



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0022059
(43) 공개일자 2025년02월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1774 (2013.01)
A61K 47/68031 (2023.08)
(21) 출원번호 10-2024-7042025
(22) 출원일자(국제) 2023년05월31일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/067697
(87) 국제공개번호 WO 2023/235754
국제공개일자 2023년12월07일
(30) 우선권주장
63/347,939 2022년06월01일 미국(US)

(71) 출원인
알렉소 온콜로지 인크.
미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코
알러튼 애비뉴 323
(72) 발명자
폰스 야우메
미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코
알러튼 애비뉴 323 알렉소 온콜로지 인크.
란돌프 소피아
미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코
알러튼 애비뉴 323 알렉소 온콜로지 인크.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

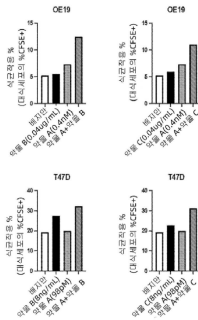
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **요로상피 암종 치료를 위한 병용 요법**

(57) 요약

SIRP α D1 도메인 변이체 및 Fc 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)를 항체-약물 접합체(예를 들어, 엔포르투맙 베도틴)와 조합하여 투여하는 단계를 포함하는, 암(예를 들어, 요로상피암)을 치료하는 방법이 제공된다. 관련 키트도 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/70503 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

브르익 마리아

미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코 알러튼 애비뉴 323 알렉소 온콜로지 인크.

치아티스 아타나시오스

미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코 알러튼 애비뉴 323 알렉소 온콜로지 인크.

류 하이잉

미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코 알러튼 애비뉴 323 알렉소 온콜로지 인크.

리 민

미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코 알러튼 애비뉴 323 알렉소 온콜로지 인크.

첸 에이미 샤우-루

미국 캘리포니아주 94080 사우스 샌 프란시스코 알러튼 애비뉴 323 알렉소 온콜로지 인크.

명세서

청구범위

청구항 1

개체의 요로상피암을 치료하는 방법으로서, (a) SIRP α D1 도메인 변이체 및 Fc 도메인 변이체를 포함하는 유효량의 융합 폴리펩티드, 및 (b) 유효량의 엔포르투맘 베도틴을 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함하되,

상기 융합 폴리펩티드의 상기 SIRP α D1 도메인 변이체는 서열번호 81 또는 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 융합 폴리펩티드의 상기 Fc 도메인 변이체는

- (i) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역;
- (ii) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 A330S, P331S, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG2 Fc 영역;
- (iii) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 S228P, E233P, F234V, L235A, 및 delG236 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역; 또는
- (iv) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 요로상피암은 국소 말기 요로상피암 또는 전이성 요로상피암인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 요로상피암은 방광암, 신우암, 요관암 또는 요도암인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 면역 체크포인트 억제제(CPI)를 사용한 이전 치료를 받은, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 CPI는 PD-1 억제제 또는 PD-L1 억제제인, 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 CPI는 아테졸리주맙, 펌브롤리주맙, 더발루맙, 아벨루맙 또는 니볼루맙인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 백금-함유 화학요법을 사용한 이전 치료를 받은, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 가장 최근의 이전 요법 동안 또는 이후에 요로상피암의 진행 또는 재발을 갖는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 모노메틸아우리스타틴(MMAE)-기반 항체-약물 접합체를

사용한 이전 치료를 받지 않은, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 개체는 엔포르투맵 베도틴을 사용한 이전 치료를 받지 않은, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 CD47과 SIRP α 의 상호작용을 차단하는 치료제를 사용한 이전 치료를 받지 않은, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엔포르투맵 베도틴은 하나 이상의 28일 주기로 상기 개체에게 투여되며, 상기 엔포르투맵 베도틴은 각 28일 주기의 1일째, 8일째, 15일째에 1.25 mg/kg의 용량으로 상기 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 엔포르투맵 베도틴은 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 최대 약 60 mg/kg의 용량으로 상기 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 2주마다 1회(q2w) 약 30 mg/kg의 용량으로 상기 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 2주마다 1회(q2w) 약 20 mg/kg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 2주마다 1회(q2w) 약 15 mg/kg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 SIRP α D1 도메인 변이체는 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 SIRP α D1 도메인 변이체는 서열번호 81의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 도메인 변이체는 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역인, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 Fc 도메인 변이체는 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제19항 및 제21항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 서열번호 136의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제18항 및 제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 서열번호 135의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 융합 폴리펩티드는 동종이량체를 형성하는, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 인간인, 방법.

청구항 27

요로상피암의 치료를 필요로 하는 개체의 요로상피암을 치료하기 위한 엔포르투맵 베도틴과 조합하여 사용하기 위한, 약제학적으로 허용 가능한 담체 중의 SIRP α D1 도메인 변이체 및 Fc 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 키트로서,

상기 SIRP α D1 도메인 변이체는 서열번호 81 또는 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하고;

상기 Fc 도메인 변이체는

(i) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역;

(ii) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 A330S, P331S, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG2 Fc 영역;

(iii) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 S228P, E233P, F234V, L235A, 및 delG236 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역; 또는

(iv) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역이며,

상기 키트는 SIRP α D1 도메인 변이체 및 Fc 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 엔포르투맵 베도틴과 조합하여 상기 개체에게 투여하기 위한 설명서를 포함하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2022 년 6월 1일에 출원된 미국 가출원 제63/347939호의 우선권 이익을 주장하며, 이의 개시는 전체적으로 참조로 본원에 인용된다.
- [0003] 전자 서열 목록에 대한 참조
- [0004] 전자 서열 목록의 내용(757972001900SEQLIST.xml; 크기: 365943 바이트, 생성일: 2023년 5월 25일)은 전체적으로 참조로 본원에 인용된다.
- [0005] 본 발명은 CD47(예를 들어, hCD47)과 SIRP α (예를 들어, hSIRP α)의 상호작용을 차단하는 제제를 항체 약물 집합체(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)와 조합하여 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0006] 방광암은 미국(US)에서 여섯 번째로 흔한 암이다. 미국 국립암연구소의 추정에 따르면 2021년 83000건 이상의 새로운 요로상피암 환자가 진단되었고, 미국에서는 17000명 이상이 요로상피암으로 사망하였다(SEER Cancer Stat Facts: Bladder Cancer, 2021. 미국 국립암연구소 Bethesda, MD, [https://seer\(dot\)cancer\(dot\)gov/statfacts/html/urinb\(dot\)html](https://seer(dot)cancer(dot)gov/statfacts/html/urinb(dot)html). 2022년 3월 9일에 액세스). 방광암은 주로 55세 이상에서 발생하며 진단 시의 중간 연령은 73세이다. 이러한 암을 발병하는 남성:여성의 비율은 대략 4:1이다. 백인은 아프리카계 미국인이나 히스패닉계 미국인보다 방광암 진단을 받을 가능성이 더 높다(SEER Cancer Stat Facts: Bladder Cancer, 2021. 미국 국립암연구소 Bethesda, MD, [https://seer\(dot\)cancer\(dot\)gov/statfacts/html/urinb\(dot\)html](https://seer(dot)cancer(dot)gov/statfacts/html/urinb(dot)html). 2022년 3월 9일에 액세스). 방광암의 대략 90%는 요로상피암이고; 진단 시 암이 말기이면, 예후는 불량하다(Simeone JC, Nordstrom BL, Patel K, Mann H, Klein AB, Horne L. Treatment patterns and overall survival in metastatic urothelial carcinoma in a real-world, US setting. *Cancer Epidemiol.* 2019;60:121-7). 대부분의 요로상피암은 비근육 침습 단계에서 진단된다. 이러한 단계에서, 질환 관리는 소포내 요법이 있거나 없는 절제를 포함한다. 이러한 치료에도 불구하고, 환자는 종종 불치병인 말기 질환을 발병하여 궁극적으로 사망을 초래한다. 대략 12%의 환자가 진단 시 국소 말기 또는 전이성 질환을 갖는다(SEER Cancer Stat Facts: Bladder Cancer, 2021. 미국 국립암연구소 Bethesda, MD, [https://seer\(dot\)cancer\(dot\)gov/statfacts/html/urinb\(dot\)html](https://seer(dot)cancer(dot)gov/statfacts/html/urinb(dot)html). 2022년 3월 9일에 액세스).

[0007] 충분한 신장 기능을 갖는 환자에서 국소 말기 또는 전이성 요로상피암에 대한 1차 요법은 시스플라틴-기반 조합, 예를 들어 메토크세이트, 빈블라스틴, 독소루비신, 및 시스플라틴(MVAC) 또는 겐시타빈+시스플라틴과의 조합으로 이루어지며, 이는 대략 10% 내지 15% 완전 반응(CRs)을 포함한 최대 50%의 전체 반응률을 입증하였다.(Bellmunt J, Orsola A, Wiegel T, Guix M, De Santis M, Kataja V; ESMO Guidelines Working Group. Bladder cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2011 Sep; v22 Suppl 6:vi45-9. doi: 10(dot)1093/annonc/mdr376(dot)PMID: 21908503). 카보플라틴과 겐시타빈은 시스플라틴에 적합하지 않은 환자에서 일반적으로 사용되지만 결과는 일반적으로 열등하다. 초기 화학 감수성에도 불구하고, 환자는 치유되지 않으며, 이러한 치료방안 후 전이성 요로상피암의 결과는 열악하다: 진행까지의 중간 시간은 7개월에 불과하며, 전체 생존(OS)의 중간값은 14개월이다. 대략 15%의 환자가 적어도 5년 생존하고, 5년 OS 비율이 7%인 내장 전이 환자의 예후는 특히 불량하다(von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, 등 Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(21):4602-8). 요로상피암 치료의 최근 진행에도 불구하고, 백금-기반 치료방안 및 면역요법을 사용한 치료 후 재발된 국소 말기 또는 전이성 요로상피암을 갖는 환자에 대한 개선된 치료에 대한 본 분야에서의 상당한 미충족 요구가 여전히 존재한다.

[0008] 특허 출원, 특허 간행물, 및 UniProtKB/Swiss-Prot 수탁 번호를 포함하는, 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 각 개별 참고문헌이 참조로 인용되도록 구체적으로 및 개별적으로 지적된 것처럼 전체적으로 참조로 본원에 인용된다.

발명의 내용

[0009] 일부 실시형태에서, 개체의 요로상피암을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 방법은 (a) SIRPα D1 도메인 변이체 및 Fc 도메인 변이체를 포함하는 유효량의 융합 폴리펩티드, 및 (b) 유효량의 엔포르투맵 베도틴을 개체에게 투여하는 단계를 포함하되, 융합 폴리펩티드의 SIRPα D1 도메인 변이체는 서열번호 81 또는 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하고; 융합 폴리펩티드의 Fc 도메인 변이체는 (i) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역; (ii) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 A330S, P331S, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG2 Fc 영역; (iii) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 S228P, E233P, F234V, L235A, 및 delG236 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역; 또는 (iv) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역이다.

[0010] 일부 실시형태에서, 개체는 인간이다. 일부 실시형태에서, 요로상피암은 국소 말기 요로상피암 또는 전이성 요로상피암이다. 일부 실시형태에서, 요로상피암은 방광암, 신우암, 요관암 또는 요도암이다. 일부 실시형태에서, 개체는 면역 체크포인트 억제제(CPI)를 사용한 이전 치료를 받았다. 일부 실시형태에서, CPI는 PD-1 억제

제 또는 PD-L1 억제제이다. 일부 실시형태에서, CPI는 아테졸리주맙, 펌브롤리주맙, 더발루맙, 아벨루맙 또는 니볼루맙이다. 일부 실시형태에서, 개체는 백금-함유 화학요법을 사용한 이전 치료를 받았다. 일부 실시형태에서, 개체는 가장 최근의 이전 요법 동안 또는 이후에 요로상피암의 진행 또는 재발을 갖는다. 일부 실시형태에서, 개체는 모노메틸아우리스타틴(MMAE)-기반 항체-약물 접합체를 사용한 이전 치료를 받지 않았다. 일부 실시형태에서, 개체는 엔포르투맙 베도틴을 사용한 이전 치료를 받지 않았다. 일부 실시형태에서, 개체는 CD47과 SIRP α 의 상호작용을 차단하는 치료제를 사용한 이전 치료를 받지 않았다.

[0011] 일부 실시형태에서, 엔포르투맙 베도틴은 하나 이상의 28일 주기로 개체에게 투여되며, 엔포르투맙 베도틴은 각 28일 주기의 1일째, 8일째, 15일째에 1.25 mg/kg의 용량으로 개체에게 투여되는, 방법. 일부 실시형태에서, 엔포르투맙 베도틴은 정맥내 투여된다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 최대 약 60 mg/kg의 용량으로 개체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 2주마다 1회(q2w) 약 30 mg/kg의 용량으로 개체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 2주마다 1회(q2w) 약 20 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 2주마다 1회(q2w) 약 15 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 정맥내 투여된다.

[0012] 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 서열번호 81의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역이다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 136의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 135의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 동종이량체를 형성한다.

[0013] 일부 실시형태에서, 요로상피암의 치료를 필요로 하는 개체의 요로상피암을 치료하기 위한 엔포르투맙 베도틴과 조합하여 사용하기 위한, 약제학적으로 허용 가능한 담체 중의 SIRP α D1 도메인 변이체 및 Fc 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 키트가 제공되며, SIRP α D1 도메인 변이체는 서열번호 81 또는 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하고; Fc 도메인 변이체는 (i) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역; (ii) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 A330S, P331S, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG2 Fc 영역; (iii) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 S228P, E233P, F234V, L235A, 및 delG236 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역; 또는 (iv) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역이며, 키트는 SIRP α D1 도메인 변이체 및 Fc 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 엔포르투맙 베도틴과 조합하여 개체에게 투여하기 위한 설명서를 포함한다.

[0014] 본원에 기재된 다양한 실시형태 중 하나, 일부 또는 모든 특성이 조합되어 본 발명의 다른 실시형태를 형성할 수 있다는 것으로 이해될 것이다. 본 발명의 이들 양태 및 다른 양태는 본 분야의 통상적인 지식을 가진 자에게 명백해질 것이다. 본 발명의 이들 실시형태 및 다른 실시형태는 하기의 자세한 설명에 의해 추가로 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0015] **도 1a**는 표적 세포로 제1 인간 공여체로부터의 단핵구에서 유래된 대식세포, T47D 관암종 세포 및 OE19 식도선 암종 세포를 사용하여 약물 A가 약물 B 및 약물 C의 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 활성을 증강시키는지 여부를 결정하기 위해 수행된 실험 결과를 나타낸다.

도 1b는 표적 세포로 제2 인간 공여체로부터 얻은 단핵구에서 유래된 대식세포, T47D 관암종 세포 및 OE19 식도선 암종 세포를 사용하여 약물 A가 약물 B 및 약물 C의 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP) 활성을 증강시키는지 여부를 결정하기 위해 수행된 실험 결과를 나타낸다.

도 2는 제3 인간 공여체로부터 얻은 단핵구에서 유래된 대식세포에 의한 OE19 식도선 암종 세포의 약물 B-의존성(좌측 패널) 또는 약물 C-의존성(우측 패널) ADCP에 대한 약물 A의 효과를 결정하기 위해 수행된 실험 결과를 나타낸다.

도 3은 제3 인간 공여체로부터 얻은 단핵구에서 유래된 대식세포에 의한 HT-1376 방광 암종 세포의 약물 B-의존성(좌측 패널) 또는 약물 C-의존성(우측 패널) ADCP에 대한 약물 A의 효과를 결정하기 위해 수행된 실험 결과를 나타낸다.

도 4는 실시예 3에 기재된 1상 임상 시험에 대한 연구 설계를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 하기 설명은 예시적인 방법, 매개변수 등을 제시한다. 그러나 이러한 설명은 본 개시의 범위를 제한하려는 것이 아니라 대신에 예시적인 실시형태의 설명으로 제공된다는 점을 인식해야 한다.
- [0017] 본원에 제공된 표제는 본 명세서 전체를 참조함으로써 가질 수 있는 본 발명의 다양한 양태 또는 실시형태의 제한이 아니다. 따라서, 바로 하기에 정의된 용어는 본 명세서 전체를 참조함으로써 보다 완전하게 정의된다.
- [0018] **정의**
- [0019] 용어 "약" 또는 "대략"은 통상의 기술자에 의해 결정된 바와 같은 특정 값에 대해 허용가능한 오차 범위 이내를 의미하며, 이는 어떻게 값이 측정 또는 결정되는지, 즉, 측정 시스템의 한계에 부분적으로 의존할 것이다. 예를 들어, "약"은 기술분야의 관행에 따라, 1 또는 1 초과의 표준 편차 이내를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값의 20% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 또는 1% 이하의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 과정에 대해, 상기 용어는 값의 배수적 규모 내에서, 바람직하게는 5-배 그리고 더 바람직하게는 2-배 내에서의 의미를 의미할 수 있다. 특정 값이 출원 및 청구범위에 기재되는 경우, 달리 언급되지 않는 한 용어 "약"은 특정 값에 대해 허용가능한 오차 범위 이내를 의미하는 것으로 가정해야 한다.
- [0020] 본원에서 사용된 용어는 단지 특정 경우를 기재하기 위한 목적을 위한 것이며, 제한하려는 의도가 아니다. 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태의 표현은 문맥이 달리 분명히 나타내지 않는 한 복수 형태를 또한 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 용어 "포함하는", "포함하다", "갖는", "갖는다", "가진", 또는 이들의 변형은 상세한 설명 또는 청구범위에서 사용되는 한, 이러한 용어는 용어 "포함하는"과 유사한 방식으로 포괄적인 것으로 의도된다.
- [0021] 용어 "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"는 포유동물에서 특정 질환 병증을 참조하여, 질환 병증을 갖는 포유동물에서 바람직하거나 유익한 효과를 유발하는 것을 지칭한다. 바람직하거나 유익한 효과는 질환의 하나 이상의 증상의 빈도 또는 중증도(즉, 종양 성장 및/또는 전이, 또는 면역 세포의 수 및/또는 활성에 의해 매개된 다른 효과 등)의 감소, 또는 질환, 병증 또는 장애의 추가 발달의 정지 또는 억제를 포함할 수 있다. 포유동물에서 암을 치료하는 상황에서, 바람직하거나 유익한 효과는 암 세포의 추가 성장 또는 확산의 억제, 암 세포의 사멸, 암 재발의 억제, 암과 관련된 통증의 감소, 또는 포유동물의 생존 개선을 포함할 수 있다. 효과는 주관적이거나 객관적일 수 있다. 예를 들어, 포유동물이 인간이면, 인간은 요법에 대한 개선 또는 반응의 주관적 증상으로서 기력 또는 활력의 개선 또는 통증의 감소를 주목할 수 있다. 대안적으로, 임상적은 신체 검사, 실험실 매개변수, 종양 마커, 또는 방사선 소견에 기초하여 종양 크기 또는 종양 부하의 감소를 주목할 수 있다. 추가적으로, 임상적은 검출 가능한 종양 마커의 감소를 관찰할 수 있다. 대안적으로, 컴퓨터 단층촬영(CT), 자기공명영상(MRI) 등과 같은 다른 검사를 사용하여 객관적인 개선을 평가할 수 있다.
- [0022] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "링커"는 2개의 요소, 예를 들어, 단백질 도메인의 연결을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 링커는 공유 결합 또는 스페이서일 수 있다. 용어 "스페이서"는 2개의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인 사이에 공간 또는 유연성(또는 공간 및 유연성 모두)을 제공하기 위해 2개의 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인 사이에서 발생하는 모이어티(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG; polyethylene glycol) 중합체) 또는 아미노산 서열(예를 들어, 1-200의 아미노산 서열)을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 아미노산 스페이서는 폴리펩티드의 1차 서열의 일부이다(예를 들어, 폴리펩티드 골격을 통해 이격된 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인에 접합됨).
- [0023] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적 조성물"은 활성 성분뿐만 아니라 부형제 또는 희석제(또는 부형제 및 희석제 둘 모두)를 포함하고 활성 성분이 적합한 투여 방법에 의해 투여되도록 하는 의약 또는 약제학적 제형을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 약제학적 조성물은 폴리펩티드와 상용성인 약제학적으로 허용가능한 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 경구 투여를 위한 정제 또는 캡슐 형태이거나, 예를 들어, 주사에 의한 정맥내 또는 피하 투여를 위한 수성 형태이다.
- [0024] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체", "개체", 및 "환자"는 척추동물, 예를 들어, 포유동물을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 포유동물은 쥐과, 유인원, 인간, 가축, 스포츠 동물(sport animal), 및 애완동물을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 생체내에서 수득되거나 시험관내에서 배양된 생물학적 실체(biological entity)의 조직, 세포, 및 이들의 자손 또한 포함된다. 어떤 용어도 의료 전문가의 감독을 수반하지 않는다.
- [0025] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "친화도" 또는 "결합 친화도"는 2개의 분자 사이의 결합 상호작용의 강도를 지

칭한다. 일반적으로, 결합 친화도는 분자와 SIRP α D1 도메인 변이체 및 CD47과 같은, 그것의 결합 파트너 사이의 비-공유 상호작용의 총 합의 강도를 지칭한다. 달리 표시되지 않는 한, 결합 친화도는 결합 쌍의 구성원 사이의 1:1 상호작용을 반영하는, 고유 결합 친화도를 지칭한다. 2개의 분자 사이의 결합 친화도는 통상적으로 해리 상수(K_D) 또는 회합 상수(K_A)로 기재된다. 서로에 대한 결합 친화도가 낮은 2개의 분자는 일반적으로 서서히 결합하고, 쉽게 해리되는 경향이 있으며, 및 큰 K_D 를 나타낸다. 서로에 대해 높은 친화도를 갖는 2개의 분자는 일반적으로 용이하게 결합하고, 보다 오래 결합된 상태로 유지되는 경향이 있으며, 및 작은 K_D 를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 2개의 상호작용하는 분자의 K_D 는 공지된 방법 및 기술, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명(SPR; surface plasmon resonance)을 사용하여 결정된다. K_D 는 k_{off}/k_{on} 의 비율로 계산될 수 있다.

[0026] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 " ~ 미만의 K_D "는 인용된 K_D 값에 대해 수치적으로 더 작은 K_D 값 및 증가하는 결합 친화도를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "~ 초과의 K_D "는 인용된 K_D 값에 대해 수치적으로 더 큰 K_D 값 및 감소하는 결합 친화도를 지칭한다.

[0027] "유효량"은 치료적 또는 예방적 결과를 포함한, 하나 이상의 원하거나 제시된 효과를 달성하기에 투여량 및 필요한 시간 기간의 적어도 효과적인 양을 지칭한다. 유효량은 1회 이상의 투여로 제공될 수 있다. 본 개시의 목적을 위해, 항체, 약물, 화합물 또는 약제학적 조성물의 유효량은 직접적으로 또는 간접적으로 예방적 또는 치료적 치료를 달성하기에 충분한 양이다. 임상적 상황에서 이해되는 바와 같이, 약물, 화합물 또는 약제학적 조성물의 유효량은 또 다른 약물, 화합물 또는 약제학적 조성물과 함께 달성될 수도 있고 달성되지 않을 수도 있다(예를 들어, 단독 요법 또는 병용 요법으로 투여되는 유효량). 따라서, "유효량"은 하나 이상의 치료제를 투여하는 맥락에서 고려될 수 있으며, 하나 이상의 다른 약제와 함께 바람직한 결과가 나타나거나 달성될 수 있는 경우 단일 약제가 유효량으로 제공되는 것으로 간주될 수 있다.

[0028] 달리 표시되지 않는 한, 본 개시의 방법 및 기법은 일반적으로 본 분야에 잘 공지된 통상적인 방법에 따라 수행되며, 본 명세서 전체를 걸쳐 인용되고 논의되는 다양한 일반적인 및 더 구체적인 참고문헌에서 기재된 바와 같다. 이러한 참고문헌은 예를 들어, Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), Ausubel 등., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (2002), 및 Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)를 포함한다. 효소 반응 및 정제 기술은 본 분야에서 일반적으로 구현되거나 본원에 기재된 바와 같이 제조업체의 사양에 따라 수행된다. 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 그리고 의약 및 약제학적 화학과 관련하여 사용되는 전문용어 및 실험실 절차 및 기술은 일반적으로 사용되며 본 분야에 잘 공지된 것이다. 표준 기술이 화학 합성, 화학 분석, 약제학적 제조, 제형, 및 전달 그리고 환자의 치료에서 사용된다.

[0029] 본원에 사용된 바와 같이, 20개의 종래의 아미노산 및 이의 약어는 종래의 용법을 따른다. *Immunology - A Synthesis*를 참조한다(2판, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

[0030] 특허 출원 및 간행물을 포함하는 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 전체적으로 참조로 본원에 원용된다.

[0031] **개요**

[0032] (a) CD47(예를 들어, hCD47)과 SIRP α (예를 들어, hSIRP α)의 상호작용을 차단하는 유효량의 제제 및 (b) 유효량의 항체-약물 접합체를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체(예를 들어, 인간 개체)의 암(예를 들어, 요로상피암)을 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

[0033] 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 SIRP α (예를 들어, hSIRP α)의 상호작용을 차단하는 제제는 CD47-SIRP α 경로의 소분자 억제제(예를 들어, RRX-001 등)이다. CD47-SIRP α 경로의 예시적인 소분자 억제제는 예를 들어, Miller 등(2019)"Quantitative high-throughput screening assays for the discovery and development of SIRP α -CD47 interaction inhibitors." *PLoS ONE* 14(7): e0218897 and Sasikumar 등ACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics; October 26-30, 2017; Philadelphia, PA; Abstract B007.을 포함하지만 이에 제한되지 않는다:

[0034] 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 SIRP α (예를 들어, hSIRP α)의 상호작용을 차단하는 제제는 CD47(예를 들어, hCD47)과 결합한다. 일부 실시형태에서, 제제는 약 10 nM 또는 더 나은(예를 들어, 적어도 약

9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 750 pM, 500pM, 250 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 20 pM 10 pM 또는 10 pM 미만 중 어느 하나) K_D 로 CD47(예를 들어, hCD47)과 결합한다. 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 결합하는 제제는 인간 대상체에서 적어도 약 50%의 CD47 수용체 점유율(예를 들어, 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 약 100% 중 어느 하나)을 나타낸다. 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 결합하는 제제는 약 80 ng/ml 이하, 예를 들어, 약 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 또는 5 ng/ml의 EC50을 갖는다. 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 결합하는 제제는 폴리펩티드이다. 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 결합하는 제제는 항-CD47 항체(예를 들어, 치료적 항-CD47 항체) 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시형태에서, 항-CD47 항체의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, scFv, 단팔항체 또는 이중항체이다. 일부 실시형태에서, 항-CD47 항체는 단일특이적 항체이다. 일부 실시형태에서, 항-CD47 항체는 다중특이적(예를 들어, 이중 특이적) 항체이다. 일부 실시형태에서, 용어 "항-CD47 항체"는 트리오파, DART(즉, 이중-친화도 재-표적화 항체), TandAb(즉, 직렬 이중항체), 탠덤 scFv, CrossMab, DNL(즉, 도크 앤 록 항체), DVD-Ig(즉, 이중 가변 도메인 면역글로불린), 4가 이중특이적 IgG, 나노바디, 이중 표적화 도메인, 및 ART-Ig(즉, 비대칭 재조작 기술-면역글로불린)를 비제한적으로 포함하는, 항체-기반 구조체(예를 들어, 다중특이적 구조체)를 포함한다. 예시적인 항체 구조체(단일특이적 및 다중특이적 모두)에 관한 추가적인 세부사항은 Husain 등(2018) *Biodrugs* 32(5): 441-464 및 Spiess 등(2015) *Molecular Immunology* 67(2): 95-106에 제공된다. 일부 실시형태에서, 항-CD47 항체는 전장 항체, 예를 들어, Hu5F9-G4, B6H12.2, BRIC126, CC-90002, SRF231, 또는 IBI188(Innovent Biologics)이다.(, 예를 들어, Zhao 등(2011), *PNAS USA* 108:18342-18347; Chao 등(2010) *Cell* 142:699-713, Kim 등(2012) *Leukemia* 26:2538-2545; Chao 등(2011) *Blood* 118:4890-4891; Goto 등(2014) *Eur. J. Cancer* 50:1836-1846; 및 Edris 등(2012) *PNAS USA* 109:6656-61에서 이러한 항-CD47 항체에 대한 추가적인 정보를 참조한다).

[0035] 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 SIRP α (예를 들어, hSIRP α)의 상호작용을 차단하는 제제는 SIRP α (예를 들어, hSIRP α)와 결합한다. 일부 실시형태에서, 제제는 약 10 nM 또는 더 나은(예를 들어, 적어도 약 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 750 pM, 500pM, 250 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 20 pM 10 pM 또는 10 pM 미만 중 어느 하나) K_D 로 SIRP α (예를 들어, hSIRP α)와 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α (예를 들어, hSIRP α)와 결합하는 제제는 인간 대상체에서 적어도 약 50%의 SIRP α 수용체 점유율(예를 들어, 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 약 100% 중 어느 하나)을 나타낸다. 일부 실시형태에서, SIRP α (예를 들어, hSIRP α)와 결합하는 제제는 약 80 ng/ml 이하, 예를 들어, 약 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 또는 5 ng/ml의 EC50을 갖는다. 일부 실시형태에서, SIRP α (예를 들어, hSIRP α)와 결합하는 제제는 폴리펩티드이다. 일부 실시형태에서, SIRP α (예를 들어, hSIRP α)와 결합하는 제제는 항-SIRP α 항체(예를 들어, 치료적 항-SIRP α 항체) 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시형태에서, 항-SIRP α 항체의 항원 결합 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, scFv, 단팔항체 또는 이중항체이다. 일부 실시형태에서, 항-SIRP α 항체는 단일특이적 항체 또는 단일특이적 항체 구조체(이상에서 기재된 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않음)이다. 일부 실시형태에서, 항-SIRP α 항체는 다중 특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체 또는 다중특이적 항체 구조체(이상에서 기재된 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않음)이다. 일부 실시형태에서, 항-SIRP α 항체는 전장 항체, 예를 들어, KWAR23, SE12C3, 040, 또는 MY-1이다(예를 들어, Ring 등(2017) *PNAS USA* 114(49): E10578-E10585); Murata 등(2018) *Cancer Sci* 109(5):1300-1308; 및 Yanigata 등(2017) *JCI Insight* 2:e89140에서 이러한 항-SIRP α 항체에 대한 추가적인 정보를 참조한다). 일부 실시형태에서, 항-SIRP α 항체는 WO 2018/057669; US-2018-0105600-A1; US20180312587; WO2018107058; WO2019023347; US20180037652; WO2018210795; WO2017178653; WO2018149938; WO2017068164; 및 WO2016063233에 기재된 항체이며, 이의 내용은 전체적으로 본원에 참조로 인용된다.

[0036] 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 SIRP α (예를 들어, hSIRP α)의 상호작용을 차단하는 제제는 항-SIRP β 항체 또는 항-SIRP γ 항체(예를 들어, SIRP α 와 결합할 수 있는 항-SIRP β 항체 또는 항-SIRP γ 항체), 또는 이의 항원-결합 단편이다. 일부 실시형태에서, 제제는 SIRP α , SIRP β , 및 SIRP γ 중 2개 이상과 결합할 수 있는 항체(또는 이의 항원 결합 단편)이다. 일부 실시형태에서, 이러한 항체는 약 10 nM 또는 더 나은(예를 들어, 적어도 약 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 750 pM, 500 pM, 250 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 20 pM, 10 pM 또는 10 pM 미만 중 어느 하나) K_D 로 SIRP α (예를 들어, hSIRP α)와 결합한다. 일부 실시형태에서, 항체(또는 이의 항원-결합 단편)는 인간 대상체에서 적어도 약 50%의 SIRP α 수용체 점유율(예를 들어, 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 약 100% 중

어느 하나)을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 항체(또는 이의 항원-결합 단편)는 약 80 ng/ml 이하, 예를 들어, 약 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 또는 5 ng/ml의 EC50을 갖는다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, scFv, 단팔항체 또는 이중항체이다. 일부 실시형태에서, 항체는 단일특이적 항체 또는 단일특이적 항체 구조체(이상에서 기재된 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않음)이다. 일부 실시형태에서, 항체는 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항체 또는 다중특이적 항체 구조체(이상에서 기재된 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않음)이다.

[0037]

일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 SIRP α(예를 들어, hSIRP α)의 상호작용을 차단하는 제제는 CD47과 결합하는 모이어티를 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 항체 Fc 영역 및 CD47과 결합하는 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 결합하는 융합 폴리펩티드의 부분은 약 10 nM 또는 더 나은(예를 들어, 적어도 약 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 750 pM, 500 pM, 250 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 20 pM, 10 pM 또는 10 pM 미만 중 어느 하나) K_D로 CD47(예를 들어, hCD47)과 결합한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 인간 대상체에서 적어도 약 50%의 CD47 수용체 점유율(예를 들어, 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 약 100% 중 어느 하나)을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 약 80 ng/ml 이하, 예를 들어, 약 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 또는 5 ng/ml 중 어느 하나의 EC50을 갖는다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 야생형 인간 항체 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 야생형 인간 항체 Fc 영역의 아미노산 서열에 대해 하나 이상의 아미노산 삽입, 결실, 및/또는 치환을 포함하는 Fc 변이체(예를 들어, 야생형 인간 항체 Fc 영역의 변이체)를 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 변이체는 WT Fc 영역과 비교하여 감소된(예를 들어 제거된 바와 같은) 효과기 기능을 나타낸다. 예시적인 Fc 변이체는 WO 2017/027422 및 US 2017/0107270에 기재되며, 이의 내용은 전체적으로 본원에 참조로 원용된다. 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 결합하는 모이어티는 WT SIRP α(예를 들어, hSIRP α), 또는 WT SIRP γ(예를 들어, hSIRP γ)이다. 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 결합하는 모이어티는 WT SIRP α(예를 들어, hSIRP α), 또는 WT SIRP γ(예를 들어, hSIRP γ)의 CD47-결합 단편(예를 들어, D1 도메인)이다. 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 결합하는 모이어티는 SIRP α 변이체, SIRP γ 변이체, SIRP β 변이체, 또는 이의 CD47-결합 단편(예를 들어, D1 도메인)이다. 일부 실시형태에서, 상술한 임의의 것의 SIRP α 변이체, SIRP γ 변이체, SIRP β 변이체, 또는 이의 CD47-결합 단편(예를 들어, D1 도메인)은 각각 상술한 임의의 것의 야생형 SIRP α, SIRP γ, SIRP β, 또는 이의 CD47-결합 단편의 아미노산 서열에 대해 하나 이상의 아미노산 삽입, 결실 또는 치환을 포함한다. 예시적인 SIRP γ 변이체 및 SIRP β 변이체는 예를 들어, WO 2013/109752; US 2015/0071905; USP 9,944,911; WO 2016/023040; WO 2017/027422; US 2017/0107270; USP 10,259,859; US9845345; WO2016187226; US20180155405; WO2017177333; WO2014094122; US2015329616; US20180312563; WO2018176132; WO2018081898; WO2018081897; PCT/US2019/048921; US20180141986A1; 및 EP3287470A1에 기재되며, 이의 내용은 전체적으로 본원에 참조로 원용된다. 예시적인 SIRP α는 본원의 다른 곳에서 더 상세히 기재된다.

[0038]

일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 SIRP α(예를 들어, hSIRP α)의 상호작용을 차단하는 제제는 항체 Fc 영역 및 SIRP α 변이체를 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 일부 실시형태에서, SIRP α 변이체는 약 10 nM 또는 더 나은(예를 들어, 적어도 약 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 750 pM, 500 pM, 250 pM, 200 pM, 100 pM, 50 pM, 25 pM, 20 pM, 10 pM 또는 10 pM 미만 중 어느 하나)K_D로 CD47(예를 들어, hCD47)과 결합한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 인간 대상체에서 적어도 약 50%의 CD47 수용체 점유율(예를 들어, 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 약 100% 중 어느 하나)을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 약 80 ng/ml 이하, 예를 들어, 약 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 또는 5 ng/ml 중 어느 하나의 EC50을 갖는다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 WT 인간 항체 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 본원에 인용된 참고문헌에 기재된 것과 같은 WT Fc 영역과 비교하여 감소된(예를 들어, 제거된 바와 같은) 효과기 기능을 나타내는 Fc 변이체(예를 들어, WT 인간 항체 Fc 영역의 변이체)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 WO 2013/109752; US 2015/0071905; WO 2016/023040; WO 2017/027422; US 2017/0107270; USP 10,259,859; US9845345; WO2016187226; US20180155405; WO2017177333; WO2014094122; US2015329616; US20180312563; WO2018176132; WO2018081898; WO2018081897; US20180141986A1; 및 EP3287470A1에 기재된 SIRP α 변이체를 포함하며, 이의 내용은 전체적으로 본원에 참조로 원용된다. 일부 실시형태에서, 항체 Fc 영역 및 SIRP α 변이체를 포함하는 융합 폴리펩티드는 TTI-621, TTI-622, 또는 IMM01이다(예를 들어, Petrova 등(2017) Clin Cancer Res

23:1086-1079; Russ 등(2018) Blood Rev S0268-960X(17)30093-0; Zhang, X, Chen, W, Fan, J *et al* Disrupting CD47-SIRP α axis alone or combined with autophagy depletion for the therapy of glioblastoma. Carcinogenesis 2018; 39: 689-99를 참조한다).

