(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월13일
(11) 등록번호 10-2100388
(24) 등록일자 2020년04월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7025286
(22) 출원일자(국제) 2013년02월06일
심사청구일자 2018년02월06일
(85) 번역문제출일자 2014년09월05일
(65) 공개번호 10-2015-0008049
(43) 공개일자 2015년01월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/024995
(87) 국제공개번호 WO 2013/119714
국제공개일자 2013년08월15일
(30) 우선권주장
61/595,216 2012년02월06일 미국(US)
61/659,752 2012년06월14일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
Cell, Vol.138, pages 286-299 (2009)*
J. Immunol. Vol. 164, pages 3652-3658 (2000)*
Molecular Cell, Vol. 31, pages 266-277 (2008)*
Science, Vol. 274, pages 795-798 (1996)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
인히브릭스, 인크.
미국 캘리포니아 92037 라 졸라 스위트 200 노스 토리 파인스 로드 11025
(72) 발명자
에클만, 브렌단
미국 캘리포니아 92037 라 졸라 스위트 130 엔. 토리 파인스 로드 11099
팀머, 존
미국 캘리포니아 92037 라 졸라 스위트 130 엔. 토리 파인스 로드 11099
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박장원

전체 청구항 수 : 총 27 항 심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **CD47 항체 및 그 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로는 CD47을 인식하는 모노클로날 항체, 더 구체적으로는 유의미한 수준으로 인간 적혈구 세포의 적혈구 응집 반응 (hemagglutination)을 일으키지 아니하는 CD47 항체, 이들 항체들을 생성시키는 방법 및 이들 모노클로날 항체들을 치료제로 사용하는 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

라자이, 아미르

미국 캘리포니아 92037 라 졸라 스위트 130 엔. 토리 파인스 로드 11099

드브로, 퀸

미국 캘리포니아 92037 라 졸라 스위트 130 엔. 토리 파인스 로드 11099

존스, 카일

미국 캘리포니아 92037 라 졸라 스위트 130 엔. 토리 파인스 로드 11099

은가이, 피터, 엘.

미국 캘리포니아 92037 라 졸라 스위트 130 엔. 토리 파인스 로드 11099

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 CD47에 결합하는 단리된 모노클로날 항체 또는 그 면역학적 활성 단편으로서,

상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은

SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, 또는 SEQ ID NO: 66으로 나타내는 VH 상보성 결정 영역 1 (CDR1) 서열;

SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, 또는 SEQ ID NO: 76으로 나타내는 VH CDR2 서열;

SEQ ID NO: 52 또는 SEQ ID NO: 77로 나타내는 VH CDR3 서열;

SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67, 또는 SEQ ID NO: 68로 나타내는 VL CDR1 서열;

SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, 또는 SEQ ID NO: 71로 나타내는 VL CDR2 서열; 및

SEQ ID NO: 55로 나타내는 VL CDR3 서열

을 포함하는 것인, 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 키메라 항체 또는 인간화 항체인 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 CD47이 신호-조절 단백질 α (SIRPα)와 상호 작용하는 것을 방지하는 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 CD47-발현 세포의 대식세포-매개 식균 작용을 촉진하는 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 투여 후에 적혈구 세포의 적혈구 응집 반응을 유의미한 수준으로 야기하지 않는 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 SEQ ID NOs: 5-30로 이루어지는 군으로부터 선택되는 가변 중쇄 (VH) 영역을 포함하는 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 SEQ ID NOs: 31-47로 이루어지는 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 (VL) 영역을 포함하는 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 SEQ ID NOs: 5-30 중 임의의 어느 하나로 제공되는 VH 영역을 포함하고, SEQ ID NOs: 31-47 중 임의의 어느 하나로 제공되는 VL 영역을 포함하는 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 SEQ ID NOs: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44, 및 47 중 임의의 어느 하나로 제공되는 VL 영역과 짝을 이루는, SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 12, 15-17, 20-22, 및 27-30 중 임의의 어느 하나로 제공되는 VH 영역을 포함하는 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 항체는 하기의 군으로부터 선택되는 VH쇄 영역 및 VL쇄 영역의 조합을 포함하는 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편:

i. SEQ ID NO: 5를 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 31을 갖는 VL쇄 영역 서열;

ii. SEQ ID NO: 5를 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 32를 갖는 VL쇄 영역 서열;

iii. SEQ ID NO: 7을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 33을 갖는 VL쇄 영역 서열;

iv. SEQ ID NO: 7을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 34를 갖는 VL쇄 영역 서열;

v. SEQ ID NO: 7을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 35를 갖는 VL쇄 영역 서열;

vi. SEQ ID NO: 7을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 36을 갖는 VL쇄 영역 서열;

vii. SEQ ID NO: 7을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 37을 갖는 VL쇄 영역 서열;

viii. SEQ ID NO: 7을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 38을 갖는 VL쇄 영역 서열;

ix. SEQ ID NO: 7을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 39를 갖는 VL쇄 영역 서열;

x. SEQ ID NO: 7을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 43을 갖는 VL쇄 영역 서열;

xi. SEQ ID NO: 8을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 39를 갖는 VL쇄 영역 서열;

xii. SEQ ID NO: 11을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 42를 갖는 VL쇄 영역 서열;

xiii. SEQ ID NO: 11을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 43을 갖는 VL쇄 영역 서열;

xiv. SEQ ID NO: 11을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 44를 갖는 VL쇄 영역 서열;

xv. SEQ ID NO: 11을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 47을 갖는 VL쇄 영역 서열;

xvi. SEQ ID NO: 15를 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 43을 갖는 VL쇄 영역 서열;

xvii. SEQ ID NO: 15를 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 44를 갖는 VL쇄 영역 서열;

xviii. SEQ ID NO: 16을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 35를 갖는 VL쇄 영역 서열;

xix. SEQ ID NO: 17을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 35를 갖는 VL쇄 영역 서열;

xx. SEQ ID NO: 20을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 35를 갖는 VL쇄 영역 서열;

xxi. SEQ ID NO: 21을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 35를 갖는 VL쇄 영역 서열;

xxii. SEQ ID NO: 22를 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 35를 갖는 VL쇄 영역 서열;

xxiii. SEQ ID NO: 27을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 35를 갖는 VL쇄 영역 서열;

xxiv. SEQ ID NO: 28을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 35를 갖는 VL쇄 영역 서열;

xxv. SEQ ID NO: 29를 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 35를 갖는 VL쇄 영역 서열; 및

xxvi. SEQ ID NO: 30을 갖는 VH쇄 영역 서열 및 SEQ ID NO: 35를 갖는 VL쇄 영역 서열.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은

SEQ ID NO: 50으로 나타내는 VH CDR1,

SEQ ID NO: 51로 나타내는 VH CDR2,

SEQ ID NO: 52로 나타내는 VH CDR3,

SEQ ID NO: 53으로 나타내는 VL CDR1,

SEQ ID NO: 54로 나타내는 VL CDR2 및

SEQ ID NO: 55로 나타내는 VL CDR3

를 포함하는 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은

SEQ ID NO: 50으로 나타내는 VH CDR1,

SEQ ID NO: 72로 나타내는 VH CDR2,

SEQ ID NO: 52로 나타내는 VH CDR3,

SEQ ID NO: 53으로 나타내는 VL CDR1,

SEQ ID NO: 71로 나타내는 VL CDR2 및

SEQ ID NO: 55로 나타내는 VL CDR3

를 포함하는 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 헤드 투 사이드 (head to side) 배향으로 CD47에 결합하고, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편의 VH쇄는 CD47 발현 세포의 세포막 근처에 위치하며, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편의 VL쇄는 CD47 상의 SIRPα 결합 부위를 가리는 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 IgG1 이소형, IgG2 이소형, IgG3 이소형 및 IgG4 이소형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IgG 이소형인 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 IgG4P 및 IgG4PE로부터 선택되는 IgG 이소형인 것인 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 17

CD47이 SIRPα와 상호 작용하는 것을 방지하기 위하여 제1항에 기재된 항체 또는 그 면역학적 활성 단편과 경쟁하는, 단리된 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 18

CD47에 결합하는 단리된 항체 또는 그 면역학적 활성 단편으로서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은

각각 SEQ ID NOs: 5-30 중 임의의 어느 하나로 나타나는 서열을 갖는 VH쇄 영역 내 CDR 1, CDR2 및 CDR 3의 아미노산 서열을 포함하는, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하고; 및

각각 SEQ ID NOs: 31-47 중 임의의 어느 하나로 나타나는 서열을 갖는 VL쇄 영역 내 CDR 1, CDR2 및 CDR 3의 아미노산 서열을 포함하는, VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 항체 또는 그 면역학적 활성 단편.

청구항 19

제1항, 제17항 및 제18항 중 어느 하나의 항에 기재된 항체 또는 그 면역학적 활성 단편을 포함하는, 그를 필요로 하는 대상체에서 암 또는 기타 종양 질환의 증상을 완화하기 위한 약학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 캐리어를 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 대상체는 인간인 것인 약학적 조성물.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체 또는 인간화 항체인 것인 약학적 조성물.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 CD47은 인간 CD47인 것인 약학적 조성물.

청구항 24

제19항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 CD47이 SIRPα와 상호 작용하는 것을 방지하는 것인 약학적 조성물.

청구항 25

제19항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 IgG1 이소형, IgG2 이소형, IgG3 이소형 및 IgG4 이소형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IgG 이소형인 것인 약학적 조성물.

청구항 26

제19항에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 IgG4P 및 IgG4PE로부터 선택되는 IgG 이소형인 것인 약학적 조성물.

청구항 27

제19항에 있어서, 화학요법의 이용을 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 28

제19항에 있어서, 방사선요법의 이용을 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] [0001] 이 출원은 35 U.S.C. §119(e)에 의거하여 2012년 2월 6일 출원된 미국 가출원 제 61/595,216호 및 2012년 6월 14일에 출원된 미국 가출원 제 61/659,752호에 대한 우선권 이익을 주장한다. 이들 출원 각각은 그 전체가 참조로서 본 발명에 포함된다.

[0003] **본 발명의 기술 분야**

[0004] [0002] 본 발명은 개괄적으로는 CD47을 인식하는 모노클로날 항체, 더 구체적으로는 유의미한 수준으로 인간 적혈구 세포의 적혈구 응집 반응 (hemagglutination)을 일으키지 아니하는 CD47 항체, 이들 항체들을 생성시키는 방법 및 이들 모노클로날 항체들을 치료제로 사용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] [0003] 인테그린-연관 단백질 (integrin-associated protein, IAP), 난소암 항원 OA3, Rh-연관 항원 및 MER6로도 알려진 CD47은 면역글로불린 수퍼패밀리에 속하는 다기능성 (multi-spanning) 막통과 수용체이다. CD47 발현 및/또는 활성은 다수의 질병 및 장애와 연루되어 있다. 따라서, CD47을 표적하는 치료법들에 대한 수요가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0006] **발명의 요약**

[0007] [0004] 본 발명은 CD47, 특히 인간의 CD47을 인식하고 결합하는 모노클로날 항체를 제공한다. 본 발명의 항체는 CD47의 발현, 활성 및/또는 신호 전달을 조절, 예컨대, 차단, 억제, 감소, 길항, 중화 또는 달리 말하면 간섭할 수 있고, 이들 항체는 본 발명에서 적혈구라고도 언급하는 인간의 적혈구 세포의 응집 반응을 유의미한 수준으로 야기하지 않는다. 그러나, 본 발명 항체들의 세포 표면의 CD47과 결합하면서도 세포의 군집 현상을 야기하지 않는 능력은 적혈구 세포에만 국한되는 것은 아니다. 본 발명의 항체들은 CD47 양성 세포들의 군집을 촉발하지 않는 방식으로 CD47에 고유하게 결합한다. 본 발명의 항체들 및 이들의 유도체들은 CD47와 SIRPα(신호-조절-단백질 α, signal-regulatory-protein α) 간 상호 작용을 조절, 예컨대, 차단, 억제, 감소, 길항, 중화 또는 달리 말하면 간섭할 수 있고, 이들 항체는 인간의 적혈구 세포의 응집 반응을 유의미한 수준으로 야기하지 않는다. 본 발명에서 제공되는 항체들을 총체적으로 "CD47 항체들"로 부른다. 본 발명의 CD47 항체들은 인간 적혈구 세포의 응집 반응을 야기하는 기존의 CD47 항체들보다 현저히 개선된 것이다 (예컨대, 문헌 [Kikuchi Y, Uno S, Yoshimura Y et al. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 315: 912-8] 참고). 예컨대, 본 발명의 CD47 항체들은 이하 자세히 기술하는 바와 같이, 그 각각이 SIRPα를 차단하지만 RBC의 적혈구 응집 반응을 야기하는 기존의 CD47 항체들 B6H12, BRC126, 및 CC2C6보다 현저히 개선된 것이다. 본 발명의 전장 IgG CD47 항체들 (예컨대, 표 1에 제시되는 것들을 비롯한 2A1 및 그 인간화 유도체들)은 유의미한 수준으로 세포를 응집시키지 않는다. 예컨대, 본 발명의 CD47 항체들은 적혈구 세포 (RBC)를 응집시키지 않는다. 본 발명에 개시되는 것들은 SIRPα를 차단하면서 유의미한 수준의 응집을 야기하지 않는 전장 IgG 포맷으로는 최초인 CD47 항체들이다.

[0008] [0005] 본 발명의 CD47 항체들은 다수의 바람직한 특성들을 나타내는데, 예컨대, 비제한적 예시의 방식으로, 유의미한 수준의 적혈구 응집 반응을 야기함이 없이 CD47과 그 리간드인 SIRPα 간의 상호 작용에 대한 강력한 차

단 및 강력한 항종양 활성을 나타낸다. 예컨대, 본 발명의 CD47 항체들은 본 발명에서 개시하고 있는 CD47 항체의 부재하에서 CD47과 SIRPα 간의 상호 작용 수준과 비교하여, CD47과 SIRPα 간의 상호 작용 수준을 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상 차단한다.

[0009] [0006] 본 발명의 CD47 항체들은 유의미한 수준의 세포 응집을 야기하지 않는다, 즉 본 발명의 CD47 항체들은 적혈구 세포의 적혈구 응집 반응을 유의미한 수준으로 야기하지 않는다. 몇몇 경우, 유의미한 수준의 세포 응집은 기존의 CD47 항체들의 존재하에서 응집 수준을 말한다. 한 가지 측면에 있어서, 본 발명의 CD47 항체들의 존재하에서 응집 수준은 기존 CD47 항체들의 존재하에서 응집 수준과 비교하여 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 99% 이상 저감된다. 몇 가지 구현예에 있어서, 본 발명의 CD47 항체들은, 본 발명의 CD47 항체들의 존재하에서 응집 수준이 기존 CD47 항체들의 존재하에서 응집 수준과 비교하여 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 99% 이상 저감된다면, 유의미한 수준의 응집을 야기하지 않는 것이다. 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 CD47 항체들은, 본 발명의 CD47 항체들의 존재하에서 응집 수준이 CD47 항체인 1B4의 존재하에서 응집 수준과 비교하여 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 99% 이상 저감된다면, 유의미한 수준의 응집을 야기하지 않는 것으로, 여기서 1B4는 각각 SEQ ID NO: 80 및 SEQ ID NO: 81로 제시되는 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 포함한다. 좋기로는, 본 발명의 CD47 항체들은 10 pM 내지 10 μM의 항체 농도, 예컨대 50 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 1 μM 또는 5 μM의 항체 농도에서 유의미한 수준의 세포 응집을 야기하지 않는다.

[0010] [0007] 또한, 본 발명의 항체들은 이 기술 분야에 알려진 항체들과 비교하여 종양 모델에서도 현저히 더욱 강력하다. 예컨대, 본 발명의 CD47 항체들의 존재하에 종양 세포를 식균하는 대식세포의 능력은 기존의 CD47 항체들의 존재하에서 대식세포의 종양 세포 식균 능력과 비교하여 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 99% 이상 증가한다.

[0011] [0008] 이 기술 분야의 숙련자라면 과도한 실험없이도 응집 수준, 예컨대 RBC의 적혈구 응집 반응 수준을 정량하는 것이 가능함을 알 것이다. 예컨대, 이 기술 분야의 숙련자라면 하기 실시예에서 기술되는 바와 같이, 본 발명의 CD47 항체들의 존재하에서 적혈구 응집 반응 시험을 수행한 후 RBC 점 (dot) 영역을 측정함으로써 적혈구 응집 반응 수준이 확인된다는 것을 알 것이다. 몇몇 경우, 본 발명의 CD47 항체의 존재하에서 RBC 점 영역은 CD47 항체의 부재하, 즉 적혈구 응집 반응 0점 상태의 RBC 점 영역과 비교된다. 이러한 방식으로, 적혈구 응집 반응은 기저 수준 대조군에 대하여 정량된다. RBC 점 영역이 클수록 더 높은 수준의 적혈구 응집 반응에 해당한다. 또는, RBC 점의 밀도계측 역시 적혈구 응집 반응을 정량하는데 이용될 수 있다.

[0012] [0009] 본 발명에서 개시되는 CD47 항체들은 암 또는 기타 종양성 질환의 치료, 진행 지연, 재발 방지 또는 그 증상의 경감에 유용하다. 예컨대, 본 발명에서 개시되는 CD47 항체들은 혈액학상 악성종양 및/또는 종양, 예컨대 혈액학상 악성종양 및/또는 종양의 치료에 유용하다. 예컨대, 본 발명에서 개시되는 CD47 항체들은 CD47+ 종양의 치료에 유용하다. 비제한적 예시의 방식으로, 본 발명에서 개시되는 CD47 항체들은 비호지킨 림프종 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 다발성 골수종 (MM), 유방암, 난소암, 두부 및 경부암, 방광암, 흑색종, 대장암, 췌장암, 폐암, 평활근종, 평활근육종, 신경 교종, 교아세포종 등의 치료에 유용하다. 고형 종양으로는, 예컨대 유방 종양, 난소 종양, 폐 종양, 췌장 종양, 전립선 종양, 흑색종 종양, 대장 종양, 폐 종양, 두부 및 경부 종양, 방광 종양, 식도 종양, 간 종양 및 신장 종양을 들 수 있다.

[0013] [0010] 본 발명에서 사용되는 바, "혈액학적 암"은 혈액암을 말하고, 무엇보다 백혈병, 림프종 및 골수종을 포함한다. "백혈병"은 감염에 대항하기에 효과적이지 못한 백혈구 세포들이 지나치게 많이 만들어짐으로써 혈액을 구성하는 다른 부분들, 예컨대 혈소판 및 적혈구 세포들을 밀어내게 되는 혈액암을 말한다. 백혈병의 경우 급성 또는 만성으로 분류된다는 것이 알려져 있다. 비제한적 예시의 방식으로, 특정형의 백혈병은 급성 림프구성 백혈병 (ALL); 급성 골수성 백혈병 (AML); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 만성 골수성 백혈병 (CML); 골수 증식성 질환/종양 (MPDS); 및 골수형성 이상 증후군을 포함한다. "림프종"은 무엇보다, 호지킨 림프종, 지연형 및 공격형 비호지킨 림프종 양자 모두, 버킷 림프종, 및 여포성 림프종 (소세포 및 대세포)을 말하는 것일 수 있다. "골수종"은 다발성 골수종 (MM), 거대 세포 골수종, 중쇄 골수종 및 경쇄 또는 벤슨-존스 골수종을 말하는 것일 수 있다.

[0014] [0011] 예시적인 본 발명의 모노클로날 항체로는, 예컨대 본 발명에 개시되는 항체들을 들 수 있다. 예시적인

항체로는 SEQ ID NOs: 5-30으로부터 선택되는 가변 중쇄와 SEQ ID NOs: 31-47로부터 선택되는 가변 경쇄를 갖는 항체들을 들 수 있다. 또한, 상기 항체들로는 SEQ ID NOs: 5-30 중 하나 이상에 설명된 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 그 이상 동일한 가변 중쇄와, SEQ ID NOs: 31-47 중 하나 이상에 설명된 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 그 이상 동일한 가변 경쇄를 갖는 항체들을 들 수 있다. 좋기로는, 상기 항체들은 인간 CD47을 인식하고 그에 결합하지만 인간 적혈구 세포의 적혈구 응집 반응을 유의한 수준으로 야기하지는 않는다. 본 발명에서 이들 항체들은 각각 CD47 항체들로 불린다. CD47 항체들은 완전 인간 모노클로날 항체들 (fully human monoclonal antibodies) 뿐 아니라, 인간화 모노클로날 항체들과 키메라 항체들을 포함한다. 이들 항체들은 인간 CD47에 대하여 특이성을 나타내며, 적혈구 세포의 응집 반응을 유의한 수준으로 야기하지 않으면서 CD47의 발현, 활성 및/또는 신호 전달을 조절, 예컨대 차단, 억제, 저감, 길항, 중화 또는 달리 말하면 간섭하는 것으로 밝혀졌다.

[0015] [0012] 예컨대, CD47의 발현을 억제 (예컨대, CD47의 세포 표면 발현 억제), 그 활성 및/또는 신호 전달을 억제하거나, CD47과 SIRPα 간의 상호 작용을 간섭함으로써 본 발명에서 제공되는 CD47 항체들은 억제 활성을 나타낸다. 본 발명에서 제공되는 항체들은 CD47, 예컨대 인간 CD47에 결합하거나 또는 다르게는 그를 간섭하면서 CD47의 발현 또는 활성을 완전히 또는 부분적으로 저감시키거나 다르게는 조절한다. CD47의 생물학적 기능의 저감 또는 조절은 상기 항체들과 인간 CD47 폴리펩타이드 및/또는 펩타이드 간의 상호 작용으로 완결되고, 유의미하며 또는 그것이 일부를 이룬다. 상기 항체의 존재하에서 CD47의 발현 또는 활성 수준이 본 발명에서 개시하는 항체와 상호 작용하지 않을 때, 예컨대 결합하지 않을 때 CD47의 발현 또는 활성의 수준과 비교하여 95% 이상, 예컨대 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 감소하는 경우 상기 항체는 CD47의 발현 또는 활성을 완전히 억제한다고 여겨진다. 상기 CD47 항체의 존재하에서 CD47의 발현 또는 활성 수준이 본 발명에서 개시하는 항체와 결합하지 않을 때 CD47의 발현 또는 활성의 수준과 비교하여 50% 이상, 예컨대 55%, 60%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 감소하는 경우 상기 항체는 CD47의 발현 또는 활성을 유의미하게 억제한다고 여겨진다. 상기 항체의 존재하에서 CD47의 발현 또는 활성 수준이 본 발명에서 개시하는 항체와 상호 작용하지 않을 때, 예컨대 결합하지 않을 때 CD47의 발현 또는 활성의 수준과 비교하여 95% 미만, 예컨대 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 감소하는 경우 상기 항체는 CD47의 발현 또는 활성을 부분적으로 억제한다고 여겨진다.

[0016] [0013] 본 발명의 항체들은 또한 CD47에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체들을 포함하는데, 여기서 상기 항체는 유의미한 수준의 세포 응집, 예컨대 적혈구 세포 응집 반응 ("RBC 적혈구 응집 반응")을 야기하지 않는다. 본 발명의 항체들은 CD47 양성 세포들의 군집을 촉진하지 않는 방식으로 CD47에 고유하게 결합하지만; 본 발명 항체들의 세포 표면상의 CD47에 결합하고 세포 군집 형상을 일으키지 않는 능력은 적혈구 세포에 국한되는 것은 아니다.

[0017] [0014] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 항체와 담체를 포함할 수 있다. 이들 약학적 조성물은 키트, 예컨대 진단 키트에 포함될 수 있다.

[0018] [0015] 본 발명은 CD47에 결합하는 모노클로날 항체 또는 그의 면역학적 활성 단편을 제공하는데, 여기서 상기 항체는 투여 후에 유의미한 수준의 세포 응집 반응을 야기하지 않는 것, 예컨대 상기 항체는 투여 후에 적혈구 세포들의 적혈구 응집 반응을 유의미한 수준으로 야기하지 않는다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체는 키메라, 인간화 또는 완전 인간 항체 (fully human antibody)이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체는 인간 CD47에 결합한다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 그의 면역학적으로 활성인 단편은 CD47이 SIRPα와 상호 작용하는 것을 막는다. 상기 항체의 존재하에서 CD47/SIRPα 상호 작용의 수준이, 상기 항체와 상호 작용하지 않을 때, 예컨대 결합하지 않을 때 CD47/SIRPα 상호 작용 수준과 비교하여 95% 이상, 예컨대 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 감소하는 경우 상기 항체는 CD47와 SERPα의 상호 작용을 완전히 억제한다고 여겨진다. 상기 항체의 존재하에서 CD47/SIRPα 상호 작용 수준이, 상기 항체와 상호 작용하지 않을 때, 예컨대 결합하지 않을 때 CD47/SIRPα 상호 작용의 수준과 비교하여 95% 미만, 예컨대 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 감소하는 경우 상기 항체는 CD47/SIRPα 상호 작용을 부분적으로 억제한다고 여겨진다.

[0019] [0016] 대상체의 암을 치료 또는 예방하기에 충분한 항체량은, 예컨대 CD47 신호 전달을 저감시키기에 충분한 양이다 (예컨대, 문헌 {Yamauchi et al., 2013 Blood, Jan 4. [Epub ahead of print]; Soto-Pantoja et al., 2013 Expert Opin Ther Targets, 17: 89-103; Irandoust et al., 2013 PLoS One, Epub Jan 8; Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24 :225-32; Theocharides et al., 2012 J Exp Med, 209(10): 1883-99; Cssanyi et al., 2012 Arterioscler Thromb Vasc Biol, 32: 2966-73; Maxhimer et al., 2009 Sci Transl Med, 1: 3ra7; Sarfati et al., 2008 Curr Drug Targets, 9: 842-850; Miyashita et al., 2004 Mol Biol Cell, 15: 3950-3963; E.J. Brown 및 W.A. Frazier, 2001 Trends Cell Biol, 11: 130-135; Oldenborg et al., 2001 J Exp

Med, 193: 855-862; Blazar et al., 2001 J Exp Med, 194: 541-549; Oldenborg et al., 2000 Science, 288: 2051-2054; 및 Gao et al., 1996 J Biol Chem, 271: 21-24} 참조). 예컨대, 대상체의 암을 치료 또는 예방하기에 충분한 항체량은 CD47/SIRPα 신호 전달축에서 CD47/SIRPα 상호 작용에 의하여 생성되는 대식세포의 식균 억제 신호를 저감시키기에 충분한 양이며, 즉 본 발명의 항체는 CD47-발현 세포의 대식세포-매개 식균 작용을 촉진한다. 본 발명에서 사용되는 바, "저감된"이라는 용어는 본 발명의 항체의 존재하에서 감소된 CD47 신호 전달을 의미한다. 본 발명의 CD47 항체의 존재하에서 CD47 신호 전달의 수준이 대조군 수준의 CD47 신호 전달(즉, 상기 항체의 부재하에서 CD47 신호 전달 수준)보다 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 이상 낮은 경우, CD47 매개 신호 전달은 감소된다. CD47 신호 전달 수준은 다양한 임의의 표준 기법들을 이용하여 측정되는데, 예컨대 비제한적 예시의 방식으로, 하류 유전자 활성화 측정 및/또는 CD47 활성화에 반응성인 루시퍼라제 리포터 분석을 들 수 있다. 이 기술 분야의 숙련자라면 CD47 신호 전달 수준이 다양한 분석법, 예컨대 시판되는 키트들을 포함하여 측정될 수 있음을 이해할 것이다.

[0020] [0017] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 그의 면역학적으로 활성인 단편은 IgG 이소형이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체의 불변 영역은 인간 IgG1 이소형의 것이고, 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

[0021]
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

[0022] [0018] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 인간 IgG1 불변 영역은, 상기 항체의 글리코실화를 방지하기 위하여 아미노산 Asn297 (박스, 카바트 번호)에서 변형되고, 예컨대 Asn297Ala (N297A)이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체의 불변 영역은 Fc 수용체 상호 작용을 변화시키기 위하여 아미노산 Leu235 (카바트 번호)에서 변형되는데, 예컨대 Leu235Glu (L235E) 또는 Leu235Ala (L235A)이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체의 불변 영역은 Fc 수용체 상호 작용을 변경시키기 위하여 아미노산 Leu234 (카바트 번호)에서 변형되는데, 예컨대 Leu234Ala (L234A)이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체의 불변 영역은 아미노산 234 및 235 양자 모두에서 변경되는데, 예컨대 Leu234Ala 및 Leu235Ala (L234A/L235A)이다 (문헌 [Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest]의 EU index).

[0023] [0019] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체의 불변 영역은 인간 IgG2 이소형의 것이고, 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

[0024]
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER
KCCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC
KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG

[0025]
FYPSDISVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 2)

[0026] [0020] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 인간 IgG2 불변 영역은 상기 항체의 글리코실화를 방지하기 위하여 아미노산 Asn297 (박스, 카바트 번호)에서 변형되는데, 예컨대 Asn297Ala (N297A)이다.

[0027] [0021] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체의 불변 영역은 인간 IgG3 이소형의 것이고, 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRVEL
KTPLGDTTHT CPRCPEPKSC DTPPPCPRCP EPKSCDTPPP CPRCPEPKSC
DTPPPCPRCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG
NIFSCSVMHE ALHNRFTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

[0028]

[0029] [0022] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 인간 IgG3 불변 영역은 상기 항체의 글리코실화를 방지하기 위하여 아미노산 Asn297 (박스, 카바트 번호)에서 변형되는데, 예컨대 Asn297Ala (N297A)이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 인간 IgG3 불변 영역은 그 반감기를 연장하기 위하여 아미노산 435에서 변형되는데, 예컨대 Arg435His (R435H)이다 (문헌 [Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest]의 EU index).

[0030] [0023] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체의 불변 영역은 인간 IgG4 이소형의 것이고, 하기의 아미노산 서열을 갖는다:

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK (SEQ ID NO: 4)

[0031]

[0032] [0024] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 인간 IgG4 불변 영역은 가닥 교환을 방지하거나 저감시키기 위하여 힌지 영역 내에서 변형되는데, 예컨대 Ser228Pro (S228P)이다. 다른 구현예에 있어서, 상기 인간 IgG4 불변 영역은 Fc 수용체 상호 작용을 변경시키기 위하여 아미노산 235에서 변형되는데, 예컨대 Leu235Glu (L235E)이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 IgG4 불변 영역은 상기 힌지 내 및 아미노산 235에서 변형되는데, 예컨대 Ser228Pro 및 Leu235Glu (S228P/L235E)이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 인간 IgG4 불변 영역은 상기 항체의 글리코실화를 방지하기 위하여 아미노산 Asn297 (카바트 번호)에서 변형되는데, 예컨대 Asn297Ala (N297A)이다 (문헌 [Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest]의 EU index).

[0033] [0025] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 인간 IgG 불변 영역은 FcRn 결합을 강화하기 위하여 변형된다. FcRn에의 결합을 강화하는 Fc 돌연변이의 예로는 Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (각각 M252Y, S254T, T256E)(카바트 번호, Dall'Acqua et al 2006, J. Biol Chem Vol 281(33) 23514-23524), 또는 Met428Leu과 Asn434Ser (M428L, N434S) (Zalevsky et al 2010 Nature Biotech, Vol 28(2) 157-159)(문헌 [Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest]의 EU index)을 들 수 있다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 인간 IgG 불변 영역은 항체-의존성 세포 독성 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 및/또는 보체-의존성 세포 독성 (complement-dependent cytotoxicity, CDC)을 변경시키기 위하여 변형되는데, 예컨대 문헌 [Natsume et al., 2008 Cancer Res, 68(10): 3863-72; Idusogie et al., 2001 J Immunol, 166(4): 2571-5; Moore et al., 2010 mAbs, 2(2): 181-189; Lazar et al., 2006 PNAS, 103(11): 4005-4010, Shields et al., 2001 JBC, 276(9): 6591-6604; Stavenhagen et al., 2007 Cancer Res, 67(18): 8882-8890; Stavenhagen et al., 2008 Advan. Enzyme Regul., 48: 152-164; Alegre et al, 1992 J Immunol, 148: 3461-3468; Reviewed in Kaneko and Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1):1-11]에 개시된 아미노산 변형들이다.

[0034] [0026] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 인간 IgG 불변 영역은 헤테로이합체화 (heterodimerization)를 유도하기 위하여 변형된다. 예컨대, CH3 도메인 내 Thr366에서 아미노산이 변형되면, 예컨대 Try (T366W)와 같이 보다 벌키한 아미노산으로 교체가 되는 경우, 이는 Thr366, Leu368, 및 Tyr407의 위치에서 보다 덜 벌키한 아미노산들, 예컨대 각각 Ser, Ala 및 Val (T366S/L368A/Y407V)로의 아미노산 변형이 있는 제2의 CH3 도메인과 보다 우선적으로 짝을 이룰 수 있다. CH3 변형을 통한 헤테로이합체화는 이황화 결합을 도입함으로써 더 안정화될 수 있는데, 예컨대 반대편 CH3 도메인 상의 Ser354을 Cys으로 (S354C) 및 Y349을 Cys으로 (Y349C) 변화시킴으로써 더 안정화될 수 있다 (문헌 [Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15]에서 검토된 바 있음).

[0035] [0027] 또한, 본 발명은 CD47에 결합하는 1종 이상의 모노클로날 항체 또는 그의 면역학적으로 활성인 단편을 포함하는 약학적 조성물을 제공하고, 여기서 상기 항체는 투여 후 적혈구 세포의 적혈구 응집 반응을 유의미한 수준으로 야기하지 않는다.

[0036] [0028] 적혈구 응집 반응은 동형 상호 작용 (homotypic interaction)의 한 예이고, 여기서 CD47을 발현하는 2개의 세포는 2가의 CD47 결합체 (binding entity)로 처리시 응집 또는 군집의 원인이 된다. 세포 표면상의 CD47과 결합하고 세포의 군집 현상을 야기하지 않는 본 발명의 항체들의 능력은 적혈구 세포에 국한되는 것은 아니다. 본 발명의 항체들이 CD47 양성 세포주들, 예컨대 다우디 세포 (Daudi cells)의 군집을 촉진하지 않는 방식으로 고유하게 CD47과 결합함이 관찰되었다.

[0037] [0029] 몇 가지 경우에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NOs: 5-30으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 가변 중쇄 (VH) 영역을 포함한다. 필요에 따라, 상기 항체는 SEQ ID NOs: 31-47로 이루어지는 군으로부터 선택되는 가변 경쇄 (VL) 영역을 포함한다. 몇 가지 경우에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NOs: 5-30으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역과 SEQ ID NOs: 31-47로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VL 영역을 포함한다. 또한, 본 발명의 항체들은 SEQ ID NOs: 5-30 중 하나 이상에 기재되는 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 그 이상으로 동일한 가변 중쇄와, SEQ ID NOs: 31-47 중 하나 이상에 기재되는 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 그 이상으로 동일한 가변 경쇄를 갖는 항체들을 포함한다. 다른 측면에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NOs: 31-39, 42, 43, 44, 및 47 중 임의의 어느 하나로 제공되는 VL 영역과 짝을 이루는, SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22, 및 27-30 중 임의의 어느 하나로 제공되는 VH 영역을 포함한다. 또 다른 구현예에 있어서, 상기 항체는 SEQ ID NOs: 31, 32, 35, 40, 41, 42, 43, 44, 및 47 중 임의의 어느 하나로 제공되는 VL 영역과 짝을 이루는, SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 12, 15-17, 20-22, 및 27-30 중 임의의 어느 하나로 제공되는 VH 영역을 포함한다. 또 다른 측면에 있어서, 상기 항체는 표 1에 나열되는 조합으로부터 선택되는 VH 영역 및 VL 영역의 조합을 포함한다.

[0038] [0030] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 CD47 항체 또는 그의 면역학적으로 활성인 단편은 SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, 또는 SEQ ID NO: 66에 개시되는 VH 상보성 결정 영역 1 (CDR1) 서열, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, 또는 SEQ ID NO: 76에 개시되는 VH CDR2 서열, SEQ ID NO: 52 또는 SEQ ID NO: 77에 개시되는 VH CDR3 서열, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67, 또는 SEQ ID NO: 68에 개시되는 VL CDR1 서열, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, 또는 SEQ ID NO: 71에 개시되는 VL CDR2 서열과 SEQ ID NO: 55에 개시되는 VL CDR3 서열을 포함한다. 예컨대, 상기 항체 또는 그의 면역학적으로 활성인 단편은 SEQ ID NO: 50에 개시되는 VH CDR1 서열, SEQ ID NO: 51에 개시되는 VH CDR2 서열, SEQ ID NO: 52에 개시되는 VH CDR3 서열, SEQ ID NO: 53에 개시되는 VL CDR1 서열, SEQ ID NO: 54에 개시되는 VL CDR2 서열과 SEQ ID NO: 55에 개시되는 VL CDR3 서열을 포함한다. 또 다른 예시에 있어서, 상기 항체 또는 그의 면역학적으로 활성인 단편은 SEQ ID NO: 50에 개시되는 VH CDR1 서열, SEQ ID NO: 72에 개시되는 VH CDR2 서열, SEQ ID NO: 52에 개시되는 VH CDR3 서열, SEQ ID NO: 53에 개시되는 VL CDR1 서열, SEQ ID NO: 71에 개시되는 VL CDR2 서열과 SEQ ID NO: 55에 개시되는 VL CDR3 서열을 포함한다.

[0039] [0031] 한 가지 구현예에 있어서, 본 발명의 항체들은 그 중쇄가 CD47 발현 세포의 세포막 근처에 자리잡는 반면 경쇄는 CD47 상의 SIRPα 결합 부위를 가리도록 하는 헤드 투 사이드 (head to side) 배향으로 CD47에 결합한다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 항체들은 그 경쇄가 CD47 발현 세포의 세포막 근처에 자리잡는 반면 중쇄는 CD47 상의 SIRPα 결합 부위를 가리도록 하는 헤드 투 사이드 (head to side) 배향으로 CD47에 결합한다.

[0040] [0032] 상기 CD47 항체들은 SEQ ID NO: 147 (즉, 시그널 서열 (아미노산 1-18)을 제외한 SEQ ID NO: 148)에 따라 번호매기는 경우 CD47의 아미노산 잔기 1-116 중 임의의 하나를 포함하는 에피토프에 결합한다. 예컨대, 본 발명의 항체들은, SEQ ID NO: 147에 따라 번호매기는 경우 CD47의 아미노산 잔기 Q31, N32, T33, T34, E35, V36, Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50, D51, G52, A53, L54, N55, K56, S57, T58, V59, P60, T61, D62, F63, S64, S65, A66, K67, I68, E69, V70, S71, Q72, L73, L74, K75, G76, D77, A78, S79, L80, K81, M82, D83, K84, S85, D86, A87, V88, S89, H90, T91, G92, N93, Y94, T95, C96, E97, V98, T99, E100, L101, T102, R103, E104, G105, E106, T107, I108, I109, 및 E110 중 하나 이상을 포함하는 에피토프에 결합한다.

[0041] [0033] 몇 가지 경우에 있어서, 본 발명의 항체들은 SEQ ID NO: 147에 따라 번호매기는 경우 CD47의 아미노산

잔기 Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50, 및 D51 중 하나 이상을 포함하는 불연속적 에피토프에 결합한다. 예컨대, 본 발명의 상기 항체들은 SEQ ID NO: 147에 따라 번호매기는 경우 CD47의 아미노산 잔기 Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104, 또는 E106을 포함하는 불연속적 에피토프에 결합한다. 예컨대, 본 발명의 항체들은 SEQ ID NO: 147에 따라 번호매기는 경우 적어도 CD47의 잔기 KGRD (SEQ ID NO: 56) 루프 (잔기 43-46)를 포함하는 불연속적 에피토프에 결합한다. 예컨대, 본 발명의 항체들은 SEQ ID NO: 147에 따라 번호매기는 경우 적어도 CD47의 잔기 Y37, K39, K41, KGRD (SEQ ID NO: 56) 루프 (잔기 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104, 및 E106를 포함하는 불연속적 에피토프에 결합한다. 예컨대, 본 발명의 항체들은 SEQ ID NO: 147에 따라 번호매기는 경우 적어도 CD47의 잔기 Y37, K39, K41, KGRD (SEQ ID NO: 56) 루프 (잔기 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104, 및 E106를 포함하는 불연속적 에피토프에 결합한다.

