



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월08일

(11) 등록번호 10-2714600

(24) 등록일자 2024년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2019-7037055

(22) 출원일자(국제) 2018년05월15일

심사청구일자 2021년05월04일

(85) 번역문제출일자 2019년12월13일

(65) 공개번호 10-2020-0005659

(43) 공개일자 2020년01월15일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/062473

(87) 국제공개번호 WO 2018/210793

국제공개일자 2018년11월22일

(30) 우선권주장

17171285.4 2017년05월16일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

JP2017510251 A

(73) 특허권자

비온디스 비.브이.

네덜란드 6545 씨엠 네이메헌 마이크로베그 22

(72) 발명자

베르하이덴 자이스베르투스 프란시스쿠스 마리아

네덜란드 6545 씨엠 네이메헌 마이크로베그 22 신

톤 바이오파머슈티칼즈 비.브이.

로우벤달 제라드

네덜란드 6545 씨엠 네이메헌 마이크로베그 22 신

톤 바이오파머슈티칼즈 비.브이.

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 16 항

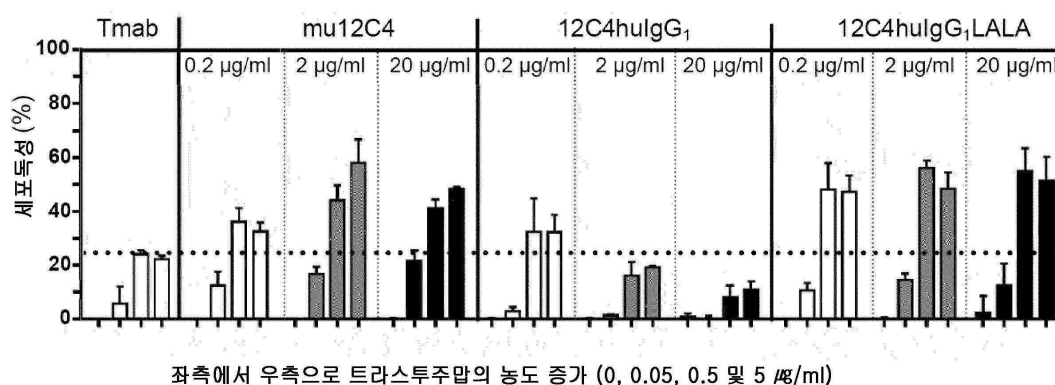
심사관 : 김윤선

(54) 발명의 명칭 항-SIRP α 항체

(57) 요약

본 발명은 항암 요법에 사용하기 적합한 SIRP α 에 대한 항체에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 있어, 경우에 따라 다른 항암 치료제와 조합된, 항-SIRP α 항체의 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/72 (2013.01)

C07K 2317/732 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

아렌즈 툴란트 안

네덜란드 6545 씨엠 네이메헌 마이크로베그 22 신
톤 바이오파머슈티칼즈 비.브이.

반 덴 베르크 티모 카르스

네덜란드 1066 씨엑스 암스테르담 플레스만란 125
스티치팅 산퀸 블로에드보르지에닝 내

마트롱 한케 로티에

네덜란드 1066 씨엑스 암스테르담 플레스만란 125
스티치팅 산퀸 블로에드보르지에닝 내

프란케 카타리나

네덜란드 1066 씨엑스 암스테르담 플레스만란 125
스티치팅 산퀸 블로에드보르지에닝 내

명세서

청구범위

청구항 1

중쇄(HC) 및 경쇄(LC) 가변 영역(VR) 상보성 결정 영역(CDR) CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서,

- HC VR CDR1은 아미노산 서열 HGIS(서열 번호 77)로 이루어지고,
- HC VR CDR2는 아미노산 서열 TIGTGVITYFASWAKG(서열 번호 78)로 이루어지고,
- HC VR CDR3은 아미노산 서열 GSAWNPFPDP(서열 번호 79)로 이루어지고,
- LC VR CDR1은 아미노산 서열 QASQSVYGNNDLA(서열 번호 80)로 이루어지고,
- LC VR CDR2는 아미노산 서열 LASTLAT(서열 번호 81)로 이루어지고,
- LC VR CDR3은 아미노산 서열 LGGGDDEADNV(서열 번호 82)로 이루어지며.

여기서 CDR은 카바트(Kabat) 넘버링에 따라 결정되는 것인 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 키메라, 인간화 또는 인간 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 3

제2항에 있어서, 인간화 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 4

제3항에 있어서,

- 서열 번호 35의 HC VR 아미노산 서열 및 서열 번호 36의 LC VR 아미노산 서열;
 - 서열 번호 35의 HC VR 아미노산 서열 및 서열 번호 37의 LC VR 아미노산 서열;
 - 서열 번호 13의 HC VR 아미노산 서열 및 서열 번호 38의 LC VR 아미노산 서열; 또는
 - 서열 번호 13의 HC VR 아미노산 서열 및 서열 번호 37의 LC VR 아미노산 서열
- 을 포함하는 인간화 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 야생형 Fc 영역을 포함하는 동일한 항-SIRP α 항체와 비교하여 인간 Fc α 또는 Fc γ 수용체에 대해 감소된 결합을 나타내는 변경된 Fc 영역을 포함하는 항-SIRP α 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, Eu 넘버링에 따른 L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328, 및 P329로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 위치에 아미노산 치환을 포함하는 변경된 인간 IgG1 Fc 영역을 포함하는 항-SIRP α 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 아미노산 치환 L234A 및 L235A; L234E 및 L235A; L234A, L235A 및 P329A; 또는 L234A, L235A 및 P329G를 포함하는 항-SIRP α 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 아미노산 치환 L234A 및 L235A; 또는 L234E 및 L235A를 포함하는 항-SIRP α 항체.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 인간 고형 종양 또는 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 하나 이상의 다른 항암 치료제와 조합하여 포함하는, 인간 고형 종양 또는 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 하나 이상의 다른 항암 치료제가 표적 치료제 또는 면역치료제인 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 표적 치료제가 치료용 항체 또는 항체-약물 접합체인 약학 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 치료용 항체가, 인간 면역 이펙터 세포에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 결합하는 인간 Fc 영역을 포함하는, 종양 세포의 표면 상의 막-결합 표적에 대한 치료용 항체인 약학 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 치료용 항체가, 아넥신 A1, B7H3, B7H4, CA6, CA9, CA15-3, CA19-9, CA27-29, CA125, CA242, CCR2, CCR5, CD2, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD56, CD70, CD74, CD79, CD115, CD123, CD138, CD203c, CD303, CD333, CEA, CEACAM, CLCA-1, CLL-1, c-MET, 크립토(Cripto), CTLA-4, DLL3, EGFL, EGFR, EPCAM, Eph, 엔도텔린 B 수용체(ETBR), FAP, FcRL5(CD307), FGF, FGFR, FOLR1, GCC, GPNMB, HER2, HMW-MAA, 인테그린 α , IGF1R, TM4SF1 (또는 L6 항원), 루이스(Lewis) A 유사 카보하이드레이트, 루이스 X, 루이스 Y, LIV1, 메소텔린, MUC1, MUC16, NaPi2b, 넥틴(Nectin)-4, PD-1, PD-L1, PSMA, PTK7, SLC44A4, STEAP-1, 5T4 항원 (또는 TPBG, 영양막 당단백질), TF(조직 인자), 톰슨 프라이덴리히(Thomsen-Friedenreich) 항원(TF-Ag), Tag72, TNF, TNFR, TROP2, VEGF, VEGFR, 및 VLA로 이루어진 군에서 선택되는 표적에 결합하는 적어도 하나의 HCVR 및 LCVR을 포함하는 단일특이적 또는 이중특이적 항체 또는 항체 단편인 약학 조성물.

청구항 15

제12항에 있어서, 치료용 항체가 알렘투주맙, 베바시주맙, 세특시맙, 파니투무맙, 리툽시맙, 및 트라스투주맙으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 16

제12항에 있어서, 항체-약물 접합체가 트라스투주맙 엠탄신 또는 브렌톡시맙 베도틴인 약학 조성물.

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 SIRP α 에 대한 항체, 및 암의 치료에 있어, 경우에 따라 다른 항암 치료제와 조합되는, 이들 항체의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 1990년대 후반부터, 치료용 항체가 암의 치료에 이용되어져 왔다. 이들 치료용 항체는 다양한 경로를 통해 악성 세포에 작용할 수 있다. 악성 세포 상의 표적에 대한 항체의 결합에 의해 유발되는 신호 전달 경로는 세포 증식의 억제 또는 아포토시스를 초래한다. 치료용 항체의 Fc 영역은 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체-의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 및 항체-의존성 세포성 식작용(ADCP)을 유발할 수 있다. 그러나, 치료용 항체는 종종 단일 요법으로서 충분히 효과적이지 않다. 치료용 항체의 효능을 개선하기 위한 한 옵션은 ADCC 및/또는 ADCP의 개선을 통한 것이다. 이것은, 예를 들어 아미노산 치환에 의해, Fc γ 수용체에 대한 Fc 영역의 친화성을 개선시킴으로써(Richards *et al. Mol. Cancer Ther.* 2008, 7(8), 2517-2527) 또는 Fc 영역의 글리코실화에 영향을 줌으로써(Hayes *et al. J. Inflamm. Res.* 2016, 9, 209-219) 이루어져 왔다.
- [0003] 치료용 항체의 ADCC 및/또는 ADCP를 개선하는 또 다른 방식은 치료용 항체를 신호 조절 단백질 α 에 대한 길항성 항체(항-SIRP α) 또는 항-CD47 항체(WO2009/131453)와 조합하는 것이다. CD47이 단핵구, 대식세포, 수지상 세포 및 호중구에서 발현된 억제성 면역수용체 SIRP α 에 결합할 때, SIRP α 는 식세포작용 또는 면역 억제 세포의 다른 Fc-수용체-의존성 세포 파괴 메커니즘에 의해 암세포의 파괴를 방지하는 억제 신호를 전달한다.
- [0004] 종양 세포는 치료용 항체에 의해 유도되는 항-종양 면역 반응을 회피하는 메커니즘으로서 CD47의 상호조절을 이용한다. 항-CD47 또는 항-SIRP α 항체는 CD47-SIRP α 축을 통해 생성된 억제성 신호 전달을 차단하여, ADCC 및/또는 ADCP를 증가시킨다.
- [0005] CD47-SIRP α 상호 작용과 관련된 대부분의 임상 연구는, 단일 요법으로서 그리고 치료용 항체와 조합한 요법으로서, 항-CD47 항체에 중점을 두고있다(Weiskopf. *Eur. J. Cancer* 2017, 76, 100-109). CD47이 또한 대부분의 정상 조직의 세포 표면에서 발현된다는 사실에도 불구하고, 항암 치료제로서 항-CD47 항체에 관한 연구가 증가하고 있다.
- [0006] 항-SIRP α 항체를 사용한 항암 단일 요법 또는 병용 요법에 대한 연구는 거의 수행되지 않았다. 항-SIRP α 항체에 대한 연구의 대부분은 CD47-SIRP α 상호 작용에 관한 메커니즘적 연구이며 무린 항-SIRP α 항체를 사용하여 수행되었으며; 예를 들어, 무린 12C4 및 1.23A는 트라스투주맙 오프소닌화된 SKBR3 세포의 호중구 매개 ADCC를 증가시켰다(Zhao *et al. PNAS* 2011, 108(45), 18342-18347). WO2015/138600은 무린 항-인간 SIRP α 항체 KWAR23 및 이의 키메라 Fab 단편을 개시하며, 이는 세톡시맙의 시험관내 식세포작용을 증가시켰다. N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG₁ Fc 부분을 갖는 인간화 KWAR23이 WO2018/026600에 개시되어 있다. WO2013/056352는 IgG₄ 29AM4-5 및 다른 IgG₄ 인간 항-SIRP α 항체를 개시한다. 8 mg/kg으로 4주 동안 주당 3회 투여된 IgG₄ 29AM4-5는 NOD scid 감마(NSG) 마우스의 오른쪽 대퇴골에 주사된 초대 인간 AML 세포의 백혈병 생착을 감소시켰다.
- [0007] SIRP α 는 면역 억제 세포 상에 존재하는 세포외 Ig-유사 도메인을 갖는 막 관통 당단백질인 신호 조절 단백질(SIRP)의 패밀리의 구성원이다. SIRP α 의 NH₂-말단 리간드 결합 도메인은 고도로 다형이다(Takenaka *et al. Nature Immun.* 2007, 8(12), 1313-1323). 그러나, 이러한 다형은 CD47에의 결합에 크게 영향을 미치지 않는다. SIRP $\alpha_{\text{BIT}}(\text{v1})$ 및 SIRP $\alpha_1(\text{v2})$ 이 2종의 가장 일반적이고 가장 다양한 (13개의 잔기가 다른) 다형체이다(Hatherley *et al. J. Biol. Chem.* 2014, 289(14), 10024-10028). 다른 생화학적으로 특징규명된 인간 SIRP 패밀리 구성원은 SIRP β_1 , 및 SIRP γ 이다.
- [0008] SIRP β_1 은 CD47에 결합하지 않고(van Beek *et al. J. Immunol.* 2005, 175 (12), 7781-7787, 7788-7789), 적어도 2종의 SIRP β_1 다형 변이(체), SIRP $\beta_{1\text{v1}}$ (ENSP00000371018) 및 SIRP $\beta_{1\text{v2}}$ (ENSP00000279477)가 공지되어 있다. SIRP β_1 의 천연 리간드가 알려져 있지 않지만, 항-SIRP β_1 특이적 항체를 이용한 시험관내 연구는 SIRP β_1 의 관여가 DAP12, Syk 및 SLP-76의 티로신 인산화 및 MEK-MAPK-미오신 경계 키나제 캐스케이드의 후속 활성화를 유도함으로써 대식세포에서 식세포작용을 촉진하는 것을 보여준다(Matuzaki *et al. J. Biol. Chem.* 2004, 279(28), 29450-29460).
- [0009] SIRP γ 는 T-세포 및 활성화된 NK-세포에서 발현되고 SIRP α 와 비교하여 10 배 낮은 친화도로 CD47에 결합한다. CD47-SIRP γ 상호 작용은 항원-제시 세포와 T-세포 사이의 접촉, T-세포 활성화의 공동-자극 및 T-세포 증식의 촉진에 관여한다(Piccio *et al. Blood* 2005, 105, 2421-2427). 또한, CD47-SIRP γ 상호 작용은 T-세포의 경내피 이동에서 역할을 한다(Stefanisakis *et al. Blood* 2008, 112, 1280-1289).
- [0010] 당업계에 공지된 항-SIRP α 항체는 인간 SIRP α 에 특이적이지 않거나 너무 특이적이기 때문에 SIRP α 지향의 단일 또는 병용 요법에 사용하기에 덜 적합하다. 종래 기술의 항체 KWAR23, SE5A5, 29AM4-5 및 12C4는 또한 인간

SIRP γ 에 결합하기 때문에 특이적이지 않다. T-세포 상에서 발현되는 SIRP γ 에 대한 결합은 T-세포 증식 및 동원에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 다른 항-SIRP α 항체는 너무 제한적인 특이성을 가지는데, 예를 들어 1.23A mAb는 인간 SIRP α 다형 변이 SIRP α_1 만을 인식하며, 적어도 백인 집단에서 우세한 변이 SIRP α_{BIT} 는 인식하지 못한다(X.W. Zhao *et al.* PNAS 2011, 108(45), 18342-18347).

