



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0079393  
(43) 공개일자 2023년06월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)  
C07K 16/30 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/2803 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7013292
- (22) 출원일자(국제) 2021년09월28일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년04월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2021/121314
- (87) 국제공개번호 WO 2022/063316  
국제공개일자 2022년03월31일
- (30) 우선권주장  
PCT/CN2020/118320 2020년09월28일 중국(CN)

- (71) 출원인  
상하이 헨리우스 바이오테크, 인크.  
중국 201210 상하이 푸둥 디스트릭트 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 강난 로드 넘버 222 콤플렉스 빌딩 룸 330  
상하이 헨리우스 바이오파마슈티칼 컴퍼니 리미티드  
중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드 넘버 1289 빌딩 1 (빌딩 디)  
상하이 헨리우스 바이올로지스 컴퍼니 리미티드  
중국 201616 상하이 송지양 디스트릭트 덩유안 로드 라인 618 넘버 1 빌딩 29 룸 617
- (72) 발명자  
왕, 진-탕  
중국 200233 상하이 슈후이 디스트릭트 홍메이 로드 넘버1801 존 에이 이노브 타워 9/에프  
첵, 치-링  
중국 200233 상하이 슈후이 디스트릭트 홍메이 로드 넘버1801 존 에이 이노브 타워 9/에프  
지양, 웨이-동  
중국 200233 상하이 슈후이 디스트릭트 홍메이 로드 넘버1801 존 에이 이노브 타워 9/에프
- (74) 대리인  
양영준, 이상영

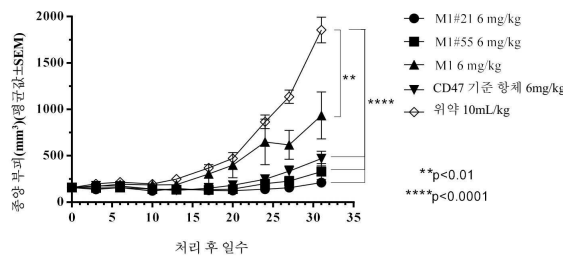
전체 청구항 수 : 총 69 항

(54) 발명의 명칭 항 CD47 항체 및 사용 방법

(57) 요약

본 개시는 CD47(IAP, MER6 및 OA3라고도 함)에 결합하는 항체 및 항체 유도체 및 그 사용 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항 CD47 항체 또는 항체 유도체는 적혈구와의 결합이 저하된 것으로 나타난다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

**C07K 14/7051** (2013.01)

**C07K 16/30** (2013.01)

C07K 2317/21 (2013.01)

C07K 2317/515 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

1. CD47에 결합하는 항체, 상기 항체는:

a) 중쇄 가변 영역, 상기 중쇄 가변 영역은 다음을 포함하고:

(1) SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51 및 61 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3 개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR-H1;

(2) SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52 및 62 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3 개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 중쇄 가변영역 CDR-H2; 및

(3) SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53 및 63 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3 개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR-H3; 및

b) 경쇄 가변 영역, 상기 경쇄 가변 영역은 다음을 포함하고:

(1) SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54 및 64 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3 개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR-L1;

(2) SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55 및 65 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3 개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는, 경쇄 가변 영역 CDR-L2; 및

(3) SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56 및 66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3 개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR-L3;을 포함한다.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는  $1 \times 10^{-8}$  M 또는 더 낮은 KD로 CD47에 결합하는, 항체.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는  $5 \times 10^{-9}$  M 또는 더 낮은 KD로 CD47에 결합하는, 항체.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 약  $1 \times 10^{-11}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-8}$  M 사이의 KD로 CD47에 결합하는, 항체.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 약  $1 \times 10^{-10}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-8}$  M 사이의 KD로 CD47에 결합하는, 항체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 기준 항 CD47 항체와 교차 경쟁하는 것으로, 상기 기준 항 CD47 항체는:

a) (1) SEQ ID NO: 1에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 2에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 3에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 4에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 5에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 6에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열;