[0042] [0034] 본 발명에서 기재되는 CD47 항체들의 VH 영역은 주로 CD47의 KGRD (SEQ ID NO: 56) 루프에 결합하는데 관여한다. 따라서, 본 발명의 항체들이 결합하는 고유한 에피토프는 CD47의 측면상에 있다. 이 기술 분야에 알려진 기존의 CD47 항체들과는 대조적으로, 본 발명에 개시되는 CD47 항체들의 VH 도메인이 막 중심부 위치로 배향하는 것은 세포 군집, 예컨대 적혈구 세포 응집 반응을 방지하는 이들 항체의 중요한 특징이며, 이는 상기 항체들로 하여금 주변 세포들 상의 CD47 분자와 가교할 수 없도록 한다. 더하여, 본 발명에 개시되는 CD47 항체들의 VK 도메인은 SIRPα 결합에 관여하는 Y37, T102, 및 E104와 같은 정상부 잔기들과 상호 작용하기 때문에 CD47에의 SIRPα 결합을 물리적으로 방해하는 것은 주로 VK 도메인이다.

[0043] [0035] 또한, CD47이 SIRPα와 상호작용하는 것을 방지하기 위하여 본 발명에서 개시되는 CD47 항체들과 경쟁하는 단리된 항체 또는 그들의 면역학적 활성 단편도 제공된다.

[0044] [0036] 본 발명은 SEQ ID NO: 147에 따라 번호매기는 경우, CD47의 아미노산 잔기 Y37, K39, K41, K43, G44, R45, D46, D51, H90, N93, E97, T99, E104, 및 E106를 포함하는 폴리펩타이드를 제공한다. 또한, SEQ ID NO: 147에 따라 번호매기는 경우 CD47의 아미노산 잔기 1-116 중 임의의 하나를 포함하는 폴리펩타이드 역시 제공된다. 예컨대, 상기 폴리펩타이드는 SEQ ID NO: 147에 따라 번호매기는 경우 CD47의 아미노산 잔기 Q31, N32, T33, T34, E35, V36, Y37, V38, K39, W40, K41, F42, K43, G44, R45, D46, I47, Y48, T49, F50, D51, G52, A53, L54, N55, K56, S57, T58, V59, P60, T61, D62, F63, S64, S65, A66, K67, I68, E69, V70, S71, Q72, L73, L74, K75, G76, D77, A78, S79, L80, K81, M82, D83, K84, S85, D86, A87, V88, S89, H90, T91, G92, N93, Y94, T95, C96, E97, V98, T99, E100, L101, T102, R103, E104, G105, E106, T107, I108, I109, 및 E110 중 하나 이상을 포함한다. 또한, 이러한 폴리펩타이드를 항원으로서, 예컨대 CD47 항체에 결합하는 항원으로서 이용하는 방법 역시 제공된다.

[0045] [0037] 또한, 본 발명은, 그를 필요로 하는 대상체에게 CD47에 결합하는 모노클로날 항체 하나 이상 또는 그들의 면역할적 활성 단편을 투여함으로써 암 또는 기타 종양 질환의 증상을 경감시키는 방법을 역시 제공하는데, 여기서 상기 항체는 투여 후에 적혈구 세포의 적혈구 세포 응집 반응을 유의미한 수준으로 야기하지 않는다. 상기 항체는 대상체의 상기 암 또는 기타 종양 질환의 증상을 경감시키기에 충분한 양으로 투여된다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 대상체는 인간이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체는 키메라 항체, 인간화 항체 또는 완전 인간 항체이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체는 인간 CD47에 결합한다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 CD47로 하여금 SIRPα와 상호 작용하는 것을 막는다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 IgG1 이소형, IgG2 이소형, IgG3 이소형, 및 IgG4 이소형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 IgG 이소형이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 그 면역학적 활성 단편은 IgG4P 및 IgG4PE으로부터 선택되는 IgG 이소형이다.

[0046] [0038] 몇 가지 구현예에 있어서, 본 발명에 개시되는 CD47 항체들은 하나 이상의 추가적인 제제들과 함께 또는 추가적인 제제들과 조합하여 사용된다. 적절한 추가 제제들은 목적하는 용도, 예컨대 암과 같은 목적하는 용도를 위한 현재의 약학적 및/또는 수술 요법들을 포함한다. 예컨대, 상기 CD47 항체들은 하나 이상의 추가적인 화학요법 또는 항종양 제제들과 함께 사용될 수 있다. 또는, 상기 추가적인 화학요법 제제는 방사선요법이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 화학요법 제제는 세포 사멸 유도제이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 화학요법 제제는 원형질막에 걸친 포스포리피드 비대칭의 손상을 유도하는데, 예컨대 포스파티딜세린 (PS)의 세포 표면 노출을 야기한다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 화학요법 제제는 소포체 (ER) 스트레스를 유도한다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 화학요법 제제는 프로테아좀 억제제이다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 화학요법 제제는 ER 단백질의 세포 표면으로의 위치 이동을 유도한다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 화학요법 제제는 칼레

티큘린 (calreticulin)의 세포 표면 노출 및 위치 이동을 유도한다.

[0047] [0039] 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 CD47 항체 및 추가적인 제제는 단일한 치료 조성물 내로 제제화되고, 상기 CD47 항체 및 추가 제제는 동시에 투여된다. 또는, 상기 CD47 항체 및 추가 제제는 서로 분리되어, 예컨대 각각이 개별적인 치료 조성물 내로 제제화되어, 상기 CD47 항체와 추가 제제는 동시에 투여되거나 또는 상기 CD47 항체와 추가 제제는 치료 요법 중 상이한 시간에 투여된다. 예컨대, CD47 항체는 상기 추가 제제의 투여 이전에 투여되거나, CD47 항체는 상기 추가 제제의 투여 후에 투여된거나, 또는 상기 CD47 항체 및 상기 추가 제제는 교대 방식으로 투여된다. 본 발명에서 개시하는 바, 상기 CD47 항체 및 추가 제제는 1회 투여 (single doses) 또는 다회 투여 (multiple doses)로 투여된다.

[0048] [0040] 이 기술 분야의 숙련자는 본 발명의 항체들이 다양한 용도를 갖는다는 것을 이해할 것이다. 예컨대, 본 발명의 항체들은 치료 제제서, 진단 키트또는 진단 수단의 시약으로서, 또는 치료 시약을 생성하는 경쟁 실험의 시약으로서 사용된다.

[0049] **도면의 간단한 설명**

[0050] [0041] 도 1a는 유세포 분석법으로 평가된, 하이브리도마 상층액에서 항체에 의한 다우디 세포 상 CD47의 결합을 묘사한 그래프이다. 도1b는 ELISA로 측정된, 하이브리도마 상층액 내의 일부 CD47 항체들의 재조합 인간 CD47로의 재조합 인간 SIRPα의 결합을 차단하는 능력을 보여주는 그래프이다.

[0051] [0042] 도 2는 유세포 분석법으로 분석한, (a) 라지 세포 (Raji cells), 버킷 림프종으로부터 유래하는 림프아구성 세포 (lymphoblastoid cells)의 배양주인 라지 세포에 대한 정제된 쥐 CD47의 결합 및 (b) CCRF-CEM 세포, CD47 양성 인간 T 세포 림프아구 유사 세포주에 대한 정제된 쥐 CD47의 결합을 묘사한 일련의 그래프들이다. 이러한 실험은 본 발명의 쥐 항체들의 결합을 시판 CD47 항체들, B6H12 및 2D3의 결합과 비교하는 것이다.

[0052] [0043] 도 3은 (a) 재조합 인간 단백질을 이용한 ELISA 또는 (b) CCRF-CEM 세포 및 재조합 인간 SIRPα 단백질을 이용한 유세포 분석법을 이용한, SIRPα 결합을 차단하는 CD47 항체들의 능력을 묘사하는 일련의 그래프들이다.

[0053] [0044] 도 4는 CD47 항체들에 의한 RBC 적혈구 응집 반응을 보여주는 일련의 사진, 그래프 및 표이다. RBC 적혈구 응집 반응은 웰 내에서 혼탁이 발생하는 것으로 증거되는 반면, 비-응집 RBC는 점상으로 나타난다. 도 4a는 모든 시험된 농도에서 2A1 항체가 어떠한 적혈구 응집 반응을 나타내지 않는다는 것을 보여준다. 적혈구 응집 반응 인덱스는 그래프 내에 설명되어 있다. 도 4b는, 2A1이 많은 CD47 항체들 중에서도 RBC를 응집시키는 불능성에 있어서 드문 것임을 보여준다. 또한, 인간 키메라 버전인 2A1 (2A1-xi)에 의한 응집 활성의 결손 역시 보여지고 있다. 도 4c는 SIRPα를 차단하지 않는 CD47 모노클로날 항체 2D3이 적혈구 응집 반응을 야기하지 않는다는 것을 보여준다. 도 4d는 적혈구 응집 반응 시험에 있어서 CD47 항체들의 고농도 범위를 보여주고, 전지대 효과 (pro-zone effect)를 입증한다. 적혈구 응집 반응 인덱스는 그래프 내에 설명되어 있다. 도 4e는 CD47 항체, 1B4에 의한 적혈구 응집 반응의 보다 좁은 농도 범위를 입증하지만, 이러한 효과는 2A1 결합에 대하여는 나타나지 않는다. 도 4f는 2A1, 키메라 2A1 (2A1-xi), 및 인간화 변이체들이 적혈구 응집 반응을 야기하지 않는다는 것을 보여준다. 대부분의 실험에 있어서, 9E4 항체 및 시판 B6H12 항체가 적혈구 응집 반응에 대한 양성 대조군으로서 사용되었다. 이들 시험에 사용된 다른 시판 항체들은 SIRPα 차단 항체, BRC126 및 CC2C6과, SIRPα 비차단 항체, 2D3였다.

[0054] [0045] 도 5는 유세포 분석법으로 시험된, 사이노몰거스 (cyno) 원숭이 B-세포 및 라지 세포에 대한 2A1과 B6H12의 결합을 보여주는 그래프이다. B6H12와 같이, 2A1도 인간 및 사이노 CD47에 균등한 친화도로 결합하고, 다만 B6H12는 2A1보다 인간 및 사이노 CD47 양자 모두에 대하여 더 낮은 친화도를 나타낸다.

[0055] [0046] 도 6은 유세포 분석법으로 시험된, 2A1, 2A1-xi, 및 B6H12의 라지 세포에 대한 결합을 묘사하는 그래프이다. 중요하게는, 이 그래프는 키메라 버전의 2A1에 있어서 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL)의 가변 영역 서열이 정확히 밝혀졌음을 보여주고 있다.

[0056] [0047] 도 7a-7j는 2A1의 인간화 변이체들의 라지 세포에 대한 결합을 보여주는 일련의 그래프들이다. 대부분의 그래프에서 2A1-xi가 내부 대조군으로서 사용되었다. 실시예 8에 기재되는 것과 같이 중쇄 및 경쇄에 대한 다수의 조합이 시험되었다.

[0057] [0048] 도 8a는 superdex200 컬럼을 갖춘 AKTA FLPC를 이용한 크기 배제 크로마토그래피로부터의 트레이스 이미지이다. 보여지는 것은 AB6.12 항체의 IgG1, IgG4P, 및 IgG4PE 변이체들이다. 3 가지 변이체들 모두 97% 이상

단량체성이다. 도 8b는 환원 조건 (R) 및 비환원 조건 (NR) 하에서의 다수의 2A1 인간화 변이체들의 쿠마시 블루 염색된 SDS-PAGE 젤 사진이다.

[0058] [0049] 도 9는 인간 단핵구 유래 대식세포 (MDM)에 의한 인간 종양 세포주의 식균 작용을 CD47 항체들이 촉진하는 능력을 묘사하는 일련의 그래프들이다. 도 9a는 식균 인덱스를 나타내는 그래프인데, 여기서 사용된 항체들은 시판 항체 B6H12, 쥐 2A1 항체, 인간화 변이체 AB2.05 항체 및 비차단 시판 항체 2D3이었다. 도 9b는 식균 인덱스를 보여주는 그래프인데, 여기서 사용된 항체들은 시판 항체 B6H12, 인간화 항체 AB2.05 (인간 IgG1), 및 인간화 항체 AB6.12의 IgG1, IgG4P, 및 IgG4PE 변이체들이었다. 이들 실험에서 CCRF-CEM 세포들은 CD47 표적 세포주로서 사용되었다.

[0059] [0050] 도 10은 라지 종양 모델에서 CD47 항체의 항-종양 효과를 보여주는 일련의 그래프들이다. 도 10a는 쥐 항체 9E4, 1B4, 2A1, 및 시판 항체 B6H12의 효능을 보여주는 그래프이다. 도 10b는 쥐 2A1 항체와 함께, 인간화 항체 AB6.12의 IgG1, IgG4P, 및 IgG4PE 이소형의 효능을 보여주는 그래프이다. 양 모델 모두에서, 마우스들은 주당 3회 200 μg 항체로 처리되었다.

[0060] [0051] 도 11은 CD47-IgV와, SIRPα-IgV 도메인과의 공-결정 복합체에 대한 그래픽 표현 (A, (Protein Data Bank (PDB) Reference No. 2JJS), B6H12과의 공-결정 복합체에 대한 그래픽 표현 (B), 및 2A1과의 공-결정 복합체에 대한 그래픽 표현 (C)이다. 2A1 및 B6H12는 매우 상이한 배향으로 CD47 상의 특유의 에피토프에 결합하고, 양자 모두 SIRPα 결합 부위와 중첩된다. 2A1 항체는 CD47 단백질 상에 헤드 투 사이드 배향으로 결합한다.

[0061] **발명의 상세한 설명**

[0062] [0052] 본 발명은 CD47, 예컨대 인간 CD47에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체를 제공한다. 본 발명에서는 이들 항체를 통칭 CD47 항체들로 부른다.

[0063] [0053] 면역글로불린 수퍼패밀리에 속하는 다기능성 막통과 수용체인 CD47은 대식세포 상의 SIRPα (신호-조절-단백질 α)와 상호 작용함으로써, 식균 작용을 약화시킨다. 이러한 경로를 취한 암 세포들은 식균 작용을 모면한다. 이하 자세히 설명하는 바와 같이, 이것은 종양 면역 회피의 새로운 메커니즘이고, CD47을 치료적으로 표적하는 것은 다수의 암에서 광범위한 응용 대상이다.

[0064] [0054] CD47의 발현은 많은 특징적인 악성종양, 예컨대 비호지킨 림프종 (NHL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 난소암, 신경교종, 교아세포종 등에 있어서 좋지 않은 임상적 결과와 연관되어 있다. 또한, CD47은 백혈병 및 고형 종양 양자 모두에 있어서 암 줄기 세포 마커로서 확인되었다 (Jaiswal et al., 2009 Cell, 138(2): 271-85; Chan et al., 2009 Proc Natl Acad Sci USA, 106(33): 14016-21; Chan et al., 2010 Curr Opin Urol, 20(5): 393-7; Majeti R et al., 2011 Oncogene, 30(9): 1009-19).

[0065] [0055] CD47 차단 항체들은 다수의 생체 내 (*in vivo*) 종양 모델에서 항-종양 활성을 증명하였다. 또한, 이들 항체들은 종양 모델에서 Rituxan®및 Herceptin®을 비롯한 다른 치료 항체들과 시너지를 일으키는 것으로 알려졌다. CD47의 SIRPα과의 상호 작용을 차단하면 대식세포에 의한 CD47 발현 세포들의 식균 작용을 촉진할 수 있다 (문헌 [Chao et al., 2012 Curr Opin Immunol, 24(2): 225-32]에 보고). CD47 결손 마우스들은 방사선 요법에 현저히 내성을 갖고, 이는 방사선요법과 조합하여 CD47을 표적하는데 대한 임무를 제시한다 (Isenberg et al., 2008 Am J Pathol, 173(4): 1100-1112; Maxhimer et al., 2009 Sci Transl Med, 1(3): 3ra7). 또한, 이들 마우스들의 공통 유전자 종양 모델은 야생형 마우스들에 비하여 감소된 골 전이를 나타낸다 (Uluckan et al., 2009 Cancer Res, 69(7): 3196-204).

[0066] [0056] 중요하게는, 대부분의 CD47 항체들은 인간 적혈구의 적혈구 응집 반응을 야기하는 것으로 보고되어 왔다. 적혈구 응집 반응은 동형 상호 작용의 한 예이고, 여기서 CD47을 발현하는 2개의 세포는 2가의 CD47 결합체로 처리시 응집 또는 군집의 원인이 된다. 예컨대, 전장 IgH 또는 $F(ab')_2$로서, CD47 항체, MABL은 적혈구의 적혈구 응집 반응을 야기하는 것으로 보고되어 왔고, 오로지 MABL이 scFv 또는 2가의 scFv로 변화된 경우에만, 이러한 효과가 완화되었다 (예컨대, 문헌 [Uno S, Kinoshita Y, Azuma Y et al. Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia. Oncol Rep 2007; 17: 1189-94; Kikuchi Y, Uno S, Yoshimura Y et al. A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. Biochem Biophys Res Commun 2004; 315: 912-8] 참조). 알려진 다른 CD47 항체들, 예컨대 B6H12, BRC126, 및 CC2C6 역시 이하 자세히 설명되는 바와 같이 RBC의 적혈구 응집 반응을 야기한다. 따라서, 세포의 응집은 기존의 전장 IgG 항체들을 이용하여 치료적으로 CD47을 표적화하는 주요

한계점이다.

[0067] [0057] 게다가, CD47 항체들의 중요한 특징은 대식세포에 의한 CD47 발현 세포들의 식균 작용을 촉진하기 위하여 CD47과 SIRPα의 상호 작용을 차단하는 능력이다. 많은 기존의 CD47 항체들이 SIRPα를 차단하지만, 본 발명의 이전에는, SIRPα를 차단했던 기존의 항체들은 적혈구 응집 반응이라는 부작용을 야기하였고, 이는 전술한 바와 같이 원치 않는 바이다. 다른 기존의 항체들, 예컨대 2D3는 적혈구 응집 반응을 야기하지는 않지만, 이들 항체들은 또한 SIRPα를 차단하지 못하고, 식균 작용을 촉진하는데 있어서 비효율적이다. 따라서, 본 발명 이전에는, 세포의 군집없이 SIRPα를 차단하는 CD47 항체들을 동정하고자 하는 강한 요구가 있었다.

[0068] [0058] 본 발명의 CD47 항체들은 적혈구 응집 반응이라는 원치 않는 효과를 회피함으로써 치료적으로 CD47을 표적하는 효능을 증가시키고, CD47의 SIRPα와의 상호 작용을 차단하는 능력을 유지함으로써 CD47 발현 세포들의 식균 작용을 촉진한다. 구체적으로, 본 발명의 전장 IgG CD47 항체들 (예컨대, 2A1 및 표 1에 제공되는 것들을 포함하는 그 인간화 유도체들)은 세포들을 유의한 수준으로 응집시키지 않는다. 예컨대, 본 발명의 CD47 항체들은 유의한 수준으로 RBC를 응집시키지 않는다. 본 발명에 개시되는 것들은 SIRPα를 차단하면서도 유의미한 수준의 적혈구 응집 반응을 야기하지 않는 전장 IgG 형태의 CD47 항체로서 최초의 것이다. 이와 함께, 본 발명의 항체들 (예컨대, 2A1 항체 및 그 인간화 유도체들)은 SIRPα를 차단하지만 유의한 수준의 적혈구 응집 반응을 야기하지 않는 그들의 능력에 있어서 기존의 CD47 항체들 중에서 고유하다.

[0069] [0059] 본 발명의 CD47 항체들은 많은 바람직한 특징들을 나타내는데, 예컨대, 비제한적 예시의 방식으로, 유의한 수준으로 적혈구의 응집 반응을 야기함이 없이 또는 달리 말하면 적혈구의 응집 반응을 조절함이 없이 CD47과 그 리간드인 SIRPα 간의 상호작용을 강력하게 차단할 뿐 아니라, 강력한 항-종양 활성을 나타낸다. 예컨대, 본 발명의 CD47 항체들은, 본 발명의 CD47 항체의 부재 하에서의 CD47과 SIRPα 간 상호 작용 수준에 비하여, CD47과 SIRPα 간의 상호 작용을 40% 이상, 45% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상 차단한다. 본 발명의 CD47 항체들은 유의한 수준의 세포 응집을 야기하지 않는데, 예컨대 본 발명의 CD47 항체들은 적혈구 세포들의 응집 반응을 유의한 수준으로 야기하지 않는다. 예컨대, 본 발명의 CD47 항체들의 존재 하에서 응집 수준은, 기존의 CD47 항체들의 존재 하에서의 응집 수준과 비교하여 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 99% 이상으로 저감된다. 몇 가지 구현예에 있어서, 본 발명의 CD47 항체들은, 본 발명의 CD47 항체들의 존재하에서 응집 수준이 CD47 항체, 각각 SEQ ID NO: 80 및 SEQ ID NO: 81로 제공되는 가변 중쇄 및 가변 경쇄 서열을 포함하는 CD47 항체, 1B4의 존재 하에서의 응집 수준과 비교하여 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 99% 이상으로 저감된다면 유의한 수준으로 응집을 야기하지 않는다. 본 발명의 항체들은 또한 이 기술 분야에서 공지된 항체들에 비하여 종양 모델에 있어서도 현저히 더 강력하다. 예컨대, 본 발명의 CD47 항체들의 존재 하에서 대식세포가 종양 세포를 식균하는 능력은, 기존의 CD47 항체들의 존재 하에서 대식세포가 종양 세포를 식균하는 능력에 비하여 5% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 99% 이상으로 증가된다.

[0070] [0060] 이 기술 분야의 숙련자라면 과도한 실험 없이도 응집 수준, 예컨대 RBC의 적혈구 응집 반응 수준을 정량하는 것이 가능하다는 것을 알 것이다. 예컨대, 이 기술 분야의 숙련자라면 하기 실시예에서 설명하는 바와 같이, 본 발명의 CD47 항체들의 존재 하에서 적혈구 응집 반응 시험을 수행한 후 RBC 점 영역을 측정함으로써 적혈구 응집 반응 수준이 확인된다는 것을 알 것이다. 몇몇 경우, 본 발명의 CD47 항체의 존재하에서 RBC 점 영역은 CD47 항체의 부재하, 즉 적혈구 응집 반응 0점 상태의 RBC 점 영역과 비교된다. 이러한 방식으로, 적혈구 응집 반응은 기저 수준 대조군에 대하여 정량된다. RBC 점 영역이 클수록 더 높은 수준의 적혈구 응집 반응에 해당한다. 또는, RBC 점의 밀도계측 역시 적혈구 응집 반응을 정량하는데 이용될 수 있다.

[0071] [0061] 본 발명의 CD47 항체들은 인간 CD47에 결합하고 그 SIRPα와의 상호 작용을 차단한다 (도 1b, 3 및 7j). 이들 항체들은 인간 적혈구의 적혈구 응집 반응을 유의한 수준으로 야기하지 않는다 (도 4). 이들 항체들은 대식세포에 의한 종양 세포의 식균 작용을 촉진할 수 있다 (도 9). 또한, 상기 CD47 항체들은 인간 림프종의 마우스 모델에서 강력한 항-종양 활성을 나타낸다 (도 10). 따라서, 본 발명의 상기 CD47 항체들은 CD47을 치료적으로 표적하기 위하여 주된 제한 인자를 피한 것이다. 따라서, 본 발명의 CD47 항체들은 다수의 암 치료에 있어서 매우 중요한 것일 것이다.

[0072] [0062] 본 발명의 항체들은, 적혈구의 응집 반응을 유의한 수준으로 야기하지 않고 또는 달리 말하면 그를 조절함이 없이, 인간 CD47에 특이적으로 결합, 그를 차단, 억제, 교란 또는 다르게는 인간 CD47과 인간 SIRPα 간의

상호 작용을 조절한다.

[0073] [0063] 본 발명의 항체들은 평형 결합 상수 (K_d) ≤1 μM로, 예컨대 ≤100 nM로, 좋기로는 ≤10 nM로, 더욱 좋기로는 ≤1 nM로 CD47 에피토프에 결합한다. 예컨대, 본 발명에서 제공되는 CD47 항체들은 대략 ≤1 nM 내지 약 1 pM 범위의 K_d를 나타낸다.

[0074] [0064] 본 발명의 CD47 항체들은 광범위하게 분포된 CD47의 기능적 활성을 조절, 차단, 억제, 저감, 길항, 중화 또는 달리 말하면 간섭하는데 기여한다. CD47의 기능적 활성은, 예컨대 SIRPα와의 상호 작용을 통한 신호 전달, 세포외 기질과의 세포 부착에 따른 세포 내 칼슘 농도의 조절, 예컨대 증가, 트롬보스폰딘의 C-말단 세포 결합 도메인과의 상호 작용, 피브리노겐과의 상호 작용 및 다양한 인테그린과의 상호 작용을 들 수 있다. 예컨대, 상기 CD47 항체들은 CD47의 SIRPα에의 결합을 부분적으로 또는 완전히 조절, 차단, 억제, 저감, 길항, 중화 또는 다르게는 간섭함으로써 CD47의 기능적 활성을 완전히 또는 부분적으로 억제한다.

[0075] [0065] 상기 CD47 항체들은 CD47 항체의 존재 하에서 CD47 기능적 활성 수준이 본 발명에 개시되는 CD47 항체와의 결합 부재라는 조건 하에서 CD47 기능적 활성 수준과 비교하여 95% 이상, 예컨대, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%로 감소하는 경우 CD47 기능적 활성을 완전히 조절, 차단, 억제, 저감, 길항, 중화 또는 다르게는 간섭하는 것으로 여겨진다. 상기 CD47 항체들은 CD47 항체의 존재 하에서 CD47 활성 수준이 본 발명에 개시되는 CD47 항체와의 결합 부재라는 조건 하에서 CD47 활성 수준과 비교하여 50% 이상, 예컨대 55%, 60%, 75%, 80%, 85% 또는 90%로 감소하는 경우 CD47 기능적 활성을 유의미하게 차단, 억제, 저감, 길항, 중화 또는 다르게는 간섭하는 것으로 여겨진다. 상기 CD47 항체들은 CD47 항체의 존재 하에서 CD47 활성 수준이 본 발명에 개시되는 CD47 항체와의 결합 부재라는 조건 하에서 CD47 활성 수준과 비교하여 95% 미만, 예컨대 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% 또는 90%로 감소하는 경우 CD47 기능적 활성을 부분적으로 조절, 차단, 억제, 저감, 길항, 중화 또는 다르게는 간섭하는 것으로 여겨진다.

[0076] *정의*

[0077] [0066] 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학적 및 기술적 용어들은 이 기술 분야의 숙련자들에 의하여 통상적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어들은 복수를, 복수 용어들은 단수형을 포함할 것이다. 일반적으로, 본 발명에 기재되는 세포 및 조직 배양, 분자 생물학 및 단백질과 올리고- 또는 폴리뉴클레오티드 화학 및 혼성에 관하여 이용되는 명명법 및 그 기법들은 이 기술 분야에서 잘 알려진 것들이고 흔히 사용되는 것들이다. 표준 기법들이 재조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성 및 조직 배양과 형질 전환 (예컨대, 전기천공, 리포펙션)을 위하여 사용된다. 효소 반응 및 정제 기법들은 제조자의 설명에 따라 또는 이 기술 분야에서 통상적으로 이루어지는 바와 같이 또는 본 발명에 개시되는 대로 수행된다. 전술한 기법들 및 과정들은 일반적으로 이 기술 분야에 잘 알려진 관용적인 방법들에 따라서, 그리고 본 발명 명세서 전체에 걸쳐 인용되고 기술되는 다양한 일반적 참고 자료들 및 더욱 구체적인 참고 자료들에 기술된 대로 수행된다. 예컨대, 문헌 [Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))] 참고. 본 발명에 개시되는 분석 화학, 합성 유기 화학 및 의약 및 약학 화학과 관련하여 사용되는 명명법, 그 실험실 과정 및 기법들은 잘 알려진 것들이고 이 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 것들이다. 표준 기법들이 화학 합성, 화학 분석, 약학적 제조, 제제화 및 전달 및 환자 치료를 위하여 사용된다.

[0078] [0067] 본 발명의 내용에 따라 사용되는 바, 이하의 용어들은, 달리 표시되지 않는 한, 다음의 의미를 갖는 것으로 이해될 것이다:

[0079] [0068] 본 발명에서 사용되는 바, 용어 CD47, 인테그린-연관 단백질 (IAP), 난소암 항원 OA3, Rh-관련 항원 및 MER6는 동의어이고 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0080] [0069] 본 발명에서 용어 적혈구 (red blood cell(s)) 및 적혈구 (erythrocyte(s))는 동의어이고 상호 교환적으로 사용된다.

[0081] [0070] 용어 응집 반응은 세포의 군집을 말하지만, 용어 적혈구 응집 반응은 구체적인 하위세트의 세포들, 즉 적혈구 세포들의 군집을 말한다. 따라서, 적혈구 응집 반응은 일종의 응집 반응이다.

[0082] [0071] 본 발명에서 사용되는 바, 용어 "항체"는 면역 글로불린 분자 및 면역 글로불린 (Ig) 분자, 즉 항원에 특이적으로 결합하는 (항원과 면역 반응하는) 항원 결합 부위를 함유하는 분자의 면역학적 활성 부분을 말한다. "특이적으로 결합" 또는 "~와 면역 반응" 또는 "~에 대한"이라는 용어는 그 항체가 목적하는 항원의 하나 이상

의 항원 결정자와 반응하고 다른 폴리펩타이드와는 반응하지 않거나, 또는 훨씬 낮은 친화도로 결합한다는 것($K_d > 10^{-6}$)을 의미한다. 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 키메라 할체, dAb 항체 (도메인 항체), 단일쇄 항체, Fab, 및 F(ab')2 단편, Fv, scFvs, 및 Fab 발현 라이브러리를 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다.

[0083] [0072] 기본적인 항체 구조 단위는 4합체를 포함하는 것으로 알려져 있다. 각 4합체는 폴리펩타이드쇄로 이루어지는, 동일한 두 쌍을 포함하고, 각 쌍은 하나의 "경쇄" (약 25 kDa) 및 하나의 "중쇄" (약 50-70 kDa)를 포함한다. 각 쇄의 아미노-말단부는 항원 인식을 주로 책임지는 약 100 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산으로 이루어지는 가변 영역을 포함한다. 각 쇄의 카복시-말단부는 주로 효과자 기능을 책임지는 불변 영역을 정의한다. 일반적으로, 인간으로부터 얻는 항체 분자는 분자 내에 존재하는 중쇄의 특성에 의하여 서로 상이한 IgG, IgM, IgA, IgE 및 IgD 부류 중 어느 하나이다. 어떤 부류는 하위클래스 역시 갖는데, 예컨대 IgG_1, IgG_2 및 기타 등이다. 또한, 인간에서, 경쇄는 카파쇄 또는 람다쇄이다.

[0084] [0073] 본 발명에서 사용되는 용어 "모노클로날 항체" (MAb) 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 고유한 경쇄 유전자 생성물과 고유한 중쇄 유전자 생성물로 이루어지는 오로지 한 가지 분자종의 항체 분자를 함유하는 항체 분자들의 집단을 말한다. 특히, 그 모노클로날 항체의 상보성 결정 영역 (CDRs)는 그 집단의 모든 분자들에서 동일하다. MAbs는 그에 대한 고유한 결합 친화도로써 특징화되는 항원의 특정 에피토프와 면역 반응할 수 있는 항원 결합 부위를 함유한다.

[0085] [0074] 일반적으로, 인간으로부터 얻어지는 항체 분자는 IgG, IgM, IgA, IgE 및 IgD 부류 중 어느 하나이고, 이들은 분자 내에 존재하는 중쇄의 특성에 의하여 서로 상이하다. 어떤 부류는 하위클래스 역시 갖는데, 예컨대 IgG_1, IgG_2 및 기타 등이다. 또한, 인간에서, 경쇄는 카파쇄 또는 람다쇄일 수 있다.

[0086] [0075] 용어 "항원-결합 부위" 또는 "결합부"은 항원 결합에 참여하는 면역 글로불린 분자의 부분을 말한다. 항원 결합 부위는 중쇄 ("H") 및 경쇄 ("L")의 N-말단 가변 영역 ("V")의 아미노산 잔기들로 형성된다. 중쇄 및 경쇄의 V 영역 내에서 3개의 고도로 분기된 구간을 "초가변 영역"으로 부르는데, 이들은 "구조 영역" 또는 "FRs"로 알려진 보다 보존된 측면 구간들 사이에 위치한다. 따라서, 용어 "FR"은 면역 글로불린의 초가변 영역들 사이, 그리고 인접하여 자연적으로 발견되는 아미노산 서열을 말한다. 하나의 항체 분자에서, 상기 3개의 경쇄 초가변 영역과 3개의 중쇄 초가변 영역은 3차원 공간에서 서로에 대하여 상대적으로 배치되어 항원-결합 표면을 형성한다. 항원-결합 표면은 결합되는 항원의 3차원 표면과 상보적이고, 상기 중쇄 및 경쇄 각각의 3개의 초가변 영역을 "상보성-결정 영역" 또는 "CDRs"이라고 부른다. 각 도메인에 대한 아미노산의 배정은 면역학적 관심사 단백질의 카바트 서열 정의에 따른다 [(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 및 1991))], 또는 [Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989)].

[0087] [0076] 본 발명에서 사용되는 바, 용어 "에피토프"는 면역 글로불린 또는 그 단편, 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 단백질 결정자를 포함한다. 용어 "에피토프"는 면역 글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 단백질 결정자를 포함한다. 에피토프 결정자들은 보통 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자들의 화학적 활성 표면 그룹화로 이루어지고 보통 특이적인 3차원 구조 특성 및 특이적인 전하 특성을 갖는다. 항체는 그 해리 상수가 ≤1 μM; 예컨대 ≤100 nM, 좋기로는 ≤10 nM 및 더욱 좋기로는 ≤ 1nM인 경우 항원에 특이적으로 결합한다고 일컬어진다.

[0088] [0077] 본 발명에서 사용되는 바, 용어 "면역학적 결합" 및 "면역학적 결합 특성"은 면역 글로불린 분자와 그 면역 글로불린이 특이성을 나타내는 항원 간 일어나는 유형의 비-공유적 상호 작용을 말한다. 면역학적 결합 상호 작용의 강도 또는 친화도는 그 결합의 해리 상수 (K_d)의 관점에서 표현될 수 있는데, 여기서 K_d가 작을수록 더 큰 친화도를 나타낸다. 선택된 폴리펩타이드의 면역학적 결합 특성은 이 기술 분야에 잘 알려진 방법들을 사용하여 정량될 수 있다. 한 가지 이러한 방법은 항원 결합 부위/항원 복합체 형성 및 해리 속도를 측정하는 것을 포함하는데, 여기서 이들 속도는 양 방향의 속도에 동등하게 영향을 미치는 복합체 파트너들의 농도, 상호 작용의 친화도 및 기하적 파라미터들에 좌우된다. 따라서, "작동 (on) 속도 상수" (k_{on}) 및 "비작동 (off) 속도 상수" (k_{off}) 양자 모두는 농도와, 결합 및 해리의 실제 속도를 계산함으로써 결정될 수 있다. 문헌 (Nature 361:186-87 (1993)) 참고. k_{off}/k_{on} 비는 친화도와 관련없는 모든 파라미터들의 상쇄를 가능하게 하고 해리 상수 K_d와 같다. (일반적으로, 문헌 [Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473] 참조). 본 발명의 항체

는, 방사성리간드 결합 분석, 표면 플라즈몬 공명 (SPR), 유세포 결합 분석 또는 이 기술 분야의 숙련자들에게 알려진 유사한 분석들과 같은 분석법에 의하여 측정시 평형 결합 상수 (Kd)가 ≤1μM, 좋기로는 ≤100nM, 더욱 좋기로는 ≤10nM, 가장 좋기로는 ≤100 pM 내지 약 1 pM인 경우에 CD47에 특이적으로 결합하는 것으로 일컬어진다.

[0089] [0078] 본 발명에서 사용되는 바 용어 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 게놈 폴리뉴클레오티드, cDNA, 또는 합성원 폴리뉴클레오티드 또는 이들의 조합을 의미하는 것이고, 이것은, 그 기원으로 인하여 상기 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 (1) "단리된 폴리뉴클레오티드"가 자연 상태에서 발견되는 그 폴리뉴클레오티드의 전부 또는 일부와 관련되어 있지 아니하고, (2) 자연 상태에서 그것이 연관되어 있지 아니한 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연관되어 있거나 (3) 더 큰 서열의 일부로서 자연 상태에서 존재치 않는 것이다.

[0090] [0079] 본 발명에서 언급되는 용어 "단리된 단백질"은 cDNA의 단백질, 재조합 RNA의 단백질, 또는 합성원의 단백질 또는 이들의 조합을 의미하는데, 이것은, 그 기원 또는 도출원으로 인하여 상기 "단리된 단백질"은 (1) 자연 상태에서 발견되는 단백질들과 연관되어 있지 아니하고, (2) 동일한 원으로부터의 다른 단백질들을 함유하지 않으며, 예컨대 해양 단백질들을 함유하고 있지 않으며, (3) 상이한 종들로부터의 세포에 의하여 발현되거나 (4) 자연 상태에서는 존재하지 않는 것이다.

[0091] [0080] 용어 "폴리펩타이드"는 본 발명에서 본연의 단백질, 단편 또는 폴리펩타이드 서열의 유사체를 언급하는 일반 용어로서 본 발명에서 사용된다. 그러므로, 본연의 단백질 단편들 및 유사체들은 그 폴리펩타이드 속의 종들이다.

[0092] [0081] 하나의 목적물에 적용되는 것으로 본 발명에서 사용되는 용어 "자연적으로 존재하는"은 목적물이 자연 상태에서 발견될 수 있다는 사실을 말한다. 예컨대, 자연 상태에서 어떤 원으로부터 단리될 수 있고 인간에 의하여 실험실 또는 다른 방법으로 고의적으로 변형되지 않은 어떤 생물 (바이러스 포함)에서 존재하는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 폴리펩타이드은 자연적으로 존재하는 것이다.

[0093] [0082] 본 발명에서 사용되는 용어 "작동적으로 연관된"은 그렇게 기술된 것들이 그들의 의도된 방식으로 기능할 수 있게 하는 관계에 있는 것인, 요소들의 위치를 말한다. 코딩 서열과 "작동적으로 연관된" 제어 서열은 그 코딩 서열의 발현이 그 제어 서열과 호환되는 조건하에서 달성되는 그러한 방식으로 연결된다.

[0094] [0083] 본 발명에서 사용되는 용어 "제어 서열"은 그들이 연결되어 있는 코딩 서열의 발현 및 프로세싱을 효과하는데 필요로되는 폴리뉴클레오티드 서열을 말한다. 이러한 제어 서열의 성질은 숙주 생물에 따라 상이한데, 원핵 생물에서는, 이러한 제어 서열은 일반적으로 프로모터, 리보좀 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함하고, 진핵 생물에서는 일반적으로, 이러한 제어 서열은 프로모터와 전사 종결 서열을 포함한다. 용어 "제어 서열"은 최소한으로는, 그 존재가 발현 및 프로세싱에 필수적인 모든 요소들을 포함하는 것으로 의도되고, 또한 그 존재가 유리한 추가적인 요소들 역시 포함할 수 있는데, 예컨대 리더 서열 및 융합 파트너 서열들을 들 수 있다. 본 발명에서 언급되는 바, 용어 "폴리뉴클레오티드"는, 길이에 있어서 10개 이상의 염기로 이루어지는 뉴클레오티드의 중합 형태를 말하고, 리보뉴클레오티드 또는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 이들 중 어떤 유형의 뉴클레오티드의 변형된 형태를 말한다. 이 용어는 단일 가닥 및 이중 가닥 형태의 DNA를 포함한다.