[0011] 치료용 항체의 ADCC를 증가시키기 위해 항-SIRP α 항체를 사용하는 것 외에도, 이들 항체는 SIRP α -발현 암 유형을 직접 표적화하는데 사용될 수도 있다. 기능적 Fc 영역을 갖는 무린 항-SIRP α 항체는 SIRP α 를 발현하는 Renca 세포 및 B16BL6 흑색종 세포가 주사된 마우스에서 종양 형성을 늦추기 때문에, 야생형 인간-Fc를 포함하는 항-SIRP α 항체는 신장 세포암종 및 악성 흑색종과 같은 SIRP α 를 발현하는 암을 치료하는데 적합할 수 있다(Yanagita *et al.* JCI Insight 2017, 2(1), e89140).

[0012] 결론적으로, SIRP γ 에 대한 결합이 낮고, SIRP α_1 및 SIRP α_{BIT} 다형 변이 모두에 특이적으로 결합하고 항암 요법에 단독으로 또는 치료용 항체와 조합하여 사용하기에 적합한, 항-SIRP α 항체에 대한 니즈가 존재한다.

발명의 내용

[0013] 본 발명은 항암 요법에 사용하기 적합한 SIRP α 에 대한 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 인간 고품종 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 있어 상기 항체의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1. 인간 호중구를 이펙터 세포로서 사용하여 SKBR3 HER2 양성 유방암 세포에서 측정된, 트라스투주맙(Tmab) 단독, 트라스투주맙과 무린 12C4 항-SIRP α 항체(mu12C4)의 조합, 트라스투주맙과 무린 12C4 가변 영역이 인간 IgG₁ 불변 영역에 이식된 항체(12C4huIgG₁)의 조합, 및 트라스투주맙과 무린 12C4 가변 영역이 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 인간 IgG₁ 불변 영역에 이식된 항체(12C4huIgG₁LALA)의 조합에 있어 %세포독성으로 측정된 ADCC의 비교.

도 2. SKBR3 세포 상에서, 트라스투주맙과, 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 인간 IgG₁ 불변 영역을 갖는 항-SIRP α 항체 1-9의 조합, 항-SIRP α 항체 12C4huIgG₁LALA(12C4LALA)의 조합 및 항-CD47 항체 B6H12huIgG₁LALA(B6H12LALA)의 조합의, 트라스투주맙(100%로 설정)에 대한 %ADCC의 비교. 채워진 사각형(■)은 SIRP α_{BIT} 변이를 갖는 도너(donor)의 호중구로 측정된 값이고, 빈 원형(○)은 SIRP α_1 변이를 갖는 도너의 호중구로 측정된 값이다. 열은 모든 도너의 평균이고; 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 3. SKBR3 세포 상에서, 트라스투주맙 단독, 및 트라스투주맙과, 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 인간 IgG₁ 불변 영역을 갖는 각종 농도(용량 반응 곡선)의 항-SIRP α 항체 4, 7, 10, 14의 조합, 및 항-SIRP α 항체 12C4huIgG₁LALA(12C4LALA)의 조합에 대한 %ADCC의 비교. 두 도너(△, ○)의 호중구는 SIRP α_{BIT} 변이를 갖는다. 열은 두 도너의 평균이다.

도 4. SKBR3 세포 상에서, 트라스투주맙 단독, 및 트라스투주맙과, 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 인간 IgG₁ 불변 영역을 갖는 항-SIRP α 항체 4, 7, 10, 13, 14, 15 및 16의 조합, 및 항-SIRP α 항체 12C4huIgG₁LALA(12C4LALA)와의 조합에 대한 %ADCC의 비교. SIRP α_{BIT} 변이(△, ○, ▽, ◇)를 갖는 도너의 호중구, SIRP α_1 변이(○, ●)를 갖는 도너의 호중구, 및 변이가 확인되지 않은(□) 도너의 호중구가 사용되었다. 열은 도너의 평균이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] SIRP α 에 대한 승인된 치료제가 입수 가능하지 않지만, 이 표적은 종양 면역 회피 메커니즘에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 나아가, SIRP α 는 다양한 악성 세포에서 발현되어 잠재적 종양 관련 항원이 된다.

[0016] 본 발명은 2개의 주요 SIRP α 다형 변이 SIRP α_{BIT} 및 SIRP α_1 에 특이적인 결합을 나타내고, SIRP γ 에 결합하지 않으며 치료용 항체의 ADCC 및/또는 ADCP를 증가시키는 길항성 항-SIRP α 항체에 관한 것이다.

[0017] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어 "항체"는 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 모노클로날 항체(mAb)를

지칭한다. 항체는 임의의 이소타입 예컨대 IgA, IgE, IgG, 또는 IgM 항체일 수 있다. 바람직하게는, 항체는 IgG 항체이고, 더 바람직하게는 IgG₁ 또는 IgG₂ 항체이다. 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 인간화 항체이다. 더욱 더 바람직하게는, 항체는 인간화 또는 인간 IgG 항체이고, 가장 바람직하게는 인간화 또는 인간 IgG₁ mAb이다. 항체는 κ (카파) 또는 λ (람다) 경쇄를 가질 수 있으며, 바람직하게는 κ (카파) 경쇄를 가질 수 있는, 즉, 인간화 또는 인간 IgG₁- κ 항체이다. 항체는 조작된 불변 영역을 포함할 수 있으며, 즉, 하나 이상의 돌연변이가 도입되어 예를 들어 반감기를 증가시키고/거나, 이펙터 기능을 증가 또는 감소시킬 수 있다.

[0018] 본원에서 사용된 용어 "모노클로날 항체" 및 "mAb"는 실질적으로 균일한 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉, 상기 집단을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 항체는 동물을 원하는 항원을 나타내는 펩티드의 혼합물로 면역화함으로써 생성될 수 있다. B-림프구를 단리하고 골수종 세포와 융합시키거나 단일 B-림프구를 조건화된 배지 및 피더 세포의 존재하에 며칠 동안 배양한다. 생성된 항체를 함유하는 골수종 또는 B-림프구 상정액을 검사하여 적합한 B-림프구 또는 하이브리도마를 선택한다. 모노클로날 항체는 문헌[Koehler *et al.* *Nature* 1975, 256, 495-497]에 의해 처음 설명한 하이브리도마 방법론에 의해 적합한 하이브리도마로부터 제조될 수 있다. 대안으로, 적합한 B-세포 또는 림프종의 RNA가 용해될 수 있고, RNA가 단리되고 역전사되고 서열분석될 수 있다. 항체는 박테리아, 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조). "모노클로날 항체"는 또한 선행 기술, 예를 들어 문헌[Clackson *et al.* *Nature* 1919, 352, 624-628] 및 [Marks *et al.* *J. Mol. Biol.* 1991, 222, 581-597]에 기재된 기법을 사용하여 과거 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0019] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용된 용어 "항원 결합 단편"은 Fab, Fab' 또는 F(ab')₂ 단편, 단일쇄(sc) 항체, scFv, 단일 도메인(sd) 항체, 디아바디, 또는 미니바디를 포함한다.

[0020] 인간화 항체에서, 중쇄(HC) 및 경쇄(LC)의 가변 영역(VR)에서 항원 결합 상보성 결정 영역(CDR)은 비-인간 중, 통상적으로 마우스, 래트 또는 토끼로부터의 항체에서 유래한다. 이들 비-인간 CDR은, 항체의 기능적 특성, 예컨대 결합 친화성 및 특이성이 보유되도록 하는 방식으로 HC 및 LC의 가변 영역의 인간 프레임워크 영역(FR1, FR2, FR3 및 FR4)과 조합된다. 인간 FR에서 선택된 아미노산이 낮은 면역원성을 유지하면서 결합 친화성을 개선하기 위해 상응하는 오리지널 비-인간 종의 아미노산으로 교환될 수 있다. 대안으로, 오리지널 비-인간 종의 FR의 선택된 아미노산이 항체의 결합 친화성을 유지하면서 면역원성을 감소시키기 위해 상응하는 인간 아미노산으로 교환된다. 이에 인간화 가변 영역은 인간 불변 영역과 조합된다.

[0021] CDR은 카바트(Kabat, E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., NIH publication no. 91-3242, pp. 662, 680, 689 (1991)), 초티아(Chothia *et al.*, *Nature* 1989, 342, 877-883) 또는 IMGT(Lefranc, *Immunologist* 1999, 7, 132-136)의 어프로치를 사용하여 결정될 수 있다. 본 발명의 맥락에서는, Eu 넘버링이 항체의 중쇄 및 경쇄 불변 영역의 위치를 나타내기 위해 사용된다. "Eu 넘버링"이라는 표현은 Kabat, E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., NIH publication no. 91-3242, pp. 662, 680, 689 (1991)에서와 같이 Eu 인덱스를 나타낸다.

[0022] 길항성 항체는 특정 항원에 대한 친화성을 가지며, 항체의 이의 항원에 대한 결합은 수용체에서 작용제 또는 역작용제의 기능을 억제한다. 이 경우에, 길항성 항-SIRP α 항체의 SIRP α 에 대한 결합은 CD47의 SIRP α 에 대한 결합을 방지하거나 또는 CD47-SIRP α 결합에 의해 촉발되는 억제 신호를 방해할 것이다.

[0023] 길항성 항-SIRP α 항체는 CD47이 결합하는 동일 부위에 결합하여, CD47에 의한 SIRP α 의 라이게이션을 방지하고 결과적으로 면역 이펙터 세포의 Fc-수용체-의존적 작용을 음성으로 조절하는 신호 전달을 억제할 수 있다. 길항성 항-SIRP α 항체는 또한 CD47의 결합 부위와 다른 SIRP α 의 부위, 즉, 알로스테릭 부위에 결합하여, 물리적 CD47-SIRP α 상호 작용, 예를 들어 SIRP α 의 3차원 형상의 변화에 대한 직접적인 간섭없이 SIRP α 의 억제성 신호 전달을 저해한다. 이러한 3차원 형상의 변화는 CD47에 결합할 때 (다운스트림) 신호 전달을 방지한다. SIRP α 가 알로스테릭 부위에 결합될 때, CD47은 여전히 SIRP α 에 의해 결합될 수 있으며, 이는 CD47이 트롬보스폰딘-1(TSP-1)에 대한 결합에 덜 이용 가능하게 할 수 있다. CD47에 대한 TSP-1의 라이게이션은 예를 들어 T-세포 활성화의 음성 조절에 역할을 담당한다(Soto-Pantoja *et al.* *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2015, 50(3), 212-230).

[0024] 본 명세서 전반에 사용되는 용어 "결합 친화성(친화도)"은 특정 항원-항체 상호 작용의 해리 상수(K_d)를 지칭한

다. K_D 는 해리 속도(k_{off}) 대 회합 속도(k_{on})의 비이다. 결과적으로, K_D 는 k_{off}/k_{on} 이고, 몰 농도(M)로서 표현된다. K_D 가 작을수록 결합 친화성이 강해진다. 전형적으로, K_D 값은 표면 플라스몬 공명(SPR)을 이용하여, 전형적으로 당업계에 공지된 방법(예를 들어, E.S. Day *et al. Anal. Biochem.* 2013, 440, 96-107)을 이용하는 바이오센서 시스템(예를 들어 Biacore®)를 사용하여 결정된다. 용어 "결합 친화성"은 또한 예를 들어 ELISA 어세이로 결정되거나 또는 유세포 분석에 의해 결정된 절반-최대 결합(EC_{50})을 제공하는 항체의 농도를 지칭할 수 있다.

[0025] 본 명세서 전반에 사용되는 용어 "특이적 결합"은 25°C에서 SPR에 의해 결정시 전형적으로 10^{-7} M 미만, 예컨대 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M 또는 심지어 그보다 낮은 K_D 로 항체와 그 항원 간의 결합에 관한 것이다.

[0026] 본 명세서 전반에 사용되는 용어 "낮은 친화성"은 문구 "~와 결합하지 않는다" 또는 "~에 결합되지 않는다"와 상호교환 가능하며 ELISA 어세이를 사용하여 결정시 1500 ng/ml 초과 EC_{50} 으로 항체와 그 항원 간의 결합 친화성을 지칭하거나, 또는 SPR에 의해 결정시 고정화된 항원과 항체 간에 특이적 결합이 관찰되지 않음을 지칭한다.

[0027] 본 명세서 전반에 사용되는 용어 "높은 친화성"은 25°C에서 SPR에 의해 결정시 전형적으로 10^{-10} M 미만, 10^{-11} M 또는 심지어 그보다 낮은 K_D 로 항체와 그 항원 간의 결합 친화성을 지칭한다.

[0028] 특히, 본 발명은 하기로 이루어진 군에서 선택된 중쇄(HC) 및 경쇄(LC) 가변 영역(VR) 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다:

[0029] a. 서열 번호 1의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 2의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

[0030] b. 서열 번호 3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 4의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

[0031] c. 서열 번호 5의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 6의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

[0032] d. 서열 번호 7의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

[0033] e. 서열 번호 9의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 10의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

[0034] f. 서열 번호 11의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 12의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

[0035] g. 서열 번호 13의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 14의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

[0036] h. 서열 번호 15의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 16의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; 및

[0037] i. 서열 번호 17의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 18의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열,

[0038] 여기서 CDR은 카바트 넘버링에 따라 결정된다.