[0039] 일부 실시형태에서, CD47(예를 들어, hCD47)과 SIRP α (예를 들어, hSIRP α)의 상호작용을 차단하는 제제는 SIRP α D1 도메인 변이체(예를 들어, 본원에 기재된 SIRP α D1 도메인 변이체) 및 Fc 도메인 변이체(예를 들어, 본원에 기재된 Fc 도메인 변이체)를 포함하는 융합 폴리펩티드이다. 이러한 융합 폴리펩티드에 관한 추가의 세부 사항은 하기에 제공된다.

[0040] **신호-조절 단백질 α (SIRP α) D1 도메인 변이체 및 Fc 변이체를 포함하는 예시적인 융합 폴리펩티드**

[0041] **신호-조절 단백질 α (SIRP α) D1 도메인 변이체**

[0042] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 신호-조절 단백질 α (SIRP α) D1 도메인 또는 이의 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 야생형 SIRP α D1 도메인의 아미노산 서열에 대해 하나 이상의 아미노산 삽입, 결실, 및/또는 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 SIRP α D1 도메인(예를 들어, 서열번호 1 또는 2에 제시된 야생형 SIRP α D1 도메인)에 대해 위치 80에서의 아미노산 돌연변이; 및 잔기 6, 잔기 27, 잔기 31, 잔기 47, 잔기 53, 잔기 54, 잔기 56, 잔기 66, 및 잔기 92로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 위치에서의 야생형 SIRP α D1 도메인(예를 들어, 서열번호 1 또는 2에 제시된 야생형 SIRP α D1 도메인)에 대해 적어도 하나의 추가적인 아미노산 돌연변이를 포함하는, SIRP α D1 도메인, 또는 이의 CD47-결합 단편을 포함하는 신호-조절 단백질 α (SIRP- α) D1 변이체를 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)가 본원에 개시된다.

[0043] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체를 포함하는 융합 폴리펩티드가 또한 본원에 개시되며, 여기서 Fc 도메인 변이체 이량체는 2개의 Fc 도메인 변이체를 포함하고, 여기서 각 Fc 도메인 변이체는 (i) 돌연변이 L234A, L235A, G237A, 및 N297A로 이루어진 인간 IgG1 Fc 영역; (ii) 돌연변이 A330S, P331S 및 N297A로 이루어진 인간 IgG2 Fc 영역; 또는 (iii) 돌연변이 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역으로부터 독립적으로 선택된다.

[0044] 신호-조절 단백질 α ("SIRP- α " 또는 "SIRP-알파")는 골수 세포의 막 상에서 광범위하게 발현되는 Ig 슈퍼패밀리에 속하는 막관통 당단백질이다. SIRP α 는 신체의 많은 세포 유형 상에서 널리 발현되는 단백질인 CD47과 상호작용한다. SIRP α 와 CD47의 상호작용은 다르게는 면역계에 의해 인식될 수 있는, "자기(self)" 세포의 탐식(engulfment)을 방지한다. 종양 세포에 대한 높은 CD47 발현은, 급성 골수성 백혈병 및 여러 고형 종양 암에서, 생존에 대한 부정적인 예후 인자로 작용할 수 있는 것으로 관찰되었다.

[0045] 천연 SIRP α 는 3개의 고도로 상동성인 면역글로불린(Ig)-유사 세포의 도메인-D1, D2, 및 D3을 포함한다. SIRP α D1 도메인("D1 도메인")은 SIRP α 의 막 원위, 세포의 도메인을 지칭하며 CD47에 대한 SIRP α 의 결합을 매개한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "SIRP α 폴리펩티드"는 CD47에 결합할 수 있는 임의의 SIRP α 폴리펩티드 또는 이의 단편을 지칭한다. 야생형 인간 SIRP α 에는 적어도 10개의 변이체가 존재한다. **표 1**은 천연 발생 야생형 인간 SIRP α D1 도메인 변이체의 D1 도메인의 아미노산 서열(서열번호 1 및 2)을 나타낸다. 일부 실시형태에서, SIRP α 폴리펩티드는 SIRP α D1 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α 폴리펩티드는 서열번호 1 및 2에 제공된 것들과 같은, 야생형 D1 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α 폴리펩티드는 야생형 인간 SIRP α 의 D2 또는 D3 도메인(또는 D2 및 D3 도메인 모두)을 포함한다(표 3 참조).

표 1

야생형 SIRP α D1 도메인의 서열

서열번호	설명	아미노산 서열
1	야생형 D1 도메인 변이체 1	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGP IQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTT VSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
2	야생형 D1 도메인 변이체 2	EEELQVIQPDKSVSAAGESAILHCTVTSLIPVGP IQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTT VSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
11	야생형 pan-D1 도메인	EEX ₁ LQVIQPDKX ₂ VX ₃ VAAGEX ₄ AX ₅ LX ₆ CTX ₇ TSLIPVGP IQWFRGAGPX ₈ RELIYNQKEGH FPRVTTVSX ₉ X ₁₀ TKRX ₁₁ NMDFX ₁₂ IX ₁₃ IX ₁₄ NITPADAGTYCYVKFRKGX ₁₅ X ₁₆ DX ₁₇ EFKSG AGTELSVRX ₁₈ KPS

	서열번호 11에 대한 아미노산 치환	X ₁ 은 E 또는 G이고; X ₂ 는 S 또는 F이며; X ₃ 은 L 또는 S이고; X ₄ 는 T 또는 S이며; X ₅ 는 T 또는 I이고; X ₆ 은 R, H, 또는 L이며; X ₇ 은 A 또는 V이고; X ₈ 은 G 또는 A이며; X ₉ 는 D 또는 E이고; X ₁₀ 은 L 또는 S이며; X ₁₁ 은 N 또는 E 또는 D이고; X ₁₂ 는 S 또는 P이며; X ₁₃ 은 R 또는 S이고; X ₁₄ 는 G 또는 S이며; X ₁₅ 는 P이거나 부재하고; X ₁₆ 은 D 또는 P이며; X ₁₇ 은 V 또는 T이고; 및 X ₁₈ 은 A 또는 G임
--	---------------------	--

- [0047] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "SIRP α D1 도메인 변이체"는 야생형 SIRP α 보다 CD47에 대해 더 높은 친화도를 갖는 SIRP α D1 도메인 또는 SIRP α 폴리펩티드의 CD47-결합 부분을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. SIRP α D1 도메인 변이체는 야생형 SIRP α 의 아미노산 서열에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환, 결실, 또는 삽입(또는 이들의 조합)을 포함한다.
- [0048] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 1 및 2에 표시된 야생형 D1 도메인에 대해 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입, 부가, 또는 결실을 포함하는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다. **표 2**는 각 SIRP α D1 도메인 변이체(서열번호 13 내지 14)에서의 예시적인 아미노산 치환을 열거한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 SIRP α D1 도메인 변이체의 단편(예를 들어, CD47-결합 단편)을 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체의 단편(예를 들어, CD47-결합 단편)은 10개 미만의 아미노산 길이, 약 10개 아미노산 길이, 약 20개 아미노산 길이, 약 30개 아미노산 길이, 약 40개 아미노산 길이, 약 50개 아미노산 길이, 약 60개 아미노산 길이, 약 70개 아미노산 길이, 약 80개 아미노산 길이, 약 90개 아미노산 길이, 약 100개 이상 아미노산 길이의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0049] 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 융합 폴리펩티드는 야생형 인간 SIRP α D1 도메인보다 CD47에 대해 더 높은 결합 친화도로 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 천연 발생 D1 도메인의 친화도보다 적어도 1배(예를 들어, 적어도 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 5배 이상)의 친화도로 인간 CD47에 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 천연 발생 D1 도메인의 친화도보다 적어도 1배(예를 들어, 적어도 10배, 100배, 1000배 이상)의 친화도로 인간 CD47에 결합한다.
- [0050] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "최적화된 친화도" 또는 "최적화된 결합 친화도"는 본원에 개시된 융합 폴리펩티드(예를 들어, SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 융합 폴리펩티드)와 CD47의 결합 상호작용의 최적화된 강도를 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 암 세포 상의 CD47에 주로 또는 더 높은 친화도로 결합하고 비-암 세포 상의 CD47에 실질적으로 결합하지 않거나 더 낮은 친화도로 결합한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드와 CD47의 결합 친화도는 최적화되어 상호작용이 최대 친화도로 결합하는 변이체와 비교하여 임상적으로 관련된 독성을 유발하지 않거나 독성을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드와 CD47의 최적화된 결합 친화도를 달성하기 위해, SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 융합 폴리펩티드는 최대 달성가능한 것보다 CD47에 대해 더 낮은 결합 친화도를 갖도록 개발된다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 설치류 CD47(예를 들어, 마우스 CD47 또는 래트 CD47), 비-인간 영장류(NHP) CD47(예를 들어, 시노몰구스 CD47), 및 인간 CD47과 교차 반응하는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다.
- [0051] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역원성"은 마치 외래 항원인 것처럼 숙주에서 면역 반응을 유발하는 단백질(예를 들어, 치료적 단백질)의 특성을 지칭한다. 단백질의 면역원성은 시험관내 T-세포 증식 검정과 같은, 다양한 상이한 방식으로 시험관내 검증될 수 있다.
- [0052] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "최소 면역원성"은 아미노산 치환이 도입되기 전(예를 들어, 비변형된 단백질)의 면역원성보다 더 낮게(예를 들어, 적어도 10%, 25%, 50%, 또는 100% 더 낮게), 예를 들어, 아미노산 치환을 통해 변형된 폴리펩티드(예를 들어, 치료적 폴리펩티드)의 면역원성을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드(예를 들어, SIRP α D1 도메인 변이체 및 Fc 변이체를 포함하는 폴리펩티드)는 최소 면역원성을 갖도록 변형되고, 대상체의 면역계에 의해 외래 항원으로 인식될 수 있더라도 대상체(예를 들어, 인간 대상체)에서 면역 반응을 전혀 유발하지 않거나 매우 적게 유발한다.
- [0053] 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 융합 폴리펩티드는 최소 면역원성을 입증한다. 일부 실시형태에서, 대상체에게 투여된 융합 폴리펩티드는 SIRP α D1 도메인 변이체의 친화도를 증가시키는 아미노산 변화를 제외하고, 대상체의 내인성 SIRP α 와 동일한 아미노산 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 항-CD47 항체 또는 야생형 SIRP α 와 비교하여 부작용의 위험을 낮추는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 항-CD47 항체 또는 야

생형 SIRP α와 비교하여 빈혈의 위험을 낮추는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 설치류 또는 비-인간 영장류(NHP) 연구에서 급성 빈혈을 유발하지 않는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다.

[0054]

표 2는 각 D1 도메인 서열에 대한 SIRP α D1 도메인 변이체의 특정 아미노산 치환을 열거한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드의 SIRP α D1 도메인 변이체는 표 2에 열거된 치환 중 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개 이상)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드의 SIRP α D1 도메인 변이체는 야생형 D1 도메인에 대해 최대 15개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드의 SIRP α D1 도메인 변이체는 야생형 D1 도메인에 대해 최대 10개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드의 SIRP α D1 도메인 변이체는 야생형 D1 도메인에 대해 최대 7개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 야생형 D1 도메인의 서열에 대해 적어도 90%(예를 들어, 적어도 92%, 95%, 97% 이상)의 아미노산 서열 동일성을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다.

[0055]

일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 2개 이상의 야생형 D1 도메인 또는 이의 변이체의 일부(예를 들어, 제1 종의 제1 야생형 D1 도메인(또는 이의 변이체)의 일부 또는 제2 종의 제2 야생형 D1 도메인(또는 이의 변이체)의 일부)를 포함하는 변이체와 같은 키메라 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키메라 SIRP α D1 도메인 변이체는 의부분 적어도 2개(예를 들어, 3개, 4개, 5개 이상의 부분)의 야생형 D1 도메인으로 부터의 부분을 포함하며, 여기서 각 부분은 상이한 야생형 D1 도메인(예를 들어, 각 야생형 D1 도메인은 상이한 종으로부터 유래됨)으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 표 2에 열거된 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함하는 키메라 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다.

표 2

[0056]

SIRP α D1 도메인 변이체의 아미노산 치환

서열번호	설명	아미노산 서열
13	D1 도메인 v1	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TS LX ₅ PVGPIQWFRGAGPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFSIRIGNITPADAGTYXCX ₁₂ KX ₁₃ RKGSPDDVEX ₁₄ KSGAGTELSVRAKPS
-	서열번호 13에 대한 아미노산 치환	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =V, I; X ₁₃ =F, L, V; X ₁₄ =F, V
14	D1 도메인 v2	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TS LX ₅ PVGPIQWFRGAGPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISNITPADAGTYXCX ₁₂ KX ₁₃ RKGSPDTEX ₁₄ KSGAGTELSVRAKPS
-	서열번호 14에 대한 아미노산 치환	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =V, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =V, I; X ₁₃ =F, L, V; X ₁₄ =F, V
23	Pan D1 도메인	EEX ₁ X ₂ QX ₃ IQPDKX ₄ VX ₅ VAAGEX ₆ X ₇ X ₈ LX ₉ CTX ₁₀ TS LX ₁₁ PVGPIQWFRGAGPX ₁₂ RX ₁₃ LIYNQX ₁₄ X ₁₅ GX ₁₆ FPRVTTVSX ₁₇ X ₁₈ TX ₁₉ RX ₂₀ NMDFX ₂₁ IX ₂₂ IX ₂₃ NITPADAGTYXCX ₂₄ KX ₂₅ RKGSPDX ₂₆ X ₂₇ EX ₂₈ KSGAGTELSVRX ₂₉ KPS
-	서열번호 23에 대한 아미노산 치환	X ₁ =E, G; X ₂ =L, I, V; X ₃ =V, L, I; X ₄ =S, F; X ₅ =L, S; X ₆ =S, T; X ₇ =A, V; X ₈ =I, T; X ₉ =H, R; X ₁₀ =A, V, I, L; X ₁₁ =I, T, S, F; X ₁₂ =A, G; X ₁₃ =E, V, L; X ₁₄ =K, R; X ₁₅ =E, Q; X ₁₆ =H, P, R; X ₁₇ =D, E; X ₁₈ =S, L, T, G; X ₁₉ =K, R; X ₂₀ =E, D; X ₂₁ =S, P; X ₂₂ =S, R; X ₂₃ =S, G; X ₂₄ =V, I; X ₂₅ =F, L, V; X ₂₆ =D 또는 부재; X ₂₇ =T, V; X ₂₈ =F, V; 및 X ₂₉ =A, G

[0057]

일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 EEEX₁QX₂IQPDKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TS LX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGNITPADAGTYXCX₁₂KX₁₃RKGSPDDVEX₁₄KSGAGTELSVRAKPS(서열번호 13)의 서열을 포함하는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 X₁은 L, I, 또는 V이고; X₂는 V, L, 또는 I이며; X₃은 A 또는 V이고; X₄는 A, I, 또는 L이며; X₅는 I, T, S, 또는 F이고; X₆은 E, V, 또는 L이며; X₇은 K 또는 R이고; X₈은 E 또는 Q이며; X₉는 H, P, 또는 R이고; X₁₀은 L, T,

또는 G이며; X_{11} 은 K 또는 R이고; X_{12} 는 V 또는 I이며; X_{13} 은 F, L, 또는 V이고; 및 X_{14} 는 F 또는 V이며; 여기서 변이체는 서열번호 1의 서열을 포함하는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0058] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 13의 서열을 포함하는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 X_1 은 L, I, 또는 V이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_2 는 V, L, 또는, I이다. 일부 실시형태에서, X_3 은 A 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X_4 는 A, I, 또는 L이다. 일부 실시형태에서, X_5 는 I, T, S, 또는 F이다. 일부 실시형태에서, X_6 은 E, V, 또는 L이다. 일부 실시형태에서, X_7 은 K 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_8 은 E 또는 Q이다. 일부 실시형태에서, X_9 는 H, P, 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_{10} 은 L, T, 또는 G이다. 일부 실시형태에서, X_{11} 은 K 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_{12} 는 V 또는 I이다. 일부 실시형태에서, X_{13} 은 F, L, V이다. 일부 실시형태에서, X_{14} 는 F 또는 V이다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 포함하는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 6개 이하의 아미노산 치환을 포함하는 SIRP α D1 도메인 변이체(또는 이의 CD47-결합 단편)를 포함한다.

[0059] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 포함하는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 10배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 포함하는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 포함하는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 1000배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 1×10^{-8} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 5×10^{-10} M 미만, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합하는 SIRP α D1 도메인 변이체 또는 이의 CD47 결합 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 약 500 nM 내지 100 nM, 약 100 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 10 nM, 약 10 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 1 nM, 약 1 nM 내지 500 pM, 약 500 pM 내지 100 pM, 약 100 pM 내지 50 pM, 또는 약 50 pM 내지 10 pM의 K_D 로 CD47에 결합하는 SIRP α D1 도메인 변이체 또는 이의 CD47-결합 단편을 포함한다.

[0060] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는
EEEX₁QX₂IQPKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TS LX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISNITPADAGTYXCX₁₂
KX₁₃RKGSPDTEX₁₄KSGAGTELSVRKPS(서열번호 14)의 서열을 포함하는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 X_1 은 L, I, 또는 V이고; X_2 는 V, L, 또는 I이며; X_3 은 A 또는 V이고; X_4 는 V, I, 또는 L이며; X_5 는 I, T, S, 또는 F이고; X_6 은 E, V, 또는 L이며; X_7 은 K 또는 R이고; X_8 은 E 또는 Q이며; X_9 는 H, P, 또는 R이고; X_{10} 은 S, T, 또는 G이며; X_{11} 은 K 또는 R이고; X_{12} 는 V 또는 I이며; X_{13} 은 F, L, 또는 V이고; 및 X_{14} 는 F 또는 V이며; 여기서 변이체는 서열번호 2의 서열을 포함하는 야생형 SIRP α D1 도메인 에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0061] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 14의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 L, I, 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X_2 는 V, L, 또는, I이다. 일부 실시형태에서, X_3 은 A 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X_4 는 V, I, 또는 L이다. 일부 실시형태에서, X_5 는 I, T, S, 또는 F이다. 일부 실시형태에서, X_6 은 E, V, 또는 L이다. 일부 실시형태에서, X_7 은 K 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_8 은 E 또는 Q이다. 일부 실시형태에서, X_9 는 H, P, 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_{10} 은 S, T, 또는 G이다. 일부 실시형태에서, X_{11} 은 K 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_{12} 는 V 또는 I이다. 일부 실시형태에서, X_{13} 은 F, L, 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X_{14} 는 F 또는 V이다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 포함하는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 6개 이하의 아미노산 치환을 포함하는 SIRP α D1 도메인 변이체(또는 이의 CD47-결합 단편)를 포함한다.

[0062] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 포함하는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 10배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 포함하는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 포함하는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 1000배 더 큰 결합 친화도로

CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 1×10^{-8} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 5×10^{-10} M 미만, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합하는 SIRP α D1 도메인 변이체(또는 이의 CD47 결합 단편)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 약 500 nM 내지 100 nM, 약 100 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 10 nM, 약 10 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 1 nM, 약 1 nM 내지 500 pM, 약 500 pM 내지 100 pM, 약 100 pM 내지 50 pM, 또는 약 50 pM 내지 10 pM의 K_D 로 CD47에 결합하는 SIRP α D1 도메인 변이체(또는 이의 CD47-결합 단편)를 포함한다.

[0063] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 EEX₁X₂QX₃IQPDKX₄VX₅VAAGEX₆X₇X₈LX₉CTX₁₀TSLX₁₁PVGPIQWFRGAGPX₁₂RX₁₃LIYNQX₁₄X₁₅GX₁₆FPRVTTVSX₁₇X₁₈TX₁₉RX₂₀NMDFX₂₁IX₂₂IX₂₃NITPADAGTYCYX₂₄KX₂₅RKGSPDX₂₆X₂₇EX₂₈KSGAGTELSVRX₂₉KPS(서열번호 23)의 서열을 포함하는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 X₁은 E 또는 G이고; X₂는 L, I, 또는 V이며; X₃은 V, L, 또는 I이고; X₄는 S 또는 F이며; X₅는 L 또는 S이고; X₆은 S 또는 T이며; X₇은 A 또는 V이고; X₈은 I 또는 T이며; X₉는 H 또는 R이고; X₁₀은 A, V, I, 또는 L이며; X₁₁은 I, T, S, 또는 F이고; X₁₂는 A 또는 G이며; X₁₃은 E, V, 또는 L이고; X₁₄는 K 또는 R이며; X₁₅는 E 또는 Q이고; X₁₆은 H, P, 또는 R이며; X₁₇은 D 또는 E이고; X₁₈은 S, L, T, 또는 G이며; X₁₉는 K 또는 R이고; X₂₀은 E 또는 D이며; X₂₁은 S 또는 P이고; X₂₂는 S 또는 R이며; X₂₃은 S 또는 G이고; X₂₄는 V 또는 I이며; X₂₅는 F, L, V이고; X₂₆은 D이거나 부재하며; X₂₇은 T 또는 V이고; X₂₈은 F 또는 V이며; X₂₉는 A 또는 G이고; 여기서 변이체는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0064] 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X₂는 L, I, 또는 V이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₃은 V, L, 또는 I이다. 실시형태에서, X₄는 S 또는 F이다. 일부 실시형태에서, X₅는 L 또는 S이다. 일부 실시형태에서, X₆은 S 또는 T이다. 일부 실시형태에서, X₇은 A 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X₈은 I 또는 T이다. 일부 실시형태에서, X₉는 H 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X₁₀은 A, V, I, 또는 L이다. 일부 실시형태에서, X₁₁은 I, T, S, 또는 F이다. 일부 실시형태에서, X₁₂는 A 또는 G이다. 일부 실시형태에서, X₁₃은 E, V, 또는 L이다. 일부 실시형태에서, X₁₄는 K 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X₁₅는 E 또는 Q이다. 일부 실시형태에서, X₁₆은 H, P, 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X₁₇은 D 또는 E이다. 일부 실시형태에서, X₁₈은 S, L, T, 또는 G이다. 일부 실시형태에서, X₁₉는 K 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X₂₀은 E 또는 D이다. 일부 실시형태에서, X₂₁은 S 또는 P이다. 일부 실시형태에서, X₂₂는 S 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X₂₃은 S 또는 G이다. 일부 실시형태에서, X₂₄는 V 또는 I이다. 일부 실시형태에서, X₂₅는 F, L, V이다. 일부 실시형태에서, X₂₆은 D이거나 부재하다. 일부 실시형태에서, X₂₇은 T 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X₂₈은 F 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X₂₉는 A 또는 G이다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 2의 서열을 포함하는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 6개 이하의 아미노산 치환을 포함하는 SIRP α D1 도메인 변이체(또는 이의 CD47-결합 단편)를 포함한다.

[0065] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 10배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 1000배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 1×10^{-8} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 5×10^{-10} M 미만, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합하는 SIRP α D1 도메인 변이체(또는 이의 CD47 결합 단편)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 약 500 nM 내지 100 nM, 약 100 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 10 nM, 약 10 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 1 nM, 약 1 nM 내지 500 pM, 약 500 pM 내지 100 pM, 약 100 pM 내지 50 pM, 또는 약 50 pM 내지 10 pM의 K_D 로 CD47에 결합하는 SIRP α D1 도메인 변이체(또는 이의 CD47-결합 단편)를 포함한다.

[0066] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 24의 서열을 포함하는 SIRP α D2 도메인 또는 서열번호 25의

서열을 갖는 SIRP α D3 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열번호 24를 포함하는 SIRP α D2 도메인 및 서열번호 25를 포함하는 SIRP α D3 도메인을 포함한다(표 3 참조). 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 D2 도메인의 단편 또는 변이체 또는 D3 도메인의 단편 또는 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 D2 도메인의 단편 또는 변이체 및 D3 도메인의 단편 또는 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 링커를 통해 D2 또는 D3 도메인에 접합된다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 링커를 통해 D2 및 D3 도메인에 접합된다.

표 3

SIRP α D2 및 D3 도메인의 아미노산 서열

서열번호	설명	아미노산 서열
24	SIRP α D2 도메인	APVVS GPAARATPQHTVSFTCE SHGFS PRDITLKWFKNGNELSDFQTNVDPVGESVSYSIHSTAK VVLTRDVHSQVICEVAHVTLQGDPLRG TANLSETIR
25	SIRP α D3 도메인	VPPTLEV TQQPVR AENQVNVTCQVRKFYPQRLQLTWLENGNVSR TETASTVTENKDGTYNWM SWL LVNVS AHRDDVKLTQCEVHDGQPAVSKSHDLKVS

일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 Fc 도메인 또는 Fc 도메인 변이체에 부착된(예를 들어, 융합된, 예를 들어 유전적으로 융합된) SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 이량체화할 수 없는 Fc 도메인 변이체에 부착된(예를 들어, 융합된, 예를 들어 유전적으로 융합된) SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 및 Fc 도메인 또는 Fc 도메인 변이체를 포함하는 융합 폴리펩티드는 Fc 도메인 또는 Fc 도메인 변이체를 포함하지 않는 융합 폴리펩티드와 비교하여 개선된 약동학적 특성을 나타내며, 예를 들어 혈청 반감기를 증가시킨다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 융합 폴리펩티드는 표 4에 나타난 서열번호 26 내지 36 중 어느 하나의 서열을 포함하지 않는다.

표 4

예시적인 SIRP α D1 도메인 변이체

서열번호	아미노산 서열
26	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQREGHFPRVTTVSETTRRENMDFSISISNITPADAG TYCYVKFRKGSPTDEVKSGAGTELSVRAKPS
27	EEEVQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGHFPRVTTVSEGTTRRENMDFSISISNITPADAG TYCYIKFRKGSPTDETFKSGAGTELSVRAKPS
28	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESVILHCTITSLTPVGPIQWFRGAGPARLLIYNQREGPFPRVTTVSETTRRENMDFSISISNITPADAG TYCYVKLRKGSPTDETFKSGAGTELSVRAKPS
29	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLSPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAG TYCYIKLRKGSPTDETFKSGAGTELSVRAKPS
30	EEELQVIQPDKSVSVAAGESVILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGRFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAG TYCYVKVRKGSPTDEVKSGAGTELSVRAKPS
31	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESIILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQREGRFPRVTTVSEGTTRRENMDFSISISNITPADAG TYCYIKLRKGSPTDETFKSGAGTELSVRAKPS
32	EEEVQLIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQREGPFPRVTTVSEGTKRENMDFSISISNITPADAG TYCYIKFRKGSPTDEVKSGAGTELSVRAKPS
33	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAG TYCYIKFRKGSPTDVEFKSGAGTELSVRAKPS
34	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARLLIYNQRQGFPRVTTVSETTKRENMDFSISISNITPADAG TYCYVKFRKGSPTDETFKSGAGTELSVRAKPS
35	EEEVQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQKQGFPRVTTISETTRRENMDFSISISNITPADAG TYCYIKFRKGSPTDETFKSGAGTELSVRAKPS
36	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLTPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGFPRVTTVSEGTTRRENMDFSISISNITPADAG TYCYIKFRKGSPTDEVKSGAGTELSVRAKPS

일부 실시형태에서, 본원에 기재된 융합 폴리펩티드는 면역 검정과 같은, 결합 검정을 위해 시험관내에서 활용된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 융합 폴리펩티드는 액상으로 활용되거나 고상 담체에 결합된다. 일부 실시형태에서, 면역 검정에 활용되는 융합 폴리펩티드는 다양한 방식으로 검출가능하게 표지된다.

일부 실시형태에서, 본원에 기재된 융합 폴리펩티드는 다양한 담체에 결합되고 특정 항원 발현 세포의 존재를

검출하기 위해 사용된다. 담체의 예는 유리, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 나일론, 아밀라아제, 천연 및 변형된 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 아가로스, 및 자철석을 포함한다. 담체의 성질은 용해성 또는 불용성일 수 있다.

[0072] 다양한 상이한 표지 및 표지 방법이 공지되어 있다. 표지의 예는 효소, 방사성 동위원소, 형광 화합물, 콜로이드 금속, 화학발광 화합물, 및 생물-발광 화합물을 포함한다. 본원에 개시된 폴리펩티드에 표지를 결합하기 위한 다양한 기술이 이용가능하다.

[0073] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 저분자량 합텐에 커플링된다. 이어서 이러한 합텐은 제2 반응을 통해 구체적으로 검출된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 합텐 비오틴아민은 아비딘과 함께 사용되거나 합텐 디니트로페닐, 피리독살, 또는 플루오레세인은 특정 항-합텐 항체(예를 들어, 각각 항-디니트로페닐 항체, 항-피리독살 항체, 및 항-플루오레세인 항체)와 함께 검출된다.

[0074] **변경된 글리코실화 패턴을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체**

[0075] 일부 실시형태에서, 야생형 SIRP α D1 도메인(예를 들어, 서열번호 1 또는 2에 제시된 야생형 SIRP α D1 도메인)에 대해 잔기 80에서 아미노산 돌연변이; 및 잔기 6, 잔기 27, 잔기 31, 잔기 47, 잔기 53, 잔기 54, 잔기 56, 잔기 66, 및 잔기 92로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기에서 야생형 SIRP α D1 도메인(예를 들어, 서열번호 1 또는 2에 제시된 야생형 SIRP α D1 도메인)에 대해 적어도 하나의 추가적인 아미노산 돌연변이를 갖는, SIRP α D1 도메인, 또는 이의 단편을 포함하는 신호-조절 단백질 α (SIRP- α) D1 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 개시된다.

[0076] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 또한 본원에 개시되며, 여기서 Fc 도메인 변이체 이량체는 2개의 Fc 도메인 변이체를 포함하고, 여기서 각 Fc 도메인 변이체는 (i) 돌연변이 L234A, L235A, G237A, 및 N297A로 이루어진 인간 IgG1 Fc 영역; (ii) 돌연변이 A330S, P331S 및 N297A로 이루어진 인간 IgG2 Fc 영역; 또는 (iii) 돌연변이 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역으로부터 독립적으로 선택된다.

[0077] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 조성물 중 폴리펩티드는 글리코실화가 감소되거나 최소인 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다. **표 1**의 서열번호 1 및 2의 D1 도메인은 각각 서열 N80ITP의 아미노산 N80에서 단일의 잠재적인 N-연결 글리코실화 부위를 포함한다. 차이나이즈 햄스터 난소(CHO; Chinese Hamster Ovary) 세포에서 SIRP α D1 도메인의 발현은 16 kDa의 메이저 밴드(비-글리코실화됨) 및 Endo Hf에 의해 제거된 고분자량의 마이너 밴드를 생성한다. Endo Hf는 엔도글리코시다제 H 및 말토스 결합 단백질의 재조합 단백질 융합이다. Endo Hf는 고만노스의 키토비오스 코어(chitobiose core) 내에서 N-연결 당단백질로부터 일부 하이브리드 올리고당을 절단한다. 이는 아미노산 위치 83의 프롤린이 글리코실화 효율을 감소시켜, 글리코실화 정도가 상이하고 따라서 이질성을 갖는 단백질로 이어질 수 있음을 의미한다. 약물 개발의 경우, 이질성으로 인해 공정 개발에서 문제가 발생할 수 있다. 따라서, 균질하고, 비-글리코실화된 형태의 SIRP α D1 도메인 변이체를 생성할 가능성을 조사하기 위해, 일부 실시형태에서, SIRP α D1 변이체의 아미노산 N80이 Ala로 돌연변이된다. 일부 실시형태에서, 비-글리코실화된 SIRP α D1 도메인 변이체를 제조하기 위해, SIRP α D1 도메인 변이체의 아미노산 N80이 임의의 천연 및 비-천연 발생 아미노산, 예를 들어, N80A 및 N80Q를 포함하는, 임의의 아미노산으로 대체된다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 N80A 돌연변이 및 적어도 1개의 추가적인 돌연변이(예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 또는 그 이상의 추가적인 돌연변이)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 추가적인 돌연변이는 CD47 결합 부위에 있다. 일부 실시형태에서, 추가적인 돌연변이는 D1 도메인의 소수성 코어에 있다.

[0078] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 조성물 중 폴리펩티드는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 글리코실화가 증가된 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다. 최종 생성물의 균질성을 증가시키는 또 다른 옵션은 아미노산 N80에서 글리코실화의 효율을 증가시키고 야생형에 대해 글리코실화가 증가된 SIRP α D1 도메인 변이체를 생성하는 것이다. 일부 실시형태에서, 서열 NITP83의 아미노산 P83은 아미노산 N80에서의 글리코실화 정도에 영향을 미친다. 일부 실시형태에서, P83을 임의의 아미노산으로 변화시키는 것은 N80에서의 글리코실화 효율을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체의 아미노산 P83은 천연 및 비-천연 아미노산, 예를 들어, P83V, P83A, P83I, 및 P83L을 포함하는, 임의의 아미노산으로 대체된다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 폴리펩티드는, 예를 들어, 세포주의 유전자 조작(예를 들어, 유전자 조작된 효모 또는 포유동물 숙주) 또는 키푼넨신(kifunensine)의 첨가와같은 세포 배양 조건의 변형 또는 원핵생물(대장균 등)과 같은 천연적 비-글리코실화 숙주를 사용함으로써, 이러한 세포에 의해 발현되는 단백질을 글리코실화하지 않도록 최적화된 세포에서

발현된다.

[0079] 표 5는 각각의 D1 도메인 변이체 서열에 대한 SIRP α D1 도메인 변이체의 특정 아미노산 치환을 열거한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 표 5에 열거된 치환 중 하나이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개 또는 그 이상)을 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 글리코실화되지 않거나 최소한으로 글리코실화된다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 완전히 글리코실화되거나 거의 완전히 글리코실화된다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 야생형 D1 도메인에 대해 최대 14개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 야생형 D1 도메인에 대해 최대 10개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 야생형 D1 도메인에 대해 최대 7개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 SIRP α D1 도메인 변이체는 야생형 D1 도메인의서열에 대해 적어도 90%(예를 들어, 적어도 92%, 95%, 97% 또는 97% 초과)의 아미노산 서열 동일성을 갖는다.