[0095] [0084] 본 발명에서 언급되는 용어 "올리고뉴클레오티드"는 자연적으로 존재하는 올리고뉴클레오티드 및 자연적으로 존재하는 것과 함께 연결되어 있는 변형된 뉴클레오티드, 및 자연적으로 존재치 않는 올리고뉴클레오티드 연결을 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 일반적으로 길이 200개의 염기 또는 그 미만을 포함하는 폴리뉴클레오티드 하위세트이다. 좋기로는 올리고뉴클레오티드는 10 내지 60개 염기 길이이고, 가장 좋기로는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 내지 40개 염기 길이이다. 올리고뉴클레오티드는, 예컨대 프로브용으로는 보통 단일 가닥이지만, 예컨대 유전자 돌연변이 컨스트럭트로 사용하기 위하여는 올리고뉴클레오티드는 이중 가닥일 수 있다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 센스 올리고뉴클레오티드 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 둘 중 하나이다.

[0096] [0085] 본 발명에서 언급되는 용어 "자연적으로 존재하는 뉴클레오티드"는 디옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함한다. 본 발명에서 언급되는 용어 "변형된 뉴클레오티드"는 변형되거나 치환된 당기를 갖는 뉴클레오티드 등등을 포함한다. 본 발명에서 언급되는 용어 "올리고뉴클레오티드 연결"은 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀렐로에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포르스라닐라데이트, 포스포론미데이트 등등과 같은 올리고뉴클레오티드 연결을 포함한다. 예컨대, 문헌 [LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al. Nucl.

Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. U.S. Patent No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)] 참조. 필요하다면, 올리고뉴클레오티드는 검출을 위한 표지를 포함할 수 있다.

[0097] [0086] 본 발명에서 언급되는 용어 "선택적으로 혼성화(되다)"는 검출 가능하고도 특이적으로 결합하는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 및 그들의 단편들은 비특이적 핵산에의 검출 가능한 양으로의 눈에 띄는 결합을 최소화하는 혼성화 및 수세 조건하에서 핵산 가닥과 선택적으로 혼성화한다. 이 기술 분야에서 알려지고 본 발명에서 설명되는 선택적인 혼성화 조건을 달성하기 위하여 강한 스트린젠시 조건이 사용될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 및 단편들과 대상 핵산 서열 간의 핵산 서열 상동성은 80% 이상이고, 더욱 통상적으로는 85%, 90%, 95%, 99% 이상의 증가하는 상동성, 및 100%의 상동성이다. 두 아미노산 서열은 그들의 서열들 간에 부분적인 또는 완전한 동일성이 있다면 상동이다. 예컨대, 85% 상동성은 두 서열을 최대 매칭되도록 정렬하는 경우 85%의 아미노산이 동일하다는 것을 의미한다. (두 서열들 중 어느 하나가 매치된) 갭은, 최대 매칭 갭 길이는 5 또는 그 미만으로 허용되는 것이 양호하고, 2 또는 그 미만인 것이 더욱 양호하다. 또는 그리고 양호하게는, 본 발명에서 이 용어가 사용되는 경우, 두 단백질 서열들 (또는 그들로부터 유래하는 길이 30개 아미노산 이상의 폴리펩타이드 서열들)은 돌연변이 데이터 매트릭스 및 갭 페널티 6 이상으로 ALIGN 프로그램을 이용하여 그들의 정렬 점수가 5 (표준 편차 단위)를 넘는다면 상동이다. 문헌 [Dayhoff, M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) and Supplement 2 to this volume, pp. 1-10] 참조. 두 서열 또는 그 일부는, ALIGN 프로그램을 이용하여 최적 정렬하였을 때 그들의 아미노산이 50% 이상 동일하다면 더욱 양호하게 상동이다. 용어 "~에 대응하다"는 폴리뉴클레오티드 서열이 레퍼런스 폴리뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부분과 상동 (즉, 엄격히 진화적으로 관련된 것은 아니나 동일)이라거나, 폴리펩타이드 서열이 레퍼런스 폴리펩타이드 서열과 동일하다는 것을 의미하기 위하여 사용된다. 대조적으로, 용어 "~에 상보적인"은 그 상보적 서열이 레퍼런스 폴리뉴클레오티드 서열의 전부 또는 일부분과 상동이라는 것을 의미하기 위하여 사용된다. 설명하자면, 뉴클레오티드 서열 "TATAC"는 레퍼런스 서열 "TATAC"에 대응하고 레퍼런스 서열 "GTATA"와 상보적이다.

[0098] [0087] 하기의 용어들은 2 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 간의 서열 관계를 설명하기 위하여 사용된다: "레퍼런스 서열", "비교 창", "서열 상동성", "서열 상동성 백분율", 및 "실질적인 상동성". "레퍼런스 서열"은 서열 비교를 위한 기준으로서 사용되는 정의된 서열이다. 레퍼런스 서열은, 예컨대 전장 cDNA 또는 서열 목록으로 주어지는 유전자 서열의 한 분절로서 더 큰 서열의 하위세트일 수 있거나, 또는 전체 cDNA 또는 유전자 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 레퍼런스 서열은 18개 뉴클레오티드 또는 6개 아미노산 이상의 길이로, 흔히 24개 뉴클레오티드 또는 8개 아미노산 이상의 길이 및 종종 48개 뉴클레오티드 또는 16개 아미노산 길이이다. 두 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열은 각각 (1) 두 분자들 간 유사한 서열 (즉, 전체 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 일부분)을 포함할 수 있고 (2) 두 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열들 간에 다른 서열을 더 포함할 수 있기 때문에, 두 (또는 그 이상) 분자들 간의 비교는 통상적으로 두 분자들의 서열을 "비교 창"을 통하여 비교함으로써 서열 유사성의 국지적 영역을 확인 및 비교하게 된다. 본 발명에서 사용되는 바 "비교 창"은 인접한 18개 뉴클레오티드 위치 또는 6개 아미노산 이상으로 이루어지는 개념적인 분절을 말하고, 여기서 폴리뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열은 인접한 18개 뉴클레오티드 또는 6개 아미노산 이상의 서열로 이루어지는 레퍼런스 서열과 비교될 수 있고, 그 비교 창 내의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 정렬을 위하여 (삽입 또는 결실을 포함하지 않는) 레퍼런스 서열과 비교하여 20% 이하의 삽입, 결실, 치환 등등 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교 창을 정렬하기 위한 최적의 서열 정렬은 문헌 [Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)]의 국지적 상동성 알고리즘에 의하여, 문헌 [Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘에 의하여, 문헌 [Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988)]의 유사성 방법에 대한 연구에 의하여, 이들 알고리즘들의 컴퓨터화된 구현 (GAP, BESTFIT, FASTA, 및 Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0의 TFASTA, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, 또는 MacVector 소프트웨어 패키지)에 의하여, 또는 검사에 의하여 수행될 수 있고, 상기 다양한 방법들에 의하여 생성된 최상의 정렬 (즉, 상기 비교 창에 걸쳐 가장 높은 상동성 백분율이라는 결과를 나타낸 것)이 선택된다.

[0099] [0088] 용어 "서열 동일"은 두 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열이 상기 비교 창에 걸쳐 동일 (즉, 뉴클레오티드 대 뉴클레오티드 또는 잔기 대 잔기 기준으로)함을 의미한다. 용어 "서열 상동성 백분율"은 상기 비교 창에 걸쳐 최적으로 정렬된 두 서열들을 비교함으로써 계산되는데, 동일한 핵산 염기 (예컨대, A, T, C, G, U

또는 I) 또는 잔기가 양 서열 모두에서 존재하는 위치의 숫자를 측정하여 매치되는 위치의 수를 얻고, 상기 매치된 위치들의 수를 비교 창 내의 총 위치수 (즉, 창 크기)로 나누어, 그 결과에 100을 곱하여 서열 상동성 백분율을 얻는다. 본 발명에서 사용되는 바 용어 "실질적인 상동성"은 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 특성을 의미하는데, 여기서 상기 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산은 18개 이상의 뉴클레오티드 (6개 이상의 아미노산) 위치로 이루어지는 비교 창에 걸쳐, 자주 24-48개 뉴클레오티드 (8-16개 아미노산) 이상의 위치로 이루어지는 창에 걸쳐 레퍼런스 서열과 비교했을 때 85% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열, 좋기로는 90 내지 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열, 더욱 흔하게는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 서열을 포함하고, 여기서 상기 서열 상동성의 백분율은 상기 레퍼런스 서열을 그 비교 창에 걸쳐 레퍼런스 서열의 총 20% 이하인 결실 또는 삽입을 포함할 수 있는 서열과 비교함으로써 계산된다. 레퍼런스 서열은 더 큰 서열의 하위세트일 수 있다.

[0100] [0089] 본 발명에서 사용되는 바, 20개의 관용적인 아미노산 및 그들의 약어는 관용적인 용법을 따른다. 문헌 [Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland7 Mass. (1991))] 참조. 20개의 관용 아미노산들의 입체이성질체 (예컨대, D-아미노산), α-, α-2 치환 아미노산과 같은 비천연 아미노산, N-알킬 아미노산, 젖산, 및 기타 비관용적 아미노산들 역시 본 발명의 폴리펩타이드용으로 적절한 성분이 될 수 있다. 비관용적 아미노산의 예시로는: 4 하이드록시프롤린, γ-카복시글루타메이트, ε-N,N,N-트리메틸리신, ε-N- 아세틸리신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시리신, δ-N- 메틸아르기닌, 및 기타 유사 아미노산 및 이미노산 (예컨대, 4-하이드록시프롤린)을 들 수 있다. 본 발명에서 사용되는 폴리펩타이드 표기법에 있어서, 표준 용법 및 관습에 따라 왼손 방향은 아미노 말단 방향이고 오른손 방향은 카복시 말단 방향이다.

[0101] [0090] 유사하게, 달리 구체화되지 않는 한, 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 왼손 말단은 5' 말단이고, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 왼손 방향은 5' 방향으로 일컬어진다. 신생 RNA 전사체의 5'에서 3'으로의 부가 방향은 전사 방향이라고 부른다. RNA와 동일한 서열을 갖고 RNA 전사체의 5' 말단을 향한 5'인 DNA 가닥 상의 서열 영역은 "상류 서열"이라고 부르며, RNA와 동일한 서열을 갖고 RNA 전사체의 3' 말단을 향한 3'인 DNA 가닥 상의 서열 영역은 "하류 서열"로 부른다.

[0102] [0091] 폴리펩타이드에 대하여 적용하듯이, 용어 "실질적 동일"은, 예컨대 디폴트 갭 웨이트를 이용한 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의하여 최적으로 정렬시키는 경우, 두 펩타이드 서열이 80% 이상 서열 상동성을 공유하고, 좋기로는 90% 이상 서열 상동성을, 더욱 좋기로는 95% 이상, 가장 좋기로는 99% 이상 서열 상동성을 공유하는 것을 의미한다.

[0103] [0092] 좋기로는, 동일하지 않은 잔기 위치들은 보존적 아미노산 치환에 의하여 상이하다.

[0104] [0093] 보존적 아미노산 치환은 유사한 측쇄를 갖는 잔기들의 상호교환성을 말한다. 예컨대, 지방족 측쇄를 갖는 아미노산 군은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신이고; 지방족-하이드록실 측쇄를 갖는 아미노산 군은 세린 및 트레오닌이며; 아미드-함유 측쇄를 갖는 아미노산 군은 아스파라긴 및 글루타민이고; 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 군은 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판이고; 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 군은 리신, 아르기닌 및 히스티딘이고; 황-함유 측쇄를 갖는 아미노산 군은 시스테인 및 메티오닌이다. 양호한 보존적 아미노산 치환 기들은: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타민산-아스파르트산 및 아스파라긴-글루타민이다.

[0105] [0094] 본 발명에서 설명하는 바, 항체 또는 면역 글로불린 분자들의 아미노산 서열에 있어서 경미한 변화는 본 발명에 포함되는 것으로 고려되는데, 이는 아미노산 서열의 변화가 서열의 75% 이상, 더욱 좋기로는 80%, 90%, 95% 이상, 가장 좋기로는 99% 유지하는 것을 제공한다. 특히, 보존적 아미노산 교체가 고려된다. 보존적 교체는 그들의 측쇄에 있어서 관련된 아미노산 패밀리 내에서 일어나는 교체이다. 유전적으로 인코딩되는 아미노산들은 일반적으로 패밀리로 구분된다: (1) 산성 아미노산은 아스파테이트, 글루타메이트; (2) 염기성 아미노산은 리신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 비극성 아미노산은 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌,메티오닌, 트립토판 그리고 (4) 비전하 극성 아미노산은 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신. 친수성 아미노산은 아르기닌, 아스파라긴, 아스파테이트, 글루타민, 글루타메이트, 히스티딘, 리신, 세린 및 트레오닌을 포함한다. 소수성 아미노산은 알라닌, 시스테인, 이소류신, 류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 트립토판, 티로신 및 발린을 포함한다. 기타 패밀리 아미노산으로는 다음의 것들을 들 수 있는데 (i) 세린 및 트레오닌, 이들은 지방족-하이드록시 패밀리; (ii) 아스파라긴 및 글루타민, 이들은 아미드 함유 패밀리; (iii) 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신, 이들은 지방족 패밀리이고; (iv) 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신, 이들은 방향족 패밀리이다. 예컨대, 류신의 이소류신 또는 발린으로의 고립된 교체, 아스파테이트의 글루타메이트

로의 교체, 트레오닌의 세린으로의, 또는 어떤 아미노산의 구조적으로 관련된 아미노산으로의 유사한 교체는, 특히 그 교체가 구조 영역 부위 내 아미노산을 포함하지 않는다면 결합 또는 결과하는 분자의 성질에 주요한 영향을 미치지 않을 것이 예상되는 것은 타당하다. 어떤 아미노산 변화가 기능적 펩타이드라는 결과를 낳는지 여부는 그 폴리펩타이드 유도체의 특이적인 활성을 분석함으로써 쉽게 결정될 수 있다. 분석법들이 본 발명에 구체적으로 설명되어 있다. 항체 또는 면역 글로불린 분자들의 단편 또는 유사체들은 이 기술 분야의 숙련자들에 의하여 쉽게 준비될 수 있다. 단편 또는 유사체들의 양호한 아미노 말단 및 카복시 말단은 기능적 도메인의 경계 근처에 존재한다. 구조적 및 기능적 도메인들은 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 데이터를 공공의 서열 데이터베이스 또는 사적 소유 서열 데이터베이스와 비교함으로써 식별될 수 있다. 좋기로는, 컴퓨터화된 비교 방법들을 이용하여 공지된 구조 및/또는 기능의 다른 단백질들에 존재하는 서열 모티프 또는 예측되는 단백질 형태 도메인을 확인하게 된다. 공지된 3차원 구조로 접히는 단백질 서열을 확인하는 방법들이 알려져 있다. 문헌 [Bowie et al. Science 253:164 (1991)]. 따라서, 전술한 예시들은 이 기술 분야의 숙련자들이 본 발명에 따른 구조적 및 기능적 도메인들을 정의하는 데 사용될 수 있는 서열 모티프 및 구조적 형태들을 인식할 수 있다는 것을 증명한다.

[0106] [0095] 양호한 아미노산 치환은: (1) 단백질 분해에 대한 민감성을 저감시키고, (2) 산화에 대한 민감성을 저감시키고, (3) 단백질 복합체를 형성하기 위한 결합 친화도를 변화시키며, (4) 결합 친화도를 변화시키고, (4) 이러한 유사체들의 기타 물리화학적 또는 기능성 성질을 부여하거나 변경시키는 것들이다. 유사체들은 자연적으로 존재하는 펩타이드 서열 이외의 다양한 서열 돌연변이 단백질들을 포함할 수 있다. 예컨대, 하나의 또는 다수의 아미노산 치환 (좋기로는 보존적 아미노산 치환)이 자연적으로 존재하는 서열 내에 이루어질 수 있다 (좋기로는 분자간 접촉을 형성하는 도메인(들) 밖 폴리펩타이드의 부분에 이루어질 수 있다). 보존적 아미노산 치환은 모(母) 서열의 구조적 성격을 실질적으로 변화시키지 않아야 한다 (예컨대, 교체 아미노산은 모 서열 내에 존재하는 나선 구조를 파괴하거나, 모 서열을 특징짓는 기타 2차 구조를 교란시키는 경향이 있어서는 안된다). 이 기술 분야에서 인식되고 있는 폴리펩타이드의 2차 및 3차 구조들의 예시가 문헌 [Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); and Thornton et al. Nature 354:105 (1991)]에 기재되어 있다.

[0107] [0096] 본 발명에서 사용되는 용어 "폴리펩타이드 단편"은 아미노 말단 및/또는 카복시 말단 결실을 갖는 폴리펩타이드를 말하지만, 여기서 잔류하는 아미노산 서열은, 예컨대 전장 cDNA 서열로부터 추론되는 자연적으로 존재하는 서열 내의 대응 위치와 동일하다. 단편들은 통상적으로 5, 6, 8 또는 10개 아미노산 이상의 길이이고, 좋기로는 14개 아미노산 이상의 길이, 더욱 좋기로는 20개 아미노산 이상의 길이, 보통 50개 아미노산 이상의 길이, 더더욱 좋기로는 70개 아미노산 이상의 길이이다. 본 발명에서 사용되는 용어 "유사체"는 추론되는 아미노산 서열의 일부분과 실질적 동일성을 갖는 25개 아미노산 이상으로 이루어지는 분절로 구성되고, 적절한 결합 조건하에서 CD47과 특이적 결합을 하는 폴리펩타이드는 말한다. 통상적으로 폴리펩타이드 유사체는 자연적으로 존재하는 서열에 대하여 보존적 아미노산 치환 (또는 부가 또는 결실)을 포함한다. 유사체들은 통상적으로 20개 아미노산 이상의 길이, 좋기로는 50개 아미노산 이상의 길이 또는 그보다 긴 길이이고, 종종 자연적으로 존재하는 전장 폴리펩타이드만큼 길 수 있다.

[0108] [0097] 약학 산업 분야에서, 펩타이드 유사체들은 흔히 그 주형 펩타이드의 그것과 유사한 성질을 갖는 비펩타이드 약물로서 사용된다. 이들 유형의 비펩타이드 화합물을 "펩타이드 모방체 (peptide mimetics)" 또는 "펩티도미메틱 (peptidomimetics)"로 명명한다. 문헌 [Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986), Veber and Freidinger TINS p.392 (1985); and Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987)]. 이러한 화합물들은 종종 컴퓨터화된 분자 모델링의 도움을 받아 개발된다. 치료적으로 유용한 펩타이드들과 구조적으로 유사한 펩타이드 모방체들은 균등한 치료적 또는 예방적 효과를 이루기 위하여 사용될 수 있다. 일반적으로, 펩티도미메틱들은 패러다임 폴리펩타이드 (즉, 생화학적 성질 또는 약리적 활성을 갖는 폴리펩타이드), 예컨대 인간 항체와 같은 패러다임 폴리펩타이드와 구조적으로 유사하지만, 필요에 따라 이 기술 분야에 잘 알려진 방법에 의하여 --CH_2NH--, --CH_2S-, --CH_2-CH_2--, --CH=CH--(시스 및 트랜스), --$COCH_2$--, $CH(OH)CH_2$--, 및 -CH_2SO--로 이루어지는 군으로부터 선택되는 연결자로 교체되는 하나 이상의 펩티드 연결자를 갖는다. 공통 서열을 구성하는 하나 이상의 아미노산의 동일한 유형의 D-아미노산으로의 체계적인 치환 (즉, L-리신을 대신한 D-리신)이 더 안정한 펩타이드를 생성하기 위하여 이용될 수 있다. 또한, 공통 서열이나 실질적으로 동일한 공통 서열 변형을 포함하는 뒤틀린 펩타이드 (constrained peptides)가 이 기술 분야에 공지된 방법들로 생성될 수 있는데 (Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)); 예컨대, 펩타이드를 고리화시키는 분자간 이황화 가교를 형성할

수 있는 내부 시스테인 잔기를 첨가하는 것에 의한다.

[0109] [0098] 용어 "제제"는 본 발명에서 화학적 화합물, 화학적 화합물로 이루어진 혼합물, 생물학적 거대분자, 또는 생물학적 재료로부터 만들어진 추출물을 의미하는데 사용된다.

[0110] [0099] 본 발명에서 사용되는 바, 용어 "표지" 또는 "표지된"은 검출 가능한 마커의 포함을 일컫는데, 예컨대 표식화된 애비딘에 의하여 검출될 수 있는 비오티닐 모이어티로 이루어진 폴리펩타이드에의 방사선 표지된 아미노산 또는 부착체의 포함을 말한다 (예컨대, 광학적 또는 열측정법에 의하여 검출될 수 있는 형광 마커 또는 효소 활성을 함유하는 스트렙다비딘). 특정 상황에 있어서, 상기 표지 또는 마커는 치료적인 것일 수 있다. 폴리펩타이드 및 당단백질들을 표지하는 다양한 방법들이 이 기술 분야에 알려져 있고 사용될 수 있다. 폴리펩타이드에 대한 표지의 예시로는 하기의 것들을 들 수 있으나 이에 국한되는 것은 아니다: 방사선 동위원소 또는 방사선 핵종 (예컨대, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), 형광 표지 (예컨대, FITC, 로다민, 란탄족 형광체), 효소 표지 (예컨대, 홀스래디쉬 퍼옥시다제, p-갈락토시다제, 루시퍼라제, 알칼리 포스파타제), 화확발광제, 비오티닐기, 2차 리포터에 의하여 인식되는 소정의 폴리펩타이드 에피토프 (예컨대, 류신 지퍼쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 꼬리). 몇 가지 구현예에 있어서, 표지는 가능한 입체장애를 저감시키기 위하여 다양한 길이의 스페이서 팔을 통하여 부착된다. 본 발명에서 사용되는 용어 "약학 제제 또는 약물"은 환자에게 적절히 투여되는 경우 원하는 치료적 효과를 유도할 수 있는 화학적 화합물 또는 조성물을 말한다.

[0111] [00100] 용어 "항종양 제제"는 인간의 종양, 특히 악성 (암성) 병변, 예컨대 암, 육종, 림프종 또는 백혈병의 발생 또는 진행을 억제하는 기능적 성질을 갖는 제제를 말한다. 전이 억제는 자주 항종양 제제의 특성이 된다.

[0112] [00101] 본 발명의 기타 화학 용어들은 이 기술 분야의 관용ㅈ억인 용법에 따라 사용되고, 예시적으로 문헌 [McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))]을 들 수 있다.

[0113] [00102] 본 발명에서 사용되는 바, "실질적으로 순수한"은 대상 종이 존재하는 우세한 종이라는 것 (즉, 몰 기준으로, 조성물 내에서 그것이 다른 어떤 개별적인 종들보다 더 많음)을 의미하고, 좋기로는 실질적으로 순수한 분획은 상기 대상 종이 존재하는 모든 거대분자 종들 중에서 약 50% 이상 (몰 기준으로)인 조성물이다.

[0114] [00103] 일반적으로, 실질적으로 순수한 조성물은 그 조성물 중에 존재하는 모든 거대분자 종들 중에서 약 80% 이상 대상 종을 포함할 것이고, 더욱 좋기로는 약 85%, 90%, 95% 및 99% 이상을 포함할 것이다. 가장 좋기로는 대상 종은 본질적인 균질성에 이르기까지 정제되는데 (오염 종은 관용적인 검출 방법에 의하여는 조성물 내에서 검출될 수 없다), 여기서 상기 조성물은 필수적으로 단일한 거대분자 종으로 이루어진다.

[0115] **CD47 항체들**

[0116] [00104] 본 발명의 모노클로날 항체들은 CD47에 결합하고, SIRPα의 CD47에의 결합을 저해하고, CD47-SIRPα-매개 신호 전달을 감소시키며, 식균 작용을 촉진하고 종양 성장 및/또는 이동을 억제하는 능력을 갖는다. 예컨대, 억제는 본 발명 실시예에서 개시되는 세포 분석법을 이용하여 측정된다.

[0117] [00105] 본 발명의 예시적 항체들은 2A1 항체, 2A1의 키메라 버전 및 2A1의 인간화 변이체를 포함한다. 본 발명의 예시적 항체들은 SEQ ID NOs: 5-30로부터 선택되는 가변 중쇄 (VH) 및 SEQ ID NOs: 31-47로부터 선택되는 가변 경쇄 (VL)을 갖는 항체를 포함한다. 구체적으로, 예시적 항체들은 표 1에 제공되는 것들을 포함한다.

[0118] **표 1.**

항체	가변 중쇄 (VH)	가변 경쇄 (VL)
2A1	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 31
2A1-xi	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 32
AB2.03	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 33
AB2.04	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 34
AB2.05	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 35
AB2.06	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 36
AB2.07	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 37
AB2.08	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 38
AB2.09	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 39
AB2.13	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 43
AB3.09	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 39
AB6.12	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 42
AB6.13	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 43
AB6.14	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 44
AB6.17	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 47
AB10.13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 43
AB10.14	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 44
AB11.05	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 35
AB12.05	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 35
AB15.05	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 35
AB16.05	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 35
AB17.05	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 35
AB22.05	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 35
AB23.05	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 35
AB24.05	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 35
AB25.05	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 35

[0119]

[0120] [00106] 또한, 본 발명에는 본 발명에서 개시되는 CD47 항체들과 동일한 에피토프에 결합하는 항체들 역시 포함된다. 예컨대, 본 발명의 항체들은 인간 CD47 (예컨대, GenBank Accession No. Q08722.1 참조) 상의 하나 이상의 아미노산을 포함하는 에피토프에 특이적으로 결합한다.

[0121] [00107] 예시적인 인간 CD47의 아미노산 서열이 하기에 제공된다 (본 발명에 참조로서 포함되는, GenBank Accession No. Q08722.1 (GI:1171879)). 신호 서열 (아미노산 1-18)에는 밑줄이 그어져 있다.

```
          1 mwplvaalll gsaccgsaql lfnktksvef tfcndtvvip cfvtnmeaqn
ttevyvkwkf
         61 kgrdiytfdg alnkstvptd fssakievsq llkgdaslkm dksdavshtg
nytcevtelt
        121 regetiielk yrvvswfspn enilivifpi faillfwgqf giktlkyrsg
gmdektiall
        181 vaglvitviv ivgailfvpg eyslknatgl glivtstgil illhyyvfst
aigltsfvia
        241 ilviqviayi lavvglslci aacipmhgpl lisglsilal aqllglvymk
fvasnqktiq
        301 pprkaveepl nafkeskgmm nde (SEQ ID NO: 48)
```

[0122]

[0123] [00108] 명확히 하기 위하여, 상기 신호 서열을 제외한 예시적인 인간 CD47의 아미노산 서열은 아래와 같이 제공된다.

```
          1 qllfnktksv eftfcndtvv ipcfvtnmea qnttevyvkw kfkgrdiytf
dgalnkstvp
         61 tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytcevte ltregetiie
lkyrvvswfs
        121 pnenilivif pifaillfwg qfgiktlkyr sggmdektia llvaglvitv
ivivgailfv
        181 pgeyslknat glglivtstg ilillhyyvf staigltsfv iailviqvia
yilavvglsl

        241 ciaacipmhg pllisglsil alaqllglvy mkfvasnqkt iqpprkavee
plnafkeskg
        301 mmnde (SEQ ID NO: 147)
```

[0124]

[0125]

[0126] [00109] 예시적 인간 CD47-IgV 도메인의 아미노산 서열은 아래와 같이 제공된다.

```
      19  qllfnktksv eftfcndtvv ipcfvtnmea qnttevyvkw kfkgrdiytf
dgalnkstvp
      79  tdfssakiev sqllkgdasl kmdksdavsh tgnytcevte ltregetiie lkyrvv
      (SEQ ID NO: 49)
```

[0127]

[0128] [00110] 본 발명의 예시적인 모노클로날 항체들은, 예컨대 하기 서열들로 보여지는 가변 중쇄 영역 (VH) 및/또는 가변 경쇄 영역 (VL)을 포함하는 인간화 항체를 포함한다.

[0129] [00111] 상기 CD47 항체들의 가변 중쇄 영역 (VH)가 아래에 제공된다. 상기 CD47 항체들의 VH 쇄의 상보성 결정 영역 (CDRs)은 하기에 강조되었다. 몇 가지 구현예에 있어서, VH CDR1의 아미노산 서열은 GFNIKDYYLH (SEQ ID NO: 50), GYTFTYYYLH (SEQ ID NO: 57), GFTFTYYYLH (SEQ ID NO: 58), GYNFTYYYLH (SEQ ID NO: 59), GYTITYYYLH (SEQ ID NO: 60), GYTFKYYYLH (SEQ ID NO: 61), GYTFTDYYLH (SEQ ID NO: 62), GFTFTDYYLH (SEQ ID NO: 63), GFTITDYYLH (SEQ ID NO: 64), GYTFKDYYLH (SEQ ID NO: 65), 또는 GFTFKDYYLH (SEQ ID NO: 66)이다. 몇 가지 구현예에 있어서, VH CDR2의 아미노산 서열은 WIDPDNGDTE (SEQ ID NO: 51), WIDPDQGDTE (SEQ ID NO: 72), WIDPDYGDTE (SEQ ID NO: 73), WIDPDSGDTE (SEQ ID NO: 74), WIDPDNADTE (SEQ ID NO: 75), 또는 WIDPDNTDTE (SEQ ID NO: 76)이다. 몇 가지 구현예에 있어서, VH CDR3의 아미노산 서열은 NAAYGSSSYPMDY (SEQ ID NO: 52) 또는 NAAYGSSPYPMDY (SEQ ID NO: 77)이다.

```
EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYLHWVKQRPEQGLEWIGWIDPDNGDTEFAPKFQGKATMTADT
SSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTSVTV (SEQ ID NO: 5)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVQQAPGKGLEWMGWIDPDNGDTEYAEKFQGRVTITADT
STDTAYMELSSLRSEDTAVYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV(SEQ ID NO: 6)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 7)

EVQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 8)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQGRVTMTADT
SSNTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 9)
```

[0130]

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQGRVTMTEDT
STDTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 10)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDQGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 11)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDYGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 12)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDSGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 13)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNADTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 14)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNTDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 15)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSPYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 16)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 17)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTFTYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 18)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYNFTYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 19)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTITYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 20)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFKYYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 21)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFTDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 22)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTFTDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 23)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTITDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 24)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 25)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFTFKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 26)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYLQLSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 27)

QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLTSEDTAVYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 28)

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVRQAPGQALEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 29)

[0131]

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVQQAPGKGLEWMGWIDPDNGDTEYAQKFQDRVTITRDR
SMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCNAAYGSSSYPMDYWGQGTTVTV (SEQ ID NO: 30)

[0132]

[0133] [00112] 상기 CD47 항체들의 가변 경쇄 영역 (VL)은 하기에 제공된다. 상기 CD47 항체들의 VL 쇄의 CDRs는 아래에 강조하였다. 몇 가지 구현예에 있어서, VL CDR1의 아미노산 서열은 KASQDIHRYLS (SEQ ID NO: 53), RASQDIHRYLA (SEQ ID NO: 67), 또는 RARQGIHRYLS (SEQ ID NO: 68)이다. 몇 가지 구현예에 있어서, VL CDR2의 아미노산 서열은 RANRLVD (SEQ ID NO: 54), RANRLQS (SEQ ID NO: 69), RANRRAT (SEQ ID NO: 70), 또는 RANRLVS (SEQ ID NO: 71)이다. 몇 가지 구현예에 있어서, VL CDR3의 아미노산 서열은 LQYDEFPYT (SEQ ID NO: 55)이다.

DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLT
ISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEMK (SEQ ID NO: 31)

DIKMTQSPSSLYASLGERVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKSPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLT
ISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 32)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWYQQKPGKAPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTFT
ISSLQPEDIATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 33)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKAPKSLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 34)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 35)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWYQQKPGKAPKRLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 36)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHRYLAWYQQKPGKVPKLLIYRANRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDVATYYCLQYDEFPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 37)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDIHRYLAWYQQKPGQAPRLLIYRANRRATGIPARFSGSGSGTDFTLT
ISSLEPEDFAVYYCLQYDEFPYTGFQGTRLEIK (SEQ ID NO: 38)

DIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 39)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 40)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 41)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 42)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKILIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 43)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKHLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 44)

[0134]

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 45)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCKASQDIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 46)

NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITCRARQGIHRYLSWFQQKPGKVPKLLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGTEFTLT
ISSLQPEDFATYYCLQYDEFPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 47)

[0135]

[0136] [00113] 몇 가지 경우에 있어서, 본 발명에 개시되는 CD47 항체들은 SEQ ID NOs: 5-30으로부터 선택되는 가변 중쇄 영역과 SEQ ID NOs: 31-47로부터 선택되는 가변 경쇄 영역을 포함한다. 예시적인 CD47 항체는, SEQ ID NO: 5로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 31로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 7로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 35로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 11로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 42로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 5로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 32로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 7로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 33로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 7로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 34로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 7로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 36로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 7로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 37로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 7로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 38로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 29로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 35로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 30로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 35로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 7로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 43로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 11로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 43로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 11로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 47로 기재되는 가변

경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 15로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 43로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 15로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 44로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 11로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 44로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 22로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 35로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 7로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 39로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 8로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 39로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 16로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 35로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 20로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 35로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 21로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 35로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 17로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 35로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 28로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 35로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함; SEQ ID NO: 27로 기재되는 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 35로 기재되는 가변 경쇄 영역을 포함한다.

[0137] [00114] 본 발명에 개시되는 CD47 항체들은 SEQ ID NOs: 5-30으로 제공되는 VH 영역 중 임의의 하나와 짝을 이룬 SEQ ID NOs: 31-47로 제공되는 VL 영역 중 임의의 하나를 포함한다. 구체적으로 본 발명에 개시되는 CD47 항체들은 SEQ ID NOs: 5, 7, 8, 11, 15-17, 20-22, 및 27-30로 제공되는 VH 영역 중 임의의 어느 하나와 짝을 이루는 SEQ ID NOs: 31-39, 42, 43, 44, 및 47로 제공되는 VL 영역 중 임의의 어느 하나를 포함한다.

[0138] [00115] 본 발명에 개시되는 CD47 항체들은 SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, 및 SEQ ID NO: 66으로 제공되는 VH CDR1 영역 중 임의의 어느 하나, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, 및 SEQ ID NO: 76으로 제공되는 VH CDR2 영역 중 임의의 어느 하나, SEQ ID NO: 52 및 SEQ ID NO: 77으로 제공되는 VH CDR3 영역 중 임의의 어느 하나, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 67, 및 SEQ ID NO: 68으로 제공되는 VL CDR1 영역 중 임의의 어느 하나, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, 및 SEQ ID NO: 71으로 제공되는 VL CDR2 영역 중 임의의 어느 하나, 및 SEQ ID NO: 55로 제공되는 VL CDR3 영역을 포함한다.

[0139] [00116] 이 기술 분야의 숙련자라면, 과도한 실험 없이도, 어떤 모노클로날 항체가 본 발명의 모노클로날 항체(예컨대, 2A1 항체, 또는 SEQ ID NOs: 5-31로부터 선택되는 가변 중쇄와 SEQ ID NOs: 31-47로부터 선택되는 가변 경쇄를 포함하는 항체)로 하여금 CD47에 결합하는 것을 막는지를 확인함으로써 전자가 후자와 동일한 특이성을 갖는지 여부를 결정하는 것이 가능하다는 것을 알고 있을 것이다. 시험 대상이 된 모노클로날 항체가, 본 발명의 모노클로날 항체에 의한 결합에 있어서 감소로 나타나는 바와 같이 본 발명의 모노클로날 항체와 경쟁한다면, 그 두 모노클로날 항체들은 동일하거나 밀접하게 관련이 있는 에피토프에 결합하는 것이다.

[0140] [00117] 어떤 모노클로날 항체가 본 발명의 모노클로날 항체가 보유하는 그 특이성을 갖는지 결정하기 위한 다른 방법은 본 발명의 모노클로날 항체를 수용성 CD47 단백질 (이는 보통 반응성임)과 예비 반응시키고 난 후, 상기 시험 대상인 모노클로날 항체를 첨가하여 그 시험 대상 모노클로날 항체의 CD47에 결합하는 그 능력이 억제되는지 여부를 결정하는 것이다. 상기 시험 대상 모노클로날 항체가 억제된다면, 십중팔구 그것은 본 발명의 모노클로날 항체와 동일하거나 기능적으로 균등한 에피토프 특이성을 갖는 것이다.

[0141] **본 발명의 항체들**

[0142] [00118] 본 발명의 모노클로날 항체들을 스크리닝하는 것은, 예컨대 CD47- 및/또는 CD47/SIRPα-매개 신호 전달을 측정, 및 그 시험 대상 모노클로날 항체가 CD47- 및/또는 CD47/SIRPα-매개 신호 전달을 조절, 차단, 억제, 저감, 길항, 중화 또는 달리 말하여 간섭하는지 여부를 결정함으로써도 수행될 수 있다. 이들 시험은 경쟁적 결합 시험을 포함할 수 있다. 또한, 이들 시험은 실시예 9 (도 9)에 개시되는 바와 같이 생물학적 판독 정보, 예컨대 대식세포에 의한 CD47 발현 세포의 식균 작용을 촉진하는 능력을 측정할 수 있다.

[0143] [00119] CD47에 대한 모노클로날 항체 또는 그 유도체들에 대한 모노클로날 항체, 그 단편, 유사체, 동족체 또는 오솔로그 (ortholog)의 제조를 위하여 이 기술 분야에서 알려진 다양한 방법들이 사용될 수 있다. (예컨대, 본 발명에 참조로서 포함되는 문헌 [Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY] 참고).완전 인간 항체는 CDRs을 포함하는 그 경쇄 및 중쇄 양자 모두의 전체 서열이 인간 유전자로부터 발생한 것인 항체 분자이다. 이러한 항체들은 본 발명에서 "인간 항체" 또는 "완전 인간 항체"라고 명한다. 인간 모노클로날 항체들은, 예컨대 이하 제공되는 실시예에서 기재되는 방법들을 이용하여 제조된다. 또한, 인간 모노클로날 항체 항체들은 트리오마 기법; 인간 B-세포 하이브로도마 기법 (문헌 [Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72] 참고); 및 인간 모노클로날 항체 생산을 위

한 EBV 하이브리도마 기법 (문헌 [Cole, et al., 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96] 참고)을 이용하여도 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체는 이용될 수 있고, 인간 하이브리도마를 이용하거나 (문헌 [Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030] 참고) 또는 인간 B-세포를 시험관 내에서 (*in vitro*) 엡스타인 바 바이러스 (Epstein Barr Virus)로 형질 전환시킴으로써 (문헌 [Cole, et al., 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96] 참고) 생산될 수 있다.