[0039] 바람직하게는, 본 발명은 하기로 이루어진 군에서 선택된 중쇄(HC) 및 경쇄(LC) 가변 영역(VR) 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다:

[0040] a. 서열 번호 3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 4의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

[0041] b. 서열 번호 5의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 6의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

- [0042] c. 서열 번호 7의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0043] d. 서열 번호 9의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 10의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0044] e. 서열 번호 11의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 12의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0045] f. 서열 번호 13의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 14의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0046] g. 서열 번호 15의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 16의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; 및
- [0047] h. 서열 번호 17의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 18의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열,
- [0048] 여기서 CDR은 카바트 넘버링에 따라 결정된다.
- [0049] 더 바람직하게는, 본 발명은 하기로 이루어진 군에서 선택된 HCVR 및 LCVR CDR을 포함하는 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다:
- [0050] a. 서열 번호 3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 4의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0051] b. 서열 번호 5의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 6의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0052] c. 서열 번호 7의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0053] d. 서열 번호 9의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 10의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; 및
- [0054] e. 서열 번호 13의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 14의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열,
- [0055] 여기서 CDR은 카바트 넘버링에 따라 결정된다.
- [0056] 더욱 더 바람직하게는, 본 발명은 하기로 이루어진 군에서 선택된 HCVR 및 LCVR CDR을 포함하는 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다:
- [0057] a. 서열 번호 5의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 6의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0058] b. 서열 번호 7의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; 및
- [0059] c. 서열 번호 13의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 14의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열,
- [0060] 여기서 CDR은 카바트 넘버링에 따라 결정된다.
- [0061] 가장 바람직하게는, 본 발명은 하기로 이루어진 군에서 선택된 HCVR 및 LCVR CDR을 포함하는 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것이다:
- [0062] a. 서열 번호 7의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; 및
- [0063] b. 서열 번호 13의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 14의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열,

- [0064] 여기서 CDR은 카바트 넘버링에 따라 결정된다.
- [0065] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 앞서 정의된 바와 같은 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 관한 것으로, 여기서 항체는 SIRP α_{BIT} 및 SIRP α_1 둘 모두에 특이적인 결합을 나타내고 SIRP γ 에 결합하지 않는다.
- [0066] 보다 바람직한 실시양태에서, 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 10^{-9} M 미만의 K_D 로 SIRP α_{BIT} 에 특이적으로 결합하고 10^{-7} M 미만의 K_D 로 SIRP α_1 에 특이적으로 결합하며, 여기서 K_D 는 25°C에서 SPR로 측정된다. 바람직하게는, 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 10^{-8} M 미만의 K_D 로 SIRP α_1 에 결합한다.
- [0067] 또 다른 더 바람직한 실시양태에서, 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 10^{-9} M 미만의 K_D 로 SIRP α_{BIT} 및 SIRP α_1 에 특이적으로 결합하며, 여기서 K_D 는 25°C에서 SPR로 측정된다.
- [0068] 더욱 더 바람직한 실시양태에서, 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 10^{-10} M 미만의 K_D 로 SIRP α_{BIT} 및 SIRP α_1 에 특이적으로 결합한다. 바람직하게는, 항-SIRP α 또는 이의 항원 결합 단편 항체는 10^{-10} M 미만의 K_D 로 SIRP α_{BIT} 와 특이적으로 결합하고 10^{-11} M 미만의 K_D 로 SIRP α_1 과 특이적으로 결합한다. 전형적으로, 앞서 정의된 항-SIRP α 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체이다. 바람직하게는, 항-SIRP α 항체는 인간화 또는 인간 항체이다. 더 바람직하게는, 항-SIRP α 항체는 인간화 항체이다. 특징의 실시양태에서, 본 발명에 따른 인간화 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기로 이루어진 군에서 선택된 HCVR 및 LCVR을 포함한다:
- [0069] a. 서열 번호 30의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 31의 LCVR 아미노산 서열;
- [0070] b. 서열 번호 32의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 33의 LCVR 아미노산 서열;
- [0071] c. 서열 번호 34의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 LCVR 아미노산 서열;
- [0072] d. 서열 번호 35의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 36의 LCVR 아미노산 서열;
- [0073] e. 서열 번호 35의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 37의 LCVR 아미노산 서열;
- [0074] f. 서열 번호 13의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 38의 LCVR 아미노산 서열; 및
- [0075] g. 서열 번호 13의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 37의 LCVR 아미노산 서열.
- [0076] 바람직한 실시양태에서, 인간화 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 30의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 31의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.
- [0077] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간화 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 32의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 33의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.
- [0078] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간화 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 34의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.
- [0079] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간화 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 35의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 36의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.
- [0080] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간화 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 35의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 37의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.
- [0081] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간화 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 13의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 38의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.
- [0082] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 인간화 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 13의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 37의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.
- [0083] 인간 (hu)SIRP α_{BIT} 및 (hu)SIRP α_1 둘 다에 대한 결합 이외에, 본 발명에 따른 항체는 또한 시노물구스 원숭이 (cy)SIRP α 에 결합할 수 있어, 관련 동물 모델에서 생체내 연구를 가능하게 한다.

- [0084] 본 발명에 따른 항체는 CD47의 결합 부위와 다른 SIRP α 의 부위, 즉, 알로스테릭 부위에 결합하여 물리적 CD47-SIRP α 상호작용에 대한 직접적인 간섭없이 SIRP α 의 억제성 신호 전달을 저해할 수 있다. 대안으로, 항체는 CD47이 결합하는 동일한 부위에 결합할 수 있어, CD47에 의한 SIRP α 의 라이게이션을 방지하고 그 결과 면역 이펙터 세포의 Fc-수용체-의존적 작용을 음성으로 조절하는 신호 전달을 억제할 수 있다.
- [0085] 앞서 기재된 항-SIRP α 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 공지의 항-SIRP α 항체보다 특이적이며, SIRP α_{BIT} 및 SIRP α_1 둘 다에 대해 우수한 친화성을 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 항-SIRP α 항체는 SIRP γ 에 결합하지 않는다.
- [0086] 일 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 항-SIRP α 항체는 인간 면역 이펙터 세포에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 결합하는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 항-SIRP α 항체는 ADCC 및/또는 ADCP를 유발할 수 있기 때문에 SIRP α -양성 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 단일 요법에 적합하다. 인간 면역 이펙터 세포는 각종 활성화 Fc 수용체를 보유하며, 라이게이션 시 식세포작용, 사이토카인 방출, ADCC 및/또는 ADCP, 등을 촉발한다. 이러한 수용체의 예는 Fc γ 수용체, 예를 들어 Fc γ RI(CD64), Fc γ RIIA(CD32), Fc γ RIIIA(CD16a), Fc γ RIIIB(CD16b), Fc γ RIIC 및 Fc α 수용체 Fc α RI(CD89)이다. 다양한 천연 항체 이소타입이 이들 수용체에 결합한다. 예를 들어 IgG₁은 Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB에 결합하고; IgG₂는 Fc γ RIIA, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA에 결합하고; IgG₃은 Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB에 결합하고; IgG₄는 Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA에 결합하고; IgA는 Fc α RI에 결합한다.
- [0087] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항-SIRP α 항체는 IgA 또는 IgG 이소타입의 Fc 영역을 포함한다. IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄ 이소타입의 Fc 영역을 포함하는 항-SIRP α 항체가 보다 바람직하고; IgG₁, IgG₂ 또는 IgG₄ 이소타입이 더욱 더 바람직하다. IgG₁ 이소타입의 Fc 영역을 포함하는 항-SIRP α 항체가 가장 바람직하다.
- [0088] 인간 면역 이펙터 세포에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 결합하는 Fc 영역을 포함하는 항-SIRP α 항체가 SIRP α 를 발현하는 암을 치료하는데 적합할 수 있지만, 키메라 항-SIRP α IgG₁ 항체는, 인간 면역 이펙터 세포에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 결합하는 인간 Fc 영역을 포함하는 다른 항체(즉, ADCC 및/또는 ADCP를 유발할 수 있는 항체)와 함께 시험관내에서 시험했을 때 예상된 결과를 나타내지 않았다. 시험관내 ADCC 어세이의 결과는, 키메라 IgG₁ 항-SIRP α 항체가 무린 항체를 사용한 이전의 결과에 기초하여 예상되는 만큼, 그러한 다른 항체의 ADCC를 증가시키지 않는다는 것을 보여주었다.
- [0089] 따라서, 본 발명은 인간 면역 이펙터 세포에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 대해 감소된 결합 또는 낮은 친화성을 나타내는 항-SIRP α 항체에 관한 것이다. 이러한 항-SIRP α 항체는 유사한 비변경된 Fc 영역과 비교했을 때 하나 이상의 아미노산이 (또)다른 아미노산(들)으로 치환된 변경된 Fc 영역을 포함한다. 감소된 결합은, 활성화 Fc 수용체에 대해 변경된 Fc 영역을 포함하는 항-SIRP α 항체의 친화성이 유사한 비변경된 Fc 영역을 포함하는 동일한 가변 영역을 갖는 항-SIRP α 항체의 친화성보다 낮다는 것을 의미한다. 활성화 Fc 수용체에 대한 항체의 결합 친화성은 전형적으로 당업계에서 공지된 방법, 예를 들어 문헌[Harrison *et al.* in *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 63, 23-28]의 방법을 사용하여 표면 플라즈몬 공명(SPR) 또는 유세포 분석에 의해 측정된다. 인간 Fc α 또는 Fc γ 수용체에 대해 감소된 결합 또는 낮은 친화성을 나타내는 항체는, 치료용 항체와 조합되어, 이펙터 면역 이펙터 세포의 ADCC 및/또는 ADCP를 증가시킴으로써 암세포의 세포 파괴에 특히 효과적이다. 전형적으로, 본 발명에 따른 항-SIRP α 항체의 Fc 영역은 인간 면역 이펙터 세포에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 대한 결합을 감소시키도록 변경된다.
- [0090] 따라서, 본 발명에 따른 항-SIRP α 항체는, 인간 Fc α 또는 Fc γ 수용체에 대해 감소된 결합 또는 낮은 친화성을 나타내는 변경된 Fc 영역을 포함한다. 예를 들면, Fc γ 수용체에 대한 IgG₁ 결합은 L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328, 및 P329 (Eu 넘버링)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 IgG₁ 아미노산을 치환함으로써 감소될 수 있고; IgG₂ 결합은 예를 들어 이하의 아미노산 치환 V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, 및 P331S; 또는 H268Q, V309L, A330S, 및 P331S (IgG₁ Eu 넘버링에 유사한 넘버링) (Vafa *et al. Methods* 2014, 65, 114-126) 중 하나 이상을 도입함으로써 감소될 수 있고; IgG₃ 결합은 예를 들어 아미노산 치환 L234A 및 L235A, 또는 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P331S (Leoh *et al. Mol. Immunol.* 2015, 67, 407-415)을 도입함으로써 감소될 수 있고; IgG₄ 결합은 예를 들어 아미노산 치환 S228P, F234A 및 L235A (IgG₁ Eu

넘버링에 유사한 넘버링) (Parekh *et al. mAbs* 2012, 4(3), 310-318)를 도입함으로써 감소될 수 있다. Fc α 수용체에 대한 IgA 결합은 예를 들어 아미노산 치환 L257R, P440A, A442R, F443R, 및 P440R (순차적 넘버링, Pleass *et al. J. Biol. Chem.* 1999, 271(33), 23508-23514) 중 하나 이상을 도입함으로써 감소될 수 있다.

[0091] 바람직하게는, 본 발명에 따른 항-SIRP α 항체는, 인간 Fc γ 수용체에 대해 감소된 결합 또는 낮은 친화성을 나타내는 변경된 Fc 영역을 포함한다. 더 바람직하게는, 변경된 Fc 영역은 IgG 이소타입의 Fc 영역이다. 더욱 더 바람직하게는, 변경된 Fc 영역은 IgG₁, IgG₂ 또는 IgG₄ 이소타입의 Fc 영역이다.

[0092] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항-SIRP α 항체는 L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328, 및 P329 (Eu 넘버링)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 위치에 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변경된 인간 IgG₁ Fc 영역을 포함한다.

[0093] 바람직하게는, 항-SIRP α 항체는, 아미노산 치환 N297A 또는 N297G의 어느 것도 포함하지 않는 변경된 Fc IgG₁ 영역을 포함한다. 더 바람직하게는, 항-SIRP α 항체는, 위치 N297에서 아미노산 치환을 포함하지 않는 변경된 Fc IgG₁ 영역을 포함한다.

[0094] 일 실시양태에서, 변경된 인간 IgG₁ Fc 영역은 L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, N297A, N297G, A327Q, P328A, P329A 및 P329G로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 바람직하게는, 하나 이상의 아미노산 치환은 L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, N297A, P328A, P329A 및 P329G로 이루어진 군에서 선택된다.

[0095] 또 다른 실시양태에서, 변경된 인간 IgG₁ Fc 영역은 L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, A327Q, P328A, P329A 및 P329G로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 바람직하게는, 하나 이상의 아미노산 치환은 L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, P328A, P329A 및 P329G로 이루어진 군에서 선택된다. 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 아미노산 치환 N297A 또는 N297G를 포함하지 않는다. 더욱 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 위치 N297에서 아미노산 치환을 포함하지 않는다.

[0096] 바람직한 실시양태에서, 변경된 인간 IgG₁ Fc 영역은 아미노산 치환 L234A 및 L235A, L234E 및 L235A, L234A, L235A 및 P329A 또는 L234A, L235A 및 P329G를 포함한다. 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 아미노산 치환 N297A 또는 N297G를 포함하지 않는다. 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 위치 N297에서 아미노산 치환을 포함하지 않는다.

[0097] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항-SIRP α 항체는, 아미노산 치환 L234A 및 L235A 또는 L234E 및 L235A, 바람직하게는 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 변경된 인간 IgG₁ Fc 영역을 포함한다. 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 아미노산 치환 N297A 또는 N297G를 포함하지 않는다. 더욱 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 위치 N297에서 아미노산 치환을 포함하지 않는다.

[0098] 본 발명은 추가적으로 앞서 기재된 항-SIRP α 항체 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 항체와 같은 치료 용 단백질의 전형적인 약제학적 제제는 정맥내 주입 전에 (수성) 용해(즉, 재구성)를 필요로 하는 동결 건조된 케이크(동결 건조된 분말) 또는 사용 전에 해동이 필요한 동결된 (수성) 용액의 형태를 취한다.