b) (1) SEQ ID NO: 11에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 12에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 13에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 14에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 15에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 16에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열;

c) (1) SEQ ID NO: 21에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 22에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 23에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 24에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 25에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 26에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열;

d) (1) SEQ ID NO: 31에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 32에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 33에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 34에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 35에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 36에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열;

e) (1) SEQ ID NO: 41에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 42에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 43에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 44에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 45에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 46에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열;

f) (1) SEQ ID NO: 51에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 52에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 53에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 54에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 55에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 56에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; 또는

g) (1) SEQ ID NO: 61에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 62에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 63에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 64에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 65에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 66에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열;을 포함하는, 항체.

## 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 다음을 포함하는 것으로:

a) CDR-H1 도메인, CDR-H2 도메인 및 CDR-H3 도메인을 포함하는 중쇄 가변 영역; 상기 CDR-H1 도메인, 상기 CDR-H2 도메인 및 상기 CDR-H3 도메인은 기준 중쇄 가변 영역에 포함되는 CDR-H1 도메인, CDR-H2 도메인 및 CDR-H3 도메인을 각각 함유하고, 상기 기준 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57 및 67로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 및

b) CDR-L1 도메인, CDR-L2 도메인 및 CDR-L3 도메인을 포함하는 경쇄 가변 영역; 상기 CDR-L1 도메인, 상기 CDR-L2 도메인 및 상기 CDR-L3 도메인은 기준 경쇄 가변 영역에 포함되는 CDR-L1 도메인, CDR-L2 도메인 및 CDR-L3 도메인을 각각 함유하고, 상기 기준 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58 및 68로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

## 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는: (1) SEQ ID NO: 1에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 2에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 3에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 4에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 5에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ



**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:7에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:8에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

**청구항 16**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:17에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:18에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

**청구항 17**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:27에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:28에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

**청구항 18**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:37에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:38에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

**청구항 19**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:47에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:48에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

**청구항 20**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:57에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:58에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

**청구항 21**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 상기 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:67에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 상기 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO:68에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

**청구항 22**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 인간 프레임을 포함하는, 항체.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 인간 항체인, 항체.

**청구항 24**

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 전장 면역글로불린, 단쇄 Fv(scFv) 프래그먼트, Fab 프래그먼트, Fab' 프래그먼트, F(ab')<sub>2</sub>, Fv 프래그먼트, 이항화 결합 안정화 Fv 프래그먼트(dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, Fv-Fc 융합체, scFv-Fc 융합체, scFv-Fv 융합체, 이중항체, 삼중항체, 사중항체 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 항체.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 Fc 영역을 포함하는, 항체.

**청구항 26**

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 인간 Fc 영역을 포함하는, 항체.

**청구항 27**

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함하는, 항체.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함하는, 항체.

**청구항 29**

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 IgG1 Fc 영역을 포함하는, 항체.

**청구항 30**

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역을 포함하는, 항체.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 상기 IgG4 Fc 영역은 S228P의 돌연변이를 포함하는, 항체.

**청구항 32**

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 C말단 라이신을 포함하는, 항체.

**청구항 33**

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역은 C말단 라이신의 결실을 포함하는, 항체.

