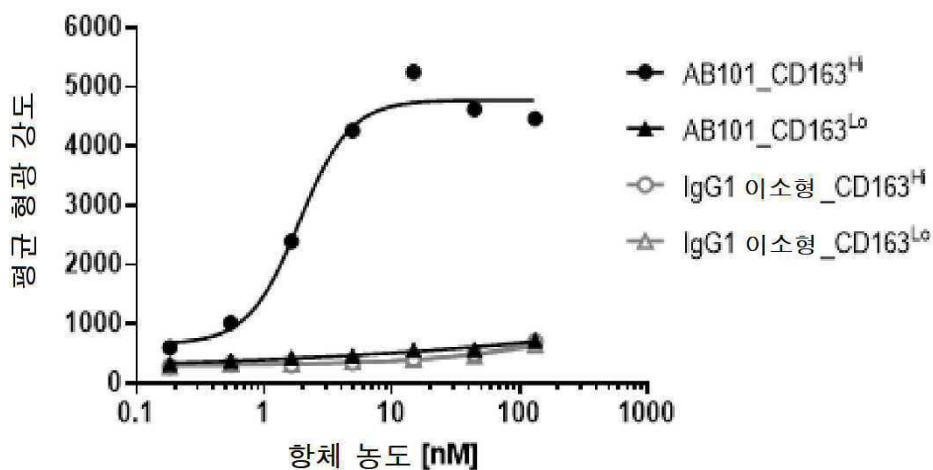
전체 청구항 수 : 총 226 항

(54) 발명의 명칭 면역조절 항체 및 이의 사용 방법

(57) 요약

항체 및 이의 사용 방법이 본원에 제공된다. 본원에 개시된 항체는 대식세포와 같은 세포 상의 CD163+에 결합한다. 이들 항체는 암의 치료 방법과 같은 치료 방법에 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/33 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/71 (2013.01)
C07K 2317/73 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/77 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

코니리 멜리사 엘.

미국 98104 워싱턴주 시애틀 콜롬비아 스트리트
1124 스위트 300

시몬스 란디 엠.

미국 98104 워싱턴주 시애틀 콜롬비아 스트리트
1124 스위트 300

스미스 티렐 티.

미국 98104 워싱턴주 시애틀 콜롬비아 스트리트
1124 스위트 300

브라운 마크 이.

미국 98104 워싱턴주 시애틀 콜롬비아 스트리트
1124 스위트 300

프랍스트 피터

미국 98104 워싱턴주 시애틀 콜롬비아 스트리트
1124 스위트 300

(30) 우선권주장

62/876,580 2019년07월19일 미국(US)

62/878,265 2019년07월24일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 12

서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) H1, 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR H2 및 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR H3을 포함하는 중쇄 서열, 및 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR L1, 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR L2 및 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR L3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 13

제12항에 있어서, CDR L1이 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖고, CDR L2가 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖고, CDR L3이 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 14

제12항에 있어서, CDR L1이 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR L2가 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR L3이 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 15

제12항에 있어서, CDR L1이 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR L2가 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR L3이 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 16

제12항에 있어서, CDR L1이 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR L2가 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR L3이 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 17

제12항에 있어서, CDR L1이 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖고, CDR L2가 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖고, CDR L3이 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 18

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CDR H1이 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖고, CDR H2가 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖고, CDR H3이 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 19

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CDR H1이 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR H2가 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR H3이 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 20

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CDR H1이 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR H2가 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR H3이 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 21

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CDR H1이 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR H2가 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR H3이 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 22

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CDR H1이 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖고, CDR H2가 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖고, CDR H3이 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 23

서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 24

제23항에 있어서, 중쇄 가변 영역(V_H)이 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 25

제23항에 있어서, 중쇄 가변 영역(V_H)이 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 26

제23항에 있어서, 중쇄 가변 영역(V_H)이 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 27

제23항에 있어서, 중쇄 가변 영역(V_H)이 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 29

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 30

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 31

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 32

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 33

서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 34

제33항에 있어서, 경쇄 가변 영역(V_L)이 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 36

제33항 또는 제34항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 37

제33항 또는 제34항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 38

제33항 또는 제34항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 39

제33항 또는 제34항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 40

서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) H1, 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR H2 및 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR H3을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 41

제40항에 있어서, 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) H1, 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 CDR H2 및 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 CDR H3을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 42

제40항에 있어서, 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) H1, 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 CDR H2 및 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 CDR H3을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 43

제40항에 있어서, 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) H1, 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 CDR H2 및 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 CDR H3을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 44

제40항에 있어서, 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) H1, 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 CDR H2 및 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 CDR H3을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 45

제40항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR) L1, 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR L2 및 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR L3을 포함하는 경쇄 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 46

제45항에 있어서, CDR L1이 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR L2가 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR L3이 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 47

제45항에 있어서, CDR L1이 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR L2가 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR L3이 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 48

제45항에 있어서, CDR L1이 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR L2가 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR L3이 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 49

제45항에 있어서, CDR L1이 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖고, CDR L2가 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖고, CDR L3이 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 50

제40항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 51

제45항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄 가변 영역(V_L)이 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 52

제40항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 53

서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) CDR L1, 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 CDR L2 및 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 CDR L3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 54

서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) CDR L1, 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 CDR L2 및 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 CDR L3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR) H1, 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR H2 및 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR H3을 포함하는 중쇄 서열을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 56

제55항에 있어서, CDR H1이 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR H2가 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR H3이 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 57

제55항에 있어서, CDR H1이 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR H2가 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR H3이 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 58

제55항에 있어서, CDR H1이 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR H2가 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR H3이 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 59

제55항에 있어서, CDR H1이 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖고, CDR H2가 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖고, CDR H3이 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 60

제53항 또는 제54항에 있어서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(V_H)을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 61

제55항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역(V_H)이 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 62

제53항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄 서열이 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 63

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 중쇄 불변 영역 또는 인간 경쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 64

제63항에 있어서, 인간 중쇄 불변 영역이 IgG1 또는 IgG4 또는 이의 단편인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄가 서열번호 10의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄가 서열번호 9의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 67

제1항 내지 제64항 및 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄가 서열번호 12의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 68

제1항 내지 제66항에 있어서, 중쇄가 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 69

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄가 서열번호 13의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 가변 프레임워크 영역 및 뮤린(murine) 불변 영역을 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 71

제70항에 있어서, 뮤린 중쇄 불변 영역 또는 뮤린 경쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 72

제71항에 있어서, 뮤린 중쇄 불변 영역이 IgG2A인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 73

제72항에 있어서, 중쇄가 서열번호 15의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 74

제72항에 있어서, 중쇄가 서열번호 16의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 75

제72항에 있어서, 경쇄가 서열번호 14의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 단일 중쇄, 단일 경쇄, Fab, Fab', F(ab)'₂, Fd, scFv, 가변 중쇄 도메인, 가변 경쇄 도메인, 가변 NAR 도메인, 이중특이적 scFv, 이중특이적 Fab₂, 삼중특이적 Fab₃ 단일 사슬 결합 폴리펩티드, dAb 단편 또는 디아바디(diabody)를 포함하는 항체 단편인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 77

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 면역억제성 인간 골수 세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고, 상기 골수 세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합이 다음의 매개변수 중 하나 또는 둘다에 의해 측정되는 면역 세포 기능을 촉진하는 항체 또는 재조합 항체:

- (i) CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; 및
- (ii) CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식.

청구항 78

제77항에 있어서, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화가 IFN- γ , TNF- α 또는 퍼포린 또는 이들의 조합의 향상된 수준으로서 측정되는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 79

제77항에 있어서, 면역억제성 인간 골수 세포가 대식세포 또는 골수 유래 억제 세포인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 80

제77항에 있어서, 면역 세포 기능이 종양 미세환경에 있는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 81

제77항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 세포 기능이 생체내인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 82

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고, 상기 대식세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합이 종양 미세환경에서 면역자극 활성을 증가시키는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 83

제82항에 있어서, 종양 미세환경이 생체내인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 84

제79항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합이 대식세포의 면역억제 활성을 감소시키는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 85

제79항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합이 대식세포의 종양 촉진 활성을 감소시키는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 86

제79항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포가 종양 관련 대식세포인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 87

제79항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 대식세포 상의 적어도 하나의 마커의 발현을 변경하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 88

제77항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질이 CD163의 당형태(glycoform)인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 89

제77항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질이 CD163의 150 kDa 당형태인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 90

제79항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 인간 대식세포에 의해 발현되는 CD163의 130 kDa 당형태에 특이적으로 결합하지 않는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 91

제1항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 수용체에 결합할 수 있는 불변 도메인을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 92

제91항에 있어서, Fc 수용체가 대식세포 상에서 발현되는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 93

제1항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 중쇄, 단일 경쇄, Fab, Fab', F(ab)'¹, F(ab')₂, Fd, scFv, 가변 중쇄 도메인, 가변 경쇄 도메인, 가변 NAR 도메인, 이중특이적 scFv, 이중특이적 Fab₂, 삼중특이적 Fab₃ 단일 사슬 결합 폴리펩티드, dAb 단편 또는 디아바드를 포함하는 항체 단편을 갖는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 94

제79항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대식세포 상의 적어도 하나의 마커가 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15(Siglec-15)인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 95

제79항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대식세포가 M2 대식세포 또는 M2-유사 대식세포인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 96

제79항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대식세포가 M2a, M2b, M2c 또는 M2d 대식세포인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 97

제79항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질이 대식세포에 의해 발현되는 적어도 하나의 다른 단백질을 포함하는 세포 표면 복합체의 성분인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 98

제97항에 있어서, 적어도 하나의 다른 단백질이 갈렉틴-1 단백질, LILRB2 단백질, 카제인 키나제 II 단백질 또는 이들의 임의의 조합인 항체 또는 재조합 항체.

청구항 99

제79항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 CD163 단백질과 결합 시 인간 대식세포

에 의해 내재화되는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 100

제79항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 대식세포에 대해 세포독성이 아닌 항체 또는 재조합 항체.

청구항 101

제79항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 $CD4^{+}$ T 세포 활성화, $CD4^{+}$ T 세포 증식, 또는 $CD4^{+}$ T 세포 활성화와 증식 둘다를 촉진하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 102

제77항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 $CD4^{+}$ T 세포에 의한 CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 103

제77항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 $CD8^{+}$ T 세포 활성화, $CD8^{+}$ T 세포 증식, 또는 $CD8^{+}$ T 세포 활성화와 증식 둘다를 촉진하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 104

제77항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 $CD8^{+}$ T 세포에 의한 ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 105

제77항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 종양 미세환경에서 면역억제를 감소시키는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 106

제77항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 107

제77항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 암 세포의 세포독성 림프구-매개 사멸을 촉진하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 108

제77항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 NK 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 109

제77항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 T 세포에 의한 IL-2 발현을 촉진하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 110

제77항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 $CD4^{+}$ T 세포, $CD196^{-}$ T 세포, $CXCR3^{+}$ T 세포, $CCR4^{-}$ T 세포 또는 이들의 임의의 조합을 증가시키는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 111

제77항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, CD163에 대한 결합이 대식세포에 의해 유발된 종양 미세환경에서의 면역억제를 감소시키는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 112

제1항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고, 결합이 다음의 효과 중 적어도 하나를 초래하는 항체 또는 재조합 항체:

- (a) 대식세포에 의한, CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15인 적어도 하나의 마커의 발현 감소;
- (b) 대식세포에 의한 항체의 내재화;
- (c) IFN- γ , TNF- α 및 퍼포린의 분비;
- (d) CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화;
- (e) CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및
- (f) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.

청구항 113

제112항에 있어서, 결합이 (a) 내지 (e) 중 2개 이상; (a) 내지 (e) 중 3개 이상; (a) 내지 (e) 중 4개 이상; 또는 (a) 내지 (e) 모두를 초래하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 114

제1항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 미세환경에서 CD163⁺ 면역억제성 골수 세포에 특이적으로 결합하고, 상기 결합이 종양 미세환경에서 종양 세포의 세포독성 T 세포-매개 사멸의 억제를 감소시키는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 115

제1항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 암의 치료 방법에서 사용하기 위한, 인간 종양 관련 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고 대식세포에 의한 CD16, CD64, TLR2, 시글렉-15 또는 이들의 조합의 발현을 감소시키는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 116

제79항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합이 종양 미세환경에서 세포의 면역 기능을 조절하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 117

제79항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합이 항종양 면역 기능을 촉진하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 118

제1항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CD163 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 119

제1항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CD163 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 120

제1항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CD163 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 121

제1항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 각각 서열번호 18, 서열번호 19 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CD163 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 122

제1항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 1 nM 내지 100 nM의 K_D 로 CD163에 특이적으로 결합하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 123

제122항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 1 nM 내지 50 nM의 K_D 로 CD163에 특이적으로 결합하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 124

제123항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 1 nM 내지 10 nM의 K_D 로 CD163에 특이적으로 결합하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 125

제1항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 1 nM 내지 100 nM의 K_D 로 인간 M2c 대식세포에 특이적으로 결합하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 126

제125항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 1 nM 내지 50 nM의 K_D 로 인간 M2c 대식세포에 특이적으로 결합하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 127

제126항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 1 nM 내지 10 nM의 K_D 로 인간 M2c 대식세포에 특이적으로 결합하는 항체 또는 재조합 항체.

청구항 128

제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체 및 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 129

제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 130

인간 대상체에서 암을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한, 제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체의 용도.

청구항 131

암을 갖는 인간 대상체에서 종양 관련 대식세포에 의한 면역억제를 감소시키는 약제의 제조를 위한, 제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체의 용도.

청구항 132

암을 갖는 인간 대상체에서 T 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 약제의 제조를 위한, 제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체의 용도.

청구항 133

면역 세포 기능의 촉진을 필요로 하는 대상체에서 면역 세포 기능을 촉진하는 방법으로서, 제1항 내지 제132항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 면역 세포 기능의 촉진이 다음의 매개변수 중 하나 또는 둘다에 의해 측정되는 방법:

- (i) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; 및
- (ii) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식.

청구항 134

제133항에 있어서, $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화가 IFN- γ , TNF- α , 퍼포린 또는 이들의 임의의 조합의 증가된 수준으로서 측정되는 방법.

청구항 135

제133항에 있어서, 면역억제성 인간 골수 세포가 대식세포인 방법.

청구항 136

제135항에 있어서, 면역억제성 인간 골수 세포가 골수 유래 억제 세포인 방법.

청구항 137

제136항에 있어서, 항체가 제76항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체인 방법.

청구항 138

암 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 139

암 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여하고, 이에 의해 개체에서 종양 관련 대식세포에 의한 면역억제가 감소되는 단계를 포함하는 방법.

청구항 140

암 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여하고, 이에 의해 개체에서 T 세포-매개 종양 세포 사멸이 증가되는 단계를 포함하는 방법.

청구항 141

종양 관련 대식세포의 종양 촉진 활성의 감소를 필요로 하는 개체에서 종양 관련 대식세포의 종양 촉진 활성을 감소시키는 방법으로서, $CD4^{+}$ T 세포 활성화, $CD4^{+}$ T 세포 증식, $CD8^{+}$ T 세포 활성화, $CD8^{+}$ T 세포 증식 또는 이들의 임의의 조합을 조절하기에 유효한 제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 142

림프구-매개 종양 세포 사멸의 촉진을 필요로 하는 개체에서 림프구-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 방법으로서, 제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 143

제138항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 폐암 또는 육종인 방법.

청구항 144

제143항에 있어서, 폐암이 폐 암종 또는 폐 선암종인 방법.

청구항 145

제138항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 재조합 항체가 종양 미세환경에서 대식세포에 결합하는 방법.

청구항 146

제138항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 개체에게 추가의 항암 요법을 실시하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 147

제146항에 있어서, 추가의 항암 요법이 수술 요법, 화학요법, 방사선 요법, 냉동요법, 호르몬 요법, 면역요법, 및 사이토킨 요법, 및 이들의 조합인 방법.

청구항 148

제147항에 있어서, 추가의 항암 요법이 면역요법인 방법.

청구항 149

제148항에 있어서, 면역요법이 체크포인트(checkpoint) 억제제를 포함하는 조성물인 방법.

청구항 150

종양 미세환경에서 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하는 방법으로서, 종양 관련 대식세포를 CD163-발현 인간 대식세포에 결합하고 다음의 효과 중 적어도 하나를 포함하는 제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 재조합 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법:

- (a) 항체의 결합은 대식세포 상에서 적어도 하나의 마커의 발현을 감소시키고, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다;
- (b) 항체는 CD163 단백질과 결합 시 인간 대식세포에 의해 내재화된다;
- (c) 항체의 결합은 대식세포에 세포독성이 아니다;
- (d) 항체의 결합은 IFN- γ , TNF- α 및 퍼포린의 수준을 증가시킨다;
- (e) 항체의 결합은 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화를 촉진한다;
- (f) 항체의 결합은 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식을 촉진한다; 및
- (g) 항체의 결합은 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진한다.

청구항 151

제150항에 있어서, 결합이 (a) 내지 (g) 중 2개 이상; (a) 내지 (g) 중 3개 이상; (a) 내지 (g) 중 4개 이상; (a) 내지 (g) 중 5개 이상; (a) 내지 (g) 중 6개 이상; 또는 (a) 내지 (g) 모두를 초래하는 방법.

청구항 152

면역억제성 인간 골수 세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체로서, 골수 세포에 대한 상기 항체의 결합이 다음의 매개변수 중 하나 또는 둘다에 의해 측정되는 면역 세포 기능을 촉진하는 항체:

- (i) CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; 및

(ii) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식.

청구항 153

제152항에 있어서, 면역억제성 인간 골수 세포가 대식세포 또는 골수 유래 억제 세포인 항체.

청구항 154

인간 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체로서, 대식세포에 대한 상기 항체의 결합이 다음의 매개변수 중 하나 또는 둘다에 의해 측정되는 면역 세포 기능을 촉진하는 항체:

(i) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; 및

(ii) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식.

청구항 155

제152항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 세포 기능이 종양 미세환경에 있는 항체.

청구항 156

제152항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 세포 기능이 생체내인 항체.

청구항 157

인간 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체로서, 대식세포에 대한 상기 항체의 결합이 종양 미세환경에서 면역자극 활성을 증가시키는 항체.

청구항 158

제157항에 있어서, 종양 미세환경이 생체내인 항체.

청구항 159

제153항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포에 대한 항체의 결합이 대식세포의 면역억제 활성을 감소시키는 항체.

청구항 160

제153항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포에 대한 항체의 결합이 대식세포의 종양 촉진 활성을 감소시키는 항체.

청구항 161

제153항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포가 종양 관련 대식세포인 항체.

청구항 162

제153항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 대식세포 상의 적어도 하나의 마커의 발현을 변경하는 항체.

청구항 163

제152항 내지 제162항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질이 CD163의 당형태인 항체.

청구항 164

제152항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질이 CD163의 150 kDa 당형태인 항체.

청구항 165

제153항 내지 제164항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간 대식세포에 의해 발현되는 CD163의 130 kDa 당형태

에 특이적으로 결합하지 않는 항체.

청구항 166

제152항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 수용체에 대한 결합을 가능하게 하는 불변 도메인을 갖는 항체.

청구항 167

제166항에 있어서, Fc 수용체가 대식세포 상에서 발현되는 항체.

청구항 168

제152항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 중쇄, 단일 경쇄, Fab, Fab', F(ab)'¹, F(ab')₂, Fd, scFv, 가변 중쇄 도메인, 가변 경쇄 도메인, 가변 NAR 도메인, 이중특이적 scFv, 이중특이적 Fab₂, 삼중특이적 Fab₃ 단일 사슬 결합 폴리펩티드, dAb 단편 또는 디아바디를 포함하는 항체 단편을 갖는 항체.

청구항 169

제153항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대식세포 상의 적어도 하나의 마커가 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15인 항체.

청구항 170

제153항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 대식세포가 M2 대식세포 또는 M2-유사 대식세포인 항체.

청구항 171

제170항에 있어서, 인간 대식세포가 M2a, M2b, M2c, 또는 M2d 대식세포인, 항체

청구항 172

제153항 내지 제171항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질이 대식세포에 의해 발현되는 적어도 하나의 다른 단백질을 포함하는 세포 표면 복합체의 성분인 항체.

청구항 173

제172항에 있어서, 적어도 하나의 다른 단백질이 갈락틴-1 단백질, LILRB2 단백질, 카제인 키나제 II 단백질 또는 이들의 임의의 조합인 항체.

청구항 174

제153항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질과 결합 시 항체가 인간 대식세포에 의해 내재화되는 항체.

청구항 175

제153항 내지 제174항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 대식세포에 대해 세포독성이 아닌 항체.

청구항 176

제152항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 CD4⁺ T 세포 활성화, CD4⁺ T 세포 증식, 또는 CD4⁺ T 세포 활성화와 증식 둘다를 촉진하는 항체.

청구항 177

제152항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 CD4⁺ T 세포에 의한 CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진하는 항체.

청구항 178

제152항 내지 제177항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 $CD8^{+}$ T 세포 활성화, $CD8^{+}$ T 세포 증식, 또는 $CD8^{+}$ T 세포 활성화와 증식 둘다를 촉진하는 항체.

청구항 179

제152항 내지 제178항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 $CD8^{+}$ T 세포에 의한 ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진하는 항체.

청구항 180

제152항 내지 제179항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 종양 미세환경에서 면역억제를 감소시키는 항체.

청구항 181

제152항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진하는 항체.

청구항 182

제152항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 암 세포의 세포독성 림프구-매개 사멸을 촉진하는 항체.

청구항 183

제152항 내지 제182항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 NK 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 항체.

청구항 184

제152항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 T 세포에 의한 IL-2 발현을 촉진하는 항체.

청구항 185

제152항 내지 제184항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 $CD4^{+}$ T 세포, $CD196^{-}$ T 세포, $CXCR3^{+}$ T 세포, $CCR4^{-}$ T 세포 또는 이들의 임의의 조합을 증가시키는 항체.

청구항 186

제152항 내지 제185항 중 어느 한 항에 있어서, CD163에 대한 결합이 대식세포에 의해 유발된 종양 미세환경에서의 면역억제를 감소시키는 항체.

청구항 187

인간 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체로서, 결합이 다음의 효과 중 적어도 하나를 초래하는 항체:

- (a) 대식세포에 의한, CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15인 적어도 하나의 마커의 발현 감소;
- (b) 대식세포에 의한 항체의 내재화;
- (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화;
- (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및
- (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.

청구항 188

제187항에 있어서, 결합이 (a) 내지 (e) 중 2개 이상; (a) 내지 (e) 중 3개 이상; (a) 내지 (e) 중 4개 이상; 또는 (a) 내지 (e) 모두를 초래하는 항체.

청구항 189

종양 미세환경에서 CD163⁺ 면역억제성 골수 세포에 특이적으로 결합하는 항체로서, 상기 결합이 종양 미세환경에서 종양 세포의 세포독성 T 세포-매개 사멸의 억제를 감소시키는 항체.

청구항 190

암 치료 방법에 사용하기 위한, 인간 종양 관련 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고 대식세포에 의한 CD16, CD64, TLR2, 시글렉-15 또는 이들의 조합의 발현을 감소시키는 항체.

청구항 191

제153항 내지 제190항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포에 대한 항체의 결합이 종양 미세환경에서 세포의 면역 기능을 조절하는 항체.

청구항 192

제153항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포에 대한 항체의 결합이 항종양 면역 기능을 촉진하는 항체.

청구항 193

제152항 내지 제192항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 194

제152항 내지 제192항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 195

인간 대상체에서 암을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한, 제152항 내지 제192항 중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.

청구항 196

암을 갖는 인간 대상체에서 종양 관련 대식세포에 의한 면역억제를 감소시키는 약제의 제조를 위한, 제152항 내지 제192항 중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.

청구항 197

암을 갖는 인간 대상체에서 T 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 약제의 제조를 위한, 제152항 내지 제192항 중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.

청구항 198

면역 세포 기능을 촉진하는 방법으로서,

항체를 면역억제성 인간 골수 세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합시키는 단계; 및

다음의 매개변수 중 하나 또는 둘다에 의해 측정되는 면역 세포 기능을 촉진하는 단계를 포함하는 방법:

(i) CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; 및

(ii) CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식.

청구항 199

제198항에 있어서, 면역억제성 인간 골수 세포가 대식세포인 방법.

청구항 200

제198항에 있어서, 면역억제성 인간 골수 세포가 골수 유래 억제 세포인 방법.

청구항 201

제198항에 있어서, 항체가 제152항 내지 제192항 중 어느 한 항에 따른 항체인 방법.

청구항 202

암 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 제152항 내지 제192항 중 어느 한 항에 따른 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 203

암 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 제152항 내지 제192항 중 어느 한 항에 따른 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여하고, 이에 의해 개체에서 종양 관련 대식세포에 의한 면역억제가 감소되는 단계를 포함하는 방법.

청구항 204

암 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 제152항 내지 제192항 중 어느 한 항에 따른 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여하고, 이에 의해 개체에서 T 세포-매개 종양 세포 사멸이 증가되는 단계를 포함하는 방법.

청구항 205

제198항 내지 제204항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 폐암 또는 육종인 방법.

청구항 206

제205항에 있어서, 폐암이 폐 암종 또는 폐 선암종인 방법.

청구항 207

종양 관련 대식세포의 종양 촉진 활성의 감소를 필요로 하는 개체에서 종양 관련 대식세포의 종양 촉진 활성을 감소시키는 방법으로서, 종양 미세환경에서 $CD4^+$ T 세포 활성화, $CD4^+$ T 세포 증식, $CD8^+$ T 세포 활성화, $CD8^+$ T 세포 증식 또는 이들의 임의의 조합을 조절하는 데 유효한 제194항에 따른 약학 조성물의 양을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 208

제207항에 있어서, 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 209

림프구-매개 종양 세포 사멸의 촉진을 필요로 하는 개체에서 림프구-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 방법으로서, 제194항에 따른 약학 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 210

종양 미세환경에서 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하는 방법으로서, 종양 관련 대식세포를 CD163-발현 인간 대식세포에 결합하고 다음의 효과 중 적어도 하나를 포함하는 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법:

(a) 항체의 결합은 대식세포 상에서 적어도 하나의 마커의 발현을 감소시키며, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2, 또는 시글렉-15이다;

- (b) 항체와 CD163 단백질의 결합 시, 항체는 인간 대식세포에 의해 내재화된다;
- (c) 항체의 결합은 대식세포에 세포독성이 아니다;
- (d) 항체의 결합은 $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화를 촉진한다;
- (e) 항체의 결합은 $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식을 촉진한다; 및
- (f) 항체의 결합은 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진한다.

청구항 211

제210항에 있어서, 결합이 (a) 내지 (f) 중 2개 이상; (a) 내지 (f) 중 3개 이상; (a) 내지 (f) 중 4개 이상; (a) 내지 (f) 중 5개 이상; 또는 (a) 내지 (f) 모두를 초래하는 방법.

청구항 212

제198항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 종양 미세환경에서 발생하는 방법.

청구항 213

제198항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 생체내에서 발생하는 방법.

청구항 214

제198항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포에 대한 항체의 결합이 종양 미세환경에서 세포의 면역 기능을 조절하는 방법.

청구항 215

제198항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 대식세포에 대한 항체의 결합이 항종양 면역 기능을 촉진하는 방법.

청구항 216

제198항 내지 제215항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 불변 도메인을 포함하고, 불변 도메인이 Fc 수용체에 결합하는 방법.

청구항 217

제216항에 있어서, Fc 수용체가 대식세포 상에서 발현되는 방법.

청구항 218

제198항 내지 제217항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 CD163 단백질과 결합 시 인간 대식세포에 의해 내재화되는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 219

제198항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, CD163 단백질에 대한 결합이 인간 대식세포에 대해 세포독성이 아닌 방법.

청구항 220

제198항 내지 제219항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{+}$ T 세포에 의한 CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 221

제198항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, $CD8^{+}$ T 세포에 의한 ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 222

제198항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 미세환경에서 면역억제를 감소시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 223

제198항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 암 세포의 세포독성 림프구-매개 사멸을 촉진하는 것을 포함하는 방법.

청구항 224

제198항 내지 제223항 중 어느 한 항에 있어서, NK 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 것을 포함하는 방법.

청구항 225

제198항 내지 제224항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포에 의한 IL-2 발현을 촉진하는 것을 포함하는 방법.

청구항 226

제198항 내지 제225항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T 세포, $CD196^-$ T 세포, $CXCR3^+$ T 세포, $CCR4^-$ T 세포 또는 이들의 임의의 조합을 증가시키는 것을 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호참조

[0002] 본 출원은 2019년 7월 19일에 출원된 미국 가출원 제62/876,580호, 2019년 7월 19일에 출원된 제62/876,579호 및 2019년 7월 24일에 출원된 제62/878,265호의 우선권 및 이익을 주장하며, 상기 출원 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 통합된다.

발명의 내용

[0003] 개시내용의 요약

[0004] 암 및 기타 장애의 치료에 유용한, 항원 결합 단편 및 기타 항원 결합 폴리펩티드를 포함하는 항체가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 항체는 M2 및 M2-유사 면역-억제성 대식세포에 특이적으로 결합하지만 M1 및 M1-유사 항종양 대식세포에는 결합하지 않는다. 개시된 항체는 M2 및 M2-유사 종양 관련 대식세포에 결합하고 종양 관련 M2 및 M2-유사 대식세포의 물리적 및 기능적 특성을 조절하여 종양 미세환경의 면역억제를 완화하고, 종양 세포 사멸을 촉진하는 세포독성 T-세포 활성화 및 증식을 증가시킨다. 본 개시내용의 항체 분자는 M2 및 M2-유사 대식세포의 표면 상에서 발현되는 인간 CD163에 특이적으로 결합한다.

[0005] 소정 실시양태에서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체가 본원에 개시된다.

[0006] 소정 실시양태에서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체가 본원에 개시된다.

[0007] 소정 실시양태에서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체가 본원에 개시된다.

[0008] 소정 실시양태에서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체가 본원에 개시된다.

[0009] 소정 실시양태에서, 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는 항체 또는 재조합 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 95%

한다. 일부 실시양태에서, CDR L1은 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR L2는 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR L3은 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CDR L1은 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR L2는 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR L3은 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CDR L1은 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR L2는 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR L3은 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CDR L1은 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖고, CDR L2는 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 100% 동일성을 갖고, CDR L3은 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역(VL)은 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는다.

[0023] 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 경쇄 가변 영역(VL)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함한다.

[0024] 소정 실시양태에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) CDR L1, 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR L2 및 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR L3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항체 또는 재조합 항체가 개시된다.

[0025] 소정 실시양태에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) CDR L1, 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 CDR L2 및 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 CDR L3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항체 또는 재조합 항체가 개시된다.

[0026] 소정 실시양태에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) CDR L1, 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 CDR L2 및 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는 CDR L3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항체 또는 재조합 항체가 개시된다.

[0027] 소정 실시양태에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) CDR L1, 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 CDR L2 및 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는 CDR L3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항체 또는 재조합 항체가 개시된다.

[0028] 소정 실시양태에서, 서열번호 1의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 상보성 결정 영역(CDR) CDR L1, 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 CDR L2 및 서열번호 3의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는 CDR L3을 포함하는 경쇄 서열을 포함하는 항체 또는 재조합 항체가 개시된다.

[0029] 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR) H1, 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR H2 및 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 CDR H3을 포함하는 중쇄 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, CDR H1은 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR H2는 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖고, CDR H3은 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CDR H1은 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR H2는 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖고, CDR H3은 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CDR H1은 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR H2는 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖고, CDR H3은 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 99% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, CDR H1은 서열번호 4의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖고, CDR H2는 서열번호 5의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖고, CDR H3은 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 100% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역(VH)은 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는다.

[0030] 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 서열번호 8의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는 중쇄 가변 영역(VH)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 가변 영역(VL)은 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는다.

[0031] 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 인간 중쇄 불변 영역 또는 인간 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 중쇄 불변 영역은 IgG1 또는 IgG4 또는 이의 단편이다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 10의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 서열번호 9의

아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 12의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 11의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 13의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 인간 인간 가변 프레임워크 영역 및 무린(murine) 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 무린 중쇄 불변 영역 또는 무린 경쇄 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 무린 중쇄 불변 영역은 IgG2A이다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 15의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 16의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 서열번호 14의 아미노산 서열에 대해 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 단일 중쇄, 단일 경쇄, Fab, Fab', F(ab)', F(ab')₂, Fd, scFv, 가변 중쇄 도메인, 가변 경쇄 도메인, 가변 도메인, 이중특이적 scFv, 이중특이적 Fab2, 삼중특이적 Fab3 단일 사슬 결합 폴리펩티드, dAb 단편 또는 디아바디를 포함하는 항체 단편이다.

[0032] 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 면역억제성 인간 골수 세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고, 여기서 골수 세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합은 다음의 매개변수 중 하나 또는 둘다에 의해 측정되는 면역 세포 기능을 촉진한다: (i) CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; 및 (ii) CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식. 일부 실시양태에서, CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화는 IFN- γ , TNF- α 또는 퍼포린 또는 이들의 임의의 조합의 증가된 수준으로서 측정된다. 일부 실시양태에서, 면역억제성 인간 골수 세포는 대식세포 또는 골수 유래 억제 세포이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 기능은 종양 미세환경 내에 있다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 기능은 생체내이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 인간 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고, 대식세포에 대한 항체의 결합은 종양 미세환경에서 면역자극 활성을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 종양 미세환경은 생체내이다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합은 대식세포의 면역억제 활성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합은 대식세포의 종양 촉진 활성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 대식세포는 종양 관련 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 대식세포 상의 적어도 하나의 마커의 발현을 변경한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질은 CD163의 당형태이다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질은 CD163의 150 kDa 당형태이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 대식세포에 의해 발현된 CD163의 130 kDa 당형태에 특이적으로 결합하지 않는다.

[0033] 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 Fc 수용체에 대한 결합을 가능하게 하는 불변 도메인을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 수용체는 대식세포 상에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 단일 중쇄, 단일 경쇄, Fab, Fab', F(ab)', F(ab')₂, Fd, scFv, 가변 중쇄 도메인, 가변 경쇄 도메인, 가변 도메인, 이중특이적 scFv, 이중특이적 Fab2, 삼중특이적 Fab3 단일 사슬 결합 폴리펩티드, dAb 단편 또는 디아바디를 포함하는 항체 단편을 갖는다. 일부 실시양태에서, 인간 대식세포 상의 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15(Siglec-15)이다. 일부 실시양태에서, 인간 대식세포는 M2 대식세포 또는 M2-유사 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 인간 대식세포는 M2a, M2b, M2c 또는 M2d 대식세포이다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질은 대식세포에 의해 발현되는 적어도 하나의 다른 단백질을 포함하는 세포 표면 복합체의 성분이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 다른 단백질은 갈락틴-1 단백질, LILRB2 단백질, 카제인 키나제 II 단백질 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질과 결합 시, 항체 또는 항체는 인간 대식세포에 의해 내재화된다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 대식세포에 세포독성이 아니다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 CD4⁺ T 세포 활성화, CD4⁺ T 세포 증식, 또는 CD4⁺ T 세포 활성화와 증식 둘다를 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 CD4⁺ T 세포에 의한 CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 CD8⁺ T 세포 활성화, CD8⁺ T 세포 증식, 또는 CD8⁺ T 세포 활성화와 증식 둘다를 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 CD8⁺ T 세포에 의한 ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 종양 미세환경에서 면역억제를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 암 세포의 세포독성 림프구-매개 사멸을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에

대한 결합은 NK 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 T 세포에 의한 IL-2 발현을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 $CD4^{+}$ T 세포, $CD196^{-}$ T 세포, $CXCR3^{+}$ T 세포, $CCR4^{-}$ T 세포 또는 이들의 임의의 조합을 증가시킨다.

[0034] 일부 실시양태에서, CD163에 대한 결합은 대식세포에 의해 유발된 종양 미세환경에서의 면역억제를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 인간 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고, 여기서 결합은 다음의 효과 중 적어도 하나를 초래한다: (a) 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 상기 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다; (b) 대식세포에 의한 항체의 내재화; (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및 (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진. 일부 실시양태에서, 결합은 (a) 내지 (e) 중 2개 이상; (a) 내지 (e) 중 3개 이상; (a) 내지 (e) 중 4개 이상; 또는 (a) 내지 (e) 모두를 초래한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 종양 미세환경에서 CD163⁺ 면역억제성 골수 세포에 특이적으로 결합하고, 여기서 결합은 종양 미세환경에서 종양 세포의 세포독성 T 세포-매개 사멸의 억제를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 따라서 암의 치료 방법에서 사용하기 위해, 인간 종양 관련 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고 대식세포에 의한 CD16, CD64, TLR2, 시글렉-15 또는 이들의 조합의 발현을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합은 종양 미세환경에서 세포의 면역 기능을 조절한다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합은 항종양 면역 기능을 촉진한다.

[0035] 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 CD163 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하는 CD163 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CD163 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 각각 서열번호 18, 서열번호 19 및 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 CD163 에피토프에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 1 nM 내지 100 nM의 K_D 로 CD163에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 1 nM 내지 50 nM의 K_D 로 CD163에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 1 nM 내지 10 nM의 K_D 로 CD163에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 CD163은 인간 CD163이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 1 nM 내지 100 nM의 K_D 로 M2c 대식세포에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 1 nM 내지 50 nM의 K_D 로 M2c 대식세포에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 1 nM 내지 10 nM의 K_D 로 M2c 대식세포에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, M2c 대식세포는 인간 M2c 대식세포이다.

[0036] 소정 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체 및 부형제를 포함하는 조성물이 본원에 개시된다.

[0037] 소정 실시양태에서, 이전 실시양태 중 어느 하나의 항체 또는 재조합 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물이 본원에 개시된다.

[0038] 소정 실시양태에서, 인간 대상체에서 암을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 이전 실시양태 중 어느 하나의 항체 또는 재조합 항체의 용도가 본원에 개시된다.

[0039] 소정 실시양태에서, 암을 갖는 인간 대상체에서 종양 관련 대식세포에 의한 면역억제를 감소시키는 약제의 제조를 위한 이전 실시양태 중 어느 하나의 항체 또는 재조합 항체의 용도가 본원에 개시된다.

[0040] 소정 실시양태에서, 암을 갖는 인간 대상체에서 T 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 약제의 제조를 위한 이전 실시양태 중 어느 하나의 항체 또는 재조합 항체의 용도가 본원에 개시된다.

[0041] 소정 실시양태에서, 면역 세포 기능을 촉진하는 방법으로서, 이전 실시양태 중 어느 하나의 항체 또는 재조합 항체를 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계, 및 다음의 매개변수 중 하나 또는 둘다에 의해 측정되는 면역 세포 기능을 촉진하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다: (i) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; 및 (ii) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식. 일부 실시양태에서, $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화는 IFN- γ

TNF- α 또는 퍼포린 또는 이들의 임의의 조합의 증가된 수준으로서 측정된다. 일부 실시양태에서, 면역억제성 인간 골수 세포는 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 면역억제성 인간 골수 세포는 골수 유래 억제 세포이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 이전 실시양태 중 어느 하나의 항체 또는 재조합 항체이다.

[0042] 소정 실시양태에서, 암 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 이전 실시양태 중 어느 하나의 항체 또는 재조합 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0043] 소정 실시양태에서, 암 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 이전 실시양태 중 어느 하나의 항체 또는 재조합 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여하고, 이에 의해 개체에서 종양 관련 대식세포에 의한 면역억제가 감소되는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0044] 소정 실시양태에서, 암 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 이전 실시양태 중 어느 하나의 항체 또는 재조합 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여하고, 이에 의해 개체에서 T 세포-매개 종양 세포 사멸이 증가되는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0045] 소정 실시양태에서, 종양 관련 대식세포의 종양 촉진 활성의 감소를 필요로 하는 개체에서 종양 관련 대식세포의 종양 촉진 활성을 감소시키는 방법으로서, 종양 미세환경에서 $CD4^+$ T 세포 활성화, $CD4^+$ T 세포 증식, $CD8^+$ T 세포 활성화, $CD8^+$ T 세포 증식 또는 이들의 임의의 조합을 조절하기에 유효한 양의 이전 실시양태 중 어느 하나의 약학 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0046] 소정 실시양태에서, 림프구-매개 종양 세포 사멸의 촉진을 필요로 하는 개체에서 림프구-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 방법으로서, 이전 실시양태 중 어느 하나의 항체 또는 재조합 항체 또는 이전의 실시양태 중 어느 하나의 약학 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0047] 일부 실시양태에서, 방법은 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 폐암 또는 육종이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 폐 암종 또는 폐 선암종이다. 일부 실시양태에서, 방법은 개체에게 추가 항암 치료제 또는 항암 요법을 실시하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가 항암 요법은 수술 요법, 화학요법, 방사선 요법, 냉동요법, 호르몬 요법, 면역요법, 및 사이토 킨 요법, 및 이들의 조합이다. 일부 실시양태에서, 추가 항암 요법은 면역요법이다. 일부 실시양태에서, 면역요법은 체크포인트(checkpoint) 억제제를 포함하는 조성물이다.

[0048] 소정 실시양태에서, 종양 미세환경에서 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하는 방법으로서, 종양 관련 대식세포를 CD163-발현 인간 대식세포에 결합하고 다음의 효과 중 적어도 하나를 포함하는 항체 또는 재조합 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다: (a) 항체의 결합은 대식세포 상에서 적어도 하나의 마커의 발현을 감소시키고, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다; (b) CD163 단백질과 결합 시, 항체는 인간 대식세포에 의해 내재화된다; (c) 항체의 결합은 대식세포에 세포독성이 아니다; (d) 항체 또는 재조합 항체의 결합은 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합에 의해 IFN- γ , TNF- α , 퍼포린 또는 이들의 임의의 조합을 생성한다; (e) 항체 또는 재조합 항체의 결합은 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화를 촉진한다; (f) 항체 또는 재조합 항체의 결합은 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식을 촉진한다; 및 (g) 항체 또는 재조합 항체의 결합은 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 결합은 (a) 내지 (g) 중 2개 이상; (a) 내지 (g) 중 3개 이상; (a) 내지 (g) 중 4개 이상; (a) 내지 (g) 중 5개 이상; (a) 내지 (g) 중 6개 이상; 또는 (a) 내지 (f) 모두를 초래한다.

[0049] 일부 실시양태에서, 방법은 종양 미세환경에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 방법은 생체내에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합은 종양 미세환경에서 세포의 면역 기능을 조절한다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체 또는 재조합 항체의 결합은 항종양 면역 기능을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 재조합 항체는 불변 도메인을 포함하고 불변 도메인은 Fc 수용체에 결합한다. 일부 실시양태에서, Fc 수용체는 대식세포 상에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 방법은 CD163 단백질과 결합 시 인간 대식세포에 의해 항체 또는 재조합 항체가 내재화되는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 인간 대식세포에 세포독성이 아니다. 일부 실시양태에서, 방법은 $CD4^+$ T 세포에 의한 CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진하는 것을 추가로 포함한다. 일부

실시양태에서, 방법은 $CD8^+$ T 세포에 의한 ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 방법은 종양 미세환경에서 면역억제를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 방법은 암 세포의 세포독성 림프구-매개 사멸을 촉진하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 NK 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 T 세포에 의한 IL-2 발현을 촉진하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 $CD4^+$ T 세포, $CD196^-$ T 세포, $CXCR3^+$ T 세포, $CCR4^-$ T 세포 또는 이들의 임의의 조합을 증가시키는 것을 포함한다.

[0050] 소정 실시양태에서, 면역억제성 인간 골수 세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시되고, 여기서 골수 세포에 대한 상기 항체의 결합은 다음의 매개변수 중 하나 또는 둘다에 의해 측정되는 면역 세포 기능을 촉진한다: (i) $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; 및 (ii) $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식. 일부 실시양태에서, 면역억제성 인간 골수 세포는 대식세포 또는 골수 유래 억제 세포이다. 일부 실시양태에서, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화는 IFN- γ , TNF- α , 퍼포린 또는 이들의 임의의 조합의 생산 증가로서 측정된다.

[0051] 소정 실시양태에서, 인간 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시되고, 여기서 대식세포에 대한 상기 항체의 결합은 다음의 매개변수 중 하나 또는 둘다에 의해 측정되는 면역 세포 기능을 촉진한다: (i) $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; 및 (ii) $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식. 일부 실시양태에서, 면역 세포 기능은 종양 미세환경에 있다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 기능은 생체내이다. 일부 실시양태에서, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화는 IFN- γ , TNF- α , 퍼포린 또는 이들의 임의의 조합의 생산 증가로서 측정된다.

[0052] 소정 실시양태에서, 인간 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시되고, 여기서 대식세포에 대한 상기 항체의 결합은 종양 미세환경에서 면역자극 활성을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 종양 미세환경은 생체내이다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체의 결합은 대식세포의 면역억제 활성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체의 결합은 대식세포의 종양 촉진 활성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 대식세포는 종양 관련 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 항체는 대식세포 상의 적어도 하나의 마커의 발현을 변경한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질은 CD163의 당형태이다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질은 CD163의 150 kDa 당형태이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 대식세포에 의해 발현되는 CD163의 130 kDa 당형태에 특이적으로 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 Fc 수용체에 대한 결합을 가능하게 하는 불변 도메인을 갖는다. 일부 실시양태에서, Fc 수용체는 대식세포 상에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 단일 중쇄, 단일 경쇄, Fab, Fab', F(ab)', F(ab')₂, Fd, scFv, 가변 중쇄 도메인, 가변 경쇄 도메인, 가변 도메인, 이중특이적 scFv, 이중특이적 Fab₂, 삼중특이적 Fab₃ 단일 사슬 결합 폴리펩티드, dAb 단편 또는 디아바티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 대식세포 상의 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다. 일부 실시양태에서, 인간 대식세포는 M2 대식세포 또는 M2-유사 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 인간 대식세포는 M2a, M2b, M2c 또는 M2d 대식세포이다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질은 대식세포에 의해 발현되는 적어도 하나의 다른 단백질을 포함하는 세포 표면 복합체의 성분이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 다른 단백질은 갈렉틴-1 단백질, LILRB2 단백질, 카제인 키나제 II 단백질 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질과 결합 시, 항체는 인간 대식세포에 의해 내재화된다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 대식세포에 세포독성이 아니다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 $CD4^+$ T 세포 활성화, $CD4^+$ T 세포 증식, 또는 $CD4^+$ T 세포 활성화와 증식 둘다를 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 $CD4^+$ T 세포에 의한 CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 $CD8^+$ T 세포 활성화, $CD8^+$ T 세포 증식, 또는 $CD8^+$ T 세포 활성화와 증식 둘다를 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 $CD8^+$ T 세포에 의한 ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 종양 미세환경에서 면역억제를 감소시킨다. 일부 실시양태에서,

CD163 단백질에 대한 결합 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 암 세포의 세포독성 림프구-매개 사멸을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 NK 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 T 세포에 의한 IL-2 발현을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 $CD4^{+}$ T 세포, $CD196^{-}$ T 세포, $CXCR3^{+}$ T 세포, $CCR4^{-}$ T 세포 또는 이들의 임의의 조합을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, CD163에 대한 결합은 대식세포에 의해 유발된 종양 미세환경에서의 면역억제를 감소시킨다.

[0053] 소정 실시양태에서, 인간 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시되며, 여기서 결합은 다음의 효과 중 적어도 하나를 초래한다: (a) 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다; (b) 대식세포에 의한 항체의 내재화; (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및 (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진. 일부 실시양태에서, 결합은 (a) 내지 (e) 중 2개 이상; (a) 내지 (e) 중 3개 이상; (a) 내지 (e) 중 4개 이상; 또는 (a) 내지 (e) 모두를 초래한다. 일부 실시양태에서, $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화는 IFN- γ , TNF- α , 퍼포린 또는 이들의 임의의 조합의 생산 증가로서 측정된다.

[0054] 소정 실시양태에서, 종양 미세환경에서 $CD163^{+}$ 면역억제성 골수 세포에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시되고, 여기서 결합은 종양 미세환경에서 종양 세포의 세포독성 T 세포-매개 사멸의 억제를 감소시킨다.

[0055] 소정 실시양태에서, 암의 치료 방법에서 사용하기 위한, 인간 종양 관련 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고 대식세포에 의한 CD16, CD64, TLR2, 시글렉-15 또는 이들의 조합의 발현을 감소시키는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체의 결합은 종양 미세환경에서 세포의 면역 기능을 조절한다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체의 결합은 항종양 면역 기능을 촉진한다.

[0056] 일부 실시양태에서, 조성물은 본원에 개시된 임의의 실시양태에 따른 항체 및 부형제를 포함한다.

[0057] 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 본원에 개시된 임의의 실시양태에 따른 항체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0058] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체의 용도는 인간 대상체에서 암을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 것이다.

[0059] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체의 용도는 암을 갖는 인간 대상체에서 종양 관련 대식세포에 의한 면역억제를 감소시키는 약제의 제조를 위한 것이다.

[0060] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체의 용도는 암을 갖는 인간 대상체에서 T 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 약제의 제조를 위한 것이다.

[0061] 소정 실시양태에서, 면역 세포 기능을 촉진하는 방법으로서, 항체를 면역억제성 인간 골수 세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합시키는 단계; 및 다음의 매개변수 중 하나 또는 둘다에 의해 측정되는 면역 세포 기능을 촉진하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다: (i) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화; 및 (ii) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식. 일부 실시양태에서, 면역억제성 인간 골수 세포는 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 면역억제성 인간 골수 세포는 골수 유래 억제 세포이다. 일부 실시양태에서, 항체는 본원에 개시된 임의의 실시양태이다.

[0062] 소정 실시양태에서, 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나의 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여함으로써 개체에서 암을 치료하는 것을 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0063] 소정 실시양태에서, 암 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나의 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여하고, 이에 의해 개체에서 종양 관련 대식세포에 의한 면역억제가 감소되는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0064] 소정 실시양태에서, 암 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나의 항체의 치료 유효량을 개체에게 투여하고, 이에 의해 개체에서 T 세포-매개 종양 세포 사멸이 증가되

는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 암은 폐암 또는 육종이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 폐 암종 또는 폐 선암종이다.

[0065] 소정 실시양태에서, 종양 관련 대식세포의 종양 촉진 활성의 감소를 필요로 하는 개체에서 종양 관련 대식세포의 종양 촉진 활성을 감소시키는 방법으로서, 종양 미세환경에서 $CD4^+$ T 세포 활성화, $CD4^+$ T 세포 증식, $CD8^+$ T 세포 활성화, $CD8^+$ T 세포 증식 또는 이들의 임의의 조합을 조절하기에 유효한 양의 청구항 43에 따른 약학 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 방법은 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진하는 것을 추가로 포함한다.

[0066] 소정 실시양태에서, 림프구-매개 종양 세포 사멸의 촉진을 필요로 하는 개체에서 림프구-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 방법으로서, 본원에 개시된 실시양태 중 어느 하나의 약학 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0067] 소정 실시양태에서, 종양 미세환경에서 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하는 방법으로서, 종양 관련 대식세포를 CD163-발현 인간 대식세포에 결합하고 다음의 효과 중 적어도 하나의 효과를 포함하는 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다: (a) 항체의 결합은 대식세포 상에서 적어도 하나의 마커의 발현을 감소시키고, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다; (b) 항체와 CD163 단백질의 결합 시, 항체는 인간 대식세포에 의해 내재화된다; (c) 항체의 결합은 대식세포에 세포독성이 아니다; (d) 항체의 결합은 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화를 촉진한다; (e) 항체의 결합은 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식을 촉진한다; 및 (f) 항체의 결합은 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 결합은 (a) 내지 (f) 중 2개 이상; (a) 내지 (f) 중 3개 이상; (a) 내지 (f) 중 4개 이상; (a) 내지 (f) 중 5개 이상; 또는 (a) 내지 (f) 모두를 초래한다. 일부 실시양태에서, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화는 $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, 퍼포린 또는 이들의 임의의 조합의 생산 증가로서 측정된다. 일부 실시양태에서, 방법은 종양 미세환경에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 방법은 생체내에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체의 결합은 종양 미세환경에서 세포의 면역 기능을 조절한다. 일부 실시양태에서, 대식세포에 대한 항체의 결합은 항종양 면역 기능을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 항체는 Fc 수용체에 결합하는 불변 도메인 및 불변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 수용체는 대식세포 상에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 방법은 CD163 단백질과 결합 시 인간 대식세포에 의해 항체가 내재화되는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 결합은 인간 대식세포에 세포독성이 아니다. 일부 실시양태에서, 방법은 $CD4^+$ T 세포에 의한 CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 $CD8^+$ T 세포에 의한 ICOS, OX40, PD1, LAG3, CTLA4 또는 이들의 임의의 조합의 발현을 촉진하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 종양 미세환경에서 면역억제를 감소시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포독성 림프구-매개 암 세포 사멸을 촉진하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 NK 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 T 세포에 의한 IL-2 발현을 촉진하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 $CD4^+$ T 세포, $CD196^-$ T 세포, $CXCR3^+$ T 세포, $CCR4^-$ T 세포 또는 이들의 임의의 조합을 증가시키는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0068] 본 개시내용의 신규 특징은 첨부된 청구범위에서 구체적으로 설명된다. 본 개시내용의 특징 및 이점에 대한 더 나은 이해는 본 개시내용의 원리가 이용되는 예시적인 실시양태를 설명하는 다음의 상세한 설명 및 첨부 도면을 참조함으로써 얻어질 것이다.

도 1은 인간 MDSC 집단에 대한 AB101 항체 결합을 도시한다.

도 2는 AB101이 $CD163^{Hi}$ 세포에 결합한다는 것을 도시한다.

도 3은 이소형 대조군과 비교하여 인간 M2c, M1 및 M0에 대한 AB101 결합을 도시한다.

도 4는 인간 말초혈 T 세포, B 세포, NKT 세포, 호중구, 단핵구 및 수지상 세포에 대한 AB101 결합을 도시하며, 여기서 이소형 대조군은 회색으로 도시되어 있고 AB101 결합은 검은색으로 도시되어 있다.

도 5는 소기도 상피 세포(small airway epithelial cell: SAEC), 신장 근위 세뇨관 상피 세포(RPTEC), 폐 미세 혈관 내피 세포(HMVEC), 제대 정맥 내피 세포(HUVEC), 대동맥 평활근 세포(AOSMC) 및 각질세포를 포함하는 인간 1차 세포의 패널에 대한 AB101의 결합이 없음을 도시한다.

도 6a는 면역침전 후 샘플의 질량 분광법 분석에 기반한 AB102에 대한 상위 20개 표적을 도시한다.

도 6b는 면역침전 후 샘플의 질량 분광법 분석에 기반한 AB102에 대한 상위 세포 표면 표적을 도시한다.

도 6c는 면역침전 후 AB102 및 ISO 샘플의 질량 분광법 분석에 기반하여 ISO(이소형 음성 대조군)와 비교한 AB102에 대한 상위 세포 표면 표적을 도시한다.

도 7은 AB102가 CD163의 별개의 고분자량 당형태를 공동면역침전시킨다는 것을 도시한다.

도 8은 AB101, AB102 및 대조군 CD163 항체가 huCD163에 결합하는 반면, 이소형 대조군은 인지 가능한 결합을 나타내지 않음을 도시한다.

도 9는 무린 CD163에 결합한 상업적으로 입수가 가능한 항-muCD163 항체와 비교하여 AB101 또는 대조군 항-huCD163 항체 어느 것도 제조함 무린 CD163에 결합하지 않았음을 도시한다.

도 10은 AB101의 결합을 차단하지 않은 염소 대조군 다클론 항체로의 처리와 비교하여 다클론 항-CD163 항체로의 M2c 대식세포의 사전처리가 AB101 항체의 결합을 차단하였음을 도시한다.

도 11은 대조군 단클론 항-huCD163 항체의 결합을 차단하지 않은 염소 대조군 다클론 항체로의 처리와 비교하여 다클론 항-CD163 항체로의 M2c 대식세포의 사전처리가 대조군 단클론 항-huCD163 항체의 결합을 차단하였음을 도시한다.

도 12는 스크램블된 siRNA(siScramb) 처리된 또는 siRNA 처리되지 않은 M2c 대식세포와 비교하여 CD163에 대한 siRNA로의 분극화된 M2c 대식세포의 처리가 AB102 항체의 결합을 실질적으로 감소시켰음을 도시하며 3개의 반복 물을 대표한다.

도 13은 CD163의 siRNA 녹다운이 AB102 항체의 결합을 감소시켰고, FCGR2A + FCGR3A(공여자 3명 중 1명에서), FCGR2C, 또는 FCGR3A에 대한 siRNA를 사용한 녹다운 후 AB102 항체 결합의 약간의 감소, 및 siCD206; siCD163L1; siPPIA; siLGALS1; siLGALS3; siLILRB2; 및 siUPAR을 사용한 녹다운 후 AB102 결합 감소의 증거가 없음을 도시한다.

도 14는 배양된 M2 대식세포를 LPS로 처리하는 것이 AB101 항체 및 대조군 항-CD163 항체 둘다에 의한 결합 손실을 초래하였음을 도시한다.

도 15는 골수 세포를 AB101 항체로 처리한 후 증가된 IL-2 생산을 도시한다.

도 16은 분극화 동안 AB101 항체 처리가 CD4⁺ T 세포 증식을 촉진하였음을 도시한다.

도 17은 분극화 동안 AB101 항체 처리가 CD8⁺ T 세포 증식을 촉진하였음을 도시한다.

도 18은 분극화 동안(그래프에 "사전"으로 표시됨), 분극화 후(그래프에 "사후"로 표시됨) 또는 조합된 분극화 동안과 분극화 후(그래프에서 "사전 및 사후"로 표시됨) AB101 항체로의 처리가 이소형 항체 처리에 비해 향상된 IL-2 생산을 초래하였음을 도시한다.

도 19는 AB101 항체로의 M2 대식세포 처리가 CD16, CD64, 칼레티쿨린 및 시글렉-15의 발현을 감소시켰음을 도시한다.

도 20은 AB101로의 M2c 세포 처리가 이소형 대조군과 비교하여 Th1/Th2 비율을 증가시켰음을 도시한다.

도 21은 AB101로의 M2c 세포 처리가 이소형 대조군과 비교하여 CD4 T 세포 상의 CD69 발현을 증가시켰음을 도시한다.

도 22는 AB101로의 M2c 세포 처리가 이소형 대조군과 비교하여 CD4 T 세포 상의 ICOS 발현을 증가시켰음을 도시한다.

도 23은 AB101로의 M2c 세포 처리가 이소형 대조군과 비교하여 CD4 T 세포 상의 OX40 발현을 증가시켰음을 도시한다.

도 24는 BiTE의 존재 하에 증가된 CTL이 이소형 대조군과 비교하여 증가된 라지(Raji) 종양 세포 사멸을 초래하였음을 도시한다.

도 25는 AB102 항체뿐만 아니라 상업적 항-CD163 항체(R&D Systems MAB1607-100)가 대체로 내재화되었고 상업적 CD163 항체의 것보다 약 2배 더 많은 AB101 항체가 내재화되었음을 도시한다.

도 26은 30일에 걸쳐 A549 종양에 대해 플롯팅된 종양 체적을 도시한다. 화살표는 항체 처리 주사를 나타낸다. 각 점은 7마리 마우스의 평균 측정값을 나타낸다. 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM)를 나타낸다. 통계적 유의성은 만-위트니(Mann-Whitney) 검정을 사용하여 계산하였다.

도 27은 30일에 걸쳐 H1975 종양에 대해 플롯팅된 종양 체적을 도시한다. 화살표는 항체 처리 주사를 나타낸다. 각 점은 7마리 마우스의 평균 측정값을 나타낸다. 오차 막대는 평균의 표준 오차(SEM)를 나타낸다. 통계적 유의성은 만-위트니 검정을 사용하여 계산하였다.

도 28은 T 세포 증식 및 IL-2 생산에 미치는 AB101 처리의 효과를 평가하기 위한 M2c/T 세포 공동배양 분석에 대한 실험 설계를 도시한다.

도 29는 M2c 대식세포 분극화 동안 AB101로의 처리가 M2c/T 세포 공동배양 분석에서 T 세포 증식을 회복시켰음을 도시한다.

도 30은 M2c 대식세포 분극화 동안 AB101로의 처리가 M2c/T 세포 공동배양 분석에서 OKT3 활성화된 T 세포에 의한 IL-2 분비를 향상시켰음을 도시한다.

도 31은 레지멘(regimen)-전, 전/후 및 -후에 AB101로의 처리가 M2c/T 세포 공동배양 분석에서 CD8⁺ T 세포 증식을 증가시켰음을 도시한다.

도 32는 레지멘-전, 전/후 및 -후에 AB101로의 처리가 개별 대상체에 대한 M2c/T 세포 공동배양 분석에서 CD8⁺ T 세포 증식을 증가시켰음을 도시한다.

도 33은 AB101 처리가 다수의 대상체로부터의 M2c/공동배양물에서 CD8⁺ T 세포 증식을 향상시켰음을 도시한다.

도 34는 AB101 처리가 다수의 대상체로부터의 M2c/공동배양물에서 CD4⁺ T 세포 증식을 향상시켰음을 도시한다.

도 35는 AB101 처리가 M2c/공동배양 동안 다수의 인간으로부터의 T 세포에 의한 IL-2 생산을 향상시켰음을 도시한다.

도 36은 AB101이 M2c/T 세포 공동배양 분석에서 T 세포 증식을 향상시키는데 있어 AB104 및 AB102 이소형보다 더 강력하다는 것을 도시한다.

도 37은, 레지멘-전, 전/후 및 -후에 AB101은 M2c 매개 면역 억제로부터 CD8⁺ T 세포 증식을 구제(rescue)하였지만 AB104는 그렇지 않았음을 도시한다.

도 38은 AB101이 M2c/T 세포 공동배양 분석에서 CD8⁺ T 세포 사이토카인 반응을 회복시켰음을 도시한다.

도 39는 AB101이 M2c 대식세포 매개 면역 억제로부터 CD4⁺ T 세포 IFN- γ , TNF- α 및 퍼포린 반응을 구제하였음을 도시한다.

도 40은 AB101 처리가 CD8⁺ T 세포의 세포독성 활성을 향상시켰음을 도시한다.

도 41은 AB101 처리가 CD8⁺ T 세포의 BiTE®-보조된 세포독성 활성을 향상시켰음을 도시한다.

도 42는 AB101 처리가 비-HLA 제한된 CD8⁺ T 세포의 세포독성 활성을 향상시켰음을 도시한다.

도 43은 AB101 처리가 M2c 세포 매개 면역 억제를 완화하였고 활성화된 CD4⁺ T 세포에 의한 독특한 발현 패턴을 유도함을 도시한다.

도 44는 AB101 처리가 M2c 대식세포 면역 억제를 완화하고 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 활성화를 향상시켰음을 도시한다.

도 45는 활성화된 $CD4^+$ T 세포에 의한 CXCR3 발현을 도시한다.

도 46은 M2c 대식세포의 분극화 동안 AB101 처리가 M2c 대식세포에 의한 CD16, CD64, Siglex-15 및 TLR2의 발현을 감소시켰음을 도시한다.

도 47은 huCD163에 결합된 AB101의 펩신 분해에 기반한 변화의 요약을 도시한다.

도 48은 huCD163에 결합된 AB101의 네펜테신 II 분해에 기반한 변화의 요약을 도시한다.

도 49는 HDX-MS 연구에 기반한 인간 CD163 ECD에 대한 AB101 결합의 개략도를 도시한다.

도 50은 AB101이 SRCR 도메인 1-5로 구성된 절두된(truncated) CD163 ECD에 결합함을 도시한다.

도 51은 시노물구스 CD163에 대한 인간 CD163의 정렬을 도시한다. 신호 서열, 검은색 막대 아래의 서열은 9개의 SRCR 도메인을 나타내고 서열 위의 회색 선은 컨센서스 서열을 나타낸다. 보호된 영역 및 노출된 영역은 HDX-MS에서 관찰된 보호에 의해 결정된 AB101 결합 에피토프에 기반하여 도시되어 있다. 서열 아래의 실선은 네펜테신 II 보호된 영역을 나타낸다. 서열 아래의 윤곽선 박스는 펩신 보호된 영역을 나타낸다. 서열 아래의 빗금친 박스는 펩신 노출된 영역을 나타낸다. 서열 아래의 세로 줄무늬 박스는 네펜테신 II 노출된 영역을 나타낸다. 인간 CD163의 323번 위치에 있는 리신(K) 및 시노물구스 CD163의 글루탐산(E)은 박스로 표시되어 있다.

도 52는 AB101이 인간 및 시노물구스 E323K 돌연변이체에 결합하지만 야생형 시노물구스 CD163 ECD에는 결합하지 않음을 도시한다.