[0080] 일부 실시양태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 2개 이상의 야생형 D1 도메인 또는 이의 변이체의 일부(예를 들어, 하나의 야생형 D1 도메인 또는 이의 변이체 및 또 다른 야생형 D1 도메인 또는 이의 변이체의 일부)를 포함하는 키메라 SIRP α D1 도메인 변이체이다. 일부 실시형태에서, 키메라 SIRP α D1 도메인 변이체는 야생형 D1 도메인 또는 이의 변이체의적어도 2개의 부분(예를 들어, 3개, 4개, 5개 또는 그 이상의 부분)을 포함하며, 여기서 부분의 각각은 상이한 야생형 D1 도메인으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 키메라 SIRP α D1 도메인 변이체는 표 5에열거된 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

표 5

SIRP α D1 도메인 변이체의 아미노산 치환

[0081]

서열번호	설명	아미노산 서열
37	D1 도메인 v1	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVLVAAGETX ₃ TLRCTX ₄ TS LX ₅ PVGPIQWFRGAGPGRX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSDX ₁₀ TX ₁₁ RNNMDFSIRIGX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPPDDVEX ₁₆ KSGAGTELSVRAKPS
-	서열번호 37에 대한 아미노산 치환	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =A, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =L, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
38	D1 도메인 v2	EEEX ₁ QX ₂ IQPDKSVSVAAGESX ₃ ILHCTX ₄ TS LX ₅ PVGPIQWFRGAGPARX ₆ LIYNQX ₇ X ₈ GX ₉ FPRVTTVSEX ₁₀ TX ₁₁ RENMDFSISISX ₁₂ ITX ₁₃ ADAGTYCYX ₁₄ KX ₁₅ RKGSPPDTE X ₁₆ KSGAGTELSVRAKPS
-	서열번호 38에 대한 아미노산 치환	X ₁ =L, I, V; X ₂ =V, L, I; X ₃ =A, V; X ₄ =V, I, L; X ₅ =I, T, S, F; X ₆ =E, V, L; X ₇ =K, R; X ₈ =E, Q; X ₉ =H, P, R; X ₁₀ =S, T, G; X ₁₁ =K, R; X ₁₂ =N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₃ =P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y; X ₁₄ =V, I; X ₁₅ =F, L, V; X ₁₆ =F, V
47	Pan D1 도메인	EEX ₁ X ₂ QX ₃ IQPDKX ₄ VX ₅ VAAGEX ₆ X ₇ X ₈ LX ₉ CTX ₁₀ TS LX ₁₁ PVGPIQWFRGAGPX ₁₂ RX ₁₃ LIYNQX ₁₄ X ₁₅ GX ₁₆ FPRVTTVSX ₁₇ X ₁₈ TX ₁₉ RX ₂₀ NMDFX ₂₁ IX ₂₂ IX ₂₃ X ₂₄ ITX ₂₅ ADAGTYCYX ₂₆ KX ₂₇ RKGSPDX ₂₈ X ₂₉ EX ₃₀ KSGAGTELSVRX ₃₁ KPS
-	서열번호 47에 대한 아미노산 치환	X ₁ =E, G; X ₂ =L, I, V; X ₃ =V, L, I; X ₄ =S, F; X ₅ =L, S; X ₆ =S, T; X ₇ =A, V; X ₈ =I, T; X ₉ =H, R, L; X ₁₀ =A, V, I, L; X ₁₁ =I, T, S, F; X ₁₂ =A, G; X ₁₃ =E, V, L; X ₁₄ =K, R; X ₁₅ =E, Q; X ₁₆ =H, P, R; X ₁₇ =D, E; X ₁₈ =S, L, T, G; X ₁₉ =K, R; X ₂₀ =E, N; X ₂₁ =S, P; X ₂₂ =S, R; X ₂₃ =S, G; X ₂₄ =임의의 아미노산; X ₂₅ =임의의 아미노산; X ₂₆ =V, I; X ₂₇ =F, L, V; X ₂₈ =D 또는 부재; X ₂₉ =T, V; X ₃₀ =F, V; 및 X ₃₁ =A, G
48	Pan D1 도메인	EEELQX ₁ IQPDKSVX ₂ VAAGEX ₃ AX ₄ LX ₅ CTX ₆ TS LX ₇ PVGPIQWFRGAGPX ₈ RX ₉ LIYNQX ₁₀ X ₁₁ GX ₁₂ FPRVTTVSX ₁₃ X ₁₄ TKRX ₁₅ NMDFSIX ₁₆ IX ₁₇ X ₁₈ ITPADAGTYCYX ₁₉ KFRKGX ₂₀ X ₂₁ X ₂₂ DX ₂₃ EFKSGAGTELSVRAKPS

-	서열번호 48에 대한 아미노산 치환	X ₁ =V, I; X ₂ =L, S; X ₃ =T, S; X ₄ =T, I; X ₅ =R, H; X ₆ =A, V, I; X ₇ =I, R, Y, K, F; X ₈ =G, A; X ₉ =E, V; X ₁₀ =K, R; X ₁₁ =E, D, Q; X ₁₂ =H, P; X ₁₃ =D, E; X ₁₄ =S, L, T; X ₁₅ =N, E; X ₁₆ =R, S; X ₁₇ =G, S; X ₁₈ =N, A; X ₁₉ =V, I; X ₂₀ =S, I, M; X ₂₁ =P 또는 부재; X ₂₂ =D, P; 및 X ₂₃ =V, T
49	Pan D1 도메인	EEELQX ₁ IQPKSVLVAAGETATLRCTX ₂ TS LX ₃ PVGPIQWFRGAGPGRX ₄ LIYNQX ₅ X ₆ GX ₇ FP RVTTVSDX ₈ TKRNNMDFSIRIGX ₉ ITPADAGTYCYX ₁₀ KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKP S
-	서열번호 49에 대한 아미노산 치환	X ₁ =V, I, L; X ₂ =A, I, V, L; X ₃ =I, F, S, T; X ₄ =E, V, L; X ₅ =K, R; X ₆ =E, Q; X ₇ =H, P, R; X ₈ =L, T, S, G; X ₉ =A; 및 X ₁₀ =V, I
50	Pan D1 도메인	EEELQX ₁ IQPKSVSVAAGESAILHCTX ₂ TS LX ₃ PVGPIQWFRGAGPARX ₄ LIYNQX ₅ X ₆ GX ₇ FP RVTTVSEX ₈ TKRENMDFSISISX ₉ ITPADAGTYCYX ₁₀ KFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
-	서열번호 50에 대한 아미노산 치환	X ₁ =V, I; X ₂ =V, I; X ₃ =I, F; X ₄ =E, V; X ₅ =K, R; X ₆ =E, Q; X ₇ =H, P; X ₈ =S, T; X ₉ =N, A; 및 X ₁₀ =V, I
51	Pan D1 도메인	EEELQX ₁ IQPKSVLVAAGETATLRCTX ₂ TS LX ₃ PVGPIQWFRGAGPGRX ₄ LIYNQX ₅ EGX ₆ FPR VTTVSDX ₇ TKRNNMDFSIRIGX ₈ ITPADAGTYCYX ₉ KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
-	서열번호 51에 대한 아미노산 치환	X ₁ =V, I; X ₂ =A, I; X ₃ =I, F; X ₄ =E, V; X ₅ =K, R; X ₆ =H, P; X ₇ =L, T; X ₈ =N, A; 및 X ₉ =V, I
52	Pan D1 도메인	EEELQX ₁ IQPKSVLVAAGETATLRCTX ₂ TS LX ₃ PVGPIQWFRGAGPGREL IYNQX ₄ EGX ₅ FPR VTTVSDX ₆ TKRNNMDFSIRIGX ₇ ITPADAGTYCYX ₈ KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
-	서열번호 52에 대한 아미노산 치환	X ₁ =V, L, I; X ₂ =A, I, L; X ₃ =I, T, S, F; X ₄ =K, R; X ₅ =H, P, R; X ₆ =L, T, G; 및 X ₇ =N, A
212	Pan D1 도메인	EEELQX ₁ IQPKSVSVAAGESAILHCTX ₂ TS LX ₃ PVGPIQWFRGAGPARELIYNQX ₄ EGX ₅ FPR VTTVSEX ₆ TKRENMDFSISISX ₇ ITPADAGTYCYX ₈ KFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
-	서열번호 212에 대한 아미노산 치환	X ₁ =V, L, I; X ₂ =V, I, L; X ₃ =I, T, S, F; X ₄ =K, R; X ₅ =H, P, R; X ₆ =S, T, G; 및 X ₇ =N, A
218	Pan D1 도메인	EEELQX ₁ IQPKSVLVAAGETATLRCTX ₂ TS LX ₃ PVGPIQWFRGAGPGRX ₄ LIYNQX ₅ X ₆ GX ₇ FP RVTTVSDX ₈ TKRNNMDFSIRIGX ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ ADAGTYCYX ₁₃ KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSV RAKPS
-	서열번호 218에 대한 아미노산 치환	X ₁ =V, L, 또는 I; X ₂ =A, V, L, 또는 I; X ₃ =I, S, T, 또는 F; X ₄ =E, L, 또는 V; X ₅ =K 또는 R; X ₆ =E 또는 Q; X ₇ =H, R 또는 P; X ₈ =S, G, L 또는 T, X ₉ =임의의 아미노산; X ₁₀ =임의의 아미노산; X ₁₁ =임의의 아미노산; X ₁₂ =임의의 아미노산; 및 X ₁₃ =V 또는 I
219	Pan D1 도메인	EEELQX ₁ IQPKSVLVAAGETATLRCTX ₂ TS LX ₃ PVGPIQWFRGAGPGRX ₄ LIYNQX ₅ X ₆ GX ₇ FP RVTTVSDX ₈ TKRNNMDFSIRIGX ₉ ITX ₁₀ ADAGTYCYX ₁₁ KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAK PS
-	서열번호 219에 대한 아미노산 치환	X ₁ =V, L 또는 I; X ₂ =A, V, L, 또는 I; X ₃ =I, S, T 또는 F; X ₄ =E, L, 또는 V; X ₅ =K 또는 R; X ₆ =E 또는 Q; X ₇ =H, R 또는 P; X ₈ =S, G, L, 또는 T; X ₉ =N; X ₁₀ =P 이외의 임의의 아미노산; 및 X ₁₁ =V 또는 I

[0082]

일부

실시형태에서,

폴리펩티드는

EEEX₁QX₂IQPKSVLVAAGETX₃TLRCTX₄TS LX₅PVGPIQWFRGAGPGRX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSDX₁₀TX₁₁RNNMDFSIRIGX₁₂ITX₁₃ADAGTYCYX₁₄KX₁₅RKGSPDDVEX₁₆KSGAGTELSVRAKPS(서열번호 37)의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 X₁은 L, I, 또는 V이고; X₂는 V, L, 또는, I이며; X₃은 A 또는 V이고; X₄는 A, I, 또는 L이며; X₅는 I, T, S, 또는 F이고; X₆은 E, V, 또는 L이며; X₇은 K 또는 R이고; X₈은 E 또는 Q이며; X₉는 H, P, 또는 R이고; X₁₀은 L, T, 또는 G이며; X₁₁은 K 또는 R이고; X₁₂는 N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, 또는 Y이며; X₁₃은 P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, 또는 Y이고; X₁₄는 V 또는 I이며; X₁₅는 F, L, 또는 V이고; 및 X₁₆은 F 또는 V이며; 여기서 변이체는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

- [0083] 본 개시의 이러한 양태의 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 37의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 X_1 은 L, I, 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X_2 는 V, L, 또는, I이다. 일부 실시형태에서, X_3 은 A 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X_4 는 A, I, 또는 L이다. 일부 실시형태에서, X_5 는 I, T, S, 또는 F이다. 일부 실시형태에서, X_6 은 E, V, 또는 L이다. 일부 실시형태에서, X_7 은 K 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_8 은 E 또는 Q이다. 일부 실시형태에서, X_9 는 H, P, 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_{10} 은 L, T, 또는 G이다. 일부 실시형태에서, X_{11} 은 K 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_{12} 는 N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, 또는 Y이다. 일부 실시형태에서, X_{13} 은 P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, 또는 Y이다. 일부 실시형태에서, X_{14} 는 V 또는 I이다. 일부 실시형태에서, X_{15} 는 F, L, V이다. 일부 실시형태에서, X_{16} 은 F 또는 V이다.
- [0084] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 10개 이하의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 7개 이하의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0085] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 10배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 1000배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 1×10^{-8} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 5×10^{-10} M 미만, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 약 500 nM 내지 100 nM, 약 100 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 10 nM, 약 10 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 1 nM, 약 1 nM 내지 500 pM, 약 500 pM 내지 100 pM, 약 100 pM 내지 50 pM, 또는 약 50 pM 내지 10 pM의 K_D 로 CD47에 결합한다.
- [0086] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는
EEEX₁QX₂IQPDKSVSVAAGESX₃ILHCTX₄TSLX₅PVGPIQWFRGAGPARX₆LIYNQX₇X₈GX₉FPRVTTVSEX₁₀TX₁₁RENMDFSISISX₁₂ITX₁₃ADAGTYYC
X₁₄KX₁₅RKGSPTDEX₁₆KSGAGTELSVRAKPS(서열번호 38)의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 X_1 은 L, I, 또는 V이고; X_2 는 V, L, 또는, I이며; X_3 은 A 또는 V이고; X_4 는 V, I, 또는 L이며; X_5 는 I, T, S, 또는 F이고; X_6 은 E, V, 또는 L이며; X_7 은 K 또는 R이고; X_8 은 E 또는 Q이며; X_9 는 H, P, 또는 R이고; X_{10} 은 S, T, 또는 G이며; X_{11} 은 K 또는 R이고; X_{12} 는 N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, 또는 Y이며; X_{13} 은 P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, 또는 Y이고; X_{14} 는 V 또는 I이며; X_{15} 는 F, L, 또는 V이고; 및 X_{16} 은 F 또는 V이며; 여기서 변이체는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0087] 본 개시의 이러한 양태의 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 38의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 X_1 은 L, I, 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X_2 는 V, L, 또는, I이다. 일부 실시형태에서, X_3 은 A 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X_4 는 V, I, 또는 L이다. 일부 실시형태에서, X_5 는 I, T, S, 또는 F이다. 일부 실시형태에서, X_6 은 E, V, 또는 L이다. 일부 실시형태에서, X_7 은 K 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_8 은 E 또는 Q이다. 일부 실시형태에서, X_9 는 H, P, 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_{10} 은 S, T, 또는 G이다. 일부 실시형태에서, X_{11} 은 K 또는 R이다. 일부 실시형태에서, X_{12} 는 N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, 또는 Y이다. 일부 실시형태에서, X_{13} 은 P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, 또는 Y이다. 일부 실시형태에서, X_{14} 는 V 또는 I이다. 일부 실시형태에서, X_{15} 는 F, L, 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X_{16} 은 F 또는 V이다.
- [0088] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 10개 이하의 아미노산 치환을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을

갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 7개 이하의 아미노산 치환을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다.

[0089]

일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 10배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 1000배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 1×10^{-8} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 5×10^{-10} M 미만, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 약 500 nM 내지 100 nM, 약 100 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 10 nM, 약 10 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 1 nM, 약 1 nM 내지 500 pM, 약 500 pM 내지 100 pM, 약 100 pM 내지 50 pM, 또는 약 50 pM 내지 10 pM의 K_D 로 CD47에 결합한다.

[0090]

또 다른 양태에서, 본 개시는 EEX₁X₂QX₃IQPKX₄VX₅VAAGEX₆X₇X₈LX₉CTX₁₀TSLX₁₁PVGPIQWFRGAGPX₁₂RX₁₃LIYNQX₁₄X₁₅GX₁₆FPRVTTVSX₁₇X₁₈TX₁₉RX₂₀NMDFX₂₁IX₂₂IX₂₃X₂₄ITX₂₅ADAGTYCYX₂₆KX₂₇RKGSXPX₂₈X₂₉EX₃₀KSGAGTELSVRX₃₁KPS(서열번호 47)의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 특징으로 하며, 여기서 X₁은 E 또는 G이고; X₂는 L, I, 또는 V이며; X₃은 V, L, 또는 I이고; X₄는 S 또는 F이며; X₅는 L 또는 S이고; X₆은 S 또는 T이며; X₇은 A 또는 V이고; X₈은 I 또는 T이며; X₉는 H, R 또는 L이고; X₁₀은 A, V, I, 또는 L이며; X₁₁은 I, T, S, 또는 F이고; X₁₂는 A 또는 G이며; X₁₃은 E, V, 또는 L이고; X₁₄는 K 또는 R이며; X₁₅는 E 또는 Q이고; X₁₆은 H, P, 또는 R이며; X₁₇은 D 또는 E이고; X₁₈은 S, L, T, 또는 G이며; X₁₉는 K 또는 R이고; X₂₀은 E 또는 N이며; X₂₁은 S 또는 P이고; X₂₂는 S 또는 R이며; X₂₃은 S 또는 G이고; X₂₄는 임의의 아미노산이며; X₂₅는 임의의 아미노산이고; X₂₆은 V 또는 I이며; X₂₇은 F, L, V이고; X₂₈은 D이거나 부재하며; X₂₉는 T 또는 V이고; X₃₀은 F 또는 V이며; X₃₁은 A 또는 G이고; 여기서 변이체는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0091]

일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 47의 서열을 포함하며, 여기서 X₁은 E 또는 G이다. 본 개시의 이러한 양태에서 임의의 전술한 실시형태에서, X₂는 L, I, 또는 V이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₃은 V, L, 또는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₄는 S 또는 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₅는 L 또는 S이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₆은 S 또는 T이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₇은 A 또는 V이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₈은 I 또는 T이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₉는 H 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₁₀은 A, V, I, 또는 L이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₁₁은 I, T, S, 또는 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₁₂는 A 또는 G이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₁₃은 E, V, 또는 L이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₁₄는 K 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₁₅는 E 또는 Q이다. 임의의 전술한 실시형태에서 X₁₆은 H, P, 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₁₇은 D 또는 E이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₁₈은 S, L, T, 또는 G이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₁₉는 K 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₂₀은 E 또는 N이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₂₁은 S 또는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₂₂는 S 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₂₃은 S 또는 G이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₂₄는 N, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, 또는 Y이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₂₅는 P, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, 또는 Y이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₂₆은 V 또는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₂₇은 F, L, V이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₂₈은 D이거나 부재한다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₂₉는 T 또는 V이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₃₀은 F 또는 V이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₃₁은 A 또는 G이다.

[0092]

일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 10개 이하의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 7개 이하의 아미노산 치환을 포함한다.

- [0093] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 10배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1 또는 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 1000배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 1×10^{-8} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 5×10^{-10} M 미만, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 약 500 nM 내지 100 nM, 약 100 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 10 nM, 약 10 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 1 nM, 약 1 nM 내지 500 pM, 약 500 pM 내지 100 pM, 약 100 pM 내지 50 pM, 또는 약 50 pM 내지 10 pM의 K_D 로 CD47에 결합한다.
- [0094] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 EEELQX₁IQPKSVX₂VAAGEX₃AX₄LX₅CTX₆TSLX₇PVGPIQWFRGAGPX₈RX₉LIYNQX₁₀X₁₁GX₁₂FPRVTTVSX₁₃X₁₄TKRX₁₅NMDFSIX₁₆IX₁₇X₁₈ITPADAGTYXCX₁₉KFRKGX₂₀X₂₁X₂₂DX₂₃EFKSGAGTELSVRAKPS(서열번호 48)의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 X₁은 V 또는 I이고; X₂는 L 또는 S이며; X₃은 T 또는 S이고; X₄는 T 또는 I이며; X₅는 R 또는 H이고; X₆은 A, V, 또는 I이며; X₇은 I, R, Y, K 또는 F이고; X₈은 G 또는 A이며; X₉는 E 또는 V이고; X₁₀은 K 또는 R이며; X₁₁은 E, D 또는 Q이고; X₁₂는 H 또는 P이며; X₁₃은 D 또는 E이고; X₁₄는 S, L 또는 T이며; X₁₅는 N 또는 E이고; X₁₆은 R 또는 S이며; X₁₇은 G 또는 S이고; X₁₈은 N 또는 A이며; X₁₉는 V 또는 I이고; X₂₀은 S, I 또는 M이며; X₂₁은 P이거나 부재하고; X₂₂는 D 또는 P이며; 및 X₂₃은 V 또는 T, 또는 이의 단편이다.
- [0095] 또 다른 양태에서, 본 개시는 EEELQX₁IQPKSVLVAAGETATLRCTX₂TSLX₃PVGPIQWFRGAGPGRX₄LIYNQX₅X₆GX₇FPRVTTVSDX₈TKRNNMDFSIRIGX₉ITPADAGTYXCX₁₀KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS(서열번호 49)의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함 하는 폴리펩티드를 특징으로 하며, 여기서 X₁은 V, L, 또는 I이고; X₂는 A, I, V, 또는 L이며; X₃은 I, F, S, 또는 T이고; X₄는 E, V, 또는 L이며; X₅는 K 또는 R이고; X₆은 E 또는 Q이며; X₇은 H, P, 또는 R이고; X₈은 L, T, S, 또는 G이며; X₉는 A 이고; 및 X₁₀은 V 또는 I이며; 여기서 변이체는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0096] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 49의 서열을 포함하며, 여기서 X₁은 V, L 또는 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X₂는 A, I, V, 또는 L이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₃은 I, F, S, 또는 T이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₄는 E, V, 또는 L이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₅는 K 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₆은 E 또는 Q이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₇은 H, P, 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₈은 L, T, S 또는 G이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₉는 A이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₁₀은 V 또는 I이다.
- [0097] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 49에 대해 적어도 85%의 서열 동일성(예를들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 포함하는 SIRP α D1 도메인을 포함하며, 여기서 X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, X₉, 및 X₁₀의 각각은 야생형 아미노산이 아니다.
- [0098] 일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 1 중 어느 하나의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 10개 이하의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 1 중 어느 하나의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 7개 이하의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0099] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 10배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 1000배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 1×10^{-8} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 1×10^{-9} M

미만, 5×10^{-10} M 미만, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 약 500 nM 내지 100 nM, 약 100 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 10 nM, 약 10 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 1 nM, 약 1 nM 내지 500 pM, 약 500 pM 내지 100 pM, 약 100 pM 내지 50 pM, 또는 약 50 pM 내지 10 pM의 K_D 로 CD47에 결합한다.

[0100] 또 다른 양태에서, 본 개시는 EEELQX₁IQPDKSVSVAAGESAILHCTX₂TSLX₃PVGPIQWFRGAGPARX₄LIYNQX₅X₆GX₇FPRVTTVSEX₈TKRENMDFSISISX₉ITPADAGTYYCX₁₀KFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAPKS(서열번호 50)의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함 하는 폴리펩티드를 특징으로 하며, 여기서 X₁은 V 또는 I이고; X₂는 V 또는 I이며; X₃은 I 또는 F이고; X₄는 E 또는 V이며; X₅는 K 또는 R이고; X₆은 E 또는 Q이며; X₇은 H 또는 P이고; X₈은 S 또는 T이며; X₉는 N 또는 A이고; 및 X₁₀은 V 또는 I이며; 여기서 변이체는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0101] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 50의 서열을 포함하며, 여기서 X₁은 V, 또는 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X₂는 V, 또는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₃은 I, 또는 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₄는 E, 또는 V이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₅는 K 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₆은 E 또는 Q이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₇은 H, 또는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₈은 S 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₉는 N 또는 A이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₁₀은 V 또는 I이다.

[0102] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 50에 대해 적어도 85%의 서열 동일성(예를들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 포함하는 SIRP α D1 도메인을 포함하며, 여기서 X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, X₉, 및 X₁₀ 각각은 야생형 아미노산이 아니다.

[0103] 일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 10개 이하의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 7개 이하의 아미노산 치환을 포함한다.

[0104] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 10배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 1000배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 1×10^{-8} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 5×10^{-10} M 미만, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 약 500 nM 내지 100 nM, 약 100 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 10 nM, 약 10 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 1 nM, 약 1 nM 내지 500 pM, 약 500 pM 내지 100 pM, 약 100 pM 내지 50 pM, 또는 약 50 pM 내지 10 pM의 K_D 로 CD47에 결합한다.

[0105] 또 다른 양태에서, 본 개시는 EEELQX₁IQPDKSVLVAAGETATLRCTX₂TSLX₃PVGPIQWFRGAGPGRX₄LIYNQX₅EGX₆FPRVTTVSDX₇TKRNNMDFSIRIGX₈ITPADAGTYYCX₉KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPKS(서열번호 51)의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함 하는 폴리펩티드를 특징으로 하며, 여기서 X₁은 V 또는 I이고; X₂는 A 또는 I이며; X₃은 I 또는 F이고; X₄는 E 또는 V이며; X₅는 K 또는 R이고; X₆은 H 또는 P이며; X₇은 L 또는 T이고; X₈은 N 또는 A이며; X₉는 V 또는 I이며; 여기서 변이체는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0106] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 51의 서열을 포함하며, 여기서 X₁은 V, 또는 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X₂는 A, 또는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₃은 I, 또는 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₄는 E, 또는 V이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X₅는 K 또는 R이다. 임의의 전

술한 실시형태에서, X_6 은 H, 또는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 L, 또는 T이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 N 또는 A이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_9 는 V 또는 I이다. 일부 실시형태에서, X_4 는 V가 아니다.

[0107] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 51의 서열을 포함하며, 여기서 X_8 은 A이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_1 은 V 또는 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_2 는 A 또는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_3 은 I 또는 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_4 는 E 또는 V이다. 일부 실시형태에서, X_4 는 V가 아니다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_5 는 K 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_6 은 H 또는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_7 은 A 또는 V이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_9 는 V 또는 I이다.

[0108] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 51의 서열을 포함하며, 여기서 X_8 은 A이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_1 은 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_2 는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_3 은 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_4 는 V이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_5 는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_6 은 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_7 은 T이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_8 은 A이고 X_9 는 I이다.

[0109] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 51에 대해 적어도 85%의 서열 동일성(예를 들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 포함하는 SIRP α D1 도메인을 포함하며, 여기서 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , 및 X_9 의 각각은 야생형 아미노산이 아니다.

[0110] 일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 10개 이하의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 7개 이하의 아미노산 치환을 포함한다.

[0111] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 10배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 1000배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 1×10^{-8} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 5×10^{-10} M 미만, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 약 500 nM 내지 100 nM, 약 100 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 10 nM, 약 10 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 1 nM, 약 1 nM 내지 500 pM, 약 500 pM 내지 100 pM, 약 100 pM 내지 50 pM, 또는 약 50 pM 내지 10 pM의 K_D 로 CD47에 결합한다.

[0112] 또 다른 양태에서, 본 개시는 EEELQX₁IQPDKSVLVAAGETATLRCTX₂TSLX₃PVGPIQWFRGAGPGRELIYNQX₄EGX₅FPRVTTVSDX₆TKRNNMDFSIRIGX₇ITPADAGTYCYVKFRKGS PDDVEFKSGAGTELSVRAPKS(서열번호 222)의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 특징으로 하며, 여기서 X_1 은 V, L, 또는 I이고; X_2 는 A, I, 또는 L이며; X_3 은 I, T, S, 또는 F이고; X_4 는 K 또는 R이며; X_5 는 H 또는 P이고; X_6 은 L, T, 또는 G이며; X_7 은 N 또는 A이고; 및 여기서 변이체는 서열번호 1에 따른 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0113] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 222의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 V, L, 또는 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_2 는 A, I, 또는 L이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_3 은 I, T, S, 또는 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_4 는 K 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_5 는 H 또는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_6 은 L, T, 또는 G이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 N 또는 A이다.

- [0114] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 222의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 V 또는 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_2 는 A 또는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_3 은 I 또는 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_4 는 K 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_5 는 H 또는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_6 은 L 또는 T이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 N 또는 A이다.
- [0115] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 222의 서열을 포함하며, 여기서 X_7 은 A이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_1 은 V 또는 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_2 는 A 또는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_3 은 I 또는 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_4 는 K 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_5 는 H 또는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_6 은 L 또는 T이다.
- [0116] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 222의 서열을 포함하며, 여기서 X_7 은 A이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_1 은 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_2 는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_3 은 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_4 는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_5 는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_6 은 T이다.
- [0117] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 222에 대해 적어도 85%의 서열 동일성(예를 들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 포함하는 SIRP α D1 도메인을 포함하며, 여기서 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , 및 X_7 의 각각은 야생형 아미노산이 아니다.
- [0118] 일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 10개 이하의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 7개 이하의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0119] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 10배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 1의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 1000배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 단편은 10개 미만의 아미노산 길이, 약 10개 아미노산 길이, 약 20개 아미노산 길이, 약 30개 아미노산 길이, 약 40개 아미노산 길이, 약 50개 아미노산 길이, 약 60개 아미노산 길이, 약 70개 아미노산 길이, 약 80개 아미노산 길이, 약 90개 아미노산 길이, 약 100개 아미노산 길이, 또는 약 100개 초과 아미노산 길이의 폴리펩티드를 포함한다. 단편은 CD47에 결합하는 능력을 보유한다. 바람직하게는, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 및 이의 단편은 CD47에 결합하는 SIRP α 폴리펩티드보다 더 높은 친화도로 CD47에 결합한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 1×10^{-8} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 5×10^{-10} M 미만, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 약 500 nM 내지 100 nM, 약 100 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 10 nM, 약 10 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 1 nM, 약 1 nM 내지 500 pM, 약 500 pM 내지 100 pM, 약 100 pM 내지 50 pM, 또는 약 50 pM 내지 10 pM의 K_D 로 CD47에 결합한다.
- [0120] 또 다른 양태에서, 본 개시는 EEELQX₁IQPKSVSVAAGESAILHCTX₂TSLX₃PVGPIQWFRGAGPARELIYNQX₄EGX₅FPRVTTVSEX₆TKRENMDFSISIX₇ITPADAGTYCYCKFRKGS PDTEFKSGAGTELSVRAKPS(서열번호 212)의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드를 특징으로 하며, 여기서 X_1 은 V, L, 또는 I이고; X_2 는 V, I, 또는 L이며; X_3 은 I, T, S, 또는 F이고; X_4 는 K 또는 R이며; X_5 는 H, P 또는 R이고; X_6 은 S, T, 또는 G이며; X_7 은 N 또는 A이고; 및 여기서 변이체는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.
- [0121] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 212의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 V, L, 또는 I이다. 본 개시의

이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_2 는 V, I, 또는 L이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_3 은 I, T, S, 또는 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_4 는 K 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_5 는 H 또는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_6 은 S, T, 또는 G이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 N 또는 A이다.

[0122] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 212의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 은 V 또는 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_2 는 V 또는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_3 은 I 또는 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_4 는 K 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_5 는 H 또는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_6 은 S 또는 T이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 N 또는 A이다.

[0123] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 212의 서열을 포함하며, 여기서 X_7 은 A이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_1 은 V 또는 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_2 는 V 또는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_3 은 I 또는 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_4 는 K 또는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_5 는 H 또는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_6 은 S 또는 T이다.

[0124] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 212의 서열을 포함하며, 여기서 X_7 은 A이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_1 은 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_2 는 I이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_3 은 F이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_4 는 R이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_5 는 P이다. 임의의 전술한 실시형태에서, X_7 은 A이고 X_6 은 T이다.

[0125] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 212에 대해 적어도 85%의 서열 동일성(예를 들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 SIRP α D1 도메인을 포함하며, 여기서 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , X_6 및 X_7 의 각각은 야생형 아미노산이 아니다.

[0126] 일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 10개 이하의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 이러한 양태의 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 7개 이하의 아미노산 치환을 포함한다.

[0127] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 10배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 2의 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인보다 적어도 1000배 더 큰 결합 친화도로 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 단편은 10개 미만의 아미노산 길이, 약 10개 아미노산 길이, 약 20개 아미노산 길이, 약 30개 아미노산 길이, 약 40개 아미노산 길이, 약 50개 아미노산 길이, 약 60개 아미노산 길이, 약 70개 아미노산 길이, 약 80개 아미노산 길이, 약 90개 아미노산 길이, 약 100개 아미노산 길이, 또는 약 100개 초과 아미노산 길이의 폴리펩티드를 포함한다. 단편은 CD47에 결합하는 능력을 보유한다. 바람직하게는, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 및 이의 단편은 CD47에 결합하는 SIRP α 폴리펩티드보다 더 높은 친화도로 CD47에 결합한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 1×10^{-8} M 미만, 5×10^{-9} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 5×10^{-10} M 미만, 1×10^{-10} M 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 약 500 nM 내지 100 nM, 약 100 nM 내지 50 nM, 약 50 nM 내지 10 nM, 약 10 nM 내지 5 nM, 약 5 nM 내지 1 nM, 약 1 nM 내지 500 pM, 약 500 pM 내지 100 pM, 약 100 pM 내지 50 pM, 또는 약 50 pM 내지 10 pM의 K_D 로 CD47에 결합한다.

[0128] 일부 실시형태에서, EEELQX₁IQPDKSVLVAAGETATLRCTX₂TSLX₃PVGPIQWFRGAGPGRX₄LIYNQX₅X₆GX₇FPRVTTVSDX₈TKRNNMDFSIRIGX₉X₁₀X₁₁X₁₂ADAGTYCYX₁₃KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPKS(서열번호 218)의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 기재되며, 여기서 X_1 은 V, L, 또는 I이고; X_2 는 A, V, L, 또는 I이며; X_3 은 I, S, T, 또는 F이고; X_4 는

E, L, 또는 V이며; X_5 는 K 또는 R이고; X_6 은 E 또는 Q이며; X_7 은 H, R, 또는 P이고; X_8 은 S, G, L, 또는 T이며; X_9 는 임의의 아미노산이고; X_{10} 은 임의의 아미노산이며; X_{11} 은 임의의 아미노산이고; X_{12} 는 임의의 아미노산이며; X_{13} 은 V 또는 I이고; 여기서 SIRP α D1 도메인 변이체는 서열번호 1에 따른 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 2개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0129] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 212의 서열을 포함하며, 여기서 X_1 , 여기서 X_9 는 A이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_9 는 N이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_{10} 은 I이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_9 는 N이고 X_{10} 은 P이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_9 는 N이고 X_{11} 은 S, T, 또는 C 이외의 임의의 아미노산이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_{11} 은 T이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_{11} 은 T 이외의 아미노산이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_{12} 는 P이다. 본 개시의 이러한 양태의 임의의 전술한 실시형태에서, X_9 는 N이고 X_{12} 는 P 이외의 임의의 아미노산이다.

[0130] 일부 실시형태에서, EEELQX₁IQPDKSVLVAAGETATLRCTX₂TSLX₃PVGPIQWFRGAGPGRXL₄LIYNQX₅X₆GX₇FPRVTTVSDX₈TKRNNMDFSIRIGX₉ITX₁₀ADAGTYCYCX₁₁KF RKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS(서열번호 219)의 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 기재되며, 여기서 X_1 은 V, L, 또는 I이고; X_2 는 A, V, L, 또는 I이며; X_3 은 I, S, T, 또는 F이고; X_4 는 E, L, 또는 V이며; X_5 는 K 또는 R이고; X_6 은 E 또는 Q이며; X_7 은 H, R, 또는 P이고; X_8 은 S, G, L, 또는 T이며; X_9 는 N이고; X_{10} 은 P 이외의 임의의 아미노산이며; X_{11} 은 V 또는 I이고; 여기서 SIRP α D1 도메인 변이체는 서열번호 1에 따른 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 2개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0131] 본 개시의 또 다른 양태에서, 서열번호 48의 아미노산 서열을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드, 또는 이의 단편을 포함하는 조성물이 본원에 개시된다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 이의 단편은 CD47에 결합하는 SIRP α 폴리펩티드의 친화도와 비교하여 더 높은 친화도로 CD47에 결합한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드는 1×10^{-8} M 미만, 1×10^{-9} M 미만, 1×10^{-10} M 미만 또는 1×10^{-11} M 미만의 K_D 로 CD47에 결합한다. 일부 실시형태에서, 상술한 SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드는 제2 폴리펩티드에 부착되거나 융합된다. 일부 실시형태에서, 제2 폴리펩티드는 Fc 폴리펩티드, Fc 변이체 또는 전술한 것의 단편을 비제한적으로 포함한다.

[0132] 전술한 것을 제한하지 않고, 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드는 표 6에 나타난 서열번호 53 내지 87 및 213 중 어느 하나로부터 선택된다.

표 6

[0133] 예시적인 SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드

서열번호	아미노산 서열
53	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPDA GTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
54	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLFPVGPIQWFRGAGPARELIYNQRQGPFPRTTVSESTKRENMDFSISISNITPDA GTYYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
55	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPDA GTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
56	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPDA GTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
57	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPDA GTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
58	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARELIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPDA GTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
59	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPDA GTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
60	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQREGFPFPRTTVSETTKRENMDFSISISNITPDA GTYYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS

61	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGHFPRVTTVSETTKRENMDFSISISNITPADA GTYCYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
62	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADA GTYCYCIKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
63	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARVLIYNQRQGFPRVTTVSETTKRENMDFSISISNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
64	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGP IQWFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
65	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGP IQWFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
66	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
67	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSETTKRENMDFSISISNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
68	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
69	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGP IQWFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
70	EEELQIIQPDKSVSVAAGESAILHCTITSLFPVGPIQWFRGAGPARELIYNQREGPFPRVTTVSETTKRENMDFSISISNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRAKPS
71	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRQGFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
72	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
73	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
74	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
75	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
76	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
77	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
78	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
79	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRQGFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
80	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
81	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
82	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
83	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
84	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
85	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
86	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYCYCIKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
87	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
195	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTMTSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
196	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLKPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
197	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
198	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLYPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
199	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRDGFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYCYCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS

200	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGIIPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
201	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGMPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
202	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
203	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSSEPDVEFKSGAGTELSVRAKPS
204	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRDGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
205	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGIIPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
206	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRDGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGIIPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
207	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLYPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRDGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
208	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLYPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGIIPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
209	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLYPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRDGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGIIPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
210	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRDGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGIIPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS
213	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQRQGPFRVTTVSDTLTKRNNMDFSIRIGNITVADA GTYTCVKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS

[0134] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 **표 6**에 제공된 임의의 변이체에 대해 적어도 85%의 서열 동일성(예를 들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다.