[0144] [00120] 항체는 잘 알려진 기법들에 의하여 정제되며, 예컨대 단백질 A 또는 단백질 G를 이용하는 친화 크로마토그래피와 같은 기법들이고, 이는 주로 면역 혈청 중 IgG 분획을 제공한다. 이어서, 또는 선택적으로, 목적하는 면역 글로불린의 표적인 특정 항원, 또는 그의 에피토프가 컬럼 상에 고정화될 수 있고 면역 친화 크로마토그래피에 의하여 특정 면역 항체를 정제할 수 있다. 면역 글로불린에 대한 정제는, 예컨대 D. Wilkinson에 의하여 설명되고 있다 (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

[0145] [00121] 본 발명의 CD47 항체는 모노클로날 항체이다. CD47- 및/또는 CD47/SIRPα-매개 세포 신호 전달을 조절, 차단, 억제, 저감, 길항, 중화 또는 달리 말하여 간섭하는 모노클로날 항체들이 생성되는데, 예컨대 어떤 동물을 막 결합 및/또는 수용성 CD47로 면역화시킴으로써 이루어지고, 예컨대 인간 CD47 또는 그의 면역성 단편, 유사체 또는 변이체가 생성된다. 또는, 동물을 CD47을 인코딩하는 핵산 분자를 함유하는 벡터로 트랜스펙션되고 그로써 CD47이 발현, 트랜스펙션된 세포의 표면에 회합되는 세포로 면역화한다. 또는, 상기 항체들은 CD47에 결합하기 위한 항체 또는 항원 결합 도메인 서열을 함유하는 라이브러리를 스크리닝함으로써 얻어진다. 이러한 라이브러리는, 예컨대 박테리오파지에서 결합되는 파지 입자들의 표면상에 발현되는 박테리오파지 피막 단백질과의 단백질 또는 펩타이드 융합 및 그 파지 입자들 내 함유되는 인코딩 DNA 서열들로서 마련된다 (즉, "파지 제공 라이브러리"). 골수종/B 세포 융합으로부터 결과된 하이브리도마를, 그 후에 CD47에 대한 반응성에 대하여 스크리닝한다.

[0146] [00122] 모노클로날 항체는, 예컨대 하이브리도마 방법을 이용하여 제조되는데, 예컨대 문헌 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)]에 기재된 방법을 이용한다. 하이브리도마 방법에서는, 마우스, 햄스터 또는 기타 적당한 숙주 동물이 통상적으로 면역화 제제로 면역화되어 그 면역화 제제에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 이끌어내게 된다. 또는, 상기 림프구는 시험관 내 면역화될 수 있다.

[0147] [00123] 상기 면역화 제제는 통상적으로 단백질 항원, 그의 단편 또는 그의 융합 단백질을 포함한다. 일반적으로, 인간 기원 세포가 요구된다면, 말초 혈액 림프구가 사용되고, 또는 비인간 포유류원이 요구된다면 비장 세포나 림프절 세포가 사용된다. 그 후, 림프구는 적절한 융합 제제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 불멸화 세포주와 융합되고, 하이브리도마 세포를 형성한다 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). 불멸화 세포주는 보통 형질 전환된 포유류 세포로, 특히 쥐, 소 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 보통, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 하이브리도마 세포는, 좋기로는 융합되지 않은 불멸화 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 성분을 함유하는 적절한 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예컨대, 모세포에 하이포산틴 구아닌 포스포리보실 전달효소 (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT 또는 HPRT)가 결손되어 있다면, 그 하이브리도마를 위한 배양 배지는 통상적으로 하이포산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이고 ("HAT 배지"), 이들 물질은 HGPRT-결손 세포의 성장을 막는다.

[0148] [00124] 양호한 불멸화 세포주는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정적인 고수준 발현을 지지하며, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 것들이다. 더욱 양호한 불멸화 세포주는 쥐과의 골수종 세포주들로, 이들은, 예컨대 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California 및 American Type Culture Collection, Manassas, Virginia로부터 얻을 수 있다. 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로골수종 세포주 역시 모노클로날 항체의 생산을 위하여 개시된 바 있다. (문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63] 참고).

[0149] [00125] 하이브리도마 세포들이 배양되는 배양 배지는 그 후에 그 항원에 대한 모노클로날 항체들의 존재에 대하여 시험될 수 있다. 좋기로는, 그 하이브리도마 세포에 의하여 생산된 모노클로날 항체들의 결합 특이성은 면역침전법 또는 시험관 내 결합 시험, 예컨대 방사선면역시험 (RIA) 또는 효소결합 면역흡착 분석법 (ELISA)에 의하여 결정된다. 이러한 기법들 및 분석법들은 이 기술 분야에 알려져 있다. 예컨대, 모노클로날 항체의 결합

친화도는 문헌 [Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐차드 분석에 의하여 결정될 수 있다. 또한, 모노클로날 항체의 치료적 적용에 있어서, 표적 항원에 대하여 고수준의 특이성 및 높은 결합 친화도를 갖는 항체들을 식별하는 것은 중요하다.

[0150] [00126] 원하는 하이브리도마 세포들이 확인된 후, 제한 희석 방법에 의하여 클론이 서브클로닝되고 표준 방법에 의하여 성장되게 된다. (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103] 참고). 이러한 목적을 위한 적절한 배양 배지로는, 예컨대 Dulbecco's Modified Eagle's Medium 및 RPMI-1640 배지를 들 수 있다. 또는, 하이브리도마 세포는 포유류의 복수(腹水)로서 생체 내에서 성장할 수 있다.

[0151] [00127] 상기 서브클론들에 의하여 분비되는 모노클로날 항체들은 관용적 면역 글로불린 정제 방법들, 예컨대 단백질 A-세파로오스, 하이드록실 아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화 크로마토그래피에 의하여 배양 배지 또는 복수액으로부터 단리 또는 정제될 수 있다.

[0152] [00128] 모노클로날 항체들은 또한 재조합 DNA 방법에 의하여도 제조될 수 있는데, 예컨대 미국 특허 4,816,567호에 개시된 방법에 의하여 제조될 수 있다. 본 발명의 모노클로날 항체를 인코딩하는 DNA는 관용적인 방법들을 이용하여 (예컨대, 쥐 항체를 구성하는 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자들에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용함으로써) 쉽게 단리 및 시퀀싱될 수 있다. 본 발명의 하이브리도마 세포들은 이러한 DNA의 양호한 제공원으로서 기여한다. 일단 단리되면, 상기 DNA를 발현 벡터 내에 넣어, 이것을 그 후 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포, 인간 배아 신장 (HEK) 293 세포, 원숭이 COS 세포, PER.C6®, NS0 세포, SP2/0, YB2/0, 또는 달리는 면역 글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포들과 같은 숙주 세포 내로 트랜스펙션하여, 그 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성하게 된다. 또한, 상기 DNA는 변형될 수 있는데, 예컨대 상동 쥐 서열 자리에 인간의 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환하거나 (미국 특허 4,816,567호; 문헌 [Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)] 참고) 또는 면역 글로불린 코딩 서열에 비(非)면역 글로불린 폴리펩타이드의 코딩 서열의 전부 또는 일부를 공유적으로 결합시킬 수 있다. 이러한 비면역 글로불린 폴리펩타이드는 본 발명의 항체의 불변 도메인 대신 치환될 수 있고, 또는 본 발명의 항체의 항원 결합 부위 중 하나의 가변 도메인 대신 치환되어 키메라 2가 항체를 생성할 수 있다.

[0153] **인간 항체 및 항체의 인간화**

[0154] [00129] 본 발명의 모노클로날 항체들은 완전 인간 항체 또는 인간화 항체를 포함한다. 이들 항체들은 그 투여되는 면역 글로불린에 대한 인간의 면역 반응을 일으키지 않고 인간에게 투여하기에 적절하다.

[0155] [00130] CD47 항체는, 예컨대 하기 제공되는 실시예들에 기재되는 방법을 이용하여 생성된다. 예컨대, 본 발명의 CD47 항체들은 마우스에서의 변형 RIMMS (Repetitive Immunization Multiple Sites) 면역화 전략 및 후속하는 하이브리도마 생성을 이용하여 동정된다.

[0156] [00131] 다른 대안의 방법에 있어서, CD47 항체는, 예컨대 오로지 인간의 서열들만을 함유하는 항체들을 이용한 파지-제시 방법을 이용하여 개발된다. 이러한 접근법은 이 기술 분야에 널리 알려져 있는데, 예컨대 본 발명에 참조로서 포함되는 WO92/01047 및 미국 특허 6,521,404호에 잘 알려져 있다. 이 접근법에 있어서, 파지가 운반하는 무작위 쌍의 경쇄 및 중쇄의 조합적 라이브러리는 천연 또는 재조합 CD47 제공원 또는 그들의 단편들을 이용하여 스크리닝된다. 또 다른 접근법에 있어서, CD47 항체는 최소한 그 방법의 한 단계가 트랜스제닉, 비인간인 동물을 인간 CD47 단백질로 면역화하는 것을 포함하는 방법으로 생산될 수 있다. 이 접근법에 있어서, 이러한 이종발생 (xenogenic) 비인간 동물의 내재 중쇄 및/또는 카파 경쇄좌 중 일부는 폐질되고 항원에 반응하여 면역 글로불린을 인코딩하는 유전자를 생성하는데 필요로되는 재배열을 할 수 없게 된다. 또한, 하나 이상의 인간 중쇄좌 및 하나 이상의 인간 경쇄좌가 안정적으로 그 동물로 트랜스펙션된다. 따라서, 투여되는 항체에 대한 반응에 있어서, 상기 인간의 좌(坐)들은 재배열하여 그 항원에 대하여 면역 특이적인 인간 가변 영역을 인코딩하는 유전자를 제공하게 된다. 면역화에 있어, 그러므로, 제노마우스 (xenomouse)는 완전 인간 면역 글로불린을 분비하는 B-세포를 생산한다.

[0157] [00132] 이종발생 비인간 동물을 생산하는 다양한 기법들이 이 기술 분야에 잘 알려져 있다. 예컨대, 그 전체가 본 발명에 참조로서 포함되는 미국 특허 6,075,181호 및 6,150,584호를 참고. 이러한 일반적인 전략은 1994년에 간행된 첫번째 XenoMouse™ 족의 생성과 관련하여 입증되었다. 그 전체가 본 발명에 참조로서 포함되는 문헌 [Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994)] 참고. 또한, 미국 특허 6,162,963호; 6,150,584호; 6,114,598호; 6,075,181호; 및 5,939,598호 및 일본 특허 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, 및 3 068 507 B2 및 유

럽 특허 EP 0 463 151 B1 및 국제특허출원 WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310과 관련 패밀리 건들 참조.

[0158] [00133] 또 다른 접근법으로, 외부 Ig 좌가, 그 Ig 좌로부터의 조각들 (개별적인 유전자들)을 포함하는 것을 통해 모방되는 "미니로커스" 접근법을 이용한다. 따라서, 하나 이상의 VH 유전자들, 하나 이상의 D_H 유전자들, 하나 이상의 J_H 유전자들, mu 불변 영역 및 제2 불변 영역 (좋기로는 감마 불변 영역)이 어떤 동물 내로의 삽입을 위한 컨스트럭트 내에 형성된다. 예컨대, 미국 특허 5,545,806호; 5,545,807호; 5,591,669호; 5,612,205호; 5,625,825호; 5,625,126호; 5,633,425호; 5,643,763호; 5,661,016호; 5,721,367호; 5,770,429호; 5,789,215호; 5,789,650호; 5,814,318호; 5,877,397호; 5,874,299호; 6,023,010호; 및 6,255,458호; 및 유럽 특허 0 546 073 B1; 및 국제특허출원 WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, 및 WO 98/24884와 관련된 패밀리 건들 참조.

[0159] [00134] 미세세포 융합을 통한, 큰 조각 염색체 또는 전체 염색체가 도입되는 마우스로부터의 인간 항체 생성이 입증되어 왔다. 유럽 특허출원 773 288호 및 843 961호 참고.

[0160] [00135] 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 반응은 키메라 또는 다른 인간화 항체들을 제조하는 산업으로 이끌었다. 키메라 항체는 인간 불변 영역 및 면역 가변 영역을 가지지만, 특히 그 항체의 만성적 또는 다량 이용에 있어서 특정한 인간 항-키메라 항체 (HACA) 반응이 관찰될 것으로 기대된다. 따라서, HAMA 또는 HACA 반응의 염려 및/또는 효과를 해치거나 또는 달리는 완화하기 위해서는 CD47에 대한 완전 인간 항체를 제공하는 것이 바람직할 것이다.

[0161] [00136] 면역원성이 감소된 항체의 생산은 또한 인간화, 키메라화 및 적절한 라이브러리를 이용한 디스플레이 기법들을 통하여 이루어진다. 이 기술 분야에 잘 알려진 기법들을 이용하여 쥐과의 항체들 또는 다른 종들의 항체들이 인간화 또는 영장류화될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예컨대, 문헌 [Winter and Harris Immunol Today 14:43 46 (1993) 및 Wright et al. Crit, Reviews in Immunol. 12125-168 (1992)] 참고. 대상 항체는 재조합 DNA 기법들로 조작되어 CH1, CH2, CH3, 힌지 도메인, 및/또는 구조 영역 도메인이 그 대응하는 인간 서열로 치환될 수 있다 (WO 92102190 및 미국 특허 5,530,101호; 5,585,089호; 5,693,761호; 5,693,792호;, 5,714,350호; 및 5,777,085호 참고). 또한, 키메라 면역 글로불린 유전자들의 제작을 위한 Ig cDNA의 사용이 이 기술 분야에 알려져 있다 (Liu et al. P.N.A.S. 84:3439 (1987) and J. Immunol. 139:3521 (1987)). 하이브리도마 또는 그 항체를 생산하는 다른 세포로부터 mRNA가 단리되고 cDNA 제조에 사용된다. 그 대상 cDNA는 특정 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄 반응을 통하여 증폭될 수 있다 (미국 특허 4,683,195호 및 4,683,202호). 또는, 라이브러리를 만들고 스크리닝하여 관심 대상 서열을 단리한다. 그 항체의 가변 영역을 인코딩하는 DNA 서열은, 그 후 인간 불변 영역 서열과 융합된다. 인간 불변 영역 유전자 서열은 문헌 [Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of immunological Interest, N.I.H. publication no. 91-3242]에서 찾을 수 있다. 인간 C 영역 유전자들은 공지의 클론들로부터 쉽게 이용 가능하다. 이소형의 선택은 원하는 효과 기능에 의하여 인도될 것인데, 예컨대 보체 고정 또는 항체-의존성 세포 독성의 활성 등이다. 양호한 이소형은 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4이다. 인간 경쇄 불변 영역들, 카파 또는 람다 중 어느 하나가 사용될 수 있다. 그 후, 키메라, 인가화 항체는 관용적인 방법에 의하여 발현된다.

[0162] [00137] Fv, $F(ab')_2$ 및 Fab와 같은 항체 단편들은 온전한 단백질의 분해, 예컨대 단백질 분해효소 또는 화학적 분해에 의한 분해에 의하여 제조될 수 있다. 또는, 절단된 유전자가 설계된다. 예컨대, $F(ab')_2$ 단편의 일부분을 인코딩하는 키메라 유전자가 H쇄의 CH1 도메인과 힌지 영역을 인코딩하는 CNA 서열을 포함하고, 뒤이어 번역 종격 코돈이 옴으로써 절단형 분자를 생산할 것이다.

[0163] [00138] 인간 C 영역 분절로의 V 영역 분절의 이어지는 연결을 위하여 J 영역에 유용한 제한 효소 부위를 도입하기 위한 프라이머로서 이용하기 위하여, H 및L J 영역의 공통 서열이 올리고뉴클레오티드 설계에 이용될 수 있다. C 영역 cDNA가 부위 지정 돌연변이화 (site directed mutagenesis)에 의하여 변형되어 인간 서열 내 유사 위치에 제한 효소 부위를 넣을 수 있다.

[0164] [00139] 발현 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, YACs, EBV 유래 에피좀 등등을 포함한다. 편리한 벡터는 임의의 VH 또는 VL 서열이 쉽게 삽입되고 발현될 수 있도록 조작된 적절한 제한효소 부위를 갖는, 기능적으로 완전한 인간 CH 또는 CL 면역 글로불린 서열을 인코딩하는 것이다. 이러한 벡터들에 있어서, 스플라이싱은 보통, 끼어드는 J 영역의 스플라이스 공여자 부위와 선행하는 인간 C 영역 스플라이스 수용자 부위 사이에서 일어나고, 또한, 인간 CH 엑손 내에 존재하는 스플라이스 영역에서 일어난다. 폴리아데닌화 및 전사 종결은 코

딩 영역의 하류인 본래 염색체 부위에서 일어난다. 그 결과 생기는 키메라 항체는 임의의 강력한 프로모터, 예컨대 레트로바이러스 LTRs, 예컨대 SV-40 초기 프로모터 (Okayama et al. Mol. Cell. Bio. 3:280 (1983)), 라우스 육종 프로모터 LTR (Gorman et al. P.N.A.S. 79:6777 (1982)), 및 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 LTR (Grosschedl et al. Cell 41:885 (1985)) 등과 연결될 수 있다. 또한, 이해될 바와 같이, 본래의 Ig 프로모터 등등이 사용될 수 있다.

[0165] [00140] 또한, 인간 항체 또는 다른 종들로부터의 항체는 디스플레이 유형 기법들을 통해서 생성될 수 있는데, 예컨대 제한 없이 파지 디스플레이, 레트로바이러스 디스플레이, 리보좀 디스플레이를 들 수 있고, 기타 기법들, 이 기술 분야에 잘 알려진 기법들을 이용하여 결과하는 분자는 추가적인 성숙, 예컨대 친화도 성숙을 거칠 수 있는데, 이러한 기법들은 이 기술 분야에 잘 알려져 있다. 문헌 [Wright et al. Crit, Reviews in Immunol. 12125-168 (1992), Hanes and Pluckthun PNAS USA 94:4937-4942 (1997) (리보좀 디스플레이), Parmley and Smith Gene 73:305-318 (1988) (파지 디스플레이), Scott, TIBS, vol. 17:241-245 (1992), Cwirla et al. PNAS USA 87:6378-6382 (1990), Russel et al. Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al. Immunol. Reviews 130:43-68 (1992), Chiswell and McCafferty TIBTECH; 10:80-8A (1992), 및 미국 특허 5,733,743호]. 디스플레이 기법들을 이용하여 인간이 아닌 항체들을 생산한다면, 이러한 항체들은 전술한 바와 같이 인간화될 수 있다.

[0166] [00141] 이들 기법들을 이용하여, 항체들은 CD47 발현 세포, 수용성 CD47, 그들의 에피토프 또는 펩타이드, 및 본 발명에 기재된 활성들에 대하여 전술한 바와 같이 후에 스크리닝 될 수 있는 그에 대한 발현 라이브러리 (예컨대, 미국 특허 5,703,057호 참고)로 생성될 수 있다.

[0167] [00142] 본 발명의 CD47 항체들은 전술한 단일쇄 항체를 인코딩하는 DNA 분절을 함유하는 벡터를 이용하여 발현될 수 있다.

[0168] [00143] 이들은 벡터, 리포좀, 나형(裸形) DNA, 아쥬방트-보조 DNA, 유전자 건, 카테터 등을 포함할 수 있다. 벡터는 WO 93/64701에 개시된 것과 같은 화학적 컨쥬게이트를 포함하는데, 이는 표적화 모이어티 (예컨대, 세포 표면 수용체에 대한 리간드) 및 핵산 결합 모이어티 (예컨대, 폴리리신)을 가지며, 바이러스 벡터 (예컨대 DNA 또는 RNA 바이러스 벡터), 표적 모이어티 (예컨대 표적 세포에 대하여 특이적인 항체)를 함유하는 융합 단백질과 핵산 결합 모이어티 (예컨대, 프로타민)를 갖는 PCT/US95/02140 (WO 95/22618)에 개시된 것과 같은 융합 단백질, 플라스미드, 파지 등을 포함한다. 상기 벡터는 염색체 벡터, 비염색체 벡터 또는 합성 벡터일 수 있다.

[0169] [00144] 양호한 벡터로는 바이러스 벡터, 융합 단백질 및 화학적 컨쥬게이트를 들 수 있다. 레트로바이러스 벡터로는 몰로니 쥐 백혈병 바이러스를 들 수 있다. DNA 바이러스 벡터가 양호하다. 이들 벡터는 폭스 벡터, 예컨대 오르소폭스 또는 애비폭스 벡터, 헤르페스바이러스 벡터, 예컨대 헤르페스 심플렉스 I 바이러스 (HSV) 벡터 (문헌 [Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990)] 참고), 아데노바이러스 벡터 (문헌 [LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet 3:219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69:2004 (1995)] 참고) 및 아데노-관련 바이러스 벡터 (문헌 [Kaplitt, M. G., et al., Nat. Genet. 8:148 (1994)] 참고)를 포함한다.

[0170] [00145] 폭스 바이러스 벡터는 유전자를 세포의 세포질로 도입한다. 애비폭스 바이러스 벡터는 오로지 핵산의 단기 발현만을 일으킨다. 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV) 벡터가 핵산을 신경 세포로 도입하기에 양호하다. 아데노바이러스 벡터 (약 2개월)는 아데노-관련 바이러스 (약 4개월)보다 더욱 단기 발현을 결과하는데, 이는 차례로 HSV 벡터보다 더 짧다. 선택되는 특정 벡터는 표적 세포 및 처리될 조건에 따라 달라질 것이다. 상기 도입은 표준 기법, 예컨대, 감염, 트랜스펙션, 형질 도입 또는 형질 전환에 의할 수 있다. 유전자 전달 모드의 예시로는, 예컨대 나형 DNA, $CaPO_4$ 침전, DEAE 덱스트란, 전기천공, 원형질 융합, 리포펙션, 세포 미세주입, 및 바이러스 벡터를 들 수 있다.

[0171] [00146] 벡터는 임의의 원하는 표적 세포를 본질적으로 표적하기 위하여 이용될 수 있다. 예컨대, 정위 주입 (stereotaxic injection)은 벡터 (예컨대, 아데노바이러스, HSV)를 원하는 위치로 향하게 하기 위하여 사용될 수 있다. 또한, 입자들은 미니펌프 주입 시스템, 예컨대 SynchroMed Infusion System을 이용한 뇌실내 (icv) 주입에 의하여 전달될 수 있다. 대류라고 불리는 벌크 흐름에 기초한 방법 역시 뇌의 확장된 구역으로 큰 분자들을 전달하는데 있어 효과적인 것으로 입증되었고 표적 세포로 벡터를 전달하는데 유용할 수 있다 (문헌 [Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. Physiol. 266:292-305

(1994)] 참고). 이용될 수 있는 다른 방법들로는 카테터, 정맥 주입, 비경구 주입, 복강 주입 및 피하 주입, 및 경구 또는 기타 공지의 투여 경로를 들 수 있다.

[0172] [00147] 이들 벡터는 다양한 방식으로 사용될 수 있는 대량의 항체를 발현하는데 사용될 수 있다. 예컨대, 시료 내에서 CD47의 존재를 검출하기 위하여 사용될 수 있다. 또한, CD47- 및/또는 CD47/SIRPα 상호 작용 및 CD47/SIRPα-매개 신호 전달을 결합하여 교란하려는 데 사용될 수 있다.

[0173] [00148] 본 발명의 항원성 단백질에 특이적인 단일쇄 항체의 생산을 위하여 기법들은 조정될 수 있다 (예컨대, 미국 특허 4,946,778호 참고). 또한, 어떤 단백질 또는 그의 유도체, 단편, 유사체 또는 동족체에 대한 원하는 특이성을 갖는 모노클로날 Fab 단편을 신속하고 효과적으로 식별할 수 있도록 하기 위하여 방법들은 Fab 발현 라이브러리 (예컨대, 문헌 [Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281] 참고)의 구축을 위하여 조정될 수 있다. 어떤 단백질 항원에 대한 유전자형 (idiotype)을 함유하는 항체 단편은 이 기술 분야에 공지된 기법들에 의하여 생산될 수 있는데, 예컨대 (i) 항체 분자의 펩신 분해에 의하여 생산되는 $F(ab')_2$ 단편; (ii) $F(ab')_2$ 단편의 이황화 가교를 환원시킴으로써 생성되는 Fab 단편; (iii) 항체 분자를 파파인과 환원제로 처리함으로써 생성되는 Fab 단편 및 (iv) Fv 단편을 들 수 있으나 이에 국한되는 것은 아니다.

[0174] [00149] 본 발명은 또한 Fv, Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$ CD47 단편, 단일쇄 CD47 단편, 단일 도메인 항체들 (예컨대, 나노바디 또는 VHHs), 2특이적 CD47 항체, 및 헤테로컨쥬게이트 CD47 항체를 포함한다.

[0175] [00150] 2특이적 항체는 2 이상의 상이한 항원에 대하여 결합 특이성을 갖는 항체이다. 본 발명의 경우에 있어서, 결합 특이성 중 하나는 CD47에 대한 것이다. 제2의 결합 표적은 임의의 다른 항원이고, 유리하게는 세포-표면 단백질 또는 수용체 또는 수용체 서브유닛이다.

[0176] [00151] 2특이적 항체를 제조하는 방법은 이 기술 분야에 알려져 있다. 전통적으로, 2특이적 항체의 재조합적 생산은 2개의 면역 글로불린 중쇄/경쇄 쌍들의 공발현에 기초하는데, 여기서 상기 두 중쇄들이 상이한 특이성을 갖는다 (Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)). 면역 글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 조합으로 인하여, 이러한 하이브리도마 (쿼드로마)는 10개의 상이한 항체 분자로 이루어지는 잠재적 혼합물을 생성하고, 그 중에서 오직 단 하나만이 정확한 2특이적 구조를 갖는다. 상기 정확한 분자의 정제는 보통 친화 크로마토그래피 단계로 이루어진다. 유사한 방법들이 1993년 5월 13일 간행된 WO 93/08829, 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0177] [00152] 원하는 결합 특이성을 갖는 항체의 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)은 면역 글로불린 불변 도메인 서열과 융합될 수 있다. 좋기로는, 상기 융합은 적어도 힌지의 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 면역 글로불린 중쇄 불변 도메인과 이루어진다. 상기 융합 중 하나 이상에 존재하는 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 좋다. 면역 글로불린 중쇄 융합, 및 필요하다면 면역 글로불린 경쇄를 인코딩하는 DNA들은 개별적인 발현 벡터들 내로 삽입되어 적절한 숙주 생물로 공-트랜스펙션된다. 2특이적 항체를 생성하는 상세한 내용은, 예컨대 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참고한다.

[0178] [00153] WO 96/27011에 개시된 또 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자들 간 계면을 조작하여 재조합 세포 배양으로부터 회수되는 헤테로이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 양호한 계면은 항체 불변 도메인 중 CH3 영역의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에 있어서, 제1 항체 분자 계면의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄는 더 큰 측쇄 (예컨대, 티로신 또는 트립토판)으로 교체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 것들 (예컨대, 알라닌 또는 트레오닌)로 교체함으로써 제2 항체 분자의 계면 상에는 동일하거나 유사한 사이즈로부터 더 큰 측쇄(들)로의 보상 "공동"이 형성된다. 이것이 호모이량체와 같은 원치않는 부산물보다 헤테로이량체의 수율을 높이기 위한 메커니즘을 제공한다.

[0179] [00154] 2특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예컨대, $F(ab')_2$ 2특이적 항체)로 제조될 수 있다. 항체 단편들로부터 2특이적 항체를 생성시키는 기법들이 문헌상 알려져 있다. 예컨대, 2특이적 항체는 화학적 연결을 이용하여 제조될 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science 229:81 (1985)]는 온전한 항체가 단백질 분해로 절단되어 $F(ab)_2$ 단편을 생성하는 방법을 개시하고 있다. 이들 단편들은 디티올 착화제 아비산나트륨의 존재 하에서 환원되어 인접한 디티올을 안정화하고 분자간 이황화결합 형성을 막는다. 생성된 Fab' 단편은 그 후에 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 변환된다. Fab'-TNB 유도체들 중 하나는 그 후 메르캅토에틸아민을 이용한 환원으로 Fab'-티올로 재변환되고 균등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합되어 2특이적 항체를 형성한다. 생산된

2특이적 항체들은 효소의 선택적 고정화를 위한 제제로 사용될 수 있다.

[0180] [00155] 또한, Fab' 단편은 대장균으로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 2특이적 항체를 형성할 수 있다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)]은 완전 인간화 2특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의 생산을 개시한다. 각각의 Fab' 단편은 대장균으로부터 개별적으로 분비되어 시험관 내에서 화학적 커플링을 거치게 되고 2특이적 항체를 형성한다. 따라서, 형성된 2특이적 항체는 ErbB2 수용체 및 일반적인 인간 T 세포를 과발현하는 세포에 결합할 수 있었을 뿐 아니라, 인간 유방암 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발한다.

[0181] [00156] 재조합 세포 배양으로부터 직접 2특이적 항체 단편들을 제조하고 단리하는 다양한 기법들이 또한 알려져 있다. 예컨대, 2특이적 항체들은 류신 지퍼를 이용하여 생산되어져 왔다. 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질들로부터의 류신 지퍼 펩타이드는 유전자 융합에 의하여 2개의 상이한 항체들의 Fab' 부분에 결합되었다. 그 항체 호모이량체는 힌지 영역에서 환원되어 단량체들을 형성한 후, 재산화되어 항체 헤테로이량체를 형성하였다. 이러한 방법은 항체 호모이량체의 생산에도 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 개시된 "이중체(diabody)" 기법은 2특이적 항체 단편 제조의 다른 메커니즘을 제공하였다. 이 단편들은 링커에 의하여 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)를 포함하는데, 상기 링커는 너무 짧아서 상기 두 도메인을 동일한 쇄 상에서 짝을 이룰 수 없게 한다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인들은 다른 단편의 상보적 V_L 및 V_H 도메인과 짝을 이루도록 강요되고, 그로써 2개의 항원 결합 부위를 형성한다. 단일쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용함으로써 2특이적 항체 단편을 만드는 또 다른 전략 역시 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)] 참고.

[0182] [00157] 2 이상의 결합가를 갖는 항체들도 고려된다. 예컨대, 3특이적 항체들이 제조될 수 있다. 문헌 [Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)].

[0183] [00158] 예시적인 2특이적 항체들은 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는데, 그 중 적어도 하나는 본 발명의 단백질 항원에서 유래한 것이다. 또는, 한 면역 글로불린 분자의 항-항원 팔은 백혈구 상의 촉발 분자, 예컨대 T-세포 수용체 분자 (예컨대, CD2, CD3, CD28, 또는 B7), 또는 IgG ($Fc\gamma R$)에 대한 Fc 수용체, 예컨대 $Fc\gamma RI$ (CD64), $Fc\gamma RII$ (CD32) 및 $Fc\gamma RIII$ (CD16)에 결합하는 팔과 결합하여 그 특정 항원을 발현하는 세포로의 세포 방어 메커니즘에 초점을 맞출 수 있다. 또한, 2특이적 항체는 특정 항원을 발현하는 세포데 대한 세포독성 제제로 사용될 수 있다. 이들 항체는 항원-결합 팔 및 세포독성 제제 또는 방사선 핵종 킬레이터, 예컨대 EOTUBE, DPTA, DOTA, 또는 TETA와 결합하는 팔을 갖는다. 또 다른 관심 대상 2특이적 항체는 본 발명에서 개시하는 단백질 항원에 결합하고 조직 인자 (TF)에도 결합한다.

[0184] [00159] 헤테로컨쥬게이트 항체 역시 본 발명의 범위 내에 속한다. 헤테로컨쥬게이트 항체는 2개의 공유적으로 결합된 항체들로 이루어진다. 이러한 항체는, 예컨대 원치않는 세포들에 대한 면역계 세포들을 표적하기 위하여 (미국 특허 4,676,980호 참고), 그리고 HIV 감염을 치료하기 위하여 (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089 참고) 제안되었다. 상기 항체들이 합성 단백질 화학 분야에 알려진 방법들, 예컨대 가교제를 포함하는 방법들을 이용하여 시험관 내에서 제조될 수 있다는 것이 고려된다. 예컨대, 면역독소는 이황화결합 교환 반응을 이용하거나 티오에테르 결합을 형성함으로써 설계될 수 있다. 이러한 목적하의 적절한 시약의 예시로는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티리미데이트 및 미국 특허 4,676,980호에 기재된 것들을 들 수 있다.

[0185] [00160] 본 발명의 항체를, 예컨대 CD47 이상 신호 전달과 관련된 질병 및 장애를 치료하는데 있어 그 효과를 증강시키기 위하여, 효과자 기능에 있어서 개질시키는 것이 바람직할 수 있다. 예컨대, 시스테인 잔기(들)을 Fc 영역에 도입할 수 있고, 그에 따라 이 영역에 쇄간 이황화 결합이 형성되도록 할 수 있다. 따라서, 생성된 호모이량형 항체는 내재화 능력이 향상되고 및/또는 보체-매개 세포 살상 및 항체-의존성 세포 독성 (ADCC)가 증가한다. (문헌 [Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) 및 Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)] 참고). 또는 항체를 조작하여 듀얼 Fc 영역을 갖고 그에 따라 보체 용해 및 ADCC 능력을 증강시킬 수 있다. (문헌 [Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)] 참고).

[0186] [00161] 또한, 본 발명은 독소 (예컨대, 효소적으로 활성인 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 독소, 또는 이들의 단편), 또는 방사선 동위원소 (예컨대, 방사선컨쥬게이트)와 같은 세포 독성 제제와 컨쥬게이션되는 항체를 포함하는 면역컨쥬게이트에 관한 것이다.

[0187] [00162] 사용될 수 있는 효소적으로 활성인 독소 및 그들의 단편으로는 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비

결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (수도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사신 (alpha-sarcin), 유동 단백질 (Aleurites fordii proteins), 디안틴 단백질 (dianthin proteins), 미국 자리공 단백질 (Phytolaca americana proteins)(PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 여주 억제제 (momordica charantia inhibitor), 커신 (curcin), 크로틴 (crotin), 사파오나리아 오피시날리스 억제제 (sapaonaria officinalis inhibitor), 겔로닌 (gelonin), 미토겔린 (mitogellin), 레스트릭토신 (restrictocin), 페노마이신 (phenomycin), 에노마이신 (enomycin), 및 트리코테센 (tricothecenes)을 들 수 있다. 다양한 방사선핵종이 방사선컨쥬게이트 항체 생산용으로 이용가능하다. 예시로는 ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, 및 ^{186}Re을 들 수 있다.

[0188] [00163] 항체와 세포독성 제제와의 컨쥬게이트는 다양한 2기능성 단백질-커플링 제제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2기능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수버레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨리엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)를 이용하여 제조된다. 예컨대, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987)]에 개시된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 방사선뉴클레오티드를 항체에 컨쥬게이션하기 위한 예시적 킬레이트제이다 (WO94/11026 참고).

[0189] [00164] 이 기술 분야의 숙련자라면 매우 다양한 가능한 모이어티들이 본 발명의 결과물인 항체에 커플링될 수 있음을 알 것이다. (예컨대, 본 발명에 그 전체 내용이 참조로서 포함되는 문헌 ["Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989)] 참조).

[0190] [00165] 커플링은 항체와 다른 모이어티가 그들 각각의 활성을 보유하기만 한다면 두 분자들을 결합할 임의의 화학적 반응에 의하여 이루어질 수 있다. 이러한 연결은 많은 화학적 메커니즘을 포함하는데, 예컨대 공유 결합, 친화 결합, 인터칼레이션, 배위 결합 및 착물화를 들 수 있다. 양호한 결합은, 그러나, 공유 결합이다. 공유 결합은 존재하는 측쇄들의 직접적인 축합이나 외부 가교 분자의 혼입에 의하여 이루어질 수 있다. 단백질 분자들의 커플링, 예컨대 본 발명의 항체를 다른 분자들로의 커플링에 있어서 많은 2가 또는 다가 연결 제제들이 유용하다. 예컨대, 대표적인 커플링 제제로는 유기 화합물, 예컨대 티오에스테르, 카보디이미드, 숙신이미드 에스테르, 디이소시아네이트, 글루타르알데히드, 디아조벤젠 및 헥사메틸렌 디아민을 들 수 있다. 이들 목록은 이 기술 분야에 알려진 다양한 부류의 커플링 제제들을 한정하려는 의도가 아니라, 오히려 더 많은 일반적인 커플링 제제들에 대한 예시이다. (문헌 [Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); 및 Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)] 참고).

[0191] [00166] 양호한 연결자들이 문헌에 개시되어 있다 (예컨대, MBS (M-말레이미도벤조일-N-하이드록시숙신이미드 에스테르의 사용을 설명하고 있는 문헌 [Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984)] 참고). 또한, 올리고펩타이드 링커의 방식으로 항체에 커플링되는 할로겐화 아세틸 하이드라자이드 유도체의 사용을 설명하고 있는 미국 특허 5,030,719호 참고. 특히 양호한 링커로는: (i) EDC (1-에틸-3-(3-디메틸아미노-프로필) 카보디이미드 염화수소; (ii) SMPT (4-숙신이미딜옥시카보닐-알파-메틸-알파-(2-피리딜-디티어)-톨루엔 (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP (숙신이미딜-6 [3-(2-피리딜디티오)프로피온아미도]헥사노에이트 (Pierce Chem. Co., Cat #21651G); (iv) 술포-LC-SPDP (술포숙신이미딜-6 [3-(2-피리딜디티오)-프로피안아미드] 헥사노에이트 (Pierce Chem. Co. Cat. #2165-G); 및 (v) EDC에 컨쥬게이션된 술포-NHS (N-하이드록시술포-숙신이미드: Pierce Chem. Co., Cat. #24510)를 들 수 있다.

[0192] [00167] 전술한 링커들은 상이한 속성을 갖는 성분들을 함유하므로, 컨쥬게이트로 하여금 서로 상이한 물리-화학적 특성을 갖도록 이끈다. 예컨대, 알킬 카복실레이트의 술포-NHS 에스테르는 방향족 카복실레이트의 술포-NHS 에스테르보다 더욱 안정하다. NHS-에스테르 함유 링커들은 술포-NHS 에스테르보다 덜 수용성이다. 또한, 링커 SMPT는 입체적으로 가리워진 이황화 결합을 함유하고, 안정성이 증가된 컨쥬게이트를 형성할 수 있다. 이황화결합 연결은, 일반적으로 그 이황화결합 연결이 시험관 내에서 분해되기 때문에 다른 연결자들보다 덜 안정하고, 이용가능한 컨쥬게이트 수가 더 적다. 술포-NHS는 특히, 카보디이미드 커플링의 안정성을 높일 수 있다. 술포-NHS와 함께 사용되는 경우 카보디이미드 커플링 (예컨대, EDC)은 카보디이미드 커플링 반응 단독인 경우보다 가수분해에 더 내성인 에스테르를 형성한다.

[0193] [00168] 본 발명에 개시되는 항체들은 또한 면역리포좀으로 제제화될 수 있다. 항체를 함유하는 리포좀은 이 기술 분야에 공지된 방법들, 예컨대 문헌 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 및 미국 특허 4,485,045호 및 4,544,545호]에 개시된 방법으로 제조된다. 순환 시간이 증가된 리포좀이 미국 특허 5,013,556호에 개시되어 있다.

[0194] [00169] 특히 유용한 리포좀은, 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)를 포함하는 지질 조성을 이용한 역-상 증발법에 의하여 생성될 수 있다. 원하는 직경을 갖는 리포좀을 수득하기 위하여 정의된 기공 크기의 필터를 통하여 리포좀을 압출한다. 본 발명 항체의 Fab' 단편은 문헌 [Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 이황화결합-상호변화 반응을 통하여 리포좀에 컨쥬게이션될 수 있다.

[0195] **CD47에 대한 항체의 용도**

[0196] [00170] 본 발명에 따른 치료적 물(物)의 투여가 적절한 캐리어, 부형제 및 이동, 전달, 내성 등등의 향상을 위하여 제제내로 포함되는 기타 제제와 함께 투여될 것이라는 것을 이해할 것이다. 다수의 적절한 제제를 모든 제약 화학자들에게 공지되어 있는 약전에서 찾아볼 수 있다: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), 특히 그 중에서도 Blaug, Seymour에 의한 챕터 87. 이들 제제는, 예컨대 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 지질 함유 소포 (양이온성 또는 음이온성)(예컨대, Lipofectin™), DNA 컨쥬게이트, 무수 흡습 페이스트, 수중유 및 유중수 에멀전, 에멀젼 카보왁스 (각종 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고체 겔, 및 카보왁스를 함유하는 반고체 혼합물을 포함한다. 제제 내 활성 성분이 그 제제에 의하여 불활성화되지 않고 그 제제가 생리학적으로 적합하며 투여 경로에 대하여 허용된다면, 전술한 임의의 혼합물들은 본 발명에 따른 치료 및 요법에 적합할 수 있다. 문헌 [Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998)] 및 제약 화학자들에게 잘 알려진 제제, 부형제 및 캐리어와 관련된 추가의 정보에 관한 그 내용 또한 참고.