도 53은 인간 CD163에 대한 AB101의 결합의 SPR 검출을 도시한다. AB101은 (A) EDTA 또는 (B) 칼슘-함유 실행 완충제를 사용하여 상이한 농도로 연속 희석하였다. 그 다음, GHI/61을 30 μ l/분의 유속, 6.25/12.5/25/50/100/200 μ g/mL의 농도, 300초의 접촉 시간 및 600초의 해리 시간으로 유동 셀 2에 주사하였다.

도 54는 인간 CD163에 대한 GHI/61의 결합의 SPR 검출을 도시한다. 항-CD163 클론 GHI/61을 (A) EDTA 또는 (B) 칼슘-함유 실행 완충제를 사용하여 상이한 농도로 연속 희석하였다. 그 다음, GHI/61을 30 μ l/분의 유속, 3.125/6.25/12.5/25/50/100 μ g/mL의 농도, 300초의 접촉 시간 및 600초의 해리 시간으로 유동 셀 2에 주입하였다.

도 55는 AB101에 대한 CD163의 결합의 SPR 검출을 도시한다. 인간 CD163 단백질은 칼슘-함유 실행 완충제를 사용하여 상이한 농도로 연속 희석하였다. 그 다음, CD163 단백질을 30 μ l/분의 유속, 1.25/2.5/5.0/10.0/20.0/40.0 μ g/mL의 농도, 300초의 접촉 시간 및 600초의 해리 시간으로 유동 셀 2에 주입하였다.

도 56은 AlphaLisa 분석에서 가용성 CD163에 대한 AB101의 결합을 도시한다. AB101(원) 또는 이소형 대조군(삼각형)을 표시된 농도에서 1시간 동안 750 nM CD163-His와 함께 인큐베이션하였다. 비오틴화된 항-hIgG1 mAb, 스트렙타비딘 수용기 및 니켈 공여기 비드를 사용하여 AlphaLisa에 의해 결합을 정량화하였다. 기호는 5개의 독립적인 측정값의 평균 $\pm$ 표준 오차를 나타낸다. 곡선 맞춤은 1 및 2-부위 포화 결합 모델(GraphPad Prism)을 사용하여 수행하였다. ($R^2 = 0.92$). (A) 선형 및 (B) 로그 x-축 스케일.

도 57은 M1c 대식세포에 대한 AB101 결합을 도시한다. M2c 대식세포를 0.5 mg/ml 인간 IgG1을 함유하는 엄격한 FACS 차단 완충제로 차단시킨 다음, 표시된 농도에서 30분 동안 AB101(원) 또는 이소형 대조군(삼각형)으로 염색하였다. M2c 대식세포에 대한 AlexaFluor 647 표지된 AB101 및 이소형 대조군의 결합을 형광 강도에 의해 정량화하고 gMFI로서 보고하였다. 기호는 4명의 연구 대상체의 평균 $\pm$ 표준 오차를 나타낸다. 곡선 맞춤은 2-부위 포화 결합 모델(GraphPad Prism)을 사용하여 수행하였다. ($R^2 = 0.99$). (A) 선형 및 (B) 로그 x-축 스케일.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069]

CD163⁺ 세포에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, CD163⁺ 세포는 면역억제성 골수 세포이다. 일부 실시양태에서, CD163⁺ 세포는 인간 CD163 발현 골수이다. 일부 실시양태에서, CD163⁺ 세포는 종양 세포이다. 일부 실시양태에서, CD163⁺ 면역억제성 골수 세포는 인간 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 인간 CD163⁺ 면역억제성 대식세포는 M2 또는 M2-유사 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 면역억제성 골수 세포는

골수 유래 억제 세포(MDSC)이다. 일부 실시양태에서, 인간 대식세포는 높은 수준의 CD163 (CD163^{hi})을 발현한다. 대조적으로, 다른 인간 조혈 세포 또는 1차 비-면역 인간 세포는 CD163을 발현하지 않는다. 예를 들어, M1 및 M1 유사 대식세포는 CD163을 발현하지 않는다.

[0070] 소정 염증성 사이토카인 또는 미생물 관련 분자 패턴에 노출된 단핵구 및 대식세포는 염증촉진성(pro-inflammatory)(M1 또는 M1-유사) 또는 소염 M2 또는 M2-유사 대식세포로 분화된다. M1 및 M2는 시험관내에서 활성화된 대식세포를 각각 염증촉진성(IFN- γ 및 지질다당류로 고전적으로 활성화된 경우) 또는 소염(IL-4 또는 IL-10으로 대안적으로 활성화된 경우)으로 정의하는 데 사용되는 분류인 반면, M1 또는 M2 표현형을 갖는 생체 내 또는 생체의 대식세포는 M1-유사 또는 M2-유사 대식세포로서 정의된다. 일부 실시양태에서, M2 대식세포는 소정 사이토카인에 대한 이의 노출에 의해 생성된다. 일부 실시양태에서, M2 대식세포는 IL-4, IL-10, IL-13, 또는 이들의 조합에 의해 분화된다.

[0071] M2 대식세포의 하위유형은 M2a, M2b, M2c 및 M2d 하위유형을 포함한다. M2a 대식세포는 IL-4 및 IL-13에 의해 유도되고, 이는 CD163의 상향조절된 발현, 아르기나제-1, 만노스 수용체 MRC1(CD206), MHC II 시스템에 의한 항원 제시, IL-10 및 TGF- β 의 생산을 촉발하여 조직 재생 및 염증촉진성 분자의 억제를 유도함으로써 염증 반응을 방지한다. M2b 대식세포는 면역 복합체에 대한 반응으로서 IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α 를 생성한다. M2c 대식세포는 IL-10, 형질전환 성장 인자 베타(TGF- β) 및 글루코코르티코이드 노출에 의해 유도되고, IL-10 및 TGF- β 를 생산하여 염증 반응을 억제한다. M2d 하위유형은 IL-6 및 아데노신에 대한 반응으로서 활성화된다.

[0072] M2 대식세포는 M2 대식세포 및 이의 하위유형에 상응하는 기능 및 표현형을 갖고 있다. M2-유사 대식세포는 M2 대식세포의 기능적 또는 표현형적 특성의 서브세트를 갖는 생체 내 또는 생체의 대식세포이다.

[0073] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 면역억제성 골수 세포, 특히 M2 및 M2-유사 대식세포와 같은 종양 관련 대식세포에 대해 높은 결합력(avidity) 및 특이적 결합을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 원발성 폐 종양으로부터의 M2 및 M2-유사 TAM에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 M1 또는 M1-유사 대식세포에 대한 인지 가능한 결합을 갖지 않는다. M1-활성화된 대식세포는 인터페론-조절성 인자(IRF5), 카파 경쇄 폴리펩티드 유전자 인핸서의 핵 인자(NF- κ B), 활성화제-단백질(AP-1) 및 STAT1과 같은 전사 인자를 발현한다. M1 대식세포는 IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 및 TNF α 와 같은 염증촉진성 사이토카인을 분비한다. M1 대식세포는 M1 대식세포에 상응하는 기능 및 표현형을 갖고 있다. M1-유사 대식세포는 M1 대식세포의 기능적 또는 표현형 특성의 서브세트를 갖는 생체 내 또는 생체의 대식세포이다.

[0074] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 1차 인간 세포에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 조혈 줄기 세포, 백혈구, T 세포, B 세포, NK 세포 및 과립구에 결합하지 않는다.

[0075] 종양 관련 대식세포(TAM)는 고형 종양의 미세환경에서 높은 수로 존재하는 대식세포의 불균질 부류이다. 대부분의 증거는 TAM이 종양 세포 증식, 종양 혈관 신생, 운동성 및 침윤, 전이, 항암 약물 내성 및 종양 면역 회피에 관여하는 것으로 보이는 종양 촉진 표현형을 갖는다고 제시하고 있다.

[0076] 종양 침윤 림프구(TIL) 중에서 세포독성 T 세포에 의한 직접적인 종양 세포 사멸은 면역계의 항종양 기능에서 중요한 역할을 한다. 그러나, 종양 미세환경(TME)의 TAM은 T 세포 매개 항종양 면역 반응을 억제한다. TAM은 면역억제성 전사 프로그램을 가지며 IL-10 및 형질전환 성장 인자 β (TGF β)를 포함하는 인자를 발현한다. 인간에서, TAM은 간세포 암종에서의 프로그램된 사멸-리간드 1(PD-L1) 및 난소 암종에서의 B7-동족체의 표면 제시를 통해 T 세포 기능을 직접적으로 억제하는 것으로 나타났으며, 이는 T 세포 상에서 각각 프로그램된 세포 사멸 단백질 1(PD-1) 및 세포독성 T-림프구 관련 단백질 4(CTLA4)를 활성화한다. PD-1 및 CTLA4에 대한 억제 신호는 면역 체크포인트이며, 리간드에 의한 이들 억제성 수용체의 결합은 T 세포 수용체 신호전달 및 T 세포 세포독성 기능을 억제하고 T 세포 아포토시스를 촉진한다. HIF-1 α 는 TAM이 T 세포 기능을 억제하도록 유도한다. CD163은 TAM에서 단독으로 발현되는 면역억제 분자로서 식별되었고 암 면역요법의 잠재적인 치료 표적이 될 수 있다.

[0077] TAM은 일반적으로 T 헬퍼 세포(CD4⁺) 유형 Th1 및 Th2와의 관계를 포함하는 이들의 기능적 특성에 기반하여, M1-유사 항종양 및 M2-유사 면역억제성 대식세포의 2가지 범주로 나뉜다. M1 대식세포는 "고전적인" 모델이며 IFN- γ 와 선천성 면역 활성화제, 예컨대 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)(예를 들어, 지질다당류(LPS)) 또는 손상 관련 분자 패턴(DAMP)뿐만 아니라 염증성 사이토카인(예를 들어, 종양 괴사 인자-알파(TNF- α))에 의해 생성될 수 있다. 또한, CD40-CD40 리간드 경로를 통한 T 세포 의존성 대식세포 활성화는 M1 분화를 유도한다. M1 대식세포는 염증촉진성, 살균 및 세포독성 기능을 가지고 있다. 이들 대식세포는 Th1 세포의 항원-의존성 유도 및

Th1 및 CD8⁺ T 세포의 활성화를 촉진한다. M1-유사 항종양 대식세포에 의한 T 세포 세포독성 활성의 촉진은 종양 세포 제거에 중요하다. 일부 실시양태에서, M1-유사 항종양 대식세포는 유세포측정에 의해 측정된 표면 마커 발현을 특징으로 하며 CD80⁺ CD86⁺ CD163^{Lo/-} 또는 CD206^{Lo/-} 표현형을 갖는다. M1 대식세포는 IL-12를 분비하고 낮은 수준의 IL-10 및/또는 TGF-β를 분비한다.

[0078] 대조적으로, M2-유사 면역억제성 대식세포는 시험관내에서 IL-4 또는 IL-10으로 생성될 수 있는 "대안적" 또는 "비고전적" 활성화의 모델이며, 소염성이며 상처 치유 및 조직 복구를 촉진한다. 일부 실시양태에서, M2-유사 면역억제성 대식세포는 단핵구 유래 대식세포로부터 분극화되고 종양에 의해 분비된 인자에 의해 동원된다. M2-유사 면역억제성 대식세포는 종양 성장, 전이 및 면역 회피의 촉진을 포함하는 TAM의 종양 촉진 기능(pro-tumoral function)에 관여하는 주요 대식세포 세포 유형이다. M2-유사 대식세포는 표면 마커 CD15, CD23, CD64, CD68, CD163^{hi}, CD204^{hi}, CD206^{hi} 및/또는 유세포측정에 의해 결정되는 기타 M2 대식세포 마커를 발현한다. M2 대식세포는 높은 수준의 IL-10 및 TGF-베타1과 낮은 수준의 IL-12를 분비한다.

[0079] 많은 종양 유형에서, TAM 침윤 수준은 상당한 예후 가치를 갖는다. TAM은 다양한 종양에서 불량한 예후와 관련이 있었다. 예를 들어, 더 많은 M2-유사 종양 관련 대식세포가 있는 유방암 환자는 더 높은 등급의 종양, 더 큰 미세혈관 밀도 및 더 낮은 전체 생존율을 갖는 것으로 밝혀졌다. 더 많은 M1-유사 항종양 TAM을 갖는 환자는 반대 효과를 나타냈다.

[0080] 따라서, 암 치료의 면역치료적 치료를 개선하기 위한 화합물 및 방법을 식별할 필요가 남아 있다.

[0081] CD163(스캐빈저 수용체 시스테인-풍부 유형 1 단백질 M130; 헤모글로빈 스캐빈저 수용체)은 헤모글로빈-합토티로빈 복합체에 대한 스캐빈저 수용체로서 작용하고 유리 헤모글로빈-매개 산화 손상으로부터 조직을 보호하는 세포 표면 단백질이다. 125,451, 125,982, 121,609 및 124,958 Da의 분자량을 갖는 CD163 단백질의 4가지 이소형이 보고되었다. 이소형 1은 125,451 Da의 분자량을 갖고 세포외 도메인, 막관통 세그먼트 및 세포질 꼬리를 포함하는 1115개의 아미노산 잔기 폴리펩티드로 이루어진 CD163의 가장 일반적인 이소형이다. 세포외 도메인은 9개의 시스테인-풍부한 반복 도메인을 포함한다. CD163 단백질의 이소형 1은 4개의 N-연결된 글리코실화 부위를 가지며, M2 대식세포에서 CD163 단백질은 환원 조건 하에 SDS-PAGE에서 약 150kDa 및 약 130kDa의 2개의 별개의 밴드를 보여준다.

[0082] CD163 mRNA 발현은 일반적으로 골수 세포로 제한되지만, 소정 인간 암에서도 발현된다. TAM 상에서 CD163 발현은 암에서 불량한 임상 결과와 상관관계가 있는 것으로 나타난 면역억제성 M2-유사 표현형과 연관되었다. CD163은 인간 및 무린 육종에서 대식세포의 종양 활성화를 위해 요구된다. CD163은 또한 대식세포 스캐빈저 수용체인 것으로 보고되었으며 면역억제를 촉진한다. 일부 실시양태에서, 헤모글로빈-합토티로빈 복합체와 CD163의 상호작용은 면역억제성 사이토카인 IL-10의 분비 및 헵-옥시게나제-1(HO-1)의 발현을 유도한다. HO-1은 소염 대사산물 Fe²⁺, CO 및 빌리베르딘을 생산한다.

[0083] 가용성 CD163은 엑토도메인 shedding을 통해 인간에서 발생하고 피토헤마글루티닌(PHA) 또는 12-O-테트라데카노일포스폴-13-아세테이트(TPA)에 의해 자극된 림프구 증식을 포함하는 T-세포 반응을 하향조절하는 것과 같은 소염 특성을 갖는 것으로 보고되어 있다.

[0084] CD163을 표적으로 하는 항체는 대식세포를 발현하는 CD163의 선천성 면역 반응을 조절하는 것으로 나타났다. 예를 들어, CD163에 대한 항체인 RM3/1 항체는 인간 단핵구에 대해 생성된 마우스 단클론 IgG1(카파 경쇄)이다. RM3/1 항체는 인간 CD163의 시스테인-풍부 도메인 9에 결합하고 LPS-유도된 TNF α를 감소시키고, 대식세포에 의한 IL-10 분비를 향상시킨다.

[0085] 소정 용어

[0086] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 청구된 주제 대상이 속하는 기술 분야의 숙련자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본원에 기재된 면역학, 종양학, 세포 및 조직 배양, 분자생물학, 및 단백질 및 올리고- 또는 폴리뉴클레오타이드 화학 및 혼성화와 관련하여 사용되는 명명법 및 기술은 당업계에 널리 공지되어 있고 통상적으로 사용되는 것이다. 전술한 일반적인 설명 및 다음의 상세한 설명은 단지 예시적이고 설명적이며 청구된 임의의 주제 대상을 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용된 섹션 제목들은 단지 구조적 목적을 위한 것으로 설명된 주제 대상을 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

- [0087] 본원에 사용되는 바와 같이, 단수 형태 "a", "and" 및 "the"는 문맥상 달리 명확하게 나타내지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "항체"에 대한 언급은 복수의 항체를 포함하고 일부 실시양태에서 "항체"에 대한 언급은 다수의 항체 등을 포함한다.
- [0088] 본원에 사용되는 바와 같이, 모든 수치 또는 수치 범위는 문맥상 달리 명확하게 나타내지 않는 한, 상기 범위 내 또는 상기 범위를 포함하는 모든 정수 및 범위 내 또는 범위를 포함하는 값 또는 정수의 분수를 포함한다. 따라서, 예를 들어 90 내지 100% 범위에 대한 언급은 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 96%, 97% 등뿐 아니라, 91.1%, 91.2%, 91.3%, 91.4%, 91.5% 등, 92.1%, 92.2%, 92.3%, 92.4%, 92.5% 등등을 포함한다. 또 다른 예에서, 1 내지 5,000배의 범위에 대한 언급은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20배 등뿐 아니라, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5배 등, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5배 등등을 포함한다.
- [0089] 본원에 사용된 "약" 숫자는 숫자를 포함하고 그 숫자보다 10% 아래부터 그 숫자보다 10% 위까지 이르는 범위를 지칭한다. "약" 범위는 범위의 하한의 10% 아래에서부터 범위의 상한의 10% 위까지를 지칭한다.
- [0090] "퍼센트 동일성" 및 "% 동일성"은 2개의 서열(뉴클레오타이드 또는 아미노산)이 정렬 내의 동일한 위치에 동일한 잔기를 갖는 정도를 지칭한다. 예를 들어, "아미노산 서열은 서열번호 Y와 X% 동일하다"는 서열번호 Y에 대한 아미노산 서열의 % 동일성을 지칭하며 아미노산 서열 내의 잔기의 X%가 서열번호 Y에 개시된 서열의 잔기와 동일한 것으로 상술된다. 일반적으로, 컴퓨터 프로그램이 이러한 계산에 사용된다. 서열 쌍을 비교하고 정렬하는 예시적인 프로그램은 ALIGN(Myers and Miller, Comput Appl Biosci. 1988 Mar;4(1):11-7), FASTA(Pearson and Lipman, Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Apr;85(8):2444-8; Pearson, Methods Enzymol. 1990;183:63-98) 및 gapped BLAST(Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-40), BLASTP, BLASTN 또는 GCG(Devereux et al., Nucleic Acids Res. 1984 Jan 11;12(1 Pt 1):387-95)를 포함한다.
- [0091] 본원에 사용되는 바와 같이, "항체"는 항원에 결합하는 단백질을 지칭한다. 항체는 종종 중쇄 및 경쇄 각각에 가변 도메인 및 불변 도메인을 포함한다. 따라서, 대부분의 항체는 항원에 결합하는 항체의 일부분을 함께 형성하는 중쇄 가변 도메인(VH) 및 경쇄 가변 도메인(VL)을 갖는다. 각 가변 도메인 내에는, 중쇄 가변 도메인(VH) 및 경쇄 가변 도메인(VL) 내에 루프를 형성하고 항원의 표면과 접촉하는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)이 있다. "항체"는 다클론, 단클론, 단일특이적, 다중특이적(예를 들어, 이중특이적 항체), 천연, 인간화, 인간, 키메라, 합성, 재조합, 하이브리드, 돌연변이, 이식된, 항체 단편(예를 들어, 전장 항체의 일부분, 일반적으로 이의 항원 결합 또는 가변 영역, 예를 들어 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편), 및 항원-결합 활성을 갖는 시험관내 생성된 항체를 포함한다. 상기 용어는 또한 가변 중쇄 및 가변 경쇄가 (직접적으로 또는 펩티드 링커를 통해) 함께 연결되어 연속적인 폴리펩티드를 형성하는 단일 사슬 항체, 예를 들어 단일 사슬 Fv(sFv 또는 scFv) 항체를 포함한다.
- [0092] 본원에 사용되는 바와 같이, "상보성 결정 영역(CDR)"은 특정 항원에 결합하는 항체 내의 가변 사슬 부분을 지칭한다. CDR을 정의하기 위해 다수의 방법이 사용될 수 있다. 현재의 기술은 CDR 길이 및 위치의 상이한 정의를 이용한 다양한 번호매김 체계를 이용한다. 예를 들어, 카뎃(Kabat) 번호매김 체계는 서열 정렬에 기반하며 주어진 아미노산 위치의 "가변성 매개변수"(주어진 위치에서 상이한 아미노산의 수를 해당 위치에서 가장 많이 발생하는 아미노산의 빈도로 나눈 값)를 사용하여 CDR을 예측한다. 반면, 초티아(Chothia) 번호매김 체계는 루프 구조를 CDR로서 정의할 때 항체 결정 구조가 정렬되는 구조-기반 번호매김 체계이다. 마틴(Martin) 번호매김 체계는 비통상적 길이의 상이한 프레임워크 영역의 구조 정렬에 중점을 둔다. IMGT 번호매김 체계는 전체 면역글로불린 슈퍼패밀리를 포함하는 완전한 참조 유전자 데이터베이스로부터의 서열의 정렬에 기반한 표준화된 번호매김 시스템이다. 호네거(Honneger)의 번호매김 체계(AHo's)는 가변 영역의 3D 구조의 구조적 정렬에 기반하며 구조적으로 보존된 Ca 위치를 사용하여 프레임워크 및 CDR 길이를 추론한다. 당업자는 CDR의 정의가 사용된 방법에 따라 달라질 것이라는 점을 인지할 것이다. CDR을 정의하는 임의의 방법이 본원에 개시된 서열과 함께 고려된다.
- [0093] 용어 "수용자", "개체", "대상체", "숙주" 및 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 진단, 치료 또는 요법이 요망되는 임의의 포유동물 대상체, 특히 인간을 지칭한다. 치료 목적상 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 실험실, 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소, 양, 염소, 돼지, 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 원숭이 등을 포함하여 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.
- [0094] 본원에 사용된 용어 "치료", "치료하는" 등은 일부 경우에 효과를 얻을 목적으로 제제를 투여하거나 절차를 수행하는 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다는

점에서 예방적이고/이거나 질환 및/또는 질환의 증상의 부분적인 또는 완전한 치유를 이룬다는 점에서 치료적이다. 본원에 사용된 "치료"는 포유동물에서, 특히 인간에서의 질환 또는 장애(예를 들어, 암)의 치료를 포함하고, (a) 질환에 대한 소인이 있을 수 있지만 아직 질환에 걸린 것으로 진단되지는 않은 대상체에서 질환 또는 질환의 증상(예를 들어, 원발성 질환과 연관되거나 그로 인해 유발된 질환을 포함)이 발생하는 것을 예방하는 것; (b) 질환을 억제하는 것, 즉 이의 발생을 정지시키는 것; 및 (c) 질환을 완화시키는 것, 즉 질환의 퇴행을 유발하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 암의 치료 또는 호전 또는 예방에서의 임의의 성공 지표를 지칭하며, 여기에는 임의의 객관적 또는 주관적 매개변수, 예컨대 경감; 완화; 증상 감소 또는 질환 상태를 환자가 더욱 견딜 수 있게 만드는 것; 퇴행 또는 쇠퇴 속도의 둔화; 또는 퇴행의 종점을 덜 쇠약하게 만드는 것이 포함된다. 증상의 치료 또는 호전은 의사에 의한 검사 결과를 포함하는 하나 이상의 객관적 또는 주관적 매개변수에 기반한다. 따라서, 용어 "치료하는"은 질환(예를 들어, 암)과 연관된 증상 또는 병태를 예방하거나, 지연시키거나, 완화하거나 또는 이의 발생을 정지시키거나 억제하기 위한 본 개시내용의 화합물 또는 제제의 투여를 포함한다. 용어 "치료 효과"는 대상체에서 질환, 질환의 증상 또는 질환의 부작용의 감소, 제거, 또는 예방을 지칭한다. 대상체는, 치료적 양의 본 개시내용의 항체를 투여받은 후, 환자가 질환 또는 장애의 매개변수 또는 증상의 관찰 가능한 및/또는 측정 가능한 변화, 예컨대 암 치료의 경우에 생체의 평가 시 증가된 종양 세포 사멸 활성, 혈중 면역억제성 분비형 인자의 더 낮은 수준, 더 낮은 종양 체적 또는 질량, 종양 생검에서 증가된 세포독성 림프구 및 Th1 유사 T 세포 수, 감소된 이환율 또는 사망률, 삶의 질 요인의 개선, 또는 질환 또는 장애의 매개변수 또는 증상과 관련된 임의의 객관적 지표의 개선을 나타낸다면, 질환 또는 장애에 대해 "치료"된 것이다. 일부 실시양태에서, 매개변수는 예를 들어 종양 생검에서 세포독성 림프구 세포 수뿐만 아니라 T 세포 활성화 마커(CD69, ICOS, OX40 등)를 증가시키거나 종양 생검에서 TAM 상의 CD16, CD64, TLR2, 시글렉-15의 발현을 감소시킴으로써 면역 저온(immune cold) 종양을 면역 고온(immune hot) 종양으로 전환시키는 것을 포함한다.

- [0095] 일부 실시양태에서, "반응의 유도"는 대상체에서 질병의 징후 또는 증상의 완화 또는 감소를 지칭하고, 구체적으로 생존 연장을 비제한적으로 포함한다.
- [0096] 용어 "결합력"은 회석 후 해리에 대한 2가지 이상의 제제의 복합체의 저항성을 지칭한다.
- [0097] 일부 실시양태에서, 항체 "효과기 기능"은 항체의 Fc 영역(본래 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 이소형에 따라 다양하다.
- [0098] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 지칭한다.
- [0099] 본원에 사용된 "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 예를 들어, 세포는 적어도 FcγRIII를 발현하고 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초혈 단핵세포(PBMC), NK 세포, 단핵구, 대식세포, 세포독성 T 세포 및 호중구가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0100] "보체-의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 고전적 보체 경로의 활성화는 보체 시스템의 제1 성분(C1q)이 동족 항원에 결합되는 항체(적절한 하위부류의)에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 CDC 분석이 수행된다.
- [0101] "내재화"하는 항체는 포유동물 세포 상의 항원(예를 들어, 세포 표면 폴리펩티드 또는 수용체)에 결합 시 세포에 의해 흡수되는(즉, 세포로 진입하는) 항체이다. 내재화 항체는 항체 단편, 인간 또는 키메라 항체 및 항체 접합체를 포함한다. 일부 경우에, 항체(예를 들어, 본원에 개시된 것과 같은)의 내재화는 세포의 생물학을 변경하여 세포의 기능의 변화를 유발한다.
- [0102] "항원-결합 도메인", "항원-결합 영역" 또는 "항원-결합 부위"는 항원과 상호작용하고 항원에 대한 항체의 특이성 및 친화도에 기여하는 아미노산 잔기(또는 다른 모이어티)를 함유하는 항체의 일부분이다. 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 경우, 이는 이의 CDR 도메인 중 적어도 하나의 적어도 일부분을 포함할 것이다.
- [0103] 항체의 항원-결합 영역은 "과라토프"라 지칭되며, 이는 항원의 항원 결정기, "에피토프", 즉 항체에 의해 결합될 수 있는 항원 분자의 일부분에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항원 물질은 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 부분, 즉 하나 초과와 에피토프를 가지며, 따라서 단일 항원 물질은 각각 상이한 에피토프에 대해 특이성을 갖는 상이한 항체에 의해 특이적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 항원의 비연속 부분을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드에서, 폴리펩티드의 1차 서열에서는 연속적이지 않지만 폴리펩티드의 3차 및 4차 구조의 범주에서는 항원-결합 단백질에 의해 결합되기에 서로 충분히 가까운 아미노산 잔기는 에피토프를 구성

한다.

- [0104] "항체 단편"은 온전한 항체의 일부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 온전한 항체의 항원-결합 또는 가변 영역을 포함한다.
- [0105] 용어 "항체의 항원-결합 부분", "항원-결합 단편", "항원-결합 도메인", "항체 단편"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭하기 위해 본원에 상호교환가능하게 사용된다. 이러한 용어 내에 포함되는 항체 단편의 비제한적 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암(arm)의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) VH 도메인을 함유하는 dAb 단편(Ward et al., Nature 341(6242):544-6 (1989)); 및 (vi) 단리된 CDR을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 단일 중쇄 및 단일 경쇄를 포함하는 "절반" 항체가 또한 포함된다. 다른 형태의 단일 사슬 항체, 예컨대 디아바디도 본원에서 고려된다.
- [0106] 본원에 사용된 "기능적 항체 단편"은 문맥상 항체의 항원에 결합할 뿐만 아니라 온전한 항체를 특징짓는 기능적 속성을 갖는 항체 단편을 지칭한다. 예를 들어, 항체가 기능에 있어 ADCC와 같은 효과기 기능을 가능하게 하는 Fc 도메인을 소유하는 것에 의존하는 경우, 기능적 단편은 이러한 기능을 소유할 것이다. 본 개시내용의 항체는 이들이 일부 실시양태에서 CD16(FcγRIIIa) 또는 CD64(FcγRI)와 같은 대식세포 Fc 수용체에 결합하는 Fc 부분을 포함할 때 종양 관련 대식세포의 기능적 상태를 조절하거나 M2-상태 대식세포를 재배향하거나 약화시키는데 효과적이라는 가설을 세웠다.
- [0107] 어구 항체의 "기능적 단편 또는 유사체"는 전장 항체와 공통된 정성적 생물학적 활성을 가지는 화합물이다. 예를 들어, 항-IgE 항체의 기능적 단편 또는 유사체는 고친화성 수용체, Fc6RI에 결합하는 능력을 갖는 이러한 분자의 능력을 방지하거나 실질적으로 감소시키기 위해 IgE 면역글로불린에 결합하는 것이다.
- [0108] "항원-결합 단백질"은 항체의 항원-결합 부분을 포함하는 일부분을 포함하고 임의로 또한 항원-결합 부분이 항원에 대한 항원-결합 단백질의 결합을 촉진하는 입체형태를 채택할 수 있도록 하는 스캐폴드 또는 프레임워크 부분을 포함하는 단백질이다.
- [0109] "온전한" 항체는 항원-결합 부위뿐만 아니라 C_L 및 적어도 중쇄 불변 도메인, C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 불변 도메인은 본래 서열 불변 도메인(예를 들어, 본래 인간 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체이다.
- [0110] 본원에 사용된 용어 "제조항 항체"는 예를 들어 CDR, VH 영역 또는 온전한 경쇄와 같은 제1 항체의 항원-결합 도메인, 및 하나 이상의 다른 항체 또는 단백질로부터의 도메인을 포함하는 항체를 지칭한다. 키메라, 하이브리드 및 인간화 항체는 제조항 항체의 예이다.
- [0111] "CDR-이식된 항체"는 하나의 종 또는 이소형의 항체로부터 유래된 하나 이상의 CDR 및 동일하거나 상이한 종 또는 이소형의 또 다른 항체의 프레임워크를 포함하는 항체이다.
- [0112] 용어 "인간 항체"는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 하나 이상의 가변 영역과 불변 영역을 갖는 모든 항체를 포함한다. 일 실시양태에서, 항체의 모든 가변 도메인과 불변 도메인은 인간 면역글로불린 서열("완전 인간 항체"로 지칭됨)으로부터 유래된다.
- [0113] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "친화도"는 2가지 제제의 가역적 결합에 대한 평형 상수를 지칭하며 K_D로서 표현된다. 일 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 10⁻⁶ M 이하의 범위 또는 10⁻¹⁶ M 이하로 낮은 범위, (예를 들어, 약 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹, 10⁻¹², 10⁻¹³, 10⁻¹⁴, 10⁻¹⁵, 10⁻¹⁶ M 이하)에서 CD163에 대해 K_D(평형 해리 상수)에 의해 측정된 결합 친화도를 나타낸다. 소정 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 10⁻⁴ M 이하, 약 10⁻⁵ M 이하, 약 10⁻⁶ M 이하, 10⁻⁷ M 이하 또는 10⁻⁸ M 이하의 K_D로 huCD163 폴리펩티드에 특이적으로 결합한다.
- [0114] 용어 "우선적으로 결합한다" 또는 "특이적으로 결합한다"는 항체 또는 이의 단편이 비관련 아미노산 서열에 결합하는 것보다 더 큰 친화도로 에피토프에 결합하고, 에피토프를 함유하는 다른 폴리펩티드와 교차-반응성인 경우에 이들이 인간 용도로의 투여를 위해 제형화되는 수준에서 독성이 아니라는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 이러한 친화도는 비관련 아미노산 서열에 대한 항체 또는 이의 단편의 친화도보다 적어도 1배 더 크거나, 적어도 2배 더 크거나, 적어도 3배 더 크거나, 적어도 4배 더 크거나, 적어도 5배 더 크거나, 적어도 6배 더 크

거나, 적어도 7배 더 크거나, 적어도 8배 더 크거나, 적어도 9배 더 크거나, 적어도 10배 더 크거나, 적어도 20배 더 크거나, 적어도 30배 더 크거나, 적어도 40배 더 크거나, 적어도 50배 더 크거나, 적어도 60배 더 크거나, 적어도 70배 더 크거나, 적어도 80배 더 크거나, 적어도 90배 더 크거나, 적어도 100배 더 크거나, 적어도 1000배 더 크다.

[0115] 용어 "특이적"은 항체가 항체에 의해 인식되는 에피토프를 함유하는 항원 이외의 분자에 우선적으로 결합하는 상황을 지칭한다. 상기 용어는 또한, 예를 들어, 항원-결합 도메인이 다수의 항원에 의해 보유되는 특정한 에피토프에 특이적인 경우에 적용가능하며, 이 경우에 항체 또는 항원-결합 도메인을 보유하는 이의 단편이 에피토프를 보유하는 다양한 항원에 결합할 수 있을 것이다.

[0116] 본원에 사용된 바와 같이, 항체는, 항체가 항원과 검출가능한 수준으로, 바람직하게는 약 10^4 M^{-1} 이상, 또는 약 10^5 M^{-1} 이상, 약 10^6 M^{-1} 이상, 약 10^7 M^{-1} 이상, 또는 10^9 M^{-1} 이상의 친화도 상수, K_a 로 반응하는 경우 항원에 대해 "면역특이적" 또는 "특이적"이거나 또는 항원에 "특이적으로 결합한다"고 언급된다.

[0117] 본원에 사용된 용어 "단일특이적"은 하나의 특정 에피토프에 대해 우선적인 친화도를 나타내는 항체를 함유하는 항체 조성을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 단일특이적 항체 제제는 특정 항원에 대한 특이적 결합 활성을 갖는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 99.9% 항체로 구성된다.

[0118] 용어 "폴리펩티드"는 이의 통상적인 의미로, 즉 아미노산의 서열로서 사용된다. 폴리펩티드는 생성물의 특정 길이에 제한되지 않는다. 펩티드, 올리고펩티드 및 단백질은 폴리펩티드의 정의 내에 포함되며, 이러한 용어는 달리 구체적으로 나타내지 않는 한 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 상기 용어는 또한 폴리펩티드의 발현 후 변형, 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등뿐만 아니라 당업계에 공지된 천연 발생 및 비-천연 발생 둘다의 기타 변형을 지칭하지 않거나 배제한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 전체 단백질 또는 이의 하위서열이다. 본 개시내용의 항체의 맥락에서 관심대상의 특정 폴리펩티드는, CDR을 포함하고 이러한 세포에 의해 발현되는 인간 M2 대식세포 또는 CD163 단백질에 결합할 수 있는 아미노산 하위서열이다.

[0119] 본원에 사용된 바와 같이, "실질적으로 순수한" 및 "실질적으로 없는"은 예를 들어 약 20% 이하의 이물질, 약 10% 이하의 이물질, 약 5% 이하의 이물질, 약 4% 이하의 이물질, 약 3% 이하의 이물질, 약 2% 이하의 이물질 또는 약 1% 이하의 이물질을 함유하는 용액 또는 현탁액을 지칭한다.

[0120] 용어 "단리된"은 다른 세포 물질 및/또는 화합물이 실질적으로 없는 단백질(예를 들어, 항체), 핵산 또는 기타 물질을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 핵산은 단리된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 핵산은 실질적으로 순수하다.

[0121] 폴리펩티드에 적용되는 경우에 "단리된"은 일반적으로 그와 함께 천연적으로 발생하는 다른 단백질 및 핵산으로부터 분리된 폴리펩티드를 의미한다. 바람직하게는, 폴리펩티드는 또한 이를 정제하기 위해 사용되는 항체 또는 겔 매트릭스(폴리아크릴아미드)와 같은 물질로부터 분리된다. 일부 경우에, 상기 용어는 이의 기원 또는 조작에 의해 (i) 발현 벡터의 일부분의 발현 산물로서 숙주 세포 내에 존재하는 폴리펩티드 또는 이의 일부분; 또는 (ii) 단백질 또는 자연 상태에서 연결되어 있는 것 이외의 다른 화학적 모이어티에 연결되어 있는 폴리펩티드 또는 이의 일부분; 또는 (iii) 자연에서 발생하지 않는 폴리펩티드 또는 이의 일부분, 예를 들어 단백질이 자연에서 발견되지 않는 형태로 있도록 단백질에 적어도 하나의 소수성 모이어티를 부착하거나 첨가함으로써 화학적으로 조작된 단백질을 의미한다. "단리된"이란, (i) 화학적으로 합성된 단백질; 또는 (ii) 숙주 세포에서 발현되고, 회합된 오염 단백질로부터 정제된 단백질을 추가로 의미한다.

[0122] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 예를 들어 대상체에게 투여될 때, 반응을 유도하기에, 예를 들어 본원에 설명된 바와 같은 대식세포 활성 또는 TAM 활성화와 연관된 질환의 치료, 예후 또는 진단을 수행하기에 충분한, 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 부분의 양을 지칭한다. 본원에 제공된 항체의 치료 유효량은, 단독으로 또는 조합되어 사용될 때, 항체 및 조합물의 상대적 활성(예를 들어, 종양 세포 성장의 억제 시)에 따라 및 치료되는 대상체 및 질환 상태, 대상체의 체중 및 연령, 질환 상태의 중증도, 투여 방식 등에 따라 달라질 것이고, 이는 일부 경우에 당업자에 의해 용이하게 결정된다.

[0123] 용어 "치료 유효량"은 일반적으로 대상체 또는 포유동물에서 질환 또는 장애를 "치료"하는 데 유효한 항체 또는 약물의 양을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물은 임의의 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 이익/위험 비에서 본원에 기재된 질환 또는 장애를 억제함으로써 일부 원하는 치료 효과를 생성하는 데 유효한 양으로 대상체에게 투여된다. 치료 유효량은 기관 또는 조직에서 원하는 치료 또는 예방 효과를 적어도 부분적

으로 달성하는 양이다. 질환 또는 장애의 예방 및/또는 치료를 성취하기 위해 필요한 항체의 양은 그 자체로 고정되어 있지 않다. 일부 실시양태에서, 투여되는 항체의 양은 질환의 유형, 질환의 범위, 및 질환 또는 장애를 앓고 있는 포유동물의 체격에 따라 달라진다. 대상체가 질환 또는 장애의 증상을 나타낸 후 치료제의 투여를 포함하는 치료 방법과 함께 사용되는 경우, 용어 "치료적으로 유효한"은 치료 후에 질환 또는 장애의 하나 이상의 징후 또는 증상이 개선되거나 제거되는 것을 의미한다.

[0124] 어구 "약학적으로 허용되는"은 인간에게 투여될 때 생리학적으로 허용될 수 있고 전형적으로 급성위연동이상항진, 현기증 등과 같은 알레르기 또는 유사한 원치않는 반응을 일으키지 않는 분자적 실체 및 조성물을 지칭한다.

[0125] 용어 "접촉하는"은 본원에 제공된 조성물이 본원에 설명된 세포, 기관, 조직 또는 체액과 물리적으로 근접하도록 하는 수단으로서 정의된다.

[0126] 면역조절 항체

[0127] 소정 실시양태에서, 인간 CD163⁺ 세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, CD163⁺ 세포는 면역억제성 골수 세포이다. 일부 실시양태에서, 면역억제성 골수 세포는 인간 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체의 결합은 인간 대식세포 상의 적어도 하나의 마커의 발현을 변경한다.

[0128] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 인간 M2 또는 M2-유사 면역억제성 대식세포 상에서 발현되는 인간 CD163(huCD163) 단백질에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 huCD163의 대략 140 kDa 당형태인 CD163 단백질에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 huCD163의 세포외 도메인 3에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 huCD163의 세포외 도메인 4에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 huCD163의 세포외 도메인 3 및 세포외 도메인 4에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 huCD163에 특이적으로 결합하여 huCD163의 입체형태적 변화를 초래한다. 일부 실시양태에서, huCD163의 입체형태적 변화는 huCD163의 세포외 도메인 2, 5 및 9를 노출시킨다. 일부 실시양태에서, 항체는 huCD163의 저분자량(대략 115 kDa) 당형태에 특이적으로 결합하지 않는다.

[0129] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 인간 CD163⁺ 면역억제성 골수 세포에 결합하고 M2 또는 M2-유사 면역억제성 대식세포(예컨대, M2c 대식세포)를 특징짓는 소정 세포 마커의 발현의 변경을 야기하며, 이는 대식세포의 비-면역억제성 또는 덜 면역억제성인 상태뿐만 아니라 보다 항종양성인 상태로의 기능적 분화를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 M2 또는 M2-유사 면역억제성 대식세포에 결합하고 M2 또는 M2-유사 대식세포를 특징짓는 소정 세포 마커의 발현을 감소시키며, 이는 대식세포의 변경된 분화 상태로의 기능적 분화를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 CD163⁺ 면역억제성 골수 세포에 의한 CD16, CD64, TLR2 및 시글렉-15 중 하나 이상의 발현을 감소시킨다.

[0130] 일부 실시양태에서, CD163⁺ 면역억제성 골수 세포에 대한 본원에 개시된 항체의 결합은 CD163⁺ 면역억제성 골수 세포의 기능적 변화를 초래한다. 일부 실시양태에서, CD163⁺ 면역억제성 골수 세포에 대한 본원에 개시된 항체의 결합은 M2 또는 M2-유사 면역억제성 대식세포에서 마커 발현의 변화를 초래한다. 일부 실시양태에서, 항체-결합된 CD163⁺ 면역억제성 골수 세포의 기능적 변화는 효과기 T 세포와 같은 다른 세포와의 변형된 상호작용을 초래하고, 이는 후속적으로 표적 종양 세포에 대한 이들의 효과 및 표적 종양 세포와의 상호작용을 변형시킨다.

[0131] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 종양 미세환경에서 종양 관련 대식세포에 의해 유발된 면역억제를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 종양 미세환경에서 종양 관련 대식세포에 의한 면역억제의 감소는 면역자극의 증가, 예를 들어 T 세포 활성화, T 세포 증식, NK 세포 활성화, NK 세포 증식 또는 이들의 임의의 조합의 촉진 생성에 상응한다. 일부 실시양태에서, T 세포 활성화 및/또는 NK 세포 활성화는 T 세포 및/또는 NK 세포에 의한 IFN- γ TNF- α , 퍼포린 또는 이들의 조합의 생산 증가를 초래한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 면역자극, 예를 들어 T 세포 활성화, T 세포 증식, NK 세포 활성화, NK 세포 증식 또는 이들의 임의의 조합의 촉진 생성을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, T 세포 활성화 및/또는 NK 세포 활성화는 T 세포 및/또는 NK 세포에 의한 IFN- γ TNF- α , 퍼포린 또는 이들의 조합의 생성의 증가를 초래한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 인간 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고, 여기서 인간 대식세포는 항체 결합 전에 제1 면역억제 활성화 및 항체 결합 후에 제2 면역억제 활성을 갖고, 여기서 제2 면역억제 활성화는 제1

면역억제 활성보다 더 낮다. 다양한 실시양태에서, 제1 면역억제 활성 및 제2 면역억제 활성은 각각 0이 아니다.

- [0132] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 T 세포 활성화 및 증식을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 항체는 T 세포 집단을 항종양 T 세포 표현형으로 편향시킨다. 일부 실시양태에서, 항체는 T 세포 활성화의 골수 세포 억제를 감소시키거나 차단한다. 일부 실시양태에서, 항체는 T-세포 활성화를 억제하는 TAM의 능력을 감소시켜 더 큰 T-세포 자극 및 IL-2 생산을 유도한다. 일부 실시양태에서, 항체는 T-세포 활성화를 억제하는 TAM의 능력을 차단하여 더 큰 T-세포 자극 및 IL-2 생산을 유도한다.
- [0133] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 T 세포 증식의 골수 억제를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 항체는 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포 활성화와 증식 둘다를 억제하는 TAM의 능력을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 항체는 Th1 세포 증식의 TAM 억제를 감소시킨다. 증식된 T 세포는 $CD4^{+}$ T 세포 상의 활성화 마커의 향상된 발현을 나타낸다.
- [0134] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 대식세포가 M2 대식세포의 면역억제 효과를 경감시키는 M1-유사 표현형을 나타내도록 M2-분극화된 대식세포를 변경한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 단핵구 유래 대식세포가 덜 면역억제적이고 보다 항종양성인 분화 상태로 분화하도록 영향을 미친다.
- [0135] 일부 실시양태에서, 인간 대식세포 상에서 발현되는 인간 CD163 단백질(huCD163)에 특이적으로 결합하고 대식세포에 의한 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15 중 적어도 하나의 발현을 감소시키는 항체가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 인간 대식세포는 종양 관련 면역억제성 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 인간 대식세포는 M2-유사 면역억제성 대식세포이다.
- [0136] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 대식세포에 의해 발현되는 적어도 하나의 다른 단백질을 포함하는 복합체의 성분으로서 대식세포에 의해 발현되는 CD163 단백질에 결합한다. 일부 실시양태에서, 복합체는 세포 표면 복합체이다. 일부 실시양태에서, 복합체는 갈렉틴-1 단백질, LILRB2 단백질 및 카제인 키나제 II 단백질로부터 선택된 적어도 하나의 다른 단백질을 포함한다.
- [0137] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 대식세포 상의 CD163 단백질에 결합하고 대식세포에 의해 내재화된다.
- [0138] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 이것이 결합되는 대식세포에 세포독성이 아니다.
- [0139] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 $CD4^{+}$ T 세포 활성 또는 증식을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 항체는 $CD4^{+}$ T 세포에 의한 CD69, ICOS, OX40, PD1, LAG3 또는 CTLA4의 발현을 촉진한다.
- [0140] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 $CD8^{+}$ T 세포 활성 또는 증식을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 항체는 $CD8^{+}$ T 세포에 의한 ICOS, OX40, PD1, LAG3 또는 CTLA4의 발현을 촉진한다.
- [0141] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 $CD8^{+}$ T 세포 활성 또는 증식을 촉진함으로써 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 항체는 암 세포의 세포독성 림프구-매개 사멸을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 항체는 NK 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진한다.
- [0142] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 T 세포에 의한 IL-2 발현을 촉진한다. 일부 실시양태에서, CD163 단백질에 대한 본 개시내용의 항체의 결합은 $CD4^{+}$ T 세포, $CD196^{-}$ T 세포, $CXCR3^{+}$ T 세포, $CCR4^{-}$ T 세포 또는 이들의 임의의 조합을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 항체는 $CD4^{+}$ $CD196^{-}$ $CXCR3^{+}$ $CCR4^{-}$ T 세포를 증가시킨다.
- [0143] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 대식세포 상에서 발현되는 Fc 수용체에 결합하는 불변 도메인을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체는 huCD163에 특이적으로 결합하고 Fc 수용체에 결합하는 불변 도메인을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체는 $CD16(Fc\gamma RIIa)$ 또는 $CD64(Fc\gamma RI)$ 와 같은 $CD163^{+}$ 면역억제성 골수 세포 상에서 발현되는 Fc 수용체에 결합하는 불변 도메인을 갖는다. 일부 실시양태에서, huCD163 및 Fc 수용체는 동일한 세포 상에서 발현된다. 일부 실시양태에서, huCD163 및 Fc 수용체는 상이한 세포 상에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 항체 가변 도메인은 huCD163에 특이적으로 결합하고 항체 불변 도메인은 Fc 수용체에 동시에 결합한다.
- [0144] 소정 실시양태에서, 인간 M2 및 M2-유사 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가

본원에 개시되며, 여기서 상기 결합은 다음의 효과 중 적어도 하나를 초래한다:

- [0145] (a) 인간 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다;
- [0146] (b) 인간 대식세포에 의한 항체의 내재화;
- [0147] (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화;
- [0148] (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및
- [0149] (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.
- [0150] 소정 실시양태에서, 인간 M2 및 M2-유사 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시되며, 여기서 상기 결합은 다음의 효과 중 적어도 2가지를 초래한다:
- [0151] (a) 인간 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다;
- [0152] (b) 인간 대식세포에 의한 항체의 내재화;
- [0153] (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화;
- [0154] (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및
- [0155] (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.
- [0156] 소정 실시양태에서, 인간 M2 및 M2-유사 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시되며, 여기서 상기 결합은 다음의 효과 중 적어도 3가지를 초래한다:
- [0157] (a) 인간 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다;
- [0158] (b) 인간 대식세포에 의한 항체의 내재화;
- [0159] (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화;
- [0160] (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및
- [0161] (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.
- [0162] 소정 실시양태에서, 인간 M2 및 M2-유사 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시되며, 여기서 상기 결합은 다음의 효과 중 적어도 4가지를 초래한다:
- [0163] (a) 인간 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다;
- [0164] (b) 인간 대식세포에 의한 항체의 내재화;
- [0165] (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화,
- [0166] (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및
- [0167] (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.
- [0168] 소정 실시양태에서, 인간 M2 및 M2-유사 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시되며, 여기서 상기 결합은 다음의 효과 중 적어도 5가지를 초래한다:
- [0169] (a) 인간 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다;
- [0170] (b) 인간 대식세포에 의한 항체의 내재화;

- [0171] (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화;
- [0172] (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및
- [0173] (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.
- [0174] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 종양 관련 대식세포(TAM) 집단 내의 인간 $CD163^{+}$ 면역억제성 골수 세포에 선택적으로 결합하고, 여기서 상기 항체는 M2 대식세포 상에서 발현되는 $CD163$ 단백질에 특이적으로 결합하고 TAM 집단의 면역억제 활성을 감소시킨다.
- [0175] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 종양 미세환경에서 인간 $CD163^{+}$ 면역억제성 골수 세포에 선택적으로 결합하고, 여기서 상기 항체는 M2 대식세포 상에서 발현되는 $CD163$ 단백질에 특이적으로 결합하고 M2 대식세포-매개 억제를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 설명된 바와 같이 결합하는 이의 항원-결합 단편이다.
- [0176] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 예를 들어 인간 항체와 같은 온전한 면역글로불린 분자뿐만 아니라, 항원-결합 단편으로도 지칭되는 Fab, Fab', F(ab)', F(ab')₂, Fd, scFv, 가변 중쇄 도메인, 가변 경쇄, 가변 NAR 도메인, 이중특이적 scFv, 이중특이적 Fab2, 삼중특이적 Fab3 단일 사슬 결합 폴리펩티드, dAb 단편, 디아바디 등으로서 당업계에 공지된 부분들을 포함하여 항원-결합 부위(즉, 파라토프)를 함유하는 인간화 Ig 분자 또는 단일 중쇄 및 단일 경쇄의 부분이다. 면역글로불린 분자 또는 이의 단편을 구성할 때, 가변 영역 또는 이의 일부분은 일부 실시양태에서 하나 이상의 불변 영역 또는 이의 일부분에 융합되거나, 연결되거나, 또는 그 밖에 결합되어 본원에 기재된 임의의 항체 또는 이의 단편을 생성한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 상기 설명된 항체 중 어느 하나의 항원-결합 단편은 Fab, Fab', Fd, F(ab')₂, Fv, scFv, 단일 사슬 결합 폴리펩티드(예를 들어, Fc 부분을 갖는 scFv) 또는 본원에 설명된 이의 임의의 다른 기능적 단편이다.
- [0177] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 임의의 면역글로불린 부류의 것이고, 따라서 일부 실시양태에서 감마, 뮤, 알파, 델타 또는 입실론 중쇄를 갖는다. 일부 실시양태에서, 감마 사슬은 감마 1, 감마 2, 감마 3 또는 감마 4이다. 일부 실시양태에서, 알파 사슬은 알파 1 또는 알파 2이다.
- [0178] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 IgG 면역글로불린이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 임의의 IgG 하위부류의 것이다. 일부 실시양태에서 항체는 IgG1이다.
- [0179] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 카파 또는 람다인 가변 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 람다 사슬은 예를 들어 람다 1, 람다 2, 람다 3 및 람다 4를 포함하는 임의의 하위유형의 것이다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 카파이다.
- [0180] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 인간 가변 프레임워크 영역 및 인간 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서 항체는 인간 경쇄 가변 프레임워크 영역 및 인간 경쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서 항체는 인간 중쇄 가변 프레임워크 영역 및 인간 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 경쇄 가변 프레임워크 영역, 인간 경쇄 불변 영역, 인간 중쇄 가변 프레임워크 영역 및 인간 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0181] 일부 실시양태에서, 인간 중쇄 불변 영역은 IgG1 또는 IgG4 또는 이의 단편을 함유한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1이다. IgG1을 갖는 항체의 일례는 AB101이다. AB101은 하기 실시예 1에 설명된 바와 같이 서열번호 9를 포함하는 경쇄 및 서열번호 10을 포함하는 중쇄를 포함한다.
- [0182] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 ADCC 기능이 감소된 인간 IgG1(즉, Fc-널(null) 항체)이다. 본 개시내용의 예시적인 Fc-널 항체는 AB102이다. AB102는 서열번호 9를 포함하는 경쇄 및 서열번호 11을 포함하는 중쇄를 포함하며, 이는 AB101의 가변 영역을 포함하고 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1의 Fc-널 형태이다. AB102는 하기 예에서 추가로 설명된다.
- [0183] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 ADCC 기능을 향상시키도록 변형된 인간 IgG1이다. 향상된 ADCC 기능을 갖는 본 개시내용의 예시적인 항체는 AB103이다. AB103은 서열번호 9를 포함하는 경쇄 및 서열번호 12를 포함하는 중쇄를 포함하며, 이는 AB101의 가변 영역을 포함하고 중쇄 불변 영역은 인간 IgG1의 향상된 ADCC 형태이다.
- [0184] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 인간 IgG4이다. IgG4를 갖는 본 개시내용의 예시적인 항체는 AB104이다. AB104는 서열번호 9를 포함하는 경쇄 및 서열번호 13을 포함하는 중쇄를 포함하며, 이는 AB101의 가변 영역을

포함하고 중쇄 불변 영역은 인간 IgG4이다.

- [0185] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 인간 가변 프레임워크 영역 및 무린 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 인간 중쇄 가변 프레임워크 영역 및 무린 중쇄 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 인간 경쇄 가변 프레임워크 영역, 무린 경쇄 불변 영역, 인간 중쇄 가변 프레임워크 영역 및 무린 중쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0186] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 무린 IgG2A이다. 무린 IgG2A를 갖는 항체의 일례는 AB211이다. AB211은 서열번호 14를 포함하는 경쇄 및 서열번호 15를 포함하는 중쇄를 포함하며, 이는 AB101의 인간 가변 영역을 포함하고 중쇄 불변 영역은 무린 IgG1의 Fc-널 형태이고 경쇄 불변 영역은 무린 카파이다. AB211은 하기 예에서 추가로 설명된다.
- [0187] 일부 실시양태에서, 중쇄 불변 영역은 무린 IgG2A이다. 무린 IgG2A의 중쇄를 갖는 항체의 일례는 AB212이다. AB212는 서열번호 14를 포함하는 경쇄 및 서열번호 16을 포함하는 중쇄를 포함하며, 이는 AB101의 인간 가변 영역을 포함하고 중쇄 불변 영역은 무린 IgG2a이고 경쇄 불변 영역은 무린 카파이다. AB212는 하기 예에서 추가로 설명된다.
- [0188] M2 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 대한 항체 또는 항원-결합 단편의 결합은 일부 실시양태에서 이러한 M2 대식세포의 생물학적 기능을 부분적으로(예를 들어, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 그 안의 임의의 수) 또는 완전히 조절한다. 항체 또는 항원-결합 단편의 활성은 예를 들어 시험관내 분석을 사용하여 및/또는 생체내에서 본원에서 설명되었거나 또는 그 밖에 당업계에 공지된 것과 같은 당업계에 인정된 분석을 사용하여 결정된다.
- [0189] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는, 필요한 경우, 원하는 기능을 유지하면서 항체의 특이적 특성을 변경하도록 추가로 변형된다. 예를 들어, 일 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 생체내 안정성, 용해도, 생체이용률 또는 반감기를 포함하나 이에 제한되지 않는 항체의 약동학적 특성을 변경하도록 변형된다.
- [0190] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 약 1 내지 약 10 pM, 약 10 내지 약 20 pM, 약 1 내지 약 29 pM, 약 30 내지 약 40 pM, 약 10 내지 약 100 pM, 또는 약 20 내지 약 500 pM의 해리 상수(Kd)를 갖는다.
- [0191] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 약 500 pM 미만, 약 400 pM 미만, 약 300 pM 미만, 약 200 pM 미만, 약 100 pM 미만, 약 75 pM 미만, 약 50 pM 미만, 약 30 pM 미만, 약 25 pM 미만, 약 20 pM 미만, 약 18 pM 미만, 약 15 pM 미만, 약 10 pM 미만, 약 75 pM 미만, 약 5 pM 미만, 약 2.5 pM 또는 약 1 pM 미만의 해리 상수(Kd)를 갖는다.
- [0192] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 huCD163 단백질 또는 펩티드에 대해 약 10^{-9} 내지 약 10^{-14} , 약 10^{-10} 내지 약 10^{-14} , 약 10^{-11} 내지 약 10^{-14} , 약 10^{-12} 내지 약 10^{-14} , 약 10^{-13} 내지 약 10^{-14} , 약 10^{-10} 내지 약 10^{-11} , 약 10^{-11} 내지 약 10^{-12} , 약 10^{-12} 내지 약 10^{-13} , 또는 10^{-13} 내지 약 10^{-14} 의 친화도를 갖는다.
- [0193] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 1개 초과와 결합 부위를 갖는다. 일부 실시양태에서, 결합 부위는 서로 동일하다. 일부 실시양태에서, 결합 부위는 서로 상이하다. 천연 발생 인간 면역글로불린은 일반적으로 2개의 동일한 결합 부위를 갖는 반면, 조작된 항체는 예를 들어 2개 이상의 상이한 결합 부위를 갖는다.
- [0194] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 이중특이적 또는 다중특이적이다. 이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적인 이중특이적 항체는 일부 실시양태에서 단일 항원의 2개의 상이한 에피토프에 결합한다. 다른 이러한 항체는, 일부 실시양태에서, 제1 항원 결합 부위와 제2 항원에 대한 결합 부위를 겸비하고 있다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 결합하고 Fc 수용체에 결합하는 불변 도메인을 갖는다. 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체의 하나 이상의 에피토프의 결합은 Fc 수용체에 대한 이중특이적 항체의 불변 도메인의 결합과 동시적이다.
- [0195] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 다가로도 지칭되는 2 이상의 결합가를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 삼중특이적이다. 일부 실시양태에서, 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 빠르게 내재화(및/또는 이화)된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖는 다가 항체(예를 들어, 4가 항체)이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 다가 항체는 항체의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 생성된다. 일부 실시양태에서, 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는

한지 영역을 포함한다(또는 이로 구성된다). 이러한 시나리오에서, 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역의 아미노 말단에 있는 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 본원의 다가 항체는 약 3 내지 약 8 개, 그러나 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다. 다가 항체는 적어도 하나의 폴리펩티드 사슬(및 바람직하게는 2개의 폴리펩티드 사슬)을 포함하고, 여기서 폴리펩티드 사슬(들)은 2개 이상의 가변 영역을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬(들)은 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ 를 포함하고, 여기서 $VD1$ 은 제1 가변 영역이고, $VD2$ 는 제2 가변 영역이고, Fc 는 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 사슬이고, $X1$ 및 $X2$ 는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n 은 0 또는 1이다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 사슬(들)은 각각 독립적으로 $V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc$ 영역 사슬; 또는 $V_H-C_H1-V_H-C_H1-Fc$ 영역 사슬을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원의 다가 항체는 적어도 2개(및 바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원의 다가 항체는 약 2 내지 약 8개의 경쇄 가변 영역 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 경쇄 가변 영역 폴리펩티드는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 경쇄 가변 영역 폴리펩티드는 C_L 도메인을 추가로 포함한다.

[0196] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 다가 형태로 폴딩되도록 구성되며, 이는 일부 실시양태에서 혈중에서 결합 친화도, 특이성 및/또는 증가된 반감기를 개선한다. 다가 형태의 항체는 예를 들어 당업계에 공지된 기술에 의해 제조된다.

[0197] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 표적 단백질에 특이적인 SMIP 또는 결합 도메인 면역글로불린 융합 단백질이다. 이들 구성물은 항체 효과기 기능을 수행하는 데 필요한 면역글로불린 도메인에 융합된 항원-결합 도메인을 포함하는 단일-사슬 폴리펩티드이다.

[0198] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 본원에 개시된 에피토프에 결합하고 임의로 면역글로불린 Fc 영역을 갖는, 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 갖는 단일 사슬 결합 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 분자는 면역글로불린 Fc 영역의 존재를 통해 효과기 기능 또는 증가된 반감기를 임의로 갖는 단일 사슬 가변 단편(scFv)이다.

[0199] 항-CD163 항체

[0200] 소정 실시양태에서, CD163 단백질에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, CD163-결합 항체는 적어도 하나의 중쇄 및 적어도 하나의 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, CD163-결합 항체는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는 적어도 하나의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는 적어도 하나의 경쇄를 포함한다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. VH 및 VL 및 CDR의 아미노산 서열은 항체의 항원 결합 특이성 및 항원 결합 강도를 결정한다. VH 및 VL 도메인은 **표 1**에 요약되어 있다. 경쇄 및 중쇄는 **표 2**에 요약되어 있다. CDR의 아미노산 서열은 **표 3**에 요약되어 있다.

[0201] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 단클론 항체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 전체 면역글로불린, scFv, Fab, F(ab')₂, 또는 디설파이드 연결된 Fv로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 IgG 또는 IgM이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 인간화된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 키메라이다.

[0202] 항-CD163 항체 가변 도메인

표 1

항-CD163 가변 도메인 서열.

표 1: 항-CD163 가변 도메인 서열		
	서열	서열번호
경쇄 가변 도메인	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSY STPRGTFGQGTKVEIKR	7
중쇄 가변 도메인	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF	8

[0203]

[0204]

소정 실시양태에서, 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL)을 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, VL은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, VL은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0205]

소정 실시양태에서, 서열번호 8에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, VH는 서열번호 8에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, VH는 서열번호 8에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0206]

소정 실시양태에서, 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 도메인(VL) 및 서열번호 8에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, VL은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖고 VH는 서열번호 8에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, VL은 서열번호 7에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖고 VH는 서열번호 8에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0207]

항-CD163 항체 경쇄 및 중쇄

표 2

항-CD163 경쇄 및 중쇄 서열

표 2: 항-CD163 경쇄 및 중쇄 서열		
	서열	서열번호
AB101, AB102, AB103, 또는 AB104 경쇄 (hIgG1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQ QSYSTPRGTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	9
AB101 중쇄 (hIgG1)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYGMDVWG QGTITVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
AB102 중쇄 (hIgG1 ADCC- Null)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYGMDVWG QGTITVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	11
AB103 중쇄 (hIgG1 eADCC)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYGMDVWG QGTITVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPD VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	12
AB104 중쇄 (hIgG4)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYGMDVWG QGTITVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTK TYTCNVDPHKPSNTKVDKRVEPKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLF	13

[0208]

표 2: 항-CD163 경쇄 및 중쇄 서열		
	서열	서열번호
	PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK	
AB211 또는 AB212 경쇄 (muKappa)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQOKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYSTPRGTFGQGTKVEIKRTDAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVV CFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSM SSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRENC	14
AB211 중쇄 (muIgG2A)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWG QGTTVTVSSKTTAPSVYPLAPVCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS ITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVF IFPPKIKDVLMLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVH TAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKD LPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVT FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRVE KKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	15
AB212 중쇄 (muIgG2A ADCC-Null)	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARENVRPYYDFWSGYYSEYYYYGMDVWG QGTTVTVSSKTTAPSVYPLAPVCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPE PVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS ITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKCPPCKCPAPNLEGGPSVF IFPPKIKDVLMLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVH TAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKAFACAVNNK DLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVT DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DGSYFMYSKLRV EKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	16

[0209]

[0210]

소정 실시양태에서, 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 서열번호 9에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0211]

소정 실시양태에서, 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서 중쇄는 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 10에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0212]

소정 실시양태에서, 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서 중쇄는 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0213]

소정 실시양태에서, 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서 중쇄는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 12에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서 중쇄는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0222] 소정 실시양태에서, 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서 경쇄는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖고 중쇄는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열과 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖고 중쇄는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0223] 소정 실시양태에서, 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서 경쇄는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖고 중쇄는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖고 중쇄는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0224] 예시적인 항-CD163 상보성 결정 영역

표 3

항-CD163 CDR 서열

표 3: 항-CD163 CDR 서열		
	서열	서열번호
경쇄 CDR1	RASQSISSYLN	1
경쇄 CDR2	AASSLQS	2
경쇄 CDR3	QQSYSTPRGT	3
중쇄 CDR1	SYAMH	4
중쇄 CDR2	VISYDGSNKYYADSVKG	5
중쇄 CDR3	ENVRPYDFWSGYYSEYYYYGMDV	6

[0225]

[0226] 소정 실시양태에서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, CD163에 결합하는 항체는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, CD163에 결합하는 항체는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다.