**청구항 34**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 다중특이적 항체, 예를 들어 이중특이적 항체에 포함되며, 상기 다중특이적 항체는 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항체 부분을 포함하는, 항체.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 상기 제2 항원은 종양 관련 항원인, 항체.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 상기 종양 관련 항원은 Her-2, EGFR, PDL1, MSLN, c-Met, B세포 성숙 항원(BCMA), 탄산무수화효소IX(CA1X), 암배아항원(CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, CD276(B7H3), 상피 당단백질(EGP2), 영약막 세포 표면 항원 2(TROP-2), 상피 당단백질-40(EGP-40), 상피세포 부착 분자(EpCAM), 수용체 타이로신 단백질 키나아제 erb-B2, 3, 4, 엽산 결합 단백질(FBP), 태아 아세틸콜린 수용체(AChR), 엽산 수용체-a, 강글리오시드 G2(GD2), 강글리오시드 G3(GD3), 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 키나아제 삽입 도메인 수용체(KDR), Lewis A(CA 1.9.9), Lewis Y(LeY), 글리피칸-3(GPC3), L1 세포 부착 분자(L1CAM), 뮤신 16(Muc-16), 뮤신 1(Muc-1), NG2D 리간드, 암 배아 항원(h5T4), 전립선 줄기세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막항원(PSMA), 종양 관련 당단백질 72(TAG-72), 클라우딘 18.2 (CLDN18.2), 혈관 내피 성장 인자 R2(VEGF-R2), 빌름스(Wilms) 종양 단백질(WT-1), 1형 타이로신 단백질 키나아제 막관통 수용체(ROR1), PVR, PVRL2 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 상기 제2 항원은 면역 체크포인트 조절제인, 항체.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 조절제는 TIGIT, PD1, CTLA4, LAG-3, 2B4, BTLA 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체.

**청구항 39**

제36항에 있어서, 상기 제2 항원은 면역 공동자극 분자 또는 T세포 수용체/CD3 복합물의 서브유닛인, 항체.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 상기 면역 공동자극 분자는 CD28, ICOS, CD27, 4-1BB, OX40 및 CD40 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체.

**청구항 41**

제39항에 있어서, 상기 T세포 수용체/CD3 복합물의 서브유닛은 CD3  $\gamma$ , CD3  $\delta$ , CD3  $\epsilon$  및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체.

**청구항 42**

치료제 또는 표지에 연결되는 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하는 면역접합체.

**청구항 43**

제42항에 있어서, 상기 치료제는 세포 독소 또는 방사성 동위원소인, 면역접합체.

**청구항 44**

제42항에 있어서, 상기 표지는 방사성 동위원소, 형광 염료 및 효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역접합체.

**청구항 45**

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인을 함유하는 키메라 항원 수용체(CAR).

**청구항 46**

제45항에 있어서, 상기 항체는 scFv인, CAR.

**청구항 47**

제45항 또는 제46항에 따른 CAR을 포함하는 면역 응답 세포.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 상기 면역 응답 세포는 T세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포 독성 T 림프구(CTL), 조절성 T세포, 자연 살해 T(NKT) 세포 및 골수 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 면역 응답 세포.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 상기 면역 응답 세포는 T세포인, 면역 응답 세포.

**청구항 50**

a) 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 항체, 제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체 또는 제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 따른 면역 응답 세포, 및 b) 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약물 조성물.

**청구항 51**

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 항체를 인코딩하는, 핵산.

**청구항 52**

제51항에 따른 핵산을 포함하는, 벡터.

**청구항 53**

제51항에 따른 핵산 또는 제52항에 따른 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

**청구항 54**

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 항체를 제조하는 방법, 상기 방법은 제53항에 따른 숙주 세포에서 상기 항체를 발현시키는 단계, 및 상기 숙주 세포로부터 상기 항체를 분리하는 단계를 포함한다.

**청구항 55**

피시험자의 종양 부하를 감소시키는 방법, 상기 방법은, 상기 피시험자에게 유효량의 제1항 내지 제41항에 따른 항체, 제42항 내지 제44항에 따른 면역접합체 또는 제50항에 따른 약물 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

**청구항 56**

제55항에 있어서, 상기 방법은 종양 세포의 수를 감소시키는, 방법.

**청구항 57**

제55항 또는 제56항에 있어서, 상기 방법은 종양의 크기를 감소시키는, 방법.

**청구항 58**

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 피시험자의 종양을 근절시키는, 방법.