[0099] 전형적으로, 약학 조성물은 동결 건조된 케이크의 형태로 제공된다. 본 발명에 따른 (동결 건조 전) 약학 조성물에 포함시키기 적합한 약학적으로 허용가능한 부형제는 버퍼 용액(예를 들어 물에 시트레이트, 히스티딘 또는 숙시네이트 함유 염), 동결보호제(예를 들어 수크로스, 트레할로스), 등장화제(예를 들어 염화나트륨), 계면활성제(예를 들어 폴리소르베이트), 및 증량제(예를 들어 만니톨, 글리신)를 포함한다. 동결 건조된 단백질 제제에 사용되는 부형제는 동결 건조 공정 동안뿐만 아니라 저장 동안 단백질 변성을 방지하는 능력으로 선택된다.

[0100] 본 발명은 추가적으로 약제로서 사용하기 위한 앞서 기재된 항-SIRP α 항체 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0101] 일 실시양태에서, 본 발명은 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 앞서 기재된 항-SIRP α

항체 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 항-SIRP α 항체는 고형 종양, 예컨대 유방암, 신장암, 또는 흑색종, 또는 혈액 악성 종양, 예컨대 급성 골수성 백혈병(AML)의 치료에 사용될 수 있다.

[0102] 제2 실시양태에서, 본 발명은 SIRP α -양성 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 인간 면역 이펙터 세포에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 결합하는 Fc 영역을 포함하는 항-SIRP α 항체에 관한 것이다. 바람직하게는, 인간 면역 이펙터 세포에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 결합하는 Fc 영역은 IgA 또는 IgG 이소타입의 것이다. IgG₁, IgG₂, IgG₃ 또는 IgG₄ 이소타입의 Fc 영역을 포함하는 항-SIRP α 항체가 더 바람직하고; IgG₁, IgG₂ 또는 IgG₄ 이소타입이 더욱 더 바람직하다. SIRP α -양성 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 IgG₁ 이소타입의 Fc 영역을 포함하는 항-SIRP α 항체가 가장 바람직하다.

[0103] 제3 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 다른 항암 요법의 사용과 조합하여 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 앞서 기재된 항-SIRP α 항체 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 적합한 항암 요법은 수술, 화학요법, 방사선 요법, 호르몬 요법, 표적 요법 및 면역요법이다. 앞서 기재된 항-SIRP α 항체 또는 약학 조성물은 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 있어 하나 이상의 다른 항암 요법의 사용과 조합하여 동시 또는 순차 사용을 위한 것일 수 있다. 특히, 앞서 기재된 항-SIRP α 항체 또는 약학 조성물은 하나 이상의 다른 항암 요법의 사용 이후에 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다.

[0104] 바람직하게는, 본 발명은 하나 이상의 다른 항암 치료제의 사용과 조합하여 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 앞서 기재된 항-SIRP α 항체 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 특히, 앞서 기재된 항-SIRP α 항체 또는 약학 조성물은 하나 이상의 다른 항암 치료제의 사용 이후에 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 것일 수 있다.

[0105] 적합한 항암 치료제는 화학 치료제, 방사선 치료제, 호르몬 치료제, 표적 치료제 및 면역치료제를 포함한다. 적합한 화학 치료제는 알킬화제, 예컨대 질소 머스터드, 니트로소우레아, 테트라진 및 아지리딘; 항대사산물, 예컨대 항-폴레이트, 플루오로피리미딘, 테옥시뉴클레오시드 유사체 및 티오프린; 항미세소관제, 예컨대 빈카 알칼로이드 및 탁산; 토포이소머라제 I 및 II 저해제; 및 세포독성 항생제, 예컨대 안트라사이클린 및 블레오마이신을 포함한다.

[0106] 적합한 방사선 치료제는 방사성 동위원소, 예컨대 ¹³¹I-메타요오도벤질구아니딘(MIBG), 소듐 포스페이트로서 ³²P, ²²³Ra 클로라이드, ⁸⁹Sr 클로라이드 및 ¹⁵³Sm 디아민 테트라메틸렌 포스포네이트(EDTMP)를 포함한다.

[0107] 호르몬 치료제로서 사용하기에 적합한 작용제는 호르몬 합성의 저해제, 예컨대 아로마타제 저해제 및 GnRH 유사체; 및 호르몬 수용체 길항제, 예컨대 선택적 에스트로젠 수용체 조절제 및 항안드로젠을 포함한다.

[0108] 표적 치료제는 종양형성 및 증식에 수반되는 특정 단백질을 방해하는 치료제이며 소분자 약물; 단백질, 예컨대 치료용 항체; 펩티드 및 펩티드 유도체; 또는 단백질-소분자 하이브리드, 예컨대 항체-약물 접합체일 수 있다. 표적 소분자 약물의 예는 mTor 저해제, 예컨대 에베롤리무스, 템시롤리무스 및 라파마이신; 키나제 저해제, 예컨대 이매티닙, 다사티닙 및 닐로티닙; VEGF 저해제, 예컨대 소라페닙 및 레고라페닙; 및 EGFR/HER2 저해제 예컨대 제피티닙, 라파티닙 및 에를로티닙을 포함한다. 펩티드 또는 펩티드 유도체 표적 치료제의 예는 프로테아좀 저해제, 예컨대 보르테오미드 및 카르필조미를 포함한다.

[0109] 면역치료제는 면역 반응을 유도, 향상 또는 억제하는 작용제, 예컨대 사이토카인(IL-2 및 IFN- α); 면역 조절성 이미드 약물, 예컨대 탈리도마이드, 레날리도마이드 및 포말리도마이드; 치료용 암 백신, 예컨대 탈리도젠 라허파랩백; 세포 기반 면역치료제, 예컨대 수지상 세포 백신, 입양 T-세포 및 키메라 항원 수용체-변경된 T-세포); 및 암 세포상의 막 결합 리간드에 결합할 때 그 Fc 영역을 통해 ADCC/ADCP 또는 CDC를 촉발할 수 있는 치료용 항체를 포함한다.

[0110] 바람직하게는, 본 발명은 하나 이상의 다른 항암 치료제와 조합하여 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 앞서 기재된 항-SIRP α 항체 또는 약학 조성물로서, 항암 치료제가 표적 치료제 또는 면역치료제인 항-SIRP α 항체 또는 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바람직한 표적 치료제는 치료용 항체 또는 항체-약물 접합체(ADC)이다. 가장 바람직한 표적 치료제는 치료용 항체이다.

[0111] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어 "치료용 항체"는 인간 요법에 적합한 앞서 정의된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭한다. 인간 요법에 적합한 항체는 특정 인간 질환의 치료에 충분한 품질, 안전성 및 효능을 갖는다. 품질은 우수 제조 관리 기준(Good Manufacturing Practice)에 대해 확립된 지침을 사용하여 평가될 수 있

고; 안전성과 효능은 일반적으로 의약품 규제 당국, 예를 들어, 유럽 의약품국(EMA) 또는 미국 식품 의약품(FDA)의 확립된 지침을 사용하여 평가된다. 이들 지침은 당업계에 익히 알려져 있다.

[0112] 바람직하게는, 치료용 항체는 의약품 규제 당국, 예컨대 EMA 또는 FDA에 의해 승인된 항체이다. 대부분의 규제 당국의 온라인 데이터베이스를 참조하여 항체 승인 여부를 확인할 수 있다.

[0113] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어 "ADC"는 링커를 통해 앞서 정의된 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 접합된 세포독성 약물을 지칭한다. 전형적으로, 세포독성 약물은 매우 강력한, 예를 들어 듀오카르마이신, 칼리케아미신, 피롤로벤조디아제핀(PBD) 이량체, 메이탄시노이드 또는 아우리스타틴 유도체이다. 링커는 절단 가능한, 예를 들어 절단성 디펩티드 발린-시트룰린(vc) 또는 발린-알라닌(va)을 포함할 수 있거나, 또는 비-절단성, 예를 들어 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트(SMCC)일 수 있다.

[0114] 전형적으로, 본 발명에 따른 항-SIRP α 항체와 조합하여 사용하기 위한 치료용 항체는, 아넥신 A1, B7H3, B7H4, CA6, CA9, CA15-3, CA19-9, CA27-29, CA125, CA242, CCR2, CCR5, CD2, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD47, CD56, CD70, CD74, CD79, CD115, CD123, CD138, CD203c, CD303, CD333, CEA, CEACAM, CLCA-1, CLL-1, c-MET, 크립토(Cripto), CTLA-4, DLL3, EGFL, EGFR, EPCAM, Eph (예를 들어 EphA2 또는 EphB3), 엔도텔린 B 수용체 (ETBR), FAP, FcRL5 (CD307), FGF, FGFR (예를 들어 FGFR3), FOLR1, GCC, GPNMB, HER2, HMW-MAA, 인테그린 α (예를 들어 $\alpha v \beta 3$ 및 $\alpha v \beta 5$), IGF1R, TM4SF1 (또는 L6 항원), 루이스 (Lewis) A 유사 카보하이드레이트, 루이스 X, 루이스 Y, LIV1, 메소텔린, MUC1, MUC16, NaPi2b, Nectin-4, PD-1, PD-L1, PSMA, PTK7, SLC44A4, STEAP-1, 5T4 항원 (또는 TPBG, 영양막 당단백질), TF (조직 인자), 톰슨 프 라이덴리히(Thomsen-Friedenreich) 항원 (TF-Ag), Tag72, TNF, TNFR, TROP2, VEGF, VEGFR, 및 VLA로 이루어진 군에서 선택되는 표적에 결합하는 적어도 하나의 HCVR 및 LCVR을 포함하는 단일특이적 또는 이중특이적 항체 또는 항체 단편이다.

[0115] 단일특이적 치료용 항체가 바람직하다. 종양 세포의 표면 상의 막-결합 표적에 대한 항체가 보다 바람직하다.

[0116] 본 발명에 따른 항-SIRP α 항체와 조합하여 사용하기 적합한 치료용 항체는 알렘투주맙, 베바시주맙, 세톡시맙, 파니투무맙, 리툽시맙, 및 트라스투주맙을 포함한다.

[0117] 본 발명에 따른 항-SIRP α 항체와 조합하여 사용하기 적합한 ADC는 트라스투주맙 엠탄신 및 브렌톡시맙 베도틴을 포함한다.

[0118] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 인간 면역 이펙터 세포 상에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 결합하는 인간 Fc 영역을 포함하는 종양 세포의 표면 상의 막-결합 표적에 대한 치료용 항체와 조합하여 앞서 언급한 사용을 위한 앞서 기재된 항-SIRP α 항체에 관한 것이다.

[0119] 앞서 기재한 바와 같이 이들 활성화 Fc 수용체와의 결합을 통해, 인간 면역 이펙터 세포 상에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 결합하는 인간 Fc 영역을 포함하는 치료용 항체는 ADCC 및/또는 ADCP를 유도할 수 있다. 인간 IgG, IgE, 또는 IgA 이소타입의 치료용 항체는 인간 면역 이펙터 세포 상에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 결합하는 인간 Fc 영역을 포함한다.

[0120] 본 발명에 따른 사용에 바람직한 치료용 항체는 IgG 또는 IgA 이소타입의 치료용 항체이다. IgG 이소타입, 예컨대 IgG₁, IgG₂, IgG₃, 및 IgG₄ 항체의 치료용 항체가 보다 바람직하다. IgG₁ 또는 IgG₂ 이소타입의 치료용 항체가 더욱 더 바람직하다. IgG₁ 이소타입의 치료용 항체가 가장 바람직하다.

[0121] 바람직하게는, 본 발명은, 인간 면역 이펙터 세포 상에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 결합하는 인간 Fc 영역을 포함하는 종양 세포의 표면 상의 막-결합 표적에 대한 치료용 항체의 사용과 조합하여 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한,

[0122] a. 서열 번호 1의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 2의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

[0123] b. 서열 번호 3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 4의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

[0124] c. 서열 번호 5의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 6의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;

- [0125] d. 서열 번호 7의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0126] e. 서열 번호 9의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 10의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0127] f. 서열 번호 11의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 12의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0128] g. 서열 번호 13의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 14의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0129] h. 서열 번호 15의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 16의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; 및
- [0130] i. 서열 번호 17의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 18의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열
- [0131] 로 이루어진 군에서 선택되는 HCVR 및 LCVR CDR을 포함하는 인간화 항-SIRP α 항체에 관한 것으로, 여기서 항-SIRP α 항체는 야생형 Fc 영역을 포함하는 동일한 항-SIRP α 항체와 비교하여 인간 Fc α 또는 Fc γ 수용체에 대한 감소된 결합을 나타내는 변경된 Fc 영역을 포함한다.
- [0132] 바람직한 실시양태에서, 치료용 항체와 조합하여 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는, L234, L235, G237, D265, D270, N297, A327, P328, 및 P329(Eu 넘버링)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변경된 인간 IgG₁ Fc 영역을 포함한다.
- [0133] 바람직하게는, 치료용 항체와 조합하여 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는, 아미노산 치환 N297A 또는 N297G를 포함하지 않는 변경된 Fc IgG₁ 영역을 포함한다. 더 바람직하게는, 항-SIRP α 항체는, 위치 N297에서 아미노산 치환을 포함하지 않는 변경된 Fc IgG₁ 영역을 포함한다.
- [0134] 일 실시양태에서, 변경된 인간 IgG₁ Fc 영역은 L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, N297A, N297G, A327Q, P328A, P329A, 및 P329G로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0135] 또 다른 실시양태에서, 치료용 항체와 조합하여 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는, L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, D270A, D270E, D270N, A327Q, P328A, P329A 및 P329G로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변경된 Fc IgG₁ 영역을 포함한다. 바람직하게는, 하나 이상의 아미노산 치환은 L234A, L234E, L235A, G237A, D265A, D265E, D265N, P328A, P329A 및 P329G로 이루어진 군에서 선택된다. 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 아미노산 치환 N297A 또는 N297G를 포함하지 않는다. 더욱 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 위치 N297에서 아미노산 치환을 포함하지 않는다.
- [0136] 바람직한 실시양태에서, 변경된 인간 IgG₁ Fc 영역은 아미노산 치환 L234A 및 L235A, L234E 및 L235A, L234A, L235A 및 P329A 또는 L234A, L235A 및 P329G를 포함한다. 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 아미노산 치환 N297A 또는 N297G를 포함하지 않는다. 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 위치 N297에서 아미노산 치환을 포함하지 않는다.
- [0137] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 치료용 항체와 조합하여 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는, 아미노산 치환 L234A 및 L235A 또는 L234E 및 L235A, 바람직하게는 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 변경된 인간 IgG₁ Fc 영역을 포함한다. 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 아미노산 치환 N297A 또는 N297G를 포함하지 않는다. 더욱 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 위치 N297에서 아미노산 치환을 포함하지 않는다.
- [0138] 바람직한 실시양태에서, 인간 면역 이펙터 세포 상에 존재하는 활성화 Fc 수용체에 결합하는 인간 Fc 영역을 포