- [0227] 소정 실시양태에서, 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, CD163에 결합하는 항체는 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, CD163에 결합하는 항체는 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0228] 소정 실시양태에서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2, 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3, 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, CD163에 결합하는 항체는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2, 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3, 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, CD163에 결합하는 항체는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2, 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3, 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2 및 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0229] 결합 친화도 및 면역반응성
- [0230] 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 결합 친화도 및/또는 결합력은 프레임워크 영역을 변형시킴으로써 개선된다. 프레임워크 영역의 변형을 위한 임의의 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있고 본원에서 고려된다. 변경할 하나 이상의 관련 프레임워크 아미노산 위치의 선택은 다양한 기준에 의존한다. 변경할 관련 프레임워크 아미노산을 선택하기 위한 하나의 기준은 예를 들어 공여기 분자와 수용기 분자 사이의 아미노산 프레임워크 잔기의 상대적 차이이다. 이러한 접근법을 사용하여 변경할 관련 프레임워크 위치를 선택하는 것은 잔기 결정의 임의의 주관적 편향 또는 잔기에 의한 CDR 결합 친화도 기여의 임의의 편향을 피할 수 있다는 이점이 있다.
- [0231] 결합 상호작용은 일부 실시양태에서 하나 이상의 CDR의 하나 이상의 아미노산 잔기와 분자간 접촉으로서 나타난다. 항원-결합은 예를 들어 CDR 또는 CDR 쌍, 또는 일부 경우에 V_H 및 V_L 쇄의 최대 6개 CDR의 상호작용을 포함한다.
- [0232] 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 친화도 및 결합력은 평형 해리 상수(K_D)의 표면 플라즈몬 공명(SPR) 측정,

AlphaLisa 분석 또는 유세포측정에 의해 측정될 수 있다.

[0233] 0.1 nM 내지 1000 nM의 K_D 로 인간 CD163에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 항체는 약 0.1 내지 약 500 nM, 약 0.1 내지 약 100 nM, 약 0.1 내지 약 50 nM, 약 0.1 내지 약 20 nM, 약 0.1 내지 약 10 nM, 약 0.1 내지 약 5 nM, 약 0.1 내지 약 2 nM, 약 0.1 내지 약 1 nM, 약 0.1 내지 약 0.5 nM, 약 0.5 내지 약 1000 nM, 약 0.5 내지 약 500 nM, 약 0.5 내지 약 100 nM, 약 0.5 내지 약 50 nM, 약 0.5 내지 약 20 nM, 약 0.5 내지 약 10 nM, 약 0.5 내지 약 5 nM, 약 0.5 내지 약 2 nM, 약 0.5 내지 약 1 nM, 약 1 내지 약 1000 nM, 약 1 내지 약 500 nM, 약 1 내지 약 100 nM, 약 1 내지 약 50 nM, 약 1 내지 약 20 nM, 약 1 내지 약 10 nM, 약 1 내지 약 5 nM, 약 1 내지 약 2 nM, 약 2 내지 약 1000 nM, 약 2 내지 약 500 nM, 약 2 내지 약 100 nM, 약 2 내지 약 50 nM, 약 2 내지 약 20 nM, 약 2 내지 약 10 nM, 약 2 내지 약 5 nM, 약 5 내지 약 1000 nM, 약 5 내지 약 500 nM, 약 5 내지 약 100 nM, 약 5 내지 약 50 nM, 약 5 내지 약 20 nM, 약 5 내지 약 10 nM, 약 10 내지 약 1000 nM, 약 10 내지 약 500 nM, 약 10 내지 약 100 nM, 약 10 내지 약 50 nM, 약 10 내지 약 20 nM, 약 20 내지 약 1000 nM, 약 20 내지 약 500 nM, 약 20 내지 약 100 nM, 약 20 내지 약 50 nM, 약 50 내지 약 1000 nM, 약 50 내지 약 500 nM, 약 50 내지 약 100 nM, 약 100 내지 약 500 nM, 약 100 내지 약 1000 nM, 약 500 내지 약 1000 nM의 K_D 로 인간 CD163에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 1.8 nM, 12 nM, 45 nM 또는 89 nM의 K_D 로 인간 CD163에 특이적으로 결합한다.

[0234] 본원에 개시된 항체는 종양 관련 대식세포(TAM)에서 고도로 발현되고 상이한 기원 유래의 다양한 종양 세포에서 검출된 골수 스캐빈저 수용체 CD163에 결합한다. 종양 조직에서 CD163의 발현은 불량한 예후와 연관된다. 본원에 개시된 항체와 IL-10 분극화된 M2c 대식세포 간의 결합 친화도는 유세포측정으로 측정된다.

[0235] 0.1 nM 내지 1000 nM의 K_D 로 M2c 대식세포에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 항체는 약 0.1 내지 약 500 nM, 약 0.1 내지 약 100 nM, 약 0.1 내지 약 50 nM, 약 0.1 내지 약 20 nM, 약 0.1 내지 약 10 nM, 약 0.1 내지 약 5 nM, 약 0.1 내지 약 2 nM, 약 0.1 내지 약 1 nM, 약 0.1 내지 약 0.5 nM, 약 0.5 내지 약 1000 nM, 약 0.5 내지 약 500 nM, 약 0.5 내지 약 100 nM, 약 0.5 내지 약 50 nM, 약 0.5 내지 약 20 nM, 약 0.5 내지 약 10 nM, 약 0.5 내지 약 5 nM, 약 0.5 내지 약 2 nM, 약 0.5 내지 약 1 nM, 약 1 내지 약 1000 nM, 약 1 내지 약 500 nM, 약 1 내지 약 100 nM, 약 1 내지 약 50 nM, 약 1 내지 약 20 nM, 약 1 내지 약 10 nM, 약 1 내지 약 5 nM, 약 1 내지 약 2 nM, 약 2 내지 약 1000 nM, 약 2 내지 약 500 nM, 약 2 내지 약 100 nM, 약 2 내지 약 50 nM, 약 2 내지 약 20 nM, 약 2 내지 약 10 nM, 약 2 내지 약 5 nM, 약 5 내지 약 1000 nM, 약 5 내지 약 500 nM, 약 5 내지 약 100 nM, 약 5 내지 약 50 nM, 약 5 내지 약 20 nM, 약 5 내지 약 10 nM, 약 10 내지 약 1000 nM, 약 10 내지 약 500 nM, 약 10 내지 약 100 nM, 약 10 내지 약 50 nM, 약 10 내지 약 20 nM, 약 20 내지 약 1000 nM, 약 20 내지 약 500 nM, 약 20 내지 약 100 nM, 약 20 내지 약 50 nM, 약 50 내지 약 1000 nM, 약 50 내지 약 500 nM, 약 50 내지 약 100 nM, 약 100 내지 약 500 nM, 약 100 내지 약 1000 nM, 약 500 내지 약 1000 nM의 K_D 로 M2c 대식세포에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 7.7 nM의 K_D 로 M2c 대식세포에 특이적으로 결합한다.

[0236] 결합 에피토프

[0237] 항체 에피토프는 선형 펩티드 서열(즉, "연속")일 수 있거나 비연속 아미노산 서열(즉, "입체형태적" 또는 "불연속")로 구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 하나 이상의 아미노산 서열을 인식하고; 따라서, 에피토프는 하나 초과와 별개의 아미노산 서열을 정의한다. 항체에 의해 인식되는 에피토프는 예를 들어 당업자에게 널리 공지된 펩티드 맵핑 및 서열 분석 기술에 의해 결정된다. 결합 상호작용은 CDR의 하나 이상의 아미노산 잔기와의 분자간 접촉으로서 나타난다.

[0238] 인간 CD163 단백질은 인간에서 CD163 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. 인간 CD163의 아미노산 서열은 다음과 같다:

MSKLRMVLLEDSEGSADFRRHFNLSPTITVVLILLSACFVTSSLGGTDKELRLVDGENKCS
GRVEVKVQEEWGTVCNNGWSMEAVSVICNQLGCPTAIKAPGWANSSAGSGRIWMDHVS
CRGNESALWDCKHDGWGKHSNCTHQDAGVTCSDGSNLEMRLTRGGNMCSGRIEIKFQ
GRWGTVCDDNFNIDHASVICRQLECGSAVSFSGSSNFGEGSGPIWFDDLICNGNESALWNC
KHQGWGKHNCDAEDAGVICSKGADLSRLVDGVTECSGRLEVRFQGEWGTICDDGDW
SYDAAVACKQLGCPTAVTAIGRVNASKGFGHIWLDVSCQGHEPAIWQCKHHEWGKHYC
NHNEAGVTCSDGSDLELRLRGGGSRCACTVEVEIQRLLGKVC DRGWGLKEADVVC RQL
CGGSALKTSYQVYSKIATNTWLFLSSCNGNETSLWDCKNWQWGGLTCDHYEEAKITCS
AHREPRLVGGDIPCSGRVEVKHGDWTGSICDSDFSLEAASVLCRELQCGTVVSILGGAHFG
EGNGQIWAEEFQCEGHESLSLCPVAPRPEGTCSHSRDVGVC SRYTEIRLVNGKTPCEGR
VELKTLGAWGSLCNSHWDIEDAHVLCQQLKCGVALSTPGGARFGKNGQIWRHMFHCT
GTEQHMGDPCVTALGASLCPSEQVASVICSGNQSQTLSSCNSSSLGPTRPTIPEESAVACIES
GQLRLVNGGGRCAGRVEIYHEGSGWTICDDSWDLSDAHVVC RQLGCGEAINATGSAHFG
EGTGPIWLDEMCKCNGKESRIWQCHSHGWGQQNCRHKEDAGVICSEFMSLRLTSEASREAC
AGRLEVFYNGAWGTVGKSSMSETTVGVVC RQLGCADKGKINPASLDKAMSIPMWVDNV
QCPKGPDTLWQCPSSPWEKRLASPSEETWITCDNKIRLQEGPTSCSGRVEIWHGGSWGTVC
DDSWDLDDAQVVCQQLGCGPALKAFKEAEFGQGTGPIWLVNCKCKGNESSLWDCPARR
WGHSECGHKEDA AVNCTDISVQKTPQKATTGRSSRQSSFIAGILGVVLLAIFVALFFLT
KRRQRQLAVSSRGENLVHQIQYREMNSCLNADDLDLMNSSGGHSEPH (서열번호 17).

[0239]

[0240]

인간 CD163의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체가 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 비연속 아미노산 서열을 포함하는 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 IGRVNASKGFGHIWLDVSCQGHEPAI(서열번호 18)을 포함하는 인간 CD163의 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 VVC RQLGCGSA(서열번호 19)를 포함하는 인간 CD163의 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 아미노산 서열 WDCKNWQWGGLTCD(서열번호 20)를 포함하는 인간 CD163의 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 18 내지 20의 아미노산 서열을 포함하는 인간 CD163의 에피토프에 결합한다.

[0241]

또한, 본원에 개시된 에피토프에 특이적으로 결합하는 추가의 항체가 본원에 개시된다. 본원에 개시된 에피토프에 특이적으로 결합하는 이러한 추가의 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 식별될 수 있다. 예를 들어, 컴퓨터 접근법은 에피토프-특이적 항체를 설계하는 데 사용된다. Nimrod et al., Computational Design of Epitope-Specific Functional Antibodies, Cell Reports 25, 2121-2131, Nov. 20, 2018, (본원에 참고로 포함됨). 다음과 같이 또 다른 접근법을 사용하여 항원에 결합하는 항체 라이브러리의 특이적 에피토프에 결합하는 항체를 식별할 수 있다: 먼저, 비정규 아미노산(ncAA) *p*-벤조일-L-페닐알라닌(pBpa) 및 *p*-아지도-L-페닐알라닌(pAzF)을 표적 에피토프에 혼입시킨 다음, UV 조사 후 ncAA 혼입된 에피토프와 가교결합하는 항체를 선택한다. 항체와 에피토프 간의 거리가 충분히 가까울 때에만 가교결합이 일어나기 때문에, 이 방법은 표적 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 효율적으로 선택할 수 있다. Chen et al. Epitope-directed antibody selection by site-specific photocrosslinking, Science Advances, Vol. 6, no. 14, eaaz7825, 01 Apr 2020 (본원에 참고로 포함됨).

[0242]

항체의 변형

[0243]

항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 일부 경우에, 다양한 목적을 위해 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 첨가에 의한 것과 같은 같은 당업계에 공지된 기술을 사용하여 변형된다. 일부 실시양태에서, PEG 변형(페닐화(PEGylation))은 개선된 순환 시간, 개선된 용해도, 단백질분해에 대한 개선된 내성, 감소된 항원성 및 면역원성, 개선된 생체이용률, 감소된 독성, 개선된 안정성 및 용이한 제형화 중 하나 이상을 유도한다.

[0244]

항원-결합 단편이 Fc 부분을 함유하지 않는 일부 경우에, 예를 들어 대상체에게 투여될 때 혈중 순환의 항원-결합 단편의 반감기를 증가시키기 위해 Fc 부분이 (예를 들어, 재조합적으로) 단편에 첨가될 수 있다. 적절한 Fc 영역의 선택 및 이러한 단편을 혼입시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. IgG의 Fc 영역을 관심대상의 폴리펩티드의 순환 반감기를 증가시키지만 생물학적 활성을 상실하지 않도록 관심대상의 폴리펩티드에 혼입하는 것은,

예를 들어 당업계에 공지된 통상의 기술을 사용하여 달성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 투여될 때 혈중 순환의 항원-결합 단편의 반감기를 증가시키기 위해 항체의 Fc 부분이 추가로 변형된다. 변형은 예를 들어 당업계의 통상의 수단을 사용하여 결정된다.

[0245] 추가로, 일부 실시양태에서, 항체 및 이의 항원-결합 단편은 이들의 복합 N-글리코시드-연결된 당 사슬 상에 푸코스를 함유하지 않도록 생성되거나 발현된다. 복합 N-글리코시드-연결된 당 사슬로부터 푸코스의 제거는 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(CDC)을 포함하나 이에 제한되지 않는 항체 및 항원-결합 단편의 효과기 기능을 증가시키는 것으로 공지되어 있다. 유사하게, 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 일부 경우에, 이들의 C-말단에서, 임의의 항체 이소형, 예를 들어 IgG, IgA, IgE, IgD 및 IgM, 및 임의의 이소형 하위부류, 특히 IgG1, IgG2b, IgG2a, IgG3 및 IgG4로부터 유래된 면역글로불린 중쇄의 전부 또는 일부분에 부착된다.

[0246] 추가로, 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편은 또한 일부 실시양태에서 이들이 혈뇌 장벽을 통과할 수 있도록 변형된다. 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편의 이러한 변형은 다형성 교모세포종(GBM)과 같은 뇌 질환의 치료를 가능하게 한다. 항체 또는 항원 결합 단편과 같은 단백질이 혈뇌 장벽을 통과할 수 있도록 하는 예시적인 변형은 미국 특허출원 공개 제2007/0082380호에 설명되어 있다.

[0247] 면역글로불린의 글리코실화는 이의 효과기 기능, 구조적 안정성 및 항체 생산 세포로부터의 분비 속도에 상당한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이러한 특성을 담당하는 탄수화물 기는 일반적으로 항체의 불변(C) 영역에 부착된다. 예를 들어, C_H2 도메인 내의 아스파라긴 297에서 IgG의 글리코실화는 보체 의존성 세포용해의 고전적 경로를 활성화하는 IgG의 전체적인 능력을 위해 요구된다(Tao and Morrison, *J Immunol* 143:2595 (1989)). C_H3 도메인 내의 아스파라긴 402에서의 IgM의 글리코실화는 항체의 적절한 조립 및 세포용해 활성을 위해 필요하다(Muraoka and Shulman, *J Immunol* 142:695 (1989)). IgA 항체의 C_H1 및 C_H3 도메인 내의 위치 162 및 419에서 글리코실화 부위의 제거는 세포내 분해 및 분비의 적어도 90% 억제체를 유도하였다(Taylor and Wall, *Mol Cell Biol* 8:4197 (1988)). 추가로, 일부 실시양태에서, 항체 및 이의 항원-결합 단편은 이의 복합 N-글리코시드-연결된 당 사슬 상에 푸코스를 함유하지 않도록 생성되거나 발현된다. 복합 N-글리코시드-연결된 당 사슬로부터 푸코스의 제거는 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및 보체 의존성 세포독성(CDC)을 포함하나 이에 제한되지 않는 항체 및 항원 결합 단편의 효과기 기능을 증가시키는 것으로 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 이들 "탈푸코실화된" 항체 및 항원-결합 단편은 복합 N-글리코시드-연결된 당 사슬 내의 푸코스의 봉입에 필수적인 효소 및 생화학적 경로를 더 이상 함유하지 않도록 유전자 조작된 트랜스제닉(transgenic) 동물, 트랜스제닉 식물 또는 세포주(푸코실트랜스퍼라제 녹-아웃 동물, 식물 또는 세포로도 공지됨)를 포함하나 이에 제한되지 않는, 당업계에 공지된 분자 클로닝 기술을 이용하는 다양한 시스템을 통해 생산된다. 푸코실트랜스퍼라제 녹-아웃 세포가 되도록 조작되는 세포의 비제한적 예로는 CHO 세포, SP2/0 세포, NS0 세포 및 YB2/0 세포가 포함된다.

[0248] 가변(V) 영역 내에서의 면역글로불린의 글리코실화가 또한 관찰되었다. 삭스(Sox) 및 후드(Hood)는 인간 항체의 약 20%가 V 영역에서 글리코실화된다고 보고하였다(*Proc Natl Acad Sci USA* 66:975 (1970)). V 도메인의 글리코실화는 V 영역 서열 내 N-연결된 글리코실화 신호 Asn-Xaa-Ser/Thr의 우연한 발생에서 기인한 것으로 여겨지며, 당업계에는 면역글로불린 기능에서 중요한 역할을 하는 것으로 인식되지 않았다.

[0249] 가변 도메인 프레임워크 잔기에서의 글리코실화는 일부 경우에 항체의 항원과의 결합 상호작용을 변경한다. 본 개시내용은 인간화 면역글로불린 쇄의 프레임워크 또는 CDR 내 제한된 수의 아미노산이 항체의 친화도를 증가시키기 위해 (예를 들어, 잔기의 치환, 결실 또는 부가에 의해) 돌연변이되도록 선택되는 기준을 포함한다.

[0250] 일부 실시양태에서, 시스테인 잔기(들)는 제거되거나 항체 또는 Fc-함유 폴리펩티드의 Fc 영역에 도입됨으로써, 이 영역에서 쇄간 디설파이드 결합 형성을 제거하거나 증가시킨다. 이러한 방법을 사용하여 생성된 동종이량체 특이적 결합제 또는 항체는, 일부 실시양태에서, 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC)을 나타낸다.

[0251] CDR 내 서열은 항체가 MHC 클래스 II에 결합하게 하여 원치않는 헬퍼 T-세포 반응을 촉발하는 것으로 나타났다. 일부 실시양태에서, 보존적 치환은 항체가 결합 활성은 보유하도록 하지만 원치않는 헬퍼 T-세포 반응을 촉발하는 이의 능력은 감소시키도록 할 수 있다. 일 실시양태에서, 중쇄 또는 경쇄의 N-말단 20개 아미노산 중 하나 이상은 제거된다.

[0252] 일부 실시양태에서, 항체 분자는 개선된 ADCC 활성을 나타내는 푸코실화가 부재이거나 감소된 항체 분자를 포함

하여, 변경된 효과기 활성을 유발하는 변경된 탄수화물 구조에 의해 생산된다. 이를 달성하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, ADCC 효과기 활성은 C_{H2} 도메인의 Asn-297에서 N-연결된 글리코실화의 탄수화물 구조에 의존성인 것으로 나타난 Fc γ RIII 수용체에 대한 항체 분자의 결합에 의해 매개된다. 비-푸코실화 항체는 상기 수용체에 증가된 친화도로 결합하고, 본래의 푸코실화 항체보다 더 효율적으로 Fc γ RIII-매개 효과기 기능을 촉발한다. 일부 숙주 세포 스트레인(strain), 예를 들어 Lec13 또는 래트 하이브리도마 YB2/0 세포주는 보다 낮은 푸코실화 수준을 갖는 항체를 천연적으로 생산한다. 예를 들어 GnTIII 효소를 과발현하는 세포에서 항체를 재조합적으로 생산하는 것을 통한 이등분된 탄수화물의 수준의 증가도 ADCC 활성을 증가시키는 것으로 결정되었다. 일부 실시양태에서, 2개 푸코스 잔기 중 단지 하나의 부재만으로 ADCC 활성을 증가시키기에 충분하다.

[0253] 항체의 공유 변형이 또한 본원에 포함된다. 일부 실시양태에서, 이는 화학적 합성에 의해 또는 적용가능한 경우에 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 이루어진다. 일부 실시양태에서, 다른 유형의 공유 변형은 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써 도입된다.

[0254] 가장 통상적으로는 시스테인 잔기가 알파-할로아세테이트(및 상응하는 아민), 예컨대 클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 반응하여 카복시메틸 또는 카복시아미도메틸 유도체를 제공한다. 시스테인 잔기는 또한 브로모트리플루오로아세톤, 알파-브로모-베타-(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 디설파이드, 메틸 2-피리딜 디설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과의 반응에 의해 유도체화된다.

[0255] 일부 실시양태에서, 히스티딘 잔기는 pH 5.5 내지 7.0에서 디에틸피로카보네이트와의 반응에 의해 유도체화되며, 이는 상기 체제가 히스티딘 측쇄에 비교적 특이적이기 때문이다. 일부 실시양태에서, 파라-브로모페나실 브로마이드가 또한 유용하고; 반응은 일부 실시양태에서 pH 6.0의 0.1 M 나트륨 카코딜레이트 중에서 수행된다.

[0256] 일부 실시양태에서, 리시닐 및 아미노-말단 잔기는 석신산 또는 다른 카복실산 무수물과 반응한다. 이들 체제를 사용한 유도체화는 리시닐 잔기의 전하를 역전시키는 효과를 갖는다. 알파-아미노-함유 잔기를 유도체화시키기 위한 다른 적합한 시약은 이미도에스테르, 예컨대 메틸 피콜린이미데이트, 피리독살 포스페이트, 피리독살, 클로로보로하이드라이드, 트리니트로벤젠설포산, 0-메틸이소우레아, 2,4-펜탄디온, 및 글리옥실레이트와의 트랜스아미나제-촉매된 반응을 포함한다.

[0257] 일부 실시양태에서, 아르기닐 잔기는 하나 또는 여러 가지의 통상의 시약, 예컨대 페닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-사이클로헥산디온 및 난히드린과의 반응에 의해 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도체화는 구아디닌 작용기의 높은 pKa로 인해 반응이 알칼리성 조건에서 수행되는 것을 필요로 한다. 추가로, 이들 시약은 일부 실시양태에서 리신 기 및 또한 아르기닌 앵실론-아미노기와 반응한다.

[0258] 일부 실시양태에서, 티로실 잔기의 특정 변형이 이루어지고, 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과의 반응에 의해 스펙트럼 표지를 티로실 잔기 내로 도입하는 것이 특히 관심대상이다. 가장 통상적으로, 일부 실시양태에서 N-아세틸이미디졸 및 테트라니트로메탄이 각각 0-아세틸 티로실 중 및 3-니트로 유도체를 형성하는 데 사용된다. 티로실 잔기를 ^{125}I 또는 ^{131}I 를 사용하여 요오드화하여 방사선면역분석에 사용하기 위한 표지된 단백질을 제조한다.

[0259] 카복실 측기(아스파틸 또는 글루타밀)는 카보디이미드($R-N=C=N-R'$)와의 반응에 의해 특이적으로 변형되며, 여기서 R 및 R'는 상이한 알킬 기, 예컨대 1-사이클로헥실-3-(2-모르폴리닐-4-에틸) 카보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸)카보디이미드이다. 게다가, 아스파틸 및 글루타밀 잔기는 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환된다.

[0260] 일부 실시양태에서, 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기는 각각 상응하는 글루타밀 및 아스파르틸 잔기로 탈아미드화된다. 이들 잔기는 중성 또는 염기성 조건 하에 탈아미드화된다.

[0261] 다른 변형은 프롤린 및 리신의 하이드록실화, 세릴 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실 기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 알파-아미노 기의 메틸화, N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카복실 기의 아미드화를 포함한다.

[0262] 또 다른 유형의 공유 변형은 특이적 결합제 또는 항체에 글리코시드를 화학적 또는 효소적으로 커플링시키는 것

을 수반한다. 이들 절차는 N- 또는 O-연결된 글리코실화에 대한 글리코실화 능력을 갖는 숙주 세포에서 폴리펩티드 또는 항체의 생성을 요구하지 않는다. 일부 실시양태에서, 사용되는 커플링 방식에 따라, 당(들)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 유리 카복실 기, (c) 유리 설프히드릴 기, 예컨대 시스테인의 것, (d) 유리 하이드록실 기, 예컨대 세린, 트레오닌 또는 하이드록시프롤린의 것, (e) 방향족 잔기, 예컨대 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 것, 또는 (f) 글루타민의 아마이드 기에 부착된다.

[0263] 폴리펩티드 또는 항체 상에 존재하는 임의의 탄수화물 모이어티의 제거는 일부 실시양태에서 화학적으로 또는 효소적으로 달성된다. 화학적 탈글리코실화는 화합물 트리플루오로메탄설폰산 또는 동등한 화합물에 대한 항체의 노출을 수반한다. 이러한 처리는, 항체는 온전하게 남겨두면서, 연결 당 (N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토스아민)을 제외한 대부분 또는 모든 당의 절단을 초래한다. 항체 상의 탄수화물 모이어티의 효소적 절단은 일부 실시양태에서 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제를 사용함으로써 달성된다.

[0264] 또 다른 유형의 공유 변형은 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리옥시에틸화 소르비톨, 폴리옥시에틸화 글루코스, 폴리옥시에틸화 글리세롤, 폴리옥시알킬렌 또는 다당류 중합체, 예컨대 텍스트란 중 하나에 항체를 연결하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0265] 미리 결정된 폴리펩티드 항원에 결합하기 위한 친화도는 일반적으로 V 영역 프레임워크, 전형적으로 하나 이상의 CDR에 인접한 영역 및/또는 하나 이상의 프레임워크 영역에 하나 이상의 돌연변이를 도입함으로써 조절된다. 전형적으로, 이러한 돌연변이는 글리코실화 부위 서열을 파괴하거나 생성하지만 폴리펩티드의 소수성 구조적 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 보존적 아미노산 치환의 도입을 포함한다. 전형적으로, 프롤린 잔기를 도입하는 돌연변이는 피한다.

[0266] 효과기 기능

[0267] 항체 효과기 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC); 식세포 작용; 세포 표면 수용체(예를 들어 B 세포 수용체)의 하향조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다. 전형적으로, Fc-매개 기능은 그 기능이 영향을 받을 세포에 의해 발현되는 전문화된 수용체 분자, "Fc 수용체" 또는 "FcR"에 의한 항체의 Fc 부분의 결합을 수반한다.

[0268] IgG는 일부 실시양태에서 면역글로불린 분자의 모든 기능을 수행하기 때문에 가장 다목적용인 면역글로불린으로 간주된다. IgG는 혈청 중의 주요 Ig이고, 태반을 가로지르는 Ig의 유일한 부류이다. IgG는 또한 보체를 고정하나, IgG4 하위부류는 그렇지 않다. 대식세포, 단핵구, 다형핵 백혈구(PMN) 및 일부 림프구는 IgG의 Fc 영역에 대한 Fc 수용체를 갖는다. 모든 하위부류가 동등하게 잘 결합하는 것은 아니며; IgG2 및 IgG4는 Fc 수용체에 결합하지 않는다. PMN, 단핵구 및 대식세포 상의 Fc 수용체에 대한 결합의 결과는, 일부 경우에 세포가 이제 항원을 더 잘 내재화할 수 있다는 것이다. IgG는 식세포작용을 향상시키는 옵소닌이다. 다른 유형의 세포 상의 Fc 수용체에 대한 IgG의 결합은 다른 기능의 활성화를 초래한다.

[0269] 소정 실시양태에서, FcR은 본래 서열 인간 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체와 결합하는 것이고(감마("γ") 수용체), FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII 하위부류의 수용체를 포함하는데, 여기에는 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 선택적으로 스플라이싱된 형태가 포함된다. FcγRII 수용체는 FcγRIIA("활성화 수용체") 및 FcγRIIB("억제성 수용체")를 포함하고, 이들은 이의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 FcγRIIA는 이의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 FcγRIIB는 이의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM)를 포함한다.

[0270] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 소정 세포독성 세포(예를 들어, 자연 살해(NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR)에 결합된 분비된 Ig가, 이들 세포독성 효과기 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후 세포독성으로 표적 세포를 사멸시킬 수 있도록 하는 세포독성의 형태를 지칭한다. 항체는 세포독성 세포를 "무장(arm)"시키고 이러한 사멸에 요구된다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현한다. 관심대상 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 일부 실시양태에서 시험관내 ADCC 분석이 수행된다. 이러한 분석에 유용한 효과기 세포는 말초혈 단핵 세포(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포를 포함한다.

[0271] 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시양태에서, 관심대상 분자의 ADCC 활성은 생체내, 예를 들어 동물 모델에서 평가된다.

[0272] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 M2-유사 대식세포의 표면 막 단백질에 결합하고 이에 의해 내재화된

다. 이러한 내재화 과정은 관찰된 이들 세포의 기능적 면역억제 특성의 변경, 즉 세포를 사멸시키거나 세포의 증식을 억제하지 않으면서 M2 상태로부터 미묘하게 활성화된 상태로의 세포의 분화에 관여하는 것으로 믿어진다. 일부 실시양태에서, 내재화 시, 항체는 $CD4^{+}$ 헬퍼 T 세포 및 세포독성 림프구를 포함하는 T 세포의 활성화 또는 증식을 자극하거나 촉진하는 가용성 인자의 발현을 증가시키면서 면역억제성 가용성 인자의 발현을 감소시킨다.

[0273] 특정 치료 적용을 위해, 내재화 과정은 CD163 단백질을 발현하는 표적 세포를 사멸시키거나 이의 활성화 또는 증식을 감소시킬 목적으로 사용된다. 내재화된 항체 분자의 수는 세포, 특히 암 세포를 사멸시키거나 이의 성장을 억제하는 데 충분하거나 적당할 것이다. 항체 또는 항체 접합체의 강도에 따라, 일부 사례에서, 세포 내로의 단일 항체 분자의 흡수는 항체가 결합하는 표적 세포를 사멸시키는 데 충분하다. 예를 들어, 소정 독소는 사멸에 있어 매우 강력하여, 항체에 접합된 하나의 독소 분자의 내재화가 감염 세포를 사멸시키는 데 충분하다.

[0274] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 항원-결합 단편은 치료적 모이어티 및/또는 영상화 또는 검출가능한 모이어티 및/또는 친화성 태그에 접합되거나 연결된다. 폴리펩티드를 접합 또는 연결시키는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 화합물과 표지 사이의 회합(결합)은 공유 및 비공유 상호작용, 화학적 결합뿐만 아니라, 제조합 기술을 포함하나 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 수단을 포함한다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 일부 실시양태에서 친화성 태그(예를 들어, 정제 태그)에 접합되거나 이것으로 제조합적으로 조작된다. 예를 들어, 폴리-히스티딘(예를 들어, His6) 태그와 같은 친화성 태그는 당업계에서 통상적이다.

[0275] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 검출가능한 모이어티를 추가로 포함한다. 검출은 예를 들어 시험관내, 생체내 또는 생체외에서 수행된다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 사용하여, 대식세포에 의해 발현된, 예를 들어 huCD163 단백질의 검출 및/또는 결정(정량, 적격성 등)하기 위한 시험관내 분석은 예를 들어 ELISA, RIA 및 웨스턴 블롯을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체의 항원의 시험관내 검출, 진단 또는 모니터링은 대상체로부터 샘플(예를 들어, 혈액 샘플)을 수득하고, 예를 들어 표준 ELISA 분석에서 샘플을 시험함으로써 발생한다.

[0276] 또한, 소정 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 및 담체를 포함하는 조성물이 본원에 개시된다.

[0277] 약학 조성물

[0278] 소정 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물이 본원에 개시된다.

[0279] 이러한 조성물은 시험관내 또는 생체내 분석에 유용하거나, 약학 조성물의 경우에, 개시된 항체로 대상체를 치료하기 위해 대상체에게 생체내 또는 생체외 투여하는 데 유용하다.

[0280] 일부 실시양태에서, 부형제는 담체, 완충제, 안정화제 또는 당업자에게 공지된 기타 적합한 물질이다. 이러한 물질은 비독성이어야 하고 활성 성분의 효능을 방해하지 않아야 한다. 담체 또는 기타 물질의 정확한 특성은 투여 경로에 의존할 것이다.

[0281] 본원에 설명된 방법으로 식별된 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 약학적 제형은 일부 실시양태에서 원하는 정도의 순도를 갖는 단백질을 임의적인 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제(예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)] 참조)와 혼합하여 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 저장을 위해 제조된다. 허용되는 담체 또는 안정화제는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비-독성인 것들이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온, 예컨대 나트륨; 금속 착체(예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 TWEEN®, PLURONICS® 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 소정 실시양태에서, 약학 조성물은 5 내지 200 mg/mL; 바람직하게는 10 내지 100 mg/mL의 농도의 항체를 포함한다.

[0282] 허용되는 담체는 투여된 대상체에게 생리학적으로 허용되는 것이고, 그와 함께/그 안에서 투여되는 화합물의 치

료적 특성을 보유한다. 허용되는 담체 및 이의 제형은 예를 들어 문헌[*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 상기]에 일반적으로 기재되어 있다. 한가지 예시적인 약학적 담체는 생리 식염수이다. 본원에 사용된 어구 "약학적으로 허용되는 담체"는 대상 화합물을 신체의 한 기관 또는 부분의 투여 부위로부터 신체의 다른 기관 또는 부분으로 운반하거나 수송하는 데 관여하거나 시험관내 분석 시스템에 관여하는 약학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클, 예컨대 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 각각의 담체는 제형의 다른 성분과 상용성이고 그것이 투여되는 대상체에게 해롭지 않은 의미에서 허용된다. 허용되는 담체는 대상 화합물의 특이적 활성을 변경하지도 않아야 한다.

- [0283] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은 조성물 중 화합물의 안정성을 개선시키고/거나 조성물의 방출 속도를 제어하기 위해 허용되는 첨가제를 추가로 포함한다. 허용되는 첨가제는 대상 화합물의 특이적 활성을 변경하지 않는다. 예시적인 허용되는 첨가제는 당, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 글루코스, 크실리톨, 트레할로스, 소르보스, 수크로스, 갈락토스, 텍스트란, 텍스트로스, 프럭토스, 락토스 및 이의 혼합물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 허용되는 첨가제는 일부 실시양태에서 허용되는 담체 및/또는 부형제, 예컨대 텍스트로스와 조합된다. 대안적으로, 예시적인 허용되는 첨가제는 펩티드의 안정성을 증가시키고 용액의 겔화를 감소시키는 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 계면활성제는 용액의 0.01% 내지 5%의 양으로 조성물에 첨가된다. 이러한 허용되는 첨가제의 첨가는 저장 시 조성물의 안정성 및 반감기를 증가시킨다.
- [0284] 일 실시양태에서, 약학 조성물은 등장화시키고 안정화시키는 등장화제, 예컨대 폴리올, 소르비톨, 수크로스 또는 염화나트륨과 조합된 등장성 완충제, 예컨대 포스페이트, 아세테이트 또는 트리스(TRIS) 완충제를 함유한다. 일부 실시양태에서, 등장화제는 약 5%의 양으로 조성물에 존재할 수 있다.
- [0285] 또 다른 실시양태에서, 약학 조성물은 응집을 방지하도록 및 안정화를 위해 0.01 내지 0.02% wt/vol에서 계면활성제를 포함한다.
- [0286] 또 다른 실시양태에서, 약학 조성물의 pH는 4.5 내지 6.5 또는 4.5 내지 5.5의 범위이다.
- [0287] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은 또한 치료할 적응증에 필요한 경우에 하나 초과와 활성 화합물, 예컨대 서로 유해하게 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 화합물을 함유한다. 예를 들어, 치료 방법은 추가로 면역억제제를 제공한다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.
- [0288] 일부 실시양태에서, 활성 성분은, 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조되는 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로구체, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에 또는 마크로에멀전에 봉입된다. 이러한 기술은 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 상기]에 개시되어 있다.
- [0289] 항체의 현탁액 및 결정 형태가 또한 본원에서 고려되고; 현탁액 및 결정 형태를 제조하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0290] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은 멸균된 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은 통상의 널리 공지된 멸균 기술에 의해 멸균된다. 예를 들어, 멸균은 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다. 일부 실시양태에서, 생성된 용액은 사용을 위해 포장되거나 무균 조건 하에 여과되고 동결건조되고, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 용액과 조합된다.
- [0291] 동결건조는 일부 실시양태에서 장기간 저장을 위해, 예컨대 폴리펩티드가 액체 조성물 중에서 비교적 불안정한 경우에 폴리펩티드를 안정화시키는 데 사용된다.
- [0292] 일부 실시양태에서, 일부 부형제, 예컨대, 예를 들어, 폴리올(만니톨, 소르비톨 및 글리세롤 포함); 당(글루코스 및 수크로스 포함); 및 아미노산(알라닌, 글리신 및 글루탐산 포함)이 동결건조된 생성물에 대한 안정화제로서 작용한다. 폴리올 및 당은 또한 일부 실시양태에서 폴리펩티드를 동결 및 건조-유발 손상으로부터 보호하고 건조된 상태에서 저장 동안 안정성을 개선시키는데 사용된다. 당은 일부 실시양태에서 동결건조 공정에서 및 저장 동안 둘다에 효과적일 수 있다. 단당류 및 이당류 및 중합체, 예컨대 PVP를 포함하는 다른 부류의 분자도 동결건조된 생성물의 안정화제로서 보고되었다.
- [0293] 주사를 위해, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은 상기 설명한 바와 같이 적절한 용액을 사용한 제구성에 적합한 분말일 수 있다. 이들의 예는 동결 건조, 회전 건조 또는 분무 건조된 분말, 무정형 분말, 파

립, 침전물 또는 미립자를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 주사용으로, 조성물은 임의로 안정화제, pH 조절제, 계면활성제, 생체이용률 조절제 및 이들의 조합물을 함유한다.

[0294] 일부 실시양태에서 지속-방출 제제가 제조된다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지속-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 하이드로겔(예를 들어, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드(미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과 γ -에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT.TM)(락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가 가능한 마이크로구체), 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산을 포함한다. 중합체, 예컨대 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산은 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 소정 하이드로겔은 단백질을 보다 짧은 기간 동안 방출한다. 일부 실시양태에서, 캡슐화된 항체가 장기간 동안 체내에서 유지되는 동안, 이것은 37°C에서의 습기 노출의 결과로서 변성 또는 응집되어 생물학적 활성의 상실 및 면역원성의 가능한 변화를 초래할 수 있다. 일부 경우에 안정화를 위해 고안된 합리적인 전략은 관련 메커니즘에 의존한다. 예를 들어, 응집 메커니즘이 티오-디설파이드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되는 경우에, 안정화는 일부 경우에 설프하이드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 수분 함량의 제어, 적절한 첨가제의 사용 및 특정 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성된다.

[0295] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은 본원에 설명된 바와 같이 단기-작용, 신속-방출, 장기-작용 또는 지속-방출되도록 설계된다. 일 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은 제어 방출 또는 느린 방출을 위해 제형화된다.

[0296] 약학 조성물은 예를 들어 피하, 유리체내, 피내, 정맥내, 동맥내, 복강내, 뇌척수내 또는 근육내 주사를 포함하나 이에 제한되지 않는 주사에 의해 투여된다. 각 유형의 주사용 조성물의 제형화에 사용하기 위한 부형제 및 담체가 본원에서 고려된다. 하기 설명은 단지 예시이며 조성물의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다. 주사용 조성물은 수용액(여기서 수용성) 또는 분산액뿐만 아니라 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리 식염수, 정균수, Cremophor EL.TM(BASF, 뉴저지주 파시파니) 또는 포스페이트 완충염 염수(PBS)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산매이다. 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우에는 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지된다. 항체균제 및 항진균제는, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산 및 티메로살을 포함한다. 일부 실시양태에서 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 및 염화나트륨이 조성물에 포함된다. 일부 실시양태에서, 생성된 용액은 그 자체로 사용을 위해 포장되거나 동결건조된다; 동결건조된 제제는 일부 실시양태에서 추후에 투여하기 전에 멸균 용액과 조합된다. 정맥내 주사 또는 통증 부위에서의 주사를 위해, 활성 성분은 발열원 무함유이고 적합한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구적으로 허용되는 수용액의 형태일 것이다. 관련 기술분야의 숙련가는 예를 들어 등장성 비히클, 예컨대 염화나트륨 주사, 링거 주사 및 락테이트화 링거 주사를 사용하여 적합한 용액을 잘 제조할 수 있다. 일부 실시양태에서 필요한 경우에, 보존제, 안정화제, 완충제, 항산화제 및/또는 다른 첨가제가 포함된다. 멸균 주사가 가능한 용액은 일부 실시양태에서 필요량의 활성 성분을 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 이의 조합물과 함께 적절한 용매 중에 혼입시킨 후 멸균 여과함으로써 제조된다. 일반적으로, 분산액은 염기성 분산매 및 상기 열거된 것으로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 활성 화합물을 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사가 가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 활성 성분에 더하여 이전에 멸균-여과된 이의 용액으로부터의 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말을 산출하는 진공 건조 및 동결 건조이다.

[0297] 조성물은 일부 실시양태에서 통상적으로 정맥내로, 예컨대 예를 들어 단위 용량의 주사에 의해 투여된다. 주사를 위해, 일부 실시양태에서, 활성 성분은 실질적으로 발열원 무함유이고 적합한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구로 허용되는 수용액의 형태이다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 염화나트륨 주사, 링거 주사액, 락테이트화 링거 주사와 같은 등장성 비히클을 사용하여 적합한 용액을 제조할 수 있다. 일부 실시양태에서 필요한 경우에, 보존제, 안정화제, 완충제, 항산화제 및/또는 다른 첨가제가 포함된다. 추가로, 조성물은 일부 실시양태에서 에어로졸화를 통해 투여된다. (Lahn et al., *Int Arch Allergy Immunol* 134:49-55 (2004))

[0298] 비경구 투여를 위해, 항체는 약학적으로 허용되는 비경구 비히클과 함께 주사가 가능한 단위 투여량 형태(용액, 현탁액, 에멀전)로 제형화된다. 이러한 비히클의 예로는 물, 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액 및 5% 인간 혈청

알부민이 포함된다. 고정유 및 에틸올레이트와 같은 비수성 비히클도 사용된다. 리포솜은 담체로서 사용된다. 비히클은 등장성 및 화학적 안정성을 향상시키는 물질과 같은 첨가제, 예를 들어 완충제 및 보존제를 소량 함유한다. 항체는 전형적으로 이러한 비히클에 약 1 mg/mL 내지 10 mg/mL의 농도로 제형화된다.

[0299] 일 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은 예를 들어 저장 시 저장 수명을 증가시키기 위해 동결건조된다. 조성물이 약제 또는 본원에 제공된 임의의 방법에서의 사용을 위해 고려되는 경우에, 일부 실시양태에서 조성물은 조성물이 인간 대상체에게 투여되는 경우에 염증성 반응 또는 안전하지 못한 알레르기 반응을 유발하지 않을 수 있도록 실질적으로 발열원 무함유인 것으로 고려된다. 조성물을 발열원에 대해 시험하고 실질적으로 발열원 무함유인 조성물을 제조하는 것은 일부 실시양태에서 당업자에게 널리 이해되고 있고 상업적으로 입수가 가능한 키트를 사용하여 달성된다.

[0300] 일부 실시양태에서, 허용되는 담체는 흡수 또는 청소(clearance)를 안정화, 증가 또는 지연시키는 화합물을 함유한다. 이러한 화합물은 예를 들어 탄수화물, 예컨대 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란; 저분자량 단백질; 펩티드의 청소 또는 가수분해를 감소시키는 조성물; 또는 부형제 또는 다른 안정화제 및/또는 완충제를 포함한다. 흡수를 지연시키는 제제는 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 담체를 포함하는 세제가 또한 약학 조성물의 흡수를 안정화 또는 증감시키는 데 사용된다. 분해로부터 보호하기 위해, 화합물을 일부 실시양태에서 조성물과 함께 복합체화하여 화합물이 산 가수분해 및 효소적 가수분해에 저항성이 되게 하거나, 화합물을 일부 실시양태에서 적절히 저항성인 담체, 예컨대 리포솜 중에 복합체화한다. 화합물을 분해로부터 보호하는 수단은 당업계에 공지되어 있다.

[0301] 조성물은 일부 실시양태에서 투여 제형과 상용성인 방식으로 및 치료 유효량으로 투여된다. 투여될 양은 치료할 대상체, 활성 성분을 이용하는 대상체의 면역계의 능력, 및 원하는 결합 능력의 정도에 의존한다. 투여에 요구되는 활성 성분의 정확한 양은 의사의 판단에 의존하고, 각 개체에 대해 특유하다. 최초 투여 및 부스터 샷에 적합한 레지먼은 또한 가변적이지만, 최초 투여한 후, 1시간 이상의 간격으로 후속 주사 또는 다른 투여에 의한 투여를 반복하는 것이 대표적이다. 대안적으로, 혈중 농도를 유지하기에 충분한 연속 정맥내 주입이 고려된다.

[0302] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 병태, 질환 또는 장애를 치료하기 위한 약제를 제조하기 위한 본원에 기재된 조성물의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 약제는 치료를 필요로 하는 대상체의 신체적 특성에 기반하여 제형화되고, 병태, 질환 또는 장애의 병기에 기반하여 단일 또는 다중 제형으로 제형화된다. 약제는 병원 및 진료소로의 배포를 위해 적절한 라벨을 갖는 적합한 패키지로 포장되고, 여기서 라벨은 일부 실시양태에서 본원에 기재된 질환을 갖는 대상체를 치료하기 위한 것임을 나타낸다. 약제는 일부 실시양태에서 단일 또는 다중 단위로서 포장된다. 조성물의 투여량 및 투여에 대한 지침서는 일부 실시양태에서 하기 기재된 바와 같은 패키지와 함께 포함된다. 본 개시내용은 추가로 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제에 관한 것이다.

[0303] 일부 실시양태에서, 조성물(본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편)은 치료할 병태에 따라 단독으로 또는 제2 조성물과 조합되어 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 일 실시양태에서, 제2 치료적 치료는 항암 요법 또는 항암 치료제이다. 둘 이상의 조성물이 투여되는 경우에, 조성물은 예를 들어 조합되어 (순차적으로 또는 동시에) 투여된다. 조성물은 일부 실시양태에서 단일 용량 또는 다중 용량으로 투여된다.

[0304] 일부 실시양태에서, 인간 대상체에게의 투여를 위해 제형화되는 경우에, 조성물은 발열원 무함유이도록 제형화될 수 있다. 조성물을 발열원에 대해 시험하고 실질적으로 발열원 무함유인 약학 조성물을 제조하는 것은 당업자에게 널리 이해된다.

[0305] 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 일부 실시양태에서 주사를 포함하나 이에 제한되지 않는, 대상체에 대한 임의의 적합한 투여 경로를 위해 제형화된다. 주사는 예를 들어 피하, 복강, 정맥내 주사, 근육내 주사 또는 뇌척수액(CSF) 내로의 척수 주사를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7곳 또는 그 이상의 주사 부위에서 이루어진다. 일 실시양태에서, 투여는 6곳의 주사 부위를 통해 이루어진다.

[0306] 생체내 적용을 위해, 접촉은 예를 들어 임의의 적합한 수단에 의해 대상체에게 조성물(본원에 설명된 바와 같은)을 투여함으로써 일어난다. 본원에 기재된 항체는, 일부 실시양태에서, 비경구, 피하, 복강내, 뇌척수내, 폐내 및 비강내 투여를 통한 것을 포함하는 임의의 적합한 수단에 의해 전신으로 또는 국부로 투여되고, 원하는 경우에 국부 치료를 위해 병변내 투여된다. 비경구 경로는 예를 들어 정맥내, 동맥내, 복강내, 경막외, 근육내 및 척추강내 투여를 포함한다. 이러한 투여는 일부 실시양태에서 볼루스(bolus), 연속 주입 또는 펄스 주입이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 부분적으로 투여가 단기인지 만성인지의 여부에 따라 주사에 의해 투여

된다. 예를 들어 원하는 부위에 가까이 위치한 카테터를 통해 국소, 특히 경피, 경점막, 직장, 경구 또는 국부 투여를 포함한 투여 방법의 다른 방식이 고려된다.

[0307] **치료 및 사용 방법**

[0308] 소정 실시양태에서, 치료를 필요로 하는 개체에서 암을 치료하는 방법으로서, 개체에게 본원에 개시된 항체를 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 인간 대상체에서 암을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 기재된 항체의 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 종양 관련 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고 대식세포에 의한 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15 중 적어도 하나의 발현을 감소시킨다.

[0309] 소정 실시양태에서, 면역 활성의 조절을 필요로 하는 대상체에서 면역 활성을 조절하는 방법으로서, 상기 대상체에게 본원에 기재된 항체를 투여하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 종양 관련 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고 대식세포에 의한 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15 중 적어도 하나의 발현을 감소시킨다.

[0310] 소정 실시양태에서, 병리학적으로 또는 부적절하게 상승된 수준의 M2 대식세포(예를 들어, 대상체에서 면역-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는데 유용한 수준에 비해 부적절하게 상승됨)를 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 본원에 기재된 항체를 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 종양 관련 대식세포 상에서 발현되는 CD163 단백질에 특이적으로 결합하고 대식세포에 의한 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15 중 적어도 하나의 발현을 감소시킨다.

[0311] 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2 및 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다.

[0312] 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2, 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2, 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2, 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR3 중 적어도 하나를 포함한다.

[0313] 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR1, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR2, 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 CDR3, 서열번호 4에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR1, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 6에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약

미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0327] 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서 중쇄는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0328] 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서 중쇄는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0329] 또한 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서 경쇄는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖고 중쇄는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖고 중쇄는 서열번호 15에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0330] 일부 실시양태에서, 항체는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄 및 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 70% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서 경쇄는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖고 중쇄는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 적어도 약 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 서열번호 14에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖고 중쇄는 서열번호 16에 기재된 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0331] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 암을 갖는 인간 대상체에서 종양 관련 대식세포에 의한 면역억제를 감소시키는 약제의 제조를 위한, 본원에 기재된 항체의 용도를 제공한다.

[0332] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 암을 갖는 인간 대상체에서 T 세포-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 약제의 제조를 위한, 본원에 기재된 항체의 용도를 제공한다.

[0333] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 암을 갖는 인간 대상체의 치료 방법으로서, 대상체에게 본원에 기재된 항체의 치료 유효량을 투여하고 이에 의해 개체에서 종양 관련 대식세포에 의한 면역억제가 감소되는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0334] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 암을 갖는 인간 대상체의 치료 방법으로서, 대상체에게 본원에 기재된 항체의 치료 유효량을 투여하고 이에 의해 개체에서 T 세포-매개 종양 세포 사멸이 증가되는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0335] 소정 실시양태에서, 암을 갖는 환자에서 종양 관련 대식세포를 기능적으로 재배향시켜 면역억제를 감소시키는 방법으로서, 환자에게 종양 미세환경에서 $CD4^{+}$ 또는 $CD8^{+}$ T 세포 활성화 또는 증식을 개선하기에 유효한 양의 본원에 기재된 항체를 포함하는 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0336] 소정 실시양태에서, 촉진을 필요로 하는 인간 대상체에서 림프구-매개 종양 세포 사멸을 촉진하는 방법으로서, 개체에게 본원에 기재된 항체를 포함하는 약학 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시된다.

[0337] 소정 실시양태에서, 종양 미세환경에서 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하는 방법으로서, 종양 관련 대식세포를 본원에 개시된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시되며, 여기서 상기 방법은 다음의 효

과 중 적어도 하나를 초래한다:

- [0338] (a) 인간 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다;
- [0339] (b) 인간 대식세포에 의한 항체의 내재화;
- [0340] (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화;
- [0341] (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합; and
- [0342] (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.
- [0343] 소정 실시양태에서, 종양 미세환경에서 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하는 방법으로서, 종양 관련 대식세포를 본원에 개시된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시되며, 여기서 상기 방법은 다음의 효과 중 적어도 2가지를 초래한다:
- [0344] (a) 인간 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다;
- [0345] (b) 인간 대식세포에 의한 항체의 내재화;
- [0346] (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화;
- [0347] (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합증식; 및
- [0348] (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.
- [0349] 소정 실시양태에서, 종양 미세환경에서 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하는 방법으로서, 종양 관련 대식세포를 본원에 개시된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시되며, 여기서 상기 방법은 다음의 효과 중 적어도 3가지를 초래한다:
- [0350] (a) 인간 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다;
- [0351] (b) 인간 대식세포에 의한 항체의 내재화;
- [0352] (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화;
- [0353] (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및
- [0354] (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.
- [0355] 소정 실시양태에서, 종양 미세환경에서 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하는 방법으로서, 종양 관련 대식세포를 본원에 개시된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시되며, 여기서 상기 방법은 다음의 효과 중 적어도 4가지를 초래한다:
- [0356] (a) 인간 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다;
- [0357] (b) 인간 대식세포에 의한 항체의 내재화;
- [0358] (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화;
- [0359] (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및
- [0360] (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.
- [0361] 소정 실시양태에서, 종양 미세환경에서 종양 관련 대식세포의 활성을 조절하는 방법으로서, 종양 관련 대식세포를 본원에 개시된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 본원에 개시되며, 여기서 상기 방법은 다음의 효과 중 적어도 5가지를 초래한다:

- [0362] (a) 인간 대식세포에 의한 적어도 하나의 마커의 발현 감소, 여기서 적어도 하나의 마커는 CD16, CD64, TLR2 또는 시글렉-15이다;
- [0363] (b) 인간 대식세포에 의한 항체의 내재화;
- [0364] (c) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 활성화;
- [0365] (d) $CD4^{+}$ T 세포, $CD8^{+}$ T 세포, NK 세포 또는 이들의 임의의 조합의 증식; 및
- [0366] (e) 종양 미세환경에서 종양 세포 사멸의 촉진.
- [0367] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 CD8 T 세포 활성화 및 증식의 골수 세포 억제를 감소시킨다.
- [0368] M2 대 M1 대식세포 분극화는 본 개시내용의 M2 또는 M2-유사 대식세포가 변경되어 생성된 대식세포가 M1 또는 M1-유사 대식세포와 관련된 소정 기능적 또는 표현형 속성을 갖게 되는 과정을 지칭한다. 일부 실시양태에서, M2 또는 M2-유사 대식세포는 더 이상 CD163을 발현하지 않을 때 분극화된다.
- [0369] 일부 실시양태에서, 항체는 CD8 T 세포에 의한 라지 세포의 CD19-CD3 BiTE-매개 사멸의 골수 세포 억제를 감소시킨다.
- [0370] 일부 실시양태에서, 항체는 암 세포의 CAR T-세포-매개 사멸의 골수 세포 억제를 감소시킨다.
- [0371] 일부 실시양태에서, 항체는 ADCC에 의한 암 세포의 NK 세포-매개 사멸의 골수 세포 억제를 감소시킨다.
- [0372] 일부 경우에, 본원에 개시된 임의의 방법은 추가의 항암 요법을 상기 대상체에게 실시하는 것을 추가로 포함한다. 항암 요법은 수술 요법, 화학요법, 방사선 요법, 냉동요법, 호르몬 요법, 면역요법 및 사이토킨 요법, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일 실시양태에서, 항체 또는 이의 항체-결합 단편 및 항암 요법은 동시에 또는 순차적으로 실시된다.
- [0373] 일부 실시양태에서, 추가 항암 요법은 면역요법이다. 일부 실시양태에서, 면역요법은 체크포인트 억제제를 포함하는 조성물이다. 일부 실시양태에서, 추가 항암 요법은 면역 체크포인트 억제제이다.
- [0374] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 huCD163-발현 대식세포를 포함하는 것으로 의심되는 세포 샘플에서 huCD163-발현 대식세포를 식별하기 위한 시험관내 또는 생체의 방법으로서, 세포 샘플을 본원에 기재된 항체와 접촉시키는 단계 및 샘플에서 세포에 대한 결합을 측정하는 단계를 포함하고, 양성 신호가 샘플에서 huCD163-발현 대식세포의 존재를 나타내는 방법을 제공한다.
- [0375] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포 샘플에서 인간 M2c 대식세포를 식별하는 방법으로서, 인간 M2c 대식세포를 포함하는 것으로 의심되는 혈액 세포를 포함하는 세포 샘플을 본원에 기재된 항체와 접촉시키는 단계 및 샘플에서 세포에 대한 결합을 측정하는 단계를 포함하고, 양성 신호는 샘플에서 인간 M2c 대식세포의 존재를 나타내는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 인간 대상체로부터 획득된 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 배양된 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플에서 M2 세포를 검출하는 방법은 결합 시 세포에 의해 내재화되지 않지만 세포 외부에 결합된 상태로 남아 있어 검출을 용이하게 하는 항체 또는 단편을 사용하는 것을 포함한다.
- [0376] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포 샘플에서 huCD163-발현 암 세포를 식별하는 방법으로서, huCD163-발현 암 세포를 포함하는 것으로 의심되는 세포를 포함하는 세포 샘플을 본원에 기재된 항체와 접촉시키는 단계 및 샘플에서 세포에 대한 결합을 측정하는 단계를 포함하고, 양성 신호가 샘플에서 huCD163-발현 암 세포의 존재를 나타내는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 인간 대상체로부터 획득된 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 배양된 세포를 포함한다.
- [0377] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 M2c 대식세포 상에서 세포 표면 마커의 발현을 조절하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, CD16(Fc γ IIIa), CD64(Fc γ I), 시글렉-15 및 TLR2 중 적어도 하나의 발현이 감소된다. 일부 실시양태에서, CD16, CD64, 시글렉-15 및 TLR2의 발현이 감소된다.
- [0378] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 T 세포 활성화의 골수 세포 억제를 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서 방법은 T 세포에 의한 IL-2 생산 증가를 유도한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 Th1 세포 증식을 증가시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 증식하는 T 세포 중 Th1 세포의 비율을 증가시키는 방법을 제공한다. 이들 각각의 측면에서, 방법은 생체내에서 본원에 기재된 항체를 투여하거나, 시험

관내 또는 생체외에서 항체를 복합 면역 세포 시스템과 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 대식세포 및 효과기 T 세포, 및 임의의 중앙 표적 세포는 생체내 상호작용을 재현하거나 모델링하는 방식으로 상호작용하도록 허용된다.

- [0379] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 T 세포 증식의 골수 세포 억제를 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 $CD4^{+}$ 세포 증식 또는 $CD8^{+}$ T 세포 증식, 또는 둘다를 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0380] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 T 세포 발현의 증가를 필요로 하는 환자에서 CD69, ICOS, OX40, PD-1, LAG3 및 CTLA4 중 적어도 하나의 T 세포 발현을 증가시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서 방법은 $CD4^{+}$ T 세포에 의한 CD69, ICOS, OX40, PD-1, LAG3 및 CTLA4 중 적어도 하나의 발현을 증가시킨다. 일부 실시양태에서 방법은 $CD8^{+}$ T 세포에 의한 ICOS, OX40, PD-1, LAG3 및 CTLA4 중 적어도 하나의 발현을 증가시킨다.
- [0381] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 암 세포 사멸을 증가시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서 세포독성 림프구(CTL)에 의한 암 세포 사멸이 증가된다. 일부 실시양태에서, MHC-불일치 암 세포의 T 세포-매개 사멸이 증가된다.
- [0382] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 골수 세포를 본원에 기재된 항체와 접촉시켜 $CD8^{+}$ T 세포 활성화 또는 $CD8^{+}$ T 세포 증식의 대식세포-매개 억제를 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 M0 대식세포를 포함하는 골수 세포와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 항체는 M2 대식세포를 포함하는 골수 세포와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 항체는 M0 및 M2 대식세포를 포함하는 골수 세포와 접촉된다.
- [0383] 일부 실시양태에서 본 개시내용은 폐암을 갖는 인간 환자를 치료하는 방법으로서, 환자에게 본원에 기재된 항체를 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 폐암은 암종 또는 선암종이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 비소세포 폐암이다.
- [0384] 본 개시내용의 효과적인 반응은 대상체가 질병의 징후 또는 증상의 부분적 또는 전체적 완화 또는 감소를 경험할 때 달성되며, 암 치료의 경우, 구체적으로 치유, 관해, 생존 연장 또는 기타 객관적인 반응을 비제한적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 예상되는 무진행 생존기간은 재발 횟수, 질환의 병기 및 기타 요인을 포함하는 예후 요인에 따라 수개월 내지 수년으로 측정된다. 생존 연장은 비제한적으로 적어도 1개월(월), 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 1년, 적어도 약 2년, 적어도 약 3년 등을 포함한다. 전체 생존은 또한 예를 들어 수개월 내지 수년으로 측정된다. 대안적으로, 일부 실시양태에서 효과적인 반응은 대상체의 증상이 고정된 상태로 유지된다는 것이다. 적응증 치료의 추가 적응증은 하기에 보다 상세하게 설명되어 있다.
- [0385] 일부 실시양태에서, 예방적 방법에서 치료제의 투여는 원하지 않는 질환 또는 장애의 증상이 나타나기 전에 수행되어, 질환 또는 장애가 예방되거나 또는 대안적으로 이의 진행이 지연된다. 따라서, 예방적 방법과 함께 사용되는 경우, 용어 "치료적으로 유효한"은 치료 후 더 적은 수의 대상체(평균적으로)에서 원하지 않는 질환 또는 장애가 발생하거나 증상의 중증도가 진행되는 것을 의미한다.
- [0386] 일부 실시양태에서, 조성물 중 활성 성분의 양, 조성물 제형 및 투여 방식은 대상체에 과도하게 유독하지 않으면서 각 대상체에 대해 원하는 치료 반응을 달성하기에 유효한 양의 활성 성분을 제공하기 위해 변화되는 요인 중 하나이다. 선택된 투여량 수준은 사용된 특정 화합물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배설 또는 대사 속도, 치료 기간, 사용된 특정 조성물과 조합하여 사용되는 기타 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료할 대상체의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강, 식이 및 이전 병력, 및 의학 분야에 널리 공지된 유사 요인에 의존할 것이다.
- [0387] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 및 항원-결합 단편은 다양한 투여 양에서 및 다양한 시간에 걸쳐 대상체에게 투여된다. 비제한적 용량은 약 0.01 mg/kg, 약 0.05 mg/kg, 약 0.1 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 40 mg/kg, 약 50 mg/kg, 약 60 mg/kg, 약 70 mg/kg, 약 80 mg/kg, 약 90 mg/kg, 약 100 mg/kg, 약 125 mg/kg, 약 150 mg/kg, 약 175 mg/kg, 약 200 mg/kg 또는 그 사이의 임의의 정수를 포함한다. 추가로, 항체 또는 항원-결합 단편의 용량(들)은, 일부 실시양태에서, 주 2회, 주 1회, 2주마다, 3주마다, 4주마다, 6주마다, 8주마다, 12주마다, 또는 이들 주의 임의의 조합으로 투여된다. 또한, 예를 들어 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 4주 동안 주 1회 또는 2회 투여하고, 요법 없는 2주가 뒤따르는 것과 같은 투여 사이클이 고려된다. 예를 들어 본원에 기재된 용량 및 매주 사이클의 상이한 조합을 포함

하는 추가의 투여 사이클이 또한 본 개시내용 내에서 고려된다.