**청구항 59**

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막육종, 흉선암, 자궁내막암, 위종양, 담관암, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 60**

증식물을 치료 및/또는 예방하는 방법, 상기 방법은, 상기 피시험자에게 유효량의 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 항체, 제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체 또는 제50항에 따른 약물 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

**청구항 61**

증식물을 앓고 있는 피시험자의 생존기간을 연장하는 방법, 상기 방법은, 상기 피시험자에게 유효량의 제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 항체, 제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체 또는 제50항에 따른 약물 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

**청구항 62**

제60항 또는 제61항에 있어서, 상기 증식물은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막육종, 흉선암, 자궁내막암, 위종양, 담관암, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 63**

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 약물로서 사용되는, 항체.

**청구항 64**

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 암 치료용으로 사용되는, 항체.

**청구항 65**

제50항에 있어서, 상기 약물 조성물은 약물로서 사용되는, 약물 조성물.

**청구항 66**

제50항에 있어서, 상기 약물 조성물은 암 치료용으로 사용되는, 약물 조성물.

**청구항 67**

제64항에 따른 항체 또는 제66항에 따른 약물 조성물에 있어서, 상기 암은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막육종, 흉선암, 자궁내막암, 위종양, 담관암, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항체 또는 약물 조성물.

**청구항 68**

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 따른 항체, 제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 면역접합체, 제50항에 따른 약물 조성물, 제51항에 따른 핵산, 제52항에 따른 벡터 또는 제47항 내지 제49항에 따른 면역 응답 세포를 포함하는, 키트.

**청구항 69**

제68항에 있어서, 상기 키트는 증식물 치료용 및/또는 예방용 서면 설명서를 또한 포함하는, 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원의 상호참조**

[0002] 본 출원은 2020년 9월 28일에 제출한 국제특허출원 번호 PCT/CN2020/118320에 대한 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합되며, 그 우선권을 주장하는 바이다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 개시는 CD47을 결합하는 항체 및 항체 유도체 및 그 사용 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0005] CD47(IAP, MER6 및 OA3이라고도 함)이 막 수용체로서, 세포의 N말단 도메인, 5개의 막통과 도메인 및 C말단 세포내 꼬리부를 갖는다. 이는 다양한 막 인테그린과 두 종류의 가용성 리간드, 즉 트롬보스폰딘-1(TSP-1) 및 신호 조절 단백질 α(SIRP α)에 결합한다. CD47은 아포토시스, 증식, 부착 및 이동을 비롯한 다양한 세포 과정에 관여한다. 또한, 면역 및 혈관생성 반응에서 관건적인 역할을 한다. 구체적으로, CD47은 대식세포에 보낸 "나를 먹지 마세요" 신호로 기능하고, 생리학적 조건에서 비악성 세포의 면역 관용을 유지하는 데 도움이 된다. 광범위한 종양 세포가 이와 같은 면역 억제 신호 전달 분자를 과발현하여, 이러한 종양세포의 생존에 기여한다. 면역 조절에서 CD47의 중요한 역할을 고려하면, 면역요법 및 암 치료를 위해 CD47을 표적으로 하는 치료 분자 및 방법을 개발할 필요가 당업계에 존재한다.

**발명의 내용**

[0006] 본 개시는 고친화력으로 CD47에 특이적으로 결합하는 분리된 단클론 항체 및 항체 유도체를 제공하는 것으로, 이는 단일특이적 항 CD47 항체, 및 CD47 및 하나 이상의 별도의 타겟에 결합하는 다중특이적 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체는 CD47에 결합하는 전장 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체는 CD47에 결합하는 scFv를 포함한다. 본 개시는 예를 들어 암과 같은 질환 및 병증의 치료를 위한, 본원에 개시된 항체 및 항체 유도체, 및 이를 포함하는 약물 조성물의 제조 및 사용 방법을 또한 제공한다. 본 발명은 CD47에 결합하는 신규 항체에 대한 발견에 부분적으로 기반하는

것으로, 이러한 신규 항체는 종양세포를 표적으로 하며 및/또는 종양세포에 대한 면역 응답을 증가하되, 정상세포(예컨대, 적혈구)에 대한 결합 및/또는 독성은 낮출 수 있다.