[0135] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 **표 6**에서의 서열번호 80, 81 또는 85에 대해 적어도 85%의 서열 동일성(예를 들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 SIRP α D1 도메인을 포함한다.

[0136] Fc 도메인 변이체

[0137] 본원에 개시된 융합 폴리펩티드는 신호-조절 단백질 α(SIRP-α) D1 변이체(또는 이의 CD47-결합 단편) 및 Fc 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 (i) L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역(여기서 아미노산 넘버링은 EU 지수에 따른 것임); (ii) A330S, P331S, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG2 Fc 영역(여기서 아미노산 넘버링은 EU 지수에 따른 것임); 또는 (iii) S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역(여기서 아미노산 넘버링은 EU 지수에 따른 것임)이거나 이를 포함한다.

[0138] 세포 표면 항원을 표적화하는 항체는 면역 세포에 대한 Fc 수용체(FcR)의 참여와 연관된 면역자극성 및 효과기 기능을 유발할 수 있다. IgG(감마 수용체), IgE(에타 수용체), IgA(알파 수용체) 및 IgM(뮤 수용체)을 포함하여, 특정 부류의 항체에 특이적인 다수의 Fc 수용체가 존재한다. 세포 표면 상의 Fc 수용체에 대한 Fc 영역의 결합은 항체-코팅된 입자의 식균작용(항체-의존성 세포-매개 식균작용, 또는 ADCP(antibody-dependent cell-mediated phagocytosis)), 면역 복합체의 소거(clearance), 살해 세포에 의한 항체-코팅된 세포의 용해(항체-의존성 세포-매개 세포독성, 또는 ADCC(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)) 및, 염증 매개체(inflammatory mediator)의 방출, 태반 통과(placental transfer), 및 면역글로불린 생성의 제어를 포함하는 다수의 생물학적 반응을 유발할 수 있다. 또한, 항체에 대한 보체의 C1 성분의 결합은 보체계를 활성화할 수 있다. 보체의 활성화는 세포 병원체의 용해에 중요할 수 있다. 그러나, 보체의 활성화는 또한 염증 반응을 자극할 수 있으며 자가면역 과민증 또는 다른 면역학적 장애에 관여할 수도 있다. 특정 Fc 수용체를 결합하는 능력이 감소되거나 제거된 변이체 Fc 영역은 국소 세포 또는 조직을 손상시키거나 파괴하지 않으면서 리간드 기능을 표적화, 활성화, 또는 중화함으로써 작용하는 치료적 항체 및 Fc-융합 폴리펩티드 구조체의 개발에 유용하다.

[0139] 일부 실시형태에서, 융합 단백질은 제거된 또는 감소된 효과기 기능을 갖는 Fc 도메인을 형성하는 Fc 도메인 변이체에 연결된(예를 들어, 융합된, 예를 들어 유전적으로 융합된) SIRP α D1 도메인 변이체(또는 이의 CD47-결합 단편)를 포함한다.

- [0140] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 제2 및 제3 항체 불변 도메인(예를 들어, CH2 및 CH3)을 포함하는 폴리펩티드 사슬을 지칭한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 또한 힌지 도메인(hinge domain)을 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 IgG, IgE, IgM, IgA, 및 IgD를 포함하는, 임의의 면역글로불린 항체 동형(isotype)이다. 또한, 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 임의의 IgG 아형(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3, 및 IgG4)이다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 Fc 도메인과 Fc 수용체의 상호작용을 변경하는 야생형 Fc 도메인 단량체 서열(예를 들어, 1 내지 10, 1 내지 8, 1 내지 6, 1 내지 4개의 아미노산 치환, 부가 또는 삽입, 결실, 또는 이들의 조합)에 대해 10개 만큼 많은 아미노산 변형(예를 들어, 삽입, 결실 및/또는 치환)을 포함한다.
- [0141] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Fc 도메인 이량체"는 2개의 Fc 도메인 또는 의 2개의 Fc 도메인 변이체의 이량체를 지칭한다. 야생형 Fc 도메인 이량체에서, 2개의 야생형 Fc 도메인은 2개의 CH3 항체 불변 도메인과, 2개의 이량체화된 Fc 도메인의 힌지 도메인 사이에 형성되는 하나 이상의 이황화 결합의 상호작용에 의해 이량체화된다.
- [0142] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Fc 도메인 이량체 변이체"는 2개의 Fc 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체는 효과기 기능이 결여되도록 돌연변이된 Fc 도메인 변이체, 예를 들어, "죽은 Fc 도메인 이량체 변이체"를 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체 내의 각각의 Fc 도메인은 CH2 및/또는 CH3 항체 불변 도메인 내의 아미노산 치환을 포함하여 Fc 도메인 이량체 변이체와 Fc 수용체, 예를 들어, Fc γ 수용체(Fc γ R), Fc α 수용체(Fc α R), 또는 Fc ϵ (Fc ϵ R)의 상호작용 또는 결합을 감소시킨다.
- [0143] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 면역글로불린의 Fc 도메인 변이체 또는 이러한 Fc 도메인 변이체의 단편에 융합된(예를 들어 유전적으로 융합된) SIRP α D1 도메인 변이체(예를 들어, 표 2, 5, 및 6에 기재된 변이체 중 어느 하나)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 또 다른 Fc 도메인 변이체와 Fc 도메인 이량체를 형성할 수 있는 면역글로불린의 Fc 도메인 변이체(또는 이의 단편)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 또 다른 Fc 도메인 변이체와 Fc 도메인 이량체를 형성할 수 없는 면역글로불린의 Fc 도메인 변이체(또는 이의 단편)를 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체(또는 이의 단편)를 포함하는 융합 폴리펩티드는 Fc 도메인 변이체(또는 이의 단편)를 포함하지 않는 폴리펩티드와 비교하여, 증가된 폴리펩티드의 혈청 반감기를 입증한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 제2 Fc 도메인 변이체와 이량체화하여 Fc 수용체에 결합하는 Fc 도메인 이량체 변이체를 형성하는 Fc 도메인 변이체(또는 이의 단편)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 제2 Fc 도메인 변이체와 이량체화하여 Fc 수용체에 결합하지 않는 Fc 도메인 이량체 변이체를 형성하는 Fc 도메인 변이체(또는 이의 단편)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 대상체(예를 들어, 인간 대상체)에 투여된 후 임의의 면역계-관련 반응을 유도하지 않는 Fc 도메인 변이체(또는 이의 단편)를 포함한다.
- [0144] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 제1 Fc 도메인 변이체에 접합된 SIRP α D1 도메인 또는 이의 변이체 및 제2 Fc 도메인 변이체에 접합된 항체 가변 도메인을 포함하며, 여기서 제1 및 제2 Fc 도메인 변이체는 조합하여 Fc 도메인 이량체 변이체(예를 들어, 이중이량체성 Fc 도메인 이량체 변이체)를 형성한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 제1 Fc 도메인 변이체에 접합된(예를 들어, 융합된, 예를 들어 유전적으로 융합된) SIRP α D1 도메인 변이체 및 제2 Fc 도메인 변이체에 접합된(예를 들어, 융합된, 예를 들어 유전적으로 융합된) 제2 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 제1 및 제2 Fc 도메인 변이체는 조합하여 Fc 도메인 이량체 변이체(예를 들어, 이중이량체성 Fc 도메인 이량체 변이체)를 형성한다. 일부 실시형태에서, 본원의 융합 폴리펩티드는 제1 Fc 도메인에 접합된(예를 들어, 융합된, 예를 들어 유전적으로 융합된) 제1 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 이중이량체를 포함한다.
- [0145] Fc 도메인 이량체는 면역글로불린의 C-말단에서 발견되는 단백질 구조이다. Fc 도메인 이량체는 CH3 항체 불변 도메인 사이의 상호작용에 의해 이량체화된 2개의 Fc 도메인을 포함한다. 야생형 Fc 도메인 이량체는 Fc 수용체, 예를 들어, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb, 및 Fc γ RIV에 결합하는 최소 구조를 형성한다.
- [0146] Fc 도메인 이량체는 항체를 이의 표적에 결합시키는 데 직접적으로 관여하지 않지만, 항체-의존성 세포독성에서 항체의 참여와 같은, 다양한 효과기 기능에 관여할 수 있다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 대응하는 야생형 Fc 도메인의 아미노산 서열에 대해 아미노산 치환, 추가 또는 삽입, 결실 또는 이의 임의의 조합을 포함하는 Fc 도메인 변이체를 포함하며, 이는 항체 의존성 세포 매개 세포 독성(ADCC) 감소, 보체 의존성 세포 용해(CDC) 감소, 항체 의존성 세포 매개 식균작용(ADCP) 감소 또는 이들의 임의의 조합과 같은 효과기 기능 감소를

야기한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 인간 Fc 수용체에 대한 결합 감소(예를 들어, 최소의 결합 또는 결합 부재) 및 보체 단백질 C1q에 대한 결합 감소(예를 들어, 최소의 결합 또는 결합 부재)를 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 인간 Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIB, 또는 이들의 임의의 조합, 및 C1q에 대한 결합 감소(예를 들어, 최소의 결합 또는 결합 부재)를 특징으로 한다. ADCC, CDC, ADCP, 또는 이들의 임의의 조합과 같은, 항체-의존성 효과기 기능을 변경 또는 감소시키기 위해, 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 E233, L234, L235, G236, G237, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331, 또는 P329(Kabat의 EU 지수에 따른 넘버링(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)))에서의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 IgG Fc 도메인 변이체를 포함한다.

[0147] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 이량체화되어 Fc 도메인 이량체 변이체를 형성할 때, 천연 Fc 도메인 이량체를 포함하는 융합 폴리펩티드와 비교하여 Fc γ 수용체 CD16a, CD32a, CD32b, CD32c 및 CD64 중 적어도 하나에 대한 감소된 또는 제거된 결합을 나타내는 비-천연 Fc 도메인(예를 들어, Fc 도메인 변이체)을 포함한다. 일부 경우에서, 융합 폴리펩티드는 이량체화(예를 들어 동종이량체화 또는 이종이량체화)될 때 CD16a, CD32a, CD32b, CD32c 및 CD64 Fc γ 수용체에 대해 감소된 또는 제거된 결합을 나타낸다.

[0148] CDC는 보체 캐스케이드가 항체 Fc 도메인에 결합하는 보체 성분 C1q에 의해 활성화되는 세포독성 형태를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 Fc 도메인 변이체를 포함하며, 이는 이량체화되어 Fc 도메인 이량체 변이체를 형성할 때 야생형 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드 구조체와 비교하여 C1q 결합이 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 감소한 것을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 Fc 도메인 변이체를 포함하며, 이는 이량체화되어 Fc 도메인 이량체 변이체를 형성할 때 야생형 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드 구조체와 비교하여 감소된 CDC를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 Fc 도메인 변이체를 포함하며, 이는 이량체화되어 Fc 도메인 이량체 변이체를 형성할 때 야생형 Fc 도메인을 포함하는 융합 폴리펩티드와 비교하여 CDC에서 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 Fc 도메인 변이체를 포함하며, 이는 이량체화되어 Fc 도메인 이량체 변이체를 형성할 때 야생형 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드 구조체와 비교하여 무시할 수 있는 CDC를 나타낸다.

[0149] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 야생형 Fc 도메인에 대해 글리코실화가 최소화되거나 감소된 글리코실화를 갖는 Fc 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탈글리코실화는 N297A(여기서 아미노산 넘버링은 EU 지수에 따른 것임)의 돌연변이로, 또는 N297을 N이 아닌 임의의 아미노산으로 돌연변이화함으로써 달성된다. 일부 실시형태에서, 탈글리코실화는 모티프 N-Xaa1-Xaa2-Xaa3을 파괴함으로써 달성되며, 여기서 N = 아스파라긴이고; Xaa1 = P(프롤린)를 제외한 임의의 아미노산이고; Xaa2 = T(트레오닌), S(세린) 또는 C(시스테인)이며; Xaa3 = P(프롤린)를 제외한 임의의 아미노산이다. 일 실시형태에서, N-Xaa1-Xaa2-Xaa3 모티프는 Kabat 등, 1991에 따라 지정된 잔기 297 내지 300을 지칭한다. 일부 실시형태에서, N, Xaa1, Xaa2 또는 Xaa3 중 어느 하나 이상에 대한 돌연변이는 Fc 도메인 변이체의 탈글리코실화를 야기한다.

[0150] 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 이량체화될 때 Fc γ 수용체에 특이적으로 결합하는 감소된 능력 또는 식균작용을 유도하는 감소된 능력을 나타내는 IgG Fc 도메인 변이체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 이량체화될 때 전형적인 "죽은" Fc 도메인 변이체(예를 들어, "죽은" IgG Fc 도메인 변이체)의 기능이 결여된 Fc 도메인 변이체(예를 들어, IgG Fc 도메인 변이체)를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체(예를 들어, IgG Fc 도메인 변이체)는 Fc 도메인 이량체와 Fc γ 수용체의 상호작용을 최소화하는 것으로 공지된 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 아미노산 치환 L234A, L235A, G237A, 및 N297A(Kabat 등, 1991에 따른 EU 넘버링 시스템에 따라 지정됨) 중 하나 이상을 포함하는 Fc 도메인 변이체(예를 들어, IgG Fc 도메인 변이체)를 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 하나 이상의 추가적인 돌연변이를 포함한다. 인간 IgG1 Fc 도메인 변이체에 대한 이러한 추가적인 돌연변이의 비제한적인 예는 E318A 및 K322A(여기서 아미노산 넘버링은 EU 지수에 따른 것임)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 야생형 인간 IgG1 도메인의 아미노산 서열과 비교하여 최대 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 또는 4개 이하의 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인 변이체(예를 들어, IgG Fc 도메인 변이체)를 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 하나 이상의 추가적인 결실을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 표 7의 서열번호 88에 제공된 Fc 도메인 IgG1 중쇄 불변 영역의 C-말단 리신을 결실시켜, 예를 들어, 박테리아 또는 포유동물 세포에서 폴리펩티드가 생성될 때 폴리펩티드의 균질성을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 인간 IgG1 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG1 서열(예를 들어, 하기 서열번호 161 참조)과 비교하여 최대

12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 또는 4개 이하의 총 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 서열 번호 135, 서열번호 136 또는 서열번호 137 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함한다.

[0151] DKHTHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 161)

[0152] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 항체 Fc 도메인의 변이체이다. 일부 실시형태에서, IgG2 변이체 또는 IgG4 변이체는 아미노산 치환 A330S, P331S, 또는 A330S 및 P331S(여기서 아미노산 넘버링은 EU 지수에 따른 것임) 둘 다를 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG2 Fc 도메인 변이체는 A330S, P331S 및 N297A 아미노산 치환(Kabat 등(1991)에 따른 EU 넘버링 시스템에 따라 지정됨) 중 하나 이상을 포함하는 인간 IgG2 Fc 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG2 Fc 도메인 변이체는 하나 이상의 추가적인 돌연변이를 포함한다. 이러한 추가적인 돌연변이의 비제한적인 예는 예를 들어, V234A, G237A, P238S, V309L 및 H268A(Kabat 등(1991)에 따른 EU 넘버링 시스템에 따라 지정됨)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 예에서, 인간 IgG2 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG2 서열과 비교하여 최대 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3개 이하의 총 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 인간 IgG2 Fc 도메인(예를 들어, 표 7의 서열 번호 89)의 C-말단 리신을 결실시켜 IgG2 Fc 도메인 변이체를 생성한다. 일부 실시형태에서, IgG2 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG2 서열(예를 들어, 하기 서열번호 162 참조)과 비교하여 최대 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 또는 4개 이하의 총 결실을 포함한다.

[0153] ERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSMHEALHNHYTQKSLSLSPG(서열번호 162).

[0154] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 IgG4 Fc 도메인 변이체이다. 일부 실시형태에서, IgG4 Fc 도메인 변이체는 S228P 돌연변이(여기서 아미노산 넘버링은 EU 지수에 따른 것임)를 포함한다. 일부 실시형태에서, IgG4 Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG4 Fc 도메인의 아미노산 서열과 비교하여 최대 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 총 돌연변이(들)를 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 S228P, E233P, F234V, L235A, 및 delG236(Kabat 등(1991)에 따른 EU 넘버링 시스템에 따라 지정됨) 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A 아미노산 치환(Kabat 등(1991)에 따른 EU 넘버링 시스템에 따라 지정됨) 중 하나 이상을 포함한다.

[0155] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 L234A, L235A, G237A 및 N297A로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 돌연변이(예를 들어, 2개, 3개 또는 4개 모두의 돌연변이)를 포함하는 인간 IgG1 Fc 도메인 단량체의 변이체이다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 A330S, P331S 및 N297A로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 돌연변이(예를 들어, 2개 또는 3개 모두의 돌연변이)를 포함하는 인간 IgG2 Fc 도메인 단량체의 변이체이다.

[0156] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG Fc 영역과 비교하여 Fc 수용체에 대해 감소된 결합을 나타낸다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG Fc 영역과 비교하여 대상체의 Fc 수용체에 대해 제거된 결합을 나타낸다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG Fc 영역과 비교하여 식균작용을 매개하는 능력의 감소를 나타낸다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 야생형 인간 IgG Fc 영역과 비교하여 제거된 식균작용을 나타낸다.

[0157] 서열번호 88 및 서열번호 89는 각각 IgG1 및 IgG2 Fc 도메인의 아미노산 서열이다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 표 7에 나타난 바와 같은 서열번호 90 내지 95의 어느 하나를 포함한다(또는 이들이다).

표 7

Fc 도메인 변이체의 아미노산 서열

[0158]

서열번호	아미노산 서열
88	EPKSCDKHTHTCPPCAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

89	STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTVKRCCEPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
90	DKHTHTCPPCPAEEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
91	DKHTHTCPPCPAEEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
92	VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
93	VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	ERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	ERKSSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0159] 본원에서 ADCC라고도 지칭되는, 항체-의존성 세포-매개 세포독성은 분비된 Ig가 특정한 세포독성 세포(예를 들어, 자연 살해(NK; Natural Killer) 세포 및 호중구) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR) 상으로 결합되어 이러한 세포독성 효과기 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합하고 후속적으로 표적 세포를 사멸할 수 있도록 하는 세포독성 형태를 지칭한다. 본원에서 ADCP로도 지칭되는, 항체-의존성 세포-매개 식균작용은 분비된 Ig가 특정한 식세포(예를 들어, 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체(FcR) 상으로 결합되어 이러한 식균 효과기 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합하고 후속적으로 표적 세포를 탐식하며 소화할 수 있도록 하는 세포독성 형태를 지칭한다. 표적 세포의 표면에 대한 리간드-특이적 고친화도 IgG 항체는 세포독성 또는 식세포를 자극할 수 있으며 이러한 사멸에 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 야생형 Fc 도메인(예를 들어, 야생형 Fc 도메인 이량체)을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)와 비교하여 감소된 ADCC 또는 ADCP를 나타내는 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 야생형 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)와 비교하여 ADCC 또는 ADCP에서 임의의 약 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 나타내는 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 야생형 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)와 비교하여 제거된 ADCC 또는 ADCP를 나타내는 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체를 포함한다.

[0160] 본원에서 CDC로도 지칭되는, 보체-지향 세포독성은 보체 캐스케이드가 항체 Fc 도메인에 결합하는 보체 성분 C1q에 의해 활성화되는 세포독성 형태를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 야생형 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)와 비교하여 C1q 결합에서 임의의 약 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 나타내는 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 야생형 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)와 비교하여 감소된 CDC를 나타내는 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 야생형 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)와 비교하여 CDC에서 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 감소를 나타내는 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체를 포함한다. 일부 경우에서, 본원에 제공된 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 야생형 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드 구조체와 비교하여 무시할 수 있는 CDC를 나타내는 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체를 포함한다.

[0161] 본원의 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체는 야생형 인간 IgG Fc 영역과 비교하여 Fc γ 수용체에 대해 감소된 결합을 나타낸다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체는 실시예에 기재된 바와 같이, Fc γ 수용체에 대한 야생형 IgG Fc 도메인의 친화도보다 더 적은 Fc γ 수용체에

대한 친화도를 나타낸다. 일부 실시형태에서, Fc γ 수용체에 대한 본원에 기재된 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체의 결합은 Fc γ 수용체에 대한 야생형 Fc 도메인의 결합과 비교하여 약 임의의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%(완전히 제거된 효과기 기능)만큼 감소한다. 일부 실시형태에서, 감소된 결합은 CD16a, CD32a, CD32b, CD32c, 및 CD64로부터 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 Fc γ 수용체에 대한 것이다.

[0162] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체는 야생형 인간 IgG Fc 영역과 비교하여 식균작용의 감소를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체의 식균작용을 매개하는 능력은 야생형 Fc 도메인의 결합과 비교하여 약 임의의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%만큼 감소한다. 일부 예에서, Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체는 야생형 인간 IgG Fc 영역과 비교하여 제거된 식균작용을 나타낸다.

[0163] 일부 실시형태에서, SIRP α 변이체는 링커 서열을 통해 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체 서열에 연결된다. 일부 실시형태에서, 링커 서열은 더 긴 링커가 또한 활용되지만 일반적으로 10개 미만의 아미노산과 같은 작은 수의 아미노산을 포함한다. 일부 경우에서, 링커는 10, 9, 8, 7, 6, 또는 5개 미만 또는 그 이하의 아미노산 길이를 갖는다. 일부 경우에서, 링커는 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 또는 35개 아미노산 또는 그 이상의 길이를 갖는다. 선택적으로, 일부 실시형태에서, 절단가능한 링커가 이용된다.

[0164] 일부 실시형태에서, 본원의 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 폴리펩티드를 원하는 세포 위치 또는 세포외 환경으로 유도하는 표적화 서열 또는 신호 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 특정 신호전달 서열은 성장 배지로 또는 세포의 내막과 외막 사이에 위치한 주변 세포질 공간으로 분비되는 폴리펩티드를 표적화한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 정제 또는 스크리닝을 가능하게 하는 에피토프 또는 태그를 포함한다. 이러한 에피토프 또는 태그는 폴리히스티딘 태그(His-태그)(예를 들어, His6(HHHHHH 서열번호 223) 및 His10(HHHHHHHHHH 서열번호 224)) 또는 고정 금속 친화성 크로마토그래피(IMAC) 시스템(예를 들어, Ni²⁺ 친화성 컬럼), GST 융합, MBP 융합, Strep-태그, 박테리아 효소 BirA의 BSP 비오티화 표적 서열, 및 항체에 의해 표적화된 에피토프 태그(예를 들어, c-myc 태그, 플래그-태그 등)와 사용하기 위한 다른 태그를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 이러한 태그는 정제, 스크리닝, 또는 이들 모두에 유용하다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 His-태그를 사용하여 Ni²⁺ 친화성 컬럼에 고정함으로써 정제한 다음, 정제 후 동일한 His-태그를 사용하여 항체를 Ni²⁺ 코팅된 플레이트에 고정하여 ELISA 또는 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같은 다른 결합 검정을 수행한다.

[0165] 일부 실시형태에서, 융합 파트너는 본원에 기재된 바와 같은 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체를 스크리닝하기 위한 선택 방법의 사용을 가능하게 한다. 다양한 선택 방법을 가능하게 하는 다양한 융합 파트너가 이용가능하다. 예를 들어, Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체 라이브러리의 구성원을 유전자 III 단백질에 융합함으로써, 파지 디스플레이(phage display)가 이용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 융합 파트너는 표시되는 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체이다. 대안적으로, 일부 실시형태에서, 융합 파트너는 발현 벡터 상의 특정 서열에 결합하여, 융합 파트너 및 연관 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체가 이들을 암호화하는 핵산과 공유적 또는 비공유적으로 연결될 수 있도록 한다.

[0166] 일부 실시형태에서, 융합 파트너가 치료적 모이어티일 때, *치료적 모이어티*는, 예를 들어, 펩티드, 단백질, 항체, siRNA, 또는 소분자이다. 본 개시의 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체에 커플링된 치료적 항체의 비-제한적 예는 CD47을 인식하는 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 본 개시의 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체에 커플링되는 치료적 폴리펩티드의 비-제한적 예는 SIRP α 폴리펩티드를 포함하는, CD47 결합 폴리펩티드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 예에서, CD47 결합 폴리펩티드는 본 개시의 Fc 도메인 변이체 또는 Fc 도메인 이량체 변이체에 부착되거나 융합된다. CD47 결합 폴리펩티드의 예는 항-CD47 항체 또는 이의 단편, 및 CD47의 리간드, 예를 들어, SIRP α 또는 이의 단편을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. CD47 결합 폴리펩티드의 추가적인 예는 천연-발생 형태의 SIRP α 뿐만 아니라 이의 돌연변이를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0167] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 개시되며, 여기서 Fc 도메인 이량체 변이체는 2개의 Fc 도메인 변이체를 포함하고, 각각의 Fc 도메인 변이체는 (i) 돌연변이 L234A, L235A, G237A, 및 N297A로 이루어진 인간 IgG1 Fc 영역; (ii) 돌연변이 A330S, P331S 및 N297A로 이루어진 인간 IgG2 Fc 영역; 또는 (iii) 돌연변이 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역으로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 동일하다(즉, 동종이량체). 일부 실시

형태에서, Fc 도메인 변이체는 상이하다(즉, 이중이량체). 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체의 Fc 도메인 변이체 중 적어도 하나는 돌연변이 L234A, L235A, G237A, 및 N297A로 이루어진 인간 IgG1 Fc 영역이다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체의 Fc 도메인 변이체 중 적어도 하나는 돌연변이 A330S, P331S 및 N297A로 이루어진 인간 IgG2 Fc 영역이다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체는 인간 IgG Fc 영역의 야생형 버전과 비교하여 Fc γ 수용체에 대해 제거되거나 감소된 결합을 나타낸다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체는 인간 IgG Fc 영역의 야생형 버전과 비교하여 CD16a, CD32a, CD32b, CD32c, 및 CD64 Fc γ 수용체에 대해 제거되거나 감소된 결합을 나타낸다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체는 인간 IgG Fc 용합의 야생형 버전과 비교하여 C1q에 대해 제거되거나 감소된 결합을 나타낸다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체의 Fc 도메인 변이체 중 적어도 하나는 돌연변이 S228P, E233P, F234V, L235A, deIG236, 및 N297A를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역이다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체는 야생형 인간 IgG4 Fc 영역과 비교하여 Fc γ 수용체에 대해 제거되거나 감소된 결합을 나타낸다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체는 그것의 인간 IgG4 Fc 영역의 야생형 버전과 비교하여 CD16a 및 CD32b Fc γ 수용체에 대해 제거되거나 감소된 결합을 나타낸다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체는 약 5×10^{-6} M 초과 K_D 로 Fc γ 수용체에 결합한다.

[0168] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체는 CD47 결합 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체 변이체는 인간 IgG Fc 영역의 야생형 버전과 비교하여 Fc γ 수용체에 대해 제거되거나 감소된 결합을 나타낸다. 일부 실시형태에서, CD47 결합 폴리펩티드는 설치류 및 비-인간 영장류에서 급성 빈혈을 유발하지 않는다. 일부 실시형태에서, CD47 결합 폴리펩티드는 인간에서 급성 빈혈을 유발하지 않는다.

[0169] 일부 실시형태에서, CD47 결합 폴리펩티드는 신호-조절 단백질 α (SIRP- α) 폴리펩티드 또는 이의 단편이다. 일부 실시형태에서, SIRP α 폴리펩티드는 아미노산 서열, EEELQX₁IQPDKSVLVAAGETATLRCTX₂TS LX₃PVGPIQWFRGAGPGRX₄LIYNQX₅EGX₆FPRVTTVSDX₇TKRNNMDFSIRIGX₈ITPADAGTYCYX₉KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRKPS(서열번호 221)를 포함하는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 X1은 V 또는 I이고; X2는 A 또는 I이며; X3은 I 또는 F이고; X4는 E 또는 V이며; X5는 K 또는 R이고; X6은 H 또는 P이며; X7은 L 또는 T이고; X8은 N 이외의 임의의 아미노산이며; 및 X9는 V 또는 I이다. 일부 실시형태에서, SIRP α 폴리펩티드는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 X1은 V 또는 I이고; X2는 A 또는 I이며; X3은 I 또는 F이고; X4는 E이며; X5는 K 또는 R이고; X6은 H 또는 P이며; X7은 L 또는 T이고; X8은 N이 아니며; 및 X9는 V이다.

[0170] 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 및 Fc 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 개시되며, 여기서 SIRP α D1 도메인 변이체는 비-천연 발생 고친화도 SIRP α D1 도메인이고, SIRP α D1 도메인 변이체는 천연 발생 D1 도메인의 친화도보다 적어도 10배 더 큰 친화도로 인간 CD47에 결합하며; Fc 도메인 변이체는 제2 Fc 도메인 변이체를 포함하는 제2 폴리펩티드에 연결되어 Fc 도메인 이량체 변이체를 형성하고, Fc 도메인 이량체 변이체는 제거되거나 감소된 효과기 기능을 갖는다. 일부 실시형태에서, 비-천연 발생 고친화도 SIRP α D1 도메인은 잔기 80에 아미노산 돌연변이를 포함한다.

[0171] 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체가 본원에 개시되며, 여기서 SIRP α D1 도메인 변이체는 250 nM 미만의 K_D 로 제1 종의 CD47과 결합하고; SIRP α D1 도메인 변이체는 250 nM 미만의 K_D 로 제2 종의 CD47과 결합하며; 제1 종의 CD47에 대한 K_D 및 제2 종의 CD47에 대한 K_D 는 서로 100배 이내이고; 및 제1 종 및 제2 종은 인간, 설치류, 및 비-인간 영장류로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 적어도 3개의 상이한 종의 CD47과 결합한다. 일부 실시형태에서, 비-인간 영장류는 시노물구스 원숭이이다.

[0172] 일부 실시형태에서, (a) 250 nM 미만의 K_D 로 인간 CD47과 결합하는 SIRP α D1 도메인; 및 (b) SIRP α D1 도메인의 N-말단 또는 C-말단에 연결된 Fc 도메인 또는 이의 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 개시되며, 여기서 폴리펩티드는 설치류 및 비-인간 영장류에서 급성 빈혈을 유발하지 않는다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 인간 SIRP- α 의 비-천연 발생 변이체이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드의 생체내 투여는 투여 후 첫 주 동안 50% 미만으로 헤모글로빈 감소를 초래한다. 일부 실시형태에서, 인간에서 폴리펩티드의 투여는 투여 후 첫 주 동안 50% 미만으로 헤모글로빈 감소를 초래한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 적어도 하나의 Fc 도메인 이량체 변이체를 추가로 포함하며, 여기서 Fc 도메인 이량체 변이체는 (i) 돌연변이 L234A, L235A, G237A, 및 N297A로 이루어진 인간 IgG1 Fc 영역; (ii) 돌연변이 A330S, P331S 및 N297A로 이루어진 인간 IgG2 Fc 영역; 또는 (iii) 돌연변이 S228P, E233P, F234V, L235A, deIG236, 및 N297A를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역으로부터

선택되는 Fc 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 돌연변이 L234A, L235A, G237A, 및 N297A로 이루어진 인간 IgG1 Fc 영역이다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 돌연변이 A330S, P331S 및 N297A로 이루어진 인간 IgG2 Fc 영역이다.

[0173]

본 개시의 SIRP α 구조체는 통상적인 유전적 또는 화학적 수단, 예를 들어, 화학적 켄주게이션을 사용하여 링커를 통해 Fc 도메인 또는 이의 변이체의 N-말단에 접합된 그것의 C-말단을 갖는 SIRP α 도메인 또는 이의 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커(예를 들어, 스페이서)는 폴리펩티드와 Fc 도메인 또는 이의 변이체 사이에 삽입된다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 본 개시의 폴리펩티드는 이량체를 형성할 수 없는 Fc 도메인 변이체에 융합된다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 폴리펩티드는 또 다른 Fc 도메인 또는 이의 변이체와 이량체, 예를 들어, 이중이량체를 형성할 수 있는 Fc 도메인 또는 이의 변이체에 융합된다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 Fc 도메인 또는 이의 변이체에 융합되고 이러한 융합 단백질은 동종이량체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 폴리펩티드는 제1 Fc 도메인 또는 이의 변이체에 융합되고 상이한 단백질 또는 펩티드(예를 들어, 항체 가변 영역)는 제2 Fc 도메인 또는 이의 변이체에 융합된다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 또는 이의 변이체는 제1 Fc 도메인 또는 이의 변이체에 접합되고 치료적 단백질(예를 들어, 사이토카인, 인터류킨, 항원, 스테로이드, 항-염증제, 또는 면역조절제)은 제2 Fc 도메인 또는 이의 변이체에 접합된다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 Fc 도메인 또는 이들의 변이체는 이중이량체를 형성한다.

[0174]

진술한 것을 제한하지 않고, 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드(예를 들어, 표 2, 5, 및 6에 기재된 변이체 중 임의의 것)는 Fc 도메인 또는 이의 변이체와 같은, Fc 폴리펩티드 또는 Fc 변이체 폴리펩티드에 융합된다. SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 및 융합된 Fc 도메인 변이체 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드의 예는 표 8에 나타난 서열번호 96-137, 214, 및 216을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

표 8

[0175]

Fc 도메인 변이체에 융합된 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드

서열번호	아미노산 서열
96	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFVGPPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYICIKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPSKDTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
97	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFVGPPIQWFRGAGPGRELIIYNQRQGPFRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYICVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPSKDTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
98	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFVGPPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYICIKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPSKDTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
99	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFVGPPIQWFRGAGPGRELIIYNQRQGPFRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYICVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPSKDTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
100	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFVGPPIQWFRGAGPGRELIIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYICVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPSKDTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
101	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFVGPPIQWFRGAGPGRELIIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYICVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPSKDTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
102	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFVGPPIQWFRGAGPGRELIIYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYICVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVRAPSKDTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK

[illegible]

118	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SRTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
119	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SRTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SRTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
121	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SRTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
122	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SRTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
123	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYTCIKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
124	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYTCIKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
125	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYTCIKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
126	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYTCIKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
127	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYTCIKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SRTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
128	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYTCIKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
129	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYTCIKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SRTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
130	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADA GTYTCVKFRKGSPPDTEFKSGAGTELSVRAKPSESKYGPSCPAPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSEQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

131	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
132	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSESKYGPPCPPCAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
133	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSESKYGPPCPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL LGK
134	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYTCIKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSAAAPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK
135	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL G
136	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL G
137	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCIKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL G
211	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLRPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQRDGPFRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGI PDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL G
214	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSERKSSVECPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFASTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PG
216	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYTCIKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK
217	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYTCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSEKTHTCPECAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK

[0176] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 표 8에 제공된 임의의 변이체에 대해 적어도 85%의 서열 동일성(예를 들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 SIRP α D1 변이체 도메인을 포함한다.

[0177] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 표 8의 서열번호 98-104, 107-113, 116-122, 또는 135-137에 대해 적어도 85%의 서열 동일성(예를 들어, 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성)을 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다.