- [0388] 조성물의 치료 유효량은, 일부 실시양태에서, 질환의 중증도 및 치료할 대상체의 체중 및 일반적인 상태에 따라 다양하고 이에 의존하지만, 일반적으로 적용당 약 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 내지 약 100 mg/kg 체중, 또는 약 10 $\mu\text{g/kg}$ 내지 약 30 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 또는 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 범위이다. 투여는 필요에 따라 장애 또는 병태에 대한 반응 및 요법에 대한 대상체의 내용성(tolerance)에 따라 매일, 격일로, 매주, 월 2회, 월 1회 또는 그보다 많은 또는 적은 빈도로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 장애 증상의 바람직한 억제 발생할 때까지 장기간, 예컨대 4, 5, 6, 7, 8, 10 또는 12주 또는 더 긴 기간에 걸친 유지 투여량이 필요하고, 투여량은 필요에 따라 조정된다. 이러한 요법의 진행은 통상의 기술 및 분석에 의해 용이하게 모니터링된다.
- [0389] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 생리학적 용액 중에서 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg 범위의 용량에서 매일 내지 매주 내지 매월(예를 들어, 매일, 격일로, 3일마다, 또는 주당 2, 3, 4, 5 또는 6회)의 범위의 빈도로, 바람직하게는 0.1 내지 45 mg/kg, 0.1 내지 15 mg/kg 또는 0.1 내지 10 mg/kg 범위의 용량에서 주당 2회 또는 3회의 빈도로 또는 월 1회 45 mg/kg 이하로 정맥내 투여된다.
- [0390] 반응은 대상체가 질환의 징후 또는 증상의 부분적 또는 전체적 완화 또는 감소를 경험할 때 달성되며, 구체적으로 생존 연장을 비제한적으로 포함한다. 예상되는 무진행 생존기간은 예를 들어 재발 횟수, 질환의 병기 및 기타 요인을 포함하는 예후 요인에 따라 수개월 내지 수년으로 측정된다. 생존 연장은 비제한적으로 적어도 1개월(월), 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 1년, 적어도 약 2년, 적어도 약 3년 이상을 포함한다. 전체 생존은 또한 일부 실시양태에서 수개월 내지 수년으로 측정된다. 일부 실시양태에 대상체의 증상은 고정된 상태로 유지되거나 감소된다.
- [0391] 관련 기술분야의 통상의 기술을 갖는 의사 또는 수의사는, 일부 경우에, 요구되는 약학 조성물의 유효량(ED_{50})을 용이하게 결정하고 처방한다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 조성물 중에 사용되는 화합물의 용량을 원하는 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 것보다 더 낮은 수준에서 시작하여, 원하는 효과가 달성될 때까지 용량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 대안적으로, 일부 실시양태에서 용량은 일정하게 유지한다.
- [0392] 일부 실시양태에서, 다른 항체, 소분자 치료제 및/또는 기타 제제는 동시 또는 순차적 투여를 위해 별도의 조성물로 조합된다. 일 실시양태에서, 동시 투여는 동시에 또는 서로 30분 이내에 투여되는 하나 이상의 조성물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여는 동일하거나 상이한 부위에서 발생한다.
- [0393] 이러한 성분의 독성 및 치료 효능은, 일부 실시양태에서, 예를 들어 LD_{50} (집단의 50%에 치명적인 용량) 및 ED_{50} (인구의 50%에서 치료 효과가 있는 용량)을 결정하기 위한 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 약학적 절차에 의해 결정된다. 일부 실시양태에서, 독성과 치료 효과 사이의 용량 비는 치료 지수이고, 이는 $\text{LD}_{50}/\text{ED}_{50}$ 비로서 표현된다. 독성 부작용을 나타내는 화합물이 일부 실시양태에서 사용되는 동안, 이러한 화합물을 이환된 조직 부위로 표적화하는 전달 시스템을 설계하여 건강한 세포에 대한 잠재적 손상을 최소화하고 그에 따라 부작용을 감소시키도록 주의를 기울여야 한다.
- [0394] 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 일부 실시양태에서 인간에서 사용하기 위한 일정 범위의 투여량을 제형화하는 데 사용된다. 이러한 화합물의 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 없거나 전혀 없는 ED_{50} 을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, 투여량은 사용되는 투여 형태 및 사용되는 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 달라진다. 본 개시내용의 방법에 사용되는 임의의 화합물에 대해, 치료 유효 용량은 일부 실시양태에서 초기에 세포 배양 분석으로부터 추정된다. 일부 실시양태에서, 용량은 세포 배양물에서 측정된 IC_{50} (즉, 최대 억제의 절반을 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 제형화된다. 혈장 중 수준은 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정된다. 이러한 정보는 일부 경우에 인간에서의 유용한 용량을 보다 정확하게 결정하는 데 사용된다.
- [0395] 일부 실시양태에서 본 개시내용은 본원에 기재된 항체의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함하고 수술 요법, 화학요법, 방사선 요법, 냉동요법, 호르몬 요법, 면역요법 또는 사이토킨 요법으로부터 선택된 항암 요법으로 대상체를 치료하는 것을 추가로 포함하는, 암을 갖는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및 다른 항암 요법은 동시에 또는 순차적으로 실시된다.
- [0396] 진단 제품 및 방법

- [0397] 일부 실시양태에서, 샘플 또는 대상체에서 huCD163 단백질 또는 M2 대식세포를 검출하여 환자의 치료 상태를 평가하거나 M2 대식세포 또는 TAM의 활성과 연관되거나 상관관계가 있는 질환 또는 장애, 예컨대 본원에 기재된 질환 및 장애를 진단하는 방법이 본원에 개시된다.
- [0398] 가용성 huCD163 단백질, 세포 또는 조직에 의한 huCD163 단백질의 발현, 또는 M2 대식세포의 존재 또는 활성의 생체내 검출, 진단 또는 모니터링에서, 대상체에게는 본원에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편이 투여되며, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 검출가능한 모이어티에 결합되어 있다. 검출가능한 모이어티는, 일부 실시양태에서, 자기 공명 영상화(MRI), 형광, 방사선영상화, 내시경, 복강경 또는 혈관내 카테터에 의해(즉, 광활성체의 검출을 통해) 공급된 광원, 광스캐닝, 양전자 방출 단층촬영(PET) 스캐닝, 전신 핵 자기 공명(NMR), 방사선선험 조영, 단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT), 표적화 근적외선 영역(NIR) 스캐닝, X-선, 초음파와 같으나 이에 제한되지 않는 당업계-인정된 방법을 사용하여 가시화한다. 이러한 방법을 사용하여 화합물을 검출하기 위한 표지는 또한 당업계에 공지되어 있다. 검출가능한 모이어티의 시각화는 일부 실시양태에서 M2 대식세포 활성 또는 huCD163 단백질을 발현하는 다른 세포의 활성과 관련된 병태 또는 질환의 검출, 진단 및/또는 모니터링을 가능하게 한다. 원하는 표적 단백질, 즉 huCD163 단백질에 특이적인 항체를 사용하는 추가 진단 분석은 당업계에 공지되어 있고 또한 본원에서 고려된다.
- [0399] 시험관내 검출 방법을 위해, 대상체로부터 수득될 샘플은 그로부터의 혈액, 조직 생검 샘플 및 유체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0400] 따라서, 본 개시내용은, 잠재적으로 치료적 치료에 대한 필요성을 나타내는, 질환 또는 장애와 연관된 M2 대식세포 또는 TAM 대식세포의 수준을 검출 또는 진단하는 데 유용한 항체 및 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 다른 실시양태에서 항체는 제2 제제를 추가로 포함한다. 이러한 제제는 일부 실시양태에서 예를 들어 리포터 분자 또는 검출가능한 표지와 같은 분자 또는 모이어티이다. 이러한 검출 방법을 위한 검출가능한 표지/모이어티는 당업계에 공지되어 있고 하기에 보다 상세하게 설명된다. 리포터 분자는 분석을 사용하여 검출되는 임의의 모이어티이다. 폴리펩티드에 접합된 리포터 분자의 비제한적 예는 효소, 방사성표지, 합텐, 형광 표지, 인광 분자, 화학발광 분자, 발색단, 발광 분자, 광친화성 분자, 착색된 입자 또는 리간드, 예컨대 비오틴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 표지는 이의 특이적 기능적 특성 및/또는 화학적 특징으로 인해 검출되는 화합물 및/또는 원소이며, 이의 사용은 그것이 부착되는 폴리펩티드가 검출되도록 하고/하거나 원하는 경우에 추가로 정량화되도록 한다. 많은 적절한 검출가능한(영상화) 제제는 폴리펩티드에 대한 이의 부착 방법과 마찬가지로 당업계에 공지되어 있다.
- [0401] 폴리펩티드는 매우 다양한 형광 염료, 소광제 및 합텐, 예컨대 플루오레세인, R-피코에리트린 및 비오틴에 접합된다. 일부 실시양태에서, 접합은 폴리펩티드 합성 동안 또는 폴리펩티드가 합성되고 정제된 후 발생한다.
- [0402] 대안적으로, 일부 실시양태에서 항체, 항원-결합 단편 또는 결합 단백질은 형광 모이어티와 접합된다. 폴리펩티드를 형광 모이어티(예를 들어, R-피코에리트린, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 등)와 접합시키는 것은 예를 들어 당업계-인정된 방법을 사용하여 달성된다. 상업적으로 입수가능한 수많은 형광 염료 및 염료-결합 키트는 형광 현미경, 유세포측정, 형광-활성화 세포 분류(FACS) 등과 같은 특정 적용을 위해 상업적으로 입수가능하다.
- [0403] 하나의 비제한적 실시양태에서, 항체 항원-결합 단편은 시험관내 및/또는 생체내에서 M2 대식세포 또는 가용성 또는 결합된 huCD163 단백질에 대한 항체의 결합을 시각화하는 데 사용되는 항원에 대한 결합의 면역검출을 위한 방사성핵종, 염료, 영상화제 또는 형광제와 같은 검출가능한 표지와 회합(접합)된다.
- [0404] 방사성표지의 비제한적 예는, 예를 들어, ^{32}P , ^{33}P , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{57}Co , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{67}Cu , ^{68}Ga , ^{71}Ge , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{77}As , ^{77}Br , ^{81}Rb , $^{81\text{m}}\text{Kr}$, $^{87\text{m}}\text{Sr}$, ^{90}Y , ^{97}Ru , ^{99}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{100}Pd , ^{101}Rh , ^{103}Pb , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{111}In , ^{113}In , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{123}I , ^{125}I , ^{127}Cs , ^{128}Ba , ^{129}Cs , ^{131}I , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{169}Eu , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{191}Os , ^{193}Pt , ^{194}Ir , ^{197}Hg , ^{199}Au , ^{203}Pb , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{212}Bi 및 ^{213}Bi 를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방사성표지는 항체 영상화의 분야에 공지된 통상의 화학을 사용하여 화합물에 부착된다. 방사성표지된 화합물은 시험관내 진단 기술 및 생체내 방사선영상화 기술 및 방사선면역요법에서 유용하다.
- [0405] 본원에 기재된 항체 및 항원-결합 단편의 조성물은 또한 일부 실시양태에서 비-치료제로서(예를 들어, 친화성 정제 제제로서) 사용된다.

- [0406] **항체 기술**
- [0407] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원의 항체 및 이의 제조 및 사용 방법에 대한 일반적인 설명은 개별 항체 폴리펩티드 성분 및 항체 단편에도 적용된다.
- [0408] 본 개시내용의 항체는 다클론 또는 단클론 항체이다. 그러나, 바람직한 실시양태에서, 이들은 단클론이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 인간 항체이다. 다클론 및 단클론 항체의 생산 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0409] M2 대식세포에 의해 발현되는 huCD163에 결합하는 항체, 항원-결합 단편 및 기타 단백질은 일부 실시양태에서 이러한 방법을 사용하여 생성되며 이의 결합 친화성, 결합력 및 조절 능력 중 하나 이상에 대해 시험된다.
- [0410] 통상의 방법은 huCD163 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 식별하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 항체 및 항원-결합 단편은 결합 친화도, 회합 속도, 해리 속도 및 결합력 중 하나 이상에 대해 평가된다. 이러한 매개변수의 측정은 예를 들어 효소-연결된-면역흡착 분석(ELISA), ELISpot 분석, 스캐차드 분석, 표면 플라즈몬 공명(예를 들어, BIACORE) 분석 등, 경쟁 결합 분석 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 분석을 사용하여 달성된다. 하나의 비제한적 실시양태에서, ELISA 분석을 사용하여 huCD163 단백질에 결합하는 특이적 항체 또는 항원-결합 단편의 결합 능력을 측정한다. 표면 플라즈몬 공명 기술은 문헌[Liljeblad et al., *Glyco J* 17:323-9 (2000)]에 설명되어 있다.
- [0411] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 항체는 하기에 추가로 설명된 바와 같이 당업계에서 이용가능한 벡터 및 방법을 사용하여 재조합적으로 생산된다. 일부 실시양태에서, 인간 항체는 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성된다(미국 특허 제5,567,610호 및 제5,229,275호 참조).
- [0412] 일부 실시양태에서, 인간 항체는 내인성 면역글로불린 생성의 부재 하에 인간 항체의 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물(예를 들어, 마우스)에서 생산된다. 예를 들어, 키메라 및 생식선 돌연변이체 마우스의 항체 중쇄 연결 영역(J_H) 유전자의 동종접합성 결실이 내인성 항체 생성을 완전히 억제한다고 설명되었다. 이러한 생식선 돌연변이체 마우스로의 인간 생식선 면역글로불린 유전자 어레이의 전이는 항원 챌린지(challenge) 시에 인간 항체의 생성을 초래한다(예를 들어, 문헌[Jakobovits et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362:255-58 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993)]; 미국 특허 제5,545,806호, 제5,569,825호, 제5,591,669호; 미국 특허 제5,545,807호; 및 WO 97/17852 참조). 일부 실시양태에서, 이러한 동물은 본 개시내용의 폴리펩티드를 포함하는 인간 항체를 생산하도록 유전자 조작된다.
- [0413] 항체는, 예를 들어, 포화 황산암모늄 침전, 유글로불린 침전 방법, 카프로산 방법, 카프틸산 방법, 이온 교환 크로마토그래피(DEAE 또는 DE52), 또는 항-Ig 컬럼 또는 단백질 A, G 또는 L 컬럼을 사용한 친화성 크로마토그래피에 의한 것과 같은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 배양 상청액 또는 복수(동물에서 생산되는 경우)로부터 단리 및 정제된다.
- [0414] 상기 언급된 바와 같이, 본 개시내용은 항체 단편을 추가로 제공한다. 소정 상황에서는, 전체 항체보다 항체 단편을 사용할 때 이점이 있다. 예를 들어, 더 작은 크기의 단편은 신속한 청소를 가능하게 하고, 일부 실시양태에서 고품종양과 같은 소정 조직에 대한 개선된 접근을 유도한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일 사슬 항체; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.
- [0415] 항체 단편을 생산하기 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 온전한 항체의 단백질가수분해적 분해를 통해 유도되었다(예를 들어, 문헌[Morimoto et al., *J Biochem Biophys Methods* 1992 24(1-2):107-17; 및 Brennan et al., *Science* 1985 229:81] 참조). 그러나, 일부 실시양태에서 이들 단편은 이제 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산된다. 일부 실시양태에서, Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이(E. coli)에서 발현되고 이로부터 분비됨으로써 이들 단편의 다량의 용이한 생산을 가능하게 한다. 일부 실시양태에서, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성한다(Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). 다른 접근법에 따르면, 일부 실시양태에서, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리된다. IgG의 Fc 영역의 C_H2 도메인의 2개의 루프로부터 취한 샬비지 수용체(salvage receptor) 결합 에피토프를 포함하는 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편은 미국 특허 제5,869,046호 및 제6,121,022호에 설명되어 있다. 항체 단편을 생산하기 위한 다른 기술은 숙련된 전문가에게 자명할 것이다.

- [0416] 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일 사슬 Fv 단편(scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 제5,571,894호; 및 제5,587,458호 참조. Fv 및 sFv는 불변 영역이 없는 온전한 결합 부위를 갖는 유일한 종이다. 따라서, 이들은 생체내 사용 동안 감소된 비특이적 결합에 적합하다. 일부 실시양태에서, sFv 융합 단백질은 sFv의 아미노 또는 카복시 말단에서 효과기 단백질의 융합을 생성하도록 구성된다. 문헌[*Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, 상기] 참조. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 또한 예를 들어, 예를 들어 미국 특허 제5,641,870호에 설명된 바와 같은 "선형 항체"이다. 일부 실시양태에서, 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적이다.
- [0417] 이중특이적 또는 다른 다중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있고, 화학적 가교결합, 류신 지퍼의 사용(Kostelny et al., *J Immunol* 148:1547-53 (1992)); 디아바디 기술(Hollinger et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6444-8 (1993)); scFv 이량체[Gruber et al., *J Immunol* 152:5368 (1994)], 선형 항체(Zapata et al., *Protein Eng* 8:1057-62 (1995)); 및 킬레이팅 재조합 항체의 사용(Neri et al., *J Mol Biol* 246:367-73 (1995))을 포함한다.
- [0418] 전장 이중특이적 항체의 전통적인 생산 방법은 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현에 기초하고, 여기서 2개의 쌍은 상이한 특이성을 갖는다(Millstein et al., *Nature* 305:537-9 (1983)). 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 랜덤 분류로 인해, 이들 하이브리도마(쿼드로마(quadroma))는 하나만 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생산한다. 정확한 분자의 정제는 예를 들어 친화도 크로마토그래피에 의해 수행된다. 유사한 절차는 WO 93/08829 및 문헌[Trautner et al., *EMBO J* 10:3655-9 (1991)]에 개시되어 있다.
- [0419] 상이한 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성(항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 바람직하게는, 융합은 힌지의 적어도 일부, C_H2 및 C_H3 영역을 포함하는 Ig 중쇄 불변 도메인과의 융합이다. 융합체의 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역(C_H1)을 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체, 및 바람직한 경우, 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터 내에 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 동시형질감염시킨다. 이는 구성에 사용된 4개의 폴리펩티드 쌍의 불균등한 비가 원하는 이중특이적 항체의 최적의 수율을 제공하는 실시양태에서 4개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 있어 큰 탄력성을 제공한다. 그러나, 균등한 비의 적어도 2개의 폴리펩티드 쌍의 발현이 고수율을 초래할 때 또는 상기 비가 원하는 사슬 조합의 수율에 유의한 효과를 미치지 않을 때 2개 또는 4개의 모든 폴리펩티드 사슬에 대한 코딩 서열을 단일 발현 벡터에 삽입하는 것이 가능하다.
- [0420] 이중특이적 항체는 예를 들어 한쪽 아암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄 및 다른 쪽 아암에 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍(제2 결합 특이성을 제공함)으로 구성된다. 이러한 비대칭 구조는 원치 않는 면역글로불린 쌍 조합물로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 한다. 이 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체를 생성하는 추가의 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌[Suresh et al., *Methods Enzymol* 121:210 (1986)]을 참조한다.
- [0421] 미국 특허 제5,731,168호에 설명된 또 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 계면은 일부 실시양태에서 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화하도록 조작된다. 바람직한 계면은 C_H3 도메인의 적어도 일부분을 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 더 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 더 작은 아미노산 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동"이 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치 않는 최종-산물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다.
- [0422] 이중특이적 또는 다중특이적 항체는 가교결합된 또는 "이중접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 것은 비오틴에 커플링된다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포로 표적화하기 위해(미국 특허 제4,676,980호) 및 HIV 감염의 치료용으로(WO 91/00360, WO 92/20373 및 EP 03089) 제안되었다. 일부 실시양태에서, 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 이중접합체 항체를 제조한다. 적합한 가교결합제는 당업계에 널리 공지되어 있고, 다수의 가교결합 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다. 또 다른 방법은 스트렙타비딘-코딩 서열을 scFv의 C-말단에 첨가함으로써 사량체를 제조하도록 설계된다. 스트렙타비딘은 4개의 서브유닛으로 구성되어, scFv-스트렙타비딘이 폴딩되는 경우에, 4개의 서브유닛은 회합하여 사량체를 형성한다(Kipriyanov et al., *Hum Antibodies Hybridomas* 6(3):93-

101 (1995)).

[0423] 또 다른 이중특이적 항체의 제조 방법에 따르면, 항체 분자의 쌍 사이의 계면은 일부 실시양태에서 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화하도록 조작된다. 하나의 계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 계면로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 더 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 더 작은 아미노산 측쇄(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동"이 제2 항체 분자의 계면 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 원치않는 최종 산물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 메커니즘을 제공한다. WO 96/27011 참조.

[0424] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하기 위한 기술은 또한 문헌에서 설명되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 화학적 연결을 사용하여 제조된다. 문헌[Brennan et al., Science 229:81 (1985)]은 온전한 항체를 단백질가수분해로 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차를 설명하고 있다. 이들 단편을 디티올 착화제인 아비산 나트륨의 존재 하에 환원시켜, 이웃자리 디티올을 안정화시키고 분자간 디설파이드 형성을 방지한다. 그 다음, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 다음, Fab'-TNB 유도체 중 하나를 머캡토에틸아민을 이용한 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 생산된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정을 위한 체계로서 사용된다.

[0425] 최근의 진전은 이. 콜라이로부터 Fab'-SH 단편의 직접적 회수를 촉진하였고, 상기 단편은 예를 들어 화학적으로 커플링되어 이중특이적 항체를 형성한다. 문헌[Shalaby et al., J Exp Med 175: 217-25 (1992)]에는 인간화 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생산이 설명되어 있다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 별개로 분리되었고, 지시된 시험관내 화학적 커플링을 거쳐 이중특이적 항체를 형성한다. 이렇게 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수 있었다.

[0426] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조하고 분리하기 위한 다양한 기술이 또한 설명되었다. 예를 들어, 이중특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생성되었다. Kostelny et al., J Immunol 148(5):1547-53 (1992). Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드를 유전자 융합에 의해 2가지의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결시켰다. 항체 동종이량체를 힌지 영역에서 환원시켜 단량체를 형성한 다음, 재산화시켜 항체 이중이량체를 형성한다. 상기 방법은 일부 실시양태에서 항체 동종이량체를 생산하는 데 사용된다.

[0427] 항체의 식별 및 제조

[0428] 항체, 이의 가변 영역 또는 이의 항원-결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 일부 실시양태에서 통상적인 시퀀싱 기술을 사용하여 결정되고 항체의 재조합 생산을 위한 발현 벡터로 서브클로닝된다. 이는 대상체, 예를 들어 암 환자의 혈액으로부터 단핵 세포를 수득하고; 단핵 세포로부터 B 세포 클론을 생산하고; B 세포가 항체-생산 형질 세포가 되도록 유도하고; 형질 세포에 의해 생성된 상청액을 스크리닝하여 항체를 함유하는지 여부를 결정함으로써 달성된다. 본 개시내용의 항체의 특이성을 갖는 다른 항체의 식별은 일부 실시양태에서 유사한 방법을 사용하여 달성된다. 예를 들어, 일단 항체를 생산하는 B 세포 클론이 식별되면, 역전사 폴리머라제 연쇄 반응(RT-PCR)을 수행하여 항체의 가변 영역 또는 이의 일부분을 코딩하는 DNA를 클로닝한다. 그 다음, 이들 서열을 인간 항체의 재조합 생산에 적합한 발현 벡터로 서브클로닝한다. 일부 실시양태에서, 결합 특이성은 M2 세포에 의해 발현되는 인간 CD163 폴리펩티드를 발현하는 M2 세포 또는 다른 세포에 결합하는 항체 또는 재조합 항체의 능력을 결정함으로써 확인된다.

[0429] 본원에 기재된 방법의 특정 실시양태에서, 말초혈 또는 림프절로부터 단리된 B 세포는, 예를 들어, 이것이 CD19 양성인 것에 기반하여 분류되고, 예를 들어, 웰당 단일 세포 특이성만큼 낮게, 예를 들어 96-, 384- 또는 1536-웰 구성으로 플레이팅된다. 세포를 항체-생산 세포, 예를 들어 형질 세포로 분화되도록 유도하고, 배양 상청액을 수거하고, 예를 들어 FACS 분석을 사용하여 표면 상에서 표적 폴리펩티드를 발현하는 세포에 대한 결합에 대해 시험한다. 그 다음, 양성 웰을 전체 웰 RT-PCR에 적용하여 클론 딸 형질 세포에 의해 발현되는 IgG 분자의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 증폭시킨다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 또는 이의 일부분을 코딩하는 생성된 PCR 산물을 재조합 발현을 위해 인간 항체 발현 벡터 내로 서브클로닝한다. 그 다음, 생성된 재조합 항체를 시험하여 이의 원래 결합 특이성을 확인하고, 일부 실시양태에서 다른 세포 또는 단백질에 대한 교차 반응성에 대해 추가로 시험한다.

- [0430] 따라서, 일 실시양태에서, 항체를 식별하는 방법은 다음과 같이 실시한다. 먼저, 전장 또는 대략 전장 CD163 cDNA를 CD163 폴리펩티드의 발현을 위해 세포주로 형질감염시킨다. 둘째, 개별 인간 혈장 또는 혈청 샘플을 세포 발현된 폴리펩티드에 결합하는 항체에 대해 시험한다. 그리고 마지막으로, 혈장- 또는 혈청-양성 개체로부터 유래된 MAb를 동일한 세포-발현된 CD163 폴리펩티드에 대한 결합에 대해 특성규명한다. MAb의 미세 특이성의 추가 정의를 일부 실시양태에서 이 시점에서 수행한다.
- [0431] 본 개시내용의 항체 또는 이의 일부분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 일부 실시양태에서 인간 항체 폴리펩티드의 보존된 영역에 특이적인 프라이머를 사용한 폴리머라제 연쇄 반응에 의한 증폭을 포함하는 당업계에서 이용 가능하고 본원에 설명된 방법에 따라, 항체를 발현하는 세포로부터 단리된다. 예를 들어, 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 WO 92/02551; 미국 특허 제5,627,052호; 또는 문헌[Babcook et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7843-48 (1996)]에 설명된 분자생물학 기술에 따라 B 세포로부터 클로닝된다. 소정 실시양태에서, 항체를 발현하는 클론 딸 형질 세포에 의해 발현되는 IgG 분자의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 둘다의 전부 또는 한 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 서브클로닝되고 시퀀싱된다. 일부 실시양태에서, 코딩된 폴리펩티드의 서열은 폴리뉴클레오티드 서열로부터 용이하게 결정된다.
- [0432] 본 개시내용의 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드는 당업계에 공지되고 본원에 설명된 절차를 사용하여 본 개시내용의 항체 및 폴리펩티드를 재조합적으로 생성하기 위해 발현 벡터 내로 서브클로닝된다.
- [0433] 일부 실시양태에서, CD163 폴리펩티드 또는 M2 세포에 대한 항체(또는 이의 단편)의 결합 특성은 일반적으로, 예를 들어 면역-조직화학(IHC) 및/또는 형광-활성화 세포 분류(FACS)와 같은 면역형광-기반 분석을 포함하는 면역검출 방법을 사용하여 결정되고 평가된다. 면역분석 방법은 일부 실시양태에서 항체가 CD163 폴리펩티드 또는 M2 대식세포에 특이적으로 결합하고 대조군 세포, 예를 들어 M1 세포 또는 대조군 단백질을 발현하도록 형질감염된 숙주 세포는 인식하지 않거나 교차반응하지 않는지를 결정하기 위한 대조군 및 절차를 포함한다.
- [0434] CD163 폴리펩티드 또는 M2 대식세포 또는 TAM에 대한 항체를 생산하는 환자를 식별하기 위한 혈청의 사전-스크리닝 후, 본 개시내용의 방법은 전형적으로 환자 또는 대상체로부터 이전에 얻은 생물학적 샘플로부터의 B 세포의 단리 또는 정제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 환자 또는 대상체는 현재 또는 이전에 암 또는 관심대상의 특정 질환으로 진단되거나 이를 갖는 것으로 의심되거나 이를 갖고 있거나, 환자 또는 대상체는 암 또는 질환이 없는 것으로 간주된다. 전형적으로, 환자 또는 대상체는 포유동물이고, 특정 실시양태에서는 인간이다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 림프절 또는 림프절 조직, 흉막 삼출액, 말초혈, 복수, 종양 조직 또는 뇌척수액(CSF)을 포함하나 이에 제한되지 않는, B 세포를 함유하는 임의의 샘플이다. 일부 실시양태에서, B 세포는 종양 생검 또는 특정 질환에 의해 영향을 받은 다른 생물학적 샘플과 같은 상이한 유형의 생물학적 샘플로부터 단리된다. 그러나, 일부 실시양태에서, B 세포를 포함하는 임의의 생물학적 샘플이 본 개시내용의 임의의 실시양태를 위해 사용되는 것으로 이해된다.
- [0435] 일단 단리되면, B 세포는 예를 들어 B 세포 증식 또는 형질구, 형질모세포 또는 형질 세포로의 발달을 뒷받침하는 조건 하에 B 세포를 배양함으로써 항체를 생산하도록 유도된다. 그 다음, 항체는 표적 항원, 예를 들어 특정 조직, 세포 또는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 항체를 식별하기 위해 전형적으로 고처리량 기술을 사용하여 스크리닝된다. 소정 실시양태에서, 특정 항원, 예를 들어 항체에 의해 결합된 세포 표면 폴리펩티드는 미지의 것인 반면, 다른 실시양태에서 항체에 의해 특이적으로 결합된 항원은 기지의 것이다.
- [0436] 본 개시내용에 따르면, B 세포는 일부 실시양태에서 당업계에 공지되어 있고 이용가능한 임의의 수단에 의해 생물학적 샘플, 예를 들어 종양, 조직, 말초혈 또는 림프절 샘플로부터 단리된다. B 세포는 전형적으로 B 세포 특이적 마커, 예를 들어 CD19, CD138 및/또는 표면 IgG의 표면 상의 존재에 기반하여 FACS에 의해 분류된다. 그러나, 일부 실시양태에서, 예를 들어 CD19 마그네틱 비드 또는 IgG-특이적 마그네틱 비드를 사용한 컬럼 정제 후 컬럼으로부터의 용출과 같은 당업계에 공지된 다른 방법이 사용된다. 그러나, 임의의 마커를 이용하는 B 세포의 마그네틱 단리는 일부 실시양태에서 소정 B 세포의 손실을 초래한다. 따라서, 소정 실시양태에서, 단리된 세포는 분류되지 않고, 대신 종양으로부터 단리된 Ficoll-정제된 단핵 세포가 웰당 적절하거나 원하는 수의 특이성으로 직접 플레이팅된다.
- [0437] 항체를 생산하는 B 세포를 식별하기 위해, B 세포는 전형적으로 저밀도(예를 들어, 웰당 단일 세포 특이성, 웰당 1 내지 10개 세포, 웰당 10 내지 100개 세포, 웰당 1 내지 100개 세포, 웰당 10개 미만 세포, 또는 웰당 100개 미만 세포)로, 예를 들어 96웰, 384웰 또는 1536웰 구성의 다중웰 또는 마이크로티터 플레이트에 플레이팅된다. B 세포가 처음에 웰당 1개 세포보다 큰 밀도로 플레이팅되는 경우, 본 개시내용의 방법은, 웰당 단일 세포 특이성이 달성됨으로써 일부 실시양태에서 항원-특이적 항체를 생산하는 B 세포의 식별이 용이하게 될 때까지,

항원-특이적 항체를 생성하는 것으로 식별된 웰에서 세포를 후속적으로 희석하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 상청액 또는 이의 일부분 및/또는 세포를 동결시키기고, 향후 시험 및 이후의 항체 폴리뉴클레오티드 회수를 위해 저장한다.

[0438] 소정 실시양태에서, B 세포는 B 세포에 의한 항체 생산에 유리한 조건 하에 배양된다. 예를 들어, B 세포는 B 세포 증식 및 분화에 유리한 조건 하에 배양되어 항체-생산 형질모세포, 형질구 또는 형질 세포를 생성한다. 특정 실시양태에서, B 세포는 지질다당류(LPS) 또는 CD40 리간드와 같은 B 세포 미토겐의 존재 하에 배양된다. 하나의 구체적 실시양태에서, B 세포는 영양 세포(feed cell) 및/또는 CD40 리간드와 같은 다른 B 세포 활성화제와 함께 배양함으로써 항체-생산 세포로 분화된다.

[0439] 세포 배양 상청액 또는 이로부터 수득된 항체는, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 것을 포함하여 당업계에서 이용가능한 통상적인 방법을 사용하여 표적 항원에 결합하는 이의 능력에 대해 시험된다. 특정 실시양태에서, 배양 상청액은 고처리량 방법을 사용하여 표적 항원에 결합하는 항체의 존재에 대해 시험된다. 예를 들어, 로봇 플레이트 핸들러를 사용하여 다수의 세포 상청액을 동시에 샘플링하고 표적 항원에 결합하는 항체의 존재를 시험하도록 B 세포가 다중웰 마이크로티터 접시에서 배양된다. 특정 실시양태에서, 항원은 항체/항원 복합체의 포획을 용이하게 하기 위해 비드, 예를 들어 상아성 또는 라텍스 비드에 결합된다. 다른 실시양태에서, 항원 및 항체는 (상이한 표지로) 형광 표지되고, 표적 항원에 결합하는 항체의 존재를 식별하기 위해 FACS 분석이 수행된다. 일 실시양태에서, 항체 결합은 FMAT™ 분석 및 기기(Applied Biosystems, 캘리포니아주 포스터 시티)를 사용하여 결정된다. FMAT는 살아있는 세포 또는 비드를 사용하여 혼합 및 판독, 비방사성 분석을 가능하게 하는 고처리량 스크리닝을 위한 형광 매크로-공초점 플랫폼이다.

[0440] 특정 표적 항원(예를 들어, 암 조직 또는 세포, 또는 감염원과 같은 생물학적 샘플)에 대한 항체의 결합을 대조군 샘플(예를 들어, 정상 세포, 다른 종으로부터의 비교 세포, 상이한 암 조직 또는 세포, 또는 상이한 감염원)과 비교 시, 일부 실시양태에서, 대조군 샘플에 결합하는 양과 비교하여 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 5배 또는 적어도 10배 더 많은 항체가 특정 표적 항원에 결합하는 경우, 항체는 특정 표적 항원에 우선적으로 결합하는 것으로 간주된다.

[0441] 항체 사슬, 이의 가변 영역 또는 이의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 일부 실시양태에서 당업계에서 이용가능한 임의의 수단을 이용하여 세포로부터 단리된다. 일 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 중쇄 또는 경쇄 코딩 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이의 상보체에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용한 당업계에서 입수가 가능한 일상의 절차를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응(PCR), 예를 들어 역전사-PCR(RT-PCR)을 사용하여 단리된다. 일 실시양태에서, 양성 웰은 클론 딸 형질 세포에 의해 발현되는 IgG 분자의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 증폭하기 위해 전체 웰 RT-PCR에 적용된다. 일부 실시양태에서, 이들 PCR 산물이 시퀀싱된 다음, 중쇄 및 경쇄 가변 영역 또는 이의 부분을 코딩하는 생성물이 인간 항체 발현 벡터 내로 서브클로닝되고 당업계의 통상적인 절차(예를 들어, 미국 특허 제7,112,439호 참조)에 따라 재조합적으로 발현된다. 본원에 기재된 M2 대식세포 특이적 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 핵산 분자는 일부 실시양태에서 핵산 절제, 라이게이션(ligation), 형질전환 및 형질감염을 위한 다양한 널리 공지된 절차 중 임의의 것에 따라 증식 및 발현된다. 따라서, 소정 실시양태에서 원핵 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이에서의 항체 단편의 발현이 바람직하다(예를 들어, 문헌[Pluckthun et al., *Methods Enzymol* 178:497-515 (1989)] 참조). 다른 소정 실시양태에서, 진핵 숙주 세포, 예컨대 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 에스. 폼베(*S. pombe*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)); 동물 세포(포유류 세포 포함); 또는 식물 세포에서의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 발현이 바람직하다. 적합한 동물 세포의 예로는 골수종, COS, CHO 또는 하이브리도마 세포가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 식물 세포의 예로는 담배, 옥수수, 대두 및 벼 세포가 포함된다. 당업자에게 공지되어 있고 본 개시내용에 기초한 방법에 의해, 핵산 벡터가 특정 숙주 시스템에서 외래 서열을 발현하도록 설계되고, 이어서 일부 실시양태에서 종양-특이적 항체(또는 이의 단편)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 삽입된다. 조절 요소는 특정 숙주에 따라 달라질 것이다.

[0442] 일부 실시양태에서, 가변 및/또는 불변 영역을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 하나 이상의 복제 가능한 발현 벡터가 제조되고 적절한 세포주, 예를 들어 마우스 NSO 주와 같은 비-생산 골수종 세포주 또는 이. 콜라이와 같은 세포를 형질전환하는 데 사용되고, 여기서 항체 생산이 일어날 것이다. 효율적인 전사 및 번역을 얻기 위해, 각 벡터의 폴리뉴클레오티드 서열은 적절한 조절 서열, 특히 가변 영역 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터 및 리더 서열을 포함해야 한다.

[0443] 이러한 방식으로 항체를 생산하는 특정 방법은 일반적으로 널리 공지되어 있고 일상적으로 사용된다. 예를

들어, 분자생물학 절차는 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989]에 설명되어 있으며; 또한 문헌[Sambrook et al., 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (2001)]을 참조한다. 필수는 아니지만, 소정 실시양태에서, 재조합 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 영역이 시퀀싱된다. DNA 시퀀싱은 예를 들어 임의의 방식으로 또는 당업계에 공지된 임의의 시스템을 사용하여 수행된다. 기본 시퀀싱 기술은 예를 들어 문헌[Sanger et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463 (1977)] 및 이에 대한 개선행을 포함한 Amersham International plc 시퀀싱 핸드북에 설명되어 있다.

[0444] 특정 실시양태에서, 생성된 재조합 항체 또는 이의 단편을 이어서 시험하여 이의 원래 특이성을 확인하고, 일부 실시양태에서 예를 들어 관련 폴리펩티드와의 상호반응성에 대해 추가로 시험한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 따라 식별되거나 생산된 항체는 통상의 방법을 사용하여 내재화하는 능력 또는 기타 효과기 기능에 대해 시험한다.

[0445] **패키지, 키트 및 사전충전된 용기**

[0446] 또한, 상기 설명된 하나 이상의 화합물을 함유하는 키트가 본원에 제공된다. 키트는 일부 실시양태에서 적합한 용기 수단 내에 본원에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0447] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물을 포함하는 용기 수단이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 용기 수단은 예를 들어 바이알, 시린지, 병, 정맥내(IV) 백 또는 앰플을 포함하나 이에 제한되지 않는, 액체 또는 동결건조된 조성물을 수용하는 임의의 적합한 용기이다. 시린지는 일부 실시양태에서 0.5 cc, 1 cc, 2 cc, 5 cc, 10 cc 또는 그 이상을 포함하나 이에 제한되지 않는, 대상체로의 주사에 적합한 임의의 용적의 액체를 수용한다.

[0448] 본원에 기재된 조성물 또는 조성물들을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 및 항암 요법을 포함하는, 암을 갖는 대상체를 치료하기 위한 키트가 본원에 제공된다.

[0449] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체, 및 용기에 부착되거나 용기와 함께 포장된 라벨을 포함하는 암 치료용 키트가 본원에 제공되고, 상기 라벨은 항암 요법과 조합된 항체의 사용을 설명한다.

[0450] 일부 실시양태에서, 항암 요법 및 용기에 부착되거나 용기와 함께 포장된 라벨을 포함하는 암 치료용 키트가 본원에 제공되며, 상기 라벨은 본원에 기재된 항체와의 항암 요법의 사용을 설명한다.

[0451] 일부 실시양태에서, 키트의 용기 수단은 일반적으로 적어도 하나의 폴리펩티드가 배치되고/되거나 바람직하게는 적절하게 분취되어 있는 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 앰플, 시린지 정맥내(IV) 백 및/또는 기타 용기 수단을 포함할 것이다. 본원에 기재된 조성물을 포함하는 용기 수단이 본원에 제공된다.

[0452] 일부 실시양태에서, 키트는 적어도 하나의 융합 단백질, 검출가능한 모이어티, 리포터 분자를 함유하기 위한 수단 및/또는 상업적 판매를 위해 엄중히 감금된 임의의 다른 시약 용기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 용기는 원하는 바이알을 그 안에 보유하는 사출 성형 및/또는 취입 성형 플라스틱 용기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 또한 키트 내의 재료를 사용하기 위한 인쇄된 재료를 포함한다.

[0453] 패키지 및 키트는 일부 실시양태에서 약학적 제형 중에 완충제, 보존제 및/또는 안정화제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트의 각 성분은 개별 용기 내에 봉입되고 다양한 용기 모두는 단일 패키지 내에 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 키트는 저온 저장 또는 실온 저장용으로 설계된다.

[0454] 추가로, 일부 실시양태에서, 제제는 키트의 저장 수명을 증가시키기 위한 안정화제를 함유하고, 예를 들어 소혈청 알부민(BSA)을 포함한다. 조성물이 동결건조되는 경우, 키트는 일부 실시양태에서 동결건조된 제형을 재구성하기 위한 용액 제제를 추가로 함유한다. 허용되는 재구성 용액은 당업계에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 약학적으로 허용되는 포스페이트 완충된 식염수(PBS)를 포함한다.

[0455] 일부 실시양태에서, 패키지 및 키트는 예를 들어 ELISA 분석과 같은 분석을 위한 하나 이상의 성분을 추가로 포함한다. 본 출원에서 시험될 샘플은 예를 들어 혈액, 혈장, 조직 절편 및 분비물, 소변, 림프 및 이들의 생성물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패키지 및 키트는 샘플 수집을 위한 하나 이상의 성분(예를 들어, 시린지, 컵, 면봉 등)을 추가로 포함한다.

[0456] 일부 실시양태에서, 패키지 및 키트는 미국 FDA 또는 유사한 규제 기관에서 요구하는 정보, 예를 들어 제품 설명, 투여량 및 투여 방식, 치료 표지를 명시하는 라벨을 추가로 포함한다. 본원에 제공된 패키지는 본원에 기재

된 임의의 조성물을 포함할 수 있다.

- [0457] 용어 "포장 재료"는 키트의 성분을 수용하기 위한 물리적 구조를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 포장 재료는 성분을 멸균상태로 유지하고, 이러한 목적에 통상적으로 사용되는 재료(예를 들어, 종이, 파형 섬유, 유리, 플라스틱, 호일, 앰플 등)로 제조된다. 일부 실시양태에서, 라벨 또는 포장 삽입물은 적절한 서면 지침서를 포함한다. 따라서, 키트는 일부 실시양태에서 본 개시내용의 임의의 방법에서 키트 성분을 사용하기 위한 라벨 또는 지침서를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 방법에서 화합물의 투여에 대한 지침서와 함께, 팩 또는 분배기 내에 화합물을 포함한다.
- [0458] 추가 실시양태에서, 키트는 항암 요법을 위한 용기 수단을 추가로 포함한다.
- [0459] 지침서는 일부 실시양태에서 치료 방법을 포함하는 본원에 기재된 임의의 방법의 실시에 대한 지침서를 포함한다. 지침서는 일부 실시양태에서 만족스러운 임상 종점 또는 일어날 수 있는 임의의 유해 증상에 대한 표시, 또는 미국 식품 의약품국과 같은 규제청에서 요구하는 인간 대상체에서의 사용에 대한 추가 정보를 추가로 포함한다.
- [0460] 지침서는 일부 실시양태에서 키트 내에 또는 키트에 고정된 "인쇄물", 예를 들어 종이 또는 카드보드 상에 있거나, 키트 또는 포장 재료에 고정된 라벨 상에 있거나, 키트의 성분을 함유하는 바이알 또는 튜브에 부착된다. 지침서는 일부 실시양태에서 추가로, 예를 들어 CD-ROM, DVD, 플래시 메모리 장치, 고체 상태 메모리, 마그네틱 디스크 및 디스크 장치, 마그네틱 테이프, 클라우드 컴퓨팅 시스템 및 서비스 등과 같은 컴퓨터 판독가능 매체에 포함된다. 일부 경우에, 프로그램 및 명령은 매체에 영구적으로, 실질적으로 영구적으로, 반영구적으로 또는 비일시적으로 코딩된다.
- [0461] 본원에 기재된 조성물을 포함하는 용기 수단이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 용기 수단은 바이알, 시린지, 병, 정맥내(IV) 백 또는 앰플을 포함하나 이에 제한되지 않는, 액체 또는 동결건조된 조성물을 수용하는 임의의 적합한 용기이다. 시린지는 일부 실시양태에서 0.5 cc, 1 cc, 2 cc, 5 cc, 10 cc 또는 그 이상을 포함하나 이에 제한되지 않는, 대상체로의 주사에 적합한 임의의 용적의 액체를 수용한다.
- [0462] 본원에 기재된 조성물을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체를 항암 요법제와 조합하여 포함하는, 암 치료용 키트가 본원에 제공된다.
- [0463] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체, 및 용기에 부착되거나 용기와 함께 포장된 라벨을 포함하는 암 치료용 키트가 본원에 제공되고, 상기 라벨은 항암 요법제의 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 사용을 설명한다.
- [0464] 일부 실시양태에서, 항암 요법 및 용기에 부착되거나 용기와 함께 포장된 라벨을 포함하는 암 치료용 키트가 본원에 제공되며, 상기 라벨은 본원에 기재된 항체와의 항암 요법의 사용을 설명한다.
- [0465] **실시예**
- [0466] 본 개시내용은 단지 예시 목적으로만 제공되고 어떤 방식으로든 본 개시내용을 제한하는 것으로 의도되지 않는 하기의 실시예에서 추가로 예시될 것이다.
- [0467] **실시예 1 - 식별 및 클로닝**
- [0468] 체크포인트 억제제 항-PD-1 치료에 반응하는 환자에 의해 생성된 인간 골수 유래 억제 세포(MDSC)에 특이적으로 결합하는 항체를 분리하고 클로닝하였다. 이들 단클론 항체는, MDSC의 면역억제 효과를 표적화하고 역전시킴으로써 종양 청소를 향상시키는 치료 잠재성을 갖는 항체를 식별하기 위한 목적으로 면역조절 특성에 대해 추가로 조사하였다.
- [0469] 적어도 6개월의 기간 동안 면역 체크포인트 억제제에 대한 부분적 또는 완전한 반응을 달성한 암 환자를 식별하고 I-STAR 플랫폼을 통해 기억 B 세포 레퍼토리 분석을 위해 선택하였다. 상기 플랫폼은 단기 B 세포 배양 시스템을 이용하여 기억 B 세포 레퍼토리를 조사하였다. CD19 및 IgG 표면-발현에 기반한 15,000개 초과와 기억 B 세포를 각 공여자 환자의 1천만개 말초혈 단핵 세포(PBMC)로부터 분리하였다. 그 다음, 이들 B 세포를 B 세포 활성화, 증식, 말단 분화 및 항체 분비를 촉진하는 조건 하에 대략 1개 세포/웰로 40개의 384웰 마이크로티터 플레이트에 접종하였다. 1개 세포/웰의 플레이트 밀도는 단일 B 세포 클론이 증대(expansion)되도록 하여 진정한 항체 중쇄 및 경쇄 쌍이 각 배양 웰로부터 재구성될 수 있도록 하였다. 고 처리량 및 소형화된 멀티플렉스 유세포측정 분석을 사용하여, 각 웰 내의 분비된 IgG 항체를 MDSC에 대한 결합에 대해 스크리닝하였다. 49개의 양성 B 세포 클론이 식별되었다. MDSC 결합 프로파일 및 항체 가변-영역 서열에 기반하여 우선 순위가 지정된 항

체의 선택된 서브세트를 시퀀싱하고, 클로닝하고, 추가 시험관내 특성규명을 위해 재조합 IgG1으로서 발현시켰다.

[0470] MDSC-특이적 항체를 생산하는 B 세포 클론으로부터의 면역글로불린 유전자의 중쇄(VH) 및 경쇄(VL) 가변 영역을 패밀리-특이적 프라이머 세트를 사용한 RT-PCR 증폭에 의해 증폭시켰다. 양성 패밀리-특이적 PCR 반응으로부터, VH- 또는 VL-영역 클론의 풀을 인간 IgG1 불변 도메인 서열 상류에서 발현 벡터로 클로닝하여, 해당 B 세포 클론에 의해 생성된 항체와 동일한 결합 특성을 갖는 기능적 항체를 생성하였다. DNA 플라스미드는 미국 뉴저지주 소재의 GenScript에서 설계되고 불변 영역 내의 유전자 합성이 요청되었다. 이들 플라스미드를 가능한 모든 중쇄 및 경쇄 패밀리 특이적 쌍으로 조합하고 사용하여 HEK293 세포를 일시적으로 형질감염시켰다. 분비된 재조합 항체를 함유하는 모든 형질감염체 상청액을 유동-기반 MDSC 결합 분석에서 스크리닝하였다. 웰당 하나 초과 B 세포 클론을 함유한 웰의 경우, 다수의 VH 및 VL 도메인 서열을 앞서 설명한 바와 같이 증폭시키고 발현시켰다. 그 다음, MDSC 스크린을 사용하여, 혼합 배양에서 발견된 항체로 관찰된 바와 같은 결합 활성을 재현한 중쇄 및 경쇄 조합 풀을 식별하였다. 모든 결합 mAb에 대한 VH 및 경쇄 VL 가변 영역의 DNA 서열은 맥시프렙스(maxipreps)(GenScript 공급 및 Macherey Nagel 증폭 플라스미드)로부터 정제된 DNA를 사용하여 다수의 시퀀싱 반응에 의해 확인하였다.

[0471] 하나의 B 세포 클론(중쇄 VH3.30-3/IGHG1 및 경쇄 VK1.012에 대한 생식선 ID)을 MDSC 스크린으로부터 식별하고 서열번호 9를 포함하는 경쇄 및 서열번호 10을 포함하는 중쇄를 포함하는 AB101로 지정하였다. 클론이 유래된 공여자는 비소세포폐암(NSCLC) 진단을 받은 환자였다. 환자는 화학 요법에 대한 진행성 질환을 앓았으며 항-PD-1 치료 시 완전 관해를 보였고 채혈 당시에도 여전히 치료를 받고 있었다. B 세포 클론 웰은 시퀀싱으로부터 단 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄를 갖는 것으로 확인되었다. 단일 B 세포 클론으로부터 분비된 IgG 항체로 관찰된 바와 같이, 재현된 항체는 MDSC에 대해 뚜렷한 이중 모드 결합(bimodal binding)을 가졌으며, 이는 항체 표적이 MDSC의 선택된 하위집단에서 고도로 발현됨을 나타낸다. **도 1** 참조. 완화된 차단(재조합 Fc 블록(Abcam) 10 µg/mL 및 엄격한 차단(Abcam으로부터의 10 µg/mL의 재조합 Fc 블록 + 1 µg/mL의 항-CD16, 항-CD32 및 항-CD64) 조건을 이용한 2명의 MDSC 공여자에 대한 재현 스크린의 결과는 완화된 차단 하에 약 10 nM의 IC₅₀으로 인간 MDSC에 대한 AB101의 용량 의존적 포화 결합을 보여준다. 엄격한 차단 조건 하에서는, MFI의 감소로 시사되는 바와 같이 AB101의 전체 결합의 감소가 있었다.

[0472] CD163은 단핵구/대식세포 계통 세포의 마커이다. 시험관내 분화된 MDSC 상에서 CD163의 발현은 이중 모드인 것으로 보고되었다. AB101의 이중 모드 결합이 CD163 발현과 상관관계가 있을 수 있다는 가설을 세웠다. 상기 가설을 시험하기 위해, 시험관내 MDSC를 생성하고(**실시예 11** 참조), **실시예 8**에 설명된 바와 같이 항-CD163(BioLegend 333611) 및 AF647 접합된 AB101로 공동염색하고 FACS에 의해 결합에 대해 분석하였다. 세포를 먼저 CD163 고(high) 또는 저(low)로서 게이트(gate)한 다음, 다양한 농도의 AB101 또는 인간 IgG1 이소형 대조군과의 결합에 대해 조사하였다. AB101 항체가 결합한 세포의 하위집단은 CD163^{Hi} 세포였다. **도 2** 참조.

[0473] 실시예 2 - 자가 단핵구 및 T 세포의 분리

[0474] 본 실시예는 자가 단핵구 및 T 세포의 분리를 나타낸다. 인간 단핵구 및 T 세포는 당업계에서 일반적으로 사용되는 기술을 사용하여 수득하였다. 인간 단핵구와 T 세포를 혈소판성분채집술 수집 과정 동안 LeukoReduction System(LRS) 챔버로 알려진 통합 챔버 내에 포획된 백혈구(WBC)로부터 분리하였다. 말초혈 단핵 세포(PBMC)는 표준 밀도 구배 원심분리(FicollTMPaque Premium 1.073, GE Healthcare 번호 17-5449-52)에 의해 LRS 샘플로부터 정제하였다. 상청액을 폐기하고, PBMC를 계수하고 단핵구 및 T 세포를 추가로 분리하기 위해 펠렛을 20mL EasySepTM 완충제(StemCell Technologies 번호 20144)에 재현탁하였다.

[0475] EasySep 인간 단핵구 분리 키트(Stem Cell 번호 19359)를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 단핵구를 분리하였다.

[0476] 인간 CD3⁺ T 세포 분리 키트(StemCell 19051), EasySepTM 인간 CD4⁺ T 세포 분리 키트(StemCell 번호 17952), EasySepTM 인간 CD8⁺ T 세포 분리 키트(StemCell 번호 17953)를 각각 제조업체 지침에 따라 사용하여 전체 CD3, CD4 또는 CD8 T 세포를 분리하였다. 이들 음성 선택 키트는 항체를 사용하여 제거를 위한 원하지 않는 세포 유형을 표지함으로써 원하는 표적 세포를 샘플로부터 분리할 수 있도록 하였다.

[0477] 실시예 3 - 면역억제성 골수 세포에 대한 AB101 특이적 결합

[0478] 특이성을 평가하기 위해, 원적외선 형광 염료 AF647에 접합된 본 발명의 항체, 항체 AB101의 결합을 **실시예 11**

및 하기에 설명된 바와 같이 생성된 MDSC, 면역 억제 M2c 및 염증촉진성 M1 대식세포를 포함한 상이한 세포 유형에서 시험하였다. 또한, 건강한 공여자의 PBMC로부터 분리된 면역 집단을 항체 결합에 대해 평가하였다. 각각의 이들 연구 동안, 적어도 3명의 개별 공여자가 사용되었다. PBMC는 표준 절차를 사용한 Ficoll 구배를 사용하여 혈액으로부터 분리하였다. 그 다음, 면역 세포 집단을 구별하기 위해, PBMC 세포를 조혈 계통 마커(CD45-BV421 (BD 642275), CD3-BV510 (BD 563109), CD11c-PE-Cy7 (BD 561356), CD14-FITC (BD 347493), CD20-APC-Cy7 (BD 562643), CD56-PE (BD 347747) 및 CD66c (BD 551478)로 염색하였다. 별도의 계통 집단을 다음의 발현 패턴에 의해 추가로 특성구명하고 AB101에 대한 결합에 대해 평가하였다: T 세포 $CD45^{+}CD3^{+}$; B 세포 $CD45^{+}CD20^{+}$, 단핵구 $CD45^{+}CD14^{+}$, NK 세포 $CD45^{+}SSC^{low}CD14^{-}CD3^{-}CD56^{+}$, 과립구 $CD45^{+}SSC^{hi}CD14^{-}CD66^{+}$, 수지상 세포 $CD45^{+}CD14^{-}CD66^{-}CD11c^{+}$. 소기도 상피 세포(SAEC, #CC-2547), 신장 근위 세뇨관 상피 세포(RPTEC, #CC-2553), 폐 미세혈관 내피 세포(HMVEC, #CC-2527), 제대 정맥 내피 세포(HUVEC, #C2519A), 대동맥 평활근 세포(AOSMC, #CC2571) 및 각질세포(#00192627)를 포함하는 1차 인간 비-면역 세포에 대한 항체 결합을 또한 평가하였다. 이들 세포를 60 내지 70% 컨플루언시(confluency)가 될 때까지 제조업체의 지침에 따라 세포 유형-특이적 배지 및 조건에서 배양한 다음, 수거하여 유세포측정에 의해 항체 결합에 대해 시험하였다(도 4 및 도 5).

[0479] 시험관내 단핵구 MDSC는 표준 방법에 의해 분리된 단핵구로부터 생성하였다: 0일차에, 단핵구를 RPMI 1640(Hyclone SH30027.02, 무혈청)에 $1.5 \times 10^5/cm^2$ 로 플레이팅하고 5% CO₂ 및 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션 한 다음, MDSC 배지(RMPI + 10% FBS(Hyclone SH30070.03) + 50 ng/mL GM-CSF(R&D Systems 215-GM-010) + 50 ng/mL IL-6(R&D Systems 206-IL-010), T75 플라스크당 20mL)를 세포에 첨가하기 전에 사전 가온된 RPMI로 세척하였다. 그 다음, 세포를 배지 교체 없이 7일 동안 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 7일 후, 세포를 PBS(Hyclone SH30028.03) + 2 mM EDTA로 2회 세척한 다음, T75 플라스크당 15mL의 차가운 대식세포 탈착 용액(PromoCell C-41330)을 첨가한 후 2 내지 8°C에서 40분 동안 인큐베이션하여 수거하였다. 플라스크를 손바닥에 대고 두드리 세포를 이탈시키고 수집하고 PBS + 2 mM EDTA를 이용하여 1:1 희석하였다. 세포를 450 x g에서 15분 동안 원심 분리하여 원추형 튜브에서 펠렛화하고 PBS + 2 mM EDTA로 1회 세척하고 카운팅하고 FACS 차단 완충제(완화된 염색 조건을 위해 PBS + 1% FBS + 0.1 µg/mL Fc 블록(Abcam Ab90285) 또는 엄격한 염색 조건을 위해 PBS + 1% FBS 블록 및 0.01 µg/mL CDR 블록(FcR CD16, CD32 및 CD64에 대한 항체; 각각 BD Biosciences 556617, 557333 및 555525))에 mL당 1×10^7 로 재현탁하였다. 세포를 FACS 차단 완충제에서 실온(RT)에서 20분(min) 동안 인큐베이션한 다음, 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 세포를 FACS 완충제 + 5% BSA(Sigma A3059)를 이용하여 1×10^6 세포/mL로 희석하고 40 µL의 세포(4×10^4 세포)를 염색을 위해 웰에 분취하였다. 1차 항체(20, 6, 2, 0.75, 0.25, 0.08, 0.02 µg/mL의 AB101 또는 6 µg/mL의 인간 IgG1 이소형 대조군)를 세포에 첨가하고 실온에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 250 µL/웰의 FACS 완충제 + 5% BSA로 3회 세척하였다. 2차 APC 염소 항-인간 IgG(Jackson IR 109-136-097) 항체는 FACS 완충제 + BSA + e780 생존성 염료(1:1000 희석)에서 1:250으로 제조하고 세포에 첨가하였다(웰당 50 µL). 4°C에서 45분 동안 인큐베이션한 후, 세포를 250 µL FACS 완충제에서 3회 세척하였다. 그 다음, 세포를 RT에서 10 내지 15분 동안 웰당 100 µL의 4% PFA에 고정시키고, 250 µL FACS 완충제로 1회 세척하고, 650 x g에서 5분 동안 펠렛화한 다음, 유세포측정용 의한 분석을 위해 100 µL의 FACS 완충제에 재현탁하였다.

[0480] AB101 항체는 M2c, M1 및 M0 상에서의 AB101 또는 이소형 염색의 MFI를 그래프로 나타내는 도 3에 도시된 바와 같이 인간 면역억제성 골수 세포(M2c 대식세포 및 단핵구 MDSC)에 결합한다. AB101 항체는 도 4에 예시된 바와 같이 B, T 및 NK 세포 및 과립구에 결합하지 않으며, 상기 도면은 T, B 및 NKT 세포, 호중구, 단핵구 및 수지상 세포 상에서의 AB101의 염색(검은색 곡선)을 도 5에 도시된 이소형 대조군(회색 곡선) 및 SAEC, RPTEC, HMVEC, HUVEC, AOSMC 및 각질세포와 같은 비-면역 세포와 비교하여 도시한다. 따라서, AB101 항체는 다른 면역 세포 또는 비-면역 세포에 영향을 미치지 않으면서 CD163-발현 면역-억제성 골수 세포에 특이적으로 결합한다.

[0481] 실시예 4 - AB101 FcNu11 항체는 CD163 폴리펩티드를 면역침전시킨다

[0482] 본 실시예는 서열번호 9를 포함하는 경쇄 및 서열번호 11을 포함하는 중쇄를 포함하는 AB102로 지정된, Fc 수용체에 대한 항체의 결합을 실질적으로 감소시키도록 변형된(Fc 널) IgG1 서열 내에 AB101 가변 도메인을 포함하는 FcNu11 항체를 사용한 CD163의 면역침전을 보여준다. 면역침전(IP)은 문헌[Klockenbusch and Kast, J Biomed Biotechnol Article ID 927585 (2010)]에 기반하여 수행하였다. 항체는 보다 고전적인 가교결합 IP 접근법에서 파라포름알데히드(PFA) 고정제 전에 첨가하거나 IP가 뒤따르는 비스(설포쿠신이미딜)수베레이트(BS3)

가교결합 전에 첨가하였다.

- [0483] PFA 접근법을 사용한 가교결합을 수반하는 IP의 경우, 인간 혈액으로부터 단핵구를 분리한 다음, **실시예 2** 및 **실시예 11**의 프로토콜을 사용하여 M2 세포로 분극화하고, M2 대식세포를 37℃에서 약 10분 동안 대식세포 탈착 용액(대식세포 탈착 용액 DXF, PromoCell, 번호 C-41330)과 함께 인큐베이션한 후 플레이트로부터 탈착시켰고, 인큐베이션 동안 세포는 둥글게 되어 탈착되기 시작하였다. 플라스크를 세게 두드리 세포 탈착을 용이하게 하였다. 탈착 후, 세포에 FACS 완충제를 첨가하여 대식세포 탈착 용액을 켄칭(quenching)하였다. 세포를 300 x g에서 10분 동안 펠렛화하고 상청액을 제거하였다. 세포 펠렛을 5% BSA(w/v) 및 1 mM EDTA pH 8.0을 함유하는 PBS 30mL에 재현탁하고 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다.
- [0484] 세포를 분취량당 15×10^6 개 세포의 6개 분취량으로 분할하고(분취량당 5mL) 비오틴화된 항체를 각각에 첨가하였다. 2개의 분취량에는 각각 50 μ g의 마우스 IgG1 항-hCD163(R&D, 번호 MAB1607)이 제공되었고, 2개의 분취량에는 각각 100 μ g의 이소형-대조군 항체 ISO2(Fc 널 프레임워크에서)가 제공되었으며 2개의 분취량에는 각각 100 μ g의 시험 항체 AB102(Fc 수용체(Fc 널)에 대한 항체의 결합을 실질적으로 감소시키도록 변형된 IgG1 서열 내에 AB101 가변 도메인을 포함)가 제공되었다. 때때로 튜브를 부드럽게 진도 혼합하면서 세포를 4℃에서 1시간(시) 동안 인큐베이션하였다. 세포를 300 x g에서 5분 동안 펠렛화하고 PBS-EDTA로 3회 세척한 다음, 5 mL PBS(마그네슘 또는 칼슘 없음, HyClone, 번호 SH30028.02)에 재현탁하였다. 파라포름알데히드(PFA; 0.8% 5mL)를 각 튜브에 첨가하여 최종 PFA 농도가 0.4%가 되도록 하였다. 세포를 부드럽게 흔들면서 실온에서 5분 동안 PFA에서 인큐베이션하였다. 세포를 800 x g에서 5분 동안 원심분리하여 펠렛화하고 상청액을 제거하였다. 세포를 1.25M 글리신을 함유하는 빙냉 PBS 10mL에 재현탁하여 켄칭시켰다. 세포를 800 x g에서 5분 동안 펠렛화하고 빙냉 PBS에 재현탁하였다. 세포를 5분 동안 800 x g에서 펠렛화하고 1x 프로테아제 억제제(ThermoFisher Scientific, 번호 89900)를 함유하는 1.0 mL의 RIPA 완충제에 재현탁하였다. 세포를 얼음 위에서 2시간 동안 인큐베이션한 다음, 2 mL Dounce 균질화기에 15회 통과시켰다.
- [0485] 세포 용해물을 행잉 버킷 원심분리기에서 회전시켜 핵을 펠렛화하고 상청액을 IP용으로 사용하였다. 단백질 용해물(50 μ L)을 투입 분획으로서 따로 보관하고 1x 프로테아제 억제제를 함유하는 2.0 mL의 차가운 PBS를 나머지 상청액에 첨가하였다. Dynabeads MyOne 스트렙타비딘(250 μ L)(ThermoFisher Scientific, 번호 65601)을 각 샘플에 첨가하고 4℃에서 밤새 회전시켰다. 다음날 StemCell 자석으로 비드를 수집하고 상청액을 제거하였다. 비드를 4℃에서 5분 동안 5mL의 Paro 완충제 I, 5mL의 Paro 완충제 II, 5mL의 Paro 완충제 III로 순차적으로 세척하였다(Oncotarget. 2017; 8(7): 11105-11113). 그 다음, 비드를 차가운 PBS로 3회 세척하고 마지막으로 100 μ L PBS에 재현탁하고 -80℃에서 동결시켰다.
- [0486] 비드를 질량 분광법에 의해 분석하였다. 이 분석은 일반적으로 문헌[Yan et al., *Mol Cell Proteomics* 10(3):M110.005611 (2011)]에 기술된 방법에 따라 수행하였다. 이 방법에서는, 일정하게 교반하면서 60℃에서 3시간 동안 6M 구아니딘, 150 mM 트리스 완충제(pH 8.3)을 사용하여 포름알데히드 가교결합의 역전 및 스트렙타비딘 비드로부터의 단백질 용출을 수행하였다. 상청액을 95℃에서 10분 동안 10 mM 트리스(2-아복시에틸)-포스핀(TCEP) 및 50 mM 클로로아세트아미드(CAA)과 함께 동일한 완충제에서 변성시키고 환원시키고 알킬화시켰다. 그 다음, 샘플을 10배 희석하고 37℃에서 1.3 μ g 트립신으로 밤새 분해시켰다. 펩티드를 C18 카트리지에 의해 세정하였다. 직접적인 MS/MS 분석을 위해 C18 카트리지에서 AB102 IP의 1개 반복물 및 항-CD163 IP의 1개 반복물을 용출하였다. AB102 IP의 1개 반복물 및 항-CD163의 1개 반복물을 PBS 완충제 pH 7.5에서 0.1M 포름알데히드-d2, 0.4M 소듐 시아노보로하이드라이드(sodium cyanoborohydride)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하여 중질 디메틸화(d4)로 표지하고, ISO2(Fc 널) IP의 두 반복물 모두를 C18 카트리지에서 PBS 완충제 pH 7.5에서 0.1M 포름알데히드, 0.4M 소듐 시아노보로하이드라이드와 함께 1시간 동안 인큐베이션하여 경질 디메틸화(d0)로 표지하였다. 그 다음, C18 카트리지를 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)으로 세척하고 80% 아세토니트릴(ACN)에 의해 용출시켰다. d0/d4 디메틸화된 펩티드를 완충제 A(20% ACN, 0.1% TFA)에 재현탁한 다음, 혼합하였다. 펩티드를 사내에서 제조된 미세모세관 HPLC 강한 양이온 교환 컬럼(SCX)(200 mm x 20 cm; Proteomix SCX 3 μ m, Sepax Technologies)을 사용하여 분별하였다. 펩티드를 완충제 A에서 평형화된 미세모세관 컬럼에 로딩하고 완충제 A로 세척하였다. 결합된 펩티드를 30%, 50%의 완충제 B(800 mM 암모늄 포르메이트, 20% ACN, pH 2.8)를 함유하는 20 μ L의 완충제 A로 용출시킨 후, 완충제 D(0.5M 암모늄 아세테이트, 50% ACN)로 20 μ L 용출시켰다. 모든 샘플은 Speed-Vac으로 건조시키고 Thermo-Oritrap-Fusion으로 직접 분석하였다. 스펙트럼을 Comet 검색 엔진(<https://sourceforge.net/projects/comet-ms/>)에 의해 인간 UniProt 데이터베이스에 대해 검색하였다. 탈메틸화 표지의 경우 N-말단 및 Lys 측쇄에서 28.03 Da(d0 디메틸화의 경우) 및 32.06 Da(d4 디메틸화의 경우)의 차

등 변형을 사용하였다.