[0197] [00171] 한 가지 구현예에 있어서, 본 발명의 모노클로날 항체를 포함하는, 본 발명의 항체는 치료 제제로서 사용될 수 있다. 이러한 제제는 일반적으로 대상체에서 이상 CD47 발현, 활성 및/또는 신호 전달과 관련한 질병 또는 장애를 진단, 예측, 모니터링, 치료, 경감 및/또는 예방하기 위하여 사용될 것이다. 치료 요법은 표준 방법을 이용하여 대상체를 식별, 예컨대 이상 CD47 발현, 활성 및/또는 신호 전달과 관련한 질병 또는 장애, 예컨대 암 또는 기타 종양 질환을 앓고 있는 (또는 유병 위험에 있는) 인간 환자들을 식별함으로써 수행된다. 항체 제조물, 좋기로는 그 표적 항원에 대하여 고특이성 및 고친화도를 갖는 것이 대상체에게 투여되고 일반적으로 그 표적과의 결합에 기인한 효과를 나타낼 것이다. 상기 항체의 투여는 표적 (예컨대, CD47)의 발현, 활성 및/또는 신호 전달 기능을 폐기 또는 억제 또는 간섭할 수 있다. 상기 항체의 투여는 표적 (예컨대, CD47)의, 천연에서 그가 결합하는 내인성 리간드 (예컨대, SIRPα)와의 결합을 폐기 또는 억제 또는 간섭할 수 있다. 예컨대, 상기 항체는 상기 표적에 결합하여 CD47의 발현, 활성 및/또는 신호 전달을 조절, 차단, 억제, 저감, 길항, 중화 또는 달리 말하면 간섭한다.

[0198] [00172] 비제한적 예시의 방식으로, 이상 CD47 발현, 활성 및/또는 신호 전달과 관련된 질환 또는 장애는 혈액암 및/또는 고형 종양을 포함한다. 혈액암은, 예컨대 백혈병, 림프종 및 골수종을 포함한다. 특정형의 백혈병은, 비제한적 예시의 방식으로 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 (AML); 만성 림프구성 백혈병 (CLL); 만성 골수성 백혈병 (CML); 골수 증식성 질환/종양 (MPDS); 및 골수 이형성 증후군을 포함한다. 특정형의 림프종은, 비제한적 예시의 방식으로 호지킨 림프종, 자연성 및 공격성 비호지킨 림프종 양자 모두, 버킷 림프종, 및 여포성 림프종 (소세포 및 대세포)을 포함한다. 특정형의 골수종은, 비제한적 예시의 방식으로 다발성 골수종 (MM), 거대 세포 골수종, 중쇄 골수종, 및 경쇄 또는 벤스 존스 골수종을 포함한다. 고형 종양은, 예컨대 유방 종양, 난소 종양, 폐 종양, 췌장 종양, 전립선 종양, 흑색종 종양, 대장 종양, 폐 종양, 두부 및 경부 종양, 방광 종양, 식도 종양, 간 종양, 및 신장 종양을 포함한다.

[0199] [00173] 암 및 기타 종양 질환과 관련된 증상으로는, 예컨대 염증, 발열, 전신 권태감, 발열, 종종 염증 환부에 몰리는 통증, 식욕 부진, 체중 감소, 부종, 두통, 피로, 발진, 빈혈, 근육 약화, 근육 피로 및 복부 증상, 예컨대 복통, 설사 또는 변비 등을 들 수 있다.

[0200] [00174] 본 발명 항체의 치료적 유효량은 일반적으로 치료 목적을 달성하기 위하여 필요로 되는 양에 관한 것이다. 전술한 바와 같이, 이것은 항체와 그 표적 항원 간의 결합 상호 작용일 수 있으며, 특정 경우에, 표적의 기능을 간섭하는 것이다. 투여될 필요량은 또한 그 특이적 항원에 대한 항체의 결합 친화도에 의존할 것이고, 또한 투여되는 항체가 그것이 투여되는 자유 체적의 다른 대상체로부터 소진되는 속도에도 의존할 것이다. 비제한적 예시의 방식으로, 본 발명 항체 또는 항체 단편의 치료적 유효 투여량의 일반적 범위는 약 0.1 mg/체중kg 내지 약 100 mg/체중kg이다. 일반적인 투여 빈도는, 예컨대 1일당 2회 내지 주당 1회의 범위일 수 있다.

[0201] [00175] 치료 유효성은 특정한 염증-관련 질환을 진단 또는 치료하는 임의의 공지된 방법과 관련하여 결정된다. 염증-관련 질환의 증상 하나 이상에 대한 경감은 그 항체가 임상적 혜택을 부여하고 있다는 것을 나타낸다.

[0202] [00176] 원하는 특이성을 갖는 항체들의 스크리닝 방법은 효소결합 면역흡착 분석법 (ELISA) 및 기타 이 기술 분야에 알려진 면역학적 매개 기법들을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다.

[0203] [00177] 또 다른 구현예에 있어서, CD47에 대한 항체는 CD47의 위치 및/또는 정량과 관련하여 이 기술 분야에서 알려진 방법들 (예컨대, 적절한 생리학적 시료 내 CD47 및/또는 CD47과 SIRPα 양자 모두의 수준을 측정하는 용도로, 진단 방법의 용도로, 단백질 영상화 용도 등등으로)에 있어서 사용될 수 있다. 주어진 구현예에 있어서, 항체 유래 항원 결합 도메인을 함유하는, CD47에 특이적인 항체, 또는 그 유도체, 단편, 유사체 또는 동족체는 약학적 활성 화합물 (이하, "치료제"로 부름)로서 이용된다.

[0204] [00178] 또 다른 구현예에 있어서, CD47에 특이적인 항체는, 표준 기법들, 예컨대 면역친화, 크로마토그래피 또는 면역침전법에 의하여 CD47 폴리펩타이드를 단리하는데 사용될 수 있다. CD47 단백질에 대한 항체 (또는 그 단편)는 임상적 시험 과정의 일부로서 조직 내 단백질 수준을 진단적으로 모니터링하는데, 예컨대 주어진 치료 요법의 효능을 측정하는데 사용될 수 있다. 검출은, 항체를 검출 가능한 물질과 커플링 (즉, 물리적으로 연결)시킴으로써 도움을 받을 수 있다. 검출 가능한 물질의 예시로는 다양한 효소, 보결 분자단, 형광 물질, 발광 물질, 생발광 물질 및 방사선 물질을 들 수 있다. 적절한 효소의 예시로는 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제, β-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린스테라제를 들 수 있고; 적절한 보결 분자단 복합체의 예시로는 스테렙타비딘/비오틴 및 애비딘/비오틴을 들 수 있으며; 적절한 형광 물질의 예시로는 엄벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 염화댄실 또는 피코에리스린을 들 수 있고; 발광 물질의 예시로는 루미놀을 들 수 있고; 생발광 물질의 예시로는 루시퍼라제, 루시페린 및 애큐오린을 들 수 있고, 적절한 방사선 물질의 예시로는 ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S 또는 ^{3}H을 들 수 있다.

[0205] [00179] 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명에 따른 항체는 시료 내에 CD47 및/또는 CD47과 SIRPα 단백질 양자 모두 (또는 그 단백질 단편)의 존재를 검출하기 위한 제제로서 사용될 수 있다. 몇 가지 구현예에 있어서, 상기 항체는 검출 가능한 표지를 함유한다. 항체는 폴리클로날, 또는 더욱 좋기로는 모노클로날 항체이다. 온전한 항체 또는 그의 단편 (예컨대, Fab, scFv, 또는 $F(ab')_2$)이 사용된다. 프로브 또는 항체와 관련하여, 용어 "표지된"은, 검출 가능한 물질의 프로브나 항체로의 커플링 (즉, 물리적으로 연결)에 의하여 상기 프로브나 항체로의 직접적인 표지 뿐 아니라, 직접적으로 표지되는 다른 시약을 이용한 반응성으로 상기 프로브나 항체를 간접적으로 표지하는 것을 포함하는 것으로 의도된다. 간접적 표지의 예시로는 형광-표지된 2차 항체를 이용한 1차 항체의 검출, 및 DNA 프로브의 비오틴을 이용한 말단-표지를 들 수 있는데 그럼으로써 이는 형광-표지된 스트렙타비딘으로 검출될 수 있다. 용어 "생물학적 시료"는 대상체로부터 단리된 조직, 세포 및 체액 뿐 아니라 대상체 내에 존재하는 조직, 세포 및 체액을 포함하는 것으로 의도된다. 그러므로, "생물학적 시료"라는 용어의 용법 내에는 혈액 및 혈청, 혈장 또는 림프액을 비롯한 혈액 분획 또는 성분이 포함된다. 즉, 본 발명의 검출 방법은 시험관 내 뿐 아니라 생체 내의 생물학적 시료에서 분석 mRNA, 단백질 또는 게놈 DNA를 검출하기 위하여 사용될 수 있다. 예컨대, 분석 mRNA의 검출을 위한 시험관 내 기법으로는 노던 혼성화 및 인 시투 (*in situ*) 혼성화를 들 수 있다. 분석 단백질의 검출을 위한 시험관 내 기법으로는 효소결합 면역흡착 분석법 (ELISA), 웨스턴 블롯, 면역침전법 및 면역형광법을 들 수 있다. 분석 게놈 DNA의 검출을 위한 시험관 내 기법으로는 서던 혼성화를 들 수 있다. 면역분석을 수행하는 방법들은, 예컨대 문헌 ["ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulus, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; 및 "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985]에 개시되어 있다. 또한, 분석 단백질의 검출을 위한 생체 내 기법들로는 대상체 내로 표지된 항-분석 단백질 항체를 도입하는 것을 들 수 있다. 예컨대, 상기 항체는 대상체 내에서 그 존재 및 위치가 표준 영상화 기법에 의하여 검출될 수 있는 방사선 마커로 표지될 수 있다.

[0206] **CD47 항체의 치료적 투여 및 제제**

[0207] [00180] 본 발명의 항체 (본 발명에서 "활성 화합물"이라고도 부름), 그 유도체, 단편, 유사체 및 동족체는 투여를 위하여 적절한 약학적 조성물 내로 포함될 수 있다. 이러한 조성물의 제조와 관련한 이론 및 고려사항 뿐 아니라 성분 선택에 있어서의 가이드는, 예컨대 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science and Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, and Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; 및 Peptide and Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York]에 제공된다.

[0208] [00181] 이러한 조성물은 통상적으로 항체와 약학적으로 허용되는 캐리어를 포함한다. 항체 단편이 사용되는 경우, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 가장 작은 억제 단편이 양호하다. 예컨대, 항체의 가변-영역 서열에 기초하여, 상기 표적 단백질 서열에 결합하는 능력을 보유하는 펩타이드 분자가 설계될 수 있다. 이러한 펩타이드는 화학적으로 합성 및/또는 재조합 DNA 기법에 의하여 생산될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)] 참고).

[0209] [00182] 본 발명에서 사용되는 바, 용어 "약학적으로 허용가능한 캐리어"는 약학적 투여와 함께 적합한 임의의 모든 용매, 분산매, 피막, 항박테리아제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연 제제, 등등을 포함하는 것으로 의도된다. 적절한 캐리어들이 본 발명에 참조로서 포함되는 이 기술 분야의 표준 레퍼런스 텍스트인 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences]의 가장 최신판에 기재되어 있다. 이러한 캐리어 또는 희석제의 양호한 예시로는 물, 염용액, 링거액, 덱스트로스 용액, 및 5% 인간 혈청 알부민을 들 수 있으나 이에 국한되는 것은 아니다. 리포좀 및 고정 오일과 같은 비수성 비히클 역시 사용될 수 있다. 약학적으로 활성인 물질로서 이러한 배지 및 제제들을 사용하는 것은 이 기술 분야에 잘 알려져 있다. 어떤 관용적인 배지 또는 제제가 활성 화합물과 비적합성이지만 않다면, 조성물에의 그 사용이 고려된다.

[0210] [00183] 생체 내 투여용으로 사용되는 제제는 멸균되어야 한다. 이것은 멸균 여과 막을 통하여 여과시킴으로써 쉽게 이루어진다.

[0211] [00184] 본 발명의 약학적 조성물은 그 의도되는 투여 경로에 적합하도록 제제화된다. 투여 경로의 예시로는 비경구, 예컨대 정맥내, 피내, 피하, 경구 (예컨대, 흡입), 경피 (즉, 국소), 점막 및 직장 투여를 들 수 있다. 비경구, 피내 또는 피하 적용을 위하여 사용되는 용액 또는 현탁액은 하기의 성분들을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주입을 위한 물, 염 용액, 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매; 항박테리아 제제, 예컨대 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨; 킬레이트제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA); 완충액, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트, 및 등장성 조정을 위한 제제, 예컨대 염화나트륨 또는 덱스트로스. pH는 염산 또는 수산화나트륨과 같은 산이나 염기로 조정될 수 있다. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리나 플라스틱으로 만들어진 다투여 바이알에 봉입될 수 있다.

[0212] [00185] 주입 가능한 용도에 적합한 약학적 조성물은 멸균 수용액 (물에 용해성인) 또는 분산액 또는 멸균 주사용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥 내 투여용으로, 적합한 캐리어는 생리 식염수, 제균수, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) 또는 인산 완충 염용액 (PBS)을 들 수 있다. 모든 경우에 있어서, 상기 조성물은 멸균이어야 하고, 용이한 주사 가능성이 있을 정도로 유동성이어야 한다. 제조 및 저장 조건 하에서 안정하여야 하고, 박테리아 및 진균 등의 미생물의 오염 작용에 대항하여 보존되어야 한다. 상기 캐리어는, 예컨대 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 배지일 수 있다. 적정 유동성은, 예컨대 레시틴과 같은 피막의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 계면 활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항박테리아제 및 항진균제에 의하여 달성될 수 있는데, 예컨대 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등등이다. 많은 경우에, 이러한 조성물에 등장화 제제, 예컨대 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 포함하는 것이 양호할 것이다. 주사 가능한 조성물의 장기간 흡수는, 조성물에 흡수를 지연시키는 제제, 예컨대 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴를 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0213] [00186] 멸균 주사 용액은 활성 화합물을 적절한 용매 내에 필요량으로, 필요하다면 상기 열거된 성분 하나 또는 그들의 조합과 함께 혼입함으로써 제조될 수 있고, 여과 멸균이 뒤따른다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산

배지 및 상기 열거된 것들로부터의 필요한 기타 성분들을 함유하는 멸균 비히클로 활성 화합물을 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 상기 활성 성분 더하기 미리 멸균 여과된 그 용액으로부터의 임의의 추가 목적 성분의 분말을 수득하는 진공 건조 및 동결 건조이다.

[0214] [00187] 경구용 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 캐리어를 포함한다. 이들은 젤라틴 캡슐에 봉입되거나 정제 내에 압축될 수 있다. 경구 치료 투여의 목적으로, 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입되어 정제, 트로키제 또는 캡슐의 형태로 이용될 수 있다. 또한, 경구 조성물은 구강세척제로서 사용하기 위한 액체 캐리어를 이용하여 제조될 수 있는데, 여기서 그 액체 캐리어 내의 화합물은 경구로 적용되어 흘려져, 뱉어내거나 삼켜진다. 약학적으로 적합한 결합 제제, 및/또는 아쥬반트가 상기 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 상기 정제, 알약, 캡슐, 트로키제 등등은 임의의 하기의 성분들 또는 유사한 성질의 화합물들을 포함할 수 있다: 결합제, 예컨대 미세결정질 셀룰로오스, 트라가칸트 검 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 전분 또는 락토오스, 붕해제, 예컨대 알긴산, Primogel, 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트 또는 Sterotes; 활택제, 예컨대 콜로이드 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로오스 또는 사카린; 또는 향미제, 예컨대 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향.

[0215] [00188] 흡입에 의한 투여용으로, 상기 화합물은 가압 용기, 적절한 추진제, 예컨대 이산화탄소와 같은 가스를 함유하는 분배기, 또는 분무기로부터의 에어로졸 스프레이의 형태로 전달된다.

[0216] [00189] 또한, 전신 투여는 점막 또는 경피 수단에 의할 수 있다. 점막 또는 경피 투여용으로, 침투될 장벽에 적절한 침투제가 제제에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 이 기술 분야에 알려져 있고, 예컨대 점막 투여를 위하여, 변성제 (detergents), 담즙산염 및 푸시딘산 유도체를 포함한다. 점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌약을 이용함으로써 이루어질 수 있다. 경피 투여용으로, 상기 활성 화합물들은 이 기술 분야에 일반적으로 알려진 바와 같이 연고, 고약, 겔 또는 크림으로 제제화된다.

[0217] [00190] 상기 화합물은 또한 좌약의 형태로 (예컨대, 관용적인 좌약 베이스, 예컨대 코코아 버터 및 기타 글리세리드와 함께) 또는 직장 전달용의 보유 관장제의 형태로 제조될 수 있다.

[0218] [00191] 한 가지 구현예에 있어서, 상기 활성 화합물들은 그 화합물이 체외로 급속히 제거되는 것을 방지할 캐리어를 이용하여 제조되는데, 예컨대 지연/조절 방출 제형, 예컨대 임프란트 및 마이크로캡슐화 전달 시스템 등이다. 생분해성, 생체적합성 고분자들이 사용될 수 있는데, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르소에스테르, 및 폴리락트산 등이다. 이러한 제제의 제조 방법은 이 기술 분야의 숙련자에게 자명하다.

[0219] [00192] 예컨대, 활성 성분은, 예컨대 코아세르베이션 기법 또는 계면 중합에 의하여 제조되는 마이크로캡슐 내에 갇힐 수 있는데, 각각 콜로이드 약물 전달 시스템 (예컨대, 리포좀, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀전 내의, 예컨대 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐이다.

[0220] [00193] 지연-방출 제제가 제조될 수 있다. 지연-방출 제제의 적합한 예로는 항체를 함유하는 고형 소수성 고분자로 이루어지는 반투과성 매트리스를 들 수 있는데, 이 매트리스는 성형된 물품, 예컨대 필름, 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 지연-방출 매트리스의 예로는 폴리에스테로, 하이드로겔 (예컨대, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락타이드 (미국 특허 3,773,919호), L-글루타민산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 LUPRON DEPOT ™ (락트산-글리콜산 공중합체와 류프롤리드 아세테이트로 이루어지는 주입용 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산을 들 수 있다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 고분자들이 100일 이상 분자 방출을 가능하게 함에도, 특정한 하이드로겔은 보다 짧은 시간 동안 단백질을 방출한다.

[0221] [00194] 또한, 상기 재료들은 Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals, Inc.로부터 구득할 수 있다. 리포좀 현탁액 (예컨대, 바이러스 항원에 대한 모노클로날 항체로 감염된 세포를 표적하는 리포좀) 또한 약학적으로 허용가능한 캐리어로 사용될 수 있다. 이들은 이 기술 분야의 숙련자들에게 알려진 방법에 따라, 예컨대 미국 특허 4,522,811에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0222] [00195] 투여의 간이성 및 투여량의 균일성을 위하여 경구 또는 비경구 조성물을 투여 단위 제형으로 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본 발명에서 사용되는 바 투여 단위 제형은 치료될 대상체에 대한 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 말하며; 각 단위는 필요한 약학적 캐리어와 함께, 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 제형에 대한 상세 활성 화합물의 고유한

성질과 달성되어야 할 특정 치료 효과 및 개개인의 치료를 위하여 이러한 활성 화합물을 배합하는 이 기술 분야의 내재된 제한에 의하여 설명되고 그에 직접적으로 의존한다.

[0223] [00196] 상기 약학적 조성물은 용기, 팩 또는 분배기에 투여 지침과 함께 포함될 수 있다.

[0224] [00197] 또한, 제제는 치료될 특정 증상에 필요한 하나 이상의 활성 화합물, 좋기로는 서로 악영향을 미치지 않는 보와적인 활성을 가진 것들을 포함할 수 있다. 또는, 아니면 또한, 상기 조성물은 그 기능을 강화하는 제제, 예컨대 세포독성 제제, 사이토카인, 화학치료 제제 또는 성장-억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자들은 그 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합하여 적절히 존재한다.

[0225] [00198] 한 가지 구현예에 있어서, 활성 화합물은 병용 요법으로 투여되는데, 즉 다른 제제, 예컨대 다양한 형태의 암, 자가면역 질환 및 염증성 질병과 같은 병리적 질환 또는 장애를 치료하는 데 유용한 치료제와 조합하여 투여된다. 본 발명의 문맥상 "조합하여"라는 용어는 제제들이 실질적으로 동시에, 동시이거나 순차적으로 주어진다는 것을 의미한다. 순차적으로 주어진다면, 제2 화합물의 투여 개시점에, 두 화합물들 중 제1의 것은 좋기로는 여전히 그 치료 부위에 유효한 농도로 검출 가능하다.

[0226] [00199] 예컨대, 병용 요법은 이하 더 자세히 설명될 하나 이상의 추가적인 치료 제제, 예컨대 하나 이상의 사이토카인 및 성장 인자 억제제, 면역억제제, 항염증제, 대사 억제제, 효소 억제제 및/또는 세포독성 또는 세포증식 억제제와 공제제화 및/또는 공투여되는, 본 발명의 항체를 하나 이상 포함할 수 있다. 이러한 병용 요법은 투여되는 치료 제제를 낮은 투여량으로 유리하게 이용할 수 있으므로, 단일요법과 관련된 다양한 가능한 독성 또는 합병증을 회피할 수 있다.

[0227] [00200] 본 발명의 항체와 조합하여 사용되는 양호한 치료 제제는 염증 반응에 있어서 다양한 단계에서 간섭하는 그러한 제제들이다. 한 가지 구현예에 있어서, 본 발명에 기재되는 하나 이상의 항체들은 하나 이상의 추가적인 제제들, 예컨대 다른 사이토카인 또는 성장 인자 길항제 (예컨대, 수용성 수용체, 펩타이드 억제제, 소분자들, 리간드 융합체); 다른 표적에 결합하는 항체들 또는 그 항원 결합 단편들 (예컨대, 다른 사이토카인 또는 성장 인자에 결합하는 항체들, 그들의 수용체, 또는 기타 세포 표면 분자들); 및 항-염증 사이토카인 또는 그들의 작용자와 공제제화 및/또는 공투여될 수 있다.

[0228] [00201] 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 항체는 자가면역 질환, 염증성 질환 등에 대한 백신 아쥬반트로 사용된다. 이들 유형의 질환의 치료를 위한 아쥬방트의 조합은 표적되는 자기-항원, 즉, 자가면역과 관계된 자가항원, 예컨대 수초 염기성 단백질; 염증성 자기-항원, 예컨대 아밀로이드 펩타이드 단백질, 또는 이식 항원, 예컨대 동종항원으로부터의 다양한 항원과 조합한 사용에 적합하다. 상기 항원은 단백질로부터 유래하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 포함할 수 있을 뿐 아니라 하기의 것들 중 임의의 단편을 포함할 수 있다: 새커라이드, 단백질, 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드, 자가항원, 아밀로이드 펩타이드 단백질, 이식 항원, 알레르겐 또는 기타 거대분자 성분들. 몇몇 예시에 있어서, 항원성 조성물에 하나 이상의 항원이 포함된다.

[0229] **기타 치료제의 설계 및 생성**

[0230] [00202] 본 발명에 따라 그리고 본 발명에서 생성되고 특징화되는 항체들의 CD47에 관한 활성에 기초하면, 항체 모이어티를 넘어선 다른 치료적 양식의 설계가 용이하게 된다. 이러한 양식으로는, 제한없이 고급 항체 치료제, 예컨대 2특이적 항체, 면역독소 및 방사선 표지된 치료제, 펩타이드 치료제의 생성, 유전자 치료, 특히 인트라바디 (intrabody), 안티센스 치료 및 소분자들을 들 수 있다.

[0231] [00203] 예컨대, 2특이적 항체와 관련하여, (i) 2개의 항체 - CD47에 특이성을 갖는 하나와, 함께 컨쥬게이션되는 제2의 분자에 대한 다른 하나, (ii) CD47에 특이적인 하나의 쇄와 제2 분자에 특이적인 제2의 쇄를 포함하는 단일 항체 또는 (iii) CD47과 제2의 분자에 특이성을 갖는 단일 쇄 항체를 포함하는 2특이적 항체들이 생성될 수 있다. 이러한 2특이적 항체들은 공지의 기법들을 이용하여 생성되고, 예컨대 (i) 및 (ii)와 관련하여서는, 예컨대 문헌 [Fanger et al. Immunol Methods 4:72-81 (1994) 및 Wright et al. Crit, Reviews in Immunol. 12125-168 (1992)]을, (iii)과 관련하여서는, 예컨대 문헌 [Traunecker et al. Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992)]를 참고한다.

[0232] [00204] 면역독소에 관하여, 이 기술 분야에 잘 알려진 기법들을 이용하여 면역독소로 작용하도록 항체를 변형시킬 수 있다. 예컨대, 문헌 [Vitetta Immunol Today 14:252 (1993)] 참고. 또한, 미국 특허 5,194,594호 참고. 방사선 표지된 항체의 제조에 관하여는, 이러한 개질된 항체들 역시 이 기술 분야에 잘 알려진 기법들을 이용하여 쉽게 제조될 수 있다. 예컨대, 문헌 [Junghans et al. in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))] 참고. 또한, 미국 특허 4,681,581호,

4,735,210호, 5,101,827호, 5,102,990호 (RE 35,500), 5,648,471호, 및 5,697,902호 역시 참고. 각각의 면역독소 및 방사선 표지된 분자들은 CD47을 발현하는 세포를 죽일 것이다.

[0233] [00205] 치료적 펩타이드의 생성과 관련하여, CD47 및 그에 대한 항체, 예컨대 본 발명의 항체들에 관한 구조적 정보를 이용하거나 펩타이드 라이브러리를 스크리닝하는 것을 통하여, CD47에 대한 치료적 펩타이드를 생성할 수 있다. 펩타이드 치료제의 설계와 스크리닝은 문헌 [Houghten et al. Biotechniques 13:412-421 (1992), Houghten PNAS USA 82:5131-5135 (1985), Pinalla et al. Biotechniques 13:901-905 (1992), Blake and Litzi-Davis BioConjugate Chem. 3:510-513 (1992)]에 설명된다. 유사한 방식으로, 항체와 관련, 전술한 바와 같이 펩티드 모이어티에 대하여 면역독소 및 방사선 표지된 분자들 또한 제조될 수 있다. CD47 분자 (또는 한 형태, 예컨대 스플라이스 변이체 또는 대안형)가 질병 진행에 있어 기능적으로 활성이라고 가정하면, 관용적인 기법들을 통하여 그에 대한 유전자 치료법 및 안티센스 치료법을 설계하는 것 역시 가능하다. CD47의 기능을 조절하기 위하여 이러한 양식이 이용될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 항체는 기능적인 분석법의 설계 및 이용을 용이하게 한다. 안티센스 치료법의 설계 및 전략은 국제특허출원 WO 94/29444에 자세히 설명되어 있다. 유전자 치료에 대한 설계 및 전략도 잘 알려져 있다. 그러나, 특히, 인트라바디와 관련한 유전자 치료 기법들의 이용이 특히 유리한 것으로 입증될 수 있었다. 예컨대, 문헌 [Chen et al. Human Gene Therapy 5:595-601 (1994) 및 Marasco Gene Therapy 4:11-15 (1997)] 참고. 유전자 치료법에 과한 일반적인 설계 및 고려사항은 국제특허출원 WO 97/38137에도 설명되어 있다.

[0234] [00206] CD47 분자의 구조 및 본 발명에 따른 그의 다른 분자와의 상호 작용, 예컨대 SIRPα 및/또는 본 발명의 항체들과의 상호 작용으로부터 얻어진 지식 및 기타 등등은 추가적인 치료적 양식을 합리적으로 설계하는데 이용될 수 있다. 이와 관련하여, 합리적인 약물 설계 기법들, 예컨대 X-선 결정학, 컴퓨터-도움 (또는 보조) 분자 모델링 (CAMM), 정량 또는 정성 구조-활성 관계 (QSAR)는, 및 유사 기술들이 약물 발견 노력에 집중하기 위하여 이용될 수 있다. 합리적인 설계는 분자 또는 그의 특이형과 상호 작용할 수 있는 단백질 또는 합성 구조의 예측을 가능하게 하는데, 이는 IL-6Rc의 활성을 변형 또는 조절하기 위하여 사용될 수 있다. 이러한 구조들은 화학적으로 합성되거나 생물학적 시스템에서 발현될 수 있다. 이러한 접근법은 문헌 [Capsey et al. Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (Stockton Press, NY (1988))]에서 검토되었다. 또한, 조합적 라이브러리가 설계 및 합성되어 스크리닝 프로그램, 예컨대 하이 쓰루풋 스크리닝 (high throughput screening) 방법에 사용될 수 있다.

[0235] **스크리닝 방법**

[0236] [00207] 본 발명은 조절자, 즉 CD47의 SIRPα에의 결합을 조절하거나 달리 말하면 간섭하는 후보 또는 시험 화합물 또는 제제들 (예컨대, 펩타이드, 펩티도미메틱, 소분자들 또는 기타 약물들), 또는 CD47 및/또는 CD47-SIRPα의 신호 전달 기능을 조절하거나 달리 말하면 간섭하는 후보 또는 시험 화합물 또는 제제들을 식별하기 위한 방법 (본 발명에서 "스크리닝 분석법"이라고도 부름)을 제공한다. 또한, 이상 CD47 및/또는 CD47-SIRPα 발현, 활성 및/또는 신호 전달과 관련된 질환들을 치료하는데 유용한 화합물들을 식별하는 방법이 제공된다. 이 스크리닝 방법은 이 기술 분야에서 알려지고 사용되는 것들 또는 본 발명에서 개시하고 있는 것들을 포함할 수 있다. 예컨대, CD47은 마이크로타이터 플레이트상에 고정화되어 SIRPα의 존재 하에서 후보 또는 시험 화합물, 예컨대 CD47 항체와 함께 반응될 수 있다. 이어서, 결합된 SIRPα는 2차 항체를 이용하여 검출될 수 있고, 흡광도가 플레이트 리더에서 검출될 수 있다.

[0237] [00208] 대식세포에 의한 종양 세포의 식균 작용을 촉진할 수 있는 화합물들을 식별하는 방법 역시 제공된다. 이들 방법은 이 기술 분야에 알려지거나 사용되는 방법들 또는 본 발명에 기술되는 것들을 포함할 수 있다. 예컨대, 대식세포는 후보 화합물, 예컨대 CD47 항체의 존재 하에서 표지된 종양 세포와 함께 반응된다. 일정 시간 후, 식균 작용을 확인하기 위하여 대식세포는 종양 표지의 내재화에 대하여 관찰될 수 있다. 이들 방법, 예컨대 SIRPα 차단 분석법 및 식균 작용 분석법에 관한 추가적인 상세가 실시예에 제공된다.

[0238] [00209] 또한, 본 발명은 본 발명에서 개시되는 스크리닝 분석법에서 확인된 화합물들을 포함한다.

[0239] [00210] 한 가지 구현예에 있어서, 본 발명은 CD47의 신호 전달 기능을 조절하는 후보 또는 시험 화합물들을 스크리닝하는 분석법을 제공한다. 본 발명의 시험 화합물들은 이 기술 분야에 알려진 다수의 조합 라이브러리 방법상의 접근법들 중 임의의 것을 이용하여 얻어질 수 있는데, 예컨대: 생물학적 라이브러리; 공간적 어드레싱 병렬 고상 또는 액상 라이브러리; 디컨볼루션을 요구 합성 라이브러리 방법; "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법; 및 친화 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법이다. 생물학적 라이브러리 접근법은 펩타이드 라이브러리에 국한되지만, 다른 4가지 접근법은 펩타이드, 비펩타이드 올리고머 또는 화합물들의 소분자 라

이브러리에도 적용 가능하다. (예컨대, 문헌 [Lam, 1997. Anticancer Drug Design 12: 145] 참고).

[0240] [00211] 본 발명에서 사용되는 "소분자"는 약 5 kDa 미만의 분자량을 갖는, 가장 좋기로는 약 4 kDa 미만인 조성을 말한다. 소분자는, 예컨대 핵산, 펩타이드, 폴리펩타이드, 펩티도미메틱, 탄수화물, 지질 또는 기타 유기 또는 무기 분자들일 수 있다. 화학적 및/또는 생물학적 혼합물들, 예컨대 진균, 박테리아 또는 조류 추출물의 라이브러리가 이 기술 분야에 알려져 있고 본 발명의 임의의 분석법을 이용하여 스크리닝될 수 있다.

[0241] [00212] 분자 라이브러리의 합성에 관한 방법의 예시를 이 기술 분야에서 찾아볼 수 있는데, 예컨대: 문헌 [DeWitt, et al., 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422; Zuckermann, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 2678; Cho, et al., 1993. Science 261: 1303; Carrell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; 및 Gallop, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 1233]에서 이다.

[0242] [00213] 화합물 라이브러리는 용액으로 (예컨대, Houghten, 1992. Biotechniques 13: 412-421 참고), 또는 비즈 상에 (Lam, 1991. Nature 354: 82-84 참고), 칩 상에 (Fodor, 1993. Nature 364: 555-556 참고), 박테리아 (미국특허 5,223,409호 참고), 포자 (미국특허 5,233,409호 참고), 플라스미드 (Cull, et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-1869 참고) 또는 파지 상에 (Scott and Smith, 1990. Science 249: 386-390; Devlin, 1990. Science 249: 404-406; Cwirla, et al., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378-6382; Felici, 1991. J. Mol. Biol. 222: 301-310; 및 미국특허 5,233,409호 참고) 존재할 수 있다.

[0243] [00214] 한 가지 구현예에 있어서, 후보 화합물은 항체-항원 복합체로 도입되어 그 후보 화합물이 항체-항원 복합체를 교란시키는지 결정하게 되는데, 여기서 이러한 복합체에의 교란은 그 후보 화합물이 CD47의 신호 전달 기능 및/또는 CD47과 SIRPα 간 상호 작용을 조절한다는 것을 나타낸다. 또 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 수용성 CD47 및/또는 CD47과 SIRPα 단백질 양자 모두가 제공, 하나 이상의 중화 모노클로날 항체에 노출된다. 항체-항원 복합체 형성이 검출되고, 하나 이상의 후보 화합물들이 복합체로 도입된다. 상기 하나 이상의 후보 화합물들의 도입 후 항체-항원 복합체가 교란된다면, 그 후보 화합물들은 이상 CD47 및/또는 CD47-SIRPα 신호 전달과 관련된 질환들을 치료하는데 유용하다.

[0244] [00215] 시험 화합물의 항체-항원 복합체를 간섭하거나 교란하는 능력에 대한 측정은, 예컨대 그 시험 화합물을 방사선 동위원소 또는 효소 표지와 커플링시킴으로써 달성될 수 있는데, 이로써 시험 화합물의 항원 또는 생물학적으로 활성인 그 부분에 대한 결합이 복합체 내의 표지된 화합물을 검출함으로써 결정될 수 있다. 예컨대, 시험 화합물들은 직접 또는 간접적으로 ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, 또는 ^{3}H으로 표지될 수 있고, 방사선 동위원소는 직접적인 선량방출 계수 또는 섬광 계수로 검출될 수 있다. 또는, 시험 화합물들은, 예컨대 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제 또는 루시퍼라제로 효소적으로 표지될 수 있고, 상기 효소 표지는 적절한 기질의 산물로의 전환을 측정함으로써 검출될 수 있다.

[0245] [00216] 한 가지 구현예에 있어서, 상기 분석법은 항체-항원 복합체를 시험 화합물과 접촉시키는 단계, 및 상기 시험 화합물의 상기 항원과의 상호 작용 능력 또는 달리 말하면 상기 존재하는 항체-항원 복합체를 교란시키는 능력을 결정하는 단계를 포함한다. 이러한 구현예에 있어서, 상기 시험 화합물의 상기 항원과 상호 작용하는 능력 및/또는 상기 항체-항원 복합체를 교란시키는 능력을 결정하는 단계는, 상기 항체와 비교하여 상기 시험 화합물의 상기 항원 또는 그 생물학적 활성 부분과 우선적으로 결합하는 능력을 결정하는 단계를 포함한다.

[0246] [00217] 또 다른 구현예에 있어서, 상기 분석법은 항체-항원 복합체를 시험 화합물과 접촉시키는 단계 및 상기 시험 화합물의 상기 항체-항원 복합체를 조절하는 능력을 결정하는 단계를 포함한다. 상기 시험 화합물의 상기 항체-항원 복합체를 조절하는 능력을 결정하는 단계는, 예컨대 상기 시험 화합물의 존재 하에서 상기 항원의 상기 항체와 결합 또는 그와 상호 작용하는 능력을 결정하는 것에 의하여 이루어질 수 있다.

[0247] [00218] 이 기술 분야의 숙련자라면, 본 발명에 개시되는 임의의 스크리닝 방법에서, 상기 항체는 중화 항체일 수 있고, 이것이 CD47 활성 및/또는 신호 전달을 조절 또는 달리 말하면 간섭한다는 것을 알 것이다.

[0248] [00219] 본 발명에 개시되는 스크리닝 방법들은 세포-기반 분석법 또는 세포-무함유 분석법으로서 수행될 수 있다. 본 발명의 세포-무함유 분석법은 수용성 형태 또는 막-결합 형태의 CD47 중 어느 하나 및 그들의 단편을 이용하는 방식으로 처리된다. 막-결합 형태의 CD47을 포함하는 세포-무함유 분석법의 경우, 용해제를 이용함으로써 상기 막-결합 형태의 단백질들이 용액 내에서 유지되도록 하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 용해제의 예시로는 비이온성 변성제, 예컨대 n-옥틸글루코시드, n-도데실글루코시드, n-도데실말토시드, 옥타노일-N-메틸글

루카미드, 데카노일-N-메틸글루카미드, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, 이소트리데시폴리(에틸렌 글리콜 에테르)$_n$, N-도데실--N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판 술포네이트, 3-(3-콜라미도프로필) 디메틸암미니올-1-프로판 술포네이트 (CHAPS), 또는 3-(3-콜라미도프로필)디메틸암미니올-2-하이드록시-1-프로판 술포네이트 (CHAPSO)를 들 수 있다.

[0249] [00220] 하나 이상의 구현예에 있어서, 후보 화합물의 도입 후에 항체 또는 항원 또는 양자 모두의 비복합 형태로부터 복합 형태의 분리를 용이하게 하기 위하여, 및 분석법의 자동화를 도모하기 위하여, 항체 또는 항원 중 어느 하나를 고정화시키는 것이 바람직할 수 있다. 후보 화합물의 존재하에서 및 부존재하에서 항체-항원 복합체의 관찰은 반응물들을 함유하는데 적합한 임의의 용기에서 이루어질 수 있다. 이러한 용기의 예시로는 마이크로타이터 플레이트, 시험관, 및 마이크로원심분리관을 들 수 있다. 한 가지 구현예에 있어서, 단백질 중 하나 또는 양자 모두로 하여금 기질에 결합할 수 있도록 하는 도메인을 부가한 융합 단백질이 제공될 수 있다. 예컨대, GST-항체 융합 단백질 또는 GST-항원 융합 단백질이 글루타티온 세파로오스 비드 (Sigma Chemical, St. Louis, MO) 또는 글루타티온 유도화된 마이크로타이터 플레이트 상에 흡착될 수 있고, 그 후 이는 시험 화합물과 배합되고, 그 혼합물이 복합체 형성에 적합한 조건 하에서 반응하게 된다 (예컨대, 염 및 pH의 생리적 조건에서). 반응 후, 비드 또는 마이크로타이터 플레이트 웰은 수세되어 임의의 결합하지 않은 성분들을 제거하고, 비드의 경우 고정화된 매트릭스을 제거하고, 복합체가 직접 또는 간접으로 결정된다. 또는, 복합체는 매트릭스로부터 해리될 수 있고, 항체-항원 복합체 형성 수준은 표준 기법들을 이용하여 결정될 수 있다.