합하는 종양 세포의 표면 상의 막-결합 표적에 대한 치료용 항체의 사용과 조합하여 인간 고형 종양 및 혈액 악성 종양의 치료에 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는, 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역, 및 하기로 이루어진 군에서 선택되는 HCVR 및 LCVR CDR을 포함한다:

- [0139] a. 서열 번호 3의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 4의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0140] b. 서열 번호 5의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 6의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0141] c. 서열 번호 7의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0142] d. 서열 번호 9의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 10의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; 및
- [0143] e. 서열 번호 13의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 14의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열.
- [0144] 제2의 바람직한 실시양태에서, 앞서 정의된 바와 같이 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역, 및 하기로 이루어진 군에서 선택되는 HCVR 및 LCVR CDR을 포함한다:
- [0145] a. 서열 번호 5의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 6의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열;
- [0146] b. 서열 번호 7의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; 및
- [0147] c. 서열 번호 13의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 14의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열.
- [0148] 제3의 바람직한 실시양태에서, 앞서 정의된 바와 같이 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역, 및 하기로 이루어진 군에서 선택되는 HCVR 및 LCVR CDR을 포함한다:
- [0149] a. 서열 번호 7의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열; 및
- [0150] b. 서열 번호 13의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열 및 서열 번호 14의 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열.
- [0151] 제4의 바람직한 실시양태에서, 앞서 정의된 바와 같이 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역, 및 이하의 것을 포함한다:
- [0152] a. 서열 번호 30의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 31의 LCVR 아미노산 서열;
- [0153] b. 서열 번호 32의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 33의 LCVR 아미노산 서열;
- [0154] c. 서열 번호 34의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 LCVR 아미노산 서열;
- [0155] d. 서열 번호 35의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 36의 LCVR 아미노산 서열;
- [0156] e. 서열 번호 35의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 37의 LCVR 아미노산 서열;
- [0157] f. 서열 번호 13의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 38의 LCVR 아미노산 서열; 또는
- [0158] g. 서열 번호 13의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 37의 LCVR 아미노산 서열.
- [0159] 일 바람직한 실시양태에서, 앞서 정의된 바와 같이 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역과, 서열 번호 30의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 31의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다. 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 아미노산 치환 N297A 또는 N297G를 포함하지 않는다. 더욱 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 위치 N297에서 아미노산 치환을 포함하지 않는다.
- [0160] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 앞서 정의된 바와 같이 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는 아미노산 치환

L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역과, 서열 번호 32의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 33의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.

[0161] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 앞서 정의된 바와 같이 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역과, 서열 번호 34의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 8의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.

[0162] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 앞서 정의된 바와 같이 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역과, 서열 번호 35의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 36의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.

[0163] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 앞서 정의된 바와 같이 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역과, 서열 번호 35의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 37의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.

[0164] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 앞서 정의된 바와 같이 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역과, 서열 번호 13의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 38의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.

[0165] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 앞서 정의된 바와 같이 사용하기 위한 인간화 항-SIRP α 항체는 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역과, 서열 번호 13의 HCVR 아미노산 서열 및 서열 번호 37의 LCVR 아미노산 서열을 포함한다.

[0166] 더 바람직하게는, 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 Fc 영역을 포함하는 앞서 정의된 바와 같이 사용하기 위한 앞서 정의된 인간화 항-SIRP α 항체는, 변경된 Fc IgG₁ 영역이 아미노산 치환 N297A 또는 N297G를 포함하지 않는다. 더욱 더 바람직하게는, 변경된 Fc IgG₁ 영역은 위치 N297에서 아미노산 치환을 포함하지 않는다.

[0167] 앞서 기재된 바와 같이 야생형 Fc 영역을 포함하는 동일한 항-SIRP α 항체와 비교했을 때 인간 Fc α 또는 Fc γ 수용체에 대해 감소된 결합을 나타내는 변경된 Fc 영역을 포함하는 항-SIRP α 항체는 SIRP α_{BIT} 또는 SIRP α_1 에 대해 동형 접합성의 상이한 도너로부터의 이펙터 세포로서 호중구를 사용하여 치료용 항체의 시험관내 ADCC를 향상시킨다. 이들 항체 모두가 대부분의 도너의 호중구를 사용하여 시험관내 ADCC를 증가시키며, 바람직한 항체는 심지어 모든 도너의 호중구를 사용하여 시험관내 ADCC를 증가시킨다.

[0168] **실시예**

[0169] **면역화 프로토콜 및 선택**

[0170] 토끼를 인간 (hu)SIRP α_{BIT} , 인간 (hu)SIRP α_1 및 시노물구스 (cy)SIRP α 의 세포외 도메인 영역을 나타내는 펩티드들의 혼합물로 반복적으로 면역화시켰다. 혈액을 다른 시점에 수집하고 림프구로 농축시켰다. 단일 B-세포를 마이크로타이터 플레이트의 단일 웰에 넣었다. 이들 B-세포를 조건화된 배지 및 피더 세포의 존재하에 며칠 동안 배양하였다. 이 기간 동안 이들은 모노클로날 항체를 생산하여 배양 배지(B-세포 상청액)에 방출했다. 이들 단일 B-세포의 상청액을 IgG 생산에 대해 분석했으며; 이후에 cySIRP α 및 항-Fc 항체에 대한 huSIRP α_{BIT} 및 huSIRP α_1 의 특이적 결합을 확인하였다. 적합한 상청액은 huSIRP α_{BIT} 및 huSIRP α_1 둘 다, 및 cySIRP α 에 결합하는 것들이었다. 히트 피킹(hit picking) 단계 이후에 마우스 (mu) SIRP α 및 huSIRP β_{1v1} , huSIRP β_{1v2} 및 huSIRP γ (항-표적으로서)에 대한 결합을 측정했다. 부가적으로, SIRP α_{BIT} 및 SIRP α_1 -과발현 CHO 세포에 대한 결합을 확인했다. 모체 CHO 세포에 대한 결합을 대조군 어세이로서 적용했다.

[0171] RNA 단리, 역전사 및 서열 분석을 위해 적합한 B-세포 용해물을 선택했다. 항체 경쇄 및 중쇄의 독특한 가변 영역을 유전자 합성하고 각각 항체 불변 영역 서열(카파 LC 서열 번호 26 및 인간 IgG₁ HC-LALA 포맷 서열 번호 27) 앞에서 클로닝 하였다.

[0172] HEK 293 세포를 Tecan Freedom Evo 플랫폼에서 자동화된 절차를 사용하여 항체 서열 함유 플라스미드로 일시적으로 형질감염시켰다. 플레이트 오토샘플러를 갖는 Dionex Ultimate 3000 HPLC 시스템에서 친화성 정제(단백질 A)를 사용하여 세포 상청액으로부터 면역글로불린을 정제했다. 생산된 항체를 ELISA-타입 어세이(ELISA: huSIRP α_1 , huSIRP α_{BIT} , cySIRP α , muSIRP α , huSIRP $\beta_{1v1}/\beta_{1v2}/\gamma$; 세포 결합 어세이: huSIRP α_1 , huSIRP α_{BIT})에서 시

험했다.

[0173] **항체의 일시적 발현**

[0174] a) cDNA 구성체 및 발현 벡터의 제조

[0175] 항체의 HCVR 아미노산 서열을 각각 N-말단에서 리더 서열(항체 1-9, 15, 16의 경우 서열 번호 28; 항체 10-14의 경우 서열 번호 39)에 결합시키고, C-말단에서 서열 번호 27에 따른 인간 IgG₁ HC LALA의 불변 도메인에 결합시켰다. 항체 12C4huIgG₁LALA, 12C4huIgG₁ 또는 29AM4-5huIgG₁LALA의 HCVR 아미노산 서열을 각각 N-말단에서 HAVT20 리더 서열(서열 번호 29)에 결합시키고 C-말단에서 서열 번호 27에 따른 인간 IgG₁ HC LALA 또는 야생형 인간 IgG₁ HC(서열 번호 25)의 불변 도메인에 결합시켰다. 생성된 키메라 아미노산 서열을 인간 세포(호모 사피엔스)에서의 발현을 위해 코돈-최적화된 cDNA 서열로 역번역시켰다. 마찬가지로, 상기 구성체의 LC에 대한 키메라 cDNA 서열은, 리더 서열의 서열들(항체 1-9, 12의 경우 서열 번호 28; 항체 10, 11, 13-16의 경우 서열 번호 40, 12C4huIgG₁LALA, 12C4huIgG₁ 및 29AM4-5huIgG₁LALA의 경우 서열 번호 29)을 N-말단에서 항체 1-16, 12C4huIgG₁LALA 및 12C4huIgG₁ 및 29AM4-5huIgG₁LALA의 LCVR에 그리고 C-말단에서 인간 IgG₁ κ 경쇄 불변 영역(서열 번호 26)에 결합시킴으로써 수득되었다. 표 1에 따른 HCVR 및 LCVR 서열을 사용하였다.

표 1

표 1: 항체 및 기준 항체의 HCVR 및 LCVR 서열

항체	HCVR	LCVR
1	서열 번호 1	서열 번호 2
2	서열 번호 3	서열 번호 4
3	서열 번호 5	서열 번호 6
4	서열 번호 7	서열 번호 8
5	서열 번호 9	서열 번호 10
6	서열 번호 11	서열 번호 12
7	서열 번호 13	서열 번호 14
8	서열 번호 15	서열 번호 16
9	서열 번호 17	서열 번호 18
29AM4-5huIgG ₁ LALA	서열 번호 19	서열 번호 20
12C4huIgG ₁ LALA	서열 번호 21	서열 번호 22
12C4huIgG ₁	서열 번호 21	서열 번호 22
KWAR23	서열 번호 23	서열 번호 24
10 인간화	서열 번호 30	서열 번호 31
11 인간화	서열 번호 32	서열 번호 33
12 인간화	서열 번호 34	서열 번호 8
13 인간화	서열 번호 35	서열 번호 36
14 인간화	서열 번호 35	서열 번호 37
15 인간화	서열 번호 13	서열 번호 38
16 인간화	서열 번호 13	서열 번호 37

[0176]

[0177] b) 벡터 구성 및 클로닝 전략

[0178] 항체 쌍의 발현을 위해 CMV:BGHpA 발현 카세트를 함유하는 포유동물 발현 벡터를 사용하였다. HC 또는 LC 발현 카세트(각각 CMV:HC:BGHpA 및 CMV:LC-BGHpA)를 함유하는 최종 벡터를 이. 콜라이(*E. coli*) NEB 5-알과 세포로 옮기고 증식시켰다. 형질감염을 위한 최종 발현 벡터의 대규모 생산은 Maxi- 또는 Megaprep 키트(Qiagen)를 사용하여 수행되었다.

[0179] c) 포유동물 세포에서의 일시적 발현

[0180] 시판되는 Expi293F 세포(Thermo Fisher)를 하기와 같이 제조사의 지시에 따라 ExpiFectamine 형질감염제를 사

용하여 발현 벡터로 형질감염시켰다: 75×10^7 세포를 300 mL FortiCHO 배지에 시딩하고, 300 μ g의 발현 벡터를 800 μ L의 ExpiFectamine 형질감염제와 조합하여 세포에 첨가하였다. 형질감염 후 1일째, 1.5 mL 인헨서 1 및 15 mL 인헨서 2를 배양물에 첨가하였다. 형질감염 후 6일째, 세포 배양 상청액을 15분 동안 4,000g에서 원심분리하여 수확하고 정화된 수확물을 PES 병 필터/MF 75 필터(Nalgene)를 통해 여과하였다.

[0181] **항체 결합 및 특이성**

[0182] **실험**

[0183] **ELISA 어세이:** 포스페이트 완충 식염(PBS) 중의 huSIRP α_1 , huSIRP α_{BIT} , huSIRP β_{1v1} , huSIRP β_{1v2} , huSIRP γ 및 cySIRP α 의 용액을 각각 ELISA를 위해 복수 웰 블랙 폴리스티렌 플레이트에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 부착을 허용했다. 결합되지 않은 단백질은 표준 세척 버퍼를 사용하여 3단계 세척으로 제거했다. 이후, 블로킹 버퍼를 웰에 첨가했다. 실온에서 1시간 인큐베이션 후, 웰을 표준 세척 버퍼로 3회 세척했다. 각종 농도의 버퍼 중의 항체를 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 결합되지 않은 항체는 표준 세척 버퍼를 사용하여 3단계 세척으로 제거했다. 버퍼 중의 염소 항 인간 IgG (Fab')₂:홀스 래디시 퍼옥시다제(HRP)를 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB)을 첨가하고 충분한 발색 후 HCl을 첨가했다. 450 nm/620 nm에서 흡광도를 판독했다.

[0184] **표면 플라스몬 공명(SPR) 어세이:** 25°C에서 표면 플라스몬 공명 장치(Biacore T200 시스템, GE Life Sciences)에서 단일 사이클 동역학 분석에 의해 친화성 분석을 수행하였다. 10 μ L/min에서 60초간 스트렙타비딘 접합체(20x 희석된 비오틴 CAPture 시약, GE Life Sciences)의 주입 후 10 μ L/min에서 60초간 런닝 버퍼(pH 7.4의 10 mM HEPES 버퍼, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA 및 0.005% v/v 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트(계면활성제 P20) 보유)에 5 μ g/mL의 SIRP 항원을 주입함으로써 비오틴화 SIRP 항원을 비오틴화 분자에 적합한 칩(Sensor Chip CAP, GE Life Sciences)의 표면 상에 포획시켰다. 베이스라인 안정화를 1분으로 설정한 후 런닝 버퍼(pH 7.4의 10 mM HEPES 버퍼, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA 및 0.005% v/v 폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트 보유)에서 5가지 증가 농도의 항-SIRP 항체를 주입했다. 각 단계에서, 모두 30 μ L/min의 유속에서, 150초의 회합 시간을 사용했고, 이후, 최고 농도에서만 1200초의 해리 시간을 사용했다. 6 M 구아니딘-HCl, 0.25 M NaOH 용액(유속 30 μ L/min으로 60초)으로 재생을 수행하였다. 비 항-SIRP(블랭크) 고정화 기준 흐름 채널 및 런닝 버퍼 주입을 사용하여 관찰된 센서그램에 대해 이중 블랭크 공제를 수행하였다. 센서그램에는 모든 시험된 항-SIRP 항체에 대해 1:1 랭뮤어 모델이 적합화되었다. 동역학 파라미터(k_a , k_d 및 K_D)를 Biacore T200 평가 소프트웨어(v3.1)를 사용하여 계산했다.