- [0487] 중질/경질 샘플을 강한 양이온 교환 컬럼(200 mm x 20 cm; Proteomix SCX 3 μ m, Sepax Technologies)을 사용하는 인라인 HPLC 컬럼에 통과시키고 Thermo-Oritrap-Fusion을 사용하여 MS/MS에 적용하였다. 중질 및 경질 표지된 샘플의 경우, 완전히 메틸화된 스펙트럼만이 포함되었다. 모든 펩티드가 중질 동위원소를 함유한 89가지 단백질이 식별되었으며, 이는 단백질이 AB102 IP에서 식별되었지만, 음성 대조군에서는 식별되지 않았음을 나타낸다. AB102 IP 고유의 89가지 단백질 중 12가지가 세포 표면에 실제로 존재하는 것으로 간주되었다: CD163, RIPK1, NEUA, SLC31, LRP8, SLIT1, RAF1, ILK, ATRN1, MCA32, FBNP2 및 LRRN3. 하나의 추가 단백질인 TNFR5는 2가지 중질 메틸화 펩티드와 1가지 비메틸화 펩티드(IP 출처 미상)를 갖는 것으로 밝혀졌으며, 이는 AB102 IP에만 독점적일 수 있음을 시사한다.
- [0488] AB102 IP의 1개 반복물 및 대조군 항-CD163 IP의 1개 반복물로부터의 펩티드를 질량분광기에 의해 개별적으로 분석하였다. AB102 IP에서 식별된 360가지 단백질 중 45가지는 잠재적인 막 결합형 또는 분비형으로서 선별되었다. 다른 데이터 세트에서 식별된 단백질 중에서, AB102 IP에서 다음이 발견되었다: CD163, 갈락틴-1, 갈락틴-3 및 펩티달-프롤린 시스-트랜스 이소머라제 A(PP1A). CD163과 직접 상호작용하는 것으로 보고된 카제인 키나제 IIb도 이 데이터 세트에서 식별되었다.
- [0489] BS3 접근법을 사용한 가교결합에 의한 IP의 경우, 플라스크로부터 250mL 원심분리 튜브로 상청액을 수집하여 대식세포를 수거하였다. 차가운 대식세포 탈착 용액(30mL)을 각 플라스크에 첨가하고 4°C에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 플라스크를 스크레이퍼로 스크래핑하고 세포를 250mL 원심분리 튜브에 수집하고 650 x g에서 10분 동안 원심분리하였다. 배지를 흡인하여 튜브에 세포 펠렛을 남겼다. 그 다음, 세포를 20mL 차가운 PBS + 2 mM EDTA에 재현탁하였다.
- [0490] 그 다음, 세포를 PBS+ 2 mM EDTA를 사용하여 1×10^7 개 세포/mL로 희석하고 40%, 40% 및 20% 총 용적의 3가지 용적으로 분할하였다. AB102(2.5 mg)를 40% 분획 중 하나에 첨가하였다. FcNu11 프레임워크의 항-PDL1 항체(2.5mg)를 양성 대조군인 다른 40% 분획에 첨가하였다. 이소형 대조군(FcNu11 프레임워크의 IS02, 1.25 mg)을 음성 대조군인 20% 분획에 첨가하였다. 각 분획을 4°C에서 2시간 동안 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션하였다. 그 다음, 650 x g에서 10분 동안 원심분리하고 상청액을 조심스럽게 경사 분리하였다. 펠렛을 각각 15mL PBS + EDTA에 재현탁한 다음, 650 x g에서 10분 동안 원심분리하였다. 그 다음, 이 세척 단계를 반복하였다. 다음으로 펠렛을 방해하지 않으면서 세척 완충제를 조심스럽게 제거하였다. 40% 분획으로부터의 펠렛을 2mL 가교결합 완충제에 재현탁하였다. 20% 분획으로부터의 펠렛을 1mL 가교결합 완충제에 재현탁하였다. 50 mM BS3의 스톱 농도를 각 8mg 바이알당 70 μ L의 초순수에 용해시켰다. BS3(60 μ L/mL의 세포)를 각각의 재현탁된 세포 분획에 첨가하여 최종 농도가 3 mM BS3이 되도록 하고, 각 세포 분획을 와류에 의해 부드럽게 혼합하였다. 그 다음, 세포 분획을 10분마다 와류시켜 혼합하면서 얼음 위에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. BS3 인큐베이션 후, 15mL 켄칭 용액을 세포에 직접 첨가하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 1200 x g에서 15분 동안 원심분리하고 켄칭 완충제를 조심스럽게 경사 분리하였다. 펠렛을 이전에 설명한 바와 같이 PBS + EDTA로 1회 세척하였다. 그 다음, 20mL의 용해 완충제(Pierce™ IP 용해 완충제 #87788)을 각각의 40% 분획에 첨가하고 10mL를 20% 분획에 첨가하여 세포를 용해시키고 이어서 얼음 위에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 세포 용해물을 4°C에서 13,000 x g에서 10분 동안 원심분리하였다.
- [0491] 생성된 세포의 IP 및 단백질 정제에 사용하기 위해 MabSelect SuRe 수지(GE Healthcare Life Sciences, 번호 17543801)를 제조하였다. 멸균 Mab Select Sure를 20 컬럼 용적(CV) 멸균 PBS로 평형화하였다. AB102 및 양성 대조군 샘플에 대해서는 150마이크로리터의 Mab Select SuRe가 사용되었고 ISO 샘플에 대해서는 75 μ L가 사용되었다. 멸균 및 평형화된 MabSelect SuRe 수지를 50mL 원추형 튜브로 옮겼다. 원심분리 후, 상청액을 제조된 MabSelect SuRe 수지를 갖는 튜브에 첨가하였다. 샘플을 4°C에서 회전 혼합(end-over-end mixing)하면서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 샘플을 10분 동안 얼음 위에서 정치시켰다. MabSelect SuRe 수지를 피펫에 의해 일회용 드립 컬럼으로 옮겼다. 수지를 20 컬럼 용적의 멸균 PBS로 세척하였다. 용출 전에, 컬럼을 수집 튜브에 위치시키고 에펜도르프 벤치탑 미세원심분리기(Eppendorf benchtop microcentrifuge)에서 9,000 rpm으로 30초 동안 원심분리하여 과량의 액체를 제거하였다. 마개를 컬럼의 바닥에 위치시켰다. 용출 완충제로서 1 컬럼 용적의 50 mM 글리신 pH 2.5를 마개로 막힌 컬럼에 첨가하고 피펫으로 혼합하여 수지로부터 샘플을 용출시킨 다음, 혼합물을 RT에서 8분 동안 인큐베이션하였다. (총 용적의 1/10(수지 및 용출 완충제)을 각 샘플로부터 제거하고 웨스턴 블롯 분석에 의한 가교결합 결정을 위해 따로 보관하였다. 하기 참조) 나머지 샘플은 2 M Tris pH 8.0의 1/10 용적을 첨가하여 중화하였다. 컬럼 바닥으로부터 마개를 제거하고 즉시 드립 컬럼을 1.8 mL 에펜도르프 원

심분리 튜브에 넣어 용출액을 수집하였다. 컬럼 어셈블리를 벤치탑 마이크로 원심분리기 장치에서 9,000 rpm으로 30초 동안 원심분리하였다. 용출액 분획에 1/10 용출액 용적의 멸균 2M Tris pH 8.0을 첨가하여 용출액을 중화하였다. 완전한 단백질 제거를 보장하기 위해 용출 프로토콜을 반복하였다. 웨스턴 블롯으로 가교결합이 확인될 때까지 용출액 분획을 -80℃에서 저장하였다.

[0492] 가교결합의 확인을 위한 웨스턴 블롯 분석

[0493] 보유한 용출액 분획을 Laemmli 샘플 완충제(Bio-Rad, 번호 161-0747) + 10% 2-머캅토에탄올과 혼합하였다. 샘플을 90℃에서 10분 동안 가열하였다. 샘플을 4-12% Bis-Tris 구배 폴리아크릴아미드 겔에 로딩하였다. 겔을 200 V에서 80분 동안 실행하였다. 로딩 후, 겔을 PVDF 웨스턴 블롯 막으로 전이시키고 25 V에서 4℃에서 밤새 실행하였다. 다음날 아침에 블롯을 RT에서 3시간 동안 SuperBlock(ThermoFisher Scientific, 번호 37515)으로 차단하였다. 차단 후, 막을 SuperBlock에서 1회 세척하였다. 웨스턴 블롯을 4℃에서 1:1000 항-인간 IgG HRP로 밤새 프로빙하였다. 다음 날, 블롯을 세척당 10분씩 PBST로 4회 세척하였다. 웨스턴 블롯을 10분 동안 PBS로 1회 세척하였다. 그 다음, 웨스턴 블롯을 SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate(ThermoFisher Scientific, 번호 34076)로 현상하였다. 노출 시, 웨스턴 블롯은 AB102에 대한 양성 가교결합을 나타내는 명확한 슈퍼-이동된(super-shifted) 밴드를 보여주었다. 양성 대조군 항체에 대해서도 가교결합된 밴드가 관찰되었다. 예상대로, ISO에 대한 분자량 이동은 관찰되지 않았다.

[0494] 그 다음, 나머지 샘플을 아세톤 침전시키고, 가교결합된 밴드를 절제하고 질량 분광법 평가를 위해 제조한 SDS-PAGE 겔 상에서 실행하였다. 용출액 샘플(AB101, ISO 및 상기로부터의 양성 대조군)을 해동하였다. 차가운(-20℃) 아세톤의 용출액 용적의 4배를 각 샘플에 첨가하였다. 그 다음, 샘플을 격렬하게 볼텍싱하고 -20℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 15,000 x g에서 10분 동안 원심분리하였다. 펠렛을 방해하지 않도록 조심하면서 상청액을 경사 분리하였다. 펠렛을 5분 동안 또는 액체가 증발할 때까지 고속 진공에서 건조시켰다. 펠렛을 튜브당 15 µL로 재현탁하고 용해될 때까지 혼합하였다. 각 조건마다 용출액을 조합하였다. 샘플 로딩 완충제 + 10% 2-머캅토에탄올을 첨가하고 샘플을 90℃에서 5분 동안 가열하였다. 각 샘플의 5마이크로리터는 SYPRO Ruby Protein Gel Stain(ThermoFisher Scientific, 번호 S12000) 분석을 위해 남겨두었다. 샘플의 전체 나머지 용적을 4 내지 12% Bis-Tris 구배 폴리아크릴아미드 겔에 로딩하고 200 V에서 80분 동안 겔에서 실행하였다. 겔을 카세트로부터 제거하고 질량 분광법 등급 물로 3x10분 세척하였다. 그 다음, 겔을 세이프 스테인 블루(Safe Stain blue)로 1시간 동안 염색하였다. 염색을 경사 분리한 다음, 세척당 30분씩 2회 세척하여 겔을 질량 분광법 등급 물로 탈색하였다. 메스 및 핀셋에 에탄올(EtOH)을 광범위하게 분무한 후 가교결합된 밴드를 젤로부터 절제하고 멸균 에펜도르프 튜브에 넣었다. 튜브를 겔 섹션을 덮기에 충분한 멸균 초순수로 충전하고 젖은 얼음으로 포장하여 MS Bioworks로 배송하였다.

[0495] MS Bioworks에 의해 질량 분광 분석이 수행되었다. 질량 분광 분석을 위해, 각각 제출된 모든 샘플을, 먼저 25 mM 중탄산 암모늄으로 세척한 후 아세토니트릴로 세척하고 60℃에서 10 mM 디티오프로판으로 환원시킨 후, RT에서 50 mM 요오도아세트아미드로 알킬화하고 37℃에서 4시간 동안 트립신(Promega)으로 분해시킨 다음, 포름산으로 켄칭시킴으로써 ProGest 로봇(DigiLab)을 사용하여 트립신을 사용한 젤 내 분해에 의해 가공처리하고, 분해물을 풀링하고 추가 가공처리 없이 분석하였다. 그 다음, 각각의 분해된 샘플을 ThermoFisher Fusion Lumos에 접속된 Waters M-Class NanoAcquity HPLC 시스템을 사용하여 나노 LC-MS/MS로 분석하였다. 펩티드를 트래핑 컬럼에 로딩하고 350nL/분으로 75µm 분석 컬럼에서 용출시켰다; 두 컬럼 모두를 Luna C18 수지(Phenomenex, 번호 00C-4041-E0)로 충전하였다. 질량 분광기는 3초 사이클 시간으로 MS 및 MS/MS에 대해 60,000 FWHM 및 15,000 FWHM에서 작동하는 Orbitrap을 이용하여 데이터-의존성 모드로 작동시켰다. 고급 피크 결정이 가능하였다. 4시간의 기기 시간을 사용/샘플링하였다. MS Bioworks에 의한 데이터 처리를 위해, 다음의 매개변수와 함께 Mascot(Matrix Science)의 로컬 사본을 사용하여 데이터를 검색하였다: 효소: 트립신/P; 데이터베이스: SwissProt Human(정방향 및 역방향 연결과 일반적인 잠재적 오염물); 고정된 변형: 카바미도메틸(C); 가변적 변형: 산화(M), 아세틸(N-말단), Pyro-Glu(N-말단 Q), 탈아미드화(N/Q); 질량 값: 단동위원소; 펩티드 질량 허용 오차: 10ppm; 단편 질량 허용 오차: 0.02 Da; 및 최대 누락 절단: 2. Mascot DAT 파일은 검증, 필터링을 위해 및 샘플당 비중복 목록 생성을 위해 Scaffold(Proteome Software)로 구문 해석(parse)하였다. 데이터를 1% 단백질 및 펩티드 FDR에서 필터링하였고 단백질당 적어도 2개의 고유한 펩티드가 요구되었다. 스펙트럼 존재 인자(Spectral Abundance Factor: SAF)를 정규화된 스펙트럼 존재 인자(Normalized Spectral Abundance Factor: NSAF)로 변환하였고, 이를 사용하여 주어진 샘플 내의 단백질의 상대적 존재비 및 샘플들 사이의 주어진 단백질의 상대적 존재비를 근사하였다.

[0496] MS Bioworks로부터의 BS3-가교결합 데이터에서 관찰된 단백질의 조사는 PFA를 포함하는 상기 IP에서 식별된 표

적의 전체 목록을 뒷받침하지 않았다. 갈렉틴-3은 중질 데이터와 경질 데이터 둘다에서 발견되었으며, 경질 데이터 세트에서 더 많이 대표되었다. 갈렉틴-1은 중질 동위원소로 표지된 3/5개의 펩티드만 있는 중질 데이터와 경질 데이터 모두에서 발견되었다. LILRB2는 관찰되지 않았다. uPAR는 관찰되지 않았다. PPIA는 중질 데이터와 경질 데이터 둘다에서 거의 동일한 표현으로서 발견되었다. **도 6a**는 AB102에 대한 상위 20개 표적을 도시한다. **도 6b**는 AB102에 대한 상위 세포 표면 표적을 도시한다. **도 6c**는 이소형 음성 대조군(ISO)과 비교하여 AB102에 대한 상위 세포 표면 표적을 도시한다. BS3 가교결합제를 사용하여 AB102로 면역침전시킨 세포 표면 단백질 중에서, CD163이 가장 높은 스펙트럼 존재 인자(SAF)를 가졌다. CD163은 PFA 및 BS3 방법 둘다에 의해 AB102로 면역침전되었다. **도 6a** 및 **도 6b**에서 SAF는 각 표적에 대한 단백질 크기(분자량)에 대해 정규화된 스펙트럼 카운트이고 SAF 값은 각 표적에 대한 이소형 제어를 위해 SAF로부터 감산된 AB102에 대한 값이다.

[0497] **실시예 5 - FcNu11 프레임워크의 AB101 항체는 CD163의 당형태를 면역침전시킨다**

[0498] 글리코실화는 단백질 입체형태, 안정성 및 기능에 영향을 미치는 고도로 조절된 번역 후 변형이며, 단백질-단백질 상호작용(즉, 리간드의 이의 동족 수용체에 대한 결합)을 확립하는 데 있어 중요한 역할을 한다. AB102 항체 및 확장된 AB101은 CD163의 별개의 고분자량 당형태에 대해 특이성을 가지며, 이는 면역억제성 대식세포의 활성화에 필요한 다른 단백질과의 CD163 상호작용에 잠재적으로 영향을 미친다.

[0499] AB101 FcNu11 항체는 Fc 수용체(Fc γ R)에 대한 항체의 결합을 실질적으로 감소시키도록 변형된 IgG1 서열 내에 AB101 가변 도메인을 포함하고, AB102로 지정된다. 웨스턴 블롯 및 SYPRO Ruby 단백질 겔 염색에 의한 분석을 위해, 10% 2-머캅토에탄올을 갖는 4x NuPAGE LDS 샘플 완충제(ThermoFisher, 번호 NP0007) 12 μ L를 **실시예 4**의 PBS-비드 25 μ L 분취량에 첨가하고 95°C에서 25분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 4 내지 12% Bis-Tris 구배 폴리아크릴아미드 겔에서 실행하였다. 직접적인 시각화를 위해, 겔을 제조업체의 지침에 따라 SYPRO Ruby 단백질 겔 염색으로 염색하였다. 웨스턴 블롯을 위해, 단백질을 4°C에서 20 V에서 PVDF 막으로 밤새 전이시켰다. 다음날 아침, 막을 5.0mL의 SuperBlock(ThermoFisher, 번호 37515; Tween 20 없음)에서 1시간 동안 차단하였다. 1차 항-CD163 항체(염소 IgG 다클론; R&D, 번호 AF1607)를 1 μ g/mL의 농도에서 막에 첨가하였다. 1차 Ab에서 약 3시간 인큐베이션(실온에서 흔들기)한 후, 막을 세척당 5분씩 약 5mL의 PBST로 3회 세척하였다. 세척 후, 1:10,000(v/v) HRP-접합된 항-염소 F(ab')₂-특이적 2차 Ab(다양한 판매업체)를 함유하는 5mL의 SuperBlock(Tween 20 없음)을 막에 첨가하고 실온에서 약 1시간 동안 인큐베이션하였다. 2차 Ab와 함께 인큐베이션한 후, 막을 세척당 약 5분 동안 5mL PBST로 3회 세척하였다. 막을 제조업체의 지침에 따라 FotoDyne Analyst Luminary Convertible 트랜스일루미네이터 FX 워크스테이션과 함께 SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate를 사용하여 영상화하였다.

[0500] **도 7**에 도시된 바와 같이. AB102는 CD163의 별개의 고분자량 당형태를 면역침전시킨다. 화살표로 표시된 이중선의 두 밴드는 모두 CD163의 별개의 당형태인 것으로 보인다.

[0501] **실시예 6 - AB101은 인간 재조합 CD163 단백질에는 결합하지만 마우스 재조합 CD163 단백질에는 결합하지 않는다**

[0502] 본 실시예는 AB101이 인간 재조합 CD163 단백질에는 결합하지만 마우스 재조합 CD163 단백질에는 결합하지 않음을 보여준다. His-태그된 재조합 인간 CD163(R&D Systems, 번호 1607-CD-050) 및 재조합 무린 CD163(R&D Systems, 번호 7435-CD-050) 단백질에 대한 AB101 결합은 ELISA를 사용하여 결정하였다. 재조합 단백질을 PBS에 5 μ g/mL로 희석하고 384웰 고결합 ELISA 플레이트(Greiner Bio-One, 번호 781061)에 웰당 25 μ L로 첨가하고 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 플레이트를 BioTek ELx405 Select 마이크로플레이트 세척기(세척 프로그램 ELISA_384_PBS_3회_세척)를 사용하여 PBS로 3회 세척한 다음, RT에서 90 μ L/웰의 차단 완충제(2% 무지방, 분유/PBS+ 0.05% Tween 20)으로 1시간 동안 차단하였다.

[0503] 차단 후, 웰당 25 μ L의 1차 항체를 플레이트에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 시험 항체는 AB101이었으며; 대조군 항-huCD163 항체는 무린 IgG1 프레임워크(R&D Systems, #MAB1607)에서 상업적으로 입수가 가능한 항체였으며; 이소형 대조군은 알려진 특이성을 갖는 인간 IgG1, 인간 FcNu11 및 무린 IgG1 프레임워크 내의 독점 mAb였다. 1차 항체 결합 후, 플레이트를 EL405x(세척 프로그램 ELISA_384_PBS_3회_세척)를 사용하여 PBS로 3회 세척하였다. 항-hu CD163에 대한 2차 항체는 염소 항-마우스 IgG F(ab')₂ HRP(Jackson ImmunoResearch, 번호 115-035-072)였고, AB101 및 AB102에 대한 2차 항체는 염소 항-인간 IgG F(ab')₂ HRP(Jackson ImmunoResearch, 번호 109-035-097)였다. 2차 항체를 2% 무지방 분유/PBS에 1:2500으로 희석하고 웰당 25 μ L를 각 플레이트에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 EL405x(세척 프로그램 ELISA_384_PBS_4회_세척)를 사용하여 PBS로 4회 세척하였다. 최종 세척액을 제거한 후, 25 μ L/웰의 순수한

Ultra-TMB를 첨가하고 플레이트를 빛으로부터 보호하면서 실온에서 10 내지 15분 동안 인큐베이션하였다. 현상 후, 웰당 25 μ L의 0.3 M HCl을 첨가하여 반응을 중단하고 450 nm에서 SpectraMax M5e 기기를 사용하여 플레이트를 판독하였다.

[0504] 도 8에 도시된 바와 같이, AB101, AB102, 및 대조군 CD163 항체는 본 분석에서 huCD163에 결합한 반면, 이소형 대조군은 인지 가능한 결합을 나타내지 않았다. AB101 및 대조군 항-huCD163 항체 모두 재조합 뮤린 CD163에 결합하지 않은 반면, 상업적으로 입수가능한 항-muCD163 항체는 예상대로 결합하였다(도 9).

[0505] 실시예 7 - 다클론 항-CD163 항체는 M2c 대식세포에 대한 AB101의 결합을 차단한다

[0506] 본 실시예는 다클론 항-CD163 항체가 M2c 세포에 대한 AB101의 결합을 차단함을 도시한다. M2c 세포 상의 CD163에 결합하는 AB101의 특이성을 조사하기 위해, 인간 CD163에 대한 상업적 다클론 항체를 사용하여 차단 실험을 수행하였다.

[0507] 수거된 M2c 세포를 FACS 완충제(2 mM EDTA를 함유하는 PBS)(ThermoFisher 번호 15575-038)에 재현탁하고(100 μ L당 100만개 세포) 적절한 용적의 인간 Fc-블록(1백만개 세포당 10 μ g의 재조합 인간 Fc 블록)을 첨가하였다. 세포를 RT에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 염소 항-huCD163 다클론 항체(R&D, #AF1607) 및 염소 대조군 다클론 항체(Sigma, # PP40)를 200 μ g/mL의 최종 농도에서 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 FACS 완충제를 사용하여 1백만개 세포/mL의 최종 용적으로 희석하고 40 μ L/웰을 v-바닥 폴리프로필렌 불투명 96웰 플레이트로 옮겼다.

[0508] Alexa Fluor® 647 표지된 AB101 및 APC 표지된 항-huCD163(R&D Systems, #FAB1607A) 항체를 첨가하고, 세포를 4°C에서 90분 동안 인큐베이션하였다. 5% BSA를 함유하는 FACS 완충제 250 μ L를 멀티드롭을 사용하여 각 웰에 첨가하여 세포를 세척하고 350 x g에서 5분 동안 원심분리하고, 완충제를 제거하였다. 세척 단계는 300 μ L FACS 완충제의 세척 용적으로 2회 반복하였다. 생존성 염료 e780(1:1000 희석)을 갖는 50 μ L의 FACS 완충제를 각 웰에 첨가하고 플레이트를 RT에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 멀티드롭을 사용하여 각 웰에 250 μ L의 FACS 완충제를 첨가하여 세포를 세척하고 350 x g에서 5분 동안 원심분리하고, 완충제를 제거하였다. FACS 완충제(75 μ L)를 각 웰에 첨가하고 BD Canto II 유세포측정기를 사용하여 샘플 분석을 수행하였다.

[0509] M2c 대식세포를 다클론 항-CD163 항체로 사전처리하는 것은 M2c 대식세포에 대한 AB101 항체(도 10) 및 대조군 단클론 항-huCD163 항체(도 11)의 결합을 차단하였다. M2c 대식세포를 염소 대조군 다클론 항체로 사전처리하는 것은 M2c 대식세포에 대한 AB101 항체(도 10) 및 대조군 단클론 항-huCD163 항체(도 11)의 결합을 차단하지 않았다.

[0510] 실시예 8 - 분극화 후 인간 M2c 대식세포에서 CD163의 siRNA 녹다운은 AB102의 결합을 감소시킨다

[0511] 본 실시예는 분극화 후 인간 M2c 대식세포에서 CD163의 siRNA 녹다운이 AB102의 결합을 감소시킴을 보여준다. 본 실시예에서 사용된 방법은 문헌[Troegeler et al., *Immunol Cell Biol* 92:699-708 (2014)]에 기반한다.

[0512] (3명의 공여자로부터) 단리된 단핵구를 웰당 1.5×10^6 개 세포로 6웰 플레이트에 별도로 플레이팅하였다. 4일차에, 배지를 제거하고 10% FBS, 100 ng/mL M-CSF(Peprotech 번호 300-25) 및 50 ng/mL IL-10(Peprotech 번호 200-10)을 함유하는 새로운 X-VIVO 배지를 각 웰에 첨가하였다. 6일차에 배지를 제거하고, 세포를 10% FBS를 함유하는 가온된 X-VIVO 배지로 2회 세척하였다. siRNA 형질감염 용액을 제조하는 동안 1밀리리터의 X-VIVO 배지 + 10% FBS를 각 웰에 첨가하고 세포를 인큐베이터로 되돌려 보냈다.

[0513] 다음의 인간 ON-TARGETplus siRNA - SMARTpool 시약(Dharmacon)을 시험하였다: CD163 (카탈로그 번호 L-007847-00-0005); SCRAM (카탈로그 번호 D-001810-10-05); CD206 (카탈로그 번호 L-011730-00-0005); CD163L1 (카탈로그 번호 L-008024-00-0005); PPIA (카탈로그 번호 L-004979-04-0005); FCGR2A (카탈로그 번호 L-014152-00-0005); FCGR3A (카탈로그 번호 L-016308-00-0005); LGALS1 (카탈로그 번호 L-011718-00-0005); LGALS3 (카탈로그 번호 L-010606-00-0005); LILRB2 (카탈로그 번호 L-020017-00-0005); FCGR2C (카탈로그 번호 L-027340-02-0005); 및 UPAR (카탈로그 번호 L-006388-00-0005).

[0514] siRNA 형질감염을 준비하기 위해, ON-TARGETplus SMART siRNA 풀을 사용하여 200 μ M 마스터 스톱을 제조하였다. 동결건조된 올리고뉴클레오타이드(각각 5 nmol)를 25 μ L의 1x Thermo siRNA 완충제(Thermo 번호 B002000)에 재현탁하였다. 분취량은 -80°C에서 보관하였다. 그 다음, 이들 마스터 스톱을 세포 등급 초순수(Hyclone 번호 SH3052902)로 희석하여 20 μ M 작업 스톱을 제조하였다. 마스터 믹스(6웰 플레이트의 6개 웰에 충분함)를 제조하기 위해, 다음의 시약들을 혼합하였다: 120 μ L 20 μ M siRNA 풀(최종 농도 200 nM), 270 μ L의

HiPerFect(Qiagen 번호 301705) 및 2.64 mL 가온된 RPMI(FBS 또는 기타 첨가제 없음). siSCRAM(스크램블된 siRNA)용 마스터 믹스는 다음의 양을 함유하였다: 720 μ L 20 μ M siSCRAM, 1.23mL HiPerFect 및 12.1 mL RPMI. 혼합물들을 합하고 주기적으로 전도 혼합하면서 RT에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 사용 직전에 튜브를 잠시 원심분리하고 siRNA 혼합물(495 μ L/well)을 세포에 적가하였다. 플레이트를 부드럽게 흔들어 혼합한 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 10% FBS 및 IL-10(최종 농도 50 ng/mL) 및 M-CSF(Peprotech 번호 300-25; 최종 농도 50 μ g/mL)를 함유하는 X-VIVO 배지 2mL를 첨가하였다. 다음 날, 배지를 교체하여(IL-10 및 M-CSF에서 유지) 형질감염 시약 및 임의의 사멸하는 세포를 제거하였다.

[0515] 8일차에, 대식세포를 들어올리고 유세포측정을 위해 항체로 염색하거나 RT-qPCR을 위해 용해시켰다.

[0516] 유세포측정에 사용된 대식세포의 경우, 다음의 방법을 사용하였다. siRNA-처리된 M2 대식세포를 대식세포 탈착 용액으로 수거하고 탈착 용액 중에서 4 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 인큐베이션한 다음, 플레이트를 부드럽게 스크래핑하였다. 대식세포 탈착 용액을 0.2 mM EDTA 및 0.1% HSA를 함유하는 차가운 PBS-/(칼슘 및 마그네슘이 없는 PBS; Hyclone 번호 SH30028.02)로 교체하였다. 세포를 650 x g에서 5분 동안 회전시킨 다음, 세포 1백만개당 0.5mL 차가운 차단 용액(FACS 완충제 + 10% NGS + 10 μ g의 인간 IgG Fc 단편 단백질(Abcam 번호 ab90285))에 재현탁하였다. 세포를 카운팅하고 mL당 평균 1×10^6 을 추가 계산에 사용하였다. 세포를 실온에서 15분 동안 인큐베이션하고(FcR 결합을 증가시키기 위해), 이어서 완전한 차단을 위해 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 미염색된 세포의 분취량은 보상 제어를 위해 따로 보관하였다. e780 생존성 염료(ThermoFisher eBioscience 번호 65-0865-18)를 1:1000의 최종 희석율에서 나머지에 첨가하였다. 세포를 96웰 플레이트(웰당 40 μ L)에 분취하고 10 μ L의 항체 용액을 각 웰에 첨가하였다. 항체는 FACS 완충제 중에서 100 μ g/mL의 시작 농도로 준비하고 FACS 완충제에 연속적으로 희석하였다. 항체를 첨가한 후, 세포의 각 세트를 항체 패널(AF647에 접합된 FcNu11 프레임워크의 AB101 및 BV421에 접합된 상업적 항-CD163[BioLegend 번호 333612]) 및 이소형 패널(AF647에 접합된 FcNu11 프레임워크의 ISO2 및 BV421에 접합된 상업적 mIgG1)로 시험하였다. 최종 항체 농도는 20 μ g/mL 내지 0.3 μ g/mL의 범위였다. 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 1차 항체에서 인큐베이션한 다음 450 x g에서 펠렛화하고 150 μ L PBS-EDTA로 3회 세척하였다. 펠렛화 후, 세포를 이어서 100 μ L 4% 파라포름알데히드(PBS -/ - 중)에 재현탁하고 RT에서 15분 동안 인큐베이션하였다(빛으로부터 보호됨). 고정 후, 세포를 650 x g에서 5분 동안 회전시키고 PBS-EDTA로 1회 세척하였다. 세포를 100 μ L PBS-EDTA에 재현탁하고 주말 동안 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다(빛으로부터 보호됨). 그 다음 세포를 BD Canto II 기계에서 유세포측정에 의해 분석하였다.

[0517] RT-qPCR 분석에 사용하기 위해 세포의 제2 세트를 다음과 같이 수거하였다. 세포를 완충제 RLT에서 수거하고 RNA를 QIAshredders(Qiagen 번호 79654)를 포함한 Qiagen RNeasy 키트(Qiagen 번호 74104)를 사용하여 단리하였다. 용출 후, RNA는 SuperScript III 제1 가닥 합성 시스템(Invitrogen 번호 18080051)을 사용하여 cDNA를 제조하는 데 사용하였다. 1.5 μ g RNA에, RNase 무함유 물을 10 μ L의 최종 용적까지 첨가하였다. 여기에 5 μ L의 DnaseI 마스터 믹스를 첨가하였다((샘플당) = 1.5 μ L 10x DnaseI 버퍼 + 2 μ L RNase-무함유 물 + 1.5 μ L DnaseI 효소). 샘플을 잘 혼합하고 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 1.5 μ L EDTA 용액을 첨가하여 반응을 중지하고, 샘플을 (효소를 사멸시키기 위해) 65 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 인큐베이션한 다음, 얼음으로 되돌려 보내 냉각시켰다. dNTP(1.5 μ L) 및 올리고-dT(1.5 μ L)를 각 샘플에 첨가하고 잘 혼합하였다. 샘플을 65 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 인큐베이션한 다음, 2분 동안 얼음으로 되돌려 보냈다. 샘플을 냉각시킨 후, 13 μ L의 샘플을 취하여 새로운 튜브에 넣고 +RT 마스터 믹스(7 μ L)를 각각에 첨가하였다. 샘플의 나머지 7.5 μ L에, 음성 대조군 샘플을 위한 -RT 마스터 믹스(3.5 μ L)를 첨가하였다. +RT 마스터 믹스의 경우(샘플당): 4 μ L 5x 제1 가닥 완충제, 1 μ L 0.1M DTT, 1 μ L RNaseOUT 및 1 μ L SuperScript III 역전사 효소(상기 참조한 SuperScript III 시스템의 모든 부분). -RT 마스터 믹스의 경우, SuperScript III 효소를 RNase-무함유 물로 대체하였다.

[0518] 샘플을 잘 혼합하고 25 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 샘플을 50 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 55 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 70 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 샘플을 진행하기 전에 4 $^{\circ}$ C로 냉각시키고 얼음 위에서 보관하였다. 사용 전에, 20 μ L의 RNase-무함유 물을 +RT 샘플에 첨가하고 10 μ L의 RNase-무함유 물을 -RT 샘플에 첨가하여 RT-qPCR용 cDNA를 희석하였다.

[0519] qPCR을 위해, 2 μ L의 희석된 cDNA를 0.2 μ L의 각 프라이머(10 μ M 스톱 농도), 2.6 μ L RNase-무함유 물 및 5 μ L의 2x SYBR Green qPCR 혼합물(BioRad 번호 1725271)과 혼합하였다. 미처리 대조군 세포의 희석 시리즈를 사용하여 표준 곡선을 작성하였다. 온도 용융 곡선을 포함하는 기본 설정을 사용하여 StepOne qPCR 기기에서 샘플을 실행하였다. 샘플을 내부 대조군으로서 Rp117a의 증폭에 대해 정규화하였다.

- [0520] 도 12에 도시된 바와 같이, 분극화된 M2c 대식세포(3개의 반복물을 대표)를 siRNA로 처리하는 것은 스크램블된 siRNA(siSCRAM) 처리된 M2c 대식세포 또는 siRNA 처리되지 않은 M2c 대식세포와 비교하여 CD163에 대한 AB102 항체의 결합을 실질적으로 감소시켰다.
- [0521] **실시예 9 - siRNA 녹다운 후 분극화된 인간 M2c 대식세포에 대한 AB102 결합**
- [0522] 본 실시예는 다양한 siRNA를 사용한 siRNA 녹다운 후 분극화된 인간 M2c 대식세포에 대한 AB102 결합을 보여준다.
- [0523] 단핵구를 전혈로부터 분리하고 웰(6웰 플레이트)당 1.5×10^6 개 세포로 플레이팅하고 상기 **실시예 8**에 설명된 바와 같이 M2-분극화 조건하에 배양하였다. 6일차에 배지를 교체하고 100 ng/mL M-CSF 및 50 ng/mL IL-10을 첨가하였다.
- [0524] siRNA 처리는 이전에 설명된 바와 같이 다양한 siRNA로 8일차에 수행하였다(**실시예 8** 참조). 다음 날, 배지를 흡인하여 형질감염 시약 및 임의의 사멸하는 세포를 제거하고 새로운 배지를 첨가하였다(여전히 IL-10 및 M-CSF를 함유함). 10일차에, siRNA-처리된 세포에 대해 FACS 분석을 수행하고, 세포의 제2 세트를 RT-qPCR을 위해 완충제 RLT에서 수거하였다(**실시예 8** 참조). 데이터를 100%로서 siSCRAM 처리된 M2c에 대한 AB102 결합 기하 MFI를 사용하고 0%로서 미처리된 M2c에 대한 이소형 대조군 항체 결합 기하 MFI를 사용하여 정규화되었다.
- [0525] CD163의 siRNA 녹다운은 AB102 항체의 결합을 감소시켰다. 대조적으로, 도 13에 도시된 FCGR2A + FCGR3A(3명의 공여자 중 1명에서), FCGR2C 또는 FCGR3A에 대한 siRNA의 약간의 감소를 제외하고는, siCD206; siCD163L1; siPPIA; siLGALS1; siLGALS3; siLILRB2; 또는 siUPAR을 사용한 녹다운 후 AB102 결합의 감소에 대한 증거는 보이지 않았다. 실제로, AB102의 결합 강도는 몇몇 siRNA 조건에서 증가하였다. RT-qPCR은 표적의 강력한 녹다운을 보여주었다.
- [0526] **실시예 10 - M2c 대식세포의 세포 표면에서 LPS-유도된 CD163 발현 감소는 대식세포에 대한 AB101 결합을 감소시킨다**
- [0527] 본 실시예는 LPS-유도된 CD163 웨딩 후 M2c 대식세포에 대한 AB101 결합 감소를 보여준다. 단핵구를 **실시예 2**에 설명된 바와 같이 분리하고, 100 μ L/웰로 10% FBS, 50 ng/mL M-CSF 및 50 ng/mL IL-10을 함유하는 X-VIVO 배지에서 조직 배양물 처리된 평저 96웰 플레이트에 1×10^4 개 세포/웰로 플레이팅하였다. 7일차에, 세포의 절반을 10 ng/mL LPS(이. 콜라이 0111:B4로부터의 지질다당류, Sigma 번호 L5293-2ML)로 24시간 동안 처리하였다. 세포를 200 nM에서 시작하는 각각 8가지의 연속 5배 희석을 사용하여 이전에 설명된 방법에 따라 비접합된 1차 항체인 항-CD163(R&D Systems MAB1607-100) 및 AB101의 적정으로 표지하였다. Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')₂ 단편 염소 항-인간 IgG, F(ab')₂ 단편 항체를 2차 항체로서 사용하였다(Jackson ImmunoResearch 109-606-006). 세포를 유세포측정에 의해 분석하였다.
- [0528] 도 14에 도시된 바와 같이, LPS로의 배양된 M2c 대식세포의 처리는 AB101 항체 및 대조군 항-CD163 항체 둘다에 의한 결합의 손실을 초래하였다.
- [0529] **실시예 11 - T 세포 활성화(IL-2 생산) 및 증식의 골수 세포 억제에 대한 AB101 차단**
- [0530] 본 실시예는 AB101이 T 세포 활성화(IL-2 생산) 및 증식의 골수 세포 억제를 차단함을 보여준다.
- [0531] T 세포 활성화가 M2 대식세포-매개 억제를 완화하는 능력을 평가하기 위해, M0, M1 및 M2c 대식세포를 인간 단핵구로부터 생성하였다. M0 대식세포는 3가지 처리 프로토콜 하에 AB101 또는 이소형 대조군과 함께 배양하였다: 1) M0 대식세포에서 M2c 대식세포로의 분극화 동안 AB101(또는 이소형 항체)의 존재 하에(5일 내지 7일차에, "사전"-조건), 2) 분극화 후 AB101의 존재하에(7일 이후, "사후"-조건) 또는 3) 조건 1과 조건 2 조합(분극화 "전"과 "후").
- [0532] M0 대식세포의 생성. 0일차에, 개별 공여자로부터의 단핵구(**실시예 2**에 설명된 바와 같이 분리됨)를 M0 배지(X-VIVO 배지 + 10% FBS + 100 ng/mL M-CSF)에서 96웰 조직 배양 플레이트에 2.5×10^5 개 세포/웰로 플레이팅하고, 37°C, 5% CO₂에서 5일 동안 인큐베이션하였다.
- [0533] M0 대식세포의 M1 또는 M2c 대식세포로의 분극화. 5일 된 M0 대식세포는 M0 배지 100 ng/mL IL-10(Peprotech 번호 200-10)에서 세포를 배양함으로써 M2c로 분극화시켰고 M0 배지 + 100 ng/mL IFN-감마(Peprotech 번호 300-03)에서 배양함으로써 M1으로 분화시켰다. AB101 또는 IgG1 이소형 대조군으로 처리된 세포의 경우, 이들

항체를 M2c 배지에서 20 $\mu\text{g/mL}$ 로 첨가하였다. 6일차에, M1 대식세포의 경우, 배지를 버리고 새로운 M0 배지 + 100 ng/mL IFN- γ + 1 ng/mL LPS(이. 콜라이 0111:B4로부터의 지질다당류; Sigma 번호 L5293-2ML)를 첨가하였다.

[0534] 자가 공여자로부터의 PBMC를 사용하여 CD8^+ T 세포를 분리하였다(실시예 2에 설명된 바와 같음). T 세포를 대식세포와 함께 공동배양하는 날(7일차)까지 X-VIVO + 10% FBS에서 T75 플라스크로 밤새 플레이팅하였다.

[0535] 유세포측정에 의한 염료 희석을 사용하여 다수의 세대를 추적할 수 있는 CellTrace™ 바이올렛 증식 염료 키트(ThermoFisher 번호 C34557)를 사용하여, 공동배양 전에 T 세포를 염색하였다. CellTrace™ 염색은 제조업체의 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0536] 7일차에, 플레이팅된 대식세포로부터 상청액을 제거하고, 배지를 100 μL 의 X-VIVO 배지 + 10% FBS + 0.5 $\mu\text{g/mL}$ OKT3으로 교체하였다. 대식세포를 37°C, 5% CO_2 에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. T 세포를 플라스크로부터 수거하고, "분극화 전/후" 및 "분극화 후" 처리를 위해 AB101(20 $\mu\text{g/mL}$) 또는 이소형 대조군(20 $\mu\text{g/mL}$)의 부재 또는 존재 하에 평저 96웰 플레이트에서 100 μL 중 115,000개 T 세포/웰(115만개/mL)로 재현탁하였다. T 세포를 100 μL 의 용적으로 대식세포에 첨가하여 200 μL /웰의 최종 용적 및 0.25 $\mu\text{g/mL}$ OKT3의 최종 농도를 제공하였다. 플레이트를 37°C, 5% CO_2 에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 8일차에 상청액을 수집하였다. IL-2 수준을 다음과 같이 수정한 제조업체의 프로토콜에 따라 CisBio HTRF IL-2 키트(번호 62HIL02PEG)를 사용하여 측정하였다: 분석은 저용적 384웰 플레이트(Greiner Bio-One 번호 784075)에서 수행하였고; 모든 용적은 절반으로 감소시켰고; 플레이트를 짧게 회전시켜 표면에 기포를 생성시켰다.

[0537] 도 15에 도시된 바와 같이, AB101 항체는 T-세포 자극 및 증식의 마커인 IL-2 생산 증가로 입증되는 바와 같이 T-세포 활성화를 억제하는 골수 세포의 능력을 차단하였다. 세포는 "사전" 조건인 분극화(IL-10 사용) 동안 AB101 또는 이소형 대조군으로 처리하였다.

[0538] 10일차에, 각 96웰 플레이트로부터 공동배양된 T 세포를 V-바닥 96-웰 플레이트(ThermoFisher 번호 249946)로 옮기고, 300 x g에서 2분 동안 원심분리하여 펠렛화하였다. 펠렛을 PBS(0.5 $\mu\text{L/mL}$) 중 100 μL 의 e780 생존성 염료(eBiosciences 번호 65-0865-14)에 재현탁하고 암실에서 RT에서 10분 동안 인큐베이션하였다.

[0539] e780 염색 후, 150 μL FACS 완충제(1X PBS + 2 mM EDTA + 1% FBS)를 첨가하여 세포를 세척하고 300 x g에서 2분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하였다. 세포 펠렛을 50 μL /웰 FACS 블록(FACS 완충제 중 5 μL /100 μL 의 인간 TruStain FcX™[Fc 수용체 차단 용액; BioLegend 번호 422302])에 재현탁하고 4°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0540] 항체 콕테일(2X)을 1:50 희석율(최종 농도는 1:100이다)의 APC-표지된 항-CD8(BD Pharmingen 번호 561953); 및 1:50 희석율(최종 농도는 1:100이다)의 FITC 표지된 항-CD14(BD 번호 347493)을 함유하는 FACS 블록을 사용하여 제조하였다. 상기 항체 콕테일을 50 μL /웰로 첨가하고 암실에서 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 염색을 150 μL /웰 FACS 완충제로 세척하였다. 세포를 300 x g에서 2분 동안 펠렛화하였다. 상청액을 제거하고, 세포를 암실에서 얼음 위에서 15분 동안 4% PFA 25 μL 에서 고정시켰다. 유세포측정기에서 분석하기 전에, 75 μL /웰의 PBS를 첨가하였다.

[0541] 도 16 및 도 17에 도시된 바와 같이, AB101 항체는 분극화 동안 각각 AB101 처리로 OKT3-유도된 CD4^+ 및 CD8^+ T 세포 증식을 허용하였다. 또한, 도 18에 도시된 바와 같이, CD3^+ T 세포와의 공동배양 동안, 분극화 후 AB101 항체로의 처리(그래프에 "후"로 표시됨), 또는 분극화 동안과 분극화 후의 조합(그래프에 "사전 및 사후"로 표시됨)은 이소형 항체 처리와 비교할 때 IL-2 생산의 향상을 초래하였다. 이들 결과는 M2c 대식세포에 대한 AB101의 결합이 T 세포 증식 및 IL-2 생산의 M2c-매개 억제를 완화한다는 것을 나타낸다. AB101 처리는 IL-10로의 분극화 동안 효과적이어서 구성적으로 억제성인 신호를 극복하고 생체내 종양 미세환경에서 억제성 TAM을 대표하는 M2c 분극화 후에 효과적이다.

[0542] 실시예 12 - M2c 표면 마커 발현의 감소

[0543] 본 실시예는 AB101로 처리 후 M2c 표면 마커 발현의 감소를 보여준다.

[0544] 단핵구를 분리하고(실시예 2에 설명된 바와 같이) AB101 또는 이소형 대조군 항체의 존재 하에 M2c 대식세포로 분극화하였다(실시예 11에 설명된 바와 같이). 그 다음, 세포를 실시예 11에 설명된 프로토콜에 따라 표현형결정 항체의 표면 마커 발현에 대해 염색하였다. M2c 대식세포를 AB101 또는 이소형 대조군 항체로 처리한 후의

대식세포 표면 발현에 대한 정규화된 중앙 형광 강도(MFI)를 그래프 아래에 표시한다. 생존 세포는 e780 고정가능한 생존력 염료를 사용하여 게이트하였다. AB101 처리된 세포의 MFI를 이소형 대조군으로 처리된 M2c 세포의 MFI로 나누어 정규화된 MFI를 계산하였다. 그 다음, 표면 마커 발현의 상대적 변화를 나타내기 위해 샘플을 M2c 대조군의 퍼센트에 대해 정규화하였다. 7명의 공여자로부터의 데이터를 평균화하고 2원 ANOVA를 사용하여 통계를 수행하였다.

[0545] 도 19에 도시된 바와 같이, 분극화 동안 AB101 항체로의 M2 대식세포의 "사전" 처리는 CD16, CD64, 칼레티쿨린 및 시글렉-15의 발현을 감소시켰다. 저친화성 IgG 수용체인 CD16(Fc γ RIIIa)은 M2 억제성 대식세포에서 고도로 발현된다. 고친화성 IgG 수용체인 CD64(Fc γ RI)도 M2에서 고도로 발현된다. 시글렉-15는 면역 억제에 관여하는 ITIM-함유 막관통 단백질로, 억제성 대식세포 상에서 특이적으로 발현된다.

[0546] 이들 마커의 변화는 이소형 대조군 항체로 처리된 M2c 세포에서 관찰되지 않았다. 유사하게, PD-L1, CD11b, CD14, CD32, CD163, CD206, HLA-DR, CD204, CD33, CD80, CD86, HLA-DR, DP, DQ, CD48, MARCO, LILRB2, CD172a (SIRP α), IL10R 및 IL18R의 표면 발현을 평가하였지만, AB101 처리로 이들 마커의 발현의 변화는 관찰되지 않았다.

[0547] **실시예 13 - AB101-처리된 M2c 대식세포는 OKT-3 활성화된 T 세포를 Th1 표현형으로 편향시킨다**

[0548] 본 실시예는 AB101-처리된 M2c 대식세포가 OKT3-자극된 T 세포에 의한 Th1 관련 표면 마커의 발현을 유도함을 보여준다. 데이터는 M2c 세포의 AB101 처리가 M2c-매개 면역 억제를 억제하고 항종양 Th1 세포의 활성화를 조절함을 시사한다.

[0549] 종양 미세환경의 골수 세포, 종양 관련 대식세포(TAM)는 종양 성장을 촉진하는 약화된 면역 반응을 조정하는 것으로 나타났다. 종종, 이러한 효과는 T 세포를 낮은 Th1/Th2 비쪽으로 편향시키는 것으로 보일 수 있다(예를 들어, T 세포를 Th2 표현형으로 편향시킴). 따라서, 본 발명자들은 AB101이 TAM과 종양 침윤 림프구(TIL) 사이의 혼선(cross talk)에 영향을 주어 TIL에 미치는 TAM의 억제 효과를 완화할 것이라고 가정하였다.

[0550] Th1 대 Th2-헬퍼 세포의 비를 AB101 및 이소형 대조군의 존재 또는 부재 하에 평가하였다. M2c 대식세포를 5일차("사전" = 분극화 동안) 및 7일차(공동배양 동안 분극화 "후")에 AB101 또는 이소형 대조군으로 처리하였다. 7일차부터 시작하여, 처리된 M2c 대식세포를 OKT3 자극된 CD3⁺ T 세포와 함께 3일 동안 공동배양하여 T 세포가 증식되도록 하였다. T 세포 증식 후, 10일차에, T 세포를 공동배양물로부터 제거하고 세포 표면 마커 항체 패널로 염색하여 Th1 대 Th2 편향의 비를 결정하였다. 표면 마커 및 세포 생존력 염색 후, T 세포를 고정시키고 유세포측정에 의해 Th1 또는 Th2 마커의 존재에 대해 분석하였다. 패널 1은 Th1/Th2, Th17 및 Treg의 비를 결정하는 데 사용하였으며 패널 2는 T 세포 활성화 및 탈진(exhaustion)을 결정하는 데 사용하였다.

[0551] 단핵구를 수득하고 대식세포로 배양하고, 대식세포를 이전 실시예에 설명된 바와 같이 분극화하였다.

[0552] StemCell CD3⁺ 음성 선택 키트를 제조업체의 지침에 따라 사용하여, **실시예 2**에 설명된 바와 같이 CD3⁺ T 세포를 수득하였다.

[0553] 대식세포 및 T 세포를 **실시예 11**에 설명된 바와 같이 3일 동안 공동배양하였다.

[0554] 10일차에, 세포를 **실시예 11**에 설명된 방법에 따라 하기 표 4에 기재된 바와 같은 항체 칵테일을 사용하여 표지하였다.

[0555] 항체 칵테일은 1:50(최종 농도는 1:100이다)에서의 패널 1 항체 및 1:50(최종 농도는 1:100이다)에서의 패널 2 항체와 함께 나머지 50 μ L/웰의 차단 완충제를 사용하여 2배로 제조한다.

표 4

T 세포의 Th1/Th2, Th17 (패널 1) 및 탈진/활성화(패널 2)를 평가하기 위한 항체 카테일 믹스.

	항체 패널 1: Th1/Th2, Th17	항체 패널 2: 탈진/활성화
표면 마커	CD4 - PE (BD Pharmingen 번호 55347) CD69 - PE-Cy7 (BioLegend 번호 104511) CD25 - APC (BioLegend 번호 101909) CD127 - BV510 (BD BIOSCIENCE 번호 563086) CXCR3 - PerCP-Cy5.5 (BioLegend 번호 126513) CD194 (CCR4) - BV421 (BioLegend 번호 359413) CD196 (CCR6) - BV510 (BioLegend 번호 353423)	CD4 - PE (BD Pharmingen 번호 55347) CD8 - APC (BIOLEGEND 번호 344721) LAG3 - BV421 (BioLegend 번호 369313) OX40 - BV510 (BioLegend 번호 745040) PD-1 - PerCP-Cy5.5 (BioLegend 번호 135207) ICOS - PE-Cy7 (BioLegend 번호 329805) CTLA4 - FITC (eBioscience 11-1529-42)
마커 식별	Th1: CD4 ⁺ , CD69 ⁺ , CD196 ⁻ , CXCR3 ⁺ , CCR4 ⁻ Th2: CD4 ⁺ , CD196 ⁻ , CXCR3 ⁻ , CCR4 ⁺ Treg: CD4 ⁺ , CD25 ⁺ , CD127 ⁻ Th17: CD4 ⁺ , CD196 ⁺ , CXCR3 ⁻ , CCR4 ⁺	활성화됨: ICOS ⁺ , OX-40 ⁺ 탈진됨: LAG-3 ⁺ , PD-1 ⁺ , CTLA-4 ⁺ Th T 세포: CD4 ⁺ Tc T 세포: CD8 ⁺

[0556]

[0557]

시험관내 골수 세포인 M2c 세포는 공동배양 시 활성화된 T 세포에 면역억제 효과를 나타냈고, 여기서 M2c는 T 세포 증식을 억제하고 T 세포를 Th2 표현형으로 편향시켰다.

[0558]

AB101로의 처리는 M2c 세포의 억제 효과를 완화시켜, 자극된 T 세포가 IL-2를 생산하고 증식하고(실시예 11에 나타난 바와 같음), 활성화된 Th1, 염증촉진성 표현형 쪽으로 편향되게 하는 능력을 초래하였다. 도 20은 AB101로의 M2c 세포 처리가 이소형 대조군과 비교하여 Th1/Th2 비를 증가시켰음을 도시하며, 이는 M2c 세포의 AB101 처리로 인해 T 세포가 Th1 표현형 쪽으로 편향되었음을 나타낸다. 또한, 도 21은 M2c 세포를 AB101로 처리하는 것이 이소형 대조군과 비교하여 CD4⁺ T 세포 상의 CD69 발현을 증가시켰음을 도시하며, 이는 M2c 세포의 AB101 처리로 인해 M2c 세포가 AB101로 처리될 때 CD4⁺ T 세포가 Th1 표현형 쪽으로 편향되었음을 나타낸다. 도 22 및 도 23은 M2c 세포를 AB101로 처리하는 것이 이소형 대조군과 비교하여 CD4⁺ T 세포 상의 ICOS 및 OX40의 발현을 각각 증가시켰음을 도시하며, 이는 M2c 세포의 AB101 처리가 증식된 CD4⁺ T 세포가 활성화 마커의 향상된 발현을 갖도록 하였음을 나타낸다.

[0559]

실시예 14 - CD8 T 세포에 의한 라지 세포의 CD19-CD3 이중특이적 T 세포 인게이지(engager)-매개 사멸의 골수 세포 억제의 감소

[0560]

본 실시예는 AB101 처리가 CD8 T 세포에 의한 라지 세포의 CD19-CD3 BiTE-매개 사멸의 골수 세포 억제를 감소시킨다는 것을 보여준다. 이중특이적 T 세포 인게이지(BiTE) 항체(인간 CD19 및 인간 CD3에 대한 이중특이적 항체; InvivoGen Bimab-hcd19cd3)를 사용하여 이소형 대조군 항체에 대한 AB101에 대한 종양 세포 사멸을 평가하였다. M2c 대식세포를 공동배양 동안, 분극화 동안 5일차에("사전") 및 분극화 후 7일차에("사후") AB101 또는 이소형 대조군으로 처리하였다. T 세포와의 공동배양을 7일차에 시작하여 3일 동안 지속하여 T 세포가 증식하도록 하였다. 10일차에, T 세포를 대식세포와의 공동배양물로부터 제거하고, 이어서 종양 세포 +/- BiTE 항체 상에서 인큐베이션하여 세포독성 T-림프구(CTL)와 종양 세포 사이의 접촉을 용이하게 하였다. BiTE 항체로 처리한 후, 종양 세포를 유세포측정에 의해 생존력에 대해 염색하였다.

[0561]

실시예 11에 설명된 바와 같이 단핵구를 배양하고, 대식세포를 분극화시켰다. 실시예 11에 기재된 바와 같이 CD8⁺ T 세포를 수득하였다. 대식세포(25,000개 세포/웰)를 설명된 방법을 사용하여 CD8⁺ T 세포(115,000개 세포

/웰)와 함께 3일 동안 공동배양하였다.

- [0562] 10일차에, 라지(ATCC 번호 CCL-86) 및 K562(ATCC 번호 CCL-243) 세포를 **실시예 11**에 설명된 방법을 사용하여 CellTrace 바이올렛으로 염색하였다. 그 다음, 종양 세포를 평저 96웰 조직 배양 플레이트에서 100k 세포/웰로 MO 배지에 재현탁하였다. 일부 미염색된 세포 및 염색된 세포는 유동 분석을 위한 단일 염색 제어를 위해 따로 보관하였다.
- [0563] 10일차에, CD8⁺ T 세포를 StemCell CD8 음성 선택 키트를 사용하여 T 세포/대식세포 공동배양물로부터 분리하였다. 회수된 T 세포를 웰당 100 μ L로 라지 및 K562 세포 플레이트에 플레이팅하였다. 이중특이적 항체를 220 μ L/웰의 최종 용적에서 10 ng/mL의 최종 농도로 각 라지 및 K562 플레이트에 첨가하였다(일부 웰은 대조군으로서 BiTE가 없다). 세포를 37°C, 5% CO₂에서 BiTE 처리에서 밤새 배양하였다.
- [0564] 11일차에, 세포를 새로운 V-바닥 플레이트에 넣고 300 x g에서 2분 동안 원심분리하였다. 모든 플레이트로부터 상청액을 수집하고 새로운 V-바닥 96웰 플레이트로 옮기고, 이어서 밀봉하고 이후의 사이토카인 분석을 위해 -80°C에서 보관하였다. 세포를 FACS 완충제(PBS + 1% FBS)에 재현탁하고, **실시예 11**에 설명된 바와 같이 항-CD8, 항-CD14(비표적 세포 제외) 및 e780 생존력 염료로 염색하였다. 염색 후, 세포를 FACS 완충제로 세정하고 4% PFA를 사용하여 고정시키고 유세포측정을 위해 PBS에 재현탁하였다. Fixable Viability Dye eFluor™ 780을 세포 내에 포함시켜 CellTrace 바이올렛-표지된 종양 세포를 종양 세포 사멸에 대해 평가하였다. eFluor™ 780 염료에 대해 양성인 세포는 BiTE 부재 대조군 웰과 비교하여 사멸된 퍼센트로서 플롯팅하였다.
- [0565] AB101로의 처리는 M2c 대식세포의 억제 효과를 완화시켰고, 이는 이소형 대조군과 비교하여 T 세포 증식이 증가 되도록 하였다. BiTE의 존재 하에 증가된 CTL은 **도 24**에 도시된 바와 같이, 이소형 대조군과 비교하여 증가된 라지 종양 세포 사멸을 초래하였다. K562는 음성 대조군으로서 사용되었으며 사멸 + BiTE 항체의 증가를 나타내지 않았다.
- [0566] **실시예 15 - 인간 1차 M2c 대식세포에 의한 항체 내재화**
- [0567] 0일차에, 단핵구(**실시예 2** 참조)를 광학적으로 투명한 바닥 96웰 조직 배양 플레이트에 100 μ L(1×10^6 /mL)의 MO 배지 중에 1×10^5 /웰로 플레이팅하여 대식세포로 분화시켰다. 5일차에, 플레이트를 와류시켜 부유 세포를 제거하고 배지를 부드럽게 흡인하였다. 대식세포는 이전 실시예에서 설명한 바와 같이 100 μ L/웰 M2c 배지에서 M2c로 분극화시켰다.
- [0568] 6일차에, 항체는 Alexa Fluor™ 647 항체 표지 키트(Invitrogen 번호 A20186)를 사용하여 표지하였다. 각 항체(100 μ g)를 50 μ L PBS에 2 mg/mL로 희석하였다. 시험된 항체는 다음과 같았다: AB101 huIgG1 및 AB102 huIgG1 ADCC-널; CD163 마우스 단클론 IgG1 항체(R&D Systems MAB1607-100); 및 이소형 대조군: IS01 huIgG1 또는 IS02 인간 Fc-널 프레임워크.
- [0569] 키트로부터의 A-647 카복실산 석신이미딜 에스테르의 전체 마이알을 150 μ L PBS에 재현탁하였다. A-647 용액의 분취량(50 μ L)을 희석된 항체의 각 튜브에 현재 1 mg/mL로 첨가하고, 혼합물을 암실에서 45분 동안 실온에서 인큐베이션하였다.
- [0570] Zebra 탈염 컬럼(Thermo 87766)은 먼저 바닥을 절단하고 4,100 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 저장 완충제를 제거함으로써 세척하였다. 그 다음, 컬럼을 300 μ L PBS(4,100 rpm에서 1분 동안 회전)로 2회 세척하고 300 μ L PBS로 1회(4,100 rpm에서 2분 동안 회전) 세척하였다. 컬럼을 새로운 호박색 튜브에 넣고 항체를 개별적으로 로딩하였다. 그 다음, 컬럼을 4,100 rpm에서 2분 동안 원심분리하여 Alexa-647 표지된 항체를 1 mg/mL에서 용출시켰다.
- [0571] 7일차에, FBS-함유 배지를 가볍게 두드려 배양 플레이트로부터 제거하고, 플레이트를 250 μ L 차가운 PBS로 2회 세척한 후, 표지된 AB101, IS01 및 항-CD163 항체(R&D Systems MAB1607-100)로 염색하기 위해 Fc 수용체를 차단하는 20 μ g/mL 비표지 IS01 IgG1을 함유하는 90 μ L의 X-VIVO 배지 또는 AB102 및 IS02로 염색하기 위해 비표지 IS01 블럭이 없는 배지를 첨가하였다. 세포를 37°C, 5% CO₂에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 표지된 항체를 5 μ g/mL의 최종 농도에서 첨가하였다. 1시간 인큐베이션 후, 배지를 제거하고 세포를 250 μ L의 차가운 FACS 완충제로 세척한 후, 암실에서 RT에서 10분 동안 4% PFA(BD Cytotfix/Cytoperm 번호 554722)를 첨가하였다. mL 당 2방울/mL의 NucBlue™(Molecular Probes 번호 R37605) 및 ActinGreen™(Molecular Probes 번호 R37110)를 1x Perm 완충제(BD Perm/Wash 번호 554723, 물에 1:10 희석)에 첨가함으로써 세포 성분에 대한 대조염색을 준비

하였다. 플레이트를 가볍게 두드리 고정물을 제거하고 대조염색 용액(20 μ L/웰)을 첨가하였다. 암실에서 RT에서 20분 동안 염색을 진행하였다. 그 다음, 250 μ L/웰 PBS를 첨가하여 세포를 세척하고, 이를 제거하고 50 μ L/웰 PBS로 교체하였다. Cellomics 기기를 사용하여 세포를 영상화하였다.