[0178] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 (a) 신호-조절 단백질 α (SIRP-α) D1 변이체를 포함하며, 여기서 SIRP α D1

도메인 변이체는 아미노산 서열
 EEX₁X₂QX₃IQPDKX₄VX₅VAAGEX₆X₇X₈LX₉CTX₁₀TSLX₁₁PVGPIQWFRGAGPX₁₂RX₁₃LIYNQX₁₄X₁₅GX₁₆FPRVTVSX₁₇X₁₈TX₁₉RX₂₀NMDFX₂₁IX₂₂IX₂₃
 X₂₄ITX₂₅ADAGTYCYX₂₆KX₂₇RKGSPDX₂₈X₂₉EX₃₀KSGAGTELSVRX₃₁KPS(서열번호 47)를 포함하고, 여기서 X₁은 E, 또는 G이고;
 X₂는 L, I, 또는 V이며; X₃은 V, L, 또는 I이고; X₄는 S, 또는 F이며; X₅는 L, 또는 S이고; X₆은 S, 또는 T이며;
 X₇은 A, 또는 V이고; X₈은 I, 또는 T이며; X₉는 H, R, 또는 L이고; X₁₀은 A, V, I, 또는 L이며; X₁₁은 I, T, S,
 또는 F이고; X₁₂는 A, 또는 G이며; X₁₃은 E, V, 또는 L이고; X₁₄는 K, 또는 R이며; X₁₅는 E 또는 Q이고; X₁₆은 H,
 P, 또는 R이며; X₁₇은 D, 또는 E이고; X₁₈은 S, L, T, 또는 G이며; X₁₉는 K, 또는 R이고; X₂₀은 E, 또는 N이며;
 X₂₁은 S, 또는 P이고; X₂₂는 S, 또는 R이며; X₂₃은 S, 또는 G이고; X₂₄는 임의의 아미노산이며; X₂₅는 임의의 아미
 노산이고; X₂₆은 V, 또는 I이며; X₂₇은 F, L, 또는 V이고; X₂₈은 D이거나 부재하며; X₂₉는 T, 또는 V이고; X₃₀은
 F, 또는 V이며; 및 X₃₁은 A, 또는 G이고; 및 여기서 SIRP α D1 도메인 변이체는 서열번호 1 내지 10 중 어느 하
 나에 따른 서열을 갖는 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 2개의 아미노산 치환; 및 (b) 2개의 Fc 도메인
 변이체를 갖는 Fc 도메인 이량체 변이체를 포함하며, 각각의 Fc 도메인 변이체는 독립적으로 하기이다: (i)
 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역; (ii) L234A, L235A, 및 G237A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1
 Fc 영역; (iii) L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역; (iv) N297A 돌연변이
 를 포함하는 인간 IgG2 Fc 영역; (v) A330S 및 P331S 돌연변이를 포함하는 인간 IgG2 Fc 영역; (vi) A330S,
 P331S, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG2 Fc 영역; (vii) S228P, E233P, F234V, L235A, 및 delG236 돌
 연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역; 또는 (viii) S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A 돌연변이
 를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역.

[0179] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 SIRP α D1 도메인 변이체는 서
 열번호 47에 따른 아미노산 서열; 2개의 Fc 도메인을 갖는 Fc 도메인 이량체를 포함하고, Fc 도메인 중 하나는
 L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역을 포함하는 Fc 도메인 변이체이다.

[0180] **Fc 도메인의 이량체화**

[0181] 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드(예를 들어, 표 2, 5, 및 6에 기재된 변이체 중 임의의
 것)는 N-말단 또는 C-말단에서 제1 Fc 도메인(예를 들어, Fc 도메인 변이체)에 융합된다. 일부 실시형태에서,
 제1 Fc 도메인은 이량체를 형성할 수 없는 변이체이다. 일부 실시형태에서, 제1 Fc 도메인은 제2 Fc 도메인과
 이량체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 Fc 도메인은 제1 및 제2 도메인 Fc 도메인 사이의 이중이량
 체화를 촉진하는 아미노산 치환을 포함한다.

[0182] 일부 실시형태에서, Fc 도메인 이량체의 2개의 Fc 도메인 각각은 2개의 단량체의 이중이량체화를 촉진하는 아미
 노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α 구조체는, 예를 들어, 제1 Fc 도메인에 융합된 SIRP α D1
 도메인 변이체 폴리펩티드를 포함하는 제1 아단위(subunit) 및 제2 Fc 도메인을 포함하는 제2 아단위(예를
 들어, SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드 또는 임의의 다른 폴리펩티드 불포함)로부터 형성된다. 일부 실시형
 태에서, 구조체는 Fc 도메인 이량체(예를 들어, 단일 팔)에 연결된 단일 SIRP α D1 도메인 변이체 폴리펩티드를
 갖는다. 일부 실시형태에서, 구조체는 Fc 도메인 이량체(예를 들어, 이중 팔)에 연결된 2개의 SIRP α D1 도메인
 변이체 폴리펩티드를 갖는다. 일부 실시형태에서, 약 500 nM의 K₀를 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체는 이중 팔
 구조체에서 특히 유용하다. 일부 실시형태에서, 약 50 nM의 K₀를 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체는 이중 팔 구조
 체에서 특히 유용하다. 일부 실시형태에서, 약 5 nM의 K₀를 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체는 이중 팔 구조체 및
 단일 팔 구조체에서 유용하다. 일부 실시형태에서, 약 500 pM의 K₀를 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체는 이중 팔
 구조체 및 단일 팔 구조체에서 유용하다. 일부 실시형태에서, 약 100 pM의 K₀를 갖는 SIRP α D1 도메인 변이체
 는 이중 팔 구조체 및 단일 팔 구조체에서 유용하다. 일부 실시형태에서, 약 50 pM의 K₀를 갖는 SIRP α D1 도메
 인 변이체는 이중 팔 구조체 및 단일 팔 구조체에서 유용하다. 일부 실시형태에서, 약 10 pM의 K₀를 갖는 SIRP
 α D1 도메인 변이체는 이중 팔 구조체 및 단일 팔 구조체에서 유용하다.

[0183] 일부 실시형태에서, Fc 도메인의 이중이량체화는 "노브-인투-홀(knob-into-hole)" 잔기 쌍 및 전하 잔기 쌍과
 같은, 2개의 Fc 도메인에 상이하지만, 양립가능한, 치환을 도입함으로써 촉진된다. 노브 및 홀 상호작용은 이중
 이량체 형성을 선호하는 반면, 노브-노브 및 홀-홀 상호작용은 입체 충돌(steric clash) 및 유리한 상호작용의

결실로 인해 동종이량체 형성을 방해한다. 홀은 단백질의 원래의 아미노산이 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상이한 아미노산으로 대체될 때 생성되는 빈 공간을 지칭한다. 노브는 단백질의 원래의 아미노산이 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상이한 아미노산으로 대체될 때 생성되는 범프(bump)를 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 대체되는 아미노산은 Fc 도메인의 CH3 항체 불변 도메인에 있고 2개의 Fc 도메인의 이량체화에 관여한다. 일부 실시형태에서, 하나의 CH3 항체 불변 도메인의 홀은 또 다른 CH3 항체 불변 도메인의 노브를 수용하도록 생성되어, 노브 및 홀 아미노산은 2개의 Fc 도메인의 이종이량체화를 촉진하거나 선호하도록 작용한다. 일부 실시형태에서, 하나의 CH3 항체 불변 도메인의 홀은 또 다른 CH3 항체 불변 도메인의 원래의 아미노산을 더 잘 수용하도록 생성된다. 일부 실시형태에서, 하나의 CH3 항체 불변 도메인의 노브는 또 다른 CH3 항체 불변 도메인의 원래의 아미노산과 추가적인 상호작용을 형성하도록 생성된다.

[0184] 일부 실시형태에서, 홀은 티로신 또는 트립토판과 같은 더 큰 측쇄를 갖는 아미노산을 알라닌, 발린, 또는 트레오닌과 같은 더 작은 측쇄를 갖는 아미노산, 예를 들어 CH3 항체 불변 도메인의 Y407V 돌연변이로 대체함으로써 구성된다. 유사하게, 일부 실시형태에서, 노브는 더 작은 측쇄를 갖는 아미노산을 더 큰 측쇄를 갖는 아미노산, 예를 들어, CH3 항체 불변 도메인의 T366W 돌연변이로 대체함으로써 구성된다. 일부 실시형태에서, 한 Fc 도메인은 노브 돌연변이 T366W를 포함하고 다른 Fc 도메인은 홀 돌연변이 T366S, L358A, 및 Y407V를 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체를 포함하는 본 개시의 폴리펩티드는 노브 돌연변이 T366W를 포함하는 Fc 도메인에 융합되어 원치 않는 노브-노브 동종이량체 형성을 제한한다. 노브-인투-홀 아미노산 쌍의 예는 **표 9**에 비제한적으로 포함되며 노브-인투-홀 Fc 도메인 변이체 및 SIRP α-Fc 융합의 예는 **표 10**에 제공된다.

표 9

노브-인투-홀 돌연변이

제1 Fc 도메인	Y407T	Y407A	F405A	T394S	T366S L358A Y407V	T394W Y407T	T394S Y407A	T366W T394S
제2 Fc 도메인	T366Y	T366W	T394W	F405W	T366W	T366Y F405A	T366W F405W	F405W Y407A

표 10

예시적인 Fc 도메인 변이체 및 SIRP α D1 도메인 변이체 - Fc 도메인 변이체 융합 폴리펩티드

서열번호	아미노산 서열
138	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSFLPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYCYCKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
139	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLCAVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
140	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSFLPVGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYCYCKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLCAVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
141	DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
142	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSFLPVGPIQWFRGAGPGRELINQRQGFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYCYCKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK
143	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSFLPVGPIQWFRGAGPGRELINQRQGFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADAGTYCYCKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLCAVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPGK

144	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKLEWLGVISGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQ SNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCRKTHTCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
145	EEELQIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSFLPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQREGPFPRVTTVSDTTKRNNMDFSIRIGAITPADA GTYYCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSKTHTCPECPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCEVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
146	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQRQGPFRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYYCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
147	DKTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLCAVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
148	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLFPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQRQGPFRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADA GTYYCVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSVRAKPSDKTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLCAVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
149	DKTHTCPPCAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0187]

노브-인트루-홀 전략에 더하여, 일부 실시형태에서, 정전기 스티어링(electrostatic steering)이 또한 Fc 도메인의 이량체화를 제어하는 데 사용된다. 정전기 스티어링은 펩티드, 단백질 도메인, 및 단백질에서 반대로 하전된 아미노산 사이의 유리한 정전기 상호작용을 활용하여 고차 단백질 분자의 형성을 제어하는 것을 지칭한다. 특히, 정전기 스티어링을 사용하여 Fc 도메인의 이량체화를 제어하기 위해, CH3-CH3 계면을 구성하는 하나 이상의 아미노산 잔기가 양으로-하전된 또는 음으로-하전된 아미노산 잔기로 대체되어 상호작용이 도입된 특정 하전된 아미노산에 따라 정전기적으로 유리하거나 불리하게 된다. 일부 실시형태에서, 리신, 아르기닌, 또는 히스티딘과 같이, 계면에서 양으로-하전된 아미노산은 아스파르트산 또는 글루탐산과 같은 음으로-하전된 아미노산으로 대체된다. 일부 실시형태에서, 계면에서 음으로-하전된 아미노산은 양으로-하전된 아미노산으로 대체된다. 일부 실시형태에서, 하전된 아미노산은 상호작용하는 CH3 항체 불변 도메인 중 하나, 또는 둘 모두에 도입된다. 일부 실시형태에서, 2개의 Fc 도메인의 상호작용하는 CH3 항체 불변 도메인에 하전된 아미노산을 도입하는 것은 하전된 아미노산 사이의 상호작용으로부터 야기되는 정전기 스티어링 효과에 의해 제어되는 바와 같이 Fc 도메인의 이중이량체의 선택적 형성을 촉진한다. 정전기 스티어링 아미노산 쌍의 예는 표 11에, 제한 없이, 포함된다.

표 11

[0188]

정전기 스티어링 아미노산 쌍

Fc 도메인 단량체 1	K409D	K409D	K409E	K409E	K392D	K392D	K392E	K392E	K409D K392D	K370E K409D K439E
Fc 도메인 단량체 2	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K	D399R	D399K D356K	D356K E357K D399K

[0189]

특히 이중특이적 항체를 구성하는 상황에서, Fc 도메인의 이중이량체화를 제어하는 데 사용되는 다른 방법이 이용가능하다.

[0190]

일부 실시형태에서, 제1 Fc 도메인 및 제2 Fc 도메인은 각각 인간 IgG1의 서열에 대해, 하기 아미노산 치환 중 하나 이상을 포함한다: T366W, T366S, L368A, Y407V, T366Y, T394W, F405W, Y349T, Y349E, Y349V, L351T, L351H, L351N, L351K, P353S, S354D, D356K, D356R, D356S, E357K, E357R, E357Q, S364A, T366E, L368T,

L368Y, L368E, K370E, K370D, K370Q, K392E, K392D, T394N, P395N, P396T, V397T, V397Q, L398T, D399K, D399R, D399N, F405T, F405H, F405R, Y407T, Y407H, Y407I, K409E, K409D, K409T, 및 K409I.

[0191] 일부 실시형태에서, Fc 도메인은 (a) 야생형 인간 IgG1에 대해 하기 아미노산 치환 중 하나: T366W, T366S, L368A, Y407V, T366Y, T394W, F405W, Y349T, Y349E, Y349V, L351T, L351H, L351N, L351K, P353S, S354D, D356K, D356R, D356S, E357K, E357R, E357Q, S364A, T366E, L368T, L368Y, L368E, K370E, K370D, K370Q, K392E, K392D, T394N, P395N, P396T, V397T, V397Q, L398T, D399K, D399R, D399N, F405T, F405H, F405R, Y407T, Y407H, Y407I, K409E, K409D, K409T, 또는 K409I; 또는 (b) (i) 인간 IgG1 Fc 영역에 대한 N297A 돌연변이; (ii) 인간 IgG1 Fc 영역에 대한 L234A, L235A, 및 G237A 돌연변이; (iii) 인간 IgG1 Fc 영역에 대한 L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이; (iv) 인간 IgG2 Fc 영역에 대한 N297A 돌연변이; (v) 인간 IgG2 Fc 영역에 대한 A330S 및 P331S 돌연변이; (vi) 인간 IgG2 Fc 영역에 대한 A330S, P331S, 및 N297A 돌연변이; (vii) 인간 IgG4 Fc 영역에 대한 S228P, E233P, F234V, L235A, 및 delG236 돌연변이; 또는 (viii) 인간 IgG4 Fc 영역에 대한 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 (a) 야생형 인간 IgG1에 대해 하기 아미노산 치환 중 하나: T366W, T366S, L368A, Y407V, T366Y, T394W, F405W, Y349T, Y349E, Y349V, L351T, L351H, L351N, L351K, P353S, S354D, D356K, D356R, D356S, E357K, E357R, E357Q, S364A, T366E, L368T, L368Y, L368E, K370E, K370D, K370Q, K392E, K392D, T394N, P395N, P396T, V397T, V397Q, L398T, D399K, D399R, D399N, F405T, F405H, F405R, Y407T, Y407H, Y407I, K409E, K409D, K409T, 또는 K409I를 포함하고; 및 (b)(i) 인간 IgG1 Fc 영역에 대한 N297A 돌연변이; (ii) 인간 IgG1 Fc 영역에 대한 L234A, L235A, 및 G237A 돌연변이; (iii) 인간 IgG1 Fc 영역에 대한 L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이; (iv) 인간 IgG2 Fc 영역에 대한 N297A 돌연변이; (v) 인간 IgG2 Fc 영역에 대한 A330S 및 P331S 돌연변이; (vi) 인간 IgG2 Fc 영역에 대한 A330S, P331S, 및 N297A 돌연변이; (vii) 인간 IgG4 Fc 영역에 대한 S228P, E233P, F234V, L235A, 및 delG236 돌연변이; 또는 (viii) 인간 IgG4 Fc 영역에 대한 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A 돌연변이를 추가로 포함한다.

[0192] 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 Fc 도메인은 상이한 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 Fc 도메인은 T366W를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 Fc 도메인은 T366S, L368A, 및 Y407V를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 Fc 도메인은 D399K를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 Fc 도메인은 K409D를 포함한다.

[0193] **폴리펩티드 또는 단백질 도메인 연결**

[0194] 일부 실시형태에서, 야생형 SIRPα D1 도메인에 대해 잔기 80에서의 아미노산 돌연변이; 및 잔기 6, 잔기 27, 잔기 31, 잔기 47, 잔기 53, 잔기 54, 잔기 56, 잔기 66, 및 잔기 92로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기에서의 야생형 SIRPα D1 도메인에 대해 적어도 하나의 추가적인 아미노산 돌연변이를 갖는, SIRPα D1 도메인, 또는 이의 단편을 포함하는 신호-조절 단백질 α(SIRP-α) D1 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 개시된다.

[0195] 일부 실시형태에서, Fc 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 또한 본원에 개시되며, 여기서 Fc 변이체는 2개의 Fc 도메인 변이체를 포함하는 Fc 도메인 이량체를 포함하고, 여기서 각 Fc 도메인 변이체는 (i) 돌연변이 L234A, L235A, G237A, 및 N297A로 이루어진 인간 IgG1 Fc 영역; (ii) 돌연변이 A330S, P331S 및 N297A로 이루어진 인간 IgG2 Fc 영역; 또는 (iii) 돌연변이 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역으로부터 독립적으로 선택된다.

[0196] 일부 실시형태에서, 신호-조절 단백질 α(SIRP-α) D1 변이체 및 Fc 변이체는 연결된다. 일부 실시형태에서, SIRPα D1 도메인 변이체의 C-말단을 Fc 도메인 변이체의 N-말단에 연결하여, 2개의 폴리펩티드가 직렬 연결로서로 접합되도록 한다.

[0197] 일부 실시형태에서, 신호-조절 단백질 α(SIRP-α) D1 변이체 및 Fc 변이체는 공유 결합, 예를 들어, 펩티드 결합, 합성 중합체, 또는 화학 반응, 예를 들어, 화학적 접합으로부터 생성된 임의의 종류의 결합을 통해 연결된다. 펩티드 결합을 통해 연결될 때, 일부 실시형태에서, 한 단백질 도메인(예를 들어, SIRPα D1 도메인 변이체)의 C-말단에서의 카르복실산 기는 축합 반응에서 또 다른 단백질 도메인(예를 들어, Fc 변이체)의 N-말단에서의 아미노 기와 반응하여 펩티드 결합을 형성한다. 일부 실시형태에서, 펩티드 결합은 종래의 유기 화학 반응을 통해 합성 수단으로부터, 또는 숙주 세포로부터의 천연 생성에 의해 형성되며, 여기서 직렬 연결로 2개의 단백질(예를 들어, Fc 도메인 변이체 및 SIRPα D1 도메인 변이체)의 DNA 서열을 암호화하는 핵산 분자는 숙주 세포에서 필수적인 분자 기구(molecular machinery)(예를 들어, DNA 폴리머라제 및 리보솜)에 의해 2개의 단백질을 암호화하는 인접 폴리펩티드로 직접 전사 및 번역될 수 있다.

[0198] 신호-조절 단백질 α (SIRP- α) D1 변이체와 Fc 변이체가 합성 중합체에 의해 연결될 때, 일부 실시형태에서, 중합체는 각 단부에서 반응성 화학 작용기로 작용화되어 2개의 단백질의 연결 단부에서 말단 아미노산과 반응한다.

[0199] 일부 실시형태에서, 신호-조절 단백질 α (SIRP- α) D1 변이체와 Fc 변이체는 펩티드 결합 제외한 펩티드, 예를 들어, 화학 반응에 의해 형성된 결합에 의해 연결되며, 일부 실시형태에서, 화학적 작용기(예를 들어, 아민, 카르복실산, 에스테르, 아지드, 또는 다른 작용기)는 각각, 한 단백질의 C-말단 및 또 다른 단백질의 N-말단에 합성적으로 부착된다. 일부 실시형태에서, 2개의 작용기는 합성 화학 수단을 통해 반응하여 화학 결합을 형성하고, 이로써 2개의 단백질을 함께 연결한다.

[0200] **스페이서**

[0201] 본 개시에서, 일부 실시형태에서, 본 개시의 Fc 도메인 단량체와 SIRP α D1 변이체 폴리펩티드 사이의 링커는 약 1-200개의 아미노산을 포함하는 아미노산 스페이서이다. 적합한 펩티드 스페이서는 글리신 및 세린과 같은 유연한 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드 링커를 포함한다. 링커 서열의 예는 표 12에 제공되어 있다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 모티프, 예를 들어, GS, GG, GGS, GGG, GGGGS(서열번호 163), GGSG(서열번호 164), 또는 SGGG(서열번호 165)의 다중 또는 반복 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 GS, 예를 들어, GS, GSGS(서열번호 166), GSGSGS(서열번호 167), GSGSGSGS(서열번호 168), GSGSGSGSGS(서열번호 169), 또는 GSGSGSGSGSGS(서열번호 170)의 모티프를 포함하는 2 내지 12개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 GGS, 예를 들어, GGS, GGSGGS(서열번호 171), GGSGGSGS(서열번호 172), 및 GGSGGSGSGS(서열번호 173)의 모티프를 포함하는 3 내지 12개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 GGSG(서열번호 164), 예를 들어, GGSG(서열번호 164), GGSGGGSG(서열번호 174), or GGSGGGSGGGSG(서열번호 175)의 모티프를 포함하는 4 내지 12개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 GGGGS(서열번호 163), 예를 들어, GGGSGGGSGGGGS(서열번호 176)의 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 글리신 및 세린을 제외한 아미노산, 예를 들어, AAS(서열번호 177), AAAL(서열번호 178), AAAK(서열번호 179), AAAR(서열번호 180), EGKSSGSGSEKST(서열번호 181), GSAGSAAGSGEF(서열번호 182), AEAAAKEAAKA(서열번호 183), KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 184), GGGGAGGGG(서열번호 185), GENLYFQSGG(서열번호 186), SACYCELS(서열번호 187), RSIAT(서열번호 188), RPACKIPNDLKQKVMNH(서열번호 189), GGSAGGSGSGSSGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG(서열번호 190), AAANSSIDLISVPVDSR(서열번호 191), or GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGS(서열번호 192)를 포함한다.

[0202] 일부 실시형태에서, 스페이서는 모티프, 예를 들어, EAAAK(서열번호 193)의 다중 또는 반복 모티프를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 (XP)_n과 같은 프롤린-풍부 서열의 모티프, 예를 들어, 다중 또는 반복 모티프를 포함하며, 여기서 X는 임의의 아미노산(예를 들어, A, K, 또는 E)이고 n은 1-5, 및 PAPAP(서열번호 194)이다.

표 12

링커 서열

[0203]

서열번호	아미노산 서열
163	GGGGS
164	GGSG
165	SGGG
166	GSGS
167	GSGSGS
168	GSGSGSGS
169	GSGSGSGSGS
170	GSGSGSGSGSGS
171	GGSGGS
172	GGSGGSGGS
173	GGSGGSGGSGGS
174	GGSGGGSG
175	GGSGGGSGGGSG
176	GGGSGGGGSGGGGS
177	AAS
178	AAAL
179	AAAK

180	AAAR
181	EGKSSGSGSESKST
182	GSAGSAAGSGEF
183	AEAAAKEAAKA
184	KESGVSSEQLAQFRSLD
185	GGGGAGGGG
186	GENLYFQSGG
187	SACYCELS
188	RSIAT
189	RPACKIPNDLKQKVMNH
190	GGGAGGSGSGSSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTGSG
191	AAANSSIDLISVPVDSR
192	GGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGS
193	EAAAK
194	PAPAP

[0204] 일부 실시형태에서, 사용된 펩티드 스페이스 및 아미노산의 길이는 관여된 2개의 단백질 및 최종 단백질 융합 폴리펩티드에서 원하는 유연성 정도에 따라 조정된다. 일부 실시형태에서, 스페이스의 길이는 적절한 단백질 폴딩(protein folding)을 보장하고 응집체 형성을 피하도록 조정된다. 일부 실시형태에서, 스페이스는 A 또는 AAAL(서열번호 178)이다.

[0205] **백터, 숙주 세포, 및 단백질 생성**

[0206] 일부 실시형태에서, 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 잔기 80에서의 아미노산 돌연변이; 및 잔기 6, 잔기 27, 잔기 31, 잔기 47, 잔기 53, 잔기 54, 잔기 56, 잔기 66, 및 잔기 92로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기에서의 야생형 SIRP α D1 도메인에 대해 적어도 하나의 추가적인 아미노산 돌연변이를 갖는, SIRP α D1 도메인, 또는 이의 단편을 포함하는 신호-조절 단백질 α (SIRP- α) D1 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 개시된다.

[0207] 또한, 일부 실시형태에서, Fc 변이체를 포함하는 폴리펩티드가 본원에 개시되며, 여기서 Fc 변이체는 2개의 Fc 도메인 단량체를 갖는 Fc 도메인 이량체를 포함하고, 각각의 Fc 도메인 단량체는 (i) 돌연변이 L234A, L235A, G237A, 및 N297A로 이루어진 인간 IgG1 Fc 영역; (ii) 돌연변이 A330S, P331S 및 N297A로 이루어진 인간 IgG2 Fc 영역; 또는 (iii) 돌연변이 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역 으로부터 독립적으로 선택된다.

[0208] 일부 실시형태에서, 본 개시의 폴리펩티드는 숙주 세포로부터 생성된다. 숙주 세포는 그것의 상응하는 핵산으로부터 본원에 기재된 폴리펩티드 및 융합 폴리펩티드를발현하는 데 필요한, 필수적인 세포 성분, 예를 들어, 세포 기관(organelle)을 포함하는 비히클을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 핵산은 형질전환, 형질감염, 전기천공, 인산칼슘 침전, 직접 현미주사, 감염 등에 의해 숙주 세포 내로 도입된 핵산 백터에 포함된다. 일부 실시형태에서, 핵산 백터의 선택은 사용되는 숙주 세포에 의존한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 원핵생물(예를 들어, 박테리아) 또는 진핵생물(예를 들어, 포유동물) 기원이다.

[0209] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드, 예를 들어, SIRP α D1 도메인 변이체(예를 들어, 표 2, 5, 및 6에 제공된 임의의 변이체) 및 Fc 변이체와 같은 융합 파트너를 포함하는 폴리펩티드 구조체는 폴리펩티드 구조체의 발현을 유도하거나 유발하기 위한 적절한 조건 하에서 폴리펩티드 구조체(예를 들어, Fc 변이체, 링커, 및 융합 파트너)을 암호화하는 핵산을 포함하는 핵산, 바람직하게는 발현 백터로 형질전환된 숙주 세포를 배양함으로써 생성된다. 일부 실시형태에서, 발현에 적절한 조건은 발현 백터 및 선택된 숙주 세포에 따라 변화한다. 일부 실시형태에서, 포유동물 세포, 박테리아, 곤충 세포, 및 효모를 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 매우 다양한 적절한 숙주 세포가 사용된다. 예를 들어, 본 개시에서 사용되는 다양한 세포주는 American Type Culture Collection에서 이용가능한 ATCC[®] 세포주 카탈로그에 기재되어 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 Fc 도메인 변이체는 세포주의 유전자 조작 또는 키프넨신의 첨가와 같은 세포 배양 조건의 변형 또는 원핵생물(대장균 등)과 같은 천연 비-글리코실화 숙주를 사용함으로써, 이러한 세포에 의해 발현되는 단백질을 글리코실화하지 않도록 최적화된 세포에서발현되며, 및 일부 경우에서, Fc에서 글리코실화 서열의 변형은 필요하지 않다.

[0210] **핵산 백터 구조체 및 숙주 세포**

[0211] 본 개시의 폴리펩티드의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열은 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한

방법은 올리고뉴클레오타이드-매개(또는 부위-지정) 돌연변이유발 및 PCR 돌연변이유발을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 표준 기술, 예를 들어, 유전자 합성을 사용하여 수득된다. 대안적으로, 야생형 SIRP α D1 도메인을 암호화하는 핵산 분자는 표준 기술, 예를 들어, QuikChangeTM 돌연변이유발을 사용하여 특정 아미노산 치환을 포함하도록 돌연변이된다. 일부 경우에서, 핵산 분자가 뉴클레오타이드 합성기(nucleotide synthesizer) 또는 PCR 기술을 사용하여 합성된다.

[0212] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드 구조체, 예를 들어, SIRP α D1 도메인 변이체(예를 들어, 표 2, 5, 및 6에 제공된 임의의 변이체) 및 Fc 변이체와 같은 융합 파트너를 포함하는 폴리펩티드 구조체를 암호화하는 핵산은 발현 벡터에 혼입되어 단백질을 발현한다. 다양한 발현 벡터가 단백질 발현에 활용될 수 있다. 발현 벡터는 자가-복제, 염색체의 벡터 또는 숙주 게놈으로 혼입되는 벡터를 포함할 수 있다. 벡터는 또한 다양한 성분 또는 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 벡터 성분은 전사 및 번역 조절 서열, 예를 들어, 프로모터 서열, 리보솜 결합 부위, 신호 서열, 전사 개시 및 정지 서열, 번역 개시 및 정지 서열, 3' 및 5' 비번역 영역(UTR; untranslated region), 및 인핸서(enhancer) 또는 활성화 서열; 복제 원점(origin of replication); 선택 마커 유전자; 및 관심 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열, 및 전사 종결 서열을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 발현 벡터는 제어 또는 조절 서열, 선택가능한 마커, 임의의 융합 파트너, 추가적인 요소, 또는 이들의 임의의 조합과 작동가능하게 연결된 단백질을 포함한다. 용어 "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 핵산이 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓이는 것을 의미한다. 일반적으로, 이러한 발현 벡터는 Fc 변이체를 암호화하는 핵산에 작동가능하게 연결된 전사 및 번역 조절 핵산을 포함하고, 전형적으로 단백질을 발현하는 데 사용되는 숙주 세포에 적절하다. 항생제 내성 유전자 또는 형광 단백질 유전자와 같지만, 이에 제한되지 않는, 선택 유전자 또는 마커를 사용하여, 예를 들어, 항생제 또는 형광 발현에 의해 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 선택할 수 있다. 다양한 선택 유전자가 이용가능하다.

[0213] 일부 실시형태에서, 벡터의 성분 또는 요소는 발현 벡터가 숙주 세포 유형과 양립할 수 있도록 최적화된다. 본 개시에서 사용되는 발현 벡터는 포유동물 세포, 박테리아, 곤충 세포, 효모, 및 시험관내 시스템에서 단백질 발현을 가능하게 하는 것들을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0214] 일부 실시형태에서, 포유동물 세포는 본 개시의 폴리펩티드를 생성하기 위한 숙주 세포로서 사용된다. 포유동물 세포 유형의 예는 인간 배아 신장(HEK; human embryonic kidney)(예를 들어, HEK293, HEK 293F), 차이니스 햄스터 난소(CHO), HeLa, COS, PC3, Vero, MC3T3, NS0, Sp2/0, VERY, BHK, MDCK, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NS0(임의의 면역글로불린 사슬을 내생적으로 생성하지 않는 쥐과 골수종 세포주), CRL7030, 및 HsS78Bst 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 대장균 세포는 본 개시의 폴리펩티드를 생성하기 위한 숙주 세포로서 사용된다. 대장균 균주의 예는 대장균 294(ATCC[®] 31,446), 대장균 λ 1776(ATCC[®] 31,537, 대장균 BL21(DE3)(ATCC[®] BAA-1025), 및 대장균 RV308(ATCC[®] 31,608)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0215] 상이한 숙주 세포는 번역 후 처리(posttranslational processing) 및 단백질 산물의 변형(예를 들어, 글리코실화)에 대한 특징적이고 특정한 기전을 갖는다. 일부 실시형태에서, 적절한 세포주 또는 숙주 시스템은 발현된 폴리펩티드의 정확한 변형 및 처리를 보장하도록 선택된다. 벡터가 단백질 생성을 위해 숙주 세포 내로 도입되면, 숙주 세포는 프로모터 유도, 형질전환체 선택, 또는 목적하는 서열을 암호화하는 유전자 증폭에 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다.

[0216] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드 구조체, 예를 들어, SIRP α D1 도메인 변이체(예를 들어, 표 2, 5, 및 6에 제공된 임의의 변이체) 및 Fc 변이체와 같은 융합 파트너를 포함하는 폴리펩티드 구조체는 발현 구조체가 레트로바이러스 또는 아데노바이러스와 같은 바이러스를 사용하여 포유동물 세포 내로 도입되는 시스템을 포함하는, 포유동물 발현 시스템에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 또는 영양류 세포가 활용된다. 적합한 세포는 또한 Jurkat T 세포, NIH3T3, CHO, COS, 및 293 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 공지된 연구 세포를 포함한다. 대안적으로, 일부 실시형태에서, 단백질은 박테리아 세포에서 발현된다. 박테리아 발현 시스템은 기술분야에 공지되어 있으며, 대장균(E. coli), 바실루스 서브틸리스(Bacillus subtilis), 스트렙토코커스 크레모리스(*Streptococcus cremoris*), 및 스트렙토코커스 리비단스(*Streptococcus lividans*)를 포함한다. 일부 경우에서, Fc 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드 구조체는 Sf9 및 Sf21 세포와 같지만 이에 제한되지 않는 곤충 세포 또는 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 피치아(Pichia), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*), 한세누라(Hansenula) 및 야로위아(Yarrowia) 속의 유기체와 같지만 이에 제한되지 않는 효모 세포에서 생성된다. 일부 경우에서, Fc 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드 구조체는 무세포 번역 시스템을

사용하여 시험관내에서 발현된다. 원핵생물(예를 들어, 대장균) 및 진핵생물(예를 들어, 밀 배아(wheat germ), 토끼 망상적혈구(rabbit reticulocyte)) 세포 모두로부터 유래된 시험관내 번역 시스템이 이용가능하며, 일부 실시형태에서, 이는 관심 단백질의 발현 수준 및 기능적 특성에 기반하여 선택된다. 예를 들어, 통상의 기술자가 인식하는 바와 같이, 일부 디스플레이 기술, 예를 들어, 리보솜 디스플레이에는 시험관내 번역이 필요하다. 또한, 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 액상 펩티드 합성 및 고상 펩티드 합성과 같지만, 이에 제한되지 않는, 화학적 합성 방법에 의해 생성된다. 박테리아 추출물과 같은 비-글리코실화 시스템을 사용하는 시험관내 전사의 경우, Fc는 천연 글리코실화 부위가 존재하더라도 글리코실화되지 않으므로 Fc의 불활성화가 동등하게 수득될 것이다.

[0217] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드 구조체는 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 비-천연 아미노산, 아미노산 유사체, 아미노산 모방체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 천연적으로 암호화된 아미노산은 일반적으로 20개의 공통 아미노산(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 리신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신, 및 발린) 및 피롤리신 및 셀레노시스테인을 지칭한다. 아미노산 유사체는, 예를 들어, 수소에 결합된 탄소, 카르복실 기, 아미노 기, 및 R 기, 예를 들어, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폭사이드, 메티오닌 메틸 설포늄과 같이 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 갖는 화합물을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 이러한 유사체는 변형된 R 기(예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 골격을 갖지만, 일반적으로 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보유한다.

[0218] 단백질 생성, 회수, 및 정제

[0219] 일부 실시형태에서, 본 개시의 폴리펩티드를 생성하는 데 사용되는 숙주 세포는 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장된다. 포유동물 숙주 세포에 적합한 배지의 예는 최소 필수 배지(MEM; Minimal Essential Medium), 돌베코 변형 이글 배지(DMEM; Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Expi293TM 발현 배지, 소 태아 혈청(fetal bovine serum; FBS)이 보충된 DMEM, 및 RPMI-1640을 포함한다. 박테리아 숙주 세포에 적합한 배지의 예는 루리아 브로쓰(LB; Luria broth)와 선택제(selection agent), 예를 들어, 암피실린(ampicillin)과 같은 필수 보충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포는 적합한 온도, 예를 들어, 약 20℃ 내지 약 39℃, 예를 들어, 약 25℃ 내지 약 37℃, 바람직하게는 37℃, 및 CO₂ 수준, 예를 들어, 약 5% 내지 10%에서 배양된다. 일부 실시형태에서, 배지의 pH는, 주로 숙주 유기체에 따라, 약 pH 6.8 내지 pH 7.4, 예를 들어, pH 7.0이다. 발현 벡터에서 유도성 프로모터가 사용되는 경우, 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에서 단백질 발현이 유도될 수 있다.

[0220] 일부 실시형태에서, 단백질 회수는, 예를 들어, 삼투압 쇼크(osmotic shock), 초음파처리, 또는 용해에 의해 숙주 세포를 파괴하는 것을 수반한다. 세포가 파괴되면, 세포 파편(cell debris)이 원심분리 또는 여과를 통해 제거된다. 이어서, 단백질은 추가로 정제될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시의 폴리펩티드는 단백질 정제의 다양한 방법, 예를 들어, 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 및 크기-배제 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 분별 용해도법에 의해, 또는 단백질의 정제를 위한 임의의 다른 표준 기술에 의해 정제된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 단백질은 단백질 A 컬럼(예를 들어, POROS 단백질 A 크로마토그래피)과 같은 친화성 컬럼을 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, POROS HS-50 양이온 교환 크로마토그래피), 여과, 한외 여과(ultra-filtration), 탈염 및 투석 절차와 적절히 선택하고 조합함으로써 단백질이 단리 및 정제된다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 정제를 용이하게 하기 위해 펩티드와 같은 마커 서열에 컨주게이션된다. 마커 아미노산 서열의 예는 헥사-히스티딘 펩티드(His6-tag)이며, 이는 마이크로몰 친화도로 니켈-작용화된 아가로스 친화성 컬럼에 결합할 수 있다. 대안으로, 인플루엔자 혈구응집소 단백질로부터 유래된 에피토프에 해당하는 혈구응집소(hemagglutinin) "HA" 태그가 사용될 수 있다.