[0250] [00221] 단백질을 매트릭스 상에 고정화시키는 기타 기법들이 본 발명의 스크리닝 분석법에 또한 사용될 수 있다. 예컨대, 항체 (예컨대, 2A1 항체, 또는 SEQ ID NOs: 5-30로부터 선택되는 가변 중쇄 및 SEQ ID NOs: 31-47로부터 선택되는 가변 경쇄를 포함하는 항체) 또는 항원 (예컨대, CD47 단백질)은 비오틴 및 스트렙타비딘 컨쥬게이션을 이용하여 고정화될 수 있다. 비오틴화된 항체 또는 항원 분자는 이 기술 분야에 잘 알려진 기법들을 이용하여 비오틴-NHS (N-하이드록시-숙신이미드)로부터 제조될 수 있고 (예컨대, 비오틴화 키트, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), 스트렙타비딘-코팅된 96 웰 플레이트 (Pierce Chemical)에 고정될 수 있다. 또는, 관심 대상 항체 또는 항원과 반응성이지만 관심 대상 항체-항원 복합체의 형성을 간섭하지는 않는 다른 항체들이 플레이트의 웰에 유도화될 수 있고, 비결합 항체 또는 항원은 항체 컨쥬게이션에 의하여 웰 내에 갇힐 수 있다. GST-고정화 복합체에 관한 전술한 방법들 외에 이러한 복합체 검출 방법은 이러한 상기 항체 또는 항원에 반응성인 다른 항체들을 이용하여 복합체를 면역검출하는 것을 포함한다.

[0251] [00222] 또한, 본 발명은 전술한 임의의 스크리닝 분석법에 의하여 동정되는 신규한 제제 및 본 발명에 개시되는 바 그 치료 용도에 관한 것이다.

[0252] **진단 및 예방 제제**

[0253] [00223] 본 발명의 CD47 MAb는 진단 및 예방 제제에 사용될 수 있다. 한 가지 구현예에 있어서, 본 발명의 CD47 MAb는 전술한 하나 이상의 질병들, 예컨대 제한없이 암 또는 기타 종양 질환의 발병 위험이 있는 환자들에게 투여된다. 환자 또는 기관의 전술한 하나 이상의 암 또는 기타 종양 질환에 대한 소인은 유전자형 마커, 혈청학적 마커 또는 생화학적 마커를 이용하여 결정될 수 있다.

[0254] [00224] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 CD47 항체는 전술한 하나 이상의 질병들, 예컨대 제한없이 암 또는 기타 종양 질환과 관련된 임상적 표시로써 진단된 인간 개체들에게 투여된다. 진단상, 상기 CD47 항체는 전술한 하나 이상의 질환들과 관련된 임상적 표시 효과를 완화 또는 역전시키기 위하여 투여된다.

[0255] [00225] 또한, 본 발명의 항체는, 환자의 시료 중의 CD47 및/또는 SIRPα의 검출에 유용하고, 따라서 진단법으로서 유용하다. 예컨대, 본 발명의 CD47 항체는 환자 시료 중의 CD47 및/또는 SIRPα 수준을 검출하기 위하여 시험관 내 분석법, 예컨대 ELISA에 사용된다.

[0256] [00226] 한 가지 구현예에 있어서, 본 발명의 CD47 항체는 고체 기질 (예컨대, 마이크로타이터 플레이트의 웰) 상에 고정화된다. 고정된 항체는 시험 시료 내 존재할 수 있는 임의의 CD47 및/또는 SIRPα에 대한 포획 항체로서 기능한다. 상기 고정화 항체를 환자 시료와 접촉시키기 전에, 고체 기질은 수세되고 유단백질 또는 알부민과 같은 블로킹제로 처리되어 분석체의 비특이적 흡착을 막는다.

[0257] [00227] 이어서, 웰은 항원을 함유하고 있는 것으로 여겨지는 시험 시료, 또는 표준량의 항원을 함유하는 용액으로 처리된다. 이러한 시료는, 예컨대 병리 진단으로 간주되는 순환 항원 수준을 갖는 것으로 의심되는 대상체로부터의 혈청 시료이다. 시험 시료 또는 표준을 수세해 내고 난 후, 고체 기질은 검출 가능하게 표지된 2차 항

체로 처리된다. 표지된 2차 항체는 검출 항체로서 기능한다. 검출 가능한 표지 수준이 측정되고, 시험 시료 내 CD47 및/또는 SIRPα의 농도가 표준 시료로부터 얻은 표준 곡선과 비교를 통하여 결정된다.

[0258] [00228] 본 발명의 CD47 항체를 이용하여 시험관 내 진단 분석법에서 얻은 결과에 기초하여 CD47 및/또는 SIRPα의 발현 수준에 근거한 대상체의 질병 단계화 (예컨대, 허혈, 자가면역 또는 염증성 질환과 관계된 임상적 표시)가 가능하다는 것을 이해할 것이다. 주어진 질병에 대하여, 그 질병의 진행에 있어 다양한 단계에 있는, 및/또는 그 질병 치료에 있어 다양한 시점에 있는 진단된 대상체들로부터 혈액 시료가 채취된다. 질병 진행 또는 치료법의 각 단계에 대하여 통계적으로 유의미한 결과를 제공하는 시료 군집을 이용하여, 각 단계의 특성으로 고려될 수 있는 항원 농도 범위가 지정된다.

[0259] [00229] 본 발명에 인용된 모든 간행물들과 특허 문헌들은 마치 이러한 간행물 또는 문헌 각각이 구체적이고 개별적으로 본 발명에 참조로서 포함된다고 표시된 것과 마찬가지로 참조로서 본 발명에 포함된다. 간행물들과 특허 문헌들에 대한 이용은 이들이 적절한 선행 기술이라는 인정으로 의도되지 않으며, 이들의 내용 또는 일자에 대한 어떠한 인정을 구성하는 것도 아니다. 현재 상세한 설명의 방식으로 설명된 발명은, 이 기술 분야의 숙련자라면 본 발명이 다양한 구현예로 실시될 수 있다는 것 및 전술한 설명 및 하기 실시예들은 하기 청구항들을 제한함이 없는 설명의 목적이라는 것을 알 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0260] **실시예**

[0261] [00230] 이하 실시예들, 예컨대 시행된 실험들 및 달성된 결과들은 오로지 설명의 목적으로 제공되고, 본 발명에 대하여 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0262] **실시예 1:** CD47 항체의 생성 및 선별

[0263] [00231] CD47 항체는 마우스를 CD47-IgV (면역 글로불린 유사 가변형)를 나타내는 재조합 단백질로 면역화하여 생성되었고, 다수 부위에 변형된 신속 면역화 전략이 구현되었다 (Kilpatrick et al. (1997) Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS. Hybridoma 16, 381-389). 또한, 면역화 그룹의 마우스 중 절반은 항-마우스 GITR 작용자 항체, DTA-1을 1회 주입받았다. 면역화 스케쥴 후, 모든 마우스들 (DTA-1 처리 및 비처리)의 림프절을 채집하여 절개함으로써, B-세포를 단리하고 이어서 마우스 골수종 세포주에 융합시켰다. 다우디 (ATCC# CCL-213) 세포 상에서 ELISA와 유세포 분석을 통하여 하이브리도마 상청액의 CD47에 대한 결합을 스크리닝하였다 (도 1a). 또한, 하이브리도마 상청액을 CD47-SIRPα 상호 작용을 차단하는 능력에 대하여도 분석하였다 (도 1b). 재조합 CD47을 Medisorp (NUNC) 마이크로타이터 플레이트 상에 고정하고, 이어서 이인간 IgG Fc 도메인과 융합된 인간 재조합 SIRPα-ECD의 존재하에서 하이브리도마 상청액과 반응시켰다. 결합된 SIRPα를 HRP 컨쥬게이션된 항-인간 IgG Fc 특이적 2차 항체 (Jackson Immuno Research)를 이용하여 검출하고, 플레이트 리더로 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0264] **실시예 2:** CD47 항체의 특징 분석

[0265] [00232] 본 발명의 예시적 쥐 CD47 항체들이 도 2에 제시되어 있다. SIRPα 차단 CD47 항체의 친화도 순위를 라지 세포 (ATCC# CCL-86) (도 2a) 및 CCRF-CEM 세포 (ATCC# CCL-119)(도 2b)에서 유세포 분석으로 시행하였다. 결합된 CD47 항체는 FITC 컨쥬게이션된 항-마우스 IgG 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch)를 이용하여 검출하여다. 이 기술 분야에 공지된 CD47 항체, B6H12가 양성 대조군으로 포함되었다 (예컨대, 미국 특허 5,057,604호 참고). 도 2b에는, 시판 SIRPα 비(非)-차단 항체, B6H12 및 2D3 양자 모두가 본 발명에서 생성되는 항체들과 비교되었다. 본 발명의 항체들은 B6H12 및 2D3 항체와 비교하여 CD47의 내인성 (세포 표면) 형에 대하여 더 높은 친화도를 나타낸다.

[0266] **실시예 3:** CD47 항체들의 SIRPα 차단 활성

[0267] [00233] CD47 항체들의 SIRPα 차단 능력을 ELISA로 측정하였고, 여기서 재조합 His-태그-CD47-IgV가 Medisorp 마이크로타이터 플레이트 상에 고정화되었다. 인간 IgG Fc 도메인에 융합된 재조합 SIRPα의 결합을 CD47 항체의 양을 증가시켜가면서 그 존재하에서 모니터링하였다. 결합된 SIRPα를 HRP 컨쥬게이션된 항-인간 IgG (Fc 특이적) 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch)를 이용하여 측정하였다. 본 발명의 항체들은 B6H12 항체에 비하여 증가된 SIRPα 차단 능력을 보여준다. 도 3a는 ELISA에 기초한 SIRPα 차단 분석의 대표 결과를 보여준다.

[0268] [00234] 유세포 분석을 통하여, 세포 표면 CD47에의 재조합 SIRPα 결합을 차단하는 CD47 항체의 능력을 분석하

였다. 이 분석에서 CCRF-CEM 세포 (ATCC# CCL-119)를 CD47의 제공원으로 사용하고, 인간 IgG의 Fc 도메인에 융합된 재조합 SIRPα의 결합을 CD47 항체의 양을 늘려가면서 그 존재하에서 모니터링하였다. 결합된 SIRPα를 APC 컨쥬게이션된 항-인간 IgG (Fc 특이적) 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch)로 측정하였다 (도 3b). 각각 B6H12와 시판되는 SIRPα 비차단 CD47 항체 2D3가 양성 대조군과 음성 대조군으로 사용되었다.

[0269] **실시예 4:** CD47 항체 매개 동형 상호 작용

[0270] [00235] SIRPα 차단 CD47 항체들을, 그 세포 군집 (CD47 양성 세포들 간의_동형 상호 작용으로 알려짐)을 유도하는 능력에 대하여 분석하였다. 다우디 및 라지 세포를 CD47 발현 세포주 후보로 사용하였다. 시험된 항체들 중에서, 본 발명의 2A1 항체만이 CD47 발현 세포들의 동형 상호 작용을 촉진하지 않는 SIRPα 차단 항체였다.

[0271] **실시예 5:** CD47 항체들의 적혈구 응집 반응 활성

[0272] [00236] RBC 응집으로 증명되는 바, 동형 상호 작용의 한 예시는 적혈구 응집 반응이다. 인간 RBCs의 정착을 방지하는 항체의 능력으로 관찰되는 바, CD47 항체들을 RBC 세포 응집에 대하여 스크리닝하였다. 예기치 않게, 2A1 항체는 다른 CD47 항체들 중에서 SIRPα에 고친화성을 갖고 그를 차단하는 능력을 갖지만, 적혈구 응집 반응을 촉진하지 않는 능력으로 고유함이 밝혀졌다. 적혈구 응집 반응이 저감된 다른 항체들은 CD47에 대한 SIRPα 결합을 차단하지 않았다.

[0273] [00237] CD47 항체들의 적혈구 응집 반응능을 평가하기 위하여, 인간 RBCs을 PBS에 10%로 희석하고 둥근 바닥 96 웰 플레이트에서 CD47 항체를 적정하며 2-6 시간동안 37℃에서 반응시켰다. 적혈구 응집 반응의 증거는 비-정착 RBCs의 존재로 입증되는데, 비(非)적혈구 응집된 RBCs의 붉은 점상에 비하여 혼탁으로 나타난다. 도 4a에 나타나는 바, 예기치 않게, 본 발명의 CD47 항체, 특히 본 발명에서 2A1으로 부르는 항체는 적혈구 응집 활성을 나타내지 않았다. 그래프는 적혈구 응집 반응 분석의 정량화를 보여주는데, 상기 항체의 존재 하에서 RBC 펠렛의 영역을 정량화함으로써 결정된 "적혈구 응집 반응 지수"로 나타내었고, 그 항체의 부재하에서의 수치에 대하여 정규화하였다.

[0274] [00238] 모든 시험된 농도에서 쥐 9E4 항체가 가장 심각한 적혈구 응집 반응을 야기하였다. 따라서, 상기 9E4 항체는 CD47에 결합하고 CD47의 SIRPα와의 상호 작용을 차단하지만; 이 9E4 항체는 심각한 적혈구 응집 반응을 야기한다.

[0275] [00239] 상기 9E4 항체의 VH쇄 영역은 하기와 같이 주어진다.

[0276]
EVQLRQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYYMYWVKQSRVRSLAWIGRINPYTGATGYDQNFKDKASLIVDK
SSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGRNRYDGWFAYWGQGTLVTV (SEQ ID NO: 78)

[0277] [00240] 상기 9E4 항체의 VL쇄 영역은 하기와 같이 주어진다.

[0278]
EIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLT
ISNLDQEDIATYFCQQGNALPPTFGGGTNLEIK (SEQ ID NO: 79)

[0279] [00241] 대조군 항체 B6H12는, SIRPα 차단 CD47 항체들에 대하여 기대된 바와 같이 적혈구 응집 반응을 야기하였다.

[0280] [00242] 2A1 항체의 비-적혈구 응집 반응 활성의 고유성을 조사하기 위하여, RBC 적혈구 응집 반응 분석에서 다수의 다른 CD47 항체들이 스크리닝되었다 (도 4b). 이 분석에 포함된 것은 키메라 버전의 2A1 항체 (2A1-xi)로, 이것은 쥐 2A1의 가변 중쇄 영역, 아미노산 106번에서 변형된 (즉, M106I) 쥐 2A1의 가변 경쇄 영역, 및 인간 IgG1 및 인간 Ig카파의 불변 영역으로 구성된다. 2A1 항체와 2A1-xi 항체의 VH 및 VL 영역 서열이 표 1에 제공된다. 항체들을 12.5, 25, 50, 및 100nM에서 시험하였다. 예기치 않게, 2A1이 도 4b에서 시험된 CD47 항체들 중에서 드문 것이었는데, 그것이 도 4b에서 적혈구 응집 반응 활성이 없거나 저감된 유일한 항체였다는 점에서 그러하다. 도 4e는 2A1, 키메라 2A1 (2A1-xi), 및 인간화 변이체들이 적혈구 응집 반응을 야기하지 않는다는 것을 보여준다.

[0281] [00234] 도 4c는 RBC 적혈구 응집 반응 분석에 있어서 추가적인 CD7 항체들을 스크리닝한 결과를 보여준다. 도 4c에서 보여지는 바와 같이, 시판 CD47 모노클로날 항체 2D3는, 이것은 SIRPα를 차단하지 않는데, 적혈구 응집 반응을 야기하지 않았다. 그러나, SIRPα를 차단하는 다른 시판 CD47 항체 (예컨대, CC2C6, BRC126, 및 B6H12)는 적혈구 응집 반응을 야기하였다 (도 4c). 따라서, 여기 개시되는 본 발명 이전에, SIRPα를 차단했던 기존의 항체들은 적혈구 응집 반응을 야기하였지만, SIRPα를 차단하지 않던 기존의 항체, 예컨대 2D3은 적혈구 응

집 반응을 야기하지 않았다. 종합하면, 본 발명의 항체들 (예컨대, 2A1 항체 및 그 인간화 유도체들)은 그 SIRP α를 차단하지만, 적혈구 응집 반응을 야기하지 않는 능력에 있어서 기존의 CD47 항체들 중에서 고유하다.

[0282] [00244] 선별된 CD47 항체들을 고농도 범위에서 재차 적혈구 응집 반응 분석하였다 (도 4d). 이 분석은 B6H12 및 9E4에 의한 적혈구 응집 반응의 전지대 효과를 보여주는데, 여기서 적혈구 응집 반응은 시험된 고농도 및 저농도 말단에서 감소되었다. 적혈구 응집 반응 지수의 그래프 도시 역시 전지대 효과를 강조하고 있다. 전지대 효과는 도 4c 및 도 4e에서도 명확하다. 중요하게는, 마우스 2A1 및 키메라 2A1 CD47 항체들이 모든 농도에서 적혈구 응집 반응을 전혀 나타내지 않았다는 것이다.

[0283] [00245] 도 4e에서 보여지듯이, 쥐 1B4 항체는 좁은 범위의 적혈구 응집 반응을 나타내었다.

[0284] [00246] 1B4 항체의 VH쇄 영역은 아래와 같이 주어진다.

[0285] QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIHWVKQRPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNERFKGKATLTVAT
SSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCARREEDYFDYWGQGTLVTV (SEQ ID NO: 80)

[0286] [00247] 1B4 항체의 VL쇄 영역은 아래와 같이 주어진다.

[0287] DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLTWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSG
TDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPLTFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 81)

[0288] [00248] 쥐 2A1으로부터 유래되는 인간화 항체의 적혈구 응집 반응능을 상기와 같이 시험하였다. 중요하게는, 다양한 인간 IgG 이소형에 있어서 (IgG1, IgG4-S228P, 및 IgG4-S228P/L235E) 대표적인 인간화 항체 AB6.12가 어떠한 RBC 적혈구 응집 반응을 야기하지 않았다. 비-적혈구 응집 반응 항체 대조군으로서 2A1 및 2A1-xi가 포함되었고, B6H12 및 9E4는 적혈구 응집 반응의 양성 대조군으로서 포함되었다 (도 4f).

[0289] **실시예 6:** 사이노몰구스 원숭이 CD47에의 결합

[0290] [00249] 쥐 2A1의 사이노몰구스 (cyno) 원숭이 CD47에의 결합 능력이 평가되었다. B6H12 항체는 cyno CD47과 교차-반응성인 것으로 이미 보고되었고, 이 분석에서 cyno CD47에 대한 양성 대조군으로 사용되었다. 2A1의 사이노몰구스 원숭이 CD47에의 결합을 측정하기 위한 시험은 2A1의 사이노몰구스 원숭이 B-세포 상의 CD47 및 인간 세포 상의 CD47에의 결합을 비교하는 것으로 설계되었고, 여기서 라지 세포가 인간 CD47 양성 세포로 사용되었다. 사이노몰구스 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMCs)를 ficoll-paque 구배 원심분리를 이용하여 사이노몰구스 전혈로부터 단리하였다. 사이노몰구스 및 인간 B-세포 (Raji)를 10 μl/ml로 인간 CD20 항체 오파투무맙 (Arzerra)으로 표지하고, 쥐 CD47 항체 2A1 또는 B6H12과 연쇄 희석으로 반응시켰다. 인간 CD20 항체로 표지된 B-세포는 DyLite 649에 컨쥬게이션된 폴리클로날 항-인간 항체로 검출되었고, CD47 쥐 항체들은 DyLite 488에 컨쥬게이션된 폴리클로날 항-마우스 항체로 검출되었다. 세포들은 유세포 분석에 의하여 분석되었는데, 처음에 FSC 및 SSC로 살아있는 세포들에 대하여 진행한 후, FL4에 대하여 양성인 세포들에 대해 (CD20 양성), 및 마지막으로 중앙 FL1 (CD47 양성)이 측정되었다. 결과는 각 세포 군에 대하여 각 농도에서의 신호를 각 항체에 대한 최대 신호로 나누어 정규화되었다. 도 5에 나타난 정규화된 결과는 2A1이 cyno CD47와 교차 반응하고, 인간 CD47에 비하여 동일한 친화도를 갖는다는 것을 보여준다. 상기 제시된 결과와 일치하게, B6H12는 라지 및 사이노몰구스 B-세포 양자 모두에서 그 세포 표면상 CD47에 대하여 본 발명의 항체들에 비해 낮은 친화도를 가졌다.

[0291] **실시예 7:** 키메라 항체 생성

[0292] [00250] 쥐 2A1 항체의 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL) 가변 영역 서열을 동정하기 위하여, 리보핵산 (RNA)을 하이브리도마로부터 단리하여 역전사 중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)(Phusion RT-PCR Kit Thermo Scientific)에 이용하여 제1 가닥 cDNA를 생성하였다. VH 및 VL 양자의 항체 리더 서열의 쥐 레퍼토리 전부를 아우르는 축퇴 프라이머 세트가 PCR에 사용되었고, 여기서 제1 가닥 cDNA는 주형으로 사용되었다.

[0293] [00251] 포워드 프라이머 (쥐 IgG 리더)는 하기와 같이 주어진다.

[0294] 이름 서열

VH1-1	CACTGCAGGTRTCCACTCC (SEQ ID NO: 82)
VH1-2	CATAGCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 83)
VH1-3	CRCTACAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 84)
VH1-4	GCYACAGMTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 85)
VH1-5	CACTGCAGGTGTCCWMTCC (SEQ ID NO: 86)
VH1-6	CRCTRCAGGTGTKCACTCC (SEQ ID NO: 87)

[0295]

VH1-7	GCTAWMGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 88)
VH1-8	CCTCAGGTGTCCACTCC (SEQ ID NO: 89)
VH1-9	GCTACAGGTGCTCACTCC (SEQ ID NO: 90)
VH1-10	CACTGCAGGTGTCCTCTCT (SEQ ID NO: 91)
VH1-11	CAYTGCAGGTGTCCAYTGC (SEQ ID NO: 92)
VH1-12	GCTAMMGGTGTCCACTTC (SEQ ID NO: 93)
VH1-13	CTCCTGTCAKTAACTKCAGGT (SEQ ID NO: 94)
VH1-14	CAACTGCAGGTGTCTCTCT (SEQ ID NO: 95)
VH1-15	CRCTRCAGGYGTCCACTCT (SEQ ID NO: 96)
VH2-1	CCAAGCTGTATCCTTTCC (SEQ ID NO: 97)
VH2-2	CCAAGCTGTGTCCTRTCC (SEQ ID NO: 98)
VH3-1	CTTGACAGYCVTTCCKGGT (SEQ ID NO: 99)
VH3-2	CTTCACAGCCTTTCCTGGT (SEQ ID NO: 100)
VH4	CTTAAAAGGGGTCCAGTGT (SEQ ID NO: 101)
VH5-1	CAYTTTAAAARGTGTCMAGTGT (SEQ ID NO: 102)
VH5-2	GTTTTAAAAGGTGTCCTGTG (SEQ ID NO: 103)
VH6	CTYTTAAAAGGKGTCCAGWG (SEQ ID NO: 104)
VH7-1	CYTTTAMATGGTATCCAGTGT (SEQ ID NO: 105)
VH7-2	CTTTTACATGGTTTCAAGTGT (SEQ ID NO: 106)
VH8	GTCCCTGCATATGTCYT (SEQ ID NO: 107)
VH9	GATGGCAGCWGCYCAAAG (SEQ ID NO: 108)
VH10	CTATCAAGGTGTGCATTGT (SEQ ID NO: 109)
VH11	CTTTTAAAAGWTGTCCAGKGT (SEQ ID NO: 110)
VH12	GTGACAGTCCTTCCTGGTAG (SEQ ID NO: 111)
VH14	CTTCCTGATGGCAGTGGTT (SEQ ID NO: 112)
VH15	GCTACAGGTATCCAATCC (SEQ ID NO: 113)

[0296]

[0297] [00252] 리버스 프라이머 (쥐 IgG 불변)는 하기와 같이 주어진다.

[0298] 이름 서열

HC-Rev	GCGTCTAGAAYCTCCACACACAGGRRCCAGTGGATAGAC (SEQ ID NO: 114)

[0299]

[0300] [00253] 포워드 프라이머 (쥐 Ig카파 리더)는 하기와 같이 주어진다.

[0301] 이름 서열

VK1-1	CTGWTGTTCTGGATTCCTG (SEQ ID NO: 115)
VK1-2	GGTCAGACAGTCAGCAGT (SEQ ID NO: 116)
VK2	GTGCTCTGGATTCGGGAA (SEQ ID NO: 117)
VK4/5-1	CAGCTTCYTGCTAATCAGTG (SEQ ID NO: 118)
VK4/5-2	CTAATCAGTGCTTCAGGA (SEQ ID NO: 119)
VK8-1	GTGGGTATCTGGTRCSTGTG (SEQ ID NO: 120)
VK8-2	GGAAATTTAAAAGTACCTGTGGG (SEQ ID NO: 121)
VK9A/9B-1	GGTTTCMAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO: 122)
VK9A/9B-2	CTCTGGTTYCCAGGTATC (SEQ ID NO: 123)
VK10	CTGTTTTCAAGGTRCCAGATGT (SEQ ID NO: 124)
VK11	GTTGTAATGTCCAGAGGA (SEQ ID NO: 125)
VK12/13-1	CTTACAGGTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 126)
VK12/13-2	CTCAATTGTAGRTGCCAGATGT (SEQ ID NO: 127)
VK12/13-3	CACAGTAGGTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 128)
VK12/13-4	GTCGTAGTTGTCAGATGT (SEQ ID NO: 129)
VK12/13-5	CCTCCTTCTTGGCCAAGA (SEQ ID NO: 130)
VK19/28-1	CTTATATGGAGCTGATGGG (SEQ ID NO: 131)

[0302]

VK19/28-2	GTGTCTGGTGCTCATGGG (SEQ ID NO: 132)
VK19/28-3	CTSTGGTTGTCTGGTGTTGA (SEQ ID NO: 133)
VK20	GTCTCTGATTCTAGGGCA (SEQ ID NO: 134)
VK21-1	CTKCKCTGGGTTCCAG (SEQ ID NO: 135)
VK21-2	GCAGGTGTTGACGGA (SEQ ID NO: 136)
VK22-1	CAGGTGCCTCGTGCAC (SEQ ID NO: 137)
VK22-2	CTCTGGTGCCTGTGCA (SEQ ID NO: 138)
VK23	CTGGAYTYCAGCCTCCAGA (SEQ ID NO: 139)
VK24/25-1	GWTCTCTRGAGTCAGTGGG (SEQ ID NO: 140)
VK24/25-2	CTGGATCCCTGGAKCYACT (SEQ ID NO: 141)
VK32	GTTCTGCTTTTTAGGTGTG (SEQ ID NO: 142)
VK33/34	GATCCCAGGCATGATATGT (SEQ ID NO: 143)
VK31/38C	CTTCATGGTGCTCAGTGT (SEQ ID NO: 144)
VKRF	CCATATCAGGTGCCCAGTGT (SEQ ID NO: 145)

[0303]

[0304] [00254] 리버스 프라이머 (쥐 Ig카파 불변)는 하기와 같이 주어진다.

[0305] 이름 서열

[0306]

LC -rev	GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAAGATGG (SEQ ID NO: 146)

[0307] [00255] 쥐:인간 키메라 DNA 컨스트럭트를 생성하기 위하여, 증폭된 VH 및 VL는 이어서 적절한 항체 분비 서열과 각각 인간 IgG1 및 Ig카파 불변 영역을 함유하는 벡터 내로 인 프레임 (in-frame) 클로닝되었다. 이들 컨스트럭트를 293Freestyle 세포 (Life Technologies) 내로 공-트랜스펙션하고 결과물 항체를 단백질-A 크로마토그래피를 이용하여 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. 정확한 VH 및 VL 서열들이 동정되었는지 결정하기 위하여, 키메라 2A1 (2A1-xi를 의미)을 쥐 2A1 모(母)항체와 비교하고 라지 세포에 대하여 유세포 분석으로 CD47 결합 분석하였다 (도 6). B6H12 역시 이 분석에 양성 대조군으로 포함되었다. 결합된 2A1-xi은 FITC-컨쥬게이션된 항-인간 IgG 2차 항체를 이용하여 검출되었다. 결합된 2A1 및 B6H12는 FITC-컨쥬게이션된 항-마우스 IgG 2차 항체를 이용하여 검출되었다. 다양한 항체 농도에서 중앙 형광 세기의 비선형 핏 (Prism Graphpad Software)을 이용하여 가시적 친화도가 측정되었다 (표 2). 2A1-xi 항체는 세포 표면 CD47에 대하여 쥐 2A1 항체와 유사한 결합 친화도를 가지며, 이는 VH 및 VL 서열이 적절히 동정되었음을 입증한다.

[0308] **표 2.**

	KD(가시) (pM)	Std 오차	R2
2A1-mIgG1	93.6	±10.1	0.9977
2A1-xi	78	±14.9	0.9922
B6H12	3786	±310	0.9998

[0309]

[0310] **실시예 8:** 항체 인간화

[0311] [00256] 쥐 2A1 CD47 항체를 인간화하여 인간 환자에게 투여시 면역원성의 가능성을 감소시켰다. IMGT 데이터뱅크로 2A1의 VH 및 VL 서열 영역을 인간 항체 서열과 비교하였다. 이어서, Protein Data Bank (PDB)에서 가장 근접하게 관련된 인간화 및 인간 항체들의 공지 구조를 이용하여 2A1 VH 및 VL 영역의 구조적 모델을 생성하였다. 2A1 항체의 중쇄 및 경쇄 양자 모두에서 3개의 상보성 결정 영역들 (CDR)을 고정하고, 쥐의 구조 영역을, CDRs의 적정한 배향을 유지할 가능성이 가장 높은 다양한 인간의 구조 영역으로 교체하였다. 각각의 인간화 2A1 변이체에 해당하는 컨스트럭트들을 유전자 합성으로 생성시키고 적절한 항체 분비 서열과 각각 인간 IgG1 및 Ig 카파 불변 영역을 함유하는 벡터 내로 인 프레임 클로닝하였다. 다양한 조합의 인간화 중쇄 및 경쇄를 293Freestyle 세포 (Life Technologies) 내로 공-트랜스펙션하고 결과물 항체를 단백질-A 크로마토그래피를 이용하여 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다.

[0312] [00257] 인간화 항체들을 유세포 분석을 통하여 라지 세포에 결합하는 그들의 능력에 대하여 시험하였다 (도 7). 결합 친화도에 대한 기준을 세팅하기 위하여, 대부분의 이들 시험에서 대조군으로 2A1-xi 항체를 이용하였다. 인간화 항체들은 더욱 최적화되어 발현을 강화하고 가능한 이성질화 및 탈아미드화 부위 등 문제 부위를 감소시켰다. 쥐 2A1 항체로부터 유래하는 최적화된 인간화 항체의 예시가 AB6.12 항체로서 나타나며, 이것은 2A1-xi 항체와 매우 유사한 결합 친화도를 보인다 (도 7h; 표 3). 다양한 항체 농도에서 중앙 형광 세기의 비선형 핏 (Prism Graphpad Software)을 이용하여 가시적 친화도가 측정되었다.

[0313] **표 3.**

	KD(가시) (pM)	Std 오차	R2
2A1-xi	36.4	±8.54	0.9908
AB6.12	39.9	±5.54	0.9964

[0314]

[0315] [00258] 이어서, AB6.12 항체를 IgG1으로부터 기타 인간 IgG 이소형으로 전환하였는데, 이는 중쇄의 불변 도메인을 교체함으로써 이루어졌다. 도 7i에서 보여지는 바와 같이, IgG 이소형을 힌지 안정화된 버전인 IgG4 (IgG4P: S228P)로 변화시키면, IgG4의 힌지 안정화된 감소된 Fc 수용체 결합 변이체 (IgG4PE: S228P/L235E)는 그 인간화 항체의 세포 표면 CD47에의 결합 친화도를 변경시키지 않았다 (도 7i; 표 4). 다양한 항체 농도에서 중앙 형광 세기의 비선형 핏 (Prism Graphpad Software)을 이용하여 가시적 친화도가 측정되었다.

[0316] **표 4.**

	KD(가시) (pM)	Std 오차	R2
AB6.12-IgG1	38.6	±10.5	0.9798
AB6.12-IgG4P	35.7	±8.4	0.9841
AB6.12-IgG4PE	34.6	±10.9	0.9727

[0317]

[0318] [00259] 인간화 과정을 통하여, CD47 항체들이 SIRPα 차단 기능성을 온전히 유지하는지 시험하였다. 도 7j에서 보여지는 바와 같이, 실시예 3에서 전술한 바와 같은 유세포 분석 기반 방법을 이용하였을 때 인간화 항체 AB6.12의 다수 IgG 이소형들은 SIRPα:CD47 상호 작용을 차단하였다. 예시적인 CD47 항체와 그들의 대응하는 VH 영역 및 VL 영역은 표 1에 제시된 것들을 포함한다.

[0319] [00260] 인간화 과정 중에, 몇 가지 구현예에 있어서, VH CDR3 (SEQ ID NO: 52 또는 SEQ ID NO: 77)의 개시부에 있는 아미노산 서열 모티프 "NA"가 본 발명에 기재되는 CD47 항체들의 결합에 중요하다는 것이 결정되었다.

몇 가지 구현예에 있어서, VH CDR3 (SEQ ID NO: 52 또는 SEQ ID NO: 77)의 개시부에 있는 아미노산 잔기 "NA"의 부재하에서는, 본 발명의 CD47 항체들은 그들의 표적에 결합하지 않거나, 또는 아미노산 잔기 "NA"의 존재하에서 그들이 결합하는 것보다 낮은 친화도로 그들의 표적에 결합한다. 예컨대, "NA" 모티프가 더욱 표준적인 모티프 "AR" 또똔또는 "AT"로 바뀌는 경우, 결합은 실질적으로 감소하였다 (즉, 10배 이상). 다른 구현예에 있어서, VH CDR3 (SEQ ID NO: 52 또는 SEQ ID NO: 77)의 개시부에 있는 아미노산 잔기 "NA"의 부재하에서, 본 발명의 CD47 항체들은 아미노산 잔기 "NA"의 존재 하에서의 결합과 비교하여 동일한 친화도로 그들의 표적에 결합한다.

[0320] [00261] 이 기술 분야의 숙련자라면 과도한 실험없이도, 본 발명의 CD47 항체들의 서열 중 어떤 아미노산 치환이 실질적으로 동일한 기능, 예컨대 SIRPα를 차단하는 능력을 갖는 CD47 항체이고 유의미한 수준의 적혈구 응집 반응을 야기하지 않는지와 같은, 동일한 기능을 갖는 항체라는 결과를 낳는지 여부를 결정하는 것이 가능하다는 것을 알 것이다.

[0321] [00262] 수퍼덱스 200 컬럼을 갖춘 AKTA FLPC를 이용한 크기 배제 크로마토그래피로부터의 트레이스 이미지가 도 8a에 나타나 있다. AB6.12 항체의 IgG1, IgG4P, 및 IgG4PE 변이체을 보여준다. 3종의 모든 변이체들은 98% 이상 단량체성이다. 도 8b는 환원 (R) 및 비환원 (NR) 조건하의, 2A1의 다양한 인간화 변이체의 쿠마시 블루 염색된 SDS-PAGE 젤 사진이다.

[0322] **실시예 9:** CD47 항체들의 종양 세포주 식균 작용 촉진

[0323] [00263] CD47은 종양 세포 상에서 상향 조절되는 세포 표면 수용체이고, 그 본연의 리간드 SIRPα와의 상호 작용을 통하여 면역 회피에 기여하는 것으로 여겨진다. 대식세포 상에서 SIRPα에 CD47의 접합은 식균 작용 활성의 감소라는 결과를 낳는다. 이하 자세히 설명되듯이, 2A1 항체 및 그들의 변이체들의 CD47 결합 및 SIRPα 차단 활성이 인간 대식세포의 존재 하에서 종양 세포 식균 작용을 촉진하는지 여부가 결정되었다.

[0324] [00264] PBMCs를 인간 혈액으로부터 단리하여 그들을 AIM-V 배지 (Life Technologies)에서 7일간 배양함으로써 단핵구들을 대식세포로 분화시켰다. 이들 단핵구 유래 대식세포 (MDMs)는 다른 세포들을 씻겨 내려가게 하면서 더욱 부착성이 된다. MDMs을 긁어내어 12-웰 디쉬에 재플레이팅하고 24 시간 동안 부착되도록 하였다. 인간 종양 세포주 CCRF-CEM을 표적 세포형으로 선택하였는데, 그 높은 CD47 발현 때문이다. 37℃에서 15 분간 CCRF-CEM 세포들을 0.3 μM CFSE로 표지한 후, 수세하고 대식세포당 종양 세포 4:1의 비율로 MDMs에 첨가하였으며, CD47 항체를 다양한 농도로 첨가하였다. 표적 세포의 식균 작용을 3 시간 동안 일어나게 하였다. 이어서, 식균되지 않은 표적 세포들을 PBS로 씻어 냈다. 남아있는 식세포들을 긁어내어 DyLite 649 (Biolegend)에 컨쥬게이션된 대식세포 마커 CD14에 대한 항체로 염색하고, 유세포 분석하였다. FL4 양성 (CD14+)이었던 살아있는 세포들에 대하여 게이팅함으로써 식균 작용을 측정하였고, 그 후 FL1 (CFSE+) 양성 세포들의 백분율을 평가하였다.

[0325] [00265] 도 9는 CD47 항체 2A1과 그 인간화 변이체들이 MDMs에 의한 종양 세포들의 식균 작용에 있어서 투여량-의존성 증가를 입증하였음을 보여준다. 항체 2A1과 그 인간화 변이체 AB2.05는 66.7 pM에서 종양 세포의 식균 작용을 유도하는 그 능력에 있어 고유하였지만 B6H12는 그 농도에서 아무런 활성이 없었다 (도 9a). 도 9b는 어떻게 2A1, 및 그 인간화 변이체 AB2.05, AB6.12-IgG1, AB6.12-IgG4P, 및 AB6.12-IgG4PE 모두가 0.3 μg/ml 또는 2 nM에서 최대 식균 작용을 유도하는지를 보여주지만, B6H12 더 높은 농도를 요구한다. 이러한 결과는 CD47 항체, 2A1 (및 그로부터 유래하는 그 인간화 변이체)가 CD47 양성 종양 세포의 대식세포 매개 식균 작용을 유도한다는 것을 입증한다. 이 실시예에 있어서, CCFR-CEM 세포가 CD47 양성 표적 세포로 이용되었다.

[0326] **실시예 10:** CD47 항체들의 항종양 활성

[0327] [00266] 림프종의 라지 모델에서 쥐 CD47 항체들의 항-종양 활성을 평가하였다. NOD/SCID 마우스에 라지 세포를 피하 이식하고 무작위로 5개 그룹화 하였다 (그룹당 10 마리 마우스, 제0일). 그룹 1: 비히클 (완충액만); 그룹 2: B6H12 (양성 대조군); 그룹 3: 1B4; 그룹 4: 2A1; 및 그룹 5: 9E4. 종양이 감지될 수 있는 때 (50 mm^3, 제13일) 각 항체 또는 비히클 (완충액만)로 치료를 개시하였고, 종양 체적이 ~1500 mm^3에 이르렀을 때 마우스들을 안락사시켰다. 종양 체적을 주당 3회 측정하였다. 항체를 3 주간 주당 3회 200 μg로 정맥 (IV) 투여하였다 (마우스당 총 9회 투여). 치료는 제13일에 개시, 제32일에 종결되었다.