[0572] 이들 데이터는 세포체학(AF647에서 평균 링 평균 강도)에 의해 결정된 세포 내부의 평균 형광 값이다. 세포는 DAPI 염색된 핵(NucBlue) 및 FITC 표지된 세포골격(AcinGreen)에 의해 정의되고 검출된다. 도 25는 적어도 4명의 개별 공여자의 대표적인 결과를 도시한다. 모든 경우에, 이소형 대조군 항체는 내재화되지 않았고 AB102 항체는 상업적 항-CD163 항체(R&D Systems MAB1607-100)와 동일한 정도로 내재화하였다. AB101(IgG1) 항체는 AB102(Fc γ 1) 또는 상업적 CD163 항체보다 약 2배 더 많이 내재화되었다.

[0573] **실시예 16 - AB101은 인간 폐암 이종이식 모델에서 종양 성장을 억제한다**

[0574] AB101은 인간 폐암 이종이식 모델에서 생체내 종양 성장 억제에 대해 시험하였다. AB101 처리 후, 종양 크기 및 중량은 대조군과 비교하여 유의하게 감소되었으며, 이에 상응하게 비장에서 CD8⁺ T 세포 비율뿐만 아니라 CD8⁺ T 세포 상의 T 세포 활성화 마커인 ICOS 및 OX40의 표면 발현이 증가하였다. CD4⁺ T 세포에 대해서는 차이가 관찰되지 않았다. 이들 결과는 AB101이 CD8⁺ T 세포 활성화 및 증식을 촉진한다는 것을 시사하며, 이는 이전 실시예에 제시된 시험관내 연구와 일치한다. 또한, CD11b⁺ 세포의 비율이 증가하였다. CD11b는 단핵구, 대식세포, 과립구, 수지상 세포 및 자연 살해 세포에 존재한다. 종합하면, 이들 발견은 AB101이 면역 반응을 증대시켜 종양 부담을 제어하는 치료적 적응성을 가질 수 있음을 시사한다.

[0575] AB101의 치료적 잠재성을 결정하기 위해, 생체내 종양 성장의 감소에서 AB101의 유효성을 인간 CD34⁺ 조혈 줄기 세포의 이식 및 다계통 면역 세포 집단의 재구성을 뒷받침하는 NSG-SGM3 마우스 스트레인(The Jackson Laboratory)을 사용하여 시험하였다.

[0576] A549(인간 폐 암종, p53 야생형) 및 NCI-1975(인간 폐 선암종, p53 돌연변이, p.R273H;)의 동결된 분취량을 ATCC(각각 cat# CCL-185 및 CRL-5908)로부터 구입하였다. A549 세포를 10% 소태아 혈청(FBS; Corning, cat# 35-010-CV) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(pen/strep, HyClone, cat# SV30010)이 보충된 F-12K 배지(ATCC 번호 30-2004)에서 성장시켰다. H1975 세포를 10% FBS 및 1% Pen/Strep를 갖는 RPMI(HyClone, cat# SH30096.02)에서 배양하였다. 세포를 마우스에 피하 주사하기 전에 다수의 계대 동안 37°C/5% CO₂에서 증대시켰다.

[0577] NSG-SGM3 마우스에는 이전에 설명된 문헌[Shultz et al., *Nat Rev Immunol* 7(2):118-30 (2007) [PubMed: 17259968]; Shultz et al., *Nat Rev Immunol* 12(11):786-98 (2012) [PubMed: 23059428]; Ishikawa et al., *Curr Top Microbiol Immunol* 324:87-94 (2008) [PubMed: 18481454]; Pearson et al., *Curr Protoc Immunol*; Chapter 15:Unit 15.21 (2008) [PubMed: 18491294]]에 따라 잭슨 연구소(Jackson Laboratory)에 의해 수행된 2개의 인간 체대혈 유닛을 이식하였다. 이들 마우스 중 2마리는 질환에 걸려 안락사시켰다. 시설에 도착하면, 이들 마우스를 5일 동안 순응시켰다. 6일차에 각 마우스의 우측 및 좌측 옆구리를 면도하였다.

[0578] 7일차에, A549 및 H1975 세포를 배양물로부터 수거하고 PBS(Ca²⁺ 또는 Mg²⁺가 없는 포스페이트-완충된 식염수; HyClone 번호 SH30028.02)로 3회 세척하고 Corning Matrigel® 막 매트릭스(Fisher Scientific CB-40234C)에 5 x 10⁶개 세포/mL의 밀도로 재현탁하였다. A549 세포는 우측 옆구리에 주사한 한편, H1975 세포는 100 μ L 매트릭셀(Matrigel) 중의 5 x 10⁵개 세포의 용량으로 각 마우스의 좌측 옆구리에 주사하였다.

[0579] 주사 5일 후, 디지털 캘리퍼(Fisher Scientific 번호 NC0649232)로 종양을 측정하였다. 종양이 50 내지 75 mm³ (종양 체적 = (W(2) × L)/2)에 도달하면, 마우스를 웹-기반 무작위화 응용 프로그램(<https://www.randomizer.org/>)을 사용하여 무작위화하고 그룹당 7마리의 마우스가 있는 2개의 그룹(하기 표시)으로 나누었다:

[0580] (1) 이소형 대조군 항체(ISO1 Hu IgG1);

[0581] (2) AB101 항체(Hu IgG1);

[0582] 마우스는 무작위화 당일로부터 시작하여 이후 3일마다 항체 처리를 받았다. 각 마우스는 복강내 주사를 통해 처리당 100 μ L의 PBS 중의 200 μ g의 이소형 대조군 또는 AB101을 투여받았다. 종양 크기는 26일까지 월요일, 수요일, 금요일에 측정하였다. 치명적인 이환의 징후를 보이는 모든 마우스를 기록하고 즉시 안락사시켰다. 26일차

에 마우스를 희생시켰다. 추가 분석을 위해 종양 및 비장을 수거하였다.

[0583] 단리된 종양을 칭량하고, 지방, 섬유질 및 피사 부위를 제거하고 2 내지 4 mm 조각으로 절단하여 가공처리하였다. 가공처리된 종양을 종양 해리 효소 믹스 용액(종양 해리 키트, 마우스; MACS Miltenyi Biotec, 번호 130-096-730)을 함유하는 gentleMACS C 튜브(MACS Miltenyi Biotec, 번호 130-096-334)에 첨가하였다. 세포를 GentleMACS 해리제(MACS Miltenyi Biotec, 번호 130-093-235)를 사용하여 해리시킨 다음, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 펠렛화하고 PBS에 재현탁하고 100-µm 세포 여과기(cell strainer)(Corning 번호 352360)를 사용하여 걸렀다. 해리된 단일 세포를 유세포측정에 의해 분석하였다.

[0584] 비장을 가공처리하고 세포 여과기를 통해 가압하여 단일 세포로 해리시켰다. 10-mL 시린지 플런저 헤드를 사용하여 임의의 지방 및 섬유 조직을 제거하였다. 비장 세포를 펠렛화하고 유세포측정에 의한 분석을 위해 PBS에 재현탁하였다.

[0585] 종양 및 비장으로부터의 골수 및 T 세포를 하기 표 5에 나타난 항체 각테일 패널을 이용한 유세포측정을 사용하여 정량화하였다. 세포 생존력은 e780 생존력 염료(eBiosciences 번호 65-0865-14; PBS 중 1:500)를 사용하여 평가하였다. 세포를 1차 또는 이소형 대조군 항체로 염색하기 전에 FACS 완충제(PBS + 1% FBS + 1 mM EDTA(Fisher Scientific 번호 15575-038))에서 e780과 함께 4℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 세포를 200 µL의 FACS 완충제로 세척하고 4℃에서 30분 동안 25 µL Fc 블록(FACS 완충제 + 5 µL/mL의 Fc 블록(BioLegend 번호 422302))에서 차단하였다. 항체 염색(하기 표 5 참조)을 세포에 첨가하고(25 µL), 암실에서 4℃에서 추가로 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 FACS 분석 전에 3회 세척하였다.

표 5

항체 각테일 패널

골수 패널 1	공급원	공급원 번호
항-CD11b-APC	BD Biosciences	550019
항-CD16 – PE	BioLegend	302007
항-CD64 – 퍼시픽 블루	BioLegend	305018
항-HLA-DR – PerCP-Cy5.5	BioLegend	361710
항-CD80 – FITC	BioLegend	305206
항-LILRB2 – PE-Cy7	BioLegend	338711
골수 패널 2	공급원	공급원 번호
항-CD11b-APC	BD Biosciences	550019
항-CD86 – BV510	BD Biosciences	563697
항-PD-L1 – BV421	BioLegend	329714
항-CD83 – PE-Cy7	BioLegend	305325
항-CD163 – FITC	BD Biosciences	3563697
항-ICOSL – PE	BioLegend	309403
T 세포 패널 1	공급원	공급원 번호
항-CD4-FITC	BioLegend	300505
항-CD194 (CCR4) – BV421	BioLegend	359413
항-CD196 (CCR6) – BV510	BioLegend	353423
항-CXCR3 – PerCP-Cy5.5	BioLegend	126513
항-CD69 – PE-Cy7	BioLegend	104511
항-CD25 – APC	BioLegend	101909
항-IL-7Ra – PE	BioLegend	135013
T 세포 패널 2	공급원	공급원 번호
CD8-APC	BD Biosciences	561953
항-LAG-3 – BV421	BioLegend	369313
항-OX40 – BV510	BD Biosciences	745040
항-PD-1 – PerCP-Cy5.5	BioLegend	135207
항-ICOS – PE-Cy7	BioLegend	329805
항-CTLA4 – PE	BioLegend	106305

[0586]

[0587] AB101 처리는 이소형 대조군 항체와 비교하여 A549 및 H1975 종양 성장을 유의하게 감소시킨다. 도 26 및 도 27

은 30일에 걸친 A549 및 H1975 종양에 대해 각각 플롯팅된 종양 체적을 도시한다. 화살표는 항체 처리 주사를 나타낸다. 각 점은 7마리 마우스의 평균 측정값을 나타낸다. 오차 막대는 평균(SEM)의 표준 오차를 나타낸다. 만-위트니 검정을 사용하여 통계적 유의성을 계산하였다.

[0588] 이소형 대조군에서, A549 및 H1975 종양의 체적은 시간이 지남에 따라 증가하였다. 그러나, AB101 처리를 받은 마우스에서 A549 종양은 이소형 대조군에 비해 더 느린 성장을 나타낸 반면, H1975 종양은 17일차에 퇴행을 보였고 그 후에 성장은 안정한 상태를 유지하였다. D5에서의 무작위 배정에서, 이소형 대조군 및 AB101의 평균 A549 종양 체적은 각각 63.6 mm^3 및 63 mm^3 이었고, D26에서 이소형 대조군의 평균 종양 체적은 378 mm^3 인 반면 AB101의 평균 종양 체적은 198 mm^3 이었다. 유사하게, D5에서의 H1975 종양 체적은 이소형 대조군 및 AB101에 대해 각각 57.8 및 34.2였으며 D26에서 이소형 대조군에 대한 평균 종양 체적은 164.4 mm^3 인 반면, AB101에 대한 평균 종양 체적은 57.4 mm^3 이었다.

[0589] AB101 처리는 A549 및 H1975 종양 둘다의 종양 크기를 유의하게 감소시켰다. 종양을 D26에서 절제하고 칭량하였다. AB101은 이소형 대조군에 비해 A549 종양의 크기를 49%까지 감소시켰고(평균 종양 중량: 이소형 대조군의 경우 538.2 mg 및 AB101의 경우 273.0 mg, $p = 0.003$) H1975 종양을 60%까지 감소시켰다(평균 종양 중량: 이소형의 경우 217.2 mg 및 AB101의 경우 85.6 mg, $p = 0.0009$).

[0590] AB101 처리는 비장의 총 생존 세포 중 CD8^+ T 세포 및 골수 세포의 비율을 유의하게 증가시켰다. CD8^+ T 세포의 평균 퍼센트는 이소형 대조군의 경우 1.3에서 AB101의 경우 3.3으로 증가되었으며 CD11b^+ 세포의 평균 퍼센트는 이소형 대조군의 경우 2.1에서 AB101의 경우 4로 유의하게 증가하였다.

[0591] AB101 처리는 또한 비장에서 인간 CD8^+ T 세포 상의 활성화 마커의 발현을 유의하게 향상시켰다. CD8^+ T 세포 상의 ICOS 발현의 평균 MFI는 이소형 대조군의 경우 318에서 AB101의 경우 841로 증가되었으며, OX40 발현의 평균 MFI는 이소형 대조군의 경우 586에서 AB101의 경우 1561로 증가되었다.

[0592] 실시예 17 - AB101은 M2c/T 세포 공동배양 분석에서 T 세포에 대한 M2c-매개 면역 억제를 완화한다.

[0593] AB101이 TME에서 암 매개 면역 회피를 조절할 수 있는지를 평가하기 위해, 인간 PBMC-유래 T 세포를 자가 면역 억제성 M2c 대식세포와 함께 배양하였다. M2c 매개 면역 억제로부터 항-CD3(OCT3) 활성화된 T 세포를 구제하는 AB101 면역조절 활성을 치료 효능에 대한 관독으로서 T 세포 증식 및 IL-2 생산과 함께 3가지 처리 레지먼 하에 평가하였다. 도 28은 실험 설계를 도시한다.

[0594] AB101이 M2-유사 종양 관련 대식세포의 생성을 방해하는지 여부를 결정하기 위해, M0 대식세포를 AB101 또는 이소형 대조군의 존재 하에 M2c 대식세포로 분극화시켰다("사전" 레지먼). T 세포와 함께 공동배양하기 전에 처리 항체를 세척하였다. AB101 처리가 M2c-매개 면역 억제로부터 T 세포를 구제하는지 여부를 평가하기 위해, T 세포를 M2c/T 세포 공동배양 동안 M2c 대식세포 및 AB101 또는 이소형 제어의 존재 하에 항-CD3으로 활성화하였다("사후" 레지먼). 생체내 면역요법을 모방하기 위해, 사전 레지먼과 사후 레지먼을 조합하였다(사전/사후).

[0595] 실험의 제1 세트에서, M2c 분극화에 미치는 AB101의 효과를 3명의 건강한 대상체로부터 인간 단핵구 유래 대식 세포 및 T 세포로 평가하였다. CD4^+ 및 CD8^+ T 세포는 AB101 또는 이소형 대조군으로 처리된 자가 M2c 대식세포의 존재 하에 OCT3으로 활성화시켰다. 단독의 M2c 대식세포와 공동배양된 OCT3 자극된 T 세포를 사용하여 M2c 매개 면역 억제를 평가하였다. $\text{IFN-}\gamma$ + LPS 분극화된 M1 대식세포와의 T 세포 공동배양은 최적의 T 세포 활성화에 대한 척도를 제공하였다. OCT3 활성화가 없는 M2c/T 세포 공동배양은 휴지 T 세포와 유사하였다. 도 29는 AB101 처리가 이소형 대조군에 비해 CD4^+ 및 CD8^+ T 세포의 증식을 각각 분열 세포의 7%에서 54%($p < 0.01$)로 및 21%에서 83%($p < 0.05$)로 유의하게 향상시켰음을 보여준다. M1 대식세포 및 AB101 처리된 M2c 대식세포는 유사한 수준의 증식을 유도하였다. 또한, 도 30은 M2c 대식세포의 AB101 사전처리가 AB101-처리된 또는 나이브(naive) M2c 그룹으로부터의 활성화된 T 세포에 의한 IL-2 분비와 비교할 때 3명의 연구 대상체 모두로부터의 활성화된 T 세포에 의한 IL-2 생산을 유의하게 증가시켰음을 도시한다. AB101 처리된 M2c 대식세포와의 공동배양물로부터의 IL-2 수준은 M1 대식세포와의 공동배양에서 달성된 것과 유사하거나 더 높았다. 예상대로, OCT3 활성화 없이 M2c와 함께 공동배양된 T 세포는 검출 가능한 수준의 IL-2를 생성하지 않았다.

[0596] 다음으로, 사전-, 사전/사후- 및 사후-레지먼 하에 CD8^+ T 세포/M2c 공동배양에 미치는 AB101 처리의 효과를 평

가하였다. 실험은 3명의 건강한 대상체로부터의 PBMC로 수행하였다. 3명의 연구 대상체의 CD3⁺ T 세포를 M2c 대식세포의 존재 하에 항-CD3(OKT3, 0.25 µg/mL)로 활성화시켰다. M2c 대식세포를 분극화 동안 AB101(20 µg/mL), 인간 IgG1 이소형 대조군(20 µg/mL) 또는 배지 단독으로 처리하였다(사전, 공동배양 전). T 세포를 항-CD3 자극 후 72시간차에 수거하고 증식을 유세포측정에 의해 정량화하였다. P 값은 M2c, AB101 및 IgG1 이소형 대조군 처리 그룹에 대한 더넷(Dunnett) T3 다중 비교 검정에 의해 계산하였다(p<0.05, *; p<0.01, ** p<0.001, ***).

[0597] **도 31**은 AB101 처리가 이소형 대조군과 비교할 때 사전- 및 사후-레지먼 하에 CD8⁺ T 세포 증식을 유의하게 향상시켰음을 도시한다(p<0.05). 레지먼-전 및 레지먼-후 AB101은 상응하는 이소형 대조군 값과 비교할 때 분열된 CD8⁺ T 세포의 퍼센트를 각각 23%에서 42%로 및 26%에서 47%로 증가시켰다. CD8⁺ T 세포 증식의 가장 큰 증가는 49% 분열 CD8⁺ T 세포로 AB101 Pre/Post 그룹에서 관찰되었으며, 이는 이소형 대조군 사전/사후 대조군의 22% 분열 CD8⁺ T 세포와 비교된다(p=0.062).

[0598] **도 32**는 개별 연구 대상체에 대한 상응하는 IL-2 데이터를 도시한다. AB101 처리 그룹의 3명의 대상체 모두는 M2c 단독 및 이소형 대조군과 비교할 때 CD8⁺ T 세포의 IL-2 생산을 유의하게 증가시켰다. 가장 높은 IL-2 분비는 M2c/T 세포 공동배양의 사전/사후 조합 처리로 달성되었다. 3가지 AB101 처리 레지먼의 증식 및 IL-2 데이터는 AB101이 M2c 세포의 분극화에 영향을 미쳤을 뿐만 아니라 T 세포/M2c 공동배양 동안 M2c 매개 면역 억제를 완화하였음을 나타냈다.

[0599] **도 33** 및 **도 34**는 AB101 사전 및 사전/사후 AB101 처리에 대한 컴파일된 증식 데이터를 도시한다. AB101은 CD4⁺ T 세포 증식보다 CD8⁺ T 세포 증식에 더 큰 영향을 미쳤다. AB101 처리는 각각 사전(n=16, p<0.001) 및 사전/사후-레지먼(n=13, p<0.001) 하에 상응하는 이소형 대조군 값에 비해 CD8⁺ T 세포의 증식을 유의하게 향상시켰다. CD4⁺ T 세포는 AB101 사전- 및 사전/사후-레지먼에 반응하여 증식하였으며, 분열된 세포의 퍼센트는 이소형 처리된 M2c 대식세포와 비교할 때 31%에서 44%로(사전, n = 18, p < 0.01) 및 42%에서 49%로(사전/사후, n = 14, p < 0.05) 증가하였다.

[0600] **도 35**는 M2c 세포의 분극화 동안의 AB101로의 처리도 M2c/T 세포 공동배양 분석에서 T 세포의 IL-2 생산을 유의하게 향상시켰음을 도시한다. 사전-처리 AB101 그룹의 T 세포는 더 높은 수준의 IL-2를 유의하게 생산하였으며, 이때 중앙값은 292 ng/mL으로, 상응하는 이소형 대조군 처리 그룹의 T 세포로부터 얻은 104 ng/mL보다 거의 3배 더 높다. AB101 사전/사후 처리는 333 ng/mL의 T 세포에 의한 IL-2 반응을 생성하였으며, 이는 이소형 대조군 처리된 M2c/T 세포 공동배양으로부터 얻은 227 ng/mL보다 50% 더 높았다; 그러나, 상기 차이는 유의성에 도달하지 않았다.

[0601] **실시예 18 - AB101은 T 세포 증식 및 M2c 대식세포와 함께 공동배양된 T 세포에 의한 사이토카인 반응을 회복시키는 데 AB104보다 더 강력하다**

[0602] 면역 억제의 AB101 매개된 완화가 M2c 대식세포에 의해 발현되는 Fc 수용체와의 상호작용을 필요로 하는지의 여부를 결정하기 위해, 본 발명자들은 M2c/T 세포 공동배양 분석에서 AB101-IgG4(AB104) 및 AB101-IgG1Fcnull(AB102) 이소형을 평가하였다. AB101 IgG1-Fc 영역은 M2c 대식세포 상의 CD64, CD32 및 CD16에 결합하는 반면, Fc γ 수용체에 대한 IgG1Fcnull 이소형의 결합은 최소이다. IgG1 Fc 영역과 마찬가지로, IgG4 Fc 영역은 CD64에 대해 나노몰 친화도를 갖지만 일반적으로 CD32 또는 CD16 Fc 수용체에 결합하지 않는다. T 세포 증식에 대한 M2c 매개 면역 억제를 완화하는 AB101, AB102 및 AB104 이소형의 능력을 5명의 연구 대상체로부터의 세포와 비교하였다.

[0603] 4명(CD8⁺ T 세포) 및 5명(CD4⁺ T 세포)의 인간 대상체로부터 단리된 T 세포를 M2c 대식세포의 존재 하에 항-CD3(OKT3, 0.25 µg/mL)으로 활성화시켰다. M2c/T 세포 공동배양물을 AB101의 표시된 이소형 20 µg/mL로 사전/사후-레지먼 하에 처리하였다. M2/T 세포 공동배양물 단독을 M2c 매개 면역 억제에 대한 대조군으로서 사용하였다. T 세포를 항-CD3 자극 후 72시간차에 수거하고 증식을 유세포측정에 의해 정량화하였다. 기호는 개별 연구 대상체를 나타낸다. P 값은 표시된 처리 그룹들을 비교하는 대응표본 양측 t-검정에 의해 계산하였다(p<0.05, *; ns, 유의하지 않음).

[0604] **도 36**은 AB101 사전/사후-레지먼이 IgG1 이소형 대조군(52 내지 78% CD8⁺ T 세포; 46 내지 65% CD4⁺) 및

AB102(52 내지 78% CD8⁺ T 세포; 42 내지 65% CD4⁺ T 세포)와 비교할 때 항-CD3 활성화된 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포의 평균 증식을 유의하게 향상시켰음을 도시한다. AB104 및 AB102 처리는 각각의 이소형 대조군과 비교할 때 T 세포의 증식 반응을 약간만 향상시켰다. AB104 처리 그룹에서 CD4⁺ T 세포의 증식 반응만이 IgG4 이소형 대조군에 비해 유의성에 도달하였다(39 내지 47% 분열된 세포, p<0.05).

[0605] 도 37은 AB101 사전/사후-레지먼이 IgG1 이소형 대조군(40% 분열된 세포, p<0.05) 및 AB104 처리(41% 분열된 세포, p<0.05)와 비교할 때 OKT3 매개된 CD8⁺ T 세포 증식(70% 분열된 세포)에 강력하고 유의한 자극 효과를 미쳤음을 도시한다. 추가로, AB101 사후-레지먼은 이소형 대조군(27% 분열된 세포, p<0.05) 또는 AB104 처리(20% 분열된 세포, p<0.05)와 비교할 때 유의하게 향상된 CD8⁺ T 세포 증식(54% 분열된 세포)을 입증하였다. AB104 처리는 사전/사후- 또는 사후-레지먼에서 IgG4 이소형 대조군에 비해 증식 반응을 유의하게 개선하지 않았다.

[0606] M2c/T 세포 공동배양 동안 AB101 처리(사후-레지먼)는 M2c 매개 면역억제를 완화하였고 항-CD3 활성화된 CD8⁺ T 세포에 의한 강력한 사이토카인 반응을 유도하였다. 3명의 연구 대상체로부터 단리된 CD8⁺ T 세포를 M2c 대식세포의 존재 하에 항-CD3(OKT3, 0.25 µg/mL)로 활성화시켰다. M2c/T 세포 공동배양물은 사후-레지먼 하에 20 µg/mL의 AB101, 인간 IgG1 이소형 대조군, AB104, 인간 IgG4 이소형 대조군 및 배지 단독(M2c)으로 처리하였다. 항-CD3 자극 후 72시간차에 상청액을 취하고 사이토카인 분비를 마그네틱 비드-기반 면역분석에 의해 정량화하였다. P 값은 표시된 처리 그룹들을 비교하는 대응표본 양측 t-검정에 의해 계산하였다(p <0.05, *; p < 0.01, **; p < 0.001, ***; ns, 유의하지 않음).

[0607] 도 38은 AB101이 IgG1 이소형 대조군과 비교할 때 모든 연구 대상체에서 IFN-γ 및 퍼포린 수준을 유의하게 향상시켰음을 도시한다. 표 6은 AB101 처리 그룹에서 평균 IFN-γ, 퍼포린 및 IL-6 수준이 IgG1 이소형 대조군 값과 비교하여 530에서 1600 pg/mL(IFN-γ)로, 210에서 1900 pg/mL(퍼포린)로 및 203에서 690 pg/mL(IL-6)로 증가하였음을 나타낸다. 또한, AB101 처리는 3명의 연구 대상체 중 2명에서 TNF-α 분비를 회복시켰으며, 상응하는 IgG1 이소형 대조군 값에 비해 60에서 830 pg/mL로 및 1에서 120 pg/mL로 유의하게 증가하였다. 표 1에 나타낸 바와 같이, AB101 사전/사후-레지먼은 퍼포린 및 시험된 사이토카인에 대해 유사한 사이토카인 수준을 유도함으로써 사후-레지먼 그룹으로 관찰된 결과를 확인시켜 주었다. AB104는 어떤 처리 그룹에서도 M2c 매개 면역억제를 완화하지 않았다. 평가된 M2c 공동배양물에서 IL-10 수준은 모든 처리 조건에서 분석의 하한 검출 한계에 있었다.

[0608] [표 1]

M2c 대식세포 매개 면역 억제로부터 AB101 구제된 CD8⁺ T 세포 사이토카인 반응

CD8 ⁺ T 세포에 의한 사이토카인 분비[pg/mL]											
사이토카인		대조군		사전/사후-용법				사후-용법			
		항체 없음		AB101		AB104		AB101		AB104	
		M1	M2	Ab	Iso	Ab	Iso	Ab	Iso	Ab	Iso
IL-6	평균	243	27	744	62	12	51	686	203	22	77
	SEM	113	16	222	36	5	28	201	86	21	53
IL10	평균	4	20	26	11	9	13	20	16	10	13
	SEM	4	10	17	0	5	3	10	3	7	3
IFN-γ	평균	3016	259	1730	461	14	134	1615	531	17	220
	SEM	1209	295	1441	549	5	153	1439	632	2	255
TNF-α	평균	53	14	330	23	2	12	312	31	2	14
	SEM	24	15	310	25	1	12	272	32	2	15
퍼포린	평균	220	91	2459	144	57	72	1912	213	48	73
	SEM	129	34	1945	124	8	24	1494	147	19	23

[0609]

[0610] AB101 사후- 및 사전/사후-레지먼 M2c/CD4⁺ T 세포 공동배양에 대한 상응하는 사이토카인 및 퍼포린 결과를 도 39 및 표 2에 나타낸다. 3명의 건강한 연구 대상체로부터 단리된 CD4⁺ T 세포를 M2c 대식세포의 존재 하에 항-CD3(OKT3, 0.25 µg/mL)으로 활성화시켰다. M2c/T 세포 공동배양물을 사후 레지먼 하에 AB101(20 µg/mL), 인간 IgG1 이소형 대조군(20 µg/mL), AB104(20 µg/mL), 인간 IgG4 이소형 대조군(20 µg/mL) 및 배지 단독(M2c)으로

처리하였다. 항-CD3 자극 후 72시간차에 상청액을 취하고 사이토카인 분비를 마그네틱 비드-기반 면역분석에 의해 정량화하였다. P 값은 표시된 처리 그룹들을 비교하는 대응표본 양측 t-검정에 의해 계산하였다($p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **; ns: 유의하지 않음).

[0611] AB101은 IgG1 이소형 대조군 및 AB104와 비교할 때 모든 연구 대상체에서 IFN- γ , TNF- α 및 퍼포린 수준을 유의하게 향상시켰다. AB101 처리 그룹의 평균 IFN- γ , TNF- α , 퍼포린 및 IL-6 수준은 IgG 1 이소형 대조군 값과 비교하여 770에서 1700pg/mL(IFN- γ)로, 420에서 1400pg/mL(TNF- α)로, 220에서 780 pf/mL(퍼포린)로 및 1300에서 5100(IL-6)pg/mL로 증가하였다. AB101 사전/사후-레지먼은 퍼포린 및 시험된 사이토카인에 대해 유사한 수준의 사이토카인을 유도함으로써 사후-레지먼 그룹에서 관찰된 결과를 확인시켜 주었다. AB104는 IgG4-이소형 대조군의 상응하는 수준과 비교할 때 사이토카인 또는 퍼포린 반응을 향상시키지 않았다.

[0612] [표 2]

M2c 대식세포 매개 면역 억제로부터 AB101 구제된 CD4⁺ T 세포 사이토카인 반응

CD4 ⁺ T 세포에 의한 사이토카인 분비[pg/mL]											
사이토카인		대조군		사전/사후-용법				사후-용법			
		항체 없음		AB101		AB104		AB101		AB104	
		M1	M2	Ab	Iso	Ab	Iso	Ab	Iso	Ab	Iso
IL-6	평균	372	112	5039	1092	1015	940	5129	1330	1101	738
	SEM	205	33	1813	236	214	362	2372	388	380	153
IL10	평균	93	67	576	232	171	132	533	218	164	129
	SEM	50	35	171	106	53	35	103	106	68	67
IFN- γ	평균	4202	84	1609	721	562	416	1678	774	588	366
	SEM	1012	53	251	291	176	96	195	345	255	194
TNF- α	평균	175	133	1356	424	427	500	1377	423	417	419
	SEM	95	82	402	70	70	95	261	59	87	121
퍼포린	평균	117	64	685	173	122	99	776	224	138	94
	SEM	58	5	195	50	33	9	231	103	48	34

[0613]

[0614] 결론적으로, M2c 매개 면역 억제로부터 AB101에 의한 T 세포 사이토카인 반응의 구제 및 AB104 이소형에 의한 효능의 기여는 AB101 Fc 수용체 상호작용이 AB101 기능을 위해 필요할 수 있음을 시사한다.

[0615] 실시예 19 - AB101 처리는 CD8⁺ T 세포의 세포독성 활성을 향상시켰다

[0616] AB101이 TME에서 CD8⁺ T 세포에 의한 종양 세포 사멸을 향상시키는지의 여부를 결정하기 위해, M2c 대식세포의 존재 하에 항-CD3 항체로 자극된 CD8⁺ T 세포의 세포독성 활성을 평가하였다. 본 연구에서, 종양 항원 특이적 T 세포 매개된 종양 세포 사멸을 이중특이적 T 세포 인게이지(BiTE®) 기술로 대체하였다. BiTE 항체는 암 세포를 CTL에 가교시키도록 설계된, 2개의 단클론 항체의 가변 도메인으로 구성된 융합 단백질이다. 하나의 가변 도메인은 암 세포 표면 상의 항원을 표적화하고, 다른 가변 도메인은 T 세포의 표면 상의 CD3에 관여한다(engage). BiTE® 항체의 두 아암(arm) 모두가 결합되면, T 세포와 암 세포가 강제로 서로 근접하게 된다. 그 결과, T 세포와 암 세포 사이에 세포용해 시냅스가 생성되고, T 세포로부터 퍼포린 및 그랜자임이 방출되고, 종양 세포 사멸이 발생한다.

[0617] CD19-CD3 BiTE 항체를 사용하여 BiTE의 CD19 표적을 발현하는 라지 B 세포 림프종 세포의 T-세포 매개 종양 세포 사멸에서의 AB101의 효능을 평가하였다. M2c/CD8⁺ T 세포 공동배양물의 AB101 처리는 M2c 매개 면억 억제를 완화하고 CD8⁺ T 세포의 세포용해 활성을 확장 및 향상시킬 수 있다. CD8⁺ T 세포는 또한 BiTE의 부재 하에 동종 이계 HLA-제한된 세포용해에 의해 라지 세포를 사멸시킬 수 있다. BiTE 또는 HLA를 발현하지 않는 K562 세포(만성 골수성 백혈병 세포주)는 CD8⁺ T 세포에 의한 비-HLA-제한된 세포 사멸의 평가를 위해 포함되었다.

[0618] M2c 대식세포와 자가 인간 1차 CD8⁺ T 세포의 공동배양물을 항-CD3로 활성화시키고 3일 동안 증대시켰다. 공동 배양물을 사전-, 사전/사후- 및 사후-레지먼 하에 AB101(20 μ g/mL), 인간 IgG1 이소형 대조군(20 μ g/mL) 또는 배지 단독으로 처리하였다. 사전- 및 사후-레지먼 하에, 치료 항체를 각각 M2c 분극화 동안 및 M2c T 세포 공동 배양 동안에만 첨가하였다. P 값은 AB101을 각각 M2c 및 이소형 대조군 처리 그룹과 비교하는 대응표본 양측 t-

검정에 의해 계산하였다($p < 0.05$, *; $p < 0.01$, **: $p < 0.001$, ***; $p < 0.0001$, ****; ns: 유의하지 않음). 세포독성 판독을 포함하는 M2/T 세포 공동배양 분석의 작업 흐름은 도 28에 도시되어 있다.

- [0619] 오류! 참조 출처 없음. 도 40은 M0에서 M2 대식세포로의 분극화 동안 또는 M2c/T 세포 공동배양 동안 AB101 처리가 이소형 대조군과 비교할 때 CD19-CD3 BiTE® 항체의 존재 하에 라지 세포의 사멸을 유의하게 향상시켰음을 도시한다. 라지 세포 사멸의 퍼센트는 사전-레지먼 하에 66%에서 77%($p < 0.01$)로, 사전/사후 레지먼 하에 64에서 83%($p < 0.001$)로 및 사후-레지먼 하에 65에서 82%($p < 0.01$)로 증가하였다. 라지 BiTE® 사멸 분석은 작은 동적 범위와 높은 배경을 가졌으며, M2c 세포와 배양된 휴지 CD8+ T 세포(회색 막대, 검은색 원)는 라지 세포의 71%를 사멸시킨다.
- [0620] 특히, AB101 처리는 또한 K562 암 세포를 표적화하는 비-HLA-제한된 CD8⁺ T 세포의 세포독성 활성을 증가시켰다. M2c 대식세포 및 T 세포의 사전/사후 및 사후 AB101 처리는 종양 세포 사멸을 사전/사후 조건($p < 0.01$) 하에 12%에서 41%로 및 사후 조건 하에 13%에서 36%($p < 0.05$)로 향상시켰다.
- [0621] 다음으로, 인간 대상체의 패널로부터의 CD8⁺ T 세포의 세포독성 활성에 미치는 AB101의 효과를 평가하였다. 8명의 연구 대상체로부터의 CD8⁺ T 세포를 항-CD3(OKT3, 0.25 $\mu\text{g/mL}$)와 자가 M2c 대식세포의 존재 하에 증식시켰다. M2c 대식세포 단독 및 공동배양물을 사전-, 사전/사후- 및 사후-레지먼 하에 AB101(20 $\mu\text{g/mL}$), 인간 IgG1 이소형 대조군(20 $\mu\text{g/mL}$) 또는 배지 단독으로 처리하였다. T 세포를 항-CD3 자극 후 72시간차에 수거하고 CD19-CD3 BiTE 항체의 존재 또는 부재 하에 라지 세포와 배양하였다. 라지 세포의 세포 사멸은 세포용해 분석 설정 후 18시간차에 유세포측정에 의해 결정하였다. P 값은 AB101을 각각 M2c 및 인간 IgG1 이소형 대조군 처리 그룹과 비교하는 대응표본 양측 t-검정에 의해 계산하였다($p < 0.01$, **: $p < 0.001$, ***).
- [0622] 오류! 참조 출처 없음, 나타낸 바와 같이, AB101 사전/사후 처리는 인간 IgG1 이소형 대조군과 비교할 때 CD8⁺ T 세포-매개 BiTE®-보조된 라지 세포 사멸을 49.5%에서 63.5%($p < 0.001$)로 유의하게 증가시켰다. BiTE가 없는 경우, AB101 그룹의 CD8⁺ T 세포는 라지 세포의 세포용해를 35%에서 43%로 향상시켰다($p < 0.01$).
- [0623] 다음으로, 비-HLA 제한된 CD8⁺ T 세포의 세포독성 활성에 미치는 AB101의 효과를 평가하였다. 8명의 연구 대상체로부터의 CD8⁺ T 세포를 항-CD3(OKT3, 0.25 $\mu\text{g/mL}$)와 자가 M2c 대식세포의 존재 하에 증식시켰다. M2c 대식세포 단독 및 공동배양물을 사전-, 사전/사후- 및 사후-레지먼 하에 AB101(20 $\mu\text{g/mL}$), 인간 IgG1 이소형 대조군(20 $\mu\text{g/mL}$) 또는 배지 단독으로 처리하였다. T 세포를 항-CD3 자극 후 72시간차에 수거하고 K562 세포와 배양하였다. K562 세포의 세포 사멸은 분석 설정 후 18시간차에 유세포측정에 의해 결정하였다. P 값은 AB101을 각각 M2c 및 인간 IgG1 이소형 대조군 처리 그룹과 비교하는 대응표본 양측 t-검정에 의해 계산하였다($p < 0.01$, **).
- [0624] 도 42는 AB101 처리가 K562 사멸 분석에서 세포용해성 CD8⁺ T 세포 활성화에 가장 강력한 영향을 미쳤음을 보여준다. AB101 처리 그룹의 평균 세포 사멸은 인간 IgG1 이소형 대조군보다 2배 높았고, 평균 K562 사멸을 각각 14%에서 29%로 증가시켰다($p < 0.01$).
- [0625] 실시예 20 - AB101은 M2c 대식세포와 함께 공동배양된 T 세포 상에서 케모카인 수용체의 발현을 조절한다.
- [0626] AB101이 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 활성화 상태를 변경하는지 여부를 결정하기 위해, 케모카인 수용체 및 활성화 또는 탈진 마커의 발현을 도 28에 도시된 바와 같은 M2c/T 세포 공동배양 분석에서 평가하였다.
- [0627] 항-CD3 활성화된 T 세포를 분극화 동안 AB101 또는 이소형 대조군으로 처리된 자가 M2c 세포와 공동배양하였다. 나이브 M2c 또는 IFN- γ LPS 활성화 M1 대식세포와 공동배양된 항-CD3 활성화된 T 세포를 각각 면역 억제 및 면역 활성화에 대한 대조군으로서 포함시켰다. 휴지 T 세포는 항-CD3 활성화 없이 M2c 대식세포와 함께 공동배양하였다. 항-CD3 활성화 3일 후, T 세포를 유세포측정에 의해 분석하였다. 유세포측정 염색 패널 1(표 8)은 활성화 마커(CD25 및 CD69), 휴지 T 세포 마커 CD127에 대한 항체뿐만 아니라, CD4⁺ T 세포 서브셋을 분화시키는 데 전형적으로 사용되는 케모카인 수용체 CXCR3, CXCR4(CD194) 및 CCR6(CD196)을 포함하였다. 유세포측정 항체 패널 2(표 8)는 T 세포 활성화 및 탈진 마커 LAG3, OX40, PD-1, ICOS 및 CTLA-4를 포함하였다.
- [0628] 3명의 연구 대상체로부터 단리된 T 세포를 M2c 대식세포의 존재 하에 항-CD3(OKT3, 0.25 $\mu\text{g/mL}$)으로 활성화하였다. M2c/T 세포 공동배양물을 M2c 분극화 동안 AB101(20 $\mu\text{g/mL}$), 인간 IgG1 이소형 대조군(20 $\mu\text{g/mL}$) 또는 배지 단독으로 처리하였다. M1/T 세포 공동배양물은 양성 대조군으로서 포함시켰다. 유세포측정을 위해 항-CD3 자

극 후 72시간차에 상청액을 수거하였다. 히트맵(heatmap)은 모든 연구 대상체의 조합된 처리 그룹의 FlowSOM 클러스터 분석을 나타낸다.

[0629] $CD4^+$ T 세포의 표현형을 비편향 클러스터링을 위한 유세포측정 패널 1 및 FlowJo FlowSOM 플러그인을 사용하여 평가하였다. 도 43에 도시된 바와 같이, 모든 M2c/T 세포 공동배양물 그룹으로부터의 $CD4^+$ T 세포의 FlowSOM 클러스터링은 표면 마커에 대한 차등적 발현 수준으로 8개의 클러스터(0 내지 7로 번호매김됨)를 식별하였다. 클러스터 1은 휴지 T 세포를 나타내고 클러스터 6은 활성화된 Th1-유사 T 세포와 유사하다.

표 8

$CD4^+$ T 세포 하위유형 상의 케모카인 수용체 및 탈진/활성화 마커의 발현을 평가하기 위해 사용된 항체 패널

	항체 패널 1: T 세포 표현형 결정 패널	항체 패널 2: 탈진/활성화
표면 마커	CD4 - FITC CD69 - PE-Cy7 CD25 - APC CD127 - PE CXCR3 - PerCP-Cy5.5 CD194 (CCR4) - BV421 CD196 (CCR6) - BV510	CD4 - FITC CD8 - APC LAG3 - BV421 OX40 - BV510 PD-1 - PerCP-Cy5.5 ICOS - PE-Cy7 CTLA4 - PE

[0630]

[0631] AB101 처리가 $CD4^+$ T 세포의 비율에 어떻게 영향을 미쳤는지에 대해 가시화된 대표적인 예는 표 9 및 도 43에 제시되어 있다. 항-CD3 활성화 없이 M2c 세포와 공동배양된 T 세포의 대부분(평균=74%)은 클러스터 1(연구 대상체 3명 중 3명)에서 발견되었다. 클러스터 1 세포는 CD69, CXCR3, CCR4 또는 CD25 발현이 낮거나 없고 CD127의 발현이 상승된 휴지 표현형을 가졌다. 면역-활성화 M1 분극화된 대식세포의 존재 하에, 대부분의 T 세포(57%, 모든 3명의 대상체의 평균)는 CXCR3의 높은 발현과 CCR4, CD127, CCR6 및 활성화 마커 CD25 및 CD69의 낮은 발현을 특징으로 하는 활성화된 표현형을 채택한다(클러스터 2). M1 공동배양은 또한 CD25, CXCR3 및 CCR4의 발현이 상승된 독특한 더 작은 서브세트를 유도한다(클러스터 7, M1과 공동배양된 T 세포의 21%). M2c 세포는 휴지기 표현형 클러스터 1에서 T 세포의 46%와의 공동배양물에서 항-CD3 활성화된 $CD4^+$ T 세포에 대한 면역억제 효과를 나타냈다. 또한, M2c 단독 그룹의 T 세포의 32%가 활성화된 T 세포 표현형 클러스터 2에서 발견되었다

표 9

AB101 은 FlowSOM 클러스터 내의 활성화된 $CD4^+$ T 세포의 분포를 조절한다

FlowSOM 클러스터	FlowSOM 클러스터 내의 $CD4^+$ T 세포 분포[%]									
	휴지 T 세포 M2c		M2c + OKT3		이소형 대조군 M2c + OKT3		AB101 M2c + OKT3		M1 + OKT3	
	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM
0	1.7	0.3	3.3	0.9	3.0	0.7	5.9	1.6	2.9	0.8
1	73.1	7.8	46.3	2.9	51.3	1.6	12.3	7.3	8.9	3.7
2	19.8	5.7	31.9	5.3	27.4	1.9	40.5	9.8	55.6	6.1
3	1.3	0.8	4.3	1.5	4.2	0.7	14.0	4.5	1.1	0.5
4	2.9	0.8	9.6	1.7	8.7	1.5	16.0	3.0	3.3	0.5
5	0.2	0.0	0.3	0.1	0.2	0.1	0.6	0.1	3.9	1.3
6	0.4	0.2	3.3	0.5	4.4	1.8	9.3	1.0	3.4	0.8
7	0.7	0.3	1.0	0.1	0.9	0.1	1.4	0.1	20.8	1.5

[0632]

[0633] 도 43은 이소형 대조군 처리 그룹으로부터의 항-CD3 활성화된 $CD4^+$ T 세포가 상응하는 M2c 단독 그룹으로부터의

T 세포와 유사한 분포 프로파일을 가지고, 클러스터 1 내의 T 세포의 평균은 51%이고 클러스터 2 내의 T 세포의 평균은 27%임을 도시한다(표 9).

- [0634] 대조적으로, AB101로 처리는 M2c 분극화된 대식세포의 억제 효과를 완화시켰다. AB101은 이소형 대조군과 비교하여 클러스터 2의 활성화된 표현형을 공유하는 T 세포의 비율을 27%에서 40%로 유의하게 향상시켰다 ($p < 0.05$). 또한, AB101은 휴지 세포의 표현형을 공유하는 세포의 비율을 51%에서 13%로 유의하게 감소시켰다(클러스터 1; $p < 0.0001$). 이러한 분포는 M1 대식세포의 존재하에 자극된 T 세포의 표현형 패턴과 유사하였다.
- [0635] 클러스터 3, 클러스터 4 및 클러스터 6은 또한 이소형 대조군과 비교할 때 AB101로 처리에 의해 상승되었다. 도 43에 도시된 바와 같이, 3개의 클러스터의 차이는 각각의 M2c 및 이소형 대조군과 관련된 3명의 평가된 대상체 중 2명에서 유의성에 도달하였다($p < 0.0001$).
- [0636] 클러스터 3 및 클러스터 4는 CXCR3의 높은 발현, CCR4의 중간 발현 및 활성화 마커 CD69의 높은(C1.3) 또는 낮은(C1.4) 발현을 갖는 CD127의 존재에 의해 정의된다. 클러스터 3의 표현형은 M1 또는 휴지 T 세포와 공유되지 않으며, 이는 AB101 처리 특유의 것으로 보인다.
- [0637] 클러스터 6은 CXCR3 및 CD69의 높은 발현 및 CCR4 및 CCR6의 최소 발현을 갖는 활성화된 Th1-유사 T 세포의 표현형을 나타낸다. AB101 처리는 클러스터 6에서 T 세포 비율의 평균 백분율을 이소형 처리 그룹의 4.4%에서 9.3%로 증가시켰다(표 9).
- [0638] 결론적으로, M2c 공동배양에 의해 증대된 $CD4^+$ T 세포 표현형의 FlowSOM 분석은 AB101 처리가 M2c 매개 면역 억제를 완화하고 CXCR3 및 CCR4의 발현에 의해 강조된 독특한 T 세포 표현형의 발현을 유도함을 나타낸다. AB101 처리는 또한 M2c 공동배양물에서 활성화된 Th1-유사 CXCR3⁺ T 세포의 비율을 증가시켰다.
- [0639] M2c-매개 억제를 차단하여 T 세포의 활성화를 향상시키는 AB101의 능력을 추가로 조사하기 위해, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포를 활성화 및 탈진 마커 LAG3, OX40, PD-1, ICOS 및 CTLA-4에 대해 평가하였다. FlowSOM에 의한 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 클러스터링은 5개의 $CD4^+$ (0번 내지 4번) 및 4개의 $CD8^+$ (0번 내지 3번) 클러스터를 식별하였다.
- [0640] 클러스터 0($CD4^+$ T 세포) 및 클러스터 3($CD8^+$ T 세포)에서 LAG3, OX40, PD-1 및 CTLA-4의 낮은 발현은 휴지 표현형을 나타낸다. 클러스터 1($CD4^+$ T 세포) 및 클러스터 3($CD8^+$ T 세포)에서 PD-1 및 ICOS의 증가된 발현은 본 연구에서 활성화된 표현형을 나타낸다(도 44).
- [0641] 클러스터 0(ICOS⁺ PD-1⁻ LAG3⁻ CTLA4⁻ OX40⁻)은 자극되지 않은 $CD4^+$ T 세포의 90%를 나타내고 클러스터 3(ICOS^{lo} PD-1⁻ LAG3⁻ CTLA4⁻ OX40⁻)은 항-CD3 활성화 없이 M2c 대식세포와 배양된 휴지 $CD8^+$ T 세포의 93%를 나타낸다(도 44). M2c 분극화된 대식세포와 함께 공동배양되거나 이소형 대조군으로 처리될 때 (항-CD3 활성화된 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포는 주로 상응하는 휴지 클러스터 0($CD4^+$ T 세포의 65%) 및 클러스터 3($CD8^+$ T 세포의 64%)에 속하며, 이는 M2c 세포 매개 면역 억제를 확인시켜 준다.
- [0642] AB101은 M2c 단독 또는 이소형 대조군 처리 그룹과 비교할 때 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 활성화를 유의하게 향상시킨다. AB101 처리 그룹의 $CD4^+$ T 세포의 82% 및 $CD8^+$ T 세포의 93%가 M1 분극화된 대식세포와 함께 공동배양된 T 세포와 공유된 각각의 활성화된 T 세포 표현형 클러스터 1(ICOS^{hi} PD-1⁺ LAG3⁻ CTLA4⁻ OX40^{lo}) 및 클러스터 0(ICOS^{hi} PD-1⁺ LAG3^{lo} CTLA4⁻ OX40^{lo})에서 발견된다.
- [0643] 실시예 21 - AB101은 m2c 표면 마커의 발현을 조절하였다
- [0644] M0 대식세포의 M2c 대식세포로의 분극화 동안 AB101 처리는 M2c/T 세포 공동배양 분석에서 M2c-매개 면역 억제로부터 항-CD3 활성화된 T 세포를 구제하였다. AB101이 M2c 상의 표면 마커 및 면역 체크포인트의 발현을 조절하는지 여부를 결정하기 위해, 5일 된 M0 대식세포를 AB101 또는 이소형 대조군(20 μ g/mL)의 존재 하에 IL-10을 이용하여 M2c 대식세포로 분극화한 다음, 대식세포 표현형 항체 패널로 염색하였다. 유세포측정 프로파일을 나이브, 미처리 M2c 세포 및 LPS + IFN- γ 분극화된 M1 대식세포와 비교하였다. M2c 대식세포는 M2c 마커 CD163, CD206 및 Mer-TK, Fc γ 수용체 CD16, CD32, CD64, 패턴 인식 수용체 TLR2, TNFR 패밀리를 구성원 CD40을 발현한다. 예상대로, IFN- γ 처리 후, M1 대식세포는 M2c 대식세포와 비교할 때 더 높은 수준의 HLA-클래스 II 및 체

크포인트 리간드 PD-L1을 발현하였다. 대조적으로, M2c 대식세포는 M1 대식세포보다 더 높은 수준의 면역 억제 리간드 시글렉-15 및 LILRB2를 나타냈다. 평가된 표면 마커, 공동자극 분자 및 수용체 CD86, CD91, CD150, 칼레티쿨린, 텍틴-1, TIM4 및 TLR4는 M2c 세포에서 발현되지 않는다.

[0645] 활성화된 $CD4^{+}$ T 세포에 의한 CXCR3 발현을 추가로 분석하기 위해, FlowSOM 클러스터 3 내지 6을 이들의 $CXCR3^{+}CD69^{+}CD25^{+}$ T 세포 표현형에 기반하여 조합하였다. 생성된 표현형의 비율은 도 45에 파이 차트로 도시되어 있으며 도 45의 표 내의 표현형을 나타낸다.

[0646] AB101 처리는 이소형 처리 그룹과 비교할 때 활성화 마커 CD69 및 CD25를 발현하는 활성화된 $CXCR3^{+}, CD4^{+}$ T 세포의 비율을 18%에서 40%로 증가시켰다. OR2572 및 M2c 단독 처리 그룹은 유사한 분포 프로파일을 가졌다.

[0647] 표면 마커 발현에 미치는 AB101의 조절 효과를 정량화하기 위해, AB101 처리된 M2c 세포에 대한 표현형 결정 항체의 mMFI 값을 이소형 대조군(nMFIiso) 또는 10명 이하의 연구 대상체로부터의 미처리된 나이브 M2c 대식세포(nMFI_{M2c}) 상의 상응하는 마커에 대해 정규화하였다(도 46). AB101은 이소형 대조군 처리된 M2c 세포에 비해, CD16(34% nMFI_{iso}, $p<0.0001$) 및 CD64(30% nMFI_{iso}, $p<0.0001$)의 매우 유의한 감소뿐만 아니라 TLR2(66% nMFI_{iso}, $p<0.05$)의 유의한 감소를 유도하였다. AB101 M2c 표면 마커 MFI가 나이브 M2c 대식세포에 대해 정규화되었을 때 유사한 경향이 관찰되었다. AB101 처리된 대식세포의 표면 마커의 nMFI_{M2c}는 CD16(44% nMFI_{M2c}, $p<0.001$), CD64(30% nMFI_{M2c}, $p<0.0001$), TLR2(63% nMFI_{M2c}, $p<0.015$) 및 시글렉-15(66% nMFI_{M2c}, $p<0.05$)에 대해 유의하게 감소되었다. AB101 처리는 M2c 대식세포 대조군과 비교할 때 HLA-클래스 II의 발현을 향상시켰고 CD163, CD206, MerTK, LILRB2 및 PD-L1의 발현에 유의한 영향을 미치지 않았다.

[0648] 요약하면, M2c 대식세포의 분극화 동안 AB101 처리는 선천적 수용체 TLR2 및 체크포인트 리간드 시글렉-15의 발현을 감소시켰다. 또한, 이는 M2c 세포 상에서 CD16 및 CD64의 IL-10 유도된 상향조절을 억제하였다.

[0649] 실시예 22 - AB101 결합은 SRCR 도메인 3 및 4 내의 영역 및 CD163의 도메인 2, 5 및 9의 노출된(빠른 HD 교환) 영역의 보호(더 느린 HD 교환)를 증가시켰다

[0650] CD163에 미치는 IgG 결합의 효과를 조사하기 위해 비교 HDX 연구를 수행하였다. 복합체에 존재하는 과량의 Ab로부터 유래된 많은 수의 펩티드로 인해 m/z 및 체류 시간에 있어 많은 펩티드 중첩이 초래되었다. 궁극적으로, 노이즈(noisy) 및 중첩 펩티드를 필터링한 후, 펩신 데이터 내의 107개 펩티드의 최종 세트는 1.28의 평균 중복성으로 74%의 적용범위(coverage)에 상응한다. 네펜데신 II 데이터 세트의 경우, 최종 필터링된 펩티드 카운트는 2.8의 평균 중복성으로 87% 적용범위에 상응하는 230이었다. 데이터 세트를 두 프로테아제 모두와 조합할 때, 총 서열 적용범위는 4.1의 평균 중복성으로 93%였다.

[0651] 질량 분광법을 사용한 수소/중수소 교환: 재조합 인간 CD163(rhCD163)의 출발 스톱 용액을 인산염 완충된 식염수(PBS) pH 7.2에 0.36 mg/mL로 희석하였다. 내부 교환 리포터: 테트라펩티드 PPPF 또는 트리펩티드 YPI를 최종 농도가 1 μ M이 되도록 각 용액에 첨가하였다. 항체-복합체 샘플은 동일한 방식으로 제조하였지만, rhCD163에 비해 3배 몰 과량에 상응하는 1.38 mg/mL의 AB101을 포함하였다. 이들 작업 용액은 중수소 교환 반응을 시작하기 전에 1일 동안 22°C에서 인큐베이션하고 4°C에서 보관하였다. 10 μ L의 작업 단백질 용액을 90 μ L 중수소화된 HBS 완충제(20 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 95% D_2O)에 10배 희석하고 22°C에서 3초, 15초, 1분, 5분, 30분, 4시간 또는 20시간 동안 인큐베이션하였다. 중수소화된 HBS는 역교환을 모니터링하기 위해 모든 실험에서 완전히 중수소화된 참조 화합물을 제공하기 위해 0.2 μ g/mL의 브라디키닌을 또한 함유하였다. 추가의 샘플을 고도로 중수소화된 샘플로서 37°C에서 20시간 동안 인큐베이션하였다. 교환된 샘플을 2.5의 최종 pH를 위해 동일한 용적(100 μ L)의 빙냉 켄치 완충제: 1M TCEP, 0.2% 포름산(FA)에 첨가하였다. 샘플을 에탄올-드라이 아이스 욕조(-60°C)에서 급속 동결시키고 이어서 LC-MS 분석까지 -80°C에서 보관하였다. 중수소화되지 않은 참조 샘플은 수성 HBS 완충제에 희석한 것을 제외하고는 동일하게 제조하였다.

[0652] 고정화된 펩신 프로테아제를 사용한 샘플 가공처리: 동결된 샘플을 로딩 루프에 주입하기 전에 5°C 블록에서 4분 동안 해동하였다. 로딩된 샘플을 200 μ L/분의 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA) 및 2% 아세토니트릴(ACN)의 흐름으로 12°C에서 유지된 맞춤형 패킹된 펩신 컬럼(POROS 20-AL 수지에 고정화된 돼지 펩신; 2.1 x 50 mm 컬럼)에 통과시켰다. 분해된 펩신 단편을 Waters XSelect CSH C18 XP VanGuard 카트리지(2.1 x 5 mm, 2.5 μ m)에 포획하였다. 5분의 로딩, 분해 및 포획 후, 펩티드를 9분 동안 3% 내지 40% 용매 B의 구배(A: 0.1% FA, 0.025% TFA, 2% ACN, B) ACN 중 1% FA)를 사용하여 분석용 컬럼(Waters CSH 1 x 100 mm, 1.7 μ m, 130Å)에서 분해하였다. LC 시스템은 이온 이동성 분리가 가능한 300 내지 2000의 m/z 범위에서 전체 스캔을 수행하는

Waters Synapt G2-Si에 커플링시켰다. 원천 조건은 탈용매화 동안 중수소의 손실을 최소화하도록 최적화하였다. 중수소화되지 않은 샘플은 모든 LC-MS 실행 전과 후에 실행하였다. 분석적 분리 단계 동안, 일련의 250 μ L 주입을 사용하여 펄스 컬럼을 세척하였다. 1) 0.1% TFA를 갖는 0.1% Fos-12; 2) 0.1% TFA 중 2 M GndHCl; 3) 10% 아세트산, 10% 아세토니트릴, 5% 이소프로판올. 각 구배 후 포획 컬럼을 일련의 250 μ L 주입으로 세척하였다: 1) 10% FA; 2) 30% 트리플루오로에탄올; 3) 80% 메탄올; 4) 66% 이소프로판올, 34% ACN; 5) 80% ACN. 포획 세척 동안 분석용 컬럼을 3회의 신속한 경사 분리로 세정하였다. 이러한 세정 단계는 캐리오버(carryover) 수준이 분석된 각 펩티드에 대해 5% 미만임을 보장하기 위해 필요하였다.

[0653] 고정화된 네펜테신 II 프로테아제를 사용한 샘플 가공처리: POROS 20-AL에 고정화된 네펜테신 II 프로테아제를 온라인 분해 단계를 위해 사용한 것을 제외하고는 전술한 샘플 가공처리를 반복하였다.

[0654] 먼저 교환 및 샘플링 조건이 미결합 상태 및 항체-결합된 상태에 대해 동일하다는 것을 보장하기 위해, 본 발명자들은 먼저 내부 표준 펩티드의 교환 프로파일을 조사하였다. 두 데이터 세트 모두에 대해, PPPI 및 YPI 표준은 리간드 미결합(unliganded) 데이터 세트와 항체-결합된 데이터 세트 간에 일관되어, 조건이 일관되고 미묘한 변화라도 변경된 단백질 구조 및/또는 역학으로 인한 것으로 해석될 수 있음을 보장하였다. 또한, 중수소화 완충제 내로 혼입된 완전히 중수소화된 브라디키닌 펩티드는 동일한 중수소 수준을 나타내어, 역교환 수준이 각 데이터 세트 내의 샘플들 간에 변이가 아님을 보장하였다.

[0655] 항체-결합된 비결합 상태 간의 HDX 동역학의 비교를 사용하여 항체 결합에 대한 반응으로 항원 전체에 걸친 변화를 평가하였다. 펩신 및 네펜테신 II 데이터 세트에 대한 변화의 요약은 도 50 및 도 51에 도시되어 있다. 항체 결합에 대한 반응으로 HDX 동역학에 작은 변화(단일 시점에서의 작은 변화) 또는 큰 변화(2개의 표준 편차를 초과하거나 여러 시점에서 관찰된)가 있었는지 여부에 따라 변화가 1차 서열에 착색되어 표시된다. 본 발명자들은 확실히 거의 동일한 영역을 포괄하는 모든 중첩 펩티드가 일치하도록 하면서, 이러한 비교를 위해 본 발명자들이 반복물들 간에 표준 편차에 의해 평가된 통계학적으로 유의한 변화만을 이용하였음을 주목하고 있다.

[0656] 도 47에 도시된 펩신 데이터 세트에서, 항체 결합 시 증가된 보호를 나타낸 2개의 부위가 있었다. 한 부위는 여러 시점에서 보호의 급격한 증가를 나타낸 글리코펩티드 271 내지 285 및 교환 동역학에서 유의한 감소를 또한 나타내는 C-말단에 인접한 영역 286 내지 299를 포괄하는 여러 펩티드를 포함한다. 두번째 부위는 보호의 약간의 증가를 나타내는 잔기 405 내지 418 내의 3개의 펩티드를 포함한다. 많은 수의 펩티드가 항체 결합 시 가요성의 증가(보다 빠른 교환)를 나타냈다. 가장 눈에 띄는 것은 잔기 125 내지 139 및 479 내지 488이었고, 보다 미묘한 증가는 잔기 887 내지 910 및 918 내지 933에서 관찰되었다.

[0657] 도 48에 도시된 네펜테신 II 데이터 세트는 전체적으로 펩신에서 관찰된 것과 유사한 변화를 나타냈다. 보호의 가장 큰 증가는 잔기 279 내지 286에서 명백하였으며, 상기 잔기의 바로 N-말단 영역(271 내지 278)은 약간의 증가를 나타냈다. 잔기 408 내지 415는 또한 항체 결합 시 보호의 약간의 증가를 나타냈다. 펩신 데이터에서와 같이, 단백질의 큰 부분에 걸쳐 가요성이 증가하였다. 가요성의 가장 큰 증가는 잔기 471 내지 483에서 관찰되었으며 단백질의 더 많은 부분에서 더 작은 변화가 관찰되었다. 이러한 데이터 세트와의 일관성은 OR2805의 에피토프가 잔기 279 내지 285 내에 있고 또한 인접 서열(279 내지 299) 및 잔기 405 내지 418을 포함할 수 있음을 강력하게 나타낸다. HDX-MS에서 관찰되지 않은 다른 영역도 관련될 수 있다.