[0221] 일부 실시형태에서, 본 개시의 폴리펩티드, 예를 들어, SIRP α D1 도메인 변이체(예를 들어, 표 2, 5, 및 6에 제공된 임의의 변이체) 및 Fc 변이체와 같은 융합 파트너를 포함하는 폴리펩티드 구조체는, 예를 들어, 유전자 요법의 상황에서, 본 개시의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 바이러스 벡터(예를 들어, 레트로 바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 포क्स바이러스 벡터(poxviral vector)(예를 들어, 변형된 백시니아 양카라(MVA; Modified Vaccinia Ankara)와 같은, 백시니아 바이러스 벡터), 아데노-연관 바이러스 벡터, 및 알파바이러스 벡터)와 같은 벡터를 투여함으로써 대상체(예를 들어, 인간)의 세포에 의해 생성된다. 벡터는, 일단 대상체의 세포 내부로 진입하면(예를 들어, 형질전환, 형질감염, 전기천공, 인산칼슘 침전, 직접 현미주사, 감염 등)에 의해) 본원에 개시된 폴리펩티드의 발현을 위해 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 폴리펩티드는 세포로부터

분비된다. 일부 실시형태에서, 질환 또는 장애의 치료가 목적하는 결과인 경우, 추가 조치가 필요하지 않다. 일부 실시형태에서, 단백질 수집을 원하는 경우, 혈액은 대상체로부터 수집되고 단백질은 다양한 방법에 의해 혈액으로부터 정제된다.

[0222] **요로상피암의 치료 방법**

[0223] 일부 실시형태에서, (a) CD47(예를 들어, hCD47)과 SIRP α (예를 들어, hSIRP α)의 상호작용을 차단하는 유효량의 제제 및 (b) 유효량의 항체-약물 접합체(ADC)를 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체(예를 들어, 인간 개체)의 암(예를 들어, 요로상피 암종과 같은 요로상피암)을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 요로상피암은 조직학적으로 확인된, 절제 불가능한 국소 말기 또는 전이성 요로상피 암종이다. 추가적으로 또는 대안적으로, 요로상피 암종은 방광, 신우, 요관 또는 요도의 암이다. 일부 실시형태에서, 개체는 편평 분화 또는 혼합 세포 유형을 갖는 이행 세포 암종을 가지며, 여기서 요로상피 암종은 우세한 조직학이다. 일부 실시형태에서, 개체는 소세포 암종 또는 신경내분비 조직학을 갖지 않는다.

[0224] 일부 실시형태에서, ADC는 세포독성 약물에 연결된 넥틴-4(예를 들어, 인간 넥틴-4)를 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-넥틴-4 항체는 AGS-22C3(CAS 등록 번호 1448664-46-7)으로도 공지된 엔포르투맵이다. 일부 실시형태에서, 세포독성 약물은 베도틴 또는 SGD-1006(CAS 등록 번호 474645-27-7)으로도 공지된 소분자 미세관 교란제인 모노메틸 아우리스타틴-E(MMAE)이다. 일부 실시형태에서, ADC는 엔포르투맵 베도틴(PADCEV®, CAS 등록 번호 1346452-25-2로도 공지됨)이다. 엔포르투맵 베도틴은 프로테아제-절단 가능한 말레이미도카프로일 발린-시트룰린(vc) 링커를 통해 MMAE에 접합된 완전 인간 항-넥틴-4 IgG1 카파 단클론 항체를 포함하는 넥틴-4 유도 항체-약물 접합체(ADC)이다. 접합이 항체의 중쇄 상의 시스테인 잔기에서 발생하여 약 3.8:1의 약물-대-항체 비(DAR)를 갖는 생성물을 수득한다. 분자량은 대략 152 kDa이다. 일부 실시형태에서, ADC(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)는 하나 이상의 28일 주기 동안 개체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, ADC(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)는 하나 이상의 28일 주기의 각각의 1일째, 8일째 및 15일째에 1.25 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시형태에서, ADC(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)는 하나 이상의 28일 주기 동안 개체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, ADC(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)는 1.25 mg/kg의 용량으로 3주마다 1회(Q3W) 투여된다. 일부 실시형태에서, ADC(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)는 정맥내 주입을 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, ADC(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)는 하나 이상의 28일 주기의 각각의 1일째, 8일째 및 15일째에 30분의 기간에 걸쳐 정맥내 주입을 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, ADC(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)의 최대 용량은 하나 이상의 28일 주기의 1, 8, 및 15일 각각에 125 mg의 최대 용량까지 개체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, ADC(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)는 국소 패키지 삽입물(미국의 경우, 예를 들어, [https://astellas\(dot\)us/docs/PADCEV\(underscore\)label\(dot\)pdf](https://astellas(dot)us/docs/PADCEV(underscore)label(dot)pdf) 참조)에 제공된 치료방안에 따라 투여된다. ADC의 작용 메커니즘에 관한 세부사항은 패키지 삽입물에서도 찾을 수 있다.

[0225] 일부 실시형태에서, CD47 및 SIRP α 의 상호작용을 차단하는 제제는 본원의 다른 곳에서 기재된 제제(예를 들어, 임의의 제제)이다. 일부 실시형태에서, CD47과 SIRP α 의 상호작용을 차단하는 제제는 SIRP α D1 도메인 변이체(예를 들어, 본원에 기재된 SIRP α D1 도메인 변이체) 및 Fc 도메인 변이체(예를 들어, 본원에 기재된 Fc 도메인 변이체)를 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)이다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드의 SIRP α D1 도메인 변이체(예를 들어, 본원에 기재된 SIRP α D1 도메인 변이체)의 C-말단은 Fc 도메인 변이체의 N-말단에 융합된다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 서열번호 81 또는 서열번호 85의 아미노산 서열을 포함하는 SIRP α D1 도메인 변이체를 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 (i) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역; (ii) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 A330S, P331S, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG2 Fc 영역; (iii) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 S228P, E233P, F234V, L235A, 및 delG236 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역; 또는 (iv) 넘버링이 Kabat의 EU 지수에 따른 S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역(예를 들어, SIRP α D1 도메인 변이체의 C-말단은 Fc 도메인 변이체의 N-말단에 융합됨)이다. 일부 실시형태에서, 개체에게 투여된 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 서열번호 136 또는 서열번호 135의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)는 이량체, 예를 들어, 동종이량체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 최대 약 60 mg/kg(예를 들어, 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 또는 60 mg/kg 중 어느 하나, 이들 값 사이의 임의의 범위 포함)의 용량으로 개체(예를 들어, 인간 개체)에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 정맥내 주입을 통해 개체에게 투여된다. 일부 실시형태

에서, 폴리펩티드는 약 15 mg/kg의 용량으로 개체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 약 15 mg/kg의 용량으로 q2w(즉, 2주마다 1회 또는 14일마다 1회) 개체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 약 20 mg/kg의 용량으로 개체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 약 20 mg/kg의 용량으로 q2w(즉, 2주마다 1회 또는 14일마다 1회) 개체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 약 30 mg/kg의 용량으로 개체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 약 30 mg/kg의 용량으로 q2w(즉, 2주마다 1회 또는 14일마다 1회) 개체에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 15, 20, 또는 30 mg/kg의 용량으로 q2w(즉, 2주마다 1회 또는 14일마다 1회) 60시간의 기간에 걸쳐 정맥내 주입을 통해 투여된다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 20 mm 테플론 코팅된 고무 격막 마개 및 변조 방지 알루미늄 밀봉재로 밀봉된 1000 mg/50 ml 유형 1 투명 유리 바이알에서 사용(예를 들어, 정맥내 투여)을 위해 공급된다. 일부 실시형태에서, 융합 폴리펩티드는 사용(예를 들어, 정맥내 투여용 제제) 전까지 2 내지 8°C(36 내지 46°F)에서 이의 원래의 용기에 보관된다.

[0226] 일부 실시형태에서, 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드) 및 ADC(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)의 투여가 일치하는 날에, 폴리펩티드는 ADC 전에 투여된다. 일부 실시형태에서, ADC(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)는 폴리펩티드의 투여가 완료된 후 대략 30분(예를 들어, 약 20 내지 약 40분, 25 내지 약 45분, 또는 약 30 내지 50 분)에 투여된다.

[0227] 일부 실시형태에서, 대상체는 국소 말기 요로상피암 또는 전이성 요로상피암에 대한 면역 체크포인트 억제제(CPI)를 사용한 이전 치료를 받았다. 일부 실시형태에서, 대상체는 신보조 환경 또는 보조 환경에서 요로상피암에 대한 CPI를 받았고, CPI 요법 동안 또는 CPI 요법 완료 후 12개월 이내에 재발성 또는 진행성 질환을 가졌다. 일부 실시형태에서, CPI 요법은 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1) 억제제 또는 프로그래밍된 세포 사멸 리간드 1(PD-L1) 억제제를 포함하였거나 이들이었다. 일부 실시형태에서, PD-1 억제제 또는 PD-L1 억제제는 치료적 항체였다. 일부 실시형태에서, 치료적 항-PD-1 항체 또는 치료적 항-PD-L1 항체는 아테졸리주맵, 캄브롤리주맵, 더발루맵, 아벨루맵 및 니볼루맵 중 하나 이상이었거나 이를 포함하였다. 일부 실시형태에서, 대상체는 백금-함유 화학요법을 사용한 요로상피암에 대한 이전 요법을 받았다. 일부 실시형태에서, 대상체는 보조 환경 또는 신보조 환경에서 요로상피암에 대한 백금-함유 화학요법을 받았고, 완료 후 12개월 이내에 재발성 또는 진행성 질환을 가졌다. 일부 실시형태에서, 대상체는 전이성 요로상피암에 대해 또는 절제 불가능한 국소 말기 요로상피암에 대해 백금-함유 화학요법을 받았다. 일부 실시형태에서, 백금-함유 화학요법은 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 네다플라틴, 트리플라틴 테트라나이트레이트, 페난트리플라틴, 피코플라틴 및 사트라플라틴 중 하나 이상이거나 이를 포함하였다.

[0228] 일부 실시형태에서, 대상체는 요로상피암에 대한 가장 최근의 이전 요법을 받는 동안 또는 받은 후에 요로상피암이 진행되었다(예를 들어, 대상체의 요로상피암은 질환 진행을 입증하였다). 일부 실시형태에서, 대상체의 암은 가장 최근의 요법을 받는 동안 또는 받은 후에 재발하였다(예를 들어, 재발을 입증하였다). 일부 실시형태에서 대상체는 엔포르투맵 베도틴을 사용한 이전 치료를 받지 않았다. 일부 실시형태에서, 대상체는 모노메틸아우리스타틴(MMAE)-기반(예를 들어, 베도틴-기반) 항체-약물 접합체(ADC)를 사용한 치료를 받지 않았다. 일부 실시형태에서, 대상체는 hCD47과 hSIRP α 의 상호작용을 방해하는 제제, 예를 들어, 항-CD47 제제 및/또는 항-SIRP α 제제를 사용한 이전 치료를 받지 않았다. 일부 실시형태에서, 대상체는 엔포르투맵 베도틴 또는 엔포르투맵 베도틴의 약물 제형(히스티딘, 트레할로스 이수화물, 및 폴리소르베이트 20 포함)에 포함된 임의의 부형체에 과민성을 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 대상체는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 생성된 생물약제에 과민하지 않는다. 일부 실시형태에서, 대상체는 항체 또는 주입된 치료적 단백질에 대한 심각한 알레르기 또는 아나필락시스 반응에 내약성이 없거나 이를 갖지 않는다. 일부 실시형태에서, 대상체는 폴리펩티드 제형에 포함된 임의의 물질에 대한 심각한 알레르기 또는 아나필락시스 반응에 내약성이 없거나 이를 갖지 않는다.

[0229] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 방법에 의해 치료되는 암은 요로상피암, 두경부암, 위암, 비소세포 폐암(NSCLC), HER2를 과발현(또는 발현)하지 않는 호르몬 수용체 양성 유방암, 예를 들어, HR⁺ HER2⁻ 유방암이다.

[0230] 키트 및 제조 물품

[0231] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 및 Fc 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드(예를 들어, 본원에 기재된 융합 폴리펩티드)를 포함하는 제조 물품 또는 키트가 제공된다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 개체(예를 들어, 인간 개체)의 요로상피암의 치료를 위한 항체-약물 접합체(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)와 조합되어 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 개체(예를 들어, 인간 개체)의 요로상피암의 치료를 위한 항체-약물 접합체(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)와 조합되어 사용하기 위한 것이다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체는 서열번호 81 및 서열번호 85로 이루어진

군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 하기이다: (i) L234A, L235A, G237A, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 영역, 여기서 넘버링은 Kabat의 EU 지수에 따른 것임; (ii) A330S, P331S, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG2 Fc 영역, 여기서 넘버링은 Kabat의 EU 지수에 따른 것임; (iii) S228P, E233P, F234V, L235A, 및 delG236 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역, 여기서 넘버링은 Kabat의 EU 지수에 따른 것임; 또는 (iv) S228P, E233P, F234V, L235A, delG236, 및 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG4 Fc 영역, 여기서 넘버링은 Kabat의 EU 지수에 따른 것임. 일부 실시형태에서, Fc 도메인 변이체는 서열번호 91의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드는 서열번호 135 또는 서열번호 136의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, SIRP α D1 도메인 변이체 및 Fc 도메인 변이체를 포함하는 폴리펩티드는 동종이량체를 형성한다. 일부 실시형태에서, 키트 또는 제조 물품은 본원에 제공된 치료 방법에 따라 사용하기 위한 것이다.

[0232] 일부 실시형태에서, 키트 또는 제조 물품은 항체-약물 접합체(ADC)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, ADC는 항-넥틴-4 항체(예를 들어, 엔포르투맵)를 포함한다. 일부 실시형태에서, ADC는 세포독성 약물에 연결된 넥틴-4(예를 들어, 인간 넥틴-4)를 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포독성 약물은 베도티노이드로 공지된 소분자 미세관 교란제인 모노메틸 아우리스타틴-E(MMAE)이다. 일부 실시형태에서, ADC는 엔포르투맵 베도틴이다. 일부 실시형태에서, 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드) 및 ADC는 동일한 용기 또는 별도의 용기에 제공된다. 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 백 및 주사기를 포함한다. 용기는 유리, 플라스틱(예를 들어 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리올레핀), 또는 금속 합금(예를 들어 스테인리스강 또는 하스텔로이)과 같은 다양한 재료로부터 형성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 용기는 제제를 보유하고, 상기 용기 상의 또는 용기와 결합된 라벨은 사용상의 주의사항을 나타낼 수 있다.

[0233] 제조 물품 또는 키트는 다른 완충액, 희석제, 충전제, 바늘, 주사기 및 사용 설명서를 갖는 패키지 삽입물을 포함하는, 상업적 그리고 사용자 관점에서 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 개체(예를 들어, 인간 개체)의 암(예를 들어, 요로상피암, 예를 들어 본원의 다른 곳에 추가적인 세부사항에 기재된 요로상피암)을 치료하거나 이의 진행을 지연시키기 위해 항체-약물 접합체(예를 들어, 엔포르투맵 베도틴)와 조합하여 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)를 사용하기 위한 설명서를 갖는 패키지 삽입물 또는 표지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 패키지 삽입물 또는 표지는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)를 이를 필요로 하는 개체에게 최대 60 mg/kg의 용량으로 투여하기 위한 설명서를 제공한다. 일부 실시형태에서, 패키지 삽입물 또는 표지는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)를 20 mg/kg의 용량으로 2주마다 1회(q2w), 또는 14일마다 1회 개체에게 투여하기 위한 설명서를 제공한다. 일부 실시형태에서, 패키지 삽입물 또는 표지는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)를 30 mg/kg의 용량으로 2주마다 1회(q2w), 또는 14일마다 1회 이를 필요로 하는 개체에게 투여하기 위한 설명서를 제공한다. 일부 실시형태에서, 패키지 삽입물 또는 표지는 폴리펩티드(예를 들어, 융합 폴리펩티드)를 15 mg/kg의 용량으로 2주마다 1회(q2w), 또는 14일마다 1회 이를 필요로 하는 개체에게 투여하기 위한 설명서를 제공한다.

[0234] 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 백 및 주사기를 포함한다. 용기는 유리, 플라스틱(예를 들어 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리올레핀), 또는 금속 합금(예를 들어 스테인리스강 또는 하스텔로이)과 같은 다양한 재료로부터 형성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 용기는 제제를 보유하고, 상기 용기 상의 또는 용기와 결합된 라벨은 사용상의 주의사항을 나타낼 수 있다. 제조 물품 또는 키트는 다른 완충액, 희석제, 충전제, 바늘, 주사기 및 사용 설명서를 갖는 패키지 삽입물을 포함하는, 상업적 그리고 사용자 관점에서 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제조 물품은 하나 이상의 또 다른 제제(예를 들어, 화학요법제, 항-종양제, 치료적 항체 등)를 추가로 포함한다. 하나 이상의 제제에 적합한 용기는, 예를 들어, 병, 바이알, 백 및 주사기를 포함한다.

[0235] 명세서에는 본 분야의 통상적인 지식을 가진 자가 발명을 수행할 수 있기에 충분한 것으로 고려된다. 본원에 나타내고 기재된 것 외에 발명의 다양한 변형은 전술한 기재로부터 본 분야의 통상적인 지식을 가진 자에게 분명하게 되고 첨부된 청구범위 내에 속한다. 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 전체적으로 참조로 본원에 인용된다.

[0236] 실시예

[0237] 본 개시는 하기 실시예를 참조하여 보다 완전하게 이해될 것이다. 그러나, 실시예는 본 개시의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본원에 기재된 실시예 및 실시형태는 단지 예시적 목적을 위한 것이고, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변경이 본 분야의 통상적인 지식을 가진 자에게 제안될 것이며, 이는 본 출원의 사상 및

영역 및 첨부된 청구범위의 범위 내에 포함되는 것으로 이해된다.

[0238] 실시예 1: 약물 B 및 약물 C에 대한 인간 Fc γ 수용체의 결합 평가

[0239] 개요

[0240] IgG 항체는 항체-의존성 세포 식균작용(ADCP) 또는 항체-의존성 세포 세포독성(ADCC)을 유도함으로써 효과기 세포(예를 들어, 대식세포) 상의 Fc 감마 수용체(Fc γ R)의 참여를 통해 표적 종양 세포의 식균작용을 매개한다. 대부분의 효과기 세포는 다중 Fc γ R을 발현한다. 항체 IgG1 부류에 대한 Fc 감마 수용체는 Fc γ RI/CD64, Fc γ RII/CD32, 및 Fc γ RIII/CD16이다. Fc γ RI/CD64는 고친화도 수용체인 반면, Fc γ RII 및 Fc γ RIII는 저친화도 수용체이다. 인간에서, Fc γ RIIA는 H/R131 단일 뉴클레오티드 다형성을 갖고, 잘 특징화된 Fc γ RIII 단일 뉴클레오티드 다형성은 V/F158이다. IgG Fc 도메인은 다양한 친화도로 다수의 Fc γ R에 결합하고, 심지어 높은 결합력 면역 복합체에 참여하는 낮은 친화도 상호작용은 표적 세포 제거에 기여한다(Armour 등(2003) *Mol. Immunol.* 40:585-593; Nagelkerke 등(2019) *Front Immunol.* 10:2237; Kang 등(2019) *Front Immunol.* doi(dot)org/10(dot)3389/fimmu(dot)2019(dot)00562). 인간 IgG1 동형은 25° C, pH 5.8에서 760 +/- 60nM의 공개 K_D로 인간 FcRn을 결합한다(Abdiche 등(2015) *MAbs.* 7(2):331-43).

[0241] 항체-약물 접합체(ADC) 엔포르투맵 베도틴은 쇠간 시스테인에 접합된 mc-vc-PAB-MMAE 링커 페이로드를 포함한다. 이러한 접합은 Fc 수용체에 대한 엔포르투맵의 Fc 영역의 결합을 제한하고 항체-의존성 세포 식균작용(ADCP)을 매개하는 ADC의 능력에 영향을 미칠 수 있다. (예를 들어, 인간 Fc-감마 수용체(Fc γ R)와 신생아 Fc 수용체(FcRn)의 결합을 통해) 링커 페이로드의 접합이 엔포르투맵의 Fc 영역이 효과기 기능을 유지하는 능력에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위해, 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 통해 약물 B(즉, 엔포르투맵 유사체) 및 약물 C(즉, 엔포르투맵 베도틴 유사체)에 대한 hFc γ Ia, hFc γ IIa-H131, hFc γ IIa-R131, hFc γ IIa, Fc γ IIaV158F, 및 hFcRn의 친화도를 평가하였다.

[0242] 재료 및 방법

[0243] 약물 B 단클론 항체 유전자 합성, 항체 발현 및 정제

[0244] 약물 B(즉, 인간 넥틴-4에 특이적으로 결합하는 엔포르투맵 유사 항체)의 아미노산 서열은 공개적으로 이용가능한 엔포르투맵 아미노산 서열에 기초하였다(KEGG database entry D1154; CAS: 1448664-46-7; PubChem database entry 384585500 참조). 약물 B의 항체 중쇄 및 항체 경쇄 서열(하기 참조)은 유전자 합성에 의해 생성되었고 포유동물 세포(ATUM)에서의 발현을 위해 코돈 최적화되었다. 중쇄 및 경쇄 유전자를 별도의 포유동물 발현 벡터로 클로닝하고, Expi293F 세포(ThermoFisher)로 일시적으로 공동 형질감염시켰다. 항체 발현을 Expi293 발현 배지에서 수행하고, 세포 배양 상청액을 형질감염 5일 후에 수거하였다. 약물 B를 MABSELECT Prisma Resin(Cytiva)을 사용하여 정제하고 완충액을 1x 인산염 완충 염수 pH 7.4로 교환하였다. 분석적 크기-배제 크로마토그래피(Cytiva, Superdex 200 10/300) 데이터는 약물 B가 ~99% 단량체임을 나타내었다.

[0245] 약물 B 경쇄 및 약물 B 중쇄의 아미노산 서열이 하기에 제공된다. 경쇄 가변 도메인 및 중쇄 가변 도메인은 밑줄로 표시한다.

[0246] 약물 B 경쇄:

[0247] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISSLPQEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSTLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열번호 225)

[0248] 약물 B 중쇄:

[0249] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWRQAPGKLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLSLQMNSLRDEDTAVYYCARYYYGMDVWGQGTITVTSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열번호 226)

[0250] 인간 넥틴-4 세포외 도메인(ECD) 및 시노물구스 넥틴-4 ECD의 아미노산 서열은 하기에 제공된다. His6(HHHHHH 서열번호 223)을 인간 및 시노물구스 넥틴-4 ECD(하기 볼드체 유형으로 나타냄)의 C-말단 도메인에 융합시킨다.

- [0251] 인간 넥틴-4-ECD
- [0252] GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVQVAWARVDAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFP
AGSFQARLRLRVLVPPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQR
ITHILHVSFLAEASVRGLEDQNLWHIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDLDPQE
DSGKQVDLVSASHHHHHH (서열번호 227)
- [0253] 시노 넥틴-4-ECD
- [0254] GELETSDVVTVVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVQVAWARADAGEGAQELALLHSKYGLHVSPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFP
AGSFQARLRLRVLVPPLPSLNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDTEVKGTTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQR
ITHILHVSFLAEASVRGLEDQNLWHVGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVDLDPQE
DSGKQVDLVSASHHHHHH (서열번호 228)
- [0255] 넥틴-4에 대한 약물 B의 친화도 결정
- [0256] S-형 센서 칩이 장착된 Biacore 8K 고처리량, 고민감도 SPR 시스템(Cytiva, Global Life Sciences Solutions USA LLC, Marlborough, MA)을 사용하여 25℃ 및 37℃에서 모든 실험을 수행하였다. Biacore Insight Evaluation Software 버전 3.0.12.15655를 사용하여 모든 동역학 데이터 분석을 수행하였다.
- [0257] 러닝 완충액은 10 mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% (v/v) 계면활성제 P20 (HBS-EP+)였다. A280 흡광도에 의해 결정된 바와 같은 이의 공칭 농도에서 그리고 이의 물 계산된 흡광 계수를 사용하여 모든 분석물 (인간 및 시노몰구스 원숭이 넥틴-4-ECD)을 사용하였다. 사용된 동역학 주사 방법은 "단일 주기 동역학" (또한 "동역학 적정"으로 공지됨)이었다(Karlsson 등 (2006) *Analytical Biochemistry*. 349(1):136-147).
- [0258] 약물 B, 즉 항-넥틴-4 단클론 항체와 인간 넥틴-4의 세포외 도메인(ECD)의 상호작용을 비아코어 시리즈 S 센서 칩 단백질 A 상에서 포획된 약물 B(200-400 RU) 위로 넥틴-4-ECD를 유동시킴으로써 분석하였다. 10 mL/분 유속으로 60초(s) 접촉 시간 동안 각 채널의 유동 셀 2에서 ~1 mg/mL 농도의 약물 B를 포획하였고, 완충액을 유동 셀 1에 각각 사용하였다. 인간 넥틴-4-ECD 분석물을 300 nM의 상부 공칭 농도를 갖는 5-원 3배 희석 시리즈로 제조하고, 단일-주기 동역학 방법을 사용하여 농도가 증가하는 순서로 각 분석물 시리즈를 주입하였다. 결합 및 해리 시간을 30 mL/분 유속으로 각각 120초와 1800초 동안 모니터링하였다. 30 mL/분 유속으로 15초씩 2회 펄스 사용하여 pH 1.6의 75mM 인산으로 표면을 재생하였다.
- [0259] 데이터를 분석하기 위해, 하기 처리 단계를 적용하였다. 유동 셀 1(참조 표면)의 참조 반응을 유동 셀 2(반응 표면)의 활성 반응에서 차감하여 차감된 데이터(2-1)를 얻었다. 그런 다음 가장 가까운(즉시) 완충액 블랭크 주입의 반응을 참조 차감된 데이터(2-1)에서 차감하여 이중-참조 데이터를 획득하였다.(Myszka, D.G. (1999). *J. Mol. Recognit.* 12, 279-284). 이러한 이중-참조 데이터는 겔보기 결합(k_a) 및 해리(k_d) 속도 상수를 결정하기 위해 질량 수송을 갖는 간단한 1:1 랭뮤어 결합 모델에 전체로 피팅하였다. 그런 다음 겔보기 평형 해리 또는 "친화도" 상수(K_D)를 $K_D = k_d/k_a$ 로 비율에서 추론하였다. 약물 B는 37℃에서 대략 36.3 ± 3.3 nM, 및 25℃에서 대략 14.5 ± 0.7 nM의 K_D 로 인간 넥틴-4-ECD를 결합하였다. 약물 B는 37℃에서 대략 50.7 ± 1.6 nM, 및 25℃에서 대략 22.6 ± 1.7 nM의 K_D 로 시노몰구스 넥틴-4-ECD를 결합하였다. 결과에 따르면 엔포르투맵과 약물 B는 인간 넥틴-4-ECD와 유사한 겔보기 친화도 결합(SPR은 엔포르투맵 베도틴의 경우 25℃에서 $K_D \sim 16$ nM (Satpayev D, Morrison RK, Morrison KJM, Gudas J, Jakobovits A, Torgov M, An Z. 2018. Antibody drug conjugates (ADC) that bind to 191P4D12 proteins. US9962454B2), 약물 B의 경우 $K_D \sim 14.5$ nM을 결정하였다)을 갖는다는 것을 시사한다.
- [0260] 약물 C의 생성
- [0261] 엔포르투맵 베도틴(CAS 번호 1346452-25-2)과 유사한 항체 약물 접합체인 약물 C를 생성하기 위해, 엔포르투맵 유사 항체인 약물 B를 항체의 쇠간 시스테인을 통해 말레이미도카프로일-발릴-시트룰리닐-p-아미노벤질옥시카르보닐-모노메틸 아우리스타틴 E 링커-페이로드(MC-Val-Cit-PAB-MMAE, CAS 646502-53-6; BroadPharm에서 입수)에 접합시켰다. 간략히 설명하자면, 20℃에서 20분 동안 단클론 항체에 대해 20 몰 당량의 TCEP(ThermoFisher)를 첨가함으로써, 1 x PBS pH 7.4, 10% 수크로스, 5 mM EDTA, 30 mM Tris-HCL pH 7.5의 약물 B 단클론 항체 2.2 mg/ml를 부분적으로 감소시켰다. MC-Val-Cit-PAB-MMAE를 100% DMSO에 용해시키고 5% v/v DMSO 용액으로 단클론 항체에 대해 10몰 당량으로 반응 혼합물에 첨가하고 반응 용액을 20℃에서 2시간 동안 장동하였다. 그 후, N-아

세틸시스테인(SigmaAldrich)을 링커-페이로드 및 반응 혼합물에 대해 1몰 당량으로 첨가하고 20℃에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 과량의 켄칭된 MC-Val-Cit-PAB-MMAE를 항체-약물 접합체로부터 양이온-교환 크로마토그래피(Cytiva, HiTrap SP HP 수지)에 의해 분리시켰고, 약물 C 항체-약물 접합체를 10% 수크로스, 150 mM NaCl, 12.5 mM Na-아세테이트 pH 5.0 완충액에서 용리시켰다. 분석적 크기-배제 크로마토그래피(Cytiva, Superdex 200 10/300)는 약물 C가 ~99% 단량체임을 나타내었다.

[0262] 약물 C의 약물-대-항체 비(DAR)의 결정

[0263] 엔포르투맵 베도틴(CAS 번호 1346452-25-2)은 대략 3.8:1의 평균 약물-대-항체 비(DAR)를 갖는다(PADCEV®, US package insert, 2019 참조). CRO Novatia, LLC(미국)에서 액체 크로마토그래피 질량 분석계(LC-MS)를 사용하여 약물 C, 즉, 엔포르투맵 베도틴 ADC 유사체에 대한 DAR을 결정하였다. 간략히 설명하자면, PNGase F 처리(New England Biolabs Rapid PNGase F)를 사용하여 약물 C의 샘플을 탈글리코실화 및 환원시킨 다음, 질량 분석계에 커플링된 역상 액체 크로마토그래피(RPLC-MS)로 분석하였다. HPLC는 할로 디페닐 컬럼 2.1x50 mm, 2.7 mm와 커플링된 Acquity I-Class UPLC였다. A 상은 물 중 0.05% TFA였고, B 상은 아세트니트릴 중 0.05% 트리플루오로아세트산였다. 구배는 1분 내에 10 내지 20% 용액 B, 9분 내에 20 내지 50% 용액 B, 0.5 mL/분, 80℃였다. 질량 분광계는 Waters Xevo G2-XS Q-ToF이다. Novatia ProMass HR을 통해 MassLynx 소프트웨어를 사용하여 데이터를 처리하였다. 결과는 약물 C의 평균 약물-대-항체 비율이 3.85:1로 엔포르투맵 베도틴의 DAR 값(3.8:1)과 유사함을 나타내었다.

[0264] 약물 B 및 약물 C에 대한 인간 FcγR의 결합

[0265] S형 센서 칩이 장착된 Biacore 8K를 사용하여 25℃에서 모든 SPR 실험을 수행하였으며 Biacore Insight Evaluation 소프트웨어를 사용하여 동역학 데이터 분석을 수행하였다.

[0266] 모든 hFcγR 상호작용에 대해 러닝 완충액은 HBS-EP+(10 mM HEPES, pH7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% (v/v) 계면활성제 P20)였다. A280 흡광도로 결정된 바와 같은 이의 공칭 농도에서 그리고 이의 몰 계산된 흡광계수를 사용하여 모든 hFcγR 분석물을 사용하였다.

[0267] 넥틴-4-코팅된 CM5 칩 상에 포획된 약물 B 또는 약물 C 위에 hFcγR의 세포외 도메인(ECD)을 흘림으로써 인간 FcγR과 약물 B 및 약물 C의 상호작용을 분석하였다. Cytiva 아민 커플링 키트 설명서에 따라 아민 화학을 사용하여 CM5 칩의 유동 셀(1 및 2) 둘 모두 상에 최대 2400 RU의 인간 넥틴-4 ECD를 고정시켰다. HBS-EP+(100-200 RU)에서 2 mg/mL로 10 mL/분으로 120초 동안 각 채널의 유동 셀 2에서 약물 B 및 약물 C를 포획하였다. hFcγRI(CD64)에 대한 3배 연속 희석액을 갖는 30 nM, 또는 hFcγRIIa(CD32a) 또는 hFcγRIIa(CD16a)에 대한 3배 연속 희석액을 갖는 3000 nM의 공칭 최고 농도에서 단일 주기 동역학 모드를 사용하는 포획 방법으로 분석물을 주사하였다. 결합 시간을 120초 동안 모니터링하였고 해리 시간을 600초 동안 모니터링하였다(해리 시간이 1800초인 hFcγRI는 제외). 30 mL/분 유속으로 15초씩 2회 펄스 사용하여 pH 1.6의 75mM 인산으로 표면을 재생하였다.

[0268] Biacore 8K Evaluation 소프트웨어 버전 3.0.12.15655(Cytiva, Global Life Sciences Solutions USA LLC, Marlborough, MA)로 데이터를 처리 및 분석하였다. 유동 셀 1의 참조 반응을 유동 셀 2의 활성 반응에서 차감하여 차감된 데이터(2-1)를 얻었다. 그런 다음 가장 가까운 완충액 블랭크 주입의 반응을 참조 차감된 데이터(2-1)에서 차감하여 이중-참조 데이터를 획득하였다. hFcγRI의 경우, 이러한 이중-참조 데이터는 겔보기 결합 속도 상수(k_a) 및 해리 속도 상수(k_d)를 결정하기 위해 질량 수송을 갖는 간단한 1:1 랭뮤어 결합 모델에 피팅하였다. 겔보기 평형 해리 상수 또는 친화도 상수를 ($K_D = k_d/k_a$) 비율을 기준으로 계산하였다. 빠른 온 속도 및 빠른 오프 속도로 인해 "정상 상태"(또는 "평형 결합") 방법을 사용하여 모든 다른 hFcγR 상호작용(hFcγIIa-H131, hFcγIIa-R131, hFcγIIIa 및 FcγIIIaV158F)에 대한 결합 친화도 K_D 값을 분석하였다.

[0269] 약물 B 및 약물 C에 대한 인간 FcRn의 결합

[0270] S형 센서 칩이 장착된 Biacore 8K를 사용하여 25℃에서 모든 실험을 수행하였으며 Biacore Insight Evaluation 소프트웨어를 사용하여 동역학 데이터 분석을 수행하였다. 러닝 완충액은 hFcRn 상호작용을 위한 0.01% Tween-20을 갖는 PBS pH 5.8이었고 포획을 위한 러닝 완충액은 HBS-EP+였다. 분석물 hFcRn ECD 단백질을 이의 공칭 농도로 사용하였다. "단일 주기 동역학" 주입 모드를 사용하였다.

[0271] 넥틴-4-코팅된 CM5 칩 상에 포획된 약물 B 또는 약물 C 위에 hFcRn ECD 단백질을 흘림으로써 hFcRn과 약물 B 및 약물 C의 상호작용을 분석하였다. Cytiva 아민 커플링 키트 설명서에 따라 아민 화학을 사용하여 CM5 칩의 유동

셀(1 및 2) 둘 모두 상에 최대 2400 RU의 인간 벡틴-4 ECD를 고정시켰다. 표면 제조법으로 HBS-EP+(100-200 RU)에서 2 mg/mL로 10 mL/분으로 120초 동안 각 채널의 유동 셀 2에서 약물 B 또는 약물 C를 포획하였다. 0.01% Tween-20을 갖는 PBS pH 5.8에서 hFcRn 실험을 수행하였다. hFcRn 분석물을 3000 nM의 상부 공칭 농도를 갖는 5-원 3배 시리즈 희석액으로 제조하고, 단일-주기 동역학 방법을 사용하여 농도가 증가하는 순서로 이러한 샘플을 주입하였다. 결합 및 해리 시간을 각각 120초와 600초 동안 모니터링하였다. 30 mL/분 유속으로 30초씩 2회 펄스 사용하여 pH 7.4의 PBS로 표면을 재생하였다. 중성 pH 완충액은 칩에서 포획된 항체를 유지하면서 hFcRn을 효율적으로 제거하였다.