[0185] **유세포 분석:** 인간 SIRP α_{BIT} 항원을 내생적으로 발현하는 U937 세포 및 인간 SIRP α_1 , SIRP α_{BIT} 또는 cySIRP α 항원을 발현하는 CHO-S 차이나이즈 햄스터 난소 세포(ExpiCHO-S) 세포로부터 스크리닝 및 단리된 비조작된 서브클론에서 유래된 세포(96-웰 플레이트에서 100,000 세포/웰)를, 0.2% v/w BSA(Sigma-Aldrich, 미주리주 세인트루이스) 및 0.02% v/w NaN₃(Sigma-Aldrich)를 함유한 빙냉 FACS 버퍼(1x PBS (LONZA))로 3회 세척하고, 이후에 빙냉 FACS 버퍼에서 희석된 소정 농도 범위의 각 일차 mAb(50 μ L/웰)을 첨가했다. 4°C에서 30분의 인큐베이션 시간 후, 세포를 빙냉 FACS 버퍼로 3회 세척하고 50 μ L/웰 이차 mAb(AffiniPure F(ab')₂ 단편 염소-항-인간 IgG-APC, 1:6,000 희석, Jackson Immuno Research)를 첨가했다. 4°C에서 30분 후, 세포를 2회 세척하고 150 μ L FACS 버퍼에 재현탁시켰다. 형광 강도는 유세포 분석(BD FACSVerser, 뉴저지주 프랭클린 레이크스)에 의해 결정되었고 U937 세포 및 ExpiCHO-S 세포에 대한 중앙 형광 강도(MFI-Median)로서 표시되었다. GraphPad Prism(Windows의 경우 버전 7.02, GraphPad, 캘리포니아주 샌디에고)에서 가변 기울기(4개의 파라미터)를 갖는 시그모이드 용량-반응 방정식을 사용하여 비선형 회귀에 의해 곡선을 피팅하였다. EC₅₀ 값은 4-파라미터 로지스틱 피트(logistic fit)를 사용할 때 곡선의 하단과 상단의 중간의 반응을 제공하는 μ g/mL의 농도로서 계산되었다.

[0186] **결과**

[0187] **ELISA 어세이:** 항체 1-9 및 기준 항체에 대한 ELISA로 얻어진 huSIRP α_1 , huSIRP α_{BIT} , huSIRP β_1 , huSIRP β_{1v2} , huSIRP γ , cySIRP α 에의 결합을 위한 EC₅₀ 값이 표 2에 요약되어 있다. 모든 항체가 huSIRP α_1 및 huSIRP α_{BIT} 에 결합한다. 항체 29AM4-5huIgG₁LALA 및 12C4huIgG₁LALA는 huSIRP β_{1v1} , huSIRP β_{1v2} , 및 huSIRP γ 에 결합한다. 항체 2-6, 8 및 9는 huSIRP β_{1v1} 및 huSIRP γ 에 대해 낮은 친화성을 나타낸다. 항체 7은 huSIRP β_{1v1} 에는 결합하지

만, huSIRPβ_{1v2} 및 huSIRPγ에 대해 낮은 친화성을 갖는다. 항체 1은 huSIRPβ_{1v2} 및 huSIRPγ에 결합한다.

표 2

표 2: 항-SIRPα 항체 및 기준 항체의 특이성

항체	huSIRPα ₁ EC ₅₀ (ng/ml)	huSIRPα _{BIT} EC ₅₀ (ng/ml)	huSIRPβ _{1v1} EC ₅₀ (ng/ml)	huSIRPβ _{1v2} EC ₅₀ (ng/ml)	huSIRPγ EC ₅₀ (ng/ml)	cySIRPα EC ₅₀ (ng/ml)
1	39	21	100,000	58	43	305
2	33	27	100,000	28	100,000	38
3	15	24	100,000	89	5,216	36
4	53	25	100,000	92	100,000	99
5	31	21	3,518	110	100,000	123
6	21	20	100,000	24	100,000	33
7	23	20	14	100,000	100,000	335
8	19	20	100,000	19	100,000	26
9	23	26	100,000	47	100,000	30
29AM4-5*	9	9	13	17	34	11
12C4*	7	5	8	6	6	5

*huIgG₁LALA

EC₅₀ 값 > 100,000 은 100,000 으로 조정됨.

[0188]

[0189]

SPR 어레이: 기준 항체 KWAR23, huIgG₁12C4LALA 및 SE5A5(상업 공급자로부터 구입)와 비교하여 항체 4, 7, 10-14의 huSIRPα₁, huSIRPα_{BIT} 및 huSIRPγ에의 결합을 위한 K_D 값이 표 3에 요약되어 있다. 항체 4, 7, 10-14는 huSIRPα₁ 및 huSIRPα_{BIT} 둘 모두에 결합하고 huSIRPγ에 결합하지 않는다. 모든 기준 항체는 huSIRPγ에 결합한다.

표 3

표 3: SPR 데이터 (K_D(M))

항체	K _D (huSIRPα _{BIT})	K _D (huSIRPα ₁)	K _D (huSIRPγ)
KWAR23 마우스 IgG2a	<1.0E-11 ¹	<1.0E-11	<1.0E-11
KWAR23 huIgG ₁ LALA	<1.0E-11 ¹	1.1E-11	<1.0E-11
12C4huIgG ₁ LALA	1.5E-11	8.7E-11	1.6E-11
SE5A5	2.6E-9	2.2E-9	4.9E-8
4	<1.0E-11	2.6E-11	N ²
7	<1.0E-11	<1.0E-11	N
10 인간화	<1.0E-11	3.2E-9	N
11 인간화	1.4E-10	4.1E-8	N
12 인간화	<1.0E-11	5.9E-11	N
13 인간화	1.2E-11	<1.0E-11	N
14 인간화	8.9E-11	<1.0E-11	N

¹ <1.0E-11: K_D는 범위를 벗어나며 높은 친화성을 의미한다

² N: 특이적인 결합이 확인되지 않음

[0190]

[0191]

유세포 분석 어레이: 세포 상에서 발현되는 huSIRPα₁, huSIRPα_{BIT}, 및/또는 cySIRPα에 대한 각종 항체의 결합이 유세포 분석에 의해 결정되었다. 결합은 EC₅₀ 값으로 표시되며, 표 4에 제시되어 있다. 항체 2, 4, 5, 7, 8, 10-14는 huSIRPα₁, huSIRPα_{BIT} 및 cySIRPα에 결합한다. 항체 2, 4, 5, 7, 8, 10-14는 낮은 μg/mL 범위에서

cySIRP α 에 결합한다.

표 4

표 4: 유세포 분석 데이터

항체	U937 세포 (SIRPα _{BIT}) EC ₅₀ (μg/mL)	ExpiCHO-S (huSIRPα ₁) EC ₅₀ (μg/mL)	ExpiCHO-S (huSIRPα _{BIT}) EC ₅₀ (μg/mL)	ExpiCHO-S (cySIRPα) EC ₅₀ (μg/mL)
1	-	-	-	-
2	0.14	0.19	0.27	0.16
3	0.22	-	-	-
4	0.12	0.41	0.23	0.18
5	0.16	0.27	0.22	0.26
6	-	-	-	-
7	0.17	0.23	0.21	0.07
8	0.12	0.22	0.18	0.15
9	0.11	-	-	-
29AM4-5 huIgG ₁ LALA	0.25	-	-	-
12C4huIgG ₁ LALA	0.19	-	-	-
KWAR23 huIgG ₁ LALA	0.09	-	-	-
10	0.17	0.38	0.2	0.27
11	0.13	1.05	0.3	0.32
12	0.2	0.1	0.46	0.17
13	0.14	0.36	0.23	0.44
14	0.22	0.37	0.29	0.38
15	0.16	-	-	-
16	0.23	-	-	-

- 값이 결정되지 않음

[0192]

[0193]

CD47-SIRP α 결합의 항체 블로킹

[0194]

실험

[0195]

SIRP α₁ 또는 SIRP α_{BIT}로 형질감염된 CHO 세포 또는 대조군으로서 모체 CHO 세포를 투명한 바닥을 갖는 웰 플레이트 중의 20 μl 세포 배지에 시딩하고 밤새 인큐베이트했다. 항체 1-9, 29AM4-5huIgG₁LALA 또는 12C4huIgG₁LALA 기준 항체를 His tag®CD47 및 항-His tag® 형광 검출 항체의 혼합물과 함께 웰에 첨가하고 2 시간 동안 인큐베이트했다. 인큐베이션 후, 세포를 세포 세척 버퍼로 세척했다. 스크리닝 시스템(CellInsight®, Thermo Scientific®)을 사용하여 형광을 측정하고 세포당 총 형광을 결정하였다.

[0196]

결과

[0197]

항체 29AM4-5huIgG₁LALA, 12C4huIgG₁LALA, 3 및 7은 huSIRP α₁을 발현하는 CHO 세포 및 huSIRP α_{BIT}를 발현하는 CHO 세포 둘 다에 대한 CD47의 결합을 완벽하게 차단하고, 항체 1, 2, 4-6, 8 및 9는 huSIRP α₁을 발현하는 CHO 세포 및 huSIRP α_{BIT}를 발현하는 CHO 세포에 대한 CD47의 결합을 모두 차단하지 못한다.

[0198]

ADCC 어세이

[0199]

SIRP α₁ 또는 SIRP α_{BIT}에 대해 동형 접합성인 도너의 호중구를 단리하고 문헌[Chao *et al.* PNAS 2011, 108(45), 18342-18347]의 방법에 따라 배양했다. ADCC는 ⁵¹Cr 방출 어세이 또는 비방사성 유로퓸 TDA (EuTDA) 세포독성 어세이(DELFA, PerkinElmer)를 이용하여 결정되었다. SKBR3 세포가 표적 세포로서 사용되었고 100 μCi ⁵¹Cr

(Perkin-Elmer)로 37℃에서 90분간, 또는 비스(아세톡시메틸) 2,2':6',2"-터피리딘-6,6"-디카르복실레이트 (BATDA 시약 Delfia)로 37℃에서 5분간 표지되었다. PBS로 2회 세척 후, 웰당 5×10^3 표적 세포를, 96-웰 U-바닥 플레이트에서, 10% (v/v) 송아지 태 혈청(FCS)이 보충된 IMDM 배양 배지에서, 호중구와 함께, 이펙터 대 표적 세포 비 50:1에서 적절한 항체의 존재 하에, 37℃ 및 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이트했다. 인큐베이션 후, 상청액을 수확하고 감마 카운터(Wallac)에서 방사능에 대해 분석하거나 또는 유로폼 용액(DELFI, PerkinElmer)에 첨가하고 유로폼 2,2':6',2"-터피리딘-6,6"-디카르복실산(EuTDA) 형광을 스펙트로플루오로미터(Envision, PerkinElmer)를 사용하여 측정하였다. 세포독성의 백분율을 [(실험적 방출-자발적 방출) / (총 방출-자발적 방출)] x 100%로 계산하였다. 모든 조건을 2회 및/또는 3회 측정하였다.

[0200] ADCC 데이터 12C4huIgG₁LALA vs 12C4IgG₁

[0201] 도 1은 ADCC 어세이의 결과를 %세포독성으로서 도시하고 있다. 이펙터 세포로서 호중구 및 트라스투주맙 단독을 사용하여 SKBR3 세포에서 측정된 %세포독성은 무린 12C4 항체(mu12C4)와 조합된 트라스투주맙의 %세포독성보다 작다. 12C4 가변 영역이 인간 IgG₁ 불변 영역에 이식된 항체(12C4huIgG₁)와 조합된 트라스투주맙은 저 농도의 12C4huIgG₁에서 트라스투주맙 단독과 비교하여 유사한 %세포독성을 나타낸다. 보다 높은 농도의 12C4huIgG₁에서는, %세포독성의 감소가 관찰된다. 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 인간 IgG₁ 불변 영역에 12C4 가변 영역이 이식된 항체(12C4huIgG₁LALA)와 조합된 트라스투주맙은 트라스투주맙 단독의 %세포독성과 비교하여 증가된 %세포독성을 나타내고, 12C4huIgG₁ 및 트라스투주맙의 조합과 비교하여 증가된 %세포독성을 나타낸다.

[0202] ADCC 데이터

[0203] 도 2는 12C4huIgG₁LALA와 비교하여, 트라스투주맙과 조합된 아미노산 치환 L234A 및 L235A(LALA)을 포함하는 인간 IgG₁ 불변 영역을 갖는 항체 1-9의 존재하의 트라스투주맙(100%로 설정)에 상대적인 인간 호중구에 의한 %ADCC를 비교하고 있다. 무린 항-CD47 항체의 VR 및 아미노산 치환 L234A 및 L235A를 포함하는 인간 IgG₁ 불변 영역을 갖는 B6H12IgG₁LALA, 및 비히클(트라스투주맙 무함유)을 각각 양성 및 음성 대조군으로서 사용했다. 채워진 사각형(■)은 SIRP α_{B1T} 변이(SIRP α_{B1T}에 대해 동형 접합성임)를 갖는 도너의 호중구를 사용하여 측정된 값이고, 빈 원형(○)은 SIRP α₁ 변이(SIRP α₁에 대해 동형 접합성임)를 갖는 도너의 호중구를 사용하여 측정된 값이다. 모든 항체의 경우 평균 ADCC가 트라스투주맙 단독에 비해 증가했다. 항체 1, 2, 4, 5, 7 및 8의 경우 평균 ADCC 증가가 12C4huIgG₁LALA-유도 ADCC 증가보다 훨씬 더 향상되었다. 항체당 도너당 ADCC 증가를 비교했을 때, 항체 1, 3-6, 8 및 9는 12C4huIgG₁LALA보다 ADCC의 증가율의 변동이 더 적게 나타난다.