[0007] 본 개시는 CD47에 결합하는 항체를 제공하는 것으로, 해당 항체는: a) (1) SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51 및 61 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR-H1; (2) SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52 및 62 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR-H2; 및 (3) SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53 및 63 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR-H3;을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 b) (1) SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54 및 64 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR-L1; (2) SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55 및 65 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR-L2; 및 (3) SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56 및 66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR-L3;을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0008] 일부 실시양태에서, 항체는  $1 \times 10^{-8}$ M 또는 더 낮은 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는  $5 \times 10^{-9}$ M 또는 더 낮은 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-11}$ M 내지 약  $1 \times 10^{-8}$ M 사이의 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-10}$ M 내지 약  $1 \times 10^{-8}$ M 사이의 KD로 CD47에 결합한다.

[0009] 일부 실시양태에서, 항체는 기준 항 CD47 항체와 교차 경쟁하는 것으로, 상기 기준 항 CD47 항체는: a) (1) SEQ ID NO: 1에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 2에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 3에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 4에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 5에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 6에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; b) (1) SEQ ID NO: 11에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 12에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 13에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 14에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 15에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 16에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; c) (1) SEQ ID NO: 21에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 22에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 23에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 24에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 25에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 26에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; d) (1) SEQ ID NO: 31에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 32에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 33에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 34에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 35에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 36에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; e) (1) SEQ ID NO: 41에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 42에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 43에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 44에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 45에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 46에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; f) (1) SEQ ID NO: 51에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 52에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 53에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 54에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 55에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 56에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; 또는 g) (1) SEQ ID NO: 61에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 62에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 63에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 64에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 65에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및



SEQ ID NO: 28에 제시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 37에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 38에 제시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 47에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 48에 제시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 57에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 58에 제시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 67에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 68에 제시되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 항체는 인간 프레임워크를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 전장 면역글로불린, 단쇄 Fv(scFv) 프래그먼트, Fab 프래그먼트, Fab' 프래그먼트, F(ab')<sub>2</sub>, Fv 프래그먼트, 이황화 결합 안정화 Fv 프래그먼트(dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, Fv-Fc 융합체, scFv-Fc 융합체, scFv-Fv 융합체, 이중항체, 삼중항체, 사중항체 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 항체는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG4 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG4 Fc 영역은 S228P의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 C말단 라이신을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 C말단 라이신의 결실을 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 항체는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)에 포함되며, 해당 다중특이적 항체는 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항체 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 종양 관련 항원이다. 일부 실시양태에서, 종양 관련 항원은 Her-2, EGFR, PDL1, MSLN, c-Met, B세포 성숙 항원(BCMA), 탄산무수화효소IX(CA1X), 암배아항원(CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, CD276(B7H3), 상피 당단백질(EGP2), 영약막 세포 표면 항원 2(TROP-2), 상피 당단백질-40(EGP-40), 상피세포 부착 분자(EpCAM), 수용체 타이로신 단백질 키나아제 erb-B2, 3, 4, 엽산 결합 단백질(FBP), 태아 아세틸콜린 수용체(AChR), 엽산 수용체-a, 강글리오시드 G2(GD2), 강글리오시드 G3(GD3), 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 키나아제 삽입 도메인 수용체(KDR), Lewis A(CA 1.9.9), Lewis Y(LeY), 글리코판-3(GPC3), L1 세포 부착 분자(L1CAM), 뮤신 16(Muc-16), 뮤신 1(Muc-1), NG2D 리간드, 암 배아 항원(h5T4), 전립선 줄기세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막항원(PSMA), 종양 관련 당단백질 72(TAG-72), 클라우딘 18.2 (CLDN18.2), 혈관 내피 성장 인자 R2(VEGF-R2), 빌름스(Wilms) 종양 단백질(WT-1), 1형 타이로신 단백질 키나아제 막관통 수용체(ROR1), PVR, PVRL2 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 면역 체크포인트 조절제이다. 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 조절제는 TIGIT, PD1, CTLA4, LAG-3, 2B4, BTLA 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 면역 공동자극 분자 또는 T세포 수용체/CD3 복합물의 서브유닛이다. 일부 실시양태에서, 면역 공동자극 분자는 CD28, ICOS, CD27, 4-1BB, OX40 및 CD40 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, T세포 수용체/CD3 복합물의 서브유닛은 CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0017] 본 개시는 면역접합체를 제공하는 것으로, 해당 면역접합체는 치료제 또는 표지에 연결된 본원에 개시된 임의의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료제는 세포 독소 또는 방사성 동위원소이다. 일부 실시양태에서, 표지는 방사성 동위원소, 형광 염료 및 효소로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0018] 본 개시는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공하는 것으로, 해당 CAR은 본원에 개시된 항체를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인을 함유한다. 일부 실시양태에서, 항체는 scFv이다.