[0272] Biacore 8K Evaluation 소프트웨어 버전 3.0.12.15655(Cytiva, Global Life Sciences Solutions USA LLC, Marlborough, MA)로 데이터를 처리 및 분석하였다. 유동 셀 1의 참조 반응을 유동 셀 2의 활성 반응에서 차감하여 차감된 데이터(2-1)를 얻었다. 그런 다음 가장 가까운 완충액 블랭크 주입의 반응을 참조 차감된 데이터(2-1)에서 차감하여 이중-참조 데이터를 획득하였다. 빠른 온 속도 및 빠른 오프 속도로 인해 "정상 상태"(또는 "평형 결합") 방법을 사용하여 결합 친화도 K_D 값을 분석하였다.

[0273] **결과**

[0274] 약물 B 및 약물 C에 대한 인간 Fc γ R의 결합

[0275] 약물 C(즉, 엔포르투맵 베도틴 유사체) 및 약물 B(즉, 접합된 엔포르투맵 유사체)는 유사한 k_a , k_d 및 hFc γ R에 결합하는 걸보기 친화도 K_D 를 갖는 것으로 밝혀졌다. 하기 표 A를 참조한다.

[0276] 약물 B 및 약물 C에 대한 인간 FcRn의 결합

[0277] 약물 C(즉, 엔포르투맵 베도틴 유사체) 및 약물 B(즉, 접합된 엔포르투맵 유사체)는 유사한 k_a , k_d 및 hFcR에 결합하는 걸보기 친화도 K_D 를 갖는 것으로 밝혀졌다. 하기 표 A를 참조한다.

표 A. 약물 B 및 약물 C에 대한 Fc γ R 및 FcRn의 친화도(K_D)

Fc 수용체	약물 B (엔포르투맵 ↓ 유사 Ab)	약물 C (엔포르투맵 베도틴 유사 ADC)
hFc γ Ia	56 pM	91 pM
hFc γ IIa-H131	772 nM	921 nM
hFc γ IIa-R131	783 nM	846 nM
hFc γ IIIa	316 nM	429 nM
Fc γ IIIaV158F	983 nM	1205 nM
hFcRn	767 nM	812 nM

[0278]

[0279] **결론**

[0280] 인간 hFc γ R 및 hFcRn에 결합하는 약물 B(엔포르투맵 유사 mAb) 및 약물 C(엔포르투맵 베도틴 유사 ADC)를 비교하는 SPR 동역학 결과는 약물 B(즉, 엔포르투맵 유사체) 및 약물 C(즉, 엔포르투맵 베도틴 유사체)가 유사한 친화도로 인간 hFc γ R 및 hFcRn에 결합한다는 것을 나타낸다. 따라서, 평균 약물 대 항체 비가 3.85:1인 엔포르투맵 베도틴의 쇄간 시스템에 접합된 링커-페이로드 mc-vc-PAB-MMAE의 존재는 인간 Fc γ R 및 인간 FcRn 수용체를 결합하는 약물 C의 능력에 영향을 미치는 것으로 보이지 않는다.

[0281] **실시예 2: 항체-의존성 세포 식균작용(ADCP)에 대한 약물 B 또는 약물 C와 조합한 약물 A의 효과 평가**

[0282] **개요**

[0283] 엔포르투맵 베도틴-ejfv는 프로테아제-절단 가능한 말레이미도카프로일 발린-시트룰린 링커(본원에서 mc-vc-

PAB-MMAE로 지칭됨)를 통해 소분자 미세소관 교란제인 모노메틸 아우리스타틴 E에 접합된 완전 인간 항-넥틴-4 IgG1 카파 단클론 항체로 구성된 넥틴-4 유도 항체-약물 접합체(ADC)이다. 엔포르투맵 베도틴 링커-페이로드는 항체의 쇠간 디설피드 결합을 포함하는 쇠간 시스테인 잔기에 접합되어 대략 3.8:1의 약물-대-항체 비를 갖는 생성물을 수득한다(PADCEV®, US 패키지 삽입물 참조). 인간 IgG1 항체 구조에서, 중쇄-중쇄 쇠간 시스테인은 힌지 영역에 위치하고, 중쇄-경쇄 쇠간 시스테인은 인간 IgG1 항체 중쇄 도메인 CH1과 인간 IgG1 경쇄 카파 불변 도메인(CK)의 계면에 위치한다. 따라서, 엔포르투맵 베도틴에서 쇠간 시스테인에 대한 링커-페이로드 mc-vc-PAB-MMAE의 접합은 FcγR 및 FcRn 수용체에 대한 Fc 영역의 결합에 입체 장애를 제거할 수 있다.

[0284] 이 실험의 목적은 약물 C의 Fc 및 Fc 근위 영역 내의 링커 페이로드의 존재가 ADC를 매개하는 Fc 효과기 기능에 영향을 미치는지 여부를 평가하는 것이었다. 따라서, 항체-의존성 세포 식균작용(ADCP)에 대한 약물 B(즉, 엔포르투맵 유사체) 및 약물 C(즉, 엔포르투맵 베도틴 유사체)와 조합하는 약물 A의 효과를 상이한 수준으로 인간 넥틴-4를 발현하는 3개의 인간 암 세포주에서 평가하였다. 약물 A는 인간 CD47에 대한 높은 친화도를 갖고 Fc 효과기 기능이 결여된 예시적인 SIRPα 변이체-Fc 변이체 융합 폴리펩티드이다.

[0285] **재료 및 방법**

[0286] 세포주

[0287] OE19(Sigma 96071721-1VL) 및 T47D(ATCC HTB-133) 세포를 10% FBS(Thermo Fisher Scientific 26140079), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Thermo Fisher Scientific 15140163), 및 1% GlutaMAX(Thermo Fisher Scientific 35050061)로 보충된 RPMI-1640(Thermo Fisher Scientific 11875119)으로 구성된 성장 배지에서 유지하였다. OE19는 인간 식도선암종 세포주이다. T47D는 인간 유방암(침윤성 유관 암종) 세포주이다. OE19 및 T47D에 대한 넥틴-4 발현 수준에 대한 정보는 **표 B**에 제공된다.

[0288] HT-1376(ATCC CRL-1472) 세포를 10% FBS(Millipore TMS-013-B), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Thermo Fisher Scientific 15140163), 및 1% GlutaMAX(Thermo Fisher Scientific 35050061)로 보충된 DMEM(Thermo Fisher Scientific 11965092)으로 구성된 성장 배지에서 유지하였다. HT-1376은 인간 방광 암종 세포주이다. HT-1376에 대한 넥틴-4 발현 수준에 대한 정보는 **표 B**에 제공된다.

[0289] 수용체 정량

[0290] 세포주를 TryPLE select(Thermo Fisher Scientific 12563029)로 수확하고, 계수하고, 2×10^5 세포를 U-바닥 96 웰 플레이트(Falcon 353227)에 접종하였다. 원심분리 후, 세포를 0.5% BSA를 갖는 PBS로 구성된 빙냉 FACS 완충액으로 세척하였다(Thermo Fisher Scientific 15260-037). 10 μg/mL의 넥틴-4-AF647 접합 항체(클론 337516, R&D Systems FAB2659R)를 4°C에서 세포와 함께 인큐베이션하였다. 1시간의 인큐베이션 후, 세포 현탁액을 빙냉 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 400 X g에서 5분 동안 회전시켰다. 샘플을 100 μL FACS 완충액에 재현탁시키고, 세포를 Attune NxT 세포측정기(Thermo Fisher Scientific)에서 분석하였다. 유효 형광단 대 단백질 비(F/P)는 SIMPLE CELLULAR® 항-인간 IgG 비드(Bangs Laboratories 816A)의 사용에 의해 결정되었다. SIMPLE CELLULAR® 항-인간 IgG 비드 한 방울을 100 μL의 10 μg/mL 넥틴-4-AF647 용액에 첨가하였다. 혼합물을 암실에서 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 2 mL 빙냉 FACS 완충액으로 2회 세척하고, 400 X g 하에 5분 동안 원심분리하였다. 500 μL의 FACS 완충액을 샘플에 첨가한 후, 세포와 동일한 날에 Attune NxT 세포측정기 상에서 분석하였다. 총 10000건의 이벤트를 FlowJo(BD)로 기록 및 분석하였다.

[0291] 인간 단핵구-유래 대식세포의 유래 및 배양

[0292] 인간 백혈구 제거 전혈(Vitalant Blood Center)을 PBS(Thermo Scientific 10010072)로 1:3으로 희석하였다. 희석된 혈액을 10 mL Ficoll-Paque Premium(Cytiva 17-5442-02)으로 언더레이딩하였다. 튜브를 400 x g에서 30분 동안 원심분리하였다. PBMC를 인터페이스에서 수집하고 40mL PBS를 첨가하여 2회 세척하고 400 xg 하에서 10분 동안 원심분리한 다음, 자기-활성화 세포 분류(MACS) 완충액(0.5% BSA(Thermo Fisher Scientific 15260-037)를 갖는 PBS, 2mM EDTA(Teknova E0307-06))에 재현탁시켰다. 제조업체의 프로토콜에 따라 단핵구 분리 키트 II(Miltenyi Biotec 130-091-153) 및 LS 컬럼(Miltenyi Biotec 130-042-401)을 사용하여 음성 선택으로 CD14⁺ 단핵구를 정제하였다. CD14⁺ 단핵구를 10% FBS(Thermo Fisher Scientific 26140079), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Thermo Fisher Scientific 15140163), 및 1% GlutaMAX(Thermo Fisher Scientific 35050061) 및 50 ng/mL의 M-CSF(Miltenyi 130-096-492)로 보충된 RPMI-1640으로 구성된 25 mL의 배지에 접시당 천만개 세포로 150 mm의 조직 배양 접시(Falcon 353025)에 접종하였다. 세포를 7일 동안 배양하였다.

[0293] 시험관내 식균작용 검증

[0294] 10mL PBS로 1회 세척하고 37℃에서 10분 동안 5mL TrypLE Select에서 인큐베이션함으로써 HT-1376, T47-D 및 OE19 세포를 배양 플레이트에서 분리시켰다. 세포를 PBS로 2회 세척하고, PBS에 재현탁시켰다. HT-1376, T-47D 및 OE19 세포를 제조업체의 지침에 따라 150 nM CFSE를 갖는 현탁액에 셀트레이스 CFSE 세포 증식 키트(Thermo Fisher Scientific C34554)로 표지하고 RPMI-1640에 재현탁시켰다. 10mL PBS로 1회 세척하고 37℃에서 20분 동안 5mL TrypLE Select에서 인큐베이션함으로써 대식세포를 배양 플레이트에서 분리시켰다. 세포를 세포 스크래퍼(Corning 3008)로 제거하고, PBS로 세척하고, RPMI-1640에 재현탁시켰다.

[0295] CFSE로 표지된 T47-D 및 OE19 표적 세포를 웰당 100000개의 세포로 초저부착 U-바닥 96 웰 플레이트에 첨가하였다. 약물 B 또는 약물 C를 40 ng/mL 또는 8 ng/mL의 농도로 첨가하고, 약물 A를 6.25 nM, 0.40 nM 또는 90 pM의 농도로 첨가하였다. EC₅₀을 결정하기 위해, CFSE로 표지된 HT-1376 및 OE19 표적 세포를 웰당 100000개의 세포로 초저부착 U-바닥 96 웰 플레이트(Corning 7007)에 첨가하였다. 약물 B 또는 약물 C를 200 ng/ml의 농도로 첨가하였다. 다음으로, 100 nM 내지 0.1 pM의 약물 A의 10배 연속 희석액을 첨가하였다. 50000개의 대식세포를 첨가하기 전에 표적 세포, 약물 A 및 약물 B 또는 약물 C를 갖는 플레이트를 5% 이산화탄소를 갖는 가습 인큐베이터에서 37℃에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 20분 후, 배양된 대식세포를 첨가하고 플레이트를 5% 이산화탄소를 갖는 가습 인큐베이터에서 37℃에서 추가로 2시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 400 g 하에서 5분 동안 원심분리하여 펠렛화하고 PBS 중 1:5000으로 희석된 100 μL 고정가능한 생존성 염료 eFluor 780(ebioscience 65-0865-14)에서 4℃에서 30분 동안 염색하였다. 세포를 200 μL FACS 완충액(PBS + 2% FBS)으로 세척하고, 2 μL 인간 FcR 차단 시약(Miltenyi Biotec 130-059-901), 0.5 μL BV421 항-CD163(Clone GHI/61, Biolegend 333612), 0.5 μL PE-시아닌7 CD11b(clone ICRF44, Thermo Scientific 25-0118-42), 및 0.5 μL PE CD326(Clone 9C4, Biolegend 324206)을 포함하는 50 μL FACS 완충액에서 60분 동안 얼음 상에서 염색하였다. 세포를 250 μL FACS 완충액으로 2회 세척하고 100 μL 0.5% 파라포름알데히드(Electron Microscopy Sciences 15710) PBS 용액에서 밤새 4℃에서 고정시켰다. 세포를 FACS Canto II(BD Biosciences) 상에서 분석한 이후, Flowjo 10.8(BD)에 의해 데이터를 분석하였다. 죽은 세포는 e780-음성 집단에 대한 게이팅을 통해 배제하였다. 대식세포를 계통 마커 CD11b 및 CD163에 대해 세포 양성인 것으로 식별하였다. 이러한 집단 중, 종양 세포를 식균한 대식세포를 CFSE에 대해 세포 양성인 것으로 식별하였다. 식균되지 않은 CFSE-표지된 종양 세포를 분석에서 배제하기 위해 상피 세포 마커 CD326에 양성인 세포는 포함되지 않았다. 표적 세포 마커(CD326⁻)에 대해 음성이고 CFSE에 대해 양성인 생존 CD11b⁺ CD163⁺ 인간 단핵구-유래 대식세포의 백분율로 식균작용 백분율을 계산하였다.

[0296] 데이터를 플롯팅하고, 최대 식균작용 값을 확인하고, 프리즘 9 소프트웨어(Graphpad)로 EC₅₀ 값을 계산하였다. 식균작용의 평균 수준 및 평균 EC₅₀ 값을 엑셀(마이크로소프트)로 계산하였다. 오차 막대는 평균값의 표준 편차를 나타낸다.

[0297] **결과**

[0298] **표 B**는 시험된 세포주에 대한 넥틴-4 수용체 수의 요약을 제공한다. 표 B에서 시험된 세포주의 세포 표면 상에 발현된 넥틴-4 수용체의 수(예를 들어, 평균 수)는 높은 110312개에서 낮은 43784개까지의 범위였다.

표 B: 인간 종양 세포주의 넥틴-4 수용체 수

세포주	넥틴-4 수용체
HT-1376	110312
T47D	86139
OE19	43784

[0299] .

[0300] **표 C**는 인간 공여체로부터 얻은 단핵구에서 유래된 대식세포에 의한 TROP2-발현 세포주의 식균작용에 대한 약물 B, 약물 C, 약물 A + 약물 B, 및 약물 A + 약물 C의 효과의 요약을 제공한다.

표 C. TROP2-발현 인간 세포주의 ADCP에 대한 약물 B, 약물 C, 약물 A +

약물 B, 및 약물 A+ 약물 C의 ADCP 활성의 요약

세포주 ^a	약물 B ADCP ^a	약물 C ADCP ^a	약물 A + 약물 B ADCP ^b	약물 A + 약물 C ADCP ^b	약물 A + 약물 B EC50, pM ^c	약물 A + 약물 C EC50, pM ^c
HT-1376 ^a	1.84 ^a	1.55 ^a	2.73 ^a	2.15 ^a	25.01 ^a	0.50 ^a
T47D ^a	1.43 ^a	1.19 ^a	1.68 ^a	1.62 ^a	nd ^a	nd ^a
T47D ^a	1.37 ^a	1.14 ^a	1.75 ^a	1.39 ^a	nd ^a	nd ^a
OE19 ^a	1.05 ^a	1.13 ^a	2.39 ^a	2.11 ^a	nd ^a	nd ^a
OE19 ^a	1.34 ^a	1.51 ^a	3.23 ^a	3.84 ^a	nd ^a	nd ^a
OE19 ^a	1.43 ^a	1.40 ^a	2.73 ^a	3.02 ^a	24.06 ^a	11.88 ^a
평균값 ^a	1.41 ^a	1.32 ^a	2.42 ^a	2.36 ^a	24.54 ^a	6.19 ^a
표준 편차 ^a	0.23 ^a	0.17 ^a	0.55 ^a	0.84 ^a	0.33 ^a	4.02 ^a

[0301]

[0302]

^a 약물 B 또는 약물 C에 반응하여 표적 세포를 식균한 대식세포의 백분율은 배지 단독으로 처리된 표적 세포를 식균한 대식세포의 백분율로 정규화되었다.

[0303]

^b 약물 A + 약물 B 또는 약물 C에 반응하여 표적 세포를 식균한 대식세포의 최대 백분율은 배지 단독으로 처리된 표적 세포를 식균한 대식세포의 백분율로 정규화되었다.

[0304]

^c 약물 A + 약물 B 또는 약물 C를 투여받은 세포의 EC₅₀ 값을 계산하였다.

[0305]

nd: 미결정

[0306]

비교: 각 행은 상이한 공여체의 데이터를 나타낸다.

[0307]

약물 A가 없는 경우, 약물 B와 약물 C는 각각 ADCP를 배지 단독에 비해 평균 1.37배 자극하였다. 약물 A와 약물 B 또는 약물 C의 조합은 모든 세포주의 ADCP를 배지 단독에 비해 평균 2.39배 증강시켰다. 약물 A는 OE19 및 HT-1376에서 약물 B 및 약물 C의 ADCP를 각각 24.54 pM 및 6.19 pM의 전체 평균 EC₅₀으로 증강시켰다.

[0308]

2개의 상이한 공여체와 함께 T-47D 및 OE19를 사용하여 약물 B와 약물 C의 시험관내 식균작용을 개선한 약물 A에 대한 결과는 도 1a 및 도 1b에 나타낸다. 도 1a는 제1 공여체로부터 얻은 인간 단핵구-유래 대식세포에 의한 OE19 및 T47D 세포의 약물 B- 또는 약물 C-유도 식균작용에 대한 약물 A 증강을 나타낸다. CFSE-표지된 OE19 세포 또는 T47D 세포를 식균하는 생존 가능한 대식세포의 백분율로 정의되는 식균작용 백분율은 y-축 상에 표시된다. 단일 제제 또는 조합 매개변수는 x-축 상에 표시된다. 도 1b는 제2 공여체로부터 얻은 인간 단핵구-유래 대식세포에 의한 OE19 및 T47D 세포의 약물 B- 또는 약물 C-유도 식균작용에 대한 약물 A 증강을 나타낸다. CFSE-표지된 OE19 세포 또는 T47D 세포를 식균하는 생존 가능한 대식세포의 백분율로 정의되는 식균작용 백분율은 y-축 상에 표시된다. 단일 제제 또는 조합 매개변수는 x-축 상에 표시된다. OE19 세포를 사용한 시험관내 식균작용 검정에 대한 EC₅₀ 결과는 도 2에 나타낸다. 도 2에서, CFSE-표지된 OE19 세포를 식균하는 생존 가능한 대식세포의 백분율로 정의되는 식균작용 백분율은 y-축 상에 표시된다. 약물 A의 농도(nM)는 x-축 상에 표시된다. 약물 B 단독, 약물 C 단독 또는 배지 단독으로 처리된 세포의 식균작용 백분율은 0 nM 약물 A에서 나타나고 화살표로 표시된다. 약물 A + 약물 B(열린 원), 약물 A + 약물 C(솔리드 원) 및 약물 A 단독(열린 사각형)으로 처리된 세포의 식균작용 백분율은 나타낸다. 오차 막대는 3회 기술적 반복실험의 표준 편차를 나타낸다. S자형 용량 반응, 가변 기울기 피팅으로부터 각 곡선의 EC₅₀을 계산하였다. HT-1376을 사용한 시험관내 식균작용 검정에 대한 EC₅₀ 결과는 도 3에 나타낸다. 도 3에서, CFSE 표지된 종양 세포를 식균하는 생존 가능한 대식세포의 백분율로

정의되는 식균작용 백분율은 y-축 상에 표시된다. 약물 A의 농도(nM)는 x-축 상에 표시된다. 약물 B 단독, 약물 C 단독 또는 배지 단독으로 처리된 세포의 식균작용 백분율은 0 nM 약물 A에서 나타나고 화살표로 표시된다. 약물 A + 약물 B(열린 원) 또는 A + 약물 C(솔리드 원) 및 약물 A 단독(열린 사각형)으로 처리된 세포의 식균작용 백분율은 나타낸다. 오차 막대는 3회 기술적 반복실험의 표준 편차를 나타낸다. S자형 용량 반응, 가변 기울기 피팅으로부터 각 곡선의 EC₅₀을 계산하였다.

[0309] 결론

[0310] 유세포 분석-기반 시험관내 식균작용 검정으로 약물 B 및 약물 C의 ADCP에 대한 약물 A의 효과를 평가하였다. 광범위한 넥틴-4 수용체를 발현하는 다중 종양 세포주에서, 약물 A는 약물 B 및 약물 C의 ADCP를 각각 24.54 및 6.19 pM의 전체 평균 EC₅₀으로 증강시켰다. 단일 제제로서, 약물 B와 약물 C는 배지 단독 대조군으로 관찰된 배경 수준에 비해 세포주 전반에 걸쳐 각각 평균 1.41배, 1.32배의 ADCP를 자극하였다. 약물 A와 약물 B의 조합 및 약물 A와 약물 C의 조합은 배지 단독 대조군에 비해 ADCP를 각각 평균 2.42배 및 2.36배 증강시켰다. 결론적으로, 평균 약물 대 항체 비가 3.85:1인 약물 C의 쇠간 시스템에 접합된 링커-페이로드 mc-vc-PAB-MMAE의 존재는 단독으로 또는 약물 A와 조합될 때 ADCP를 매개하는 약물 C의 능력에 영향을 미치는 것으로 보이지 않는다.

[0311] 실시예 3: 요로상피 암종을 갖는 대상체에서 엔포르투맵 베도틴과 조합한 약물 A의 1상 안전성, 약동학, 약력학 연구

[0312] 본 실시예는 국소 말기 또는 전이성 요로상피암을 갖는 대상체에서 엔포르투맵 베도틴과 조합한 약물 A의 1상 임상 연구를 설명한다.

[0313] (A) 연구 설계

[0314] 본 연구는 용량 증량 부분(1a 상) 및 용량 확장 부분(1b 상)을 포함한다. 연구 설계는 도 4에 제시된다. 대략 30명의 성인 대상체(즉, 18세 이상)가 등록된다. 본 연구는 엔포르투맵 베도틴과 함께 약물 A의 안전성 및 내약성, 최대 내약 용량(MTD), 권장되는 2상 용량(RP2D), 단일- 및 다중-용량 PK 프로파일, 및 PD 마커(표적 점유를 포함하지만 이에 제한되지 않음)를 확립하고, 엔포르투맵 베도틴과 조합한 약물 A의 예비 활성(예를 들어, 치료적 활성)을 특징화하기 위해 설계된다.

[0315] 약물 A는 각 28일 주기의 1일째, 8일째, 15일째에 엔포르투맵 베도틴의 표준 용량 및 일정으로 제공되는 1.25mg/kg IV의 엔포르투맵 베도틴과 조합하여 20mg/kg의 시작 용량으로 시작하는 증량 용량 코호트에 2주마다 1회(Q2W) 정맥내(IV)로 투여된다.

[0316] Bayesian 최적 간격(BOIN) 설계를 사용하여 약물 A 용량을 증량시키고 용량 제한 독성(DLT)의 발생에 대해 평가하였다(Liu 등(2015) *Journal of the Royal Statistical Society. Series C: Applied Statistics*. 64(3): 507-523 및 Yuan 등(2016) *Clin Cancer Res*. 22(17): 4291-4301 참조). 약물 A는 2종 용량 수준인 20 mg/kg Q2W 및 30 mg/kg Q2W에서 평가된다. 20 mg/kg Q2W가 내약되지 않는 경우, 약물 A의 더 낮은 용량 수준(즉, 15 mg/kg Q2W)이 평가된다. 최대 내약 용량(MTD) 이하의 다른 용량 수준 및/또는 일정이 평가될 수 있다.

[0317] 용량 증량 동안, BOIN 설계로, MTD에 대한 표적 용량 제한 독성(DLT) 속도는 0.25로 설정된다. 3명의 대상체의 코호트를 등록하고 DLT에 대해 평가하였다. DLT는 각 코호트에 대해 평가되며 하기에서 더 자세히 설명된다. DLT는 주기 1의 28일 평가 기간 동안 평가된다. BOIN 설계에서는 용량 증량/감량을 안내하기 위해 과량 투여 조결과 함께 하기 규칙을 사용한다.

[0318] · 현재 용량에서 관찰된 DLT 비율이 ≤0.197인 경우, 용량을 다음 더 높은 용량 수준으로 증량한다.

[0319] · 현재 용량에서 관찰된 DLT가 >0.298인 경우, 용량은 다음 더 낮은 용량 수준으로 감량된다.

[0320] · 그렇지 않으면, 현재 용량 수준을 유지한다.

[0321] MTD의 선택은 Liu et al. (2015) *Journal of the Royal Statistical Society. Series C: Applied Statistics*. 64(3): 507-523.에 명시된 바와 같은 등장성 회귀에 기초한다. 구체적으로, MTD는 DLT 속도의 등장성 추정치가 표적 DLT 속도에 가장 가까운 용량으로 선택된다. 다중 동일한 추정치가 있는 경우, 등장성 추정치가 표적 DLT 속도보다 낮을 때, 더 높은 용량 수준이 선택되고, 등장성 추정치가 표적 DLT 속도 이상일 때 더 낮은 용량 수준이 선택된다.

- [0322] 용량 수준이 안전성 검토 위원회(SRC)에 의해 검토되고 제거되면, 용량 최적화 목적을 위한 약물 A 및 엔포르투맵 베도틴의 안전성, PK, PD, 및 예비 항종양 활성을 추가로 특징화하기 위해, 백필 코호트에서 동일한 용량 수준으로 추가 대상체를 등록한다. 백필 코호트에 등록된 환자는 DLT에 대한 평가를 받지 않는다. 용량 증량 및 백필 코호트 둘 다를 포함하는 1a 상 부분에서, 대략 15명의 대상체를 용량 수준에 따라 치료한다. RP2D의 선택을 위해, 스폰서는 SRC와 함께 1a 상 부분의 모든 이용 가능한 안전성, PK, PD, 및 예비 항암 활성 데이터(용량 증량 및 백필 코호트 둘 다를 포함함)를 검토하여, 2상 환경에서 사용될 엔포르투맵 베도틴과 조합한 약물 A의 용량을 권장한다.
- [0323] SRC의 재량에 따라, 용량 확장이 개시되어 안전성, 내약성을 추가로 평가하고 선택된 대상체 집단에서 약물 A 및 엔포르투맵 베도틴의 예비 항암 활성을 특징화한다(도 4 참조). 용량 확장 부분에서, 체크포인트 억제제와 같은 다른 항암제의 안전성 및 내약성은 약물 A 및 엔포르투맵 베도틴과 조합하는 것을 특징화한다.
- [0324] 종양내 약리학 중점을 평가하기 위해, 백필 코호트 및 확장 코호트에 신선한 치료전 및 치료중 생검이 필요하다. 용량 증량 코호트에 등록된 대상체의 경우, 이러한 생검은 선택적이다. 대상체는 스크리닝 평가를 완료하는 데 최대 28일을 가지며, (a) 질환 진행, (b) 대상체 또는 의사가 치료를 중단하기로 결정, (c) 허용할 수 없는 독성이 발생, (d) 동의 철회, 또는 (e) 연구가 종료될 때까지 약물 A와 엔포르투맵 베도틴의 조합으로 치료된다. 종양 평가는 기준선에서 수행되고, 연구의 치료 단계 동안 대략 8주마다 수행된다. 조사자의 추정에 따르면, 대상체가 (i) 연구 치료로부터 임상적 이익을 얻고 있고, 임상적으로 유의한 질환 진행을 나타내는 임상 증상 또는 징후의 부재를 입증하고 있고; (ii) 표현 상태(PS)의 저하가 없고; (iii) 급속한 질환 진행 또는 긴급한 대안적인 의학적 개입을 필요로 하는 중요한 장기 또는 중요한 해부학적 부위에 대한 위협의 부재를 입증하고; (iv) 연구 치료와 관련된 유의한, 허용 불가능한 또는 비가역적 독성을 입증하지 않는 경우, 환자는 방사선촬영 진행 후에 치료를 계속할 수 있다. 치료 종료(EOT) 방문은 대략 4주(적어도 28일 및 35일 이하), 또는 다음 암 요법을 시작하기 전에, 약물 A의 마지막 투여 후에 발생하여 병용 약물, 활력 징후, 부작용(AE) 및 심각한 부작용(SAE)을 검토/수집하고 치료 관련 독성의 해결을 평가한다. 이후, 추적 관찰은 24개월 동안 3개월마다 핸드폰으로 수집하는 전체 생존 데이터로 이루어진다.
- [0325] 본 연구는 프로토콜, 우수한 임상 실천(GCP) 및 적용 가능한 규제 요건을 준수하여 수행된다.
- [0326] **(B) 연구 목적 및 중점**
- [0327] 본 연구의 1차 목적은 (1) 국소 말기 또는 전이성 요로상피 암종을 이전에 치료받은 대상체에서 엔포르투맵 베도틴과 조합한 약물 A의 안전성 및 내약성을 평가하는 것; 및 (2) 엔포르투맵 베도틴과 조합한 약물 A의 최대 내약 용량(MTD) 및 권장되는 2상 용량(RP2D)을 결정하는 것이다.
- [0328] 본 연구의 2차 목적은 (1) 엔포르투맵 베도틴과 조합한 약물 A의 전체 안전성 프로파일을 평가하는 것; (2) 엔포르투맵 베도틴과 조합한 약물 A의 단일 및 다중-용량 약동학(PK)을 특징화하는 것; (3) 약물 A의 면역원성을 평가하는 것; 및 (4) 엔포르투맵 베도틴과 조합한 약물 A의 항종양 활성의 증거를 평가하는 것이다.
- [0329] 본 연구의 탐색적 목적은 (1) 엔포르투맵 베도틴과 조합한 약물 A의 약리학(PD) 효과를 탐색하는 것; 및 (2) 혈액 생성물 수혈에 사용되는 혈청학적 시험에서 약물 A 간섭을 완화시키는 방법론을 평가하는 것이다.
- [0330] 본 연구의 1차 중점은 (1) 하기에 추가로 자세히 기재된 바와 같은 제1 주기 용량-제한 독성(DLT); 및 (2) 유형, 빈도, 중증도(미국 국립암연구소의 부작용에 대한 일반적인 용어 기준(NCI CTCAE v. 5.0)에 따라 등급이 매겨짐) 예를 들어 [https://ctep\(dot\)cancer\(dot\)gov/protocoldevelopment/electronic\(underscore\)applications/docs/CTCAE\(underscore\)v5\(underscore\)Quick\(underscore\)Reference\(underscore\)5x7\(dot\)pdf](https://ctep(dot)cancer(dot)gov/protocoldevelopment/electronic(underscore)applications/docs/CTCAE(underscore)v5(underscore)Quick(underscore)Reference(underscore)5x7(dot)pdf)), 타이밍, 심각성 및 연구 요법과의 관계에 의해 특징화되는 부작용(AE)다.
- [0331] 본 연구의 2차 중점은 (1) 유형, 빈도, 심각도(NCI CTCAE v. 5.0에 따라 등급이 매겨짐) 및 타이밍에 의해 특징화되는 실험실 이상; (2) 데이터 권한에 따른 최대 혈청 농도(C_{max}), 최대 혈청 농도에 도달하는 시간(T_{max}), 시간 경과에 따른 약물 노출량(곡선 하부 면적 또는 AUC), 제거율(CL), 및 반감기($t_{1/2}$)와 같은 약물 A의 약동학 매개변수; (3) 고형 종양에 대한 반응 평가 기준을 사용한 평가(RECIST 1.1, 예를 들어, Eisenhauer 등(2009) *Eur J Cancer* 45: 228-247 참조); (4) 질환 조절물(DCR), 최상의 전체 반응(BOR), 반응 지속시간(DOR), 종양 진행 시간(TTP), 무진행 생존기간(PFS), 및 전체 생존기간(OS)이다.
- [0332] 본 연구의 탐색적 중점은 (1) (a) 말초 혈액에서 CD47 표적 점유의 약물 A 전 용량 수준 및 약물 A 후 용량 수준; (b) 순환하는 백혈구 집단의 면역표현형 검사; (c) 연구 치료 전후의 종양 생검 조직에서의 종양 마커

발현, 침윤성 백혈구 집단 및 면역-조절 분자; (d) 치료 전후의 말초 혈액 및/또는 종양 생검 샘플에서의 탐색적 분자 분석(종양 및 면역 마커를 포함하지만 이에 제한되지 않음);을 포함하는 약리학 효과; 및 (2) 약물 A 치료 동안 간접 항글로불린 시험(IAT) 및 직접 항글로불린 시험(DAT)에서 약물 A 간섭의 완화를 위한 방법론의 특징화이다.

[0333] (C) 연구 집단

[0334] 포함 기준

[0335] 대상체는 연구에 등록시킬 자격이 되는 하기 기준 모두를 충족하여야만 한다:

[0336] · 대상체는 조직학적으로 확인된, 절제 불가능한 국소 말기 또는 전이성 요로상피 암종(즉, 방광, 신우, 요관 또는 요도의 암)을 갖는다. 편평 분화 또는 혼합 세포 유형을 갖는 요로상피 암종(이행 세포)을 갖는 대상체는 요로상피 암종이 우세한 조직학이라는 조건 하에 적격이다. 소세포 또는 신경내분비 조직학의 임의의 성분을 갖는 대상체는 배제된다.

[0337] · 대상체는 국소 말기 또는 전이성 요로상피암 배경에서 면역 체크포인트 억제제(CPI)를 사용한 이전 치료를 받았다. 신보조/보조 환경에서 CPI 요법을 받았고 요법 동안 또는 요법 완료 후 12개월 이내에 재발성 또는 진행성 질환을 가졌던 대상체가 적격이다. CPI는 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1) 억제제 또는 프로그래밍된 세포 사멸 리간드 1(PD-L1) 억제제(아테졸리주맵, 펌브롤리주맵, 더발루맵, 아벨루맵 및 니볼루맵을 포함하지만, 이에 제한되지 않음)로 정의된다.

[0338] · 대상체는 보조/신보조 환경에서 백금을 투여받았고 완료 후 12개월 이내에 재발성 또는 진행성 질환을 가졌거나, 전이성 환경에서 또는 절제 불가능한 국소 말기 질환에 대해 백금을 사용한 치료를 받은 것으로 정의된 백금-함유 화학요법을 사용한 이전 치료를 받았다.

[0339] · 대상체는 가장 최근의 요법을 받는 동안 또는 받은 후에 요로상피암의 진행 또는 재발을 경험하였다.

[0340] · RECIST(버전 1.1)에 따라 대상체는 측정 가능한 질환을 가져야 한다. 이전 방사선 분야의 병변은 방사선 치료 후 진행되었어야 측정 가능한 것으로 간주된다.

[0341] · 하기 실험실 수치에 의해 입증된 바와 같은 그리고 연구 대상 질환에 적절한 적절한 골수 기능.

[0342] · 호중구절대계수(ANC) $\geq 1500/\text{mm}^3$ ($\geq 1.5 \times 10^9/\text{L}$);

[0343] · 혈소판 $\geq 100000/\text{mm}^3$ ($\geq 100 \times 10^9/\text{L}$);

[0344] · 헤모글로빈 $\geq 9 \text{ g/dL}$ ($\geq 90 \text{ g/L}$).

[0345] · Cockcroft-Gault 방정식 또는 신장 질환 식단 수정(MDRD) 또는 만성 신장 질환 유행병학 협력(CKD-EPI)과 같은 의학적으로 허용 가능한 다른 공식에 의한 $\geq 30\text{mL/분}$ 의 크레아티닌 제거 추정치에 의해 입증된 바와 같은 적절한 신장 기능.

[0346] · 하기 실험실 수치에 의해 입증된 바와 같은 그리고 연구 대상 질환에 적절한 간 기능.