[0658] 펩신 데이터에서와 마찬가지로, 네펜테신 II 데이터 세트에서도 단백질의 큰 부분에 걸쳐 가요성의 증가가 있었다. 가요성의 가장 큰 증가는 잔기 471 내지 483에서 관찰되었으며, 단백질의 더 많은 부분에 걸쳐 더 작은 변화가 관찰되었다(도 49). 전반적으로, 제안된 에피토프에서 먼 곳에서의 큰 변화는 항체 결합 시 대규모 알로스테릭 효과와 일치한다. 에피토프에서 먼 곳에서의 모든 변화가 더 많이 노출되고 있다는 사실은 항체 결합이 아마도 인접 단백질 도메인과의 상호작용에 영향을 미침으로써 단백질 전체에 걸친 일부 2차 구조를 느슨하게 함을 나타낸다. 바로 N-말단 도메인과 C-말단 도메인 둘다에서 변화가 보인다는 사실은 이 단백질이 본래(리간드 미결합) 입체형태에서 여러 도메인간 상호작용을 가지고 있음을 나타낸다.

[0659] 도 49는 인간 CD163 ECD에 대한 AB101 결합의 효과의 개략적인 요약을 도시한다. AB101의 존재 하에, 도메인 SRCR 3 및 4 내의 영역은 양성자-중수소 교환으로부터 보호되었다. 도메인 3 및 4에서의 교환 감소와 동시에, SRCR 도메인 2, 5 및 9는 AB101 결합 시 용매에 더 많이 노출되었음을 나타내는 증가된 교환을 나타냈다.

[0660] 실시예 23 - AB101은 절두된 인간 CD163 ECD SRCR 도메인 1-5 단편에 결합한다

[0661] 인간 CD163의 세포외 도메인은 SRCR 도메인 5 후에 절두되었고 C-말단 히스티딘 태그를 보유하였다. 이러한 CD163 ECD 단편은 HEK293-6E 세포에서 발현되었고 도 50에 도시된 바와 같이 IMAC 방법을 사용하여 정제되었다.

AB101은 표 10에 나타난 바와 같이 나노몰 이하의 EC50으로 절두된 ECD에 결합하지만, 예상대로 RM3/1은 결합하지 않는다. RM3/1 결합 에피토프는 SRCR 도메인 8 및 9에 맵핑되었다. 절두된 CD163 ECD SRCR 1-5는 HDX-MS에 의해 AB101 결합 에피토프를 함유하는 것으로 식별된 도메인 3 및 4를 함유한다. AB101이 SRCR 1-5에 대한 결합을 유지한다는 것은 HDX-MS 연구의 에피토프 식별 결과를 추가로 뒷받침한다.

표 10

절두된 CD163 ECD SRCR 1-5에 대한 AB101, RM3/1, EDHu-1, 및 215927 결합의 EC50 값

EC50 (nM)				
항원	AB101 R11	RM3/1	EDHu-1	215927
huCD163 ECD	0.26	0.061	0.052	0.017
huCD163 SRCR 1-5	0.76	---	0.050	0.020
비 SRCR 1-5 / ECD	2.9	---	0.96	1.17

[0662]

[0663]

실시예 24 - AB101은 인간 재조합 CD163 ECD 단백질에 결합하지만 시노물구스 재조합 CD163 ECD 단백질에는 결합하지 않으며, 시노물구스 CD163 ECD에서 단일 점 돌연변이, E323K는 인간 CD163 ECD와 동등한 AB101 결합을 부여한다

[0664]

실시예 6에서, 플라스틱에 고정화된 재조합 CD163 단백질을 사용한 ELISA 분석을 사용하였을 때, 재조합 인간에 대한 AB101 결합은 26가지의 개별 실험의 14-포인트 용량-반응 곡선으로부터 0.52 nM의 기하 평균 EC50 값을 갖는 것으로 결정되었다. AB101은 재조합 뮤린 CD163에 대한 결합을 나타내지 않은 반면, 상업적으로 입수가능한 래트 항-muCD163(Thermo Fisher Scientific #14-1631-82) 항체는 예상대로 결합하였다.

[0665]

AB101이 뮤린 CD163에 결합하지 못하고 인간 CD163과 낮은 아미노산 서열 동일성(72.9%)의 결과로서, 전임상 독성 연구에서 종종 사용되는 제2 종, 즉 비인간 영장류(NHP) 시노물구스에 초점이 맞추어졌다. 시노물구스 CD163은 인간 CD163과 96.5% 아미노산 서열 동일성을 공유한다. HEK293-6E 세포에서 C-말단 8 히스티딘 태그를 갖는 인간 및 시노물구스 CD163 ECD의 생산은 7일차 일시적 형질감염 CM의 L당 정제된 단백질 약 1 내지 2 mg을 산출하였다. 도 51은 인간 CD163 단백질 및 시노물구스 CD163 단백질의 정렬을 도시한다.

[0666]

CD163 상의 결합 에피토프 및 인간 CD163과 시노물구스 CD163 간의 유의한 서열 동일성을 식별해주는 HDX-MS 결과와 AB101이 시노물구스 CD163에 결합하지 않는다는 지식을 갖추으로써, AB101 결합에 연루된 SRCR 도메인 3 내의 주요 잔기를 식별할 수 있었다. 인간 CD163에서 위치 323의 리신 잔기는 독성 연구를 위해 고려되는 모든 잠재적인 비-인간 종에서 글루탐산 잔기이다(도 51). 이 위치는 HDX-MS에 의해 정의된 SRCR 도메인 3의 AB101 결합 에피토프 내의 중앙에 있다. 위치 323에서 시노물구스 글루탐산의 리신으로의 부위-지정 돌연변이유발은 인간 CD163 ECD에 대한 AB101 결합의 EC50에 가까운 EC50으로 시노물구스 CD163 ECD에 대한 AB101 결합을 부여한다(도 52). 이러한 기능 증가의 결과는 AB101 결합 에피토프에서 위치 323의 리신을 강력하게 시사한다.

[0667]

실시예 25 - SPR에 의한 인간 CD163에 대한 AB101의 결합 친화도

[0668]

표면 플라즈몬 공명(SPR) 측정을 사용하여 상이한 실험 완충제 조건에서 인간 CD163에 대한 AB101 및 항-CD163 클론 GHI/61 결합(AB101 결합력 측정)을 결정하였다.

[0669]

인간 CD163에 대한 AB101 및 항-CD163 클론 GHI/61의 결합의 SPR 분석은 Biacore T200 기기(GE Healthcare Life Sciences)를 사용하여 수행하였다. 정제된 재조합 CD163 단백질을 아민 커플링 키트(GE Healthcare Life Sciences)를 사용하여 칩(Serie S-type CM5) 상에 직접 고정화하였다. pH 선별(10 mM 나트륨 아세테이트 pH 5.5/5.0/4.5/4.0)을 수행하여 아민 커플링 고정화에 적합한 농도 및 pH를 결정하였다. 나트륨 아세테이트(pH 5.5)가 CD163이 센서 칩 CM5에 커플링하기 위한 최상의 조건으로 선택되었다. CM5 칩에 커플링하는 CD163 단백질의 양은 80 RU(0.08 ng/mm²)였다.

[0670]

실험에 사용된 실험 완충제: 완충제(1) 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3.0 mM EDTA, 및 0.05% Tween 20, pH 7.4 또는 완충제; 완충제(2) 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3.0 mM CaCl₂, 1.0 mM EGTA 및 0.005% Tween 20, pH 7.4.

[0671]

MAb를 실험 완충제에 용해시켰다. AB101의 경우, 30 µl/분의 유속, 6.25/12.5/25/50/100/200 µg/mL의 농도,

접촉 시간 300초, 및 해리 시간 600초를 사용하여 센서그램을 생성하였다. GHI/61의 경우, 30 μ l/분의 유속, 3.125/6.25/12.5/25/50/100 μ g/mL의 농도, 접촉 시간 300초 및 해리 시간 600초를 사용하여 센서그램을 생성하였다. 유동 셀을 10 mM 글리신-HCl, pH 3.0(GE Healthcare Life Sciences)으로 재생시켰다. 데이터 분석은 Biacore T200 컴퓨터 상에서 Biacore T200 평가 소프트웨어를 이용하여 수행하였다.

인간 CD163에 대한 GHI/61 및 기타 항-CD163 항체의 결합은 유리 칼슘에 의존성인 것으로 나타났다. GHI/61은 칼슘 함유 완충제보다 칼슘 무함유 완충제에서 CD163에 대한 친화도가 더 높았다. AB101 결합이 칼슘 의존성인지의 여부를 결정하기 위해, 본 발명자들은 2 mM 칼슘 함유 완충제 또는 칼슘 무함유 EDTA 완충제에서 고정화된 인간 CD163에 대한 AB101 결합의 SPR 측정을 수행하였다. 표 11 및 도 53에 나타난 바와 같이, AB101은 칼슘 무함유 EDTA 완충제(K_D = 89 nM)에서의 2배 더 약한 결합력과 관련하여 칼슘 함유 완충제에서 45 nM의 K_D 로 더 강한 결합 결합력을 가졌다. 대조적으로, SPR 측정은 칼슘 함유 완충제 및 EDTA 완충제에서 CD163에 대한 GHI/61 결합에 대해 각각 63 nM 및 12 nM의 K_D 값을 관찰하였다(도 54 및 표 11).

표 11

고정화된 인간 CD163 에 대한 항체의 SPR 결합 결과

고정화된 인간 CD163 에 대한 항체의 결합						
완충제	AB101			GHI/61		
	K_D [nM]	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	K_d [s^{-1}]	K_D [nM]	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	K_d [s^{-1}]
칼슘	45	1.678×10^4	7.544×10^{-4}	63	0.732×10^4	4.668×10^{-4}
EDTA	89	1.280×10^4	11.39×10^{-4}	12	1.476×10^4	1.783×10^{-4}

SPR 결과는 이전에 보고된 GHI/61 발견을 확인시켜 주었고 AB101이 인간 CD163에 대한 최적의 결합을 위해 생리학 적 칼슘 농도를 요구할 수 있음을 나타냈다.

다음으로, 본 발명자들은 칼슘 함유 완충제에서 고정화된 AB101에 대한 CD163 결합 친화도의 SPR 측정을 수행하고 12 nM의 K_D 를 관찰하였다(도 55 및 표 12). 고정화된 AB101에 대한 CD163 결합은 고정화된 CD163에 대한 AB101 결합의 상응하는 $K_a(1.678 \times 10^4 M^{-1}s^{-1})$ 와 비교할 때 $6.213 \times 10^4(M^{-1}s^{-1})$ 의 3.7배 더 높은 k_a 를 가졌다.

표 12

고정화된 AB101 에 대한 인간 CD163 의 SPR 결합 결과

AB101 에 대한 인간 CD163 결합			
완충제	K_D [nM]	k_a [$M^{-1}s^{-1}$]	K_d [s^{-1}]
칼슘	12	6.213×10^4	7.895×10^{-4}

요약하면, SPR 측정은 2 mM 유리 칼슘의 존재 하에 CD163에 대한 AB101의 12 nM 결합 친화도 및 45 nM 결합력을 결정하였다.

실시예 26 - AlphaLISA에 의한 용액 중 인간 CD163 단백질에 대한 AB101 결합

용액 중 인간 CD163에 대한 AB101의 결합 친화도를 AlphaLisa 분석에 의해 결정하였다.

분석은 C-말단에 10-히스티딘 태그를 갖는 인간 가용성 CD163, 비오틴화된 항-hIgG1, 스트렙타비딘 수용기 비드 및 니켈 공여기 비드로 구성된다.

1500 nM을 시작 적정 농도로 하여 Ca^{2+} , Mg^{2+} 가 없는 1X PBS 중 0.5% BSA에 AB101 및 이소형 대조군을 연속적으로 희석하여 분석을 수행하였다. CD163을 동일한 완충제에 1500 nM의 농도로 희석하였다.

- [0682] 인간 CD163에 대한 AB101의 결합. AB101 또는 이소형 대조군 연속 희석액을 5 μ l/웰의 용적으로 5 μ l/웰의 인간 CD163에 첨가하고 알루미늄 플레이트 밀봉기로 밀봉하고 실온에서 1시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하였다.
- [0683] AB101의 검출: AB101은 10 μ l 결합 믹스에 대해 5 μ l/웰의 용적에서 1X AlphaLISA 면역분석 분석 완충제 중의 2.5 nM 비오틴화된 항-인간 IgG1 항체를 사용하여 검출하였다. 플레이트를 밀봉하고 실온에서 1시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하였다.
- [0684] 수용기 비드의 결합: 항체 검출 단계 후, 1X AlphaLISA 면역분석 분석 완충제 중의 5 μ l의 100 μ g/mL 스트렙타 비딘 수용기 비드를 각 웰에 첨가한 후, 플레이트를 밀봉하고 실온에서 1시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하였다.
- [0685] 공여기 비드의 결합: 다음으로, 1X AlphaLISA 면역분석 분석 완충제 중의 5 μ l의 100 μ g/mL 니켈 공여기 비드를 웰마다 첨가한 후, 플레이트를 밀봉하고 실온에서 1시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하였다.
- [0686] Envision 플레이트 판독기를 제조업체 프로토콜에 따라 사용하여 플레이트를 판독하고, GraphPad Prism 8을 사용하여 데이터를 분석하여 K_d 를 계산하였다.
- [0687] CD163에 대한 AB101 결합의 AlphaLISA 측정은 30 nM의 AB101에서 포화에 도달하였다(도 56). 5회의 독립적인 측정을 조합하는 1-부위 포화 결합 모델에 의해 1.8 nM의 K_d 가 결정되었다(표 13). 2-부위 포화 결합 모델은 더 낮은 AB101 농도에 대해 더 나은 곡선 맞춤을 제공하였다.

표 13

가용성 CD163 단백질에 대한 AB101 결합의 AlphaLISA 측정

가용성 CD163에 대한 AB101 결합			
독립적 분석	1-부위 결합 모델		
	EC ₅₀ [nM]	Max	R ²
1	4.1	31000	0.99
2	1.5	37000	0.97
3	1.9	52000	0.98
4	1.7	48000	0.99
5	0.51	44000	0.98
평균	1.9	42400	
SD	1.3	8444	
기하 평균	1.6	41692	

- [0688]
- [0689] 실시예 27 - M2c 대식세포에 대한 AB101의 결합
- [0690] 세포 상에 발현된 CD163에 대한 AB101의 결합 동역학을 결정하기 위해, 본 발명자들은 4명의 연구 대상체로부터의 면역억제성 M2c 대식세포를 사용하여 결합 연구를 수행하였다.
- [0691] M2c 대식세포에 대한 AB101 결합은 4명의 건강한 인간 대상체(39세 여성, 24세 남성, 39세 남성 및 54세 남성)로부터 평가하였다. 혈액구는 BloodWorks에서 구입한 LeukoPak로부터 분리하였다.
- [0692] 7일차에, M2c 세포를 대식세포 탈착 용액 DXF에서 실온에서 15분 동안 인큐베이션하고 플라스크로부터 제거하여 X-VIVO-15TM 배지에 넣었다. 원심분리 후, 세포를 PBS로 1회 세척하고 실온에서 20분 동안 Zombie UV 생존/사멸 염색(1:500)에 재현탁하였다. 그 다음, 세포를 FACS 완충제로 세척하고 실온에서 20분 동안 FACS 블록(10% FBS 및 0.5 mg/ml 인간 IgG1을 함유하는 FACS 완충제)에 재현탁하였다. 차단 완충제 중의 세포를 2.5×10^4 개 세포/웰로 384웰 플레이트로 옮기고, 적정된 항체를 2X 최종 분석 농도에서 각 웰에 직접 첨가하였다. 세포를 실온에서 20분 동안 항체와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 FACS 완충제로 3회 세척한 다음, Symphony 유세포분석기(BD Biosciences)에서 획득을 위해 FACS 완충제에 재현탁하였다.
- [0693] M2c 대식세포에 대한 AB101 결합은 이중모드 결합 곡선(도 57)을 나타냈고, 이는 Fc 수용체에 대한 AB101 결합

이 M2c 세포 상에 발현된 CD163에 대한 결합에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 1-부위 특이적 포화 결합 곡선에서 AB101에 대해 계산된 K_d 값은 표 14에 나타난다. 1-부위 모델에 의해 계산된 CD163에 대한 AB101 결합의 K_d 값은 7.7 nM이었고 Bmax는 46103 gMFI였다($R^2=0.91$). 2-부위 곡선 맞춤 모델링은 더 우수한 곡선 맞춤을 제공하였다($R^2=0.98$).

표 14

인간 M2c 대식세포에 대한 AB101 결합의 평형 결합

AB101의 결합 동역학			
인간 대상체 ID	1-부위 결합 모델		
	K_d [nM]	Bmax	R^2
W	7.2	45800	0.93
X	6.6	41700	0.91
Y	8.1	45400	0.91
Z	8.9	51513	0.93
평균	7.7	46103	
SD	1.0	4051	
기하 평균	7.7	45972	

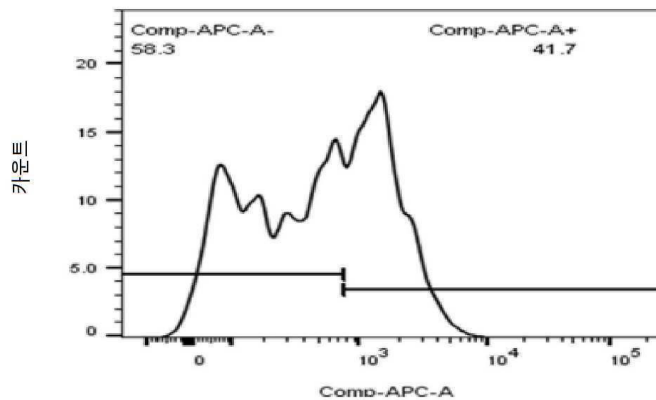
[0694]

[0695]

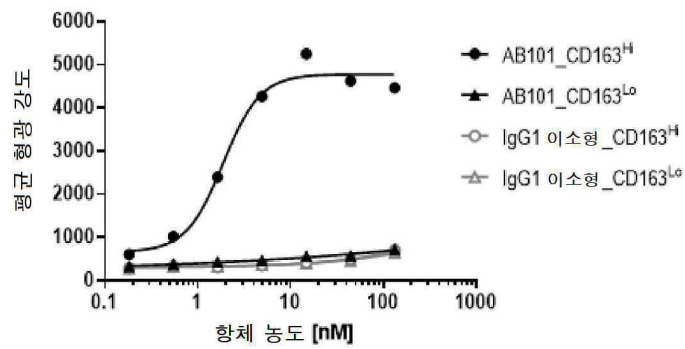
본 개시내용 및 이의 이점이 상세하게 설명되었지만, 첨부된 청구범위에 정의된 개시내용의 취지 및 범위를 벗어남이 없이 다양한 변경, 대체 및 개조가 본원에서 행해지는 것으로 이해되어야 한다.

도면

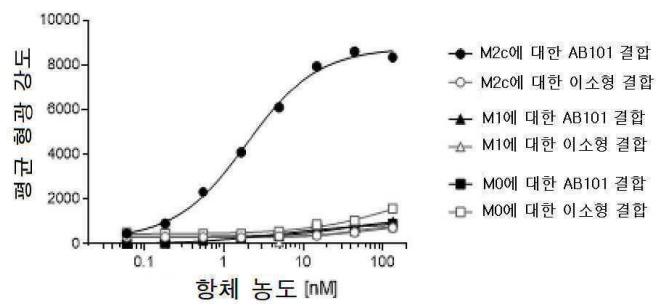
도면1



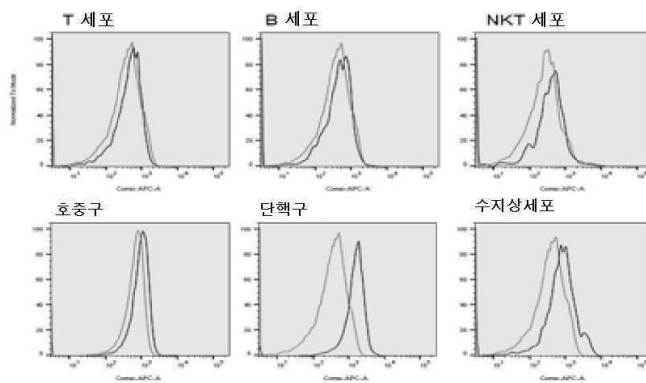
도면2



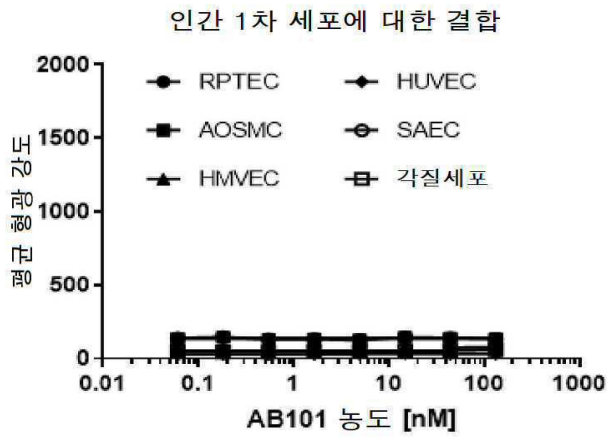
도면3



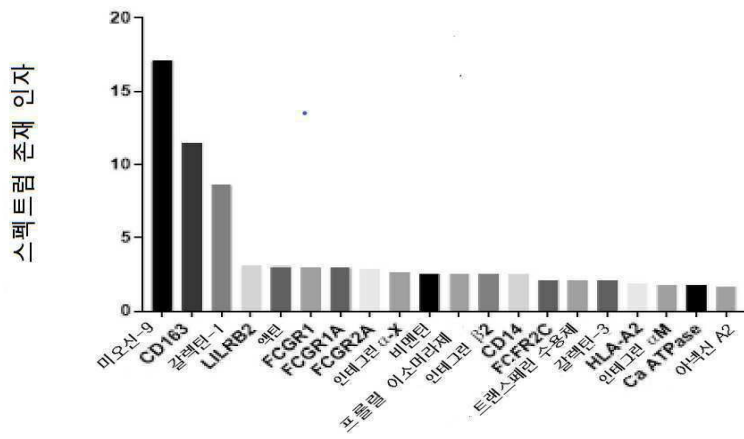
도면4



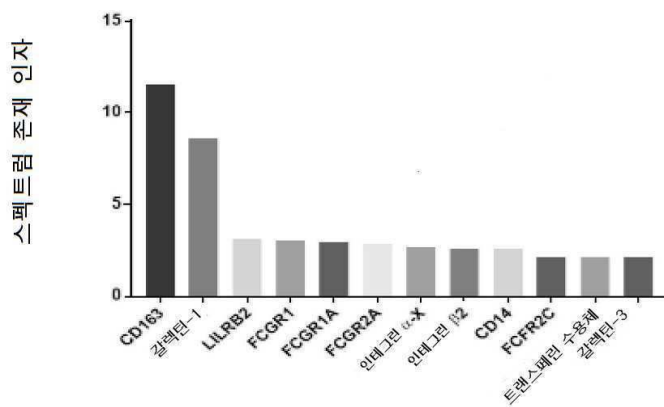
도면5



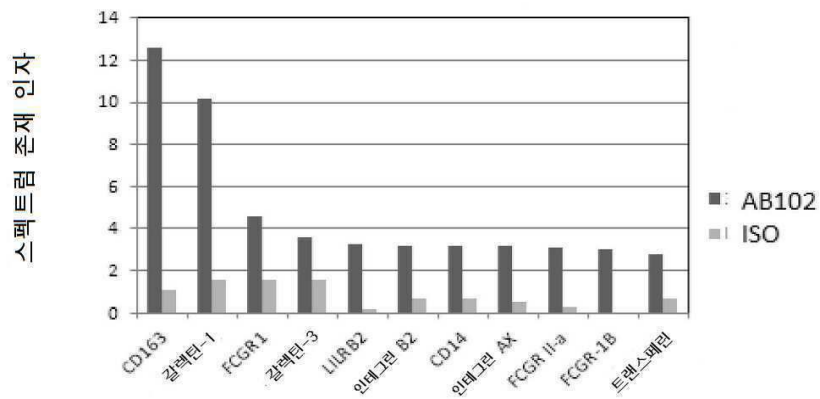
도면6a



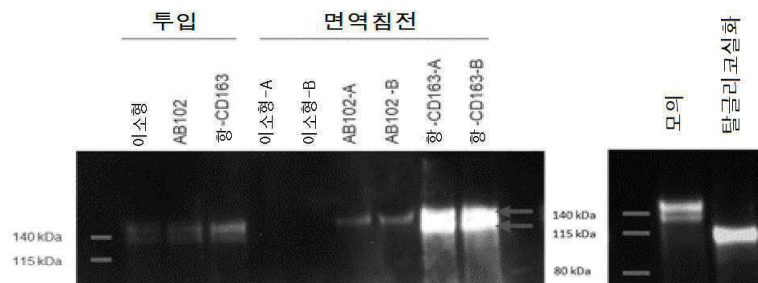
도면6b



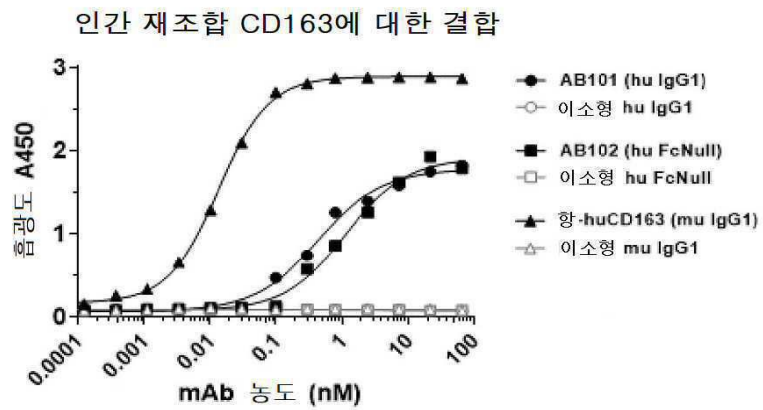
도면6c



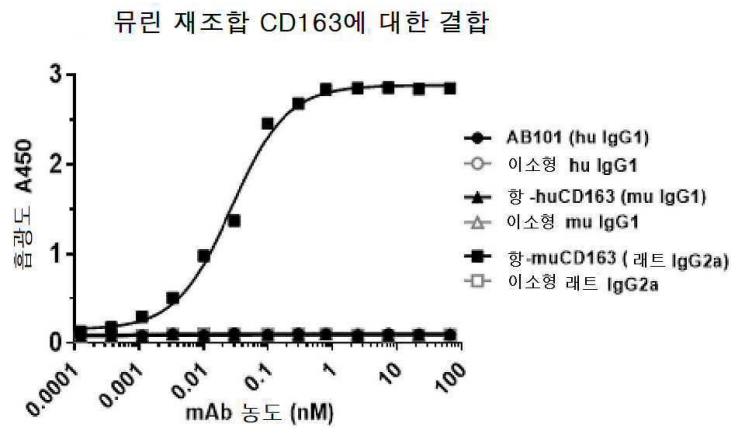
도면7



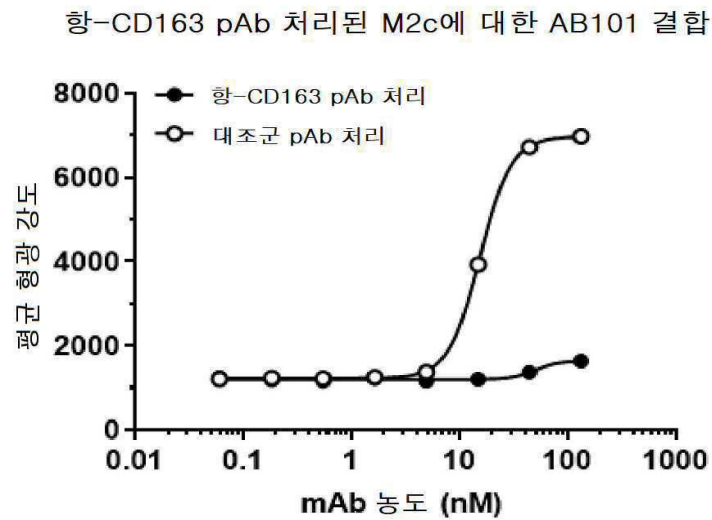
도면8



도면9

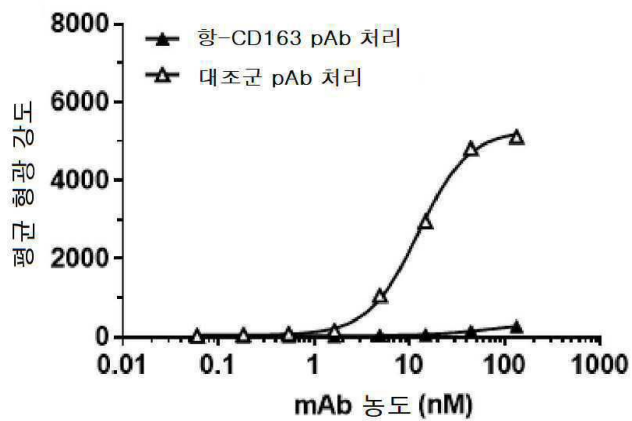


도면10

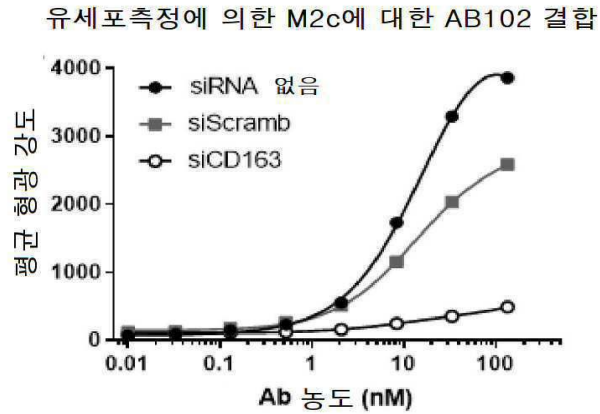


도면11

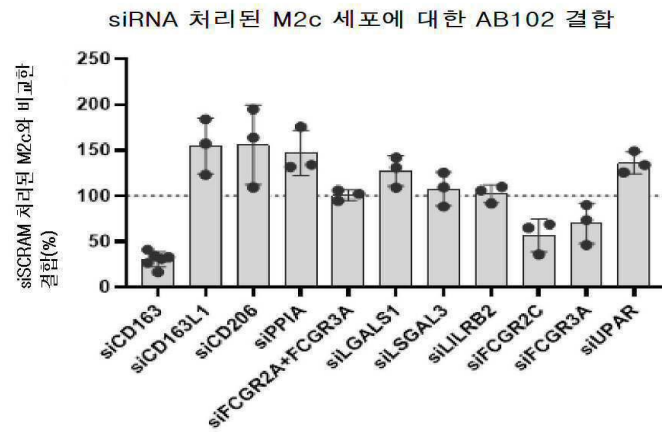
항-CD163 pAb 처리된 M2c에 대한 항-huCD163 mAb 결합



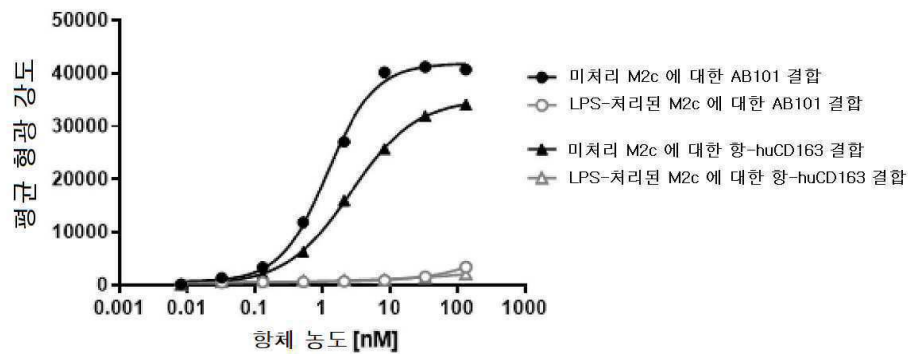
도면12



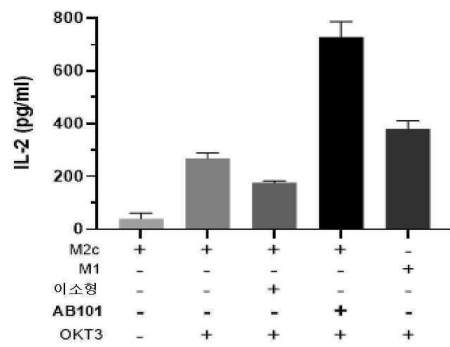
도면13



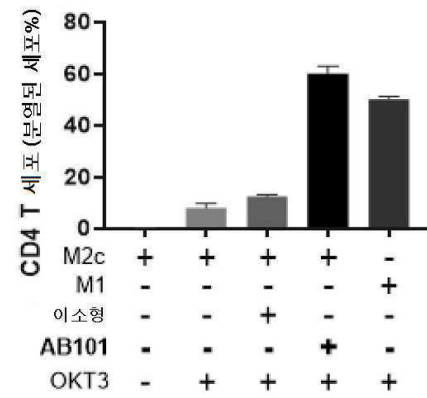
도면14



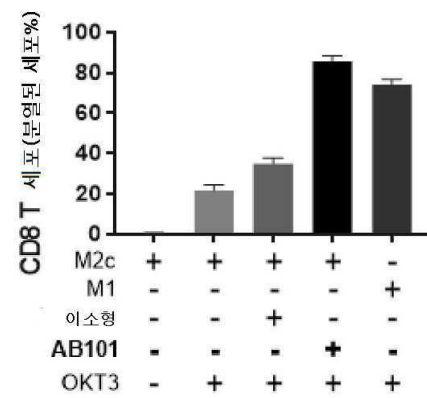
도면15



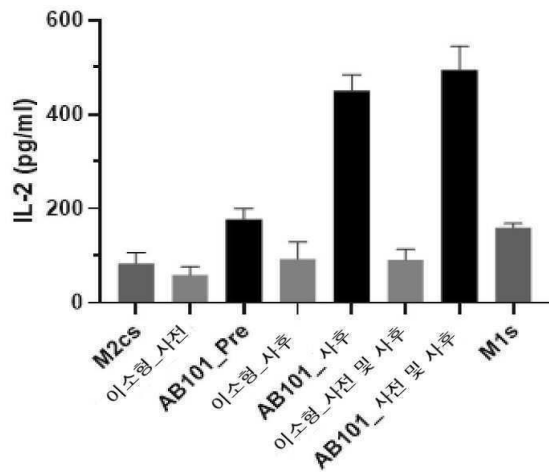
도면16



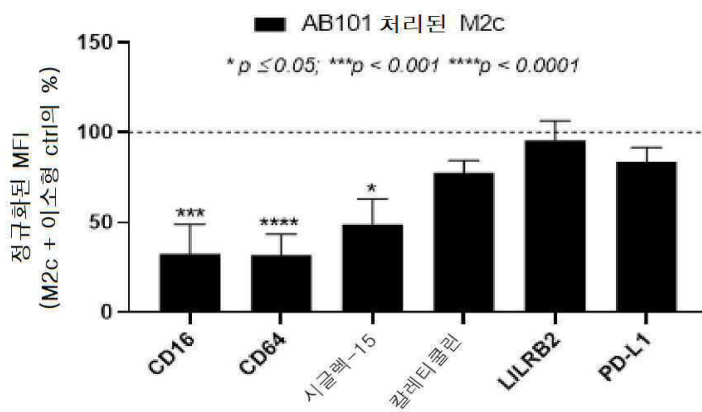
도면17



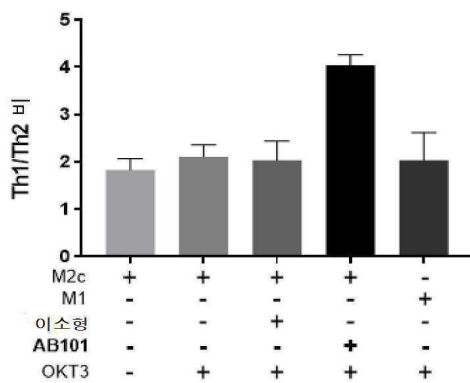
도면18



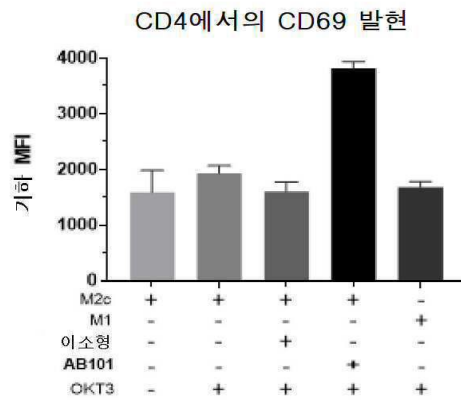
도면19



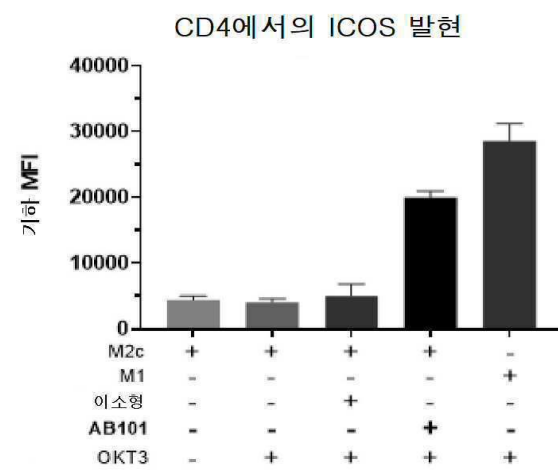
도면20



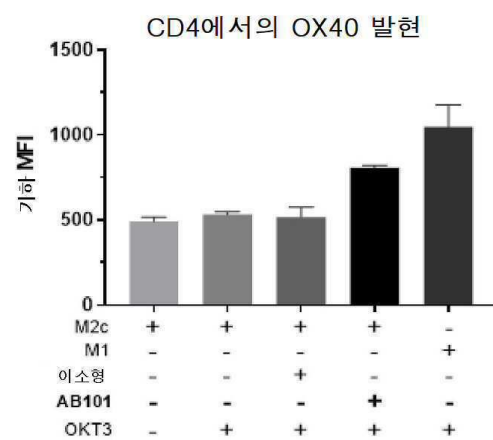
도면21



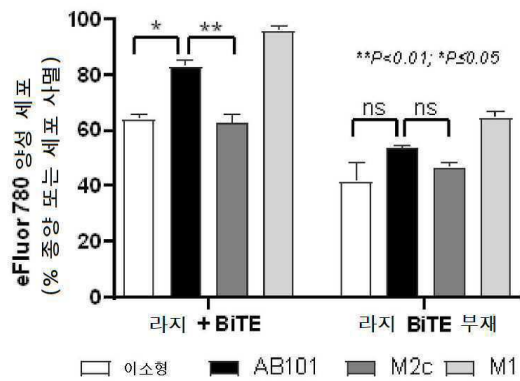
도면22



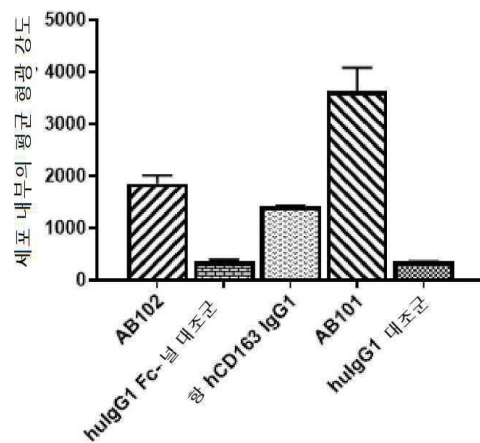
도면23



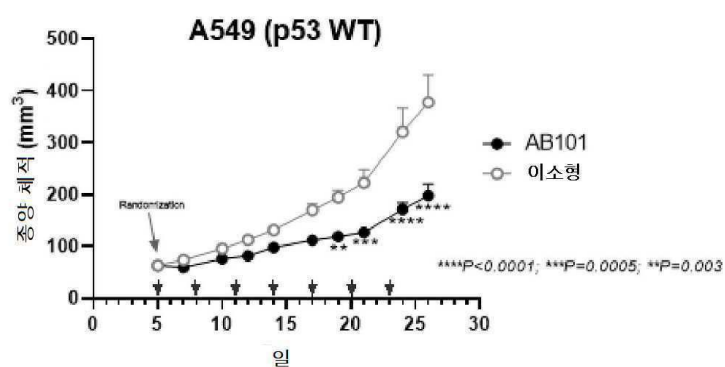
도면24



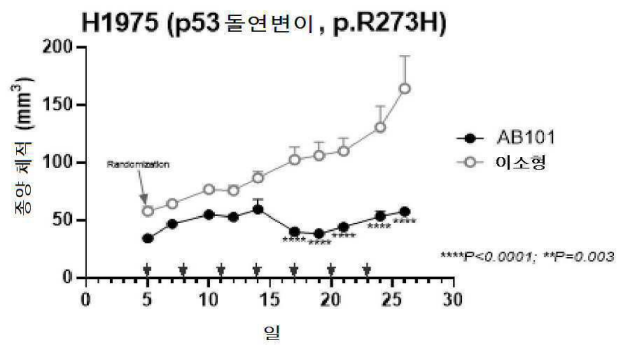
도면25



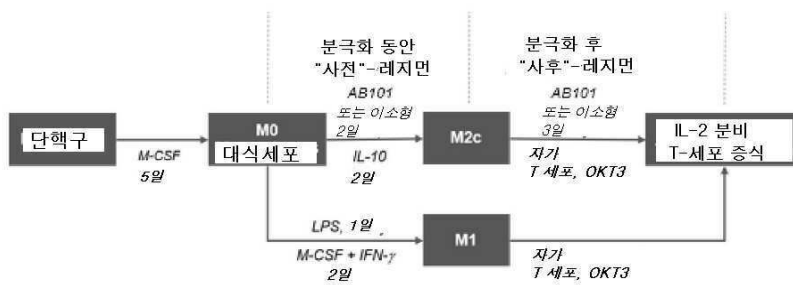
도면26



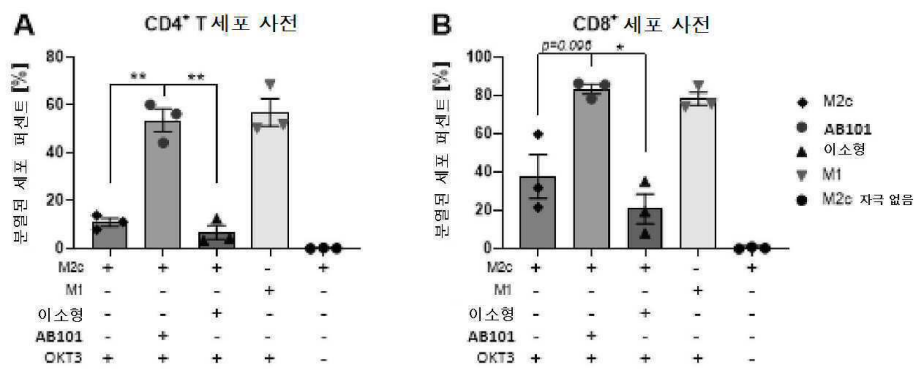
도면27



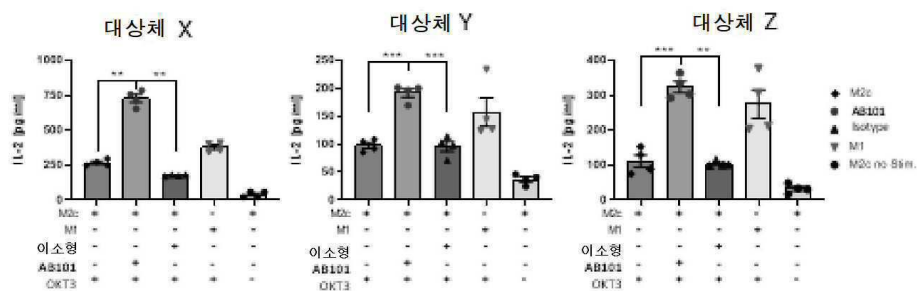
도면28



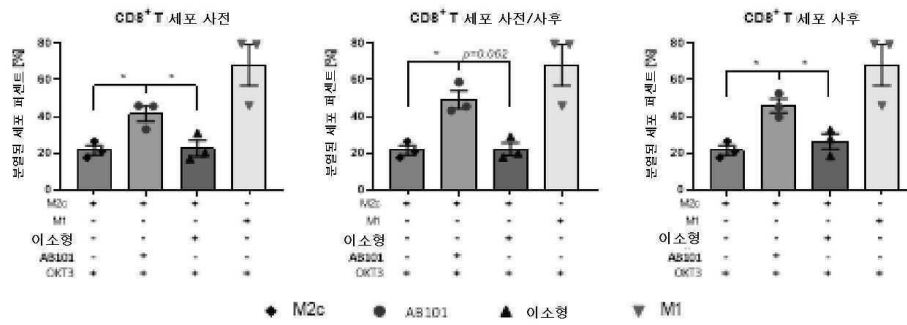
도면29



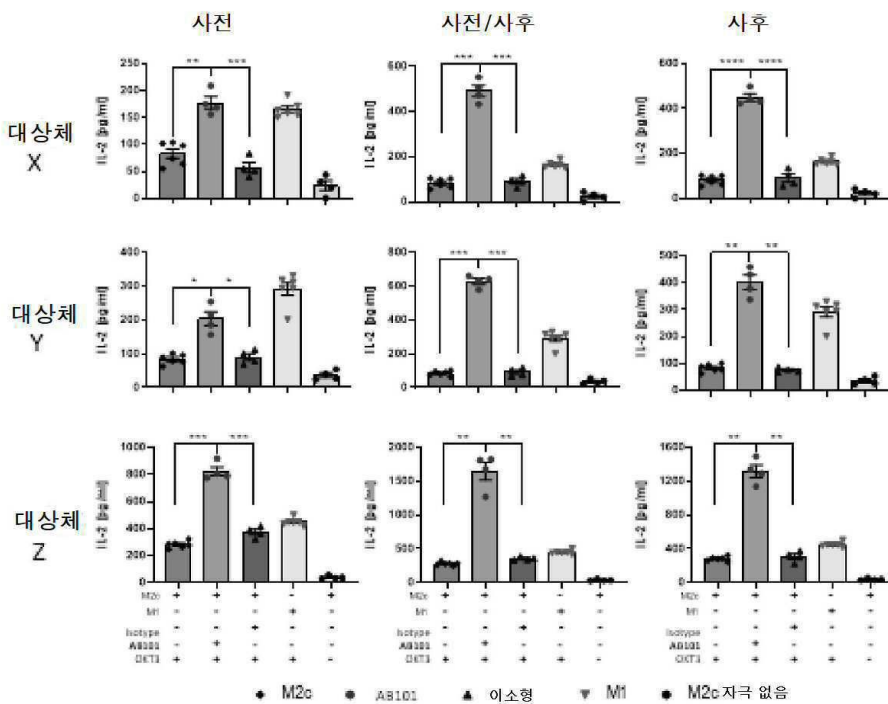
도면30



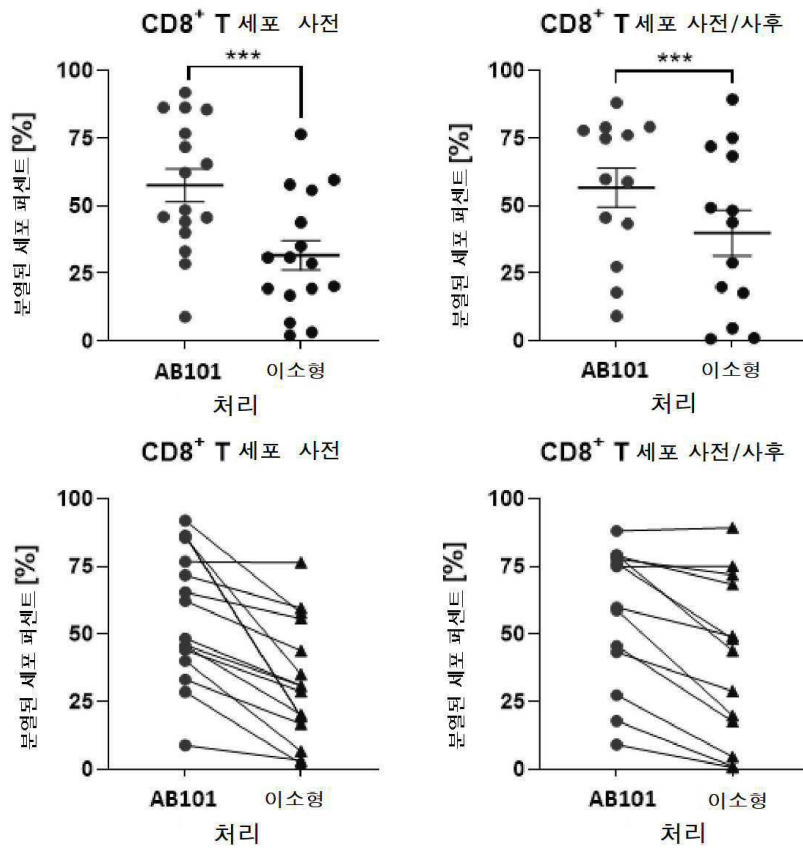
도면31



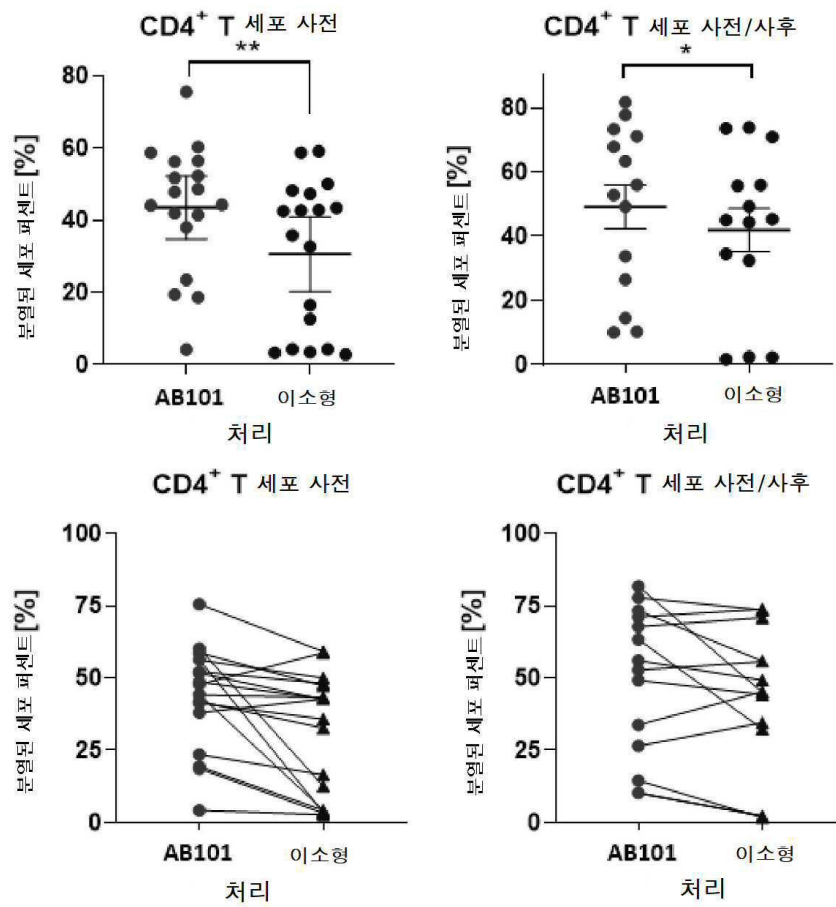
도면32



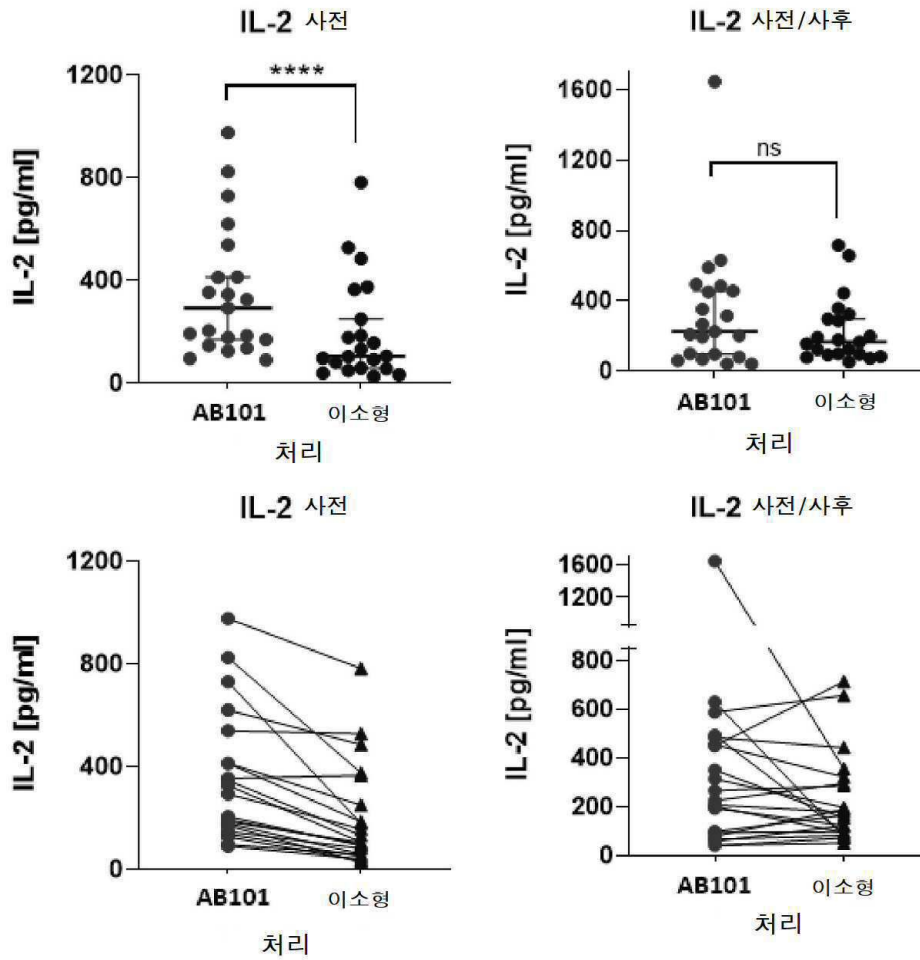
도면33



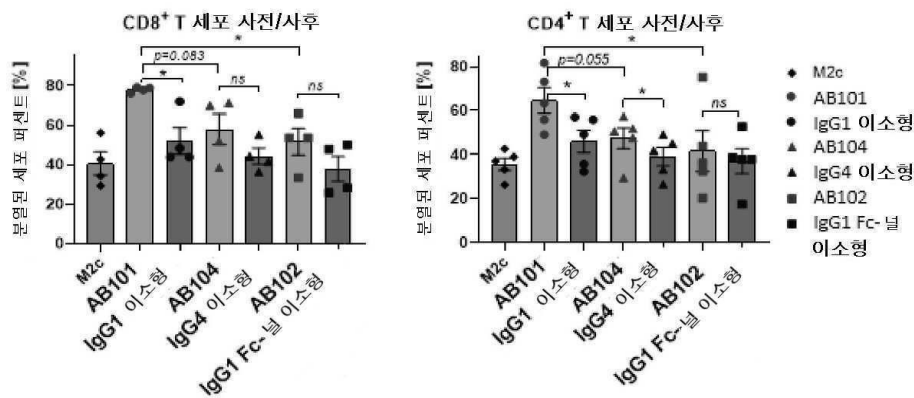
도면34



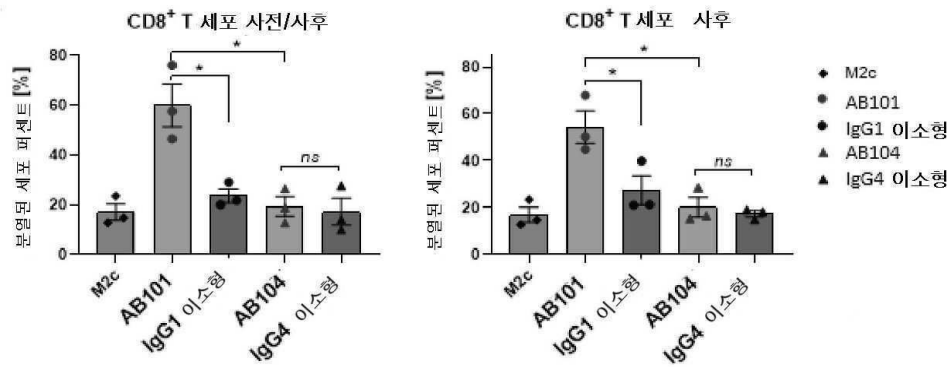
도면35



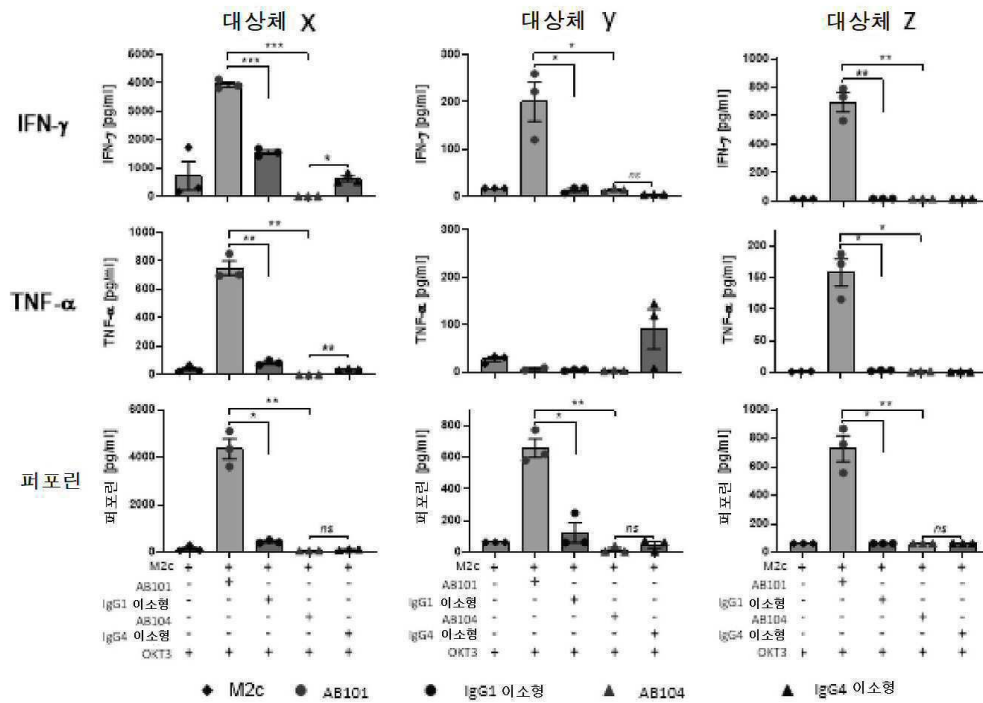
도면36



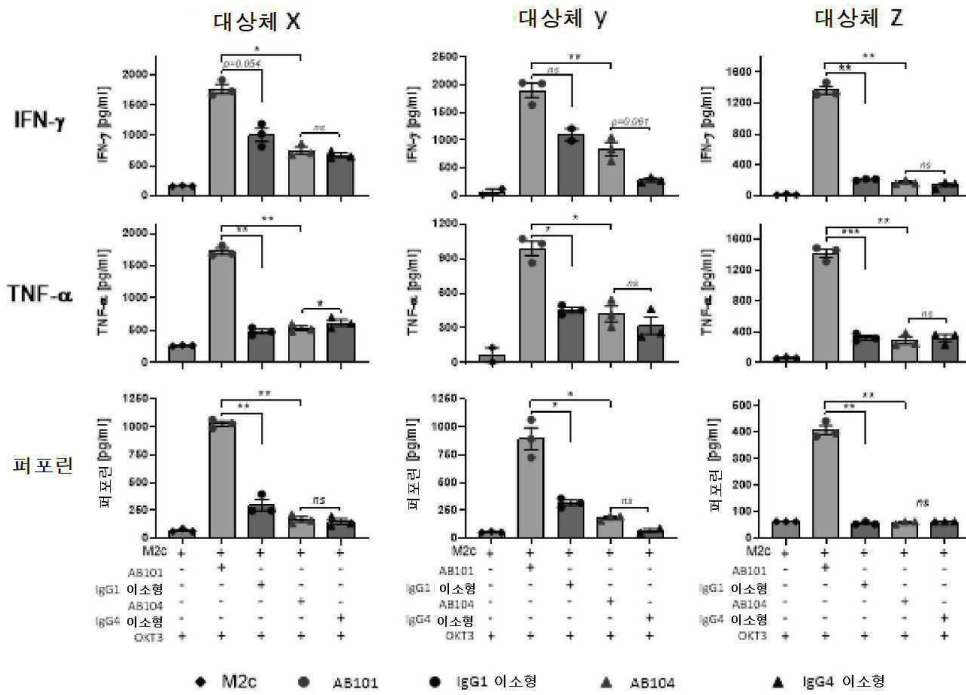
도면37



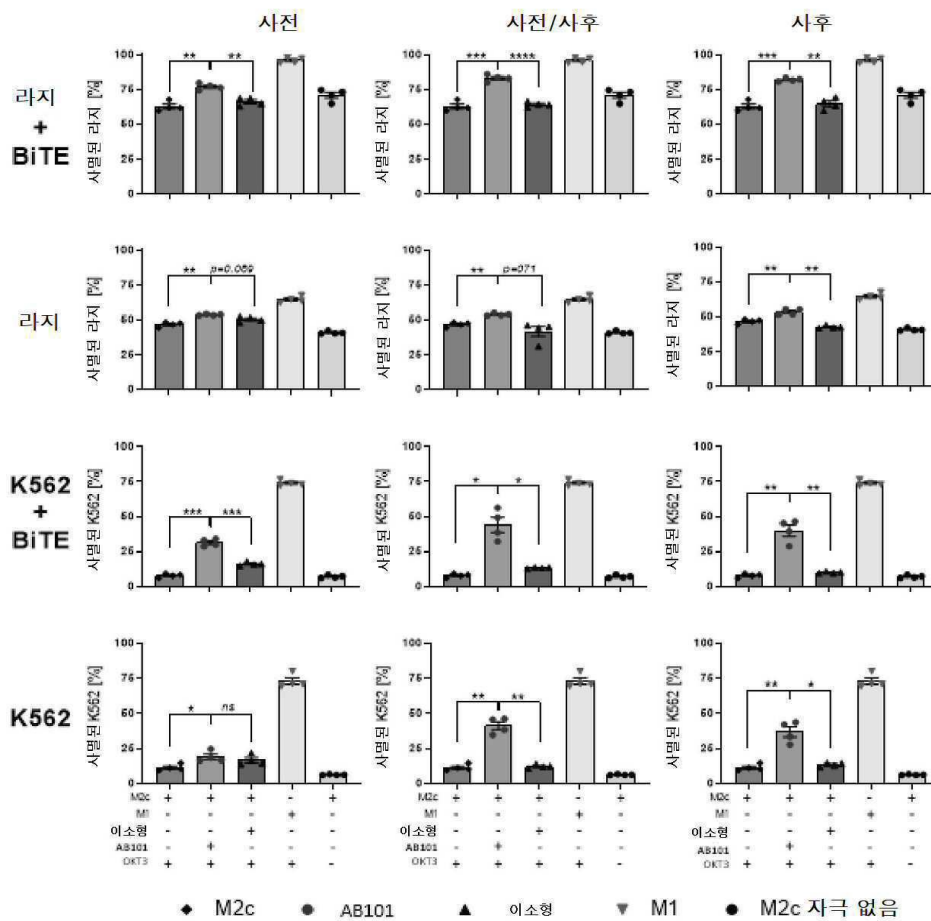
도면38



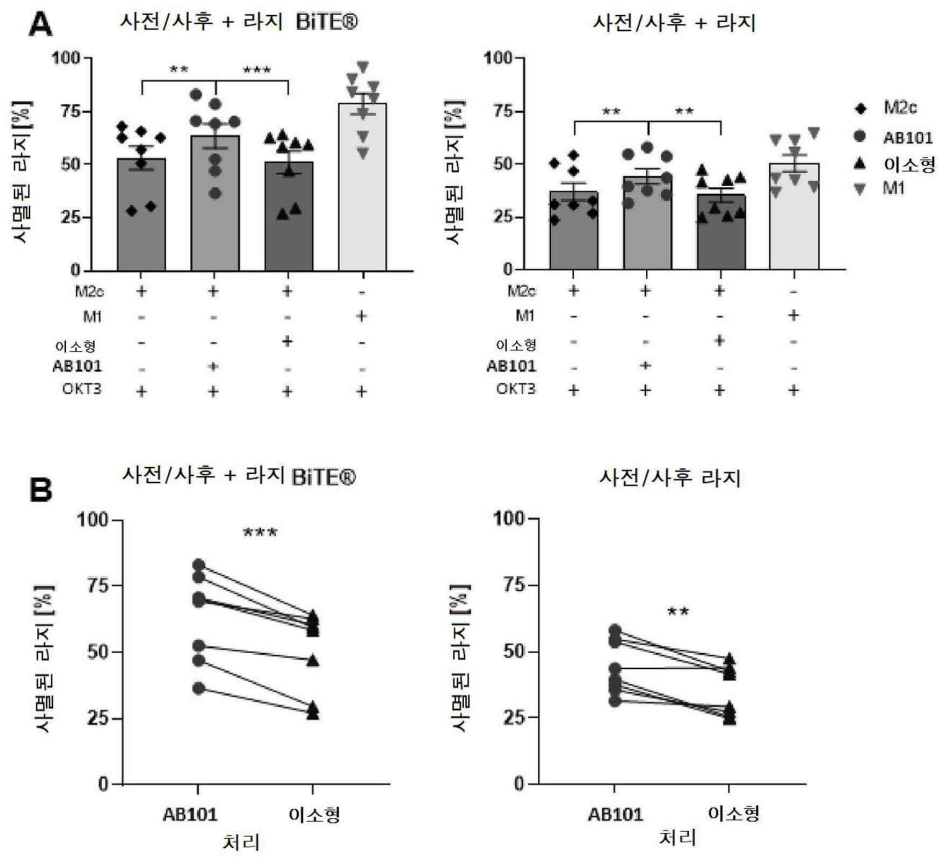
도면39



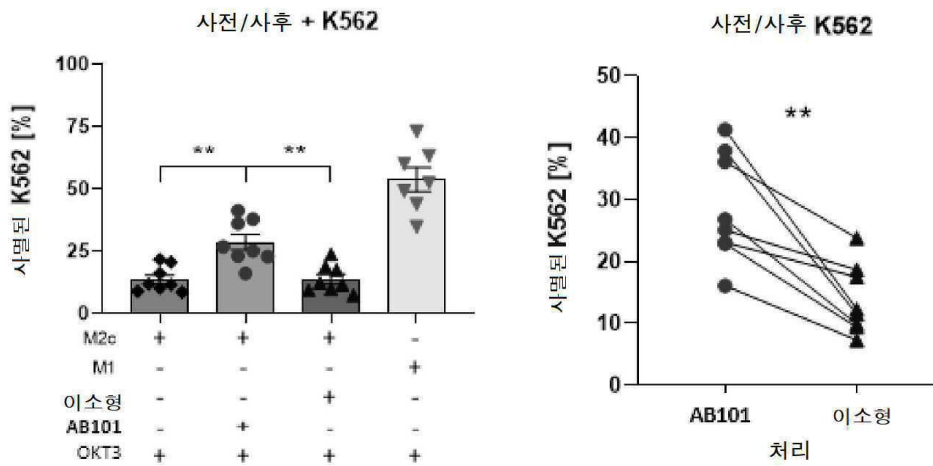
도면40



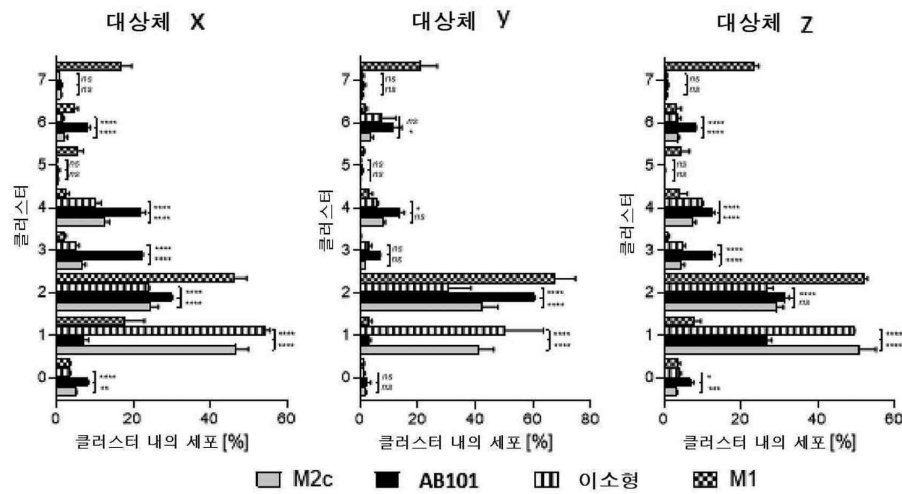
도면41



도면42

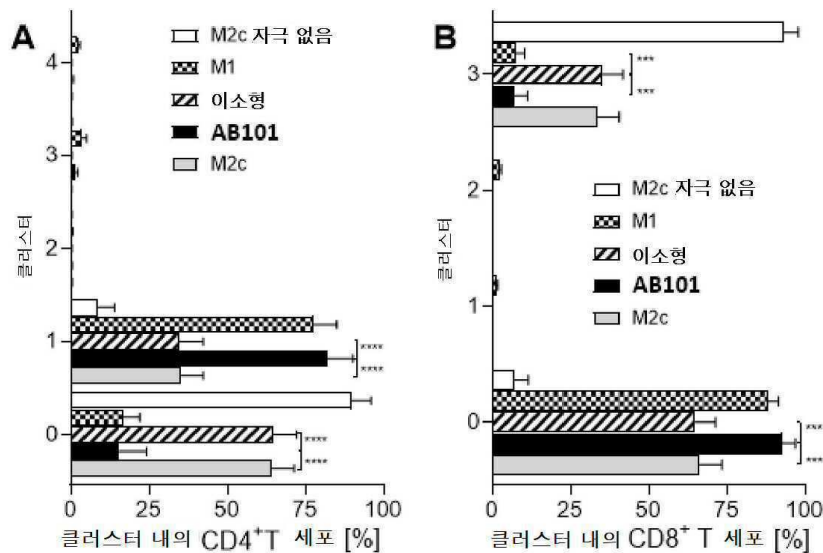


도면43



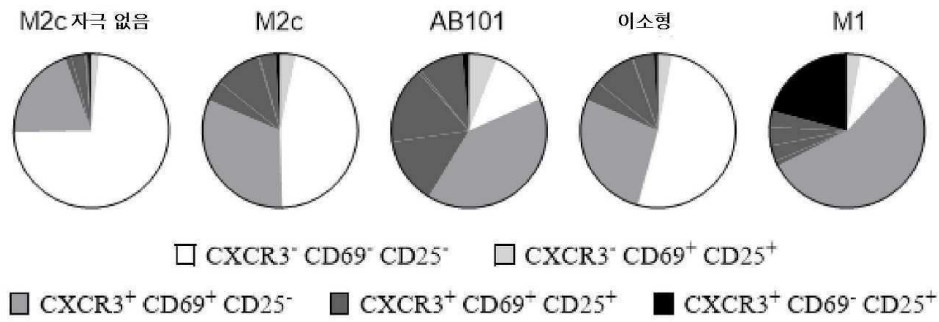
FlowSOM 클러스터	표현형	CD4 ⁺ T 세포 상태
1	CD127 ⁺ , CCR6 ⁻ , CD25 ⁻ , CCR4 ⁻ , CXCR3 ⁻ , CD69 ⁻	휴지
0	CD127 ⁺ , CCR6 ⁻ , CD25 ^{lo} , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ^{lo}	활성화
2	CD127 ⁺ , CCR6 ⁻ , CD25 ⁻ , CCR4 ⁻ , CXCR3 ⁺ , CD69 ^{lo}	활성화
3	CD127 ⁺ , CCR6 ⁺ , CD25 ⁺ , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺	활성화
4	CD127 ⁺ , CCR6 ⁻ , CD25 ^{lo} , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ^{lo}	활성화
5	CD127 ⁻ , CCR6 ^{lo} , CD25 ^{hi} , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺	활성화
6	CD127 ⁻ , CCR6 ⁻ , CD25 ^{lo} , CCR4 ⁻ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺	활성화
7	CD127 ⁻ , CCR6 ⁻ , CD25 ^{hi} , CCR4 ⁺ , CXCR3 ⁺ , CD69 ⁻	활성화