[0204] 도 3은, 트라스투주맙 단독, 및 각종 농도의 12C4huIgG₁LALA와 조합된 트라스투주맙과 비교하여, 트라스투주맙과 조합된 아미노산 치환 L234A 및 L235A(LALA)를 포함하는 인간 IgG₁ 불변 영역을 갖는 각종 농도의 키메라 항체 4 및 7 및 인간화 항체 10 및 14의 존재하에 인간 호중구에 의한 %ADCC를 비교하고 있다. SIRP α_{B1T}에 대해 동형 접합성인 2 도너의 호중구가 사용되었다. 심지어 낮은 농도에서 항체 4, 7, 10 및 14는 ADCC를 증가시킨다. ADCC 증가는 농도 의존적이다.

[0205] 도 4는, 트라스투주맙(Tmab) 단독 및 12C4huIgG₁LALA의 %ADCC와 비교하여, 트라스투주맙과 조합된 항체 4, 7, 10, 13, 14, 15 및 16의 존재하에서 인간 호중구에 의한 %ADCC를 비교하고 있다. 모든 항체가 트라스투주맙 단독과 비교하여 ADCC를 증가시킨다. 트라스투주맙과 조합된 항체 4, 7, 10, 13, 14, 15 및 16의 존재하에서 대부분의 도너의 호중구에 의한 ADCC 증가는 트라스투주맙과 조합된 12C4huIgG₁LALA와 비교하여 유사하거나 증가된다.

[0206] (카밧의 방법에 의해 결정된) 중쇄(HC) 및 경쇄(LC) 가변 영역(VR) 아미노산 서열에서 밀줄친 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 갖는 서열 목록

서열 번호 1 (HC VR 1)

1 QSVVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGIDLSS YAMSWVRQAP GKGLEWIGII
 51 SSGGITYYAS WAKGRFTISK TSTTVDLKIP SPTTEDTATY FCARSLWAAS
 101 NYYMALWGPG TLTVSS

서열 번호 2 (LC VR 1)

1 AIKMTQTPAS VSAAVGGTVS INCQASEDIE SYLAWYQQKP GQPPKLLIYR
 51 ASTLASGVSS RFKSGSGTQ FTLTISDLES ADAATYYCLG DYYSSSGDTG
 101 AFGGGTEVVV K

서열 번호 3 (HC VR 2)

1 QSVVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSN YAMHWVRQAP GKGLEWIGII
 51 YTGGATSYAT WAKGQFTISK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY FCARGDRDGY
 101 AYFNIWGPGT LVTVSL

서열 번호 4 (LC VR 2)

1 QIVMTQTPFS VSAVVGTVT IKCQASHNIG SWLAWYQQKP GQRPKLLIYD
 51 ASTLASGVSS RFKSGSGTE FTLTISGVES ADAATYYCQQ GYGISYVHNV
 101 FGGGTEVVVK

[0207]

서열 번호 5 (HC VR 3)

1 QSVEESGGRL VTPGTPLTLA CTVSGFSLIS YYISWVRQAP EKGLEYIGII
 51 NIGGGASYAS WAKGRFTISK TSTTVDLKIT SPTPEDTATY FCAMSYGMDT
 101 GAFNIWGPGT LVTVSL

서열 번호 6 (LC VR 3)

1 AQVLTQTPAS VSAAVGGTVT ISCQSSSESVY KNNFLSWYQQ KPGKPPKLLI
 51 YGASTLASGV PSRFKSGSG TQFTLTISDL ESDDAATYFC QGGYRTDIYP
 101 FGGGTEVVVK

서열 번호 7 (HC VR 4)

1 QSVEESGGRL GTPGTPLTLT CTVSGFSLSS YVMGWFRQAP GKLEYIGII
 51 SSSGSPYYAS WVNGRFTISK TSTTMDLKMN SPTTEDTATY FCARVGPLGV
 101 DYFNIWGPGT LVTVSL

서열 번호 8 (LC VR 4)

1 DIVMTQTPSS VEAAVGGTVT IKCQAGQSIN SYLAWYQQKP GQRPKLLIYY
 51 ASTLESGVPS RFKGSGSGTD YTLTISDLES ADAATYYCQS WHYISRSYAF
 101 GGGTEVVVK

서열 번호 9 (HC VR 5)

1 QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS YVMGWFRQAA GKLEYIGYI
 51 NADGSPYYAT WVNGRFTISK TPTTMDLKIN SPTTEDTATY FCARVGPLGV
 101 DYFNIWGPGT LVTVSL

[0208]

서열 번호 10 (LC VR 5)

1 DIVMTQTPAS VEAAVGGTIVT IKQASQSIN RYLTWYQKP GQRPKLLIYY
 51 ASTLESGVPS RFEGSGSGTD YTLTISDLES ADAATYYCQS YYYISRTYAF
 101 GGGTEV VVK

서열 번호 11 (HC VR 6)

1 QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGIDLSS YTMTWVRQAP GKGLEWIGII
 51 YAGGSTAYAS WAKGRFTISK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY FCARSSSDGY
 101 DYFNIWGPGT LVTVS L

서열 번호 12 (LC VR 6)

1 GVVMTQTPSS VSAAVGGTIVT INCQASQSIG SWLAWYQKP GQPPKLLIYQ
 51 ASKLASGVPS RFSGRSGSGH FTLTISDVQS DDAATYYCQQ TVTAASNVDNA
 101 FGGGTEVVVK

서열 번호 13 (HC VR 7)

1 RSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS HGISWVRQAP GKGLEYIGTI
 51 GTGVITYFAS WAKGRFTGSK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY FCARGSAWND
 101 PFDPWGPRTL VTVSS

서열 번호 14 (LC VR 7)

1 ALVMTQTPAS VSAAVGGTIVT TKQASQSVY GNNDLAWYQH KPGQPPKLLI
 51 YLASTLATGV PSRFSGSGSG TQFTLTITGV QSDDAATYYC LGGGDDEADN
 101 VFGGGTEVVV K

[0209]

서열 번호 15 (HC VR 8)

1 QSLEESGGRL VTPGTPLTLT CTASGVDLSN YAMGWVRQAP GKGLEWIGII
 51 YAGGSTSYAT WAKGRFTISK TSTTMDLKMT SPTTEDTATY FCARHRSDGY
 101 DYFHLWGPGT LVTVSL

서열 번호 16 (LC VR 8)

1 AIDMTQTPAS VSEPVGGTIVT IKCQASQSIG SWLAWYQQKP GQRPKLLIYD
 51 ASKLASGVPS RFSGSGSGTE FTLTISGVQS DDAAAYYCQQ GYAVSYVENI
 101 FGGGTEVVVK

서열 번호 17 (HC VR 9)

1 QSMEESSGRL VTPGTPLTLT CTASGFSLSN YGVSWVRQAP GKGLEWIGII
 51 YGGSDITAYA SWAKGRFTIS KTSTTVDLTI TSPTTEDTAT YFCAKSYTNG
 101 MDYYNIWGPG TLVTVSL

서열 번호 18 (LC VR 9)

1 AFDLTQTPSS VEAPVGGTVI IKCQASQSIG SYLAWYQQKP GQPPKLLIYS
 51 ASTLASGVSS RFKSGSGSETQ FPLTISDLES ADAATYYCQS YYGSRSNVFG
 101 GGTEVVVK

서열 번호 19 (HC VR 29AM4-5)

1 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIS YYFIHWVRQA PGKGLEWVAS
 51 VYSSFGYIYY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARFT
 101 FPGLFDGFFG AYLGSLDYWG QGTILVTVSS

[0210]

서열 번호 20 (LC VR 29AM4-5)

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSVS SAVAWYQQKP GKAPKLLIYS
 51 ASSLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ AVNWWGALVT
 101 FGQGTKVEIK

서열 번호 21 (HC VR 12C4)

1 EVKLEESGGG LMQPGGSMKL SCVASGFTFS NYWMNWVRQS PEKGLEWVAE
 51 IRLKSNNYAT HYAESVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRA EDTGIYYCIR
 101 DYDYDAYFDY WGQGTTLTVS S

서열 번호 22 (LC VR 12C4)

1 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYNYMYWY QQKPGQPPKL
 51 LIYLASNLES GVPARFSGSG SGTDFTLNH PVEEEDAATY YCQHSGELPY
 101 TFGGGTKLEI K

서열 번호 23 (HC VR KWAR23)

1 EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DYIHWVQQR TEQGLEWIGR
 51 IDPEDGETKY APKFQDKATI TADTSSNTAY LHLSSLTSED TAVYYCARWG
 101 AYWGQGTlVT VSS

서열 번호 24 (LC VR KWAR23)

1 QIVLTQSPAI MSASPGEKVT LTCSASSSVS SSYLYWYQQK PGSSPKLWIY
 51 STSNLASGVP ARFSGSGSGT SYSLTISSME AEDAASYFCH QWSSYPRTFG
 101 AGTKLELK

[0211]

서열 번호 25 (인간 IgG₁ 항체 HC 불변 영역)

```

1      ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51     HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP
101    KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
151    HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
201    EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
251    LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
301    QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

서열 번호 26 (인간 IgG₁ 항체 LC κ 불변 영역)

```

1      RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
51     NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
101    SFNRGEC

```

서열 번호 27 (인간 IgG₁ 항체 HC 불변 영역 LALA 돌연변이 (돌연변이는 밑줄침))

```

1      ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51     HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP
101    KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
151    HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
201    EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
251    LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
301    QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

[0212]

서열 번호 28 (리더 서열 HC 1-9, 15 + 16, LC 1-9 + 12)

1 MGWSCIILFL VATATGVHS

서열 번호 29 (HAVT20 리더 서열)

1 MACPGFLWAL VISTCLEFSMA

서열 번호 30 (HC VR 10)

1 KVEESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFSLSY VMGWVRQAPG KGLEWVSIIS
51 SSGSPYYASW VNGRFTISKD NSEGMVYLQM NSLRAEDTAV YYCARVGPLG
101 VDYFNIWGQG TTVTVSS

서열 번호 31 (LC VR 10)

1 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCQAGQSIN SYLAWYQQKP GQPPKLLIYY
51 ASTLESGVPD RFGSGSGTD FTLTISSLQA EDVAVYYCQS WHYISRSYAF
101 GGGTKLEIK

서열 번호 32 (HC VR 11)

1 EVKVEESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFSLS SYVMGWVRQA PGKGLEWVSI
51 ISSSGSPYYA SWVNGRFTIS KTSTMDLQM NSLRAEDTAV YYCARVGPLG
101 VDYFNIWGQG TTVTVSS

서열 번호 33 (LC VR 11)

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQAGQSIN SYLAWYQQKP GKVPKLLIYY
51 ASTLESGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCQS WHYISRSYAF
101 GQGTKVEIK

[0213]

서열 번호 34 (HC VR 12)

```

1      VQLVESGGRL VQPGTPTLS CTVSGFSLSS YVMGWFRQAP GKGLEYGII
51     SSSGSPYYAS WVNGRFTISK TSTMDLKMN SLRSEDATY FCARVGPLGV
101    DYFNIWGPGT LTVSS
    
```

서열 번호 35 (HC VR 13 + 14)

```

1      RQLVESGGGL VQPGGSLRLS CTASGFSLSS HGISWVRQAP GKGLEYGII
51     GTGVITYFAS WAKGRFTGSK TSSTAYMELS SLRSEDATY FCARGSAWND
101    PFDPWGQGTL VTVSS
    
```

서열 번호 36 (LC VR 13)

```

1      AIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQSVY GNNDLAWYQQ KPGKAPKLLI
51     YLASTLATGV PSRFGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC LGGGDDEADN
101    VFGGGTKVEI K
    
```

서열 번호 37 (LC VR 14 + 16)

```

1      DIEMTQSPSS VSASVGDRVT LTCQASQSVY GNNDLAWYQQ KPGQAPKLLI
51     YLASTLATGV PSRFGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC LGGGDDEADN
101    VFGGGTKVEI K
    
```

서열 번호 38 (LC VR 15)

```

1      ELVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCQASQSVY GNNDLAWYQQ KPGEAPKLLI
51     YLASTLATGV PSRFGSGSG TDFTLTISGL QSEDFATYYC LGGGDDEADN
101    VFGQGTKVEI K
    
```

[0214]

서열 번호 39 (리더 서열 중쇄 10-14)

```

1      MGWTLVFLFL LSVTAGVHS
    
```

서열 번호 40 (리더 서열 경쇄 10, 11, 13-16)

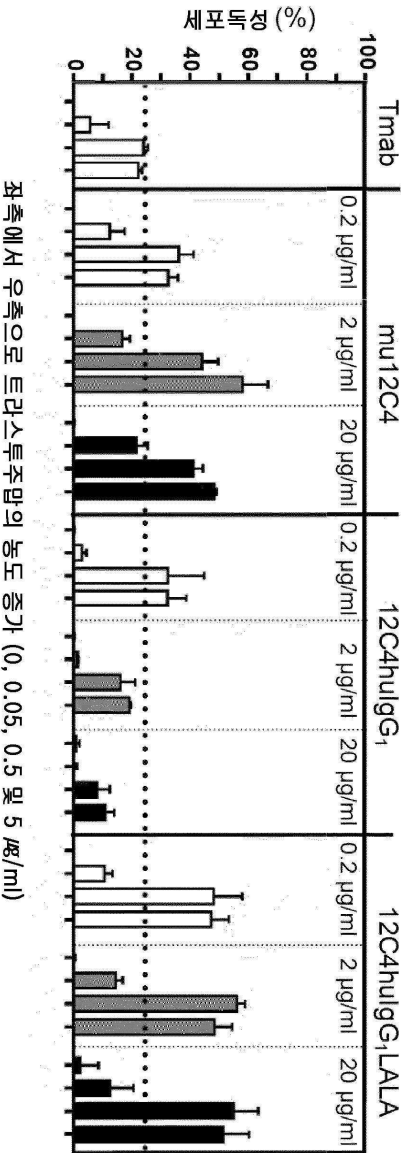
```

1      MVSSAQFLGL LLLCFQGTRC
    
```