[0347] · 총 혈청 빌리루빈 $\leq 1.5 \times$ 정상 상한치(ULN)(대상체가 길버트 증후군을 문서화한 경우 $\leq 3.0 \times$ ULN);

[0348] · 간 전이를 갖는 대상체의 경우, 아스파테이트 및 알라닌 트랜스아미나제(AST 및 ALT) $\leq 3.0 \times$ ULN 또는 $\leq 5.0 \times$ ULN;

[0349] · 골 또는 간 전이를 갖는 대상체의 경우, 알칼리성 포스파타제 $\leq 2.5 \times$ ULN 또는 $\leq 5.0 \times$ ULN.

[0350] · $\leq 480 \text{ msec}$ 의 심박수 Fridericia의 공식(QTcF) 간격에 대해 수정된 QT 간격(삼중 심전도[ECG]의 평균 값 기준).

[0351] · 연령 ≥ 18 세.

[0352] · 미국 동부 협력 종양학 그룹(ECOG) 성과 상태 0 또는 1.

[0353] · 용량 증량 코호트에 있는 대상체는 연구 진입 전에 이용 가능한 보관(또는 신선한) 생검 샘플을 제공한다. 백필 및 확장 코호트에 있는 대상체는 순차적인 생검을 위해 접근 가능한 종양을 가지며, 신선한 전-치료 및 연구 중인 종양 조직 생검(코어 바늘 생검 또는 절제 필요)을 제공할 용의가 있다.

- [0354] · 스크리닝에서 혈청 임신 검사(가임 가능성이 있는 여성의 경우) 음성.
- [0355] · 남성 대상체 및 가임 가능성이 있는 여성 대상체는 연구 전반에 걸쳐 그리고 연구 치료의 마지막 용량 후 적어도 4개월 동안 매우 효과적인 피임 방법을 사용하는 것에 동의한다.
- [0356] 배제 기준
- [0357] 임의의 하기 특성/조건을 가진 대상체는 연구에 포함되지 않는다.
- [0358] · 기존 감각 또는 운동 신경병증 등급 ≥ 2 ;
- [0359] · 증상이 있거나 조절되지 않는 중추신경계(CNS) 전이가 있는 경우. 치료된 CNS 전이를 갖는 대상체는 하기 모두가 사실인 경우 연구에 허용된다:
- [0360] · CNS 전이는 스크리닝 전에 적어도 6주 동안 임상적으로 안정하였고;
- [0361] · CNS 전이에 스테로이드 치료를 필요로 하는 경우, 대상체는 적어도 2주 동안 ≤ 20 mg/일의 프레드니손 또는 동등물의 안정한 용량으로 복용해야 하고;
- [0362] · 기준선 스캔은 새로운 또는 확대된 뇌 전이의 증거를 보여주지 않으며;
- [0363] · 대상체는 연수막 질환이 없다.
- [0364] · 엔포르투맵 베도틴 또는 다른 모노메틸아우리스타틴(MMAE)-기반 항체-약물 접합체(ADC)를 사용한 이전 치료.
- [0365] · 항-CD47 또는 항-신호 조절 단백질- α (SIRP α) 제제를 사용한 이전 치료.
- [0366] · 엔포르투맵 베도틴 또는 엔포르투맵 베도틴의 약물 제형에 함유된 임의의 부형제(히스티딘, 트레할로스 이수화물, 및 폴리소르베이트 20 포함)에 대한 공지된 과민성; 또는 대상체는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 제조된 생물약제에 대한 공지된 과민성을 갖는다.
- [0367] · 항체 또는 융합된 치료적 단백질에 대한 심각한 알레르기 또는 아나필락시스 반응을 경험하였거나 약물 A에 포함된 임의의 물질에 대한 심각한 알레르기 또는 아나필락시스 반응을 경험한 대상체의 불내약성.
- [0368] · 이전 치료(전신 요법, 방사선 요법 또는 수술 포함)와 관련된 지속적인 임상적으로 유의한 독성(탈모증을 제외하고 등급 2 이상). $\leq$ 등급 2 면역요법 관련 갑상선기능저하증 또는 범뇌하수체기능저하증을 갖는 대상체는 호르몬 대체 요법(표시된 경우)의 안정적인 용량으로 잘 유지/제어될 때 등록된다. 진행 중인 $\geq$ 등급 3 면역요법 관련 갑상선기능저하증 또는 범뇌하수체기능저하증을 갖는 대상체는 배제된다. 진행 중인 면역요법 관련 결장염, 포도막염, 심근염 또는 폐염을 갖는 대상체 또는 고용량의 스테로이드(>20 mg/일의 프레드니손 또는 동등물)를 필요로 하는 다른 면역요법 관련 AE를 갖는 대상체는 배제된다.
- [0369] · 활동성 감염(바이러스, 박테리아 또는 진균)에 대한 현재의 전신 항균 치료. 일상적인 항균 예방이 허용된다.
- [0370] · 공지된 활성 조절되지 않은 B형 간염(HBV), C형 간염(HCV), 및 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염.
- [0371] · 이전 6개월에서의 하기 중 임의의 것: 심근 경색, 중증/불안정 협심증, 관상동맥/말초 동맥 우회로 이식술, 뉴욕 심장 협회(NYHA) 부류 II 이상의 울혈성 심부전, 조절되지 않은 고혈압, 뇌혈관 사고, 일시성 허혈 발작, 심부 정맥 혈전증(기기와 관련이 있고 임상적으로 유의하지 않은 것으로 간주된 혈전 제외), 동맥 혈전증, 증상성 폐 색전증, 또는 임의의 다른 유의한 혈전색전증.
- [0372] · 다른 중재적 치료 임상 연구에서의 현재 활성 치료.
- [0373] · 연구 약물의 제1 투여 전 14일 이내에 방사선 요법 또는 주요 수술.
- [0374] · 연구 약물의 제1 투여 전 28일 또는 5개의 반감기(둘 중 더 짧은 기간) 내에 완료되지 않는 면역요법을 사용한 화학요법, 생물제제, 임상시험용 제제 및/또는 항종양 치료.
- [0375] · 연구 약물의 제1 투여 전 지난 28일 동안의 모든 실험용 항체 또는 생백신. 생백신의 예는 홍역, 볼거리, 풍진, 수두/대상포진, 황열, 광견병, Bacillus Calmette-Guérin(BCG) 및 장티푸스 백신을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 주사용 계절 인플루엔자 백신은 일반적으로 사멸된 바이러스 백신이고 허용되지만; 비강내 인플루엔자 백신(예를 들어, FluMist®)은 약독화된 생백신이고 허용되지 않는다.

[0376] 연구 약물의 제1 투여 전 3년 이내에 또 다른 악성 종양의 병력이 있거나 이전에 진단된 악성 종양의 잔류 질환의 증거가 있는 대상체. 비흑색종 피부암, 진행의 증거 없이 치유적 의도로 치료된 국소화된 전립선암, 치료 의도 없이 적극적인 감시/주의 대기 하에 있는 저위험성 또는 매우 저위험성(표준 지침에 따라) 국소화된 전립선암, 또는 임의의 유형의 인시츄 암종(완전 절제를 수행한 경우)을 갖는 대상체는 허용된다.

[0377] 지난 1년 동안 전신 치료가 필요한 활동성 자가면역 질환(즉, 질환 완화제, 코르티코스테로이드 또는 면역억제 약물의 사용)을 갖는 대상체. 대체 요법(예를 들어, 티록신, 인슐린, 또는 부신 또는 뇌하수체 부전에 대한 생리학적 코르티코스테로이드 대체 요법)은 전신 치료의 형태로 간주되지 않으며 허용된다.

[0378] 최근(지난 1년 이내) 또는 적극적인 자살 관념 또는 행동을 포함한 다른 심각한 급성 또는 만성 의학적 또는 정신의학 상태, 또는 연구 참여 또는 임상시험용 제품 투여와 관련된 위험을 증가시킬 수 있거나 연구 결과의 해석을 방해할 수 있고, 대상체가 본 연구에 참가하기에 부적절하게 하는 실험실 이상.

[0379] 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 혈소판감소증 또는 용혈성 수혈 반응의 병력.

[0380] 공지된 활성 각막염 또는 각막 궤양. 표재성 점상 각막염을 갖는 대상체는 장애가 적절하게 치료되고 있는 경우 허용된다.

[0381] 연구 약물의 제1 투여 후 3개월 이내에 조절되지 않은 당뇨병의 병력. 조절되지 않은 당뇨병은 관련 당뇨병 증상(예를 들어, 다뇨증 또는 다갈증)과 함께 헤모글로빈 A1C(HbA1c) $\geq 8\%$ 또는 HbA1c가 7 및 $<8\%$ 로 정의되고, 이는 달리 설명되지 않는다.

[0382] 현재 임신 또는 모유 수유 중.

[0383] **(D) 임상시험용 의약품, 투여용량 및 투여방식**

[0384] 연구의 용량 증량 부분에서, 약물 A의 초기 출발 용량은 20 mg/kg IV Q2W이고, 안전한 것으로 간주되는 경우, 약물 A의 용량은 30 mg/kg IV Q2W의 최대 프로토콜-정의된 용량으로 증량된다. 20 mg/kg Q2W가 내약되지 않는 경우, 약물 A의 더 낮은 용량 수준(즉, 15 mg/kg IV Q2W)이 평가될 수 있다. MTD 이하의 다른 용량 수준 및/또는 일정이 평가될 수 있다. 용량 증량 및 백필 코호트는 엔포르투맙 베도틴과 조합하여 약물 A 권장 2상 용량(RP2D)의 최적 용량 및 일정을 결정한다. 연구의 용량 확장 부분에서, 약물 A는 연구의 용량 증량 부분에서 결정된 엔포르투맙 베도틴과 조합하여 MTD 이하로 투여된다. 엔포르투맙 베도틴은 각 28일 주기의 1일째, 8일째 및 15일째에 1.25mg/kg IV의 표준 용량으로 투여된다. 하기 표 D를 참조한다.

표 D. 용량 증량 투여량 및 투여 일정

코호트	약물 A의 용량, 투여 경로 및 투여 일정(mg/kg)	엔포르투맙 베도틴의 용량, 투여 경로 및 투여 일정(mg/kg)
28일 주기		
1	20 mg/kg, IV, Q2W	각 28일 주기의 1일째, 8일째 및 15일째에 1.25 mg/kg
2	30 mg/kg, IV, Q2W	각 28일 주기의 1일째, 8일째 및 15일째에 1.25 mg/kg
-1	15 mg/kg, IV, Q2W	각 28일 주기의 1일째, 8일째 및 15일째에 1.25 mg/kg

[0385]

[0386] 본원의 다른 곳에서 언급된 바와 같이, Bayesian 최적 간격(BOIN) 설계(Liu 등(2015) *Journal of the Royal Statistical Society. Series C: Applied Statistics*. 64(3): 507-523 및 Yuan 등(2016) *Clin Cancer Res*. 22(17): 4291-4301 참조)는 최대 내약 용량 (MTD)을 찾기 위해 사용된다. BOIN 설계는 전통적인 3+3 설계와 유사한 간단한 방식으로 구현되지만, 더 유연하고 연속 재평가 방법(CRM)과 같은 더 복잡한 모델-기반 설계의 것과 비교할 수 있는 우수한 동작 특성을 갖는다(Zhou 등(2018) *Clin Cancer Res*. 24(18):4357-4364 참조).

[0387] 약물 A는 20 mm 테플론 코팅된 고무 혈청 마개 및 변조 방지 알루미늄 밀봉재로 밀봉된 1000 mg/50 mL 유형 1 투명 유리 바이알에 공급된다. 각 일회용 바이알은 1000 mg 약물 A(50 mL)를 전달하고, 정맥내(IV) 투여용으로 의도된다.

- [0388] 엔포르투맵 베도틴 투여 형태 및 포장에 관한 완전한 정보는 미국 또는 로컬 패키지 삽입물에서 찾을 수 있다. 미국의 경우, 예를 들어, [https://astellas\(dot\)us/docs/PADCEV\(underscore\)label\(dot\)pdf](https://astellas(dot)us/docs/PADCEV(underscore)label(dot)pdf)를 참조한다.
- [0389] 약물 A는 외래 환자를 기준으로 IV 주입으로 2주마다 1회 투여된다. 용량을 대략 60분에 걸쳐 주입한다. 주입 펌프의 사용은 임상시험용 제품의 정확한 전달을 보장하기 위한 바람직한 투여 방법이지만, 중력 강하가 허용된다.
- [0390] 주기는 1일째 용량으로부터 다음 1일째 용량까지의 시간으로 정의된다. 치료 지연이 없는 경우, 주기는 2주마다 1회 투여하는 28일이다. 모든 시험 치료는 외래 환자를 기준으로 투여한다. 대상체를 주기 1의 1일째에 주입 후 적어도 2시간 동안 임상에서 관찰하고, 그 후 임상적으로 지시되는 바와 같다.
- [0391] 약물 A에 대한 사전 처방은 필요하지 않다. 엔포르투맵 베도틴 주입에 대한 지침은 엔포르투맵 베도틴 US 또는 국소 패키지 삽입물에 따라 다르다. 엔포르투맵 베도틴의 권장 용량은 질환이 진행되거나 허용할 수 없는 독성이 나타날 때까지 28일 주기의 1일째, 8일째 및 15일째에 30분에 걸쳐 정맥내 주입으로 투여된 1.25 mg/kg(대상체 ≥ 100 kg에 대해 최대 125 mg)이다.
- [0392] 투여 일정이 일치하는 투여일에, 엔포르투맵 베도틴은 약물 A 요법이 완료된 후 대략 30분에 시작된다.
- [0393] 독성에 대한 용량 중단 및 수정이 허용된다. 약물 A의 용량 수정은 하기 세 가지 방법 중 하나로 발생할 수 있다.
- [0394] · 주기 내: (약물 A만 2주마다 1회 투여의 경우) 주어진 치료 주기 동안, 필요한 경우, 적절한 회복 및 용량 감소까지 투여 중단.
- [0395] · 주기 사이: 새로운 주기가 시작될 예정일 때 지속적인 독성으로 인해 다음 주기의 투여가 지연될 수 있다.
- [0396] · 다음 주기에서: 용량 감소는 이전 주기에서 경험된 독성에 기초하여 후속 주기에서 요구될 수 있다.
- [0397] 약물 A가 영구적으로 중단되는 경우, 조사자의 의견에 따르면, 대상체가 임상적 이익을 얻고 있는 경우, 대상체는 엔포르투맵 베도틴을 계속 받을 수 있다. 엔포르투맵 베도틴이 너무 일찍 영구적으로 중단되는 경우, 조사자의 의견에 따르면, 대상체가 약물 A로부터 임상적 이익을 얻고 있는 경우, 대상체는 약물 A를 계속 받을 수 있다.
- [0398] 용량 증량 동안, 대상체는 이전 코호트의 안전성 평가 후 결정된 용량 수준 및 일정에서 다음 이용 가능한 치료 슬롯에 연속적으로 할당된다.
- [0399] **(E) 통계 방법**
- [0400] 대략 30명의 성인 대상체가 전체로 연구에 등록된다. 등록은 관찰된 안전성 프로파일에 따라 달라지며, 이는 각 용량 수준에서의 대상체의 수 및 탐색된 용량 수준의 수를 결정한다. 1상의 샘플 크기는 잠재적 용량 독성 프로파일과 실제 데이터 구현의 변동성에 따라 달라진다. 용량 증량 부분에서 각 용량으로(즉, 3 내지 15) 치료되는 대상체의 수는 BOIN(Bayesian 최적 간격) 설계에 기초한다(예를 들어, Yuan *et al.* (2016) *Clin Cancer Res.* 22(17): 4291-4301 참조).
- [0401] 일단 용량 수준이 안전성 검토 위원회(SRC)에 의해 안전하고 내약성이 있는 것으로 결정되면, 이전에 치료된 국소 말기 또는 전이성 요로상피 암종을 갖는 대상체에서 엔포르투맵 베도틴과 조합하여 투여되는 약물 A의 안전성, 약동학, 약력학, 및 예비 항종양 활성을 추가로 평가하기 위해 백필 코호트에서 동일한 용량 수준으로 추가 대상체를 등록한다. 이러한 백필 코호트에서는 DLT 평가를 수행하지 않는다. 백필 코호트를 포함하는 용량 증량 부분에서, 대략 15명의 대상체를 용량 수준에 따라 치료한다.
- [0402] RP2D의 선택을 위해, 스폰서는 SRC와 함께 1a 상의 모든 이용 가능한 안전성, 약동학, 약력학, 및 예비 항암 활성 데이터(용량 증량 및 백필 코호트 둘 다를 포함함)를 검토하여, 2상 환경에서 사용되는 약물 A의 용량을 권장한다.
- [0403] **(F) 안전성**
- [0404] 부작용(AE)은 조사자의 판단에 따라 인과관계를 고려하고 인과관계를 고려하지 않는 방식으로 제시된다. 독성 등급 1 내지 5로 분류된 전체 독성의 시기, 빈도 및 모든 부작용의 심각성을 설명한다. 부작용의 중증도는 CTCAE 버전 5.0에 따라 등급이 매겨진다(예를 들어,

[https://ctep\(dot\)cancer\(dot\)gov/protocoldevelopment/electronic\(underscore\)applications/docs/CTCAE\(underscore\)v5\(underscore\)Quick\(underscore\)Reference\(underscore\)5x7\(dot\)pdf](https://ctep(dot)cancer(dot)gov/protocoldevelopment/electronic(underscore)applications/docs/CTCAE(underscore)v5(underscore)Quick(underscore)Reference(underscore)5x7(dot)pdf) 참조). 더 높은 빈도로 관찰되거나 심각한 부작용으로 간주되는 AE에 대한 추가 요약이 제공된다(예를 들어, 히스 법칙 사례).

[0405] 연구 기간 동안 부작용, 심전도(ECG), 혈압(BP), 맥박수, 심장 모니터링 및 안전성 실험실 데이터를 지속적으로 검토하고 요약하여 대상체의 안전성을 평가한다. 안전성 데이터는 표 및/또는 그래픽 포맷으로 제시되고 적절한 경우 설명적으로 요약된다.

[0406] 본 연구는 AE의 지속적인 모니터링을 제공하는 연구 조사자 및 스폰서 대표로 구성된 시험 SRC를 사용한다. 연구 기간 동안 발생하고 연구 약물과 관련된 것으로 간주되는 AE, 심각한 부작용(SAE) 및 안전성 실험실 값을 정기적으로 평가하여 지속적인 투여가 미래 대상체의 안전성을 손상시키는지 여부를 결정한다.

[0407] **(G) 용량 제한 독성(DLT)**

[0408] 용량-제한 독성(DLT)-평가 기간은 치료의 처음 28일(즉, 주기 1)이다. 명확하게 그리고 논란의 여지 없이 약물 A와 관련이 없는 경우가 아니면, 하기 정의를 충족하는 모든 주기 1 AE는 DLT로 간주된다.

- [0409] · 혈액학:
- [0410] · >7일 지속되는 공급 4 호중구 감소증.
- [0411] · 열성 호중구 감소증(호중구 감소증 $\geq$ 등급 3, 및 단위 체온은 $>38.3^{\circ}\text{C}$ 이거나 체온은 $\geq 38^{\circ}\text{C}$ 로 1시간 이상 지속되는 것으로 정의).
- [0412] · 감염 동반 $\geq$ 등급 3 호중구 감소증.
- [0413] · 임상적으로 상당한 출혈과 관련된 등급 3 혈소판감소증.
- [0414] · 등급 4 혈소판 감소증.
- [0415] · 히스 법칙 기준을 충족하는 사례
- [0416] · 다음을 제외한 $\geq$ 등급 3 비혈액학 독성:
- [0417] · 다음 주입 전에 $\leq$ 등급 1로 완화되는 등급 3 메스꺼움, 구토 또는 설사(적절한 항구토제 및 다른 지원 치료로 72시간 이상 지속되는 3등급 메스꺼움, 구토 또는 설사는 DLT로 간주해야 함).
- [0418] · 7일 이내에 $\leq$ 등급 2로 완화되는 등급 3 피로;
- [0419] · 24시간 이내에 $\leq$ 등급 1로 완화되거나 조사자가 임상적으로 유의하지 않은 것으로 간주되는 $\geq$ 등급 3 실험실 이상.
- [0420] · 성공적으로 관리되고 72시간 이내에 완화되는 등급 3 주입 반응(사전 약물치료에도 불구하고 재발하거나 발생하는 등급 3 주입 반응은 DLT로 간주되어야 함).

[0421] · 약물 A에 기인하는 지속적인 독성으로 인해 예정된 주기 2 1일째 약물 A 용량 투여 2주 이상 지연.

[0422] 또한, 임상적으로 중요하거나 지속적인 등급 2 독성이 DLT로 간주될 수 있다.

[0423] **(H) 효능**

[0424] 본 연구에서, 예비 항종양 활성은 2차 목적이다. 데이터가 허용하는 경우 전체 분석 세트(FAS) 집단 및 평가가 능한 집단에서 전체 반응률(ORR), 최상의 전체 반응(BOR), 질환 통제율(DCR), 반응 기간(DOR), 종양 진행 시간(TTP), 무진행 생존(PFS), 및 전체 생존(OS)을 분석한다.

[0425] 종양 평가에는 공지되거나 의심되는 모든 질환 부위가 포함된다. 컴퓨터 단층촬영(CT)이 바람직한 영상 양식이지만, 자기공명영상(MRI)도 사용된다. 영상에는 흉부, 복부 및 골반(머리와 목은 선택 사항)이 포함된다. 공지되거나 의심되는 뇌 전이를 갖는 대상체에 대해 뇌 CT 또는 MRI 촬영을 수행해야 한다. 기준선에서 각 확인되고 보고된 병변을 특징화하는 데 사용되는 동일한 영상 기술이 하기 종양 평가에 사용된다.

[0426] 항종양 활성은 기준선에서, 치료 동안, 질환 진행이 의심될 때마다(예를 들어, 증상 악화), 및 치료 중단 시에 수행된 방사선학적 종양 평가를 통해 평가된다. 관련 2차 종점에 대한 반응의 평가는 조사자에 의해 평가된 바와 같은 RECIST 버전 1.1(예를 들어, Eisenhauer *et al.* (2009) *Eur J Cancer* 45: 228-247 참조)을 이용하여

수행된다. 종양 크기의 변화는 완전 반응(CR), 부분 반응(PR), 안정 질환(SD) 또는 진행성 질환으로 분류되며, 후자는 새로운 병변의 출현을 통합한다.

[0427] **(I) 종양 생검 마커**

[0428] 생검된 조직의 분석은 종양 참조 실험실에서 수행된다. 분석은 넥틴-4 발현, PD-L1 상태, 및 CD47 발현과 같은 추가의 면역조직화학(IHC) 평가, 및 T 세포와 같은 침윤성 면역 세포 및 종양-관련 대식세포(TAM)의 빈도 및 위치를 포함한다. 생검 재료가 충분한 경우, 종양, 면역 및 체크포인트 마커에 대한 추가 다중 면역형광 검정 및 탐색적 분자 검정을 수행한다.

[0429] **(J) 약동학/약역학**

[0430] PK 분석을 위한 혈청을 제공하기 위한 혈액 샘플을 수집한다. 모든 노력은 투여에 대해 정확한 공칭 시간에 약동학 샘플을 얻기 위해 수행된다. 약물 A의 약물 농도는 검증된 방법을 사용하여 측정된다. 약동학(PK) 매개변수는 표준 비구획 방법을 사용하여 각각의 농도 시간 데이터로부터 결정된다. 샘플 수집 시간은 매개변수 계산에 사용된다. 약물 A의 경우, 최대 농도(C_{max}), 최대 농도에 대한 시간(T_{max}), 시간 0부터 마지막 측정 시간까지의 농도 시간 곡선 하부 면적(AUC_{last}), 시간 0부터 무한대까지의 AUC(AUC_{inf}) 및/또는 투여 간격(τ) 동안의 혈장 농도-시간 곡선 하부 면적(AUC_{τ})을 포함하는 약동학 매개변수를 계산한다. 적절한 경우, 제거율(CL), 분포 부피(V_z), 말단 제거 반감기($t_{1/2}$), 및 축적 비율(R_{ac})을 포함하는 추가 PK 매개변수가 계산된다. 약물 A의 약물 농도는 그래픽으로 요약되고 용량, 주기 및 공칭 PK 샘플링 시간에 따른 기술적 통계로 요약된다. 비구획 PK 매개변수는 용량 및 주기로 기술적으로 요약된다. 약력학 데이터는 그래픽으로 요약되고 시간 및 용량에 따른 기술적 통계로 요약된다. 노출-반응 관계를 더 잘 이해하기 위해 적절한 모델-기반 방법을 사용하는 PK/PD 분석을 탐색하고 결과를 별도로 보고할 수 있다.

[0431] CD47 표적 점유, 순환하는 백혈구의 면역표현형 검사, 말초 혈액 순환하는 종양 DNA(ctDNA) 및 탐색적 분자 분석을 위한 전혈 샘플을 수집한다.

[0432] 기준선 방문시 수집된 혈액 샘플, 및 다른 방문시 수집된 임의의 남은 혈액은 약물 반응과 관련된 잠재적인 약리계통 분석을 위해 보유된다. 예를 들어, SIRP α 유전자 다형성, 추정 안전성 바이오마커, 약물 대사 효소 유전자, 약물 수송 단백질 유전자, 또는 약물 작용 메커니즘과 관련이 있는 것으로 생각되는 유전자를 검사할 수 있다.

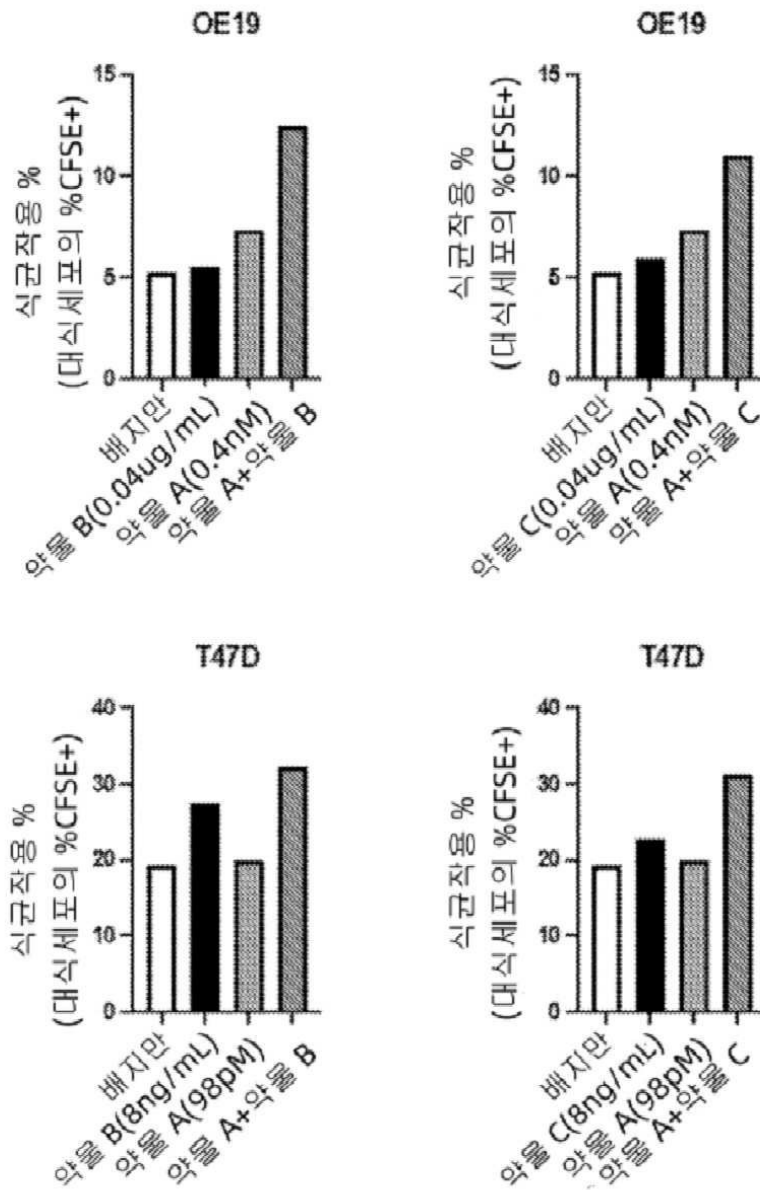
[0433] **(K) 수혈-전 크로스매칭 시험을 위한 중화 시약 평가**

[0434] 적혈구(RBC)가 CD47을 발현하므로, 약물 A는 대상체의 혈청 또는 혈장에 결합되지 않은 형태로 존재하는 이외에도, 환자의 순환하는 적혈구에 결합할 수 있다. 약물 A를 사용한 치료를 시작한 후, 간접 항글로불린 시험(IAT) 및 직접 항글로불린 시험(DAT)을 포함하는 항체 스크리닝은 약물 A의 Fc 부분에 결합하는 항-인간 글로불린(AHG)의 결과로서 허위 양성으로 보고될 수 있으며, 이로써 수혈 전 크로스매칭의 해석에 잠재적으로 영향을 미친다. 이러한 간섭의 중화를 위한 잠재적인 완화 방법론이 평가된다. 이러한 이유로, 부위에 있는 혈액 샘플에는 임상시험용 중화 시약이 제공될 수 있거나, ABO Rh 타이핑, 항체 스크리닝 및 크로스매칭이 RBC 수혈을 위해 수행되는 시점에 탐색적 중화 검정으로 시험하기 위해 혈액 샘플을 지정된 기준 실험실로 보낼 수 있다.

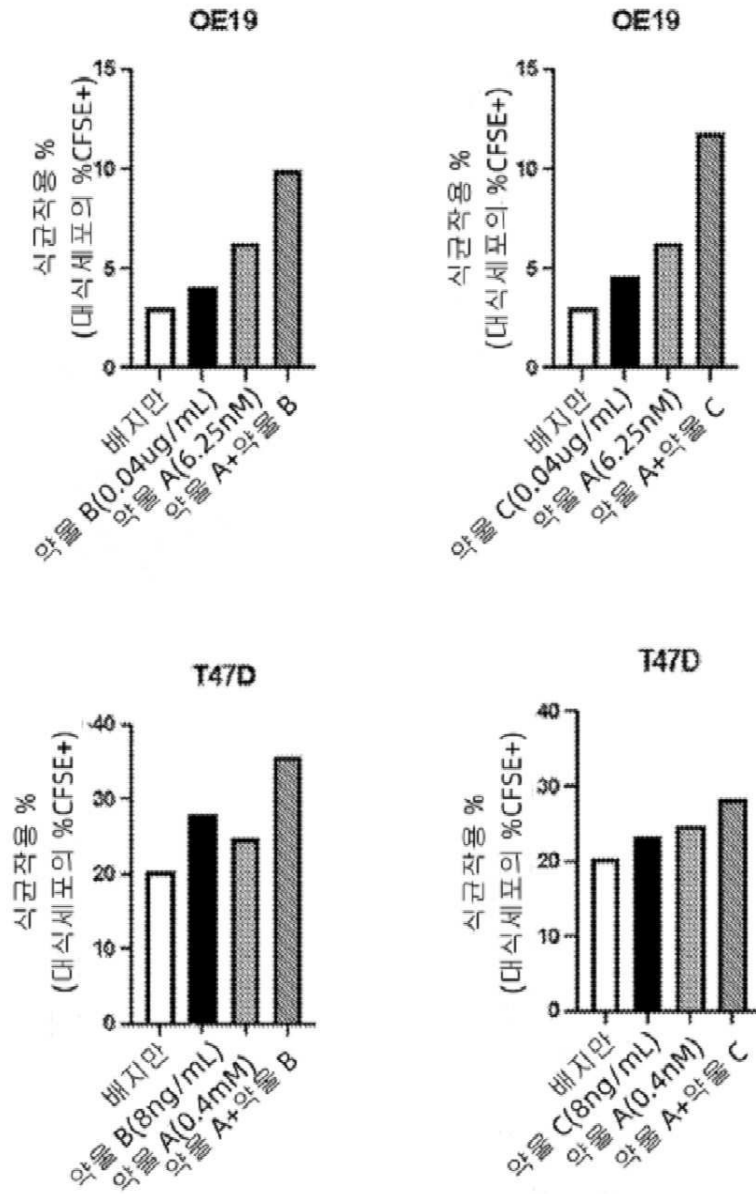
[0435] 이전 실시예는 단지 예시적인 목적으로 제공되며, 본 발명의 범위를 어떤 식으로든 제한하려는 의도가 아니다. 본원에 나타내고 기재된 것 외에 발명의 다양한 변형은 전술한 기재로부터 본 분야의 통상적인 지식을 가진 자에게 분명하게 되고 첨부된 청구범위 내에 속한다.

도면

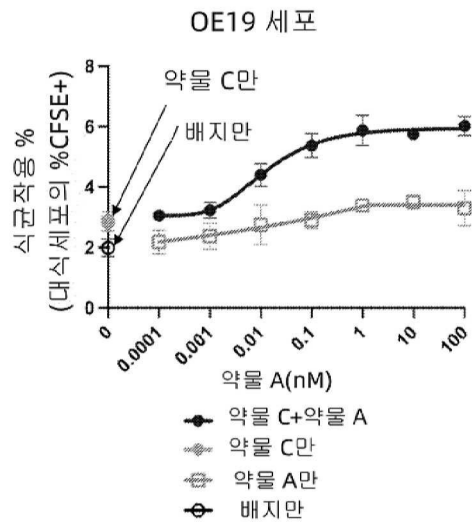
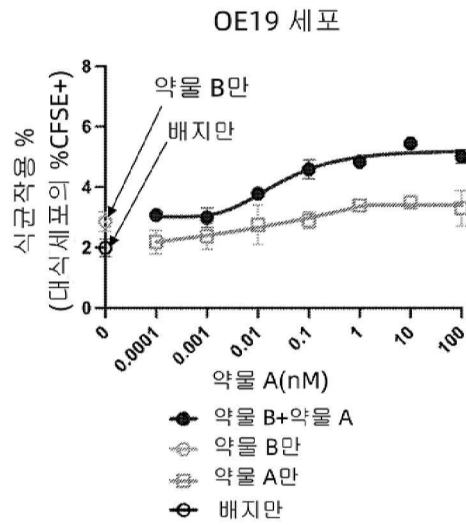
도면1a



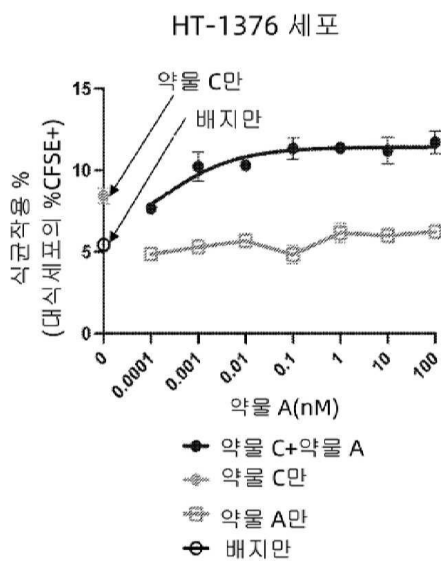
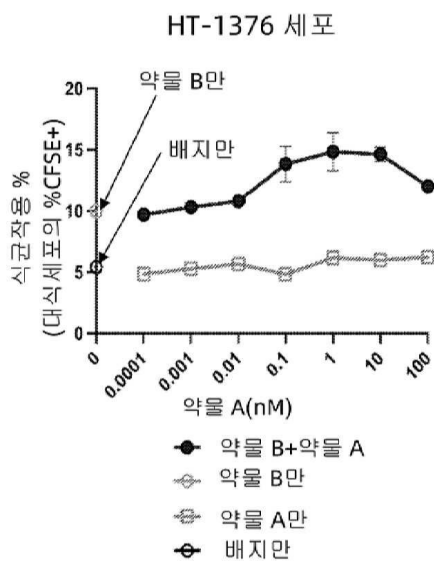
도면1b



도면2



도면3



도면4

1a 상: 용량 증량

- BOIN 설계; N= 대략 30(15일 용량 수준)
- 이전에 치료된 국소 말기 또는 전이성 요로상피 암증

용량 수준 1



약물 A 20 mg/kg IV Q2W



28일 주기의 1일째, 8일째 및 15일째에
엔포르투맙 베도틴 1.25 mg/kg IV

백필 코호트

약물 A 20mg/kg IV Q2W + 엔포르투맙 베도틴

용량 수준 2

약물 A 30 mg/kg IV Q2W



28일 주기의 1일째, 8일째 및 15일째에
엔포르투맙 베도틴 1.25 mg/kg IV

백필 코호트

약물 A 30mg/kg IV Q2W + 엔포르투맙 베도틴

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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