도면44



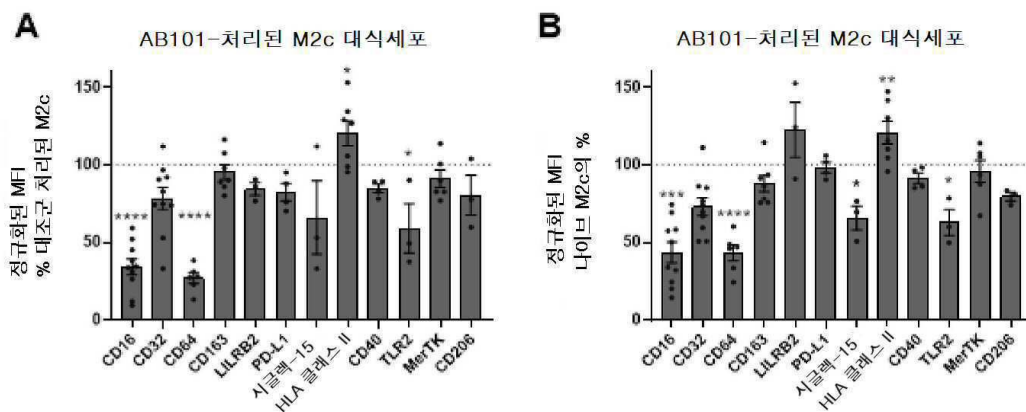
FlowSOM 클러스터	CD4 ⁺ T 세포 표현형	FlowSOM 클러스터	CD8 ⁺ T 세포 표현형
0	ICOS ⁺ , PD-1 ⁻ , LAG3 ⁻ , CTLA-4 ⁻ , OX40 ⁻	0	ICOS ^{hi} , PD-1 ⁺ , LAG3 ^{lo} , CTLA-4 ⁻ , OX40 ^{lo}
1	ICOS ^{hi} , PD-1 ⁺ , LAG3 ⁻ , CTLA-4 ⁻ , OX40 ^{lo}	1	ICOS ^{hi} , PD-1 ⁺ , LAG3 ⁺ , CTLA-4 ^{hi} , OX40 ^{lo}
2	ICOS ⁻ , PD-1 ⁺ , LAG3 ^{lo} , CTLA-4 ⁺ , OX40 ⁺	2	ICOS ^{hi} , PD-1 ^{lo} , LAG3 ⁺ , CTLA-4 ^{lo} , OX40 ^{lo}
3	ICOS ^{hi} , PD-1 ⁺ , LAG3 ⁺ , CTLA-4 ⁻ , OX40 ^{lo}	3	ICOS ^{lo} , PD-1 ⁻ , LAG3 ⁻ , CTLA-4 ⁻ , OX40 ⁻
4	ICOS ^{hi} , PD-1 ⁺ , LAG3 ^{lo} , CTLA-4 ⁺ , OX40 ⁺		

도면45



CD4 ⁺ T 세포 상태	CXCR3	표현형	FlowSOM 클러스터
	발현		
휴지	아니오	CXCR3 ⁻ , CD69 ⁻ , CD25 ⁻	1
활성화	아니오	CXCR3 ⁻ , CD69 ⁺ , CD25 ⁻	0
활성화	예	CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺ , CD25 ⁻	2
활성화	예	CXCR3 ⁺ , CD69 ⁺ , CD25 ⁺	3-6
활성화	예	CXCR3 ⁺ , CD69 ⁻ , CD25 ⁺	7

도면46



도면47

10	20	30	40	50	60
GTDKELRLVD	GENKCSGRVE	VKVQEEWGT	CNNGWSMEAV	SVICNQLGCP	TAIKAPGWAN
70	80	90	100	110	120
SSAGSGRIWM	DHVSCRGNES	ALWDCKHDGW	GKHSNCTHQ	DAGVTCSDGS	NLEMRLTRGG
130	140	150	160	170	180
NMCSGRIEIK	FQGRWGTCD	DNFNIDHASV	ICRQLECGSA	VSFSGSSNFG	EGSGPIWFDD
190	200	210	220	230	240
LICNGNESAL	WNCKHQGWGK	HNCDAEDAG	VICSKGADLS	LRLVDGVTEC	SGRLEVRFQG
250	260	270	280	290	300
EWGTICDDGW	DSYDAAVACK	QLGCPTAVTA	IGRVNASKGF	GHIWLDSVSC	QGHEPAVWQC
310	320	330	340	350	360
KHHEWGHYIC	NHNEDAGVTC	SDGSDLELRL	RGGGSRGAGT	VEVEIQRLLG	KVCDRGWGLK
370	380	390	400	410	420
EADVVCRQLG	CGSAIKTSYQ	VYSKIQATNT	WLFLSSCNGN	ETSLWDCKNW	QWGGLTCDHY
430	440	450	460	470	480
EEAKITCSAH	REPRLVGGDI	PCSGRVEVKH	GDTWGSICDS	DFSLEAASVL	CRELQCGTVV
490	500	510	520	530	540
SILGGAHFE	GNGQIWAEEF	QCEGHESHLS	LCPVAPRPEG	TCSHSRDVG	VCSRYTEIRL
550	560	570	580	590	600
VNGKTPCEGR	VELKTLGAWG	SLCNSHWDIE	DAHVLCQQLK	CGVALSTPGG	ARFGKGNQOI
610	620	630	640	650	660
WRHMFHCTGT	EQHMGDCPVT	ALGASLCPSE	QVASVICSGN	QSQTLSNCNS	SSLGPTRPIT
670	680	690	700	710	720
PEESAIVACIE	SGQLRLVNGG	GRCAGRVEIY	HEGSGWTICD	DSWDLSDAHV	VCRQLGCGEA
730	740	750	760	770	780
INATGSAHFG	EGTGPIWLDE	MKCNKESRI	WQCHSHGWGQ	QNCRHKEDAG	VICSEFMSLR
790	800	810	820	830	840
LTSEASREAC	AGRLEVIFYNG	AWGTVGKSSM	SETTVGVVCR	QLGCADKGI	NPASLDKAMS
850	860	870	880	890	900
IPMVVDNVQC	PKGPDTLWQC	PSSFWEKRLA	SPSEETWITC	DNKIRLQEGP	TSCSGRVEIW
910	920	930	940	950	960
HGGSWGTVCD	DSWDLDDAQV	VCCQLGCGPA	LKAFKEAEFG	QGTGPIWLNE	VKCKGNESL
970	980	990	1000	1010	
WDCPARRWGH	SECCHKEDAA	VNCTDISVQK	TPQKATTGRS	SRQSSHHHHH	HHHHH

보다 가요성 [REDACTED] 보다 보호됨
변화 없음

도면48

```

10      20      30      40      50      60
GTDKELRLVD GENKCSGRVE VKVQEEWGTV CNNGWSMEAV SVICNQLGCP TAIKAPGWAN

70      80      90      100     110     120
SSAGSGRIWM DHVSCRGNES ALWDCKHDGW GKHSNCTHQQ DAGVTCSDGS NLEMRLTRGG

130     140     150     160     170     180
NMCSGRIEIK FQGRWGTVC DNFNIDHASV ICRQLECGSA VSFSGSSNFG EGSGPIWFDD

190     200     210     220     230     240
LICNGNESAL WNCKHQGWGK HNCDAEDAG VICSKGADLS LRLVDGVTEC SGRLEVRFQG

250     260     270     280     290     300
EWGTICDDGW DSYDAAVACK QLGCP TAVTA IGRVNASKGF GHIWLDVSC QGHEPAVWQC

310     320     330     340     350     360
KHHEWKGHYC NHNEDAGVTC SDGSDLELRL RGGGSRCACT VEVEIQRLLG KVCDRGWGLK

370     380     390     400     410     420
EADVVCRLQG CGSALKTSYQ VYSKIQTNT WLFLLSSCNGN ETSLWDCKNW QWGGLTCDHY

430     440     450     460     470     480
EEAKITCSAH REPRLVGDI PCSGRVEVKH GDTWGSICDS DFSLEAASVL CRELQCGTVV

490     500     510     520     530     540
SILGGAHFGE GNGQIWAEEF QCEGHESHL S LCPVAPRPEG TCSHSRDVG VCSRYTEIRL

550     560     570     580     590     600
VNGKTPCEGR VELKTLGAWG SLCNSHWDIE DAHVLCQQLK CGVALSTPGG ARFGKGNQI

610     620     630     640     650     660
WRHMFHCTGT EQHMGDCPVT ALGASLCPSE QVASVICSGN QSQTLSSCNS SSLGPTPTI

670     680     690     700     710     720
PEESAVACIE SGQLRLVNGG GRCAGRVEIY HEGSWG T ICD DSWDLSDAH VCRQLGCGEA

730     740     750     760     770     780
INATGSAHFG EGTGPIWLDE MKCNGKESRI WQCHSHGWGQ QNCRHKEDAG VICSEFMSLR

790     800     810     820     830     840
LTSEASREAC AGRLEV FYNG AWGTVGKSSM SETTVGVVCR QLGCADKGI NPASLDKAMS

850     860     870     880     890     900
IPMWVDNVQC PKGPD TLWQC PSSPWEKRLA SPSEETWITC DNKIRLQEGF TSCSGRVEIW

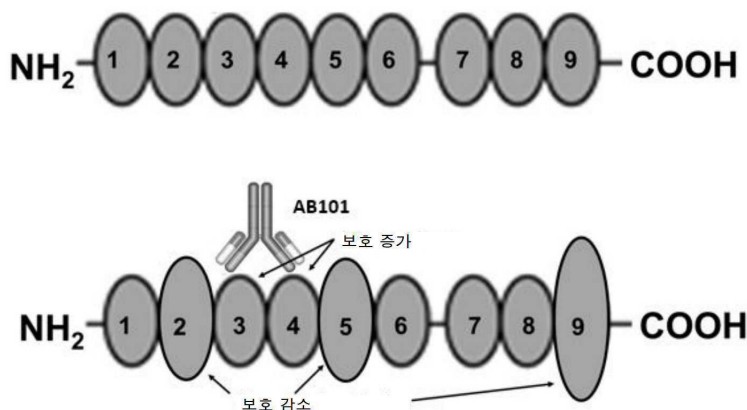
910     920     930     940     950     960
HGGSWGTVCD DSWDLDDAQV VCQQLGCGPA LKAFKEAEFG QGTGPIWLNE VKCKGNESSL

970     980     990     1000    1010
WDCPARRWGH SECCHKEDAA VNCTDISVQK TPQKATTGRS SRQSSHHHHH HHHHH

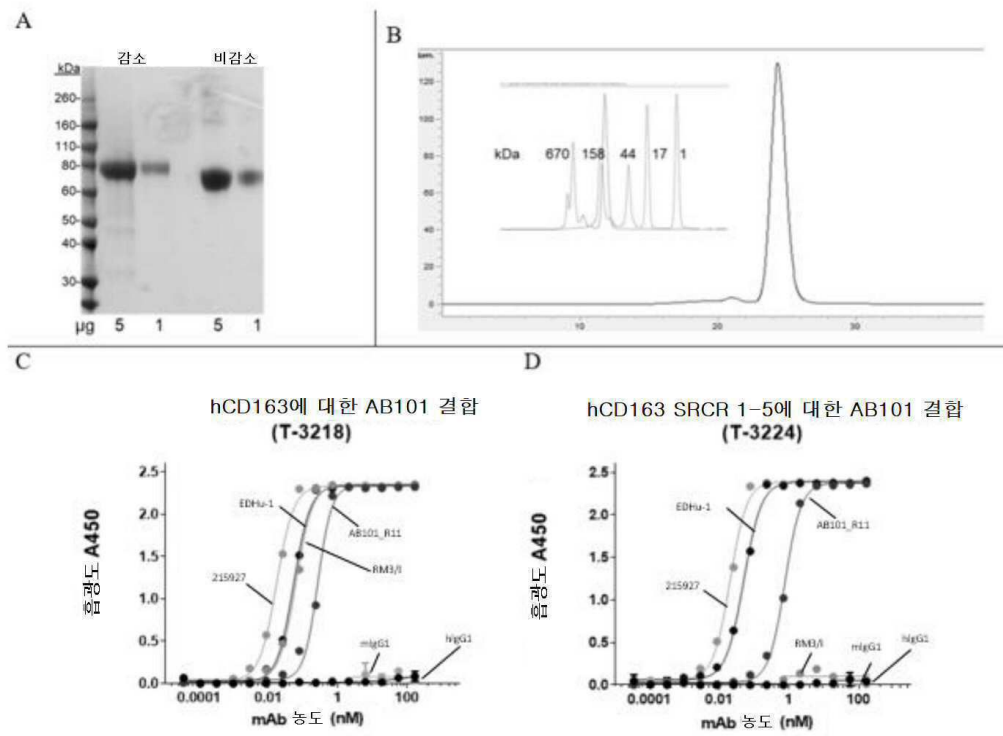
```

보다 가요성 보다 보호됨
변화 없음

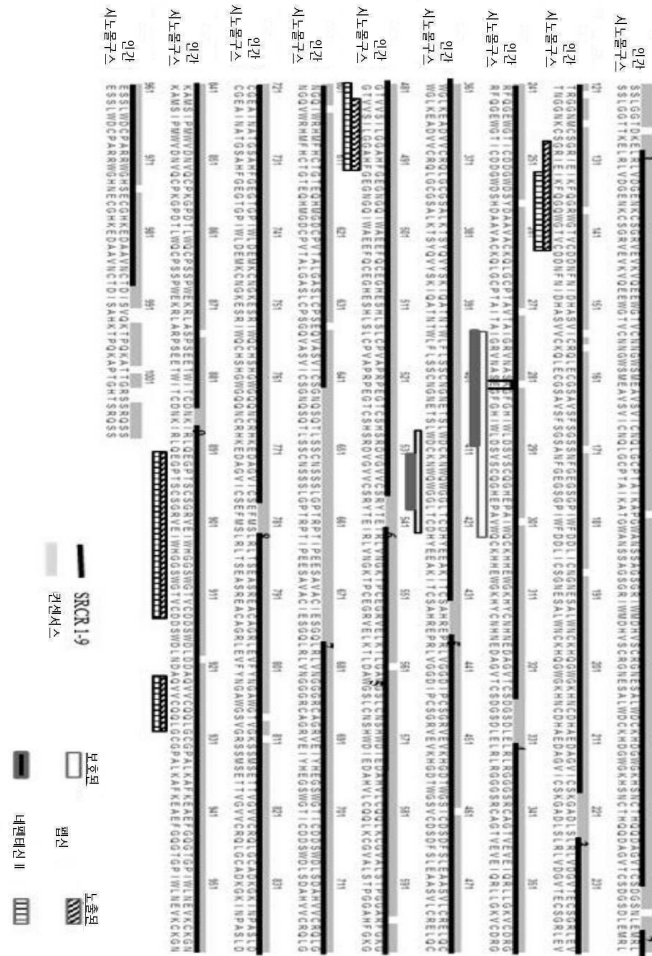
도면49



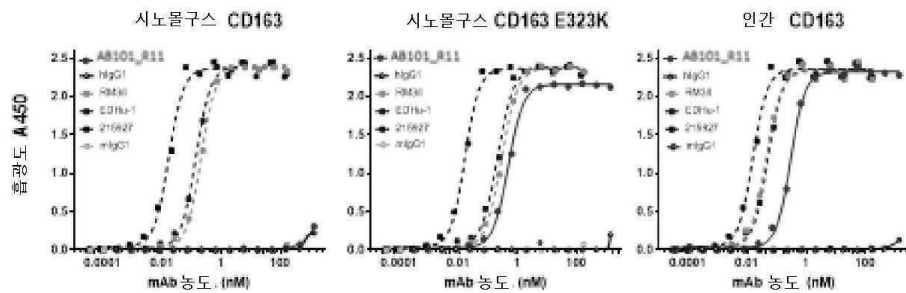
도면50



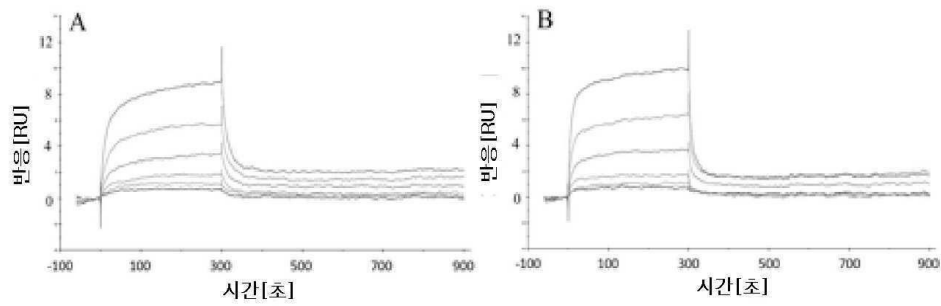
도면51



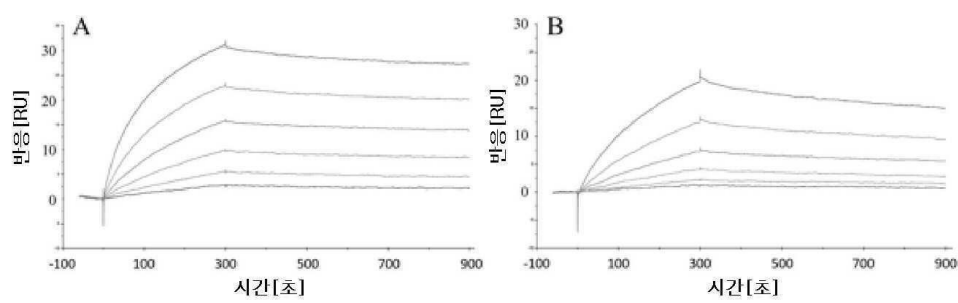
도면52



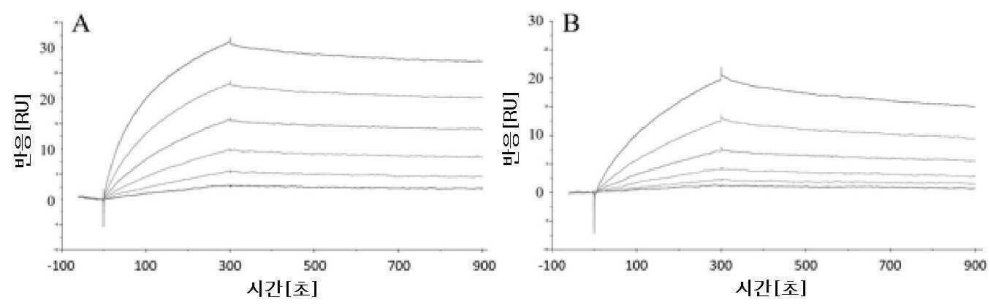
도면53



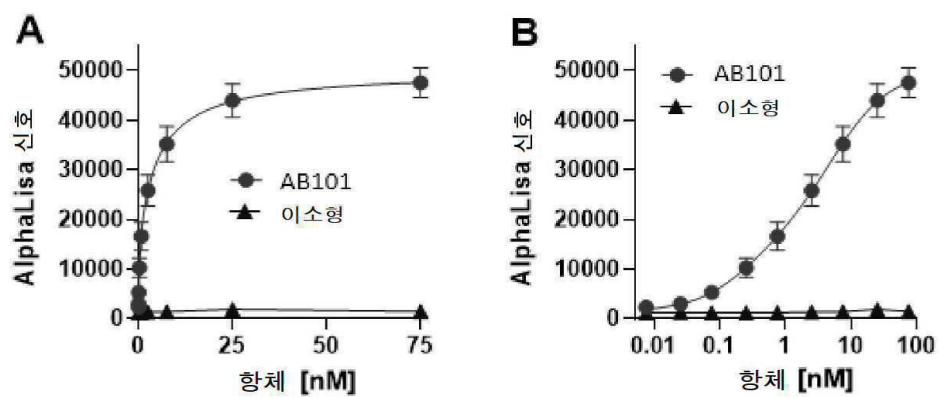
도면54



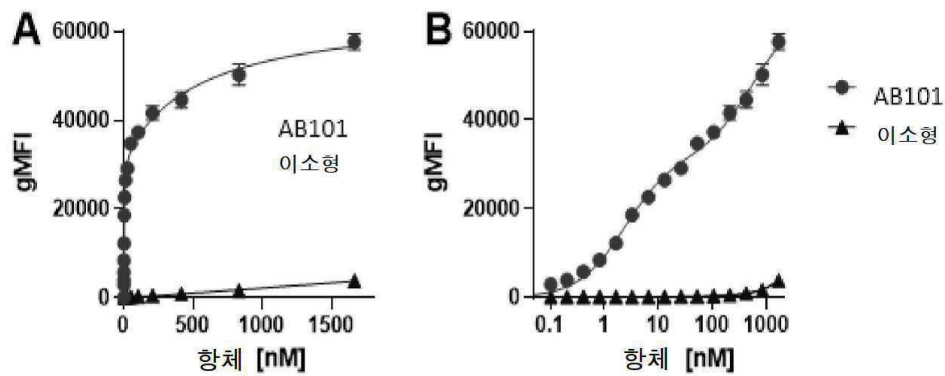
도면55



도면56



도면57



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ONCORESPONSE, INC.

<120> IMMUNOMODULATORY ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 56382-703.601

<140> PCT/US2020/042668

<141> 2020-07-17

<150> 62/878,265

<151> 2019-07-24

<150> 62/876,579

<151> 2019-07-19

<150> 62/876,580

<151> 2019-07-19

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 2

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 3

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg Gly Thr

1 5 10

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Ser Tyr Ala Met His

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 5

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Glu Asn Val Arg Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr Ser Glu

1 5 10 15

Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val

20

<210> 7

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 7

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65					70					75					80				
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Arg				
85					90					95									
Gly	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg							
100					105														
<210> 8																			
<211> 166																			
<212> PRT																			
<213> Artificial Sequence																			
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide																			
<400> 8																			
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg				
1				5				10				15							
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr				
20					25					30									
Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
35				40				45											
Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val				
50			55			60													
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr				
65					70					75					80				
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
85					90					95									
Ala	Arg	Glu	Asn	Val	Arg	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Trp	Ser	Gly	Tyr	Tyr				
100					105					110									
Ser	Glu	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr				
115				120				125											
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu				
130			135			140													
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys				

145 150 155 160
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 165
 <210> 9
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Arg
 85 90 95
 Gly Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

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

<210> 10

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 10

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

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

Ser Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
115 120 125
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
130 135 140
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

145 150 155 160
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 165 170 175

 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 180 185 190
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 195 200 205
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 210 215 220
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240

 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365

 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 11

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 11

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Asn Val Arg Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr
100 105 110

Ser Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
115 120 125

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

130 135 140
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 145 150 155 160
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 165 170 175
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 180 185 190
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 195 200 205

 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 210 215 220
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270

 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 12

<211> 463

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 12

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Glu Asn Val Arg Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr
100 105 110

Ser Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 115 120 125
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 130 135 140
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 145 150 155 160
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 165 170 175

 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 180 185 190
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 195 200 205
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 210 215 220
 Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240

 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val
 245 250 255
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

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

355 360 365
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430

 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460
 <210> 13
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide
 <400> 13
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

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

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

85	90	95
Ala Arg Glu Asn Val Arg Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr		
100	105	110
Ser Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
115	120	125
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
130	135	140
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
145	150	155
160		
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
165	170	175
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
180	185	190
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
195	200	205
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn		
210	215	220
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro		
225	230	235
240		
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
245	250	255
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
260	265	270
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
275	280	285
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
290	295	300
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
305	310	315
320		
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
325	330	335

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
340 345 350
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
355 360 365
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
370 375 380
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
385 390 395 400

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
405 410 415
Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu
420 425 430
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
435 440 445
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455 460

<210> 14

<211

> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

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

Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser
115				120				125							
Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp
130				135				140							
Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val
145				150				155				160			
Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Met
				165				170				175			

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser
180 185 190

Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

<210> 15

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 15

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Asn Val Arg Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr
100 105 110
Ser Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
115 120 125
Val Thr Val Ser Ser Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala
130 135 140
Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160
Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly
165 170 175
Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp
180 185 190
Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro
195 200 205
Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
210 215 220
Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro
225 230 235 240
Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
245 250 255
Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
260 265 270
Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val
275 280 285
Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr

290 295 300
Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala
305 310 315 320
Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys

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

385 390 395 400
Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp
405 410 415
Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp
420 425 430
Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
435 440 445
Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

450 455 460
<210> 16
<211> 462
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Asn Val Arg Pro Tyr Tyr Asp Phe Trp Ser Gly Tyr Tyr

100 105 110

Ser Glu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr

115 120 125

Val Thr Val Ser Ser Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly

165 170 175

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

180 185 190

Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro

195 200 205

Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys

210 215 220

Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro

225 230 235 240

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe

245 250 255

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro

260 265 270

Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val

275 280 285
Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr

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

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

420 425 430
Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
435 440 445
Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 17

<211> 1121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Ser Lys Leu Arg Met Val Leu Leu Glu Asp Ser Gly Ser Ala Asp
1 5 10 15

Phe Arg Arg His Phe Val Asn Leu Ser Pro Phe Thr Ile Thr Val Val

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

 Ser Met Glu Ala Val Ser Val Ile Cys Asn Gln Leu Gly Cys Pro Thr
 85 90 95
 Ala Ile Lys Ala Pro Gly Trp Ala Asn Ser Ser Ala Gly Ser Gly Arg
 100 105 110
 Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg Gly Asn Glu Ser Ala Leu Trp
 115 120 125
 Asp Cys Lys His Asp Gly Trp Gly Lys His Ser Asn Cys Thr His Gln
 130 135 140

 Gln Asp Ala Gly Val Thr Cys Ser Asp Gly Ser Asn Leu Glu Met Arg
 145 150 155 160
 Leu Thr Arg Gly Gly Asn Met Cys Ser Gly Arg Ile Glu Ile Lys Phe
 165 170 175
 Gln Gly Arg Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Asn Phe Asn Ile Asp His
 180 185 190
 Ala Ser Val Ile Cys Arg Gln Leu Glu Cys Gly Ser Ala Val Ser Phe
 195 200 205

 Ser Gly Ser Ser Asn Phe Gly Glu Gly Ser Gly Pro Ile Trp Phe Asp
 210 215 220
 Asp Leu Ile Cys Asn Gly Asn Glu Ser Ala Leu Trp Asn Cys Lys His
 225 230 235 240
 Gln Gly Trp Gly Lys His Asn Cys Asp His Ala Glu Asp Ala Gly Val
 245 250 255
 Ile Cys Ser Lys Gly Ala Asp Leu Ser Leu Arg Leu Val Asp Gly Val
 260 265 270

Thr Glu Cys Ser Gly Arg Leu Glu Val Arg Phe Gln Gly Glu Trp Gly
 275 280 285
 Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Asp Ser Tyr Asp Ala Ala Val Ala Cys
 290 295 300
 Lys Gln Leu Gly Cys Pro Thr Ala Val Thr Ala Ile Gly Arg Val Asn
 305 310 315 320
 Ala Ser Lys Gly Phe Gly His Ile Trp Leu Asp Ser Val Ser Cys Gln
 325 330 335

 Gly His Glu Pro Ala Ile Trp Gln Cys Lys His His Glu Trp Gly Lys
 340 345 350
 His Tyr Cys Asn His Asn Glu Asp Ala Gly Val Thr Cys Ser Asp Gly
 355 360 365
 Ser Asp Leu Glu Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ser Arg Cys Ala Gly
 370 375 380
 Thr Val Glu Val Glu Ile Gln Arg Leu Leu Gly Lys Val Cys Asp Arg
 385 390 395 400

 Gly Trp Gly Leu Lys Glu Ala Asp Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys
 405 410 415
 Gly Ser Ala Leu Lys Thr Ser Tyr Gln Val Tyr Ser Lys Ile Gln Ala
 420 425 430
 Thr Asn Thr Trp Leu Phe Leu Ser Ser Cys Asn Gly Asn Glu Thr Ser
 435 440 445
 Leu Trp Asp Cys Lys Asn Trp Gln Trp Gly Gly Leu Thr Cys Asp His
 450 455 460

 Tyr Glu Glu Ala Lys Ile Thr Cys Ser Ala His Arg Glu Pro Arg Leu
 465 470 475 480
 Val Gly Gly Asp Ile Pro Cys Ser Gly Arg Val Glu Val Lys His Gly
 485 490 495
 Asp Thr Trp Gly Ser Ile Cys Asp Ser Asp Phe Ser Leu Glu Ala Ala
 500 505 510
 Ser Val Leu Cys Arg Glu Leu Gln Cys Gly Thr Val Val Ser Ile Leu

515 Gly Gly Ala His Phe Gly Glu Gly Asn Gly Gln Ile Trp Ala Glu Glu
 530 535 540
 Phe Gln Cys Glu Gly His Glu Ser His Leu Ser Leu Cys Pro Val Ala
 545 550 555 560
 Pro Arg Pro Glu Gly Thr Cys Ser His Ser Arg Asp Val Gly Val Val
 565 570 575
 Cys Ser Arg Tyr Thr Glu Ile Arg Leu Val Asn Gly Lys Thr Pro Cys
 580 585 590

 Glu Gly Arg Val Glu Leu Lys Thr Leu Gly Ala Trp Gly Ser Leu Cys
 595 600 605
 Asn Ser His Trp Asp Ile Glu Asp Ala His Val Leu Cys Gln Gln Leu
 610 615 620
 Lys Cys Gly Val Ala Leu Ser Thr Pro Gly Gly Ala Arg Phe Gly Lys
 625 630 635 640
 Gly Asn Gly Gln Ile Trp Arg His Met Phe His Cys Thr Gly Thr Glu
 645 650 655

 Gln His Met Gly Asp Cys Pro Val Thr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Cys
 660 665 670
 Pro Ser Glu Gln Val Ala Ser Val Ile Cys Ser Gly Asn Gln Ser Gln
 675 680 685
 Thr Leu Ser Ser Cys Asn Ser Ser Ser Leu Gly Pro Thr Arg Pro Thr
 690 695 700
 Ile Pro Glu Glu Ser Ala Val Ala Cys Ile Glu Ser Gly Gln Leu Arg
 705 710 715 720

 Leu Val Asn Gly Gly Gly Arg Cys Ala Gly Arg Val Glu Ile Tyr His
 725 730 735
 Glu Gly Ser Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Ser Trp Asp Leu Ser Asp
 740 745 750
 Ala His Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Glu Ala Ile Asn Ala
 755 760 765

Thr Gly Ser Ala His Phe Gly Glu Gly Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asp
770 775 780

Glu Met Lys Cys Asn Gly Lys Glu Ser Arg Ile Trp Gln Cys His Ser
785 790 795 800

His Gly Trp Gly Gln Gln Asn Cys Arg His Lys Glu Asp Ala Gly Val
805 810 815

Ile Cys Ser Glu Phe Met Ser Leu Arg Leu Thr Ser Glu Ala Ser Arg
820 825 830

Glu Ala Cys Ala Gly Arg Leu Glu Val Phe Tyr Asn Gly Ala Trp Gly
835 840 845

Thr Val Gly Lys Ser Ser Met Ser Glu Thr Thr Val Gly Val Val Cys
850 855 860

Arg Gln Leu Gly Cys Ala Asp Lys Gly Lys Ile Asn Pro Ala Ser Leu
865 870 875 880

Asp Lys Ala Met Ser Ile Pro Met Trp Val Asp Asn Val Gln Cys Pro
885 890 895

Lys Gly Pro Asp Thr Leu Trp Gln Cys Pro Ser Ser Pro Trp Glu Lys
900 905 910

Arg Leu Ala Ser Pro Ser Glu Glu Thr Trp Ile Thr Cys Asp Asn Lys
915 920 925

Ile Arg Leu Gln Glu Gly Pro Thr Ser Cys Ser Gly Arg Val Glu Ile
930 935 940

Trp His Gly Gly Ser Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Ser Trp Asp Leu
945 950 955 960

Asp Asp Ala Gln Val Val Cys Gln Gln Leu Gly Cys Gly Pro Ala Leu
965 970 975

Lys Ala Phe Lys Glu Ala Glu Phe Gly Gln Gly Thr Gly Pro Ile Trp
980 985 990

Leu Asn Glu Val Lys Cys Lys Gly Asn Glu Ser Ser Leu Trp Asp Cys
995 1000 1005

Pro Ala Arg Arg Trp Gly His Ser Glu Cys Gly His Lys Glu Asp

1010 1015 1020
Ala Ala Val Asn Cys Thr Asp Ile Ser Val Gln Lys Thr Pro Gln
1025 1030 1035

Lys Ala Thr Thr Gly Arg Ser Ser Arg Gln Ser Ser Phe Ile Ala
1040 1045 1050
Val Gly Ile Leu Gly Val Val Leu Leu Ala Ile Phe Val Ala Leu
1055 1060 1065
Phe Phe Leu Thr Lys Lys Arg Arg Gln Arg Gln Arg Leu Ala Val
1070 1075 1080
Ser Ser Arg Gly Glu Asn Leu Val His Gln Ile Gln Tyr Arg Glu
1085 1090 1095

Met Asn Ser Cys Leu Asn Ala Asp Asp Leu Asp Leu Met Asn Ser
1100 1105 1110
Ser Gly Gly His Ser Glu Pro His
1115 1120

<210> 18

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ile Gly Arg Val Asn Ala Ser Lys Gly Phe Gly His Ile Trp Leu Asp

1 5 10 15

Ser Val Ser Cys Gln Gly His Glu Pro Ala Ile

20 25

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Ser Ala

1 5 10

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Trp Asp Cys Lys Asn Trp Gln Trp Gly Gly Leu Thr Cys Asp

1 5 10

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag

<400> 21

His His His His His His

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

8xHis tag

<400> 22

His His His His His His His His

1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

10xHis tag

<400> 23

His His His His His His His His His His

1 5 10

<210> 24

<211> 1015

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 24

Gly Thr Asp Lys Glu Leu Arg Leu Val Asp Gly Glu Asn Lys Cys Ser

1 5 10 15

Gly Arg Val Glu Val Lys Val Gln Glu Glu Trp Gly Thr Val Cys Asn

20 25 30

Asn Gly Trp Ser Met Glu Ala Val Ser Val Ile Cys Asn Gln Leu Gly

35 40 45

Cys Pro Thr Ala Ile Lys Ala Pro Gly Trp Ala Asn Ser Ser Ala Gly

50 55 60

Ser Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg Gly Asn Glu Ser

65 70 75 80

Ala Leu Trp Asp Cys Lys His Asp Gly Trp Gly Lys His Ser Asn Cys

85 90 95

Thr His Gln Gln Asp Ala Gly Val Thr Cys Ser Asp Gly Ser Asn Leu

100 105 110

Glu Met Arg Leu Thr Arg Gly Gly Asn Met Cys Ser Gly Arg Ile Glu

115 120 125

Ile Lys Phe Gln Gly Arg Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Asn Phe Asn

130 135 140

Ile Asp His Ala Ser Val Ile Cys Arg Gln Leu Glu Cys Gly Ser Ala

145 150 155 160

Val Ser Phe Ser Gly Ser Ser Asn Phe Gly Glu Gly Ser Gly Pro Ile

165 170 175

Trp Phe Asp Asp Leu Ile Cys Asn Gly Asn Glu Ser Ala Leu Trp Asn

180 185 190

Cys Lys His Gln Gly Trp Gly Lys His Asn Cys Asp His Ala Glu Asp

195 200 205
 Ala Gly Val Ile Cys Ser Lys Gly Ala Asp Leu Ser Leu Arg Leu Val
 210 215 220
 Asp Gly Val Thr Glu Cys Ser Gly Arg Leu Glu Val Arg Phe Gln Gly
 225 230 235 240
 Glu Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Asp Ser Tyr Asp Ala Ala

 245 250 255
 Val Ala Cys Lys Gln Leu Gly Cys Pro Thr Ala Val Thr Ala Ile Gly
 260 265 270
 Arg Val Asn Ala Ser Lys Gly Phe Gly His Ile Trp Leu Asp Ser Val
 275 280 285
 Ser Cys Gln Gly His Glu Pro Ala Val Trp Gln Cys Lys His His Glu
 290 295 300
 Trp Gly Lys His Tyr Cys Asn His Asn Glu Asp Ala Gly Val Thr Cys

 305 310 315 320
 Ser Asp Gly Ser Asp Leu Glu Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Ser Arg
 325 330 335
 Cys Ala Gly Thr Val Glu Val Glu Ile Gln Arg Leu Leu Gly Lys Val
 340 345 350
 Cys Asp Arg Gly Trp Gly Leu Lys Glu Ala Asp Val Val Cys Arg Gln
 355 360 365
 Leu Gly Cys Gly Ser Ala Leu Lys Thr Ser Tyr Gln Val Tyr Ser Lys

 370 375 380
 Ile Gln Ala Thr Asn Thr Trp Leu Phe Leu Ser Ser Cys Asn Gly Asn
 385 390 395 400
 Glu Thr Ser Leu Trp Asp Cys Lys Asn Trp Gln Trp Gly Gly Leu Thr
 405 410 415
 Cys Asp His Tyr Glu Glu Ala Lys Ile Thr Cys Ser Ala His Arg Glu
 420 425 430
 Pro Arg Leu Val Gly Gly Asp Ile Pro Cys Ser Gly Arg Val Glu Val

 435 440 445

Lys His Gly Asp Thr Trp Gly Ser Ile Cys Asp Ser Asp Phe Ser Leu
 450 455 460
 Glu Ala Ala Ser Val Leu Cys Arg Glu Leu Gln Cys Gly Thr Val Val
 465 470 475 480
 Ser Ile Leu Gly Gly Ala His Phe Gly Glu Gly Asn Gly Gln Ile Trp
 485 490 495
 Ala Glu Glu Phe Gln Cys Glu Gly His Glu Ser His Leu Ser Leu Cys
 500 505 510
 Pro Val Ala Pro Arg Pro Glu Gly Thr Cys Ser His Ser Arg Asp Val
 515 520 525
 Gly Val Val Cys Ser Arg Tyr Thr Glu Ile Arg Leu Val Asn Gly Lys
 530 535 540
 Thr Pro Cys Glu Gly Arg Val Glu Leu Lys Thr Leu Gly Ala Trp Gly
 545 550 555 560
 Ser Leu Cys Asn Ser His Trp Asp Ile Glu Asp Ala His Val Leu Cys
 565 570 575
 Gln Gln Leu Lys Cys Gly Val Ala Leu Ser Thr Pro Gly Gly Ala Arg
 580 585 590
 Phe Gly Lys Gly Asn Gly Gln Ile Trp Arg His Met Phe His Cys Thr
 595 600 605
 Gly Thr Glu Gln His Met Gly Asp Cys Pro Val Thr Ala Leu Gly Ala
 610 615 620
 Ser Leu Cys Pro Ser Glu Gln Val Ala Ser Val Ile Cys Ser Gly Asn
 625 630 635 640
 Gln Ser Gln Thr Leu Ser Ser Cys Asn Ser Ser Ser Leu Gly Pro Thr
 645 650 655
 Arg Pro Thr Ile Pro Glu Glu Ser Ala Val Ala Cys Ile Glu Ser Gly
 660 665 670
 Gln Leu Arg Leu Val Asn Gly Gly Gly Arg Cys Ala Gly Arg Val Glu
 675 680 685
 Ile Tyr His Glu Gly Ser Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Ser Trp Asp

690 695 700
 Leu Ser Asp Ala His Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Glu Ala
 705 710 715 720
 Ile Asn Ala Thr Gly Ser Ala His Phe Gly Glu Gly Thr Gly Pro Ile
 725 730 735
 Trp Leu Asp Glu Met Lys Cys Asn Gly Lys Glu Ser Arg Ile Trp Gln
 740 745 750
 Cys His Ser His Gly Trp Gly Gln Gln Asn Cys Arg His Lys Glu Asp

 755 760 765
 Ala Gly Val Ile Cys Ser Glu Phe Met Ser Leu Arg Leu Thr Ser Glu
 770 775 780
 Ala Ser Arg Glu Ala Cys Ala Gly Arg Leu Glu Val Phe Tyr Asn Gly
 785 790 795 800
 Ala Trp Gly Thr Val Gly Lys Ser Ser Met Ser Glu Thr Thr Val Gly
 805 810 815
 Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Ala Asp Lys Gly Lys Ile Asn Pro

 820 825 830
 Ala Ser Leu Asp Lys Ala Met Ser Ile Pro Met Trp Val Asp Asn Val
 835 840 845
 Gln Cys Pro Lys Gly Pro Asp Thr Leu Trp Gln Cys Pro Ser Ser Pro
 850 855 860
 Trp Glu Lys Arg Leu Ala Ser Pro Ser Glu Glu Thr Trp Ile Thr Cys
 865 870 875 880
 Asp Asn Lys Ile Arg Leu Gln Glu Gly Pro Thr Ser Cys Ser Gly Arg

 885 890 895
 Val Glu Ile Trp His Gly Gly Ser Trp Gly Thr Val Cys Asp Asp Ser
 900 905 910
 Trp Asp Leu Asp Asp Ala Gln Val Val Cys Gln Gln Leu Gly Cys Gly
 915 920 925
 Pro Ala Leu Lys Ala Phe Lys Glu Ala Glu Phe Gly Gln Gly Thr Gly
 930 935 940

Pro Ile Trp Leu Asn Glu Val Lys Cys Lys Gly Asn Glu Ser Ser Leu

945 950 955 960

Trp Asp Cys Pro Ala Arg Arg Trp Gly His Ser Glu Cys Gly His Lys

965 970 975

Glu Asp Ala Ala Val Asn Cys Thr Asp Ile Ser Val Gln Lys Thr Pro

980 985 990

Gln Lys Ala Thr Thr Gly Arg Ser Ser Arg Gln Ser Ser His His His

995 1000 1005

His His His His His His His

1010 1015

<210> 25

<211> 1009

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ser Ser Leu Gly Gly Thr Asp Lys Glu Leu Arg Leu Val Asp Gly Glu

1 5 10 15

Asn Lys Cys Ser Gly Arg Val Glu Val Lys Val Gln Glu Glu Trp Gly

20 25 30

Thr Val Cys Asn Asn Gly Trp Ser Met Glu Ala Val Ser Val Ile Cys

35 40 45

Asn Gln Leu Gly Cys Pro Thr Ala Ile Lys Ala Pro Gly Trp Ala Asn

50 55 60

Ser Ser Ala Gly Ser Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg

65 70 75 80

Gly Asn Glu Ser Ala Leu Trp Asp Cys Lys His Asp Gly Trp Gly Lys

85 90 95

His Ser Asn Cys Thr His Gln Gln Asp Ala Gly Val Thr Cys Ser Asp

100 105 110

Gly Ser Asn Leu Glu Met Arg Leu Thr Arg Gly Gly Asn Met Cys Ser

115 120 125

Gly Arg Ile Glu Ile Lys Phe Gln Gly Arg Trp Gly Thr Val Cys Asp
 130 135 140
 Asp Asn Phe Asn Ile Asp His Ala Ser Val Ile Cys Arg Gln Leu Glu
 145 150 155 160
 Cys Gly Ser Ala Val Ser Phe Ser Gly Ser Ser Asn Phe Gly Glu Gly
 165 170 175
 Ser Gly Pro Ile Trp Phe Asp Asp Leu Ile Cys Asn Gly Asn Glu Ser
 180 185 190
 Ala Leu Trp Asn Cys Lys His Gln Gly Trp Gly Lys His Asn Cys Asp
 195 200 205
 His Ala Glu Asp Ala Gly Val Ile Cys Ser Lys Gly Ala Asp Leu Ser
 210 215 220
 Leu Arg Leu Val Asp Gly Val Thr Glu Cys Ser Gly Arg Leu Glu Val
 225 230 235 240
 Arg Phe Gln Gly Glu Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Asp Ser
 245 250 255
 Tyr Asp Ala Ala Val Ala Cys Lys Gln Leu Gly Cys Pro Thr Ala Val
 260 265 270
 Thr Ala Ile Gly Arg Val Asn Ala Ser Lys Gly Phe Gly His Ile Trp
 275 280 285
 Leu Asp Ser Val Ser Cys Gln Gly His Glu Pro Ala Ile Trp Gln Cys
 290 295 300
 Lys His His Glu Trp Gly Lys His Tyr Cys Asn His Asn Glu Asp Ala
 305 310 315 320
 Gly Val Thr Cys Ser Asp Gly Ser Asp Leu Glu Leu Arg Leu Arg Gly
 325 330 335
 Gly Gly Ser Arg Cys Ala Gly Thr Val Glu Val Glu Ile Gln Arg Leu
 340 345 350
 Leu Gly Lys Val Cys Asp Arg Gly Trp Gly Leu Lys Glu Ala Asp Val
 355 360 365
 Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Gly Ser Ala Leu Lys Thr Ser Tyr Gln

370 375 380
 Val Tyr Ser Lys Ile Gln Ala Thr Asn Thr Trp Leu Phe Leu Ser Ser
 385 390 395 400
 Cys Asn Gly Asn Glu Thr Ser Leu Trp Asp Cys Lys Asn Trp Gln Trp
 405 410 415
 Gly Gly Leu Thr Cys Asp His Tyr Glu Glu Ala Lys Ile Thr Cys Ser
 420 425 430
 Ala His Arg Glu Pro Arg Leu Val Gly Gly Asp Ile Pro Cys Ser Gly

 435 440 445
 Arg Val Glu Val Lys His Gly Asp Thr Trp Gly Ser Ile Cys Asp Ser
 450 455 460
 Asp Phe Ser Leu Glu Ala Ala Ser Val Leu Cys Arg Glu Leu Gln Cys
 465 470 475 480
 Gly Thr Val Val Ser Ile Leu Gly Gly Ala His Phe Gly Glu Gly Asn
 485 490 495
 Gly Gln Ile Trp Ala Glu Glu Phe Gln Cys Glu Gly His Glu Ser His

 500 505 510
 Leu Ser Leu Cys Pro Val Ala Pro Arg Pro Glu Gly Thr Cys Ser His
 515 520 525
 Ser Arg Asp Val Gly Val Val Cys Ser Arg Tyr Thr Glu Ile Arg Leu
 530 535 540
 Val Asn Gly Lys Thr Pro Cys Glu Gly Arg Val Glu Leu Lys Thr Leu
 545 550 555 560
 Gly Ala Trp Gly Ser Leu Cys Asn Ser His Trp Asp Ile Glu Asp Ala

 565 570 575
 His Val Leu Cys Gln Gln Leu Lys Cys Gly Val Ala Leu Ser Thr Pro
 580 585 590
 Gly Gly Ala Arg Phe Gly Lys Gly Asn Gly Gln Ile Trp Arg His Met
 595 600 605
 Phe His Cys Thr Gly Thr Glu Gln His Met Gly Asp Cys Pro Val Thr
 610 615 620

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

625 630 635 640

Cys Ser Gly Asn Gln Ser Gln Thr Leu Ser Ser Cys Asn Ser Ser Ser

645 650 655

Leu Gly Pro Thr Arg Pro Thr Ile Pro Glu Glu Ser Ala Val Ala Cys

660 665 670

Ile Glu Ser Gly Gln Leu Arg Leu Val Asn Gly Gly Gly Arg Cys Ala

675 680 685

Gly Arg Val Glu Ile Tyr His Glu Gly Ser Trp Gly Thr Ile Cys Asp

690 695 700

Asp Ser Trp Asp Leu Ser Asp Ala His Val Val Cys Arg Gln Leu Gly

705 710 715 720

Cys Gly Glu Ala Ile Asn Ala Thr Gly Ser Ala His Phe Gly Glu Gly

725 730 735

Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asp Glu Met Lys Cys Asn Gly Lys Glu Ser

740 745 750

Arg Ile Trp Gln Cys His Ser His Gly Trp Gly Gln Gln Asn Cys Arg

755 760 765

His Lys Glu Asp Ala Gly Val Ile Cys Ser Glu Phe Met Ser Leu Arg

770 775 780

Leu Thr Ser Glu Ala Ser Arg Glu Ala Cys Ala Gly Arg Leu Glu Val

785 790 795 800

Phe Tyr Asn Gly Ala Trp Gly Thr Val Gly Lys Ser Ser Met Ser Glu

805 810 815

Thr Thr Val Gly Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Ala Asp Lys Gly

820 825 830

Lys Ile Asn Pro Ala Ser Leu Asp Lys Ala Met Ser Ile Pro Met Trp

835 840 845

Val Asp Asn Val Gln Cys Pro Lys Gly Pro Asp Thr Leu Trp Gln Cys

850 855 860

Pro Ser Ser Pro Trp Glu Lys Arg Leu Ala Ser Pro Ser Glu Glu Thr

865 870 875 880
 Trp Ile Thr Cys Asp Asn Lys Ile Arg Leu Gln Glu Gly Pro Thr Ser

 885 890 895
 Cys Ser Gly Arg Val Glu Ile Trp His Gly Gly Ser Trp Gly Thr Val

 900 905 910
 Cys Asp Asp Ser Trp Asp Leu Asp Asp Ala Gln Val Val Cys Gln Gln

 915 920 925
 Leu Gly Cys Gly Pro Ala Leu Lys Ala Phe Lys Glu Ala Glu Phe Gly

 930 935 940
 Gln Gly Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asn Glu Val Lys Cys Lys Gly Asn

945 950 955 960
 Glu Ser Ser Leu Trp Asp Cys Pro Ala Arg Arg Trp Gly His Ser Glu

 965 970 975
 Cys Gly His Lys Glu Asp Ala Ala Val Asn Cys Thr Asp Ile Ser Val

 980 985 990
 Gln Lys Thr Pro Gln Lys Ala Thr Thr Gly Arg Ser Ser Arg Gln Ser

 995 1000 1005
 Ser

<210> 26

<211> 1009

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 26

Ser Ser Leu Gly Gly Thr Thr Lys Glu Leu Arg Leu Val Asp Gly Glu

1 5 10 15
 Asn Lys Cys Ser Gly Arg Val Glu Val Lys Val Gln Glu Glu Trp Gly

 20 25 30
 Thr Val Cys Asn Asn Gly Trp Ser Met Glu Ala Val Ser Val Ile Cys

 35 40 45
 Asn Gln Leu Gly Cys Pro Thr Ala Ile Lys Ala Thr Gly Trp Ala Asn

50	55	60	
Ser Ser Ala Gly Ser Gly Arg Ile Trp Met Asp His Val Ser Cys Arg			
65	70	75	80
Gly Asn Glu Ser Ala Leu Trp Asp Cys Lys His Asp Gly Trp Gly Lys			
	85	90	95
His Ser Asn Cys Thr His Gln Gln Asp Ala Gly Val Thr Cys Ser Asp			
	100	105	110
Gly Ser Asp Leu Glu Met Arg Leu Thr Asn Gly Gly Asn Lys Cys Ser			
	115	120	125
Gly Arg Ile Glu Ile Lys Phe Gln Gly Gln Trp Gly Thr Val Cys Asp			
	130	135	140
Asp Asn Phe Asn Ile Asp His Ala Ser Val Val Cys Lys Gln Leu Glu			
145	150	155	160
Cys Gly Ser Ala Val Ser Phe Ser Gly Ser Ala Asn Phe Gly Glu Gly			
	165	170	175
Ser Gly Pro Ile Trp Phe Asp Asp Leu Ile Cys Ser Gly Asn Glu Ser			
	180	185	190
Ala Leu Trp Asn Cys Lys His Gln Gly Trp Gly Lys His Asn Cys Asp			
	195	200	205
His Ala Glu Asp Ala Gly Val Ile Cys Ser Lys Gly Ala Asp Leu Ser			
	210	215	220
Leu Arg Leu Val Asp Gly Val Thr Glu Cys Ser Gly Arg Leu Glu Val			
225	230	235	240
Arg Phe Gln Gly Glu Trp Gly Thr Ile Cys Asp Asp Gly Trp Asp Ser			
	245	250	255
His Asp Ala Ala Val Ala Cys Lys Gln Leu Gly Cys Pro Thr Ala Ile			
	260	265	270
Thr Ala Ile Gly Arg Val Asn Ala Ser Glu Gly Phe Gly His Ile Trp			
	275	280	285
Leu Asp Ser Val Ser Cys Gln Gly His Glu Pro Ala Val Trp Gln Cys			
	290	295	300

Lys His His Glu Trp Gly Lys His Tyr Cys Asn His Asn Glu Asp Ala
 305 310 315 320

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

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

 Arg Val Glu Val Lys His Gly Asp Thr Trp Gly Ser Val Cys Asp Ser
 450 455 460
 Asp Phe Ser Leu Glu Ala Ala Ser Val Leu Cys Arg Glu Leu Gln Cys
 465 470 475 480
 Gly Thr Val Val Ser Ile Leu Gly Gly Ala His Phe Gly Glu Gly Asn
 485 490 495
 Gly Gln Ile Trp Ala Glu Glu Phe Gln Cys Glu Gly His Glu Ser His
 500 505 510

 Leu Ser Leu Cys Pro Val Ala Pro Arg Pro Glu Gly Thr Cys Ser His
 515 520 525
 Ser Arg Asp Val Gly Val Val Cys Ser Arg Tyr Thr Glu Ile Arg Leu
 530 535 540
 Val Asn Gly Lys Thr Pro Cys Glu Gly Arg Val Glu Leu Lys Thr Leu

545 550 555 560
 Asp Ala Trp Gly Ser Leu Cys Asn Ser His Trp Asp Ile Glu Asp Ala
 565 570 575

 His Val Leu Cys Gln Gln Leu Lys Cys Gly Val Ala Leu Ser Thr Pro
 580 585 590
 Gly Gly Ala His Phe Gly Lys Gly Asn Gly Gln Val Trp Arg His Met
 595 600 605
 Phe His Cys Thr Gly Thr Glu Gln His Met Gly Asp Cys Pro Val Thr
 610 615 620
 Ala Leu Gly Ala Ser Leu Cys Pro Ser Gly Gln Val Ala Ser Val Ile
 625 630 635 640

 Cys Ser Gly Asn Gln Ser Gln Thr Leu Ser Ser Cys Asn Ser Ser Ser
 645 650 655
 Leu Gly Pro Thr Arg Pro Thr Ile Pro Glu Glu Ser Ala Val Ala Cys
 660 665 670
 Ile Glu Ser Gly Gln Leu Arg Leu Val Asn Gly Gly Gly Arg Cys Ala
 675 680 685
 Gly Arg Val Glu Ile Tyr His Glu Gly Ser Trp Gly Thr Ile Cys Asp
 690 695 700

 Asp Ser Trp Asp Leu Ser Asp Ala His Val Val Cys Arg Gln Leu Gly
 705 710 715 720
 Cys Gly Glu Ala Ile Asn Ala Thr Gly Ser Ala His Phe Gly Glu Gly
 725 730 735
 Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asp Glu Met Lys Cys Asn Gly Lys Glu Ser
 740 745 750
 Arg Ile Trp Gln Cys His Ser His Gly Trp Gly Gln Gln Asn Cys Arg
 755 760 765

 His Lys Glu Asp Ala Gly Val Ile Cys Ser Glu Phe Met Ser Leu Arg
 770 775 780
 Leu Thr Ser Glu Ala Ser Arg Glu Ala Cys Ala Gly Arg Leu Glu Val
 785 790 795 800

Phe Tyr Asn Gly Ala Trp Gly Ser Val Gly Arg Ser Ser Met Ser Glu
805 810 815
Thr Thr Val Gly Val Val Cys Arg Gln Leu Gly Cys Ala Asp Lys Gly
820 825 830

Lys Ile Asn Pro Ala Ser Leu Asp Lys Ala Met Ser Ile Pro Met Trp
835 840 845
Val Asp Asn Val Gln Cys Pro Lys Gly Pro Asp Thr Leu Trp Gln Cys
850 855 860
Pro Ser Ser Pro Trp Glu Lys Arg Leu Ala Arg Pro Ser Glu Glu Thr
865 870 875 880
Trp Ile Thr Cys Asp Asn Lys Ile Arg Leu Gln Glu Gly Pro Thr Ser
885 890 895

Cys Ser Gly Arg Val Glu Ile Trp His Gly Gly Ser Trp Gly Thr Val
900 905 910
Cys Asp Asp Ser Trp Asp Leu Asn Asp Ala Gln Val Val Cys Gln Gln
915 920 925
Leu Gly Cys Gly Pro Ala Leu Lys Ala Phe Lys Glu Ala Glu Phe Gly
930 935 940
Gln Gly Thr Gly Pro Ile Trp Leu Asn Glu Val Lys Cys Lys Gly Asn
945 950 955 960

Glu Ser Ser Leu Trp Asp Cys Pro Ala Arg Arg Trp Gly His Asn Glu
965 970 975
Cys Gly His Lys Glu Asp Ala Ala Val Asn Cys Thr Asp Ile Ser Ala
980 985 990
His Lys Thr Pro Gln Lys Ala Pro Thr Gly His Thr Ser Arg Gln Ser
995 1000 1005

Ser

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 27

Pro Pro Pro Phe

1

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 28

Pro Pro Pro Ile

1