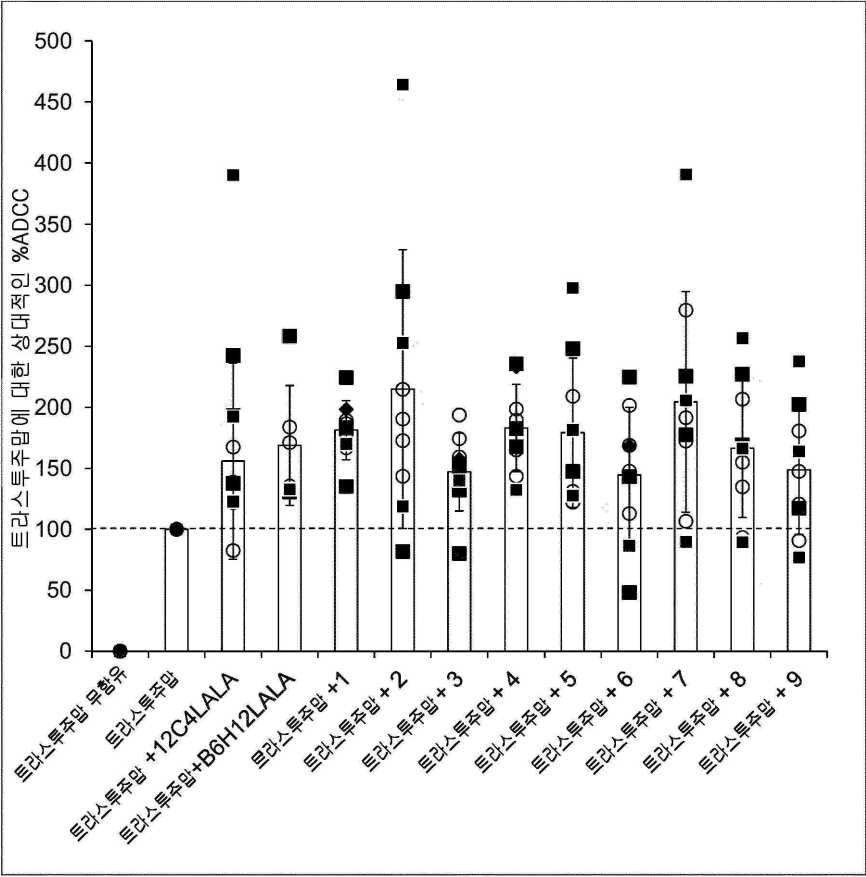
[0215]

도면

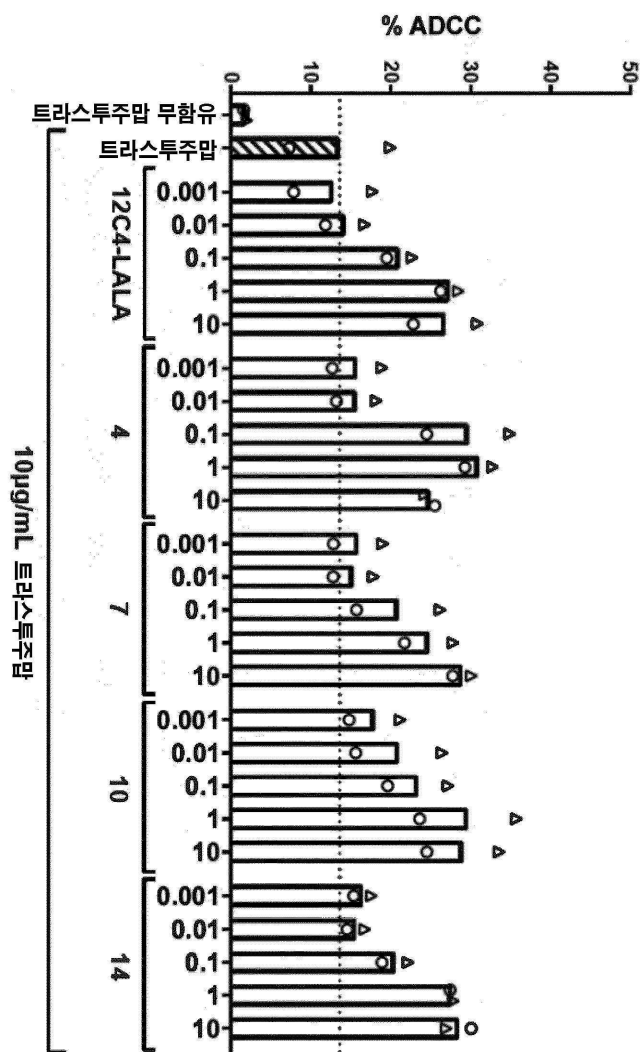
도면1



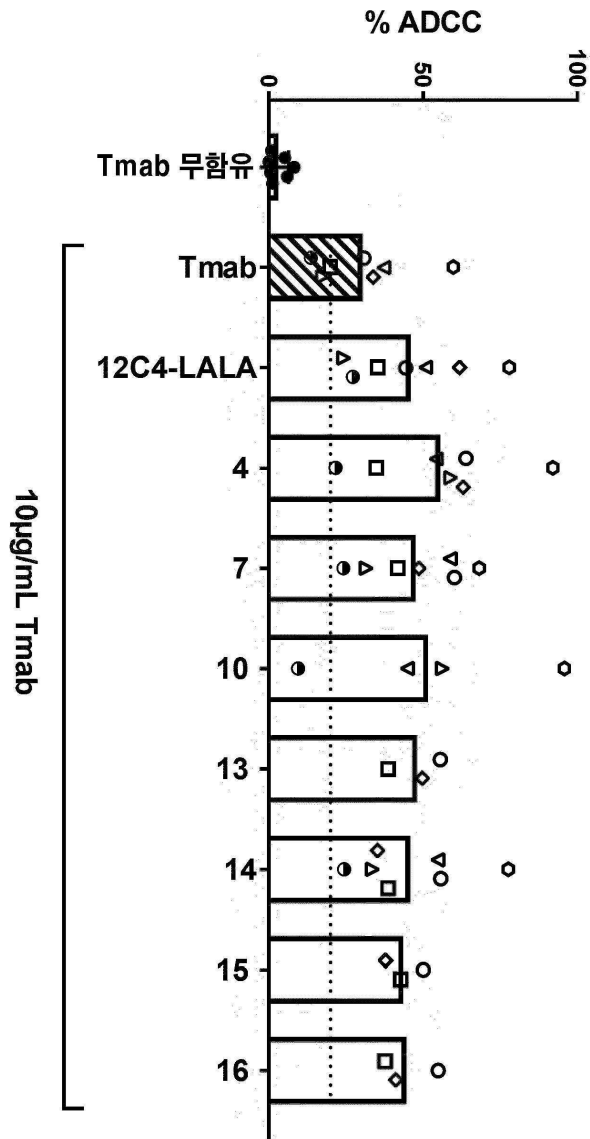
도면2



도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Synthon Biopharmaceuticals B.V.

VERHEIJDEN Gijsbertus Franciscus Maria

ROUWENDAL Gerard Johan Adolph

ARENDS Roland Jan

BERG, VAN DEN Timo Kars

MATLUNG Hanke Lottie

SZILAGYI Katarina

<120> Anti SIRPalph antibodies with a LALA mutation

<130> P1703PC00/PB-078

<140> PCT/EP2018/062473

<141> 2018-05-15

<160> 40

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:1 (HC VR 1)

<400> 1

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Ile Ile Ser Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Pro
 65 70 75 80
 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Leu
 85 90 95
 Trp Ala Ala Ser Asn Tyr Tyr Met Ala Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:2 (LC VR 1)

<400> 2

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

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Asp Tyr Tyr Ser Ser Ser
 85 90 95
 Gly Asp Thr Gly Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:3 (HC VR 2)

<400> 3

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr Ala
 20 25 30
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Ile Ile Tyr Thr Gly Gly Ala Thr Ser Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Gln Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
 65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asp
85 90 95

Arg Asp Gly Tyr Ala Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Leu
115

<210> 4

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:4 (LC VR 2)

<400> 4

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

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser His Asn Ile Gly Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Gly Ile Ser Tyr
85 90 95

Val His Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:5 (HC VR 3)

<400> 5

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

Leu Thr Leu Ala Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Ser Tyr Tyr
20 25 30

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

Ile Ile Asn Ile Gly Gly Gly Ala Ser Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Pro Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Met Ser Tyr
85 90 95

Gly Met Asp Thr Gly Ala Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Leu
115

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:6 (LC VR 3)

<400> 6

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

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Glu Ser Val Tyr Lys Asn
20 25 30

Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu
65 70 75 80

Glu Ser Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gly Gly Tyr Arg Thr
85 90 95

Asp Ile Tyr Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:7 (HC VR 4)

<400> 7

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

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Val

20 25 30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly
50 55 60

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

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val Gly

85 90 95

Pro Leu Gly Val Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Leu

115

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:8 (LC VR 4)

<400> 8

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

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Gly Gln Ser Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Ser

65 70 75 80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp His Tyr Ile Ser Arg

85 90 95

Ser Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys

100 105

<210> 9

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:9 (HC VR 5)

<400> 9

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Val

20 25 30

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Ala Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly

35 40 45

Tyr Ile Asn Ala Asp Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Thr Trp Val Asn Gly

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

Pro Leu Gly Val Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Leu
 115

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:10 (LC VR 5)

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Arg Tyr
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Glu Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Tyr Ile Ser Arg
 85 90 95

Thr Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105

<210> 11

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:11 (HC VR 6)

<400> 11

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Thr

20 25 30

Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Ile Ile Tyr Ala Gly Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Ser

85 90 95

Ser Asp Gly Tyr Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Leu

115

<210> 12

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:12 (LC VR 6)

<400> 12

Gly Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Trp

20 25 30

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

35

40

45

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

50

55

60

Arg Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Ser

65

70

75

80

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

85

90

95

Asn Val Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys

100

105

110

<210> 13

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:13 (HC VR 7)

<400> 13

Arg Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro

1

5

10

15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser His Gly

20

25

30

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

35

40

45

Thr Ile Gly Thr Gly Val Ile Thr Tyr Phe Ala Ser Trp Ala Lys Gly

50

55

60

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

65

70

75

80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ser

85

90

95

Ala Trp Asn Asp Pro Phe Asp Pro Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr

100

105

110

Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:14 (LC VR 7)

<400> 14

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

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Thr Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn

20 25 30

Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val

65 70 75 80

Gln Ser Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Gly Asp Asp

85 90 95

Glu Ala Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys

100 105 110

<210> 15

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:15 (HC VR 8)

<400> 15

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Val Asp Leu Ser Asn Tyr Ala

20 25 30
Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

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

Thr Val Ser Leu
115

<210> 16

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:16 (LC VR 8)

<400> 16

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

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

Val Glu Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 17

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:17 (HC VR 9)

<400> 17

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

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

Val Thr Val Ser Leu
115

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:18 (LC VR 9)

<400> 18

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

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

<210> 19

<211

> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:19 (HC VR 29AM4-5))

<400> 19

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

 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala 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 Phe Thr Phe Pro Gly Leu Phe Asp Gly Phe Phe Gly Ala Tyr
100 105 110
Leu Gly Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

115 120 125
Ser

<210> 20

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:20 (LC VR 29AM4-5)

<400> 20

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 Val Ser Ser Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg 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 Ala Val Asn Trp Val Gly
85 90 95
Ala Leu Val Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 21

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:21 (HC VR 12C4)

<400> 21

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

1 5 10 15

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 22

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:22 (LC VR 12C4)

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Tyr Asn Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

100 105 110

<210> 23

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:23 (HC KWAR23)

<400> 23

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

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

Ser

<210> 24

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:24 (LC VR KWAR23)

<400> 24

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu

65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Ser Tyr Phe Cys His Gln Trp Ser Ser Tyr Pro

85 90 95

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

100 105

<210> 25

<211>

> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO 25: (human IgG1 antibody HC constant region)

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

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

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO 26: (human IgG antibody LC ? constant region)

<400> 26

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

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

85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 27

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO 27: (human IgG1 antibody HC constant region LALA mutant

(mutations underlined)

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

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

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

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

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

<210> 28

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:28 (leader sequence antibodies 1-9)

<400> 28

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser

<210> 29

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:29 (HAVT20 leader sequence)

<400> 29

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu

1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala

20

<210> 30

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:30 (HC10)

<400> 30

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

1 5 10 15

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Val Met

20 25 30

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

35 40 45

Ile Ser Ser Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Gly Pro Leu Gly Val Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210>

> 31

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:31 (LC 10)

<400> 31

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Gln Ala Gly Gln Ser Ile Asn Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp His Tyr Ile Ser Arg

85 90 95

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

100 105

<210> 32

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:32 (HC VR 11)

<400> 32

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Met Asp Leu Gln Met

65 70 75 80

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

Gly Pro Leu Gly Val Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:33 (LC VR 11)

<400> 33

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 Gln Ala Gly Gln Ser Ile Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Glu 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 Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp His Tyr Ile Ser Arg
85 90 95

Ser Tyr Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 34

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:34 (HC VR 12)

<400> 34

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Gln Pro Gly Thr Pro

1	5	10	15
Leu Thr Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Val			
20	25	30	
Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly			
35	40	45	
Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly			
50	55	60	
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Met Asp Leu Lys Met Asn			
65	70	75	80
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val Gly			
85	90	95	
Pro Leu Gly Val Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val			
100	105	110	
Thr Val Ser Ser			
115			

<210> 35

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:34 (HC VR 12)

<400> 35

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Gln Pro Gly Thr Pro

1	5	10	15
Leu Thr Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Val			
20	25	30	
Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly			
35	40	45	
Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly			
50	55	60	

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

65 70 75 80
Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Val Gly
 85 90 95
Pro Leu Gly Val Asp Tyr Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
 100 105 110
Thr Val Ser Ser
 115

<210> 36

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:36 (LC VR 13)

<400> 36

Ala 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 Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn
 20 25 30
Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

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

<210> 37

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:37 (LC VR 14 +16)

<400> 37

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Gly Asp Asp

85 90 95

Glu Ala Asp Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 38

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:38 (LC VR 15)

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Gly Asp Asp

85 90 95
 Glu Ala Asp Asn Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 39

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:39 (leader sequence heavy chains 10-14)

<400> 39

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

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SEQ ID NO:40 (leader sequence light chains 10, 11, 13-16)

<400> 40

Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly Thr Arg Cys
 20