[0328] [00267] 도 10a에 보여지는 바와 같이, 본 발명의 CD47 항체들, 특히 2A1 항체는 이러한 림프종 동물 모델에서 항-종양 활성을 증명하였다. 1500 mm^3 종양 체적에 이르기까지, 그룹 1 (비히클만)은 ~25일을 필요로 하였고; 그룹 2 (B6H12.2)는 ~45일; 그룹 3 (1B4)은 ~37일; 그룹 4 (2A1)는 ~85일; 및 그룹 5 (9E4)는 ~40일을 필요로

하였다. 이러한 결과는 항체 2A1이 CD47에 결합, SIRPα와의 CD47 상호 작용을 차단하고 인간 암의 마우스 모델에서 종양 형성을 억제한다고 알려졌던 B6H12을 비롯한, 시험된 모든 CD47 결합 항체들보다 더욱 유의미하게 강력했다는 것을 보여준다. 예기치 않게, 이들 CD47 항체들의 종양 억제 활성은, 그들의 CD47 결합능 또는 CD47의 SIRPα와의 상호 작용 차단능과 상관 관계가 없었는데, 그 상관 관계는 간행 데이터들에 기초하여 기대되었던 것이다.

[0329] [00268] 실시예 2 및 3에서 설명된 바, 2A1, 1B4, 및 9E4은 CD47에 대하여 유사한 친화도를 가졌고 CD47의 SIRPα와의 상호 작용 차단능도 유사하였다. 또한, 2A1의 강화된 효능은 개시된 그 항체들의 Fc 도메인의 차이로 설명될 수 없는데, 이 연구에 사용된 모든 항체들은 동일한 마우스 IgG1 도메인을 포함하였기 때문이다. 따라서, 고유한 물적 조성 외에, 2A1 항체는 증가된 CD47에의 결합 또는 CD47으s.의 SIRPα과의 상호작용 차단 능력의 증가로는 설명될 수 없는, 기대치 못했던 고유한 특성을 갖는데, 예컨대 CD47 발현 세포들, 예컨대 적혈구 세포들 간의 동형 상호 작용을 유도하는 비능력, 및 종양 억제 활성의 강화가 그것이다.

[0330] [00269] 인간화 2A1 항체들이 그 들의 항-종양 활성을 유지하는지 확인하기 위하여, 유사한 라지 종양 연구가 수행되었다. 연구 설계는 상술한 것과 동일하였다. NOD/SCID 마우스에 라지 세포를 피하 이식하고 무작위로 5개 그룹화 하였다 (그룹당 10 마리 마우스, 제0일). 이 연구에서는, 항체를 3 주간 주당 3회 200 μg로 복강 (IP) 투여하였고 (마우스당 총 9회 투여), 종양 체적을 주당 3회 측정하였다. 그러나, 이 연구에서는, 마우스 IgG1 2A1 항체 (그룹 2)가 인간화 유도체 AB6.12와 비교되었다. 이 연구에서는, AB6.12는 인간 IgG1 내로 컨스트럭트화 이루어졌고 (실시예 8에서 설명된 바와 같다)(그룹 3), 인간 IgG4P (그룹 4) 및 인간 IgG4PE (그룹 5) 내로 이루어졌다. 따라서, 이 실험은 2A1의 인간화가 그 종양 억제 활성에 미치는 영향과 이 기술 분야에 알려진 많은 항체들의 항종양 활성에 기여하는 Fc 도메인 효과자 기증의 강력한 역할을 설명하기 위하여 설계되었다. 인간 IgG1이 인간 IgG4P에 비하여 현저히 많은 효과자 기능을 갖는다는 것이 많은 문헌에 잘 나와 있다. IgG4PE는 효과자 기능을 보다 저감시키기 위하여 개발되었다. 도 10b에서 볼 수 있는 바와 같이, 2A1의 인간화는 2A1의 항종양 활성을 감소시키지 않았고, 사실 증가시켰을 수 있다. AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P, 및 AB6.12-hIgG4PE 모두 마우스 A1 (2A1mIgG)보다 훨씬 높아 보이는 서로 유사한 항-종양 활성을 보였다. 이러한 결과는 2A1mIgG1, AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P 및 AB6.12-hIgG4PE가 유사한 CD47 결합 및 SIRPα 차단 활성을 갖기 때문에 예기치 못한 것이다. 또한, AB6.12-hIgG1, AB6.12-hIgG4P 및 AB6.12-hIgG4PE가 유사한 항-종양 활성을 갖기 때문에, 효과자 기능은 인간화 2A1 항체 AB6.12의 효능에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

[0331] **실시예 11:** CD47 항체들의 CD47과의 공-결정화

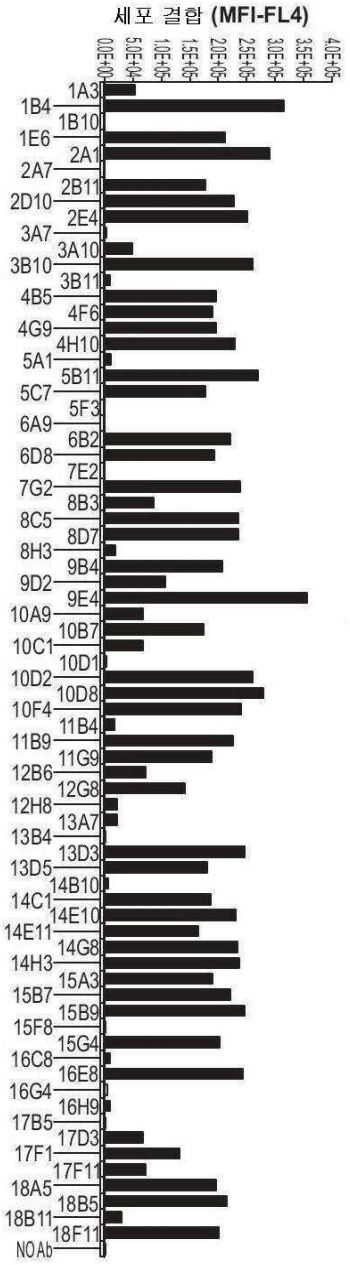
[0332] [00270] CD47은 6개 위치에서 고도로 글리코실화된 단일한 세포외 IgV (면역 글로불린 유사 가변형)를 갖는 5 패스 막통과 단백질이다. CD47-IgV 도메인의 구구조는, 그 천연의 리간드인 SIRPα의 IgV 도메인과의 복합체로 해결되었다 (Protein Data Bank (PDB) Reference No. 2JJS; Hatherley et al., 2008 Mol Cell, 25;31(2): 266-77 (도 11a)). 이 구조는 CD47의 N-말단 파이로글루타메이트를 포함하는 정점 에피토프 상에서 CD47-IgV에의 SIRPα-IgV 결합을 보여준다. 이 구조는 어떻게 두 세포 표면 막통과 단백질들이 인접한 세포들로부터 헤드 투 헤드 (head to head) 배향으로 생산적으로 상호 작용할 수 있는지를 충분히 설명한다. B6H12 Fab와 복합체를 이룬 CD47-IgV의 X-레이 결정화 그래픽 구조가 도 11b에 주여진다. 명확성을 위해, Fab의 불변 영역 (CH1 및 CL)은 도면에서 생략되었고, 오로지 Fv (VH 및 VL)만 제시된다. 이는 세포 막으로부터 매우 떨어진 표면에서 이 항체를 위치시키는 정점 결합 부위를 보여준다 (도 11b). B6H12에 의한 SIRPα 차단 메커니즘은 이 구조로부터 명백하다. 세포 막 위치와 관련한 배향 목적은 도 11에 점선으로 표시된다.

[0333] [00271] 본 발명 항체의 표적 에피토프를 결정하기 위하여, CD47-IgV 도메인 및 2A1-xi (인간 CH1 및 CL 도메인을 갖는 키메라 항체)의 Fab의 공-복합체에 대한 X-레이 결정 그래픽 구조를 결정하였다 (도 11c). 명확성을 위해, Fab의 불변 영역 (CH1 및 CL)은 도면에서 생략되었고, 오로지 Fv (VH 및 VL)만 제시된다. 앞서 결정된 헤드 투 헤드 배향의 CD47 결합 SIRPα의 구조 (도 11a), 및 막으로부터 멀리 정점 위치되는 B6H12 항체 (도 11b)와는 달리, CD47과 복합체를 이룬 2A1의 구조는 기대치 않은 고유한 헤드 투 사이드 (head to side) 배향으로 막 근처에서 CD47에 상기 항체의 결합을 보여주었다 (도 11c). CD47 상의 2A1 에피토프는 불연속이고, SEQ ID NO: 147 (즉, 시그널 서열 (아미노산 1-18)을 제외한 SEQ ID NO: 48)에 ㄸ따라 번호매길 경우 CD47의 잔기 Y37, K39, K41, KGRD (SEQ ID NO: 56) 루프 (잔기 43-46), D51, H90, N93, E97, T99, E104, 및 E106를 포함한다. CD47에 결합된 2A1의 구조는 또한, VH가 CD47의 KGRD (SEQ ID NO: 56) 루프에의 결합에 주로 관여하는 반면, VK 도메인은 SIRPα 결합에 관여된 정점의 잔기들, 예컨대 Y37, T102, 및 E104와 상호 작용한다는 것을 보여준다. 그러므로, CD47에의 SIRPα 결합을 물리적으로 방해하는 것은 주로 VK 도메인이다. 이들 구조적 연구는 2A1이 결합하는 고유한 에피토프가 CD47의 측면상에 있음을 제시한다. 이 기술 분야에 알려진 CD47 항체들과는 대

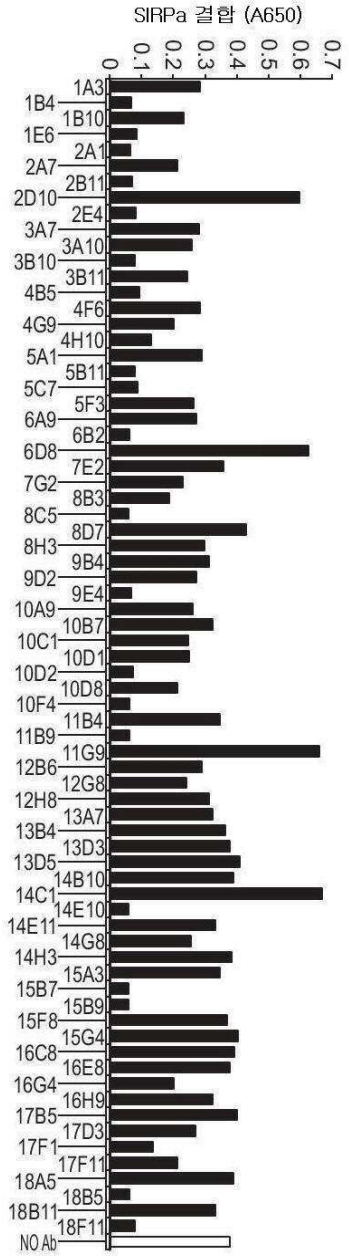
조적으로, 막 중심부 위치로의 2A1 VH 영역의 배향이, 그 항체로 하여금 인접 세포상의 CD47 분자와 가교할 수 없도록 함으로써 유의미한 수준의 적혈구 세포 응집 반응을 막는, 이 항체의 중요한 특징이다.

도면

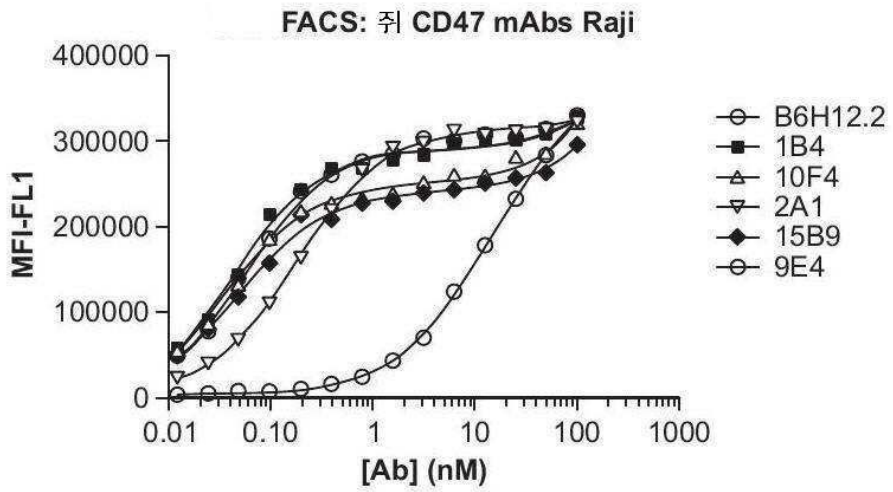
도면1a



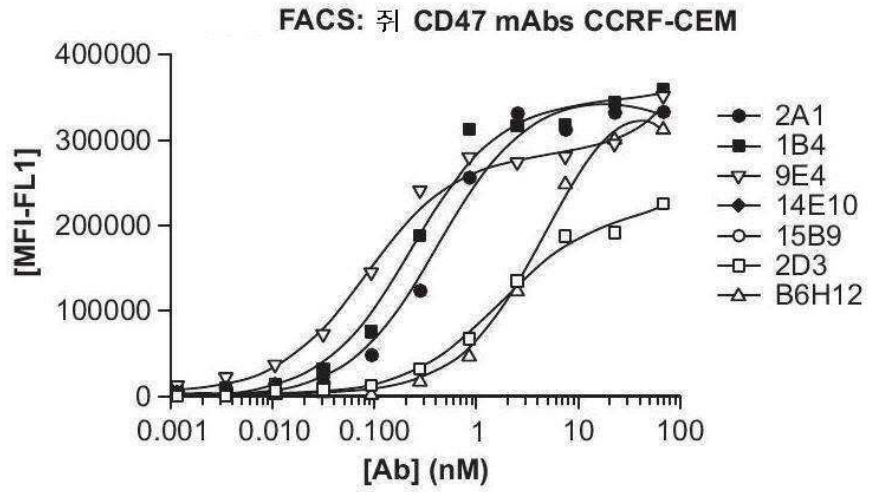
도면1b


SIRPa 결합 (A650)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
1A3
1B4
1B10
1E6
2A1
2A7
2B11
2D10
2E4
3A7
3A10
3B10
3B11
4B5
4F6
4G9
4H10
5A1
5B11
5C7
5F3
6A9
6B2
6D8
7E2
7G2
8B3
8C5
8D7
8H3
9B4
9D2
9E4
10A9
10B7
10C1
10D1
10D2
10D8
10F4
11B4
11B9
11G9
12B6
12G8
12H8
13A7
13B4
13D3
13D5
14B10
14C1
14E10
14E11
14G8
14H3
15A3
15B7
15B9
15F8
15G4
16C8
16E8
16G4
16H9
17B5
17D3
17F1
17F11
18A5
18B5
18B11
18F11
NO Ab

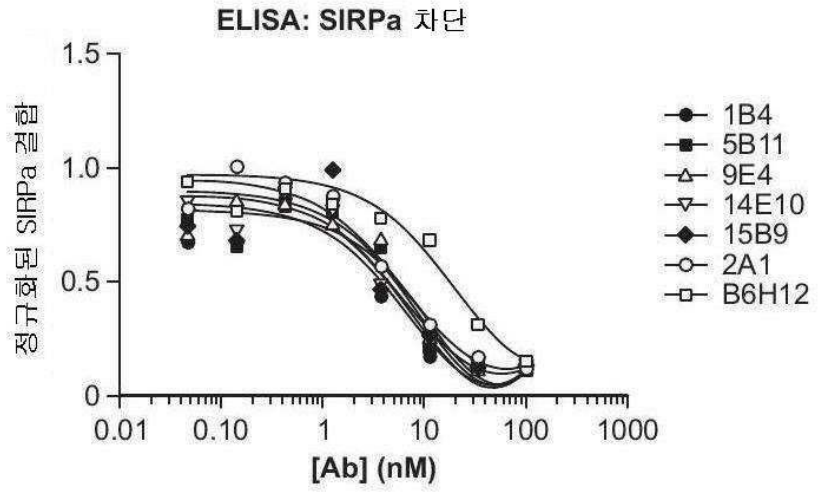
도면2a



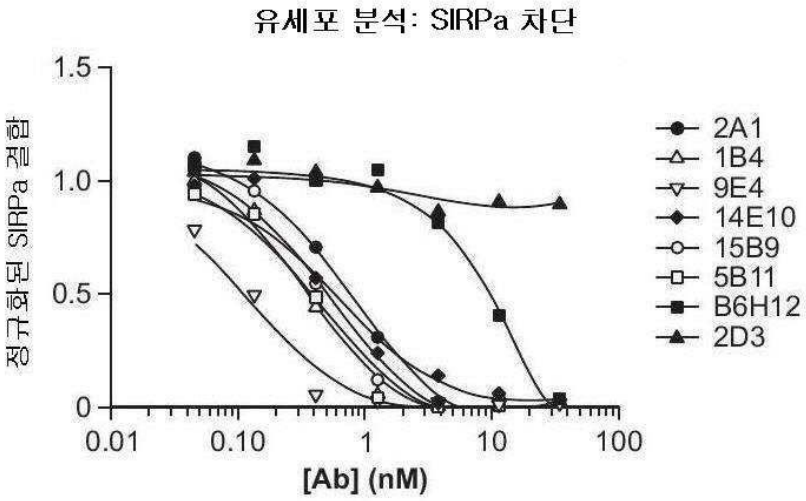
도면2b



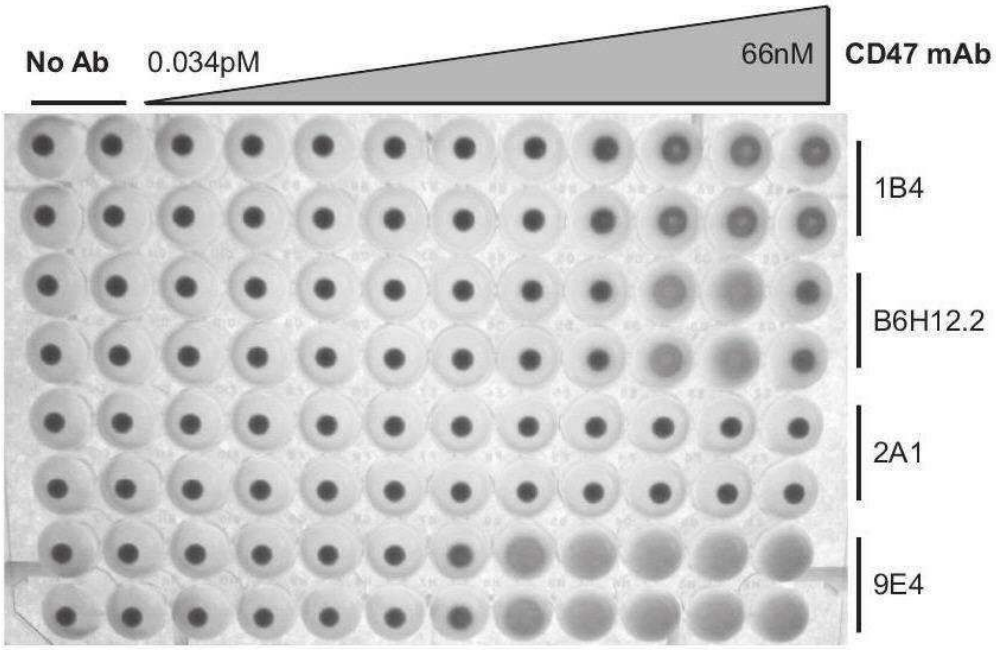
도면3a

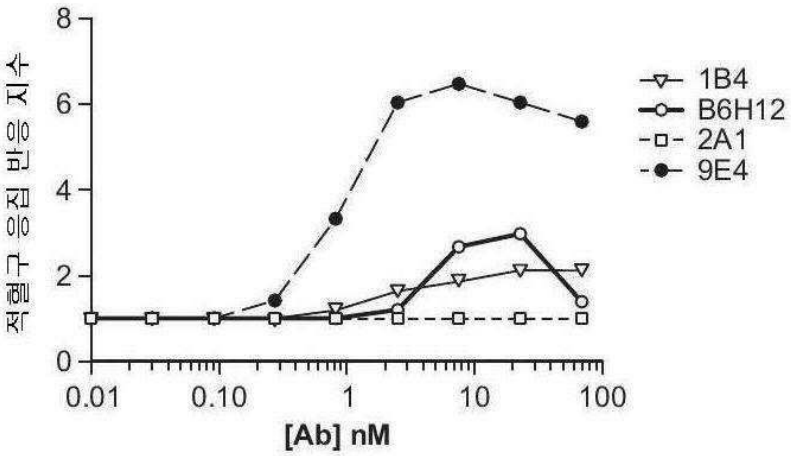


도면3b


유세포 분석: SIRPa 차단
정규화된 SIRPa 결합
1.5
1.0
0.5
0
0.01
0.10
1
10
100
[Ab] (nM)
2A1
1B4
9E4
14E10
15B9
5B11
B6H12
2D3

도면4a

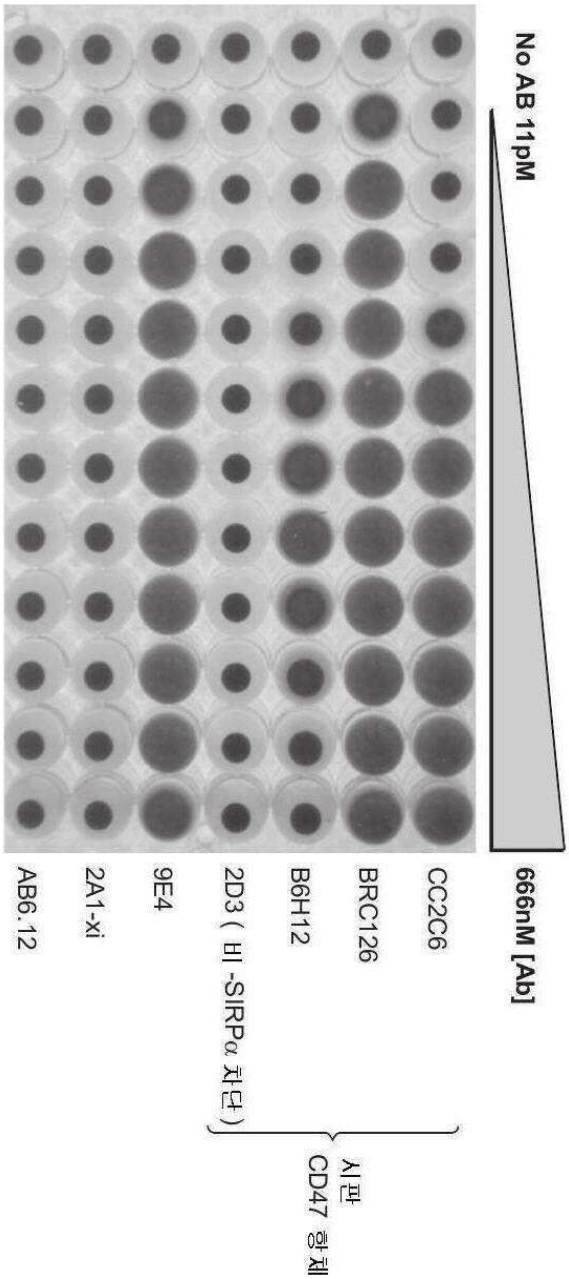

No Ab
0.034pM
66nM
CD47 mAb
1B4
B6H12.2
2A1
9E4


적혈구 응집 반응 지수
8
6
4
2
0
0.01
0.10
1
10
100
[Ab] nM
1B4
B6H12
2A1
9E4

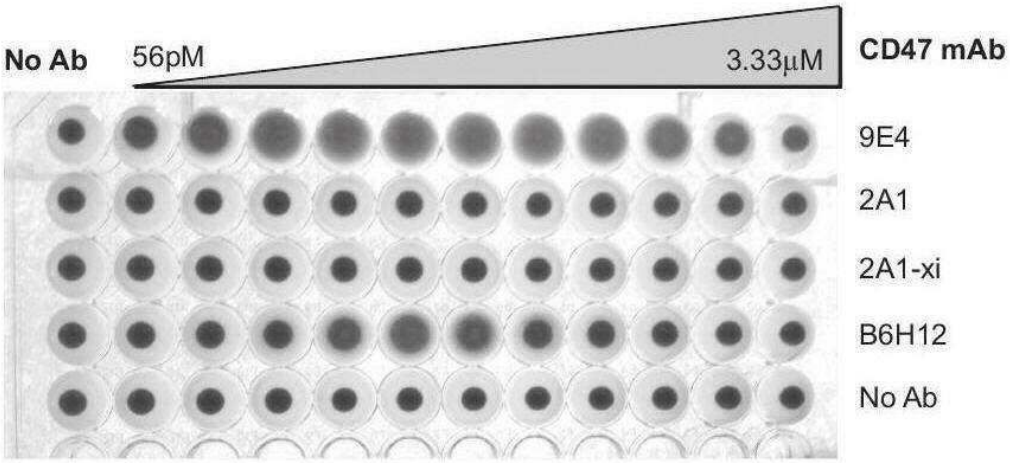
도면4b

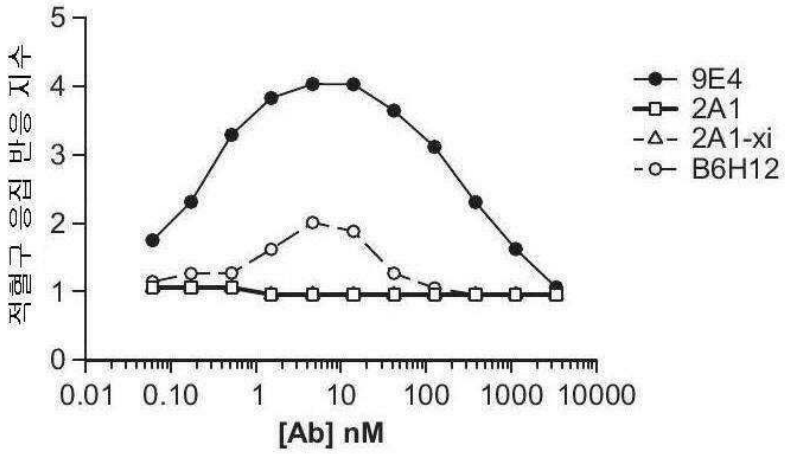
[Ab] (nM)	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5	100	50	25	12.5
A	9E4	9E4	9E4	9E4	11B9	11B9	11B9	11B9	15B9	15B9	15B9	15B9
B	Blank	Blank	Blank	Blank	10F4	10F4	10F4	10F4	18F11	18F11	18F11	18F11
C	B6H12	B6H12	B6H12	B6H12	Blank	Blank	Blank	Blank	18B5	18B5	18B5	18B5
D	2A1	2A1	2A1	2A1	3B10	3B10	3B10	3B10	17F11	17F11	17F11	17F11
E	2A1-XI	2A1-XI	2A1-XI	2A1-XI	15B7	15B7	15B7	15B7	Blank	Blank	Blank	Blank
F	6B2	6B2	6B2	6B2	2B11	2B11	2B11	2B11	Blank	Blank	Blank	Blank
G	14E10	14E10	14E10	14E10	5B11	5B11	5B11	5B11	Blank	Blank	Blank	Blank
H	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

도면4c

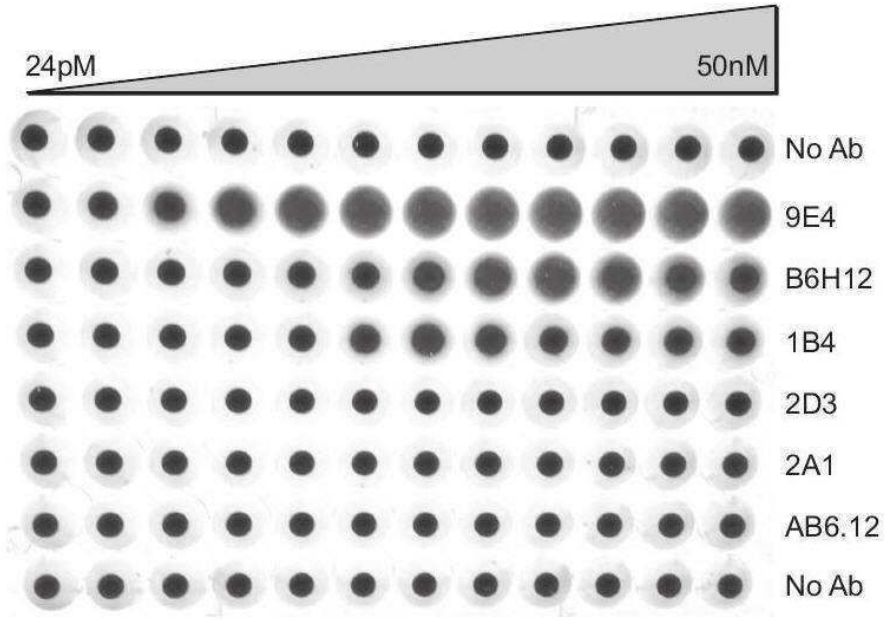

No AB 11pM
666nM [Ab]
CC2C6
BRC126
B6H12
2D3 (비 -SIRPα 차단)
9E4
2A1-xi
AB6.12
시판
CD47 항체

도면4d

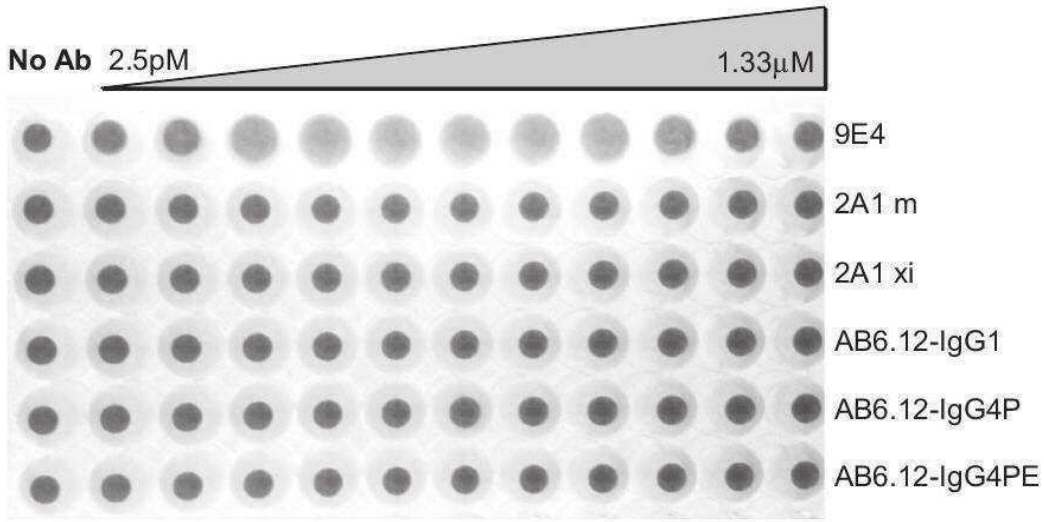

No Ab
56pM
3.33μM
CD47 mAb
9E4
2A1
2A1-xi
B6H12
No Ab


적혈구 응집 반응 지수
0
1
2
3
4
5
0.01
0.10
1
10
100
1000
10000
[Ab] nM
9E4
2A1
2A1-xi
B6H12

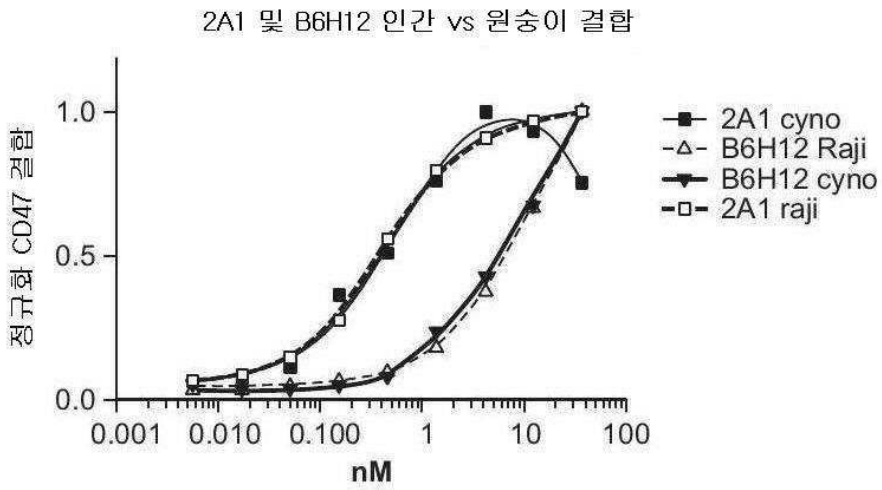
도면4e


24pM
50nM
No Ab
9E4
B6H12
1B4
2D3
2A1
AB6.12
No Ab

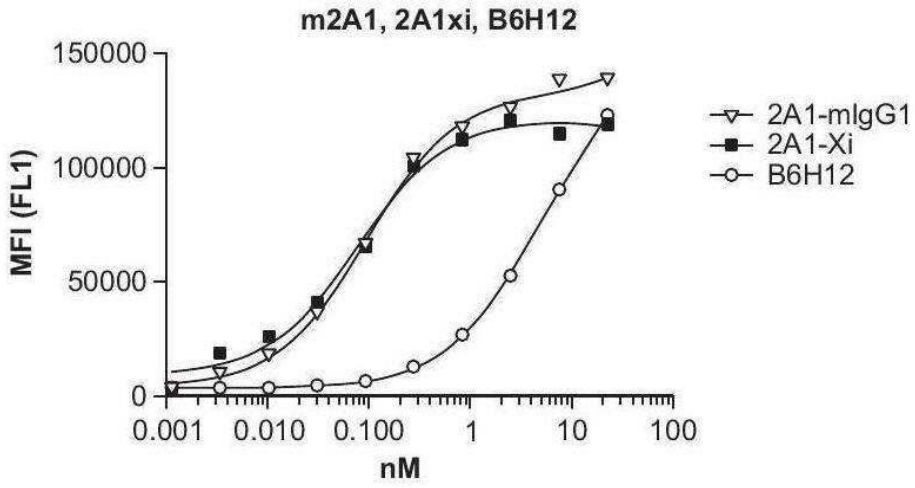
도면4f


No Ab 2.5pM
1.33μM
9E4
2A1 m
2A1 xi
AB6.12-IgG1
AB6.12-IgG4P
AB6.12-IgG4PE

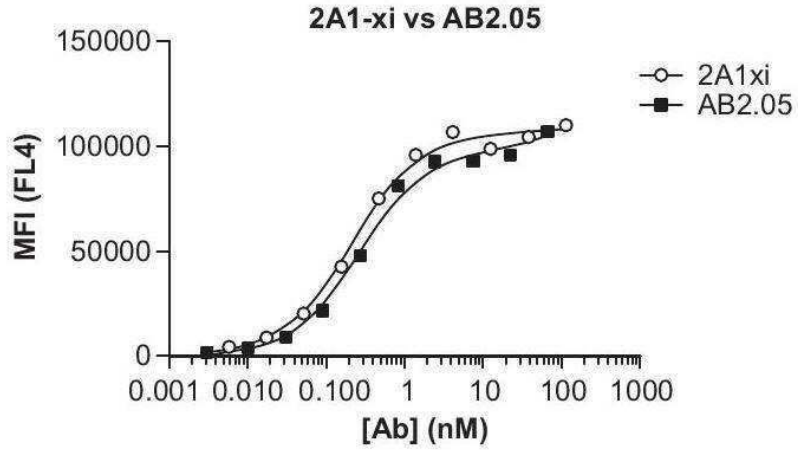
도면5


2A1 및 B6H12 인간 vs 원숭이 결합
정규화 CD47 결합
1.0
0.5
0.0
0.001
0.010
0.100
1
10
100
nM
2A1 cyno
B6H12 Raji
B6H12 cyno
2A1 raji

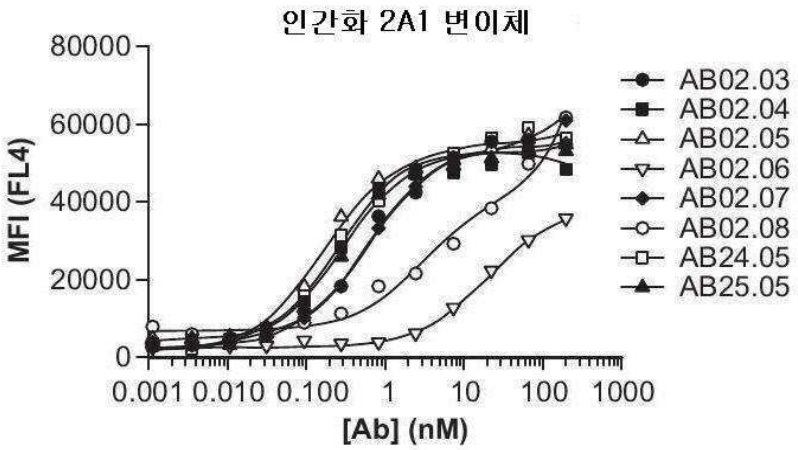
도면6


m2A1, 2A1xi, B6H12
MFI (FL1)
150000
100000
50000
0
0.001
0.010
0.100
1
10
100
nM
2A1-mIgG1
2A1-Xi
B6H12

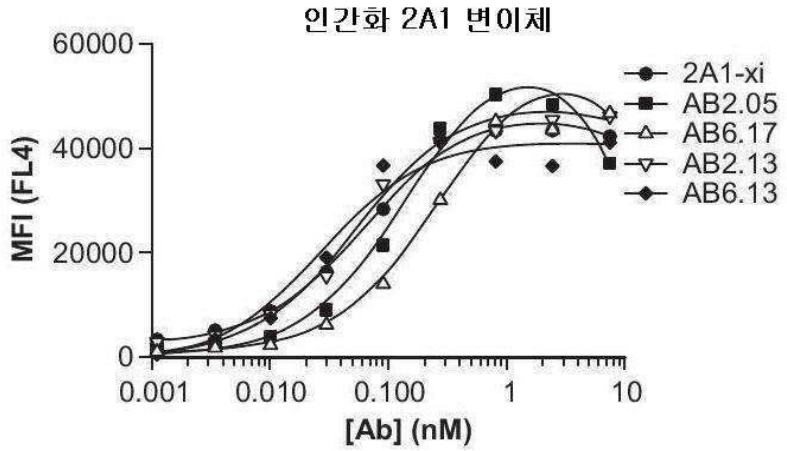
도면7a


2A1-xi vs AB2.05
MFI (FL4)
150000
100000
50000
0
0.001
0.010
0.100
1
10
100
1000
[Ab] (nM)
2A1xi
AB2.05

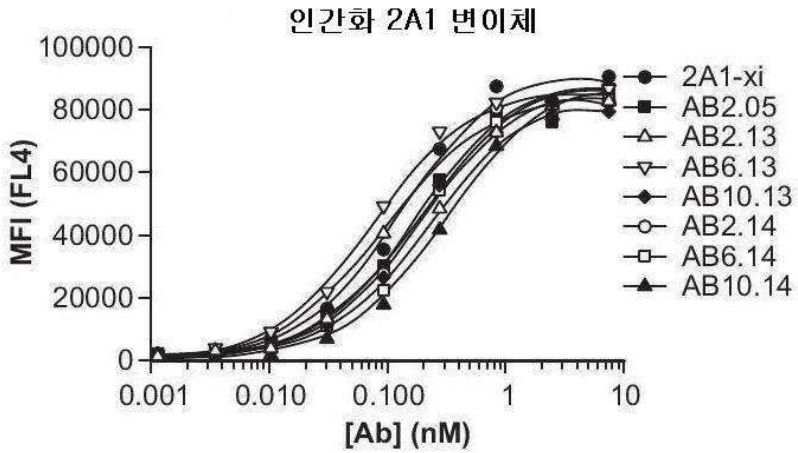
도면7b



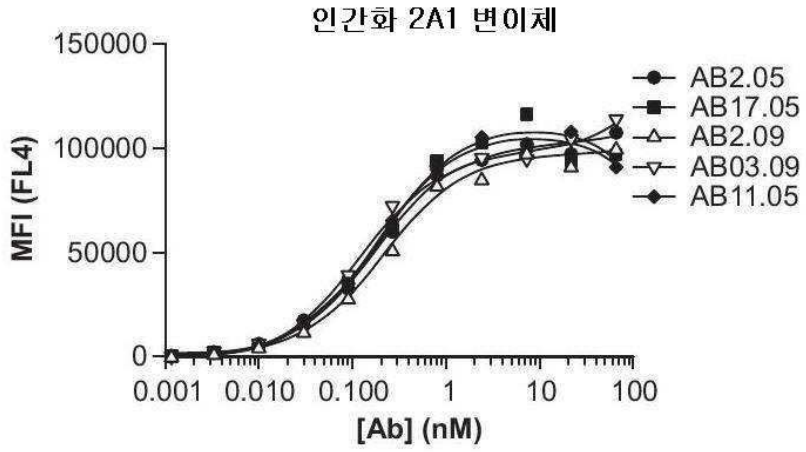
도면7c



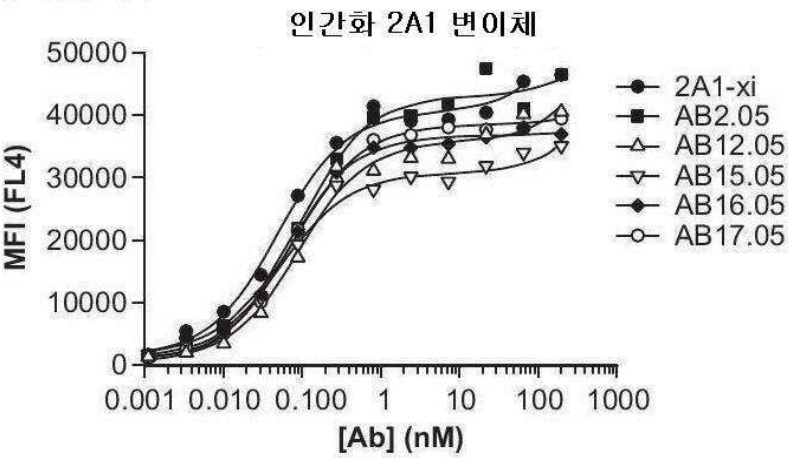
도면7d



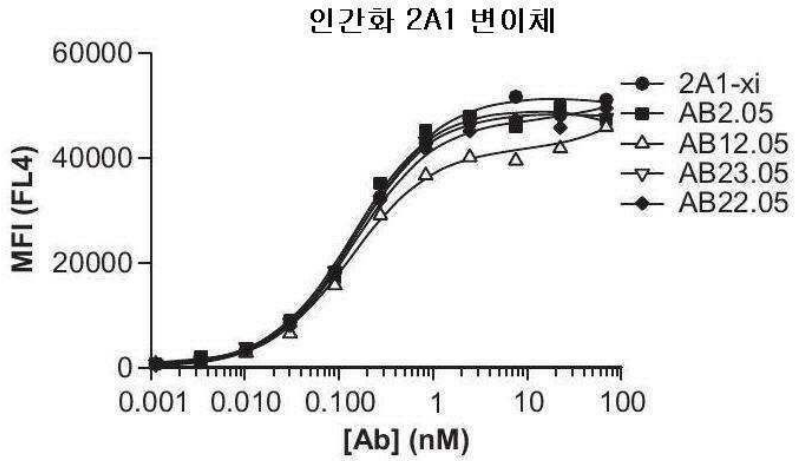
도면7e



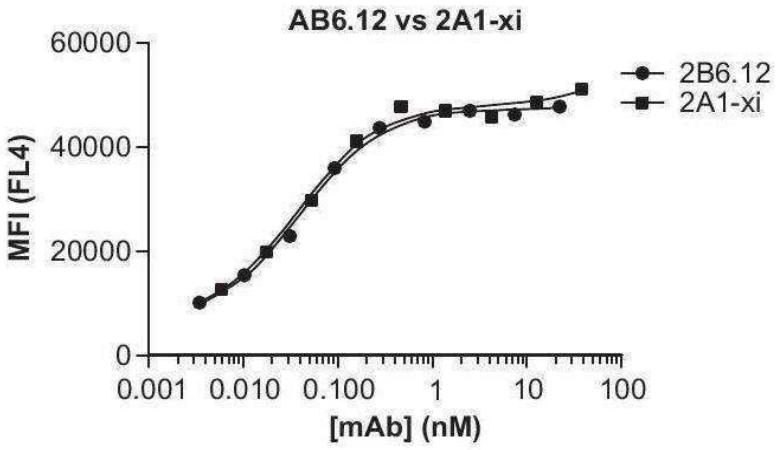
도면7f



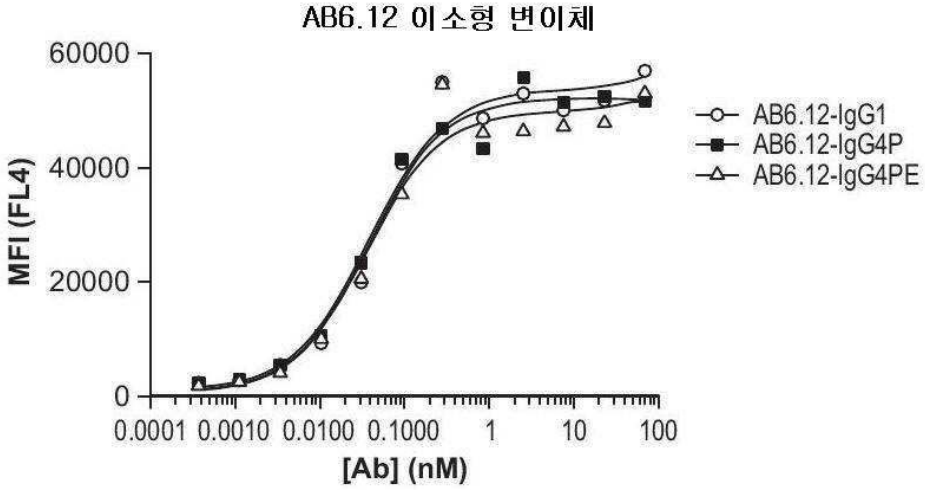
도면7g



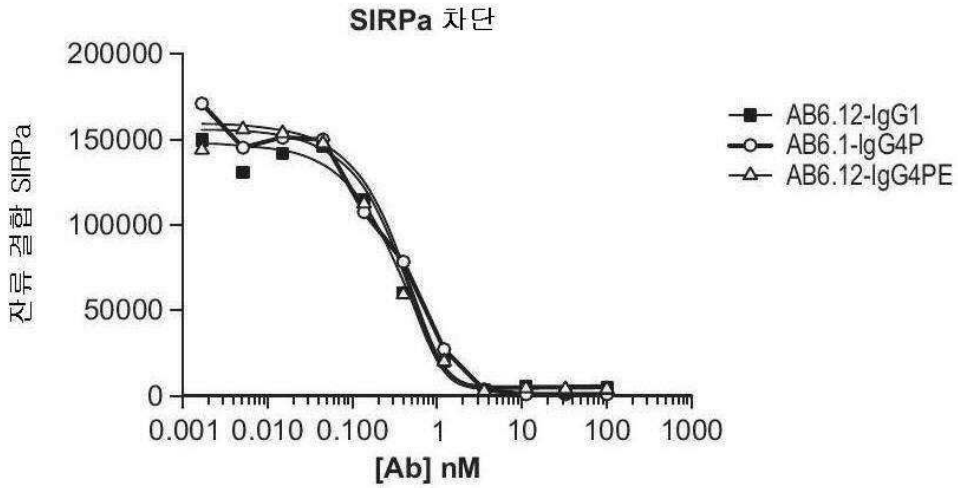
도면7h



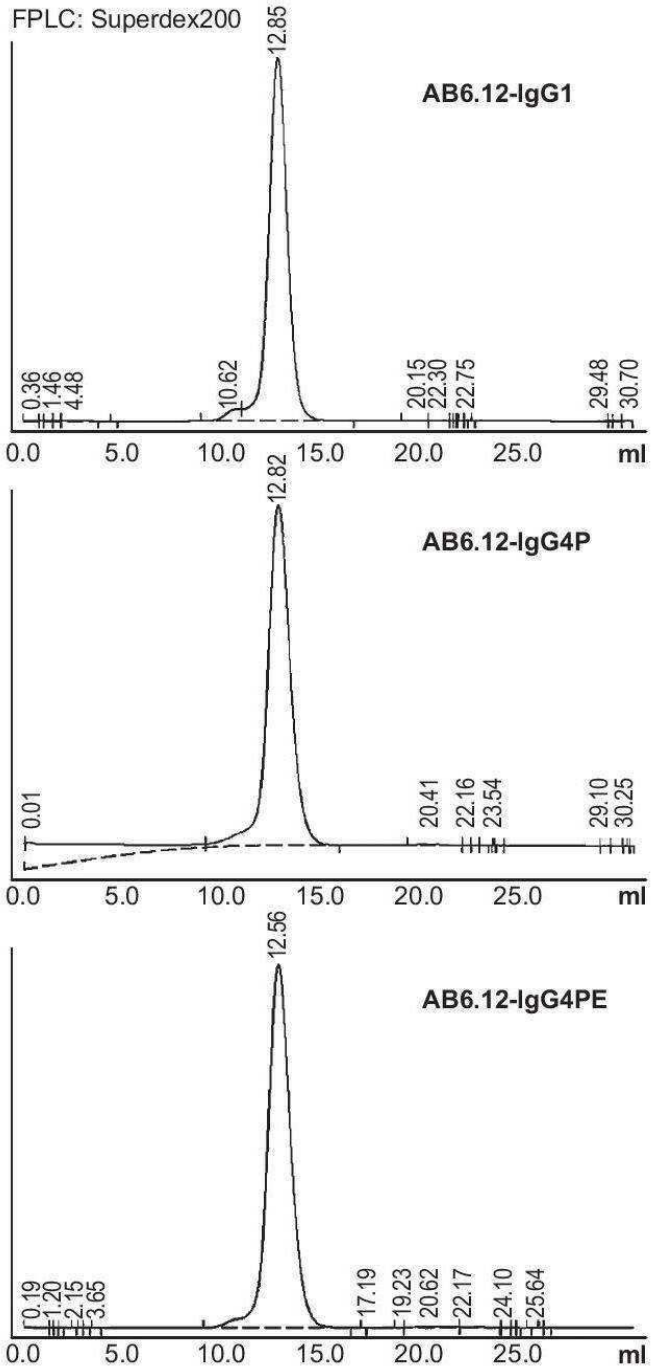
도면7i



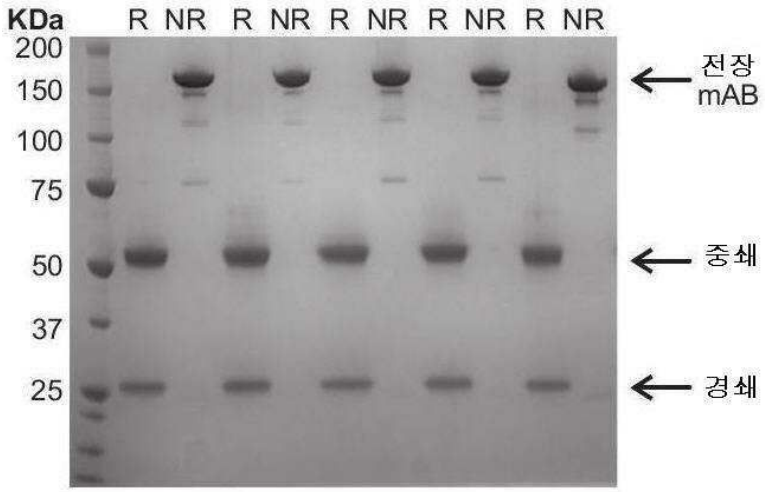
도면7j



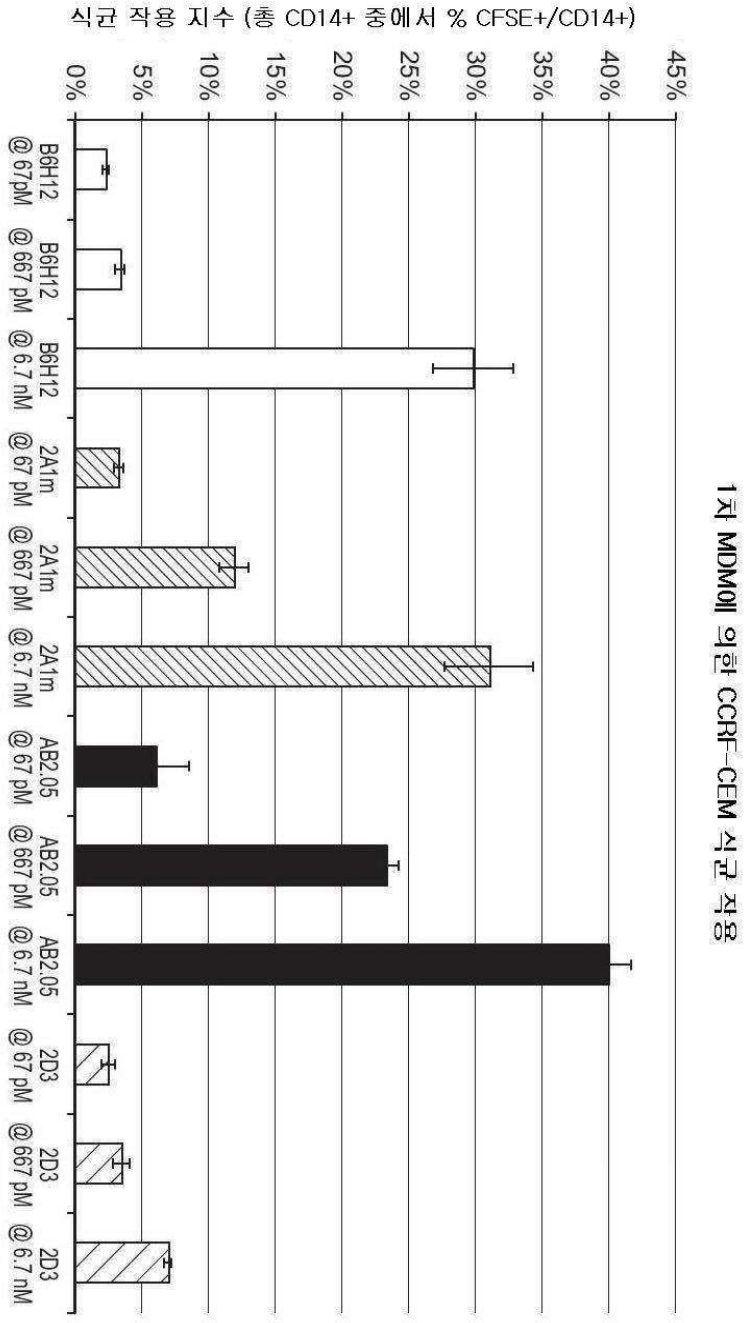
도면8a


FPLC: Superdex200
AB6.12-IgG1
12.85
0.36
1.46
4.48
10.62
20.15
22.30
22.75
29.48
30.70
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
ml
AB6.12-IgG4P
12.82
0.01
20.41
22.16
23.54
29.10
30.25
AB6.12-IgG4PE
12.56
0.19
1.20
2.15
3.65
17.19
19.23
20.62
22.17
24.10
25.64

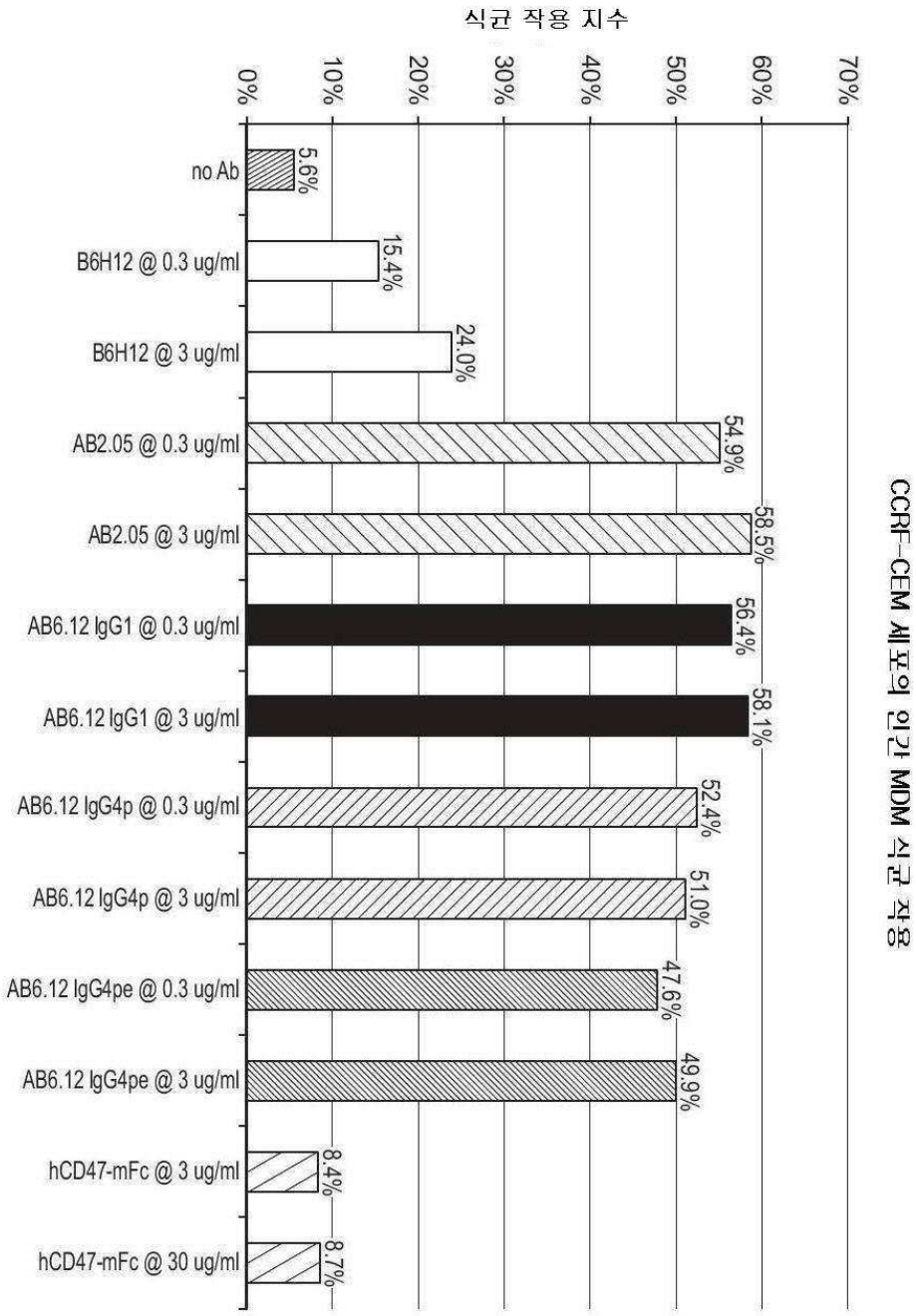
도면8b



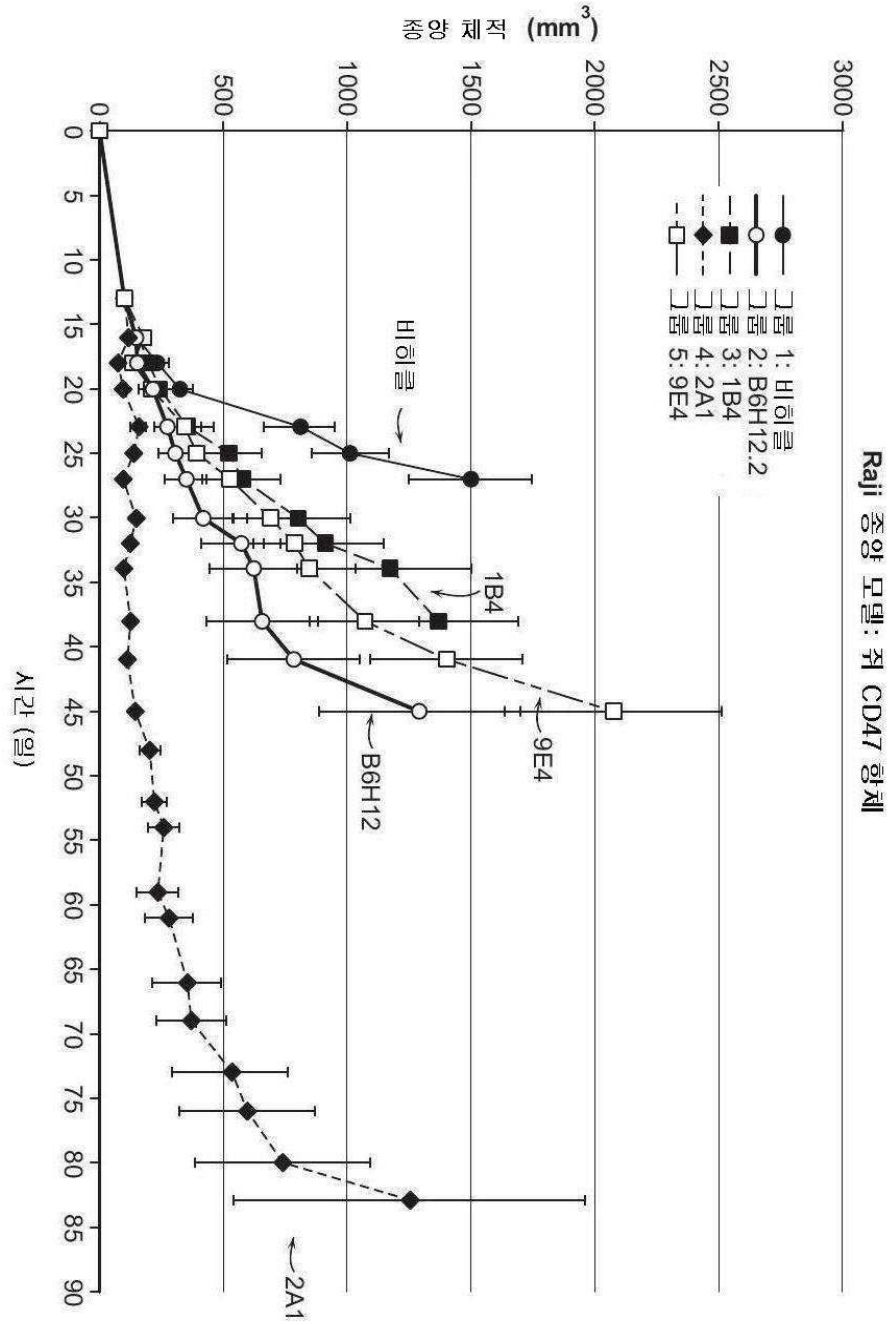
도면9a


1차 MDM에 의한 CCRF-CEM 식균 작용
식균 작용 지수 (총 CD14+ 중에서 % CFSE+/CD14+)
0%
5%
10%
15%
20%
25%
30%
35%
40%
45%
B6H12 @ 67pM
B6H12 @ 667 pM
B6H12 @ 6.7 nM
2A1m @ 67 pM
2A1m @ 667 pM
2A1m @ 6.7 nM
AB2.05 @ 67 pM
AB2.05 @ 667 pM
AB2.05 @ 6.7 nM
2D3 @ 67 pM
2D3 @ 667 pM
2D3 @ 6.7 nM

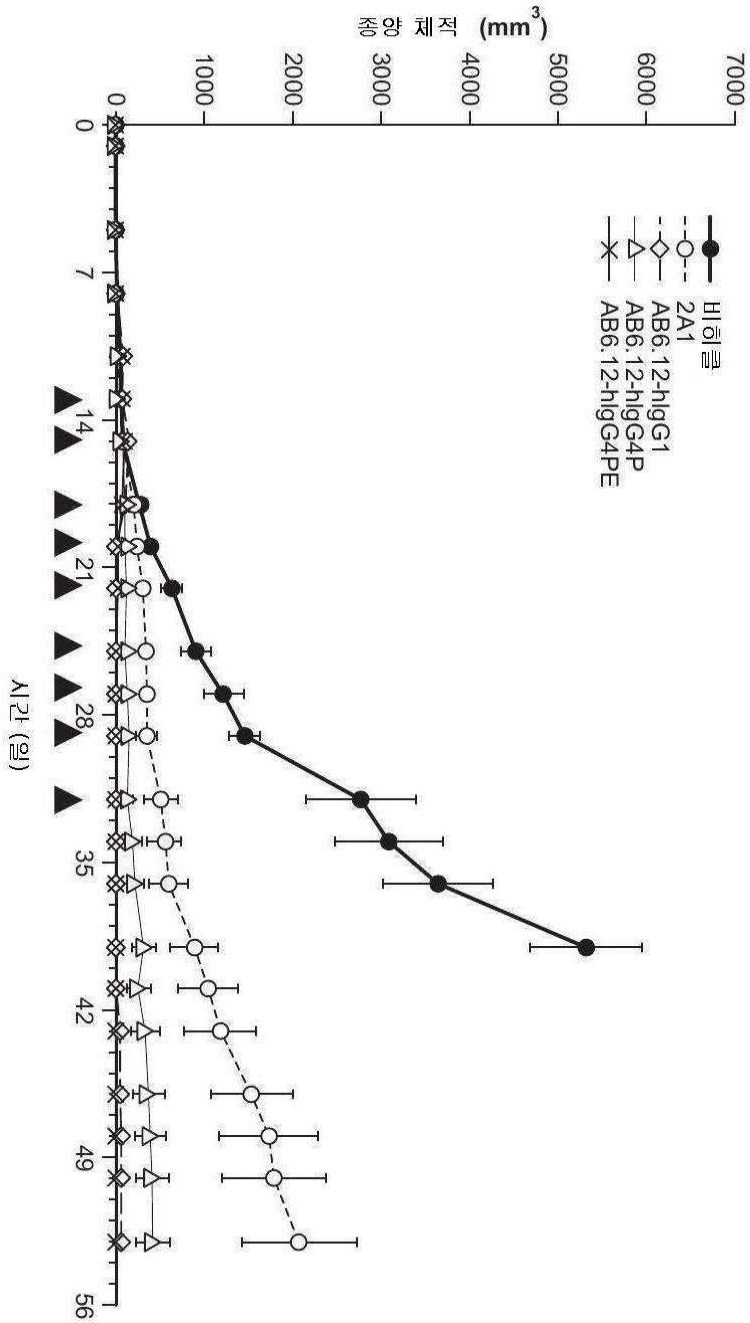
도면9b


CCRF-CEM 세포의 인간 MDM 식균 작용
식균 작용 지수
0%
10%
20%
30%
40%
50%
60%
70%
no Ab
5.6%
B6H12 @ 0.3 ug/ml
15.4%
B6H12 @ 3 ug/ml
24.0%
AB2.05 @ 0.3 ug/ml
54.9%
AB2.05 @ 3 ug/ml
58.5%
AB6.12 IgG1 @ 0.3 ug/ml
56.4%
AB6.12 IgG1 @ 3 ug/ml
58.1%
AB6.12 IgG4p @ 0.3 ug/ml
52.4%
AB6.12 IgG4p @ 3 ug/ml
51.0%
AB6.12 IgG4pe @ 0.3 ug/ml
47.6%
AB6.12 IgG4pe @ 3 ug/ml
49.9%
hCD47-mFc @ 3 ug/ml
8.4%
hCD47-mFc @ 30 ug/ml
8.7%

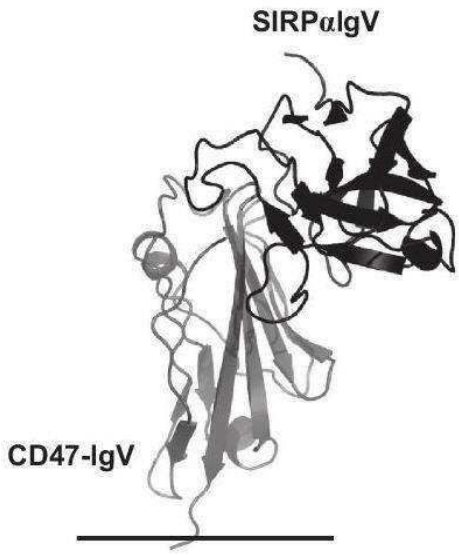
도면10a


Raji 종양 모델: 쥐 CD47 항체
종양 체적 (mm3)
시간 (일)
그룹 1: 비히클
그룹 2: B6H12.2
그룹 3: 1B4
그룹 4: 2A1
그룹 5: 9E4
비히클
1B4
B6H12
9E4
2A1
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90

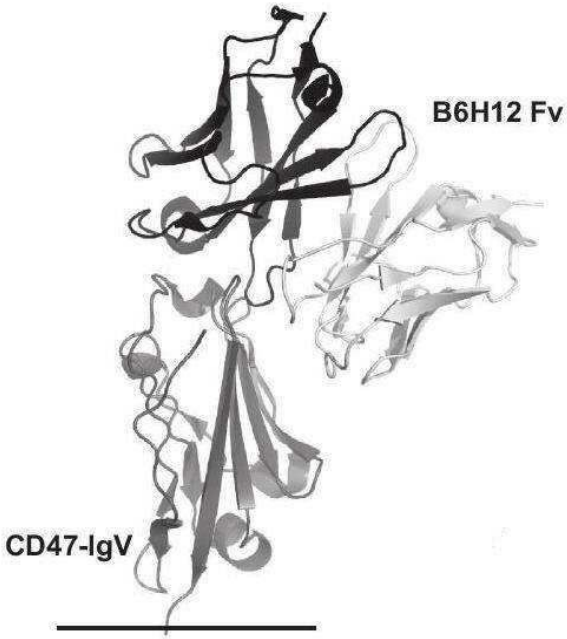
도면10b


종양 체적 (mm3)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
시간 (일)
0
7
14
21
28
35
42
49
56
비히클
2A1
AB6.12-hIgG1
AB6.12-hIgG4P
AB6.12-hIgG4PE

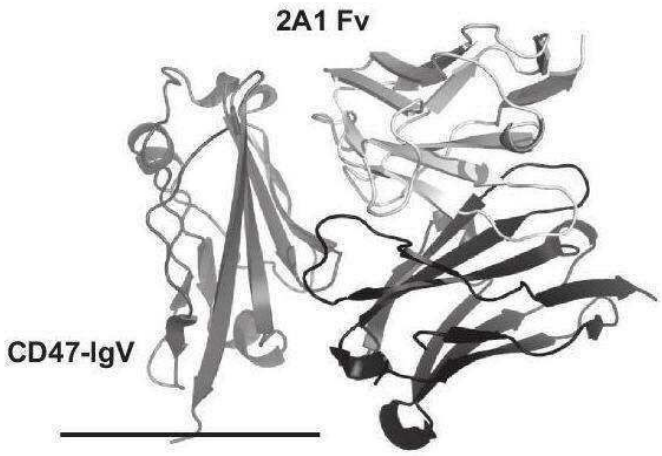
도면11a



도면11b



도면11c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> InhibRx LLC

<120> CD47 Antibodies and Methods of Use Thereof

<130> 42967-506001WO

<140> PCT/US2013/024995

<141> 2013-02-06

<150> US 61/595,216

<151> 2012-02-06

<150> US 61/659,752

<151> 2012-06-14

<160> 147

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

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

<210> 2
<211> 326
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<400> 2
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 3

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

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

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

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 4
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

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

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 5

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

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

20 25 30

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

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Phe Ala Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val
115

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 6

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

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

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 9

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

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

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

50 55 60

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

<210> 10
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody
<400> 10
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 11

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 11

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 12

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

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

20 25 30

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

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 13
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody
<400> 13

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

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 14
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody
<400> 14

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody
<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 18

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val
115

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 19

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Thr Gly Ser
1 5 10 15

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

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 22

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 24

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 24

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

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

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 25

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 26

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 27

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 28

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 28

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 29

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable heavy chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 30

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

Tyr Leu His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val

115

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 31

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ile Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys

100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 32

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Tyr Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ile Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 33

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

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

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile

35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 36

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

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

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 37

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

35 40 45

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

<210> 38
<211> 107

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody
<400> 38
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

<210> 39
<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 39

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 40

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 40

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

<210> 41
<211> 107

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody
<400> 41

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

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

<210> 42
<211> 107

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody
<400> 42

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

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

<210> 43
<211> 107

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody
<400> 43
Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr
20 25 30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Ile Leu Ile
35 40 45

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

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

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 44

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 45

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

<210> 46
<211> 107

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody
<400> 46
Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr
20 25 30
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variable light chain region of a humanized CD47 antibody

<400> 47

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 48

<211> 323

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp

50 55 60

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
65 70 75 80
Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
85 90 95
Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
100 105 110
Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
130 135 140
Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
145 150 155 160
Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
165 170 175
Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
180 185 190

Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
195 200 205
Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
210 215 220
Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
225 230 235 240
Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu
245 250 255

Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
260 265 270
Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
275 280 285
Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
290 295 300

Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
305 310 315 320

Asn Asp Glu

<210> 49
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 49
Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
1 5 10 15
Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
20 25 30
Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
35 40 45
Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser

50 55 60
Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
65 70 75 80
Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
85 90 95
Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
100 105 110
Tyr Arg Val Val
115
<210> 50

<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> amino acid sequence of VH CDR1
<400> 50
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR2

<400> 51

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Gly Asp Thr Glu

1 5 10

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR3

<400> 52

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Ser Tyr Pro Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VL CDR1

<400> 53

Lys Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VL CDR2

<400> 54

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VL CDR3

<400> 55

Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 56

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Lys Gly Arg Asp

1

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 57

Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 58

Gly Phe Thr Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 59

Gly Tyr Asn Phe Thr Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 60

Gly Tyr Thr Ile Thr Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 61

Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 62

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 62

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 63

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 64

Gly Phe Thr Ile Thr Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 65

Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 66

Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VL CDR1

<400> 67

Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Arg Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VL CDR1

<400> 68

Arg Ala Arg Gln Gly Ile His Arg Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VL CDR2

<400> 69

Arg Ala Asn Arg Leu Gln Ser

1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VL CDR2

<400

> 70

Arg Ala Asn Arg Arg Ala Thr

1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VL CDR2

<400> 71

Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser

1 5

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 72

Trp Ile Asp Pro Asp Gln Gly Asp Thr Glu

1 5 10

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 73

Trp Ile Asp Pro Asp Tyr Gly Asp Thr Glu

1 5 10

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 74

Trp Ile Asp Pro Asp Ser Gly Asp Thr Glu

1 5 10

<210> 75

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 75

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Ala Asp Thr Glu

1 5 10

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR1

<400> 76

Trp Ile Asp Pro Asp Asn Thr Asp Thr Glu

1 5 10

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of VH CDR3

<400> 77

Asn Ala Ala Tyr Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 78

<211> 118

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain region of the 9E4 antibody

<400> 78

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser Arg Val Arg Ser Leu Ala Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Gly Tyr Asp Gln Asn Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Arg Asn Arg Tyr Asp Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val

115

<210> 79

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain region of the 9E4 antibody

<400> 79

Glu Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Asp Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 80

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VH chain region of the 1B4 antibody

<400> 80

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Val Thr Val

115

<210> 81

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VL chain region of the 1B4 antibody

<400> 81

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Lys

<210> 82

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 82

cactgcaggt rtccactcc 19

<210> 83

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 83

catagcaggt gtccactcc 19

<210> 84

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 84

crctacaggt gtccactcc 19

<210> 85

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 85

gcyacagmtg tccactcc 18

<210> 86

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 86

cactgcaggt gtccwmtcc 19

<210> 87

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 87

crctrcaggt gtkcactcc 19

<210> 88

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 88

gctawmggtg tccactcc 18

<210> 89

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 89

cctcaggtgt ccactcc 17

<210> 90

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 90

gctacaggtg ctcactcc 18

<210> 91

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 91

cactgcaggt gtcctctct 19

<210> 92

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 92

caytgcaggt gtccaytgc 19

<210> 93

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 93

gctammggtg tccacttc 18

<210> 94

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 94

ctcctgtcak taactkcagg t 21

<210> 95

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 95

caactgcagg tgtctctct 19

<210> 96

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 96

crctrcaggy gtccactct 19

<210> 97

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 97

ccaagctgta tcctttcc 18

<210> 98

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 98

ccaagctgtg tcctrtcc 18

<210> 99

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 99

cttgacagyc vttcckggt 19

<210> 100

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 100

cttcacagcc tttcctggt 19

<210> 101

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 101

cttaaaaggg gtccagtgt 19

<210> 102

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 102

caytttaaaa rgtgtcmagt gt 22

<210> 103

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 103

gttttaaaag gtgtcctgtg 20

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 104

ctyttaaaag gkgtccagwg 20

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 105

cytttamatg gtatccagtg t 21

<210> 106

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 106

cttttacatg gtttcaagtg t 21

<210> 107

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 107

gtccctgcat atgtcyt 17

<210> 108

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 108

gatggcagcw gcycaaag 18

<210> 109

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 109

ctatcaaggt gtgcattgt 19

<210> 110

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 110

cttttaaaag wtgtccagkg t 21

<210> 111

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 111

gtgacagtcc ttcctggtag 20

<210> 112

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 112

cttcctgatg gcagtggtt 19

<210> 113

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 113

gctacaggta tccaatcc 18

<210> 114

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 114

gcgtctagaa yctccacaca caggrrccag tggatagac 39

<210> 115

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 115

ctgwtgttct ggattcctg 19

<210> 116

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 116

ggtcagacag tcagcagt 18

<210> 117

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 117

gtgctctgga ttcgggaa 18

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 118

cagcttcytg ctaatcagtg 20

<210> 119

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 119

ctaatcagtg cttcagga 18

<210> 120

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 120

gtgggtatct ggtrcstgtg 20

<210> 121

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 121

ggaaatttaa aagtacctgt ggg 23

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 122

ggtttcmagg trccagatgt 20

<210> 123

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 123

ctctggttyc caggtatc 18

<210> 124

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 124

ctgttttcaa ggtrccagat gt 22

<210> 125

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 125

gttgtaatgt ccagagga 18

<210> 126

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 126

cttacaggtg ccagatgt 18

<210> 127

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 127

ctcaattgta grtgccagat gt 22

<210> 128

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 128

cacagtaggt gtcagatgt 19

<210> 129

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 129

gtcgtagttg tcagatgt 18

<210> 130

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 130

cctccttctt ggccaaga 18

<210> 131

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 131

cttatatgga gctgatggg 19

<210> 132

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 132

gtgtctggtg ctcatggg 18

<210> 133

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 133

ctstggttgt ctggtgttga 20

<210> 134

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 134

gtctctgatt ctagggca 18

<210> 135

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 135

ctkckctggg ttccag 16

<210> 136

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 136

gcaggtgttg acgga 15

<210> 137

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 137

caggtgcctc gtgcac 16

<210> 138

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 138

ctctggtgcc tgtgca 16

<210> 139

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 139

ctggaytyca gcctccaga 19

<210> 140

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 140

gwtctctrga gtcagtggg 19

<210> 141

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 141

ctggatccct ggakcyact 19

<210> 142

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 142

gttctgcttt ttaggtgtg 19

<210> 143

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 143

gatcccaggc atgatatgt 19

<210> 144

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 144

cttcatggtg ctcagtgt 18

<210> 145

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 145

ccatatcagg tgcccagtgt 20

<210> 146

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically synthesized oligonucleotide primer

<400> 146

gcgtctagaa ctggatggtg ggaagatgg 29

<210> 147

<211> 305

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe Cys Asn
1 5 10 15

Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala Gln Asn
20 25 30

Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp Ile Tyr
35 40 45

Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu
65 70 75 80

Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys
85 90 95

Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys
100 105 110

Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu Ile Val
115 120 125

Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe Gly Ile
130 135 140

Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr Ile Ala
145 150 155 160

Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val Gly Ala
165 170 175

Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr Gly Leu
180 185 190

Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His Tyr Tyr
195 200 205

Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala Ile Leu
210 215 220

Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu Ser Leu

225 230 235 240

Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile Ser Gly

245 250 255

Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr Met Lys

260 265 270

Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys Ala Val

275 280 285

Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met Asn Asp

290 295 300

Glu

305