[0019] 본 개시는 면역 응답 세포를 공개한 것으로, 해당 면역 응답 세포는 본원에 개시된 CAR을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역 응답 세포는 T세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포 독성 T 림프구(CTL), 조절성 T세포, 자연 살해 T(NKT) 세포 및 골수 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 면역 응답 세포는 T세포이다.

- [0020] 본 개시는 또한 약물 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 약물 조성물은 a) 본원에 개시된 항체, 면역접합체 또는 면역 응답 세포, 및 b) 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.
- [0021] 본 개시는 또한 본원에 개시된 임의의 항체를 인코딩하는 핵산, 본원에 개시된 임의의 핵산을 포함하는 벡터, 및 본원에 개시된 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0022] 본 개시는 본원에 개시된 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 해당 방법은 본원에 개시된 숙주 세포에서 항체를 발현시키는 단계, 및 해당 숙주 세포로부터 해당 항체를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0023] 본 개시는 또한 피시험자의 종양 부하를 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 해당 방법은 피시험자에게 유효량의 본원에 개시된 항체, 면역접합체 또는 약물 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 해당 방법은 종양세포의 수를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 해당 방법은 종양의 크기를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 해당 방법은 피시험자의 종양을 근절시킨다. 일부 실시양태에서, 종양은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막육종, 흉선암, 자궁내막암, 위종양, 담관암, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0025] 본 개시는 또한 피시험자의 증식물을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 해당 방법은 피시험자에게 유효량의 본원에 개시된 항체, 면역접합체 또는 약물 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0026] 본 개시는 또한 증식물 질환을 앓고 있는 피시험자의 생존기간을 연장하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 해당 방법은 피시험자에게 유효량의 본원에 개시된 항체, 면역접합체 또는 약물 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 증식물은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막육종, 흉선암, 자궁내막암, 위종양, 담관암, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0028] 본 개시는 약물로 사용되는 본원에 개시된 임의의 항체를 제공한다. 본 개시는 또한 암 치료용으로 사용되는 본원에 개시된 임의의 항체를 제공한다. 본 개시는 또한 약물로 사용되는 본원에 개시된 약물 조성물을 제공한다. 본 개시는 또한 암 치료용으로 사용되는 본원에 개시된 약물 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 암은 중피종, 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 결장암, 흉막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 활막육종, 흉선암, 자궁내막암, 위종양, 담관암, 두경부암, 혈액암 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0029] 본 개시는 본원에 개시된 항체, 면역접합체, 약물 조성물, 핵산, 벡터 또는 면역 응답 세포를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 키트는 증식물 치료용 및/또는 예방용 서면 설명서를 포함한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0030] 도 1은 항 CD47 항체의 CD47 결합 능력을 도시하였다. 유세포 분석을 통해 네이브 파지 라이브러리(naive phage library)로부터 선택한 항체와 Raji 세포(B세포 림프종)의 결합을 측정한다. 항 CD47 기준 항체(마그롤리맵(magrolimab) 유사체)를 양성 대조군으로 사용한다. IgG 이소형 대조(항PD1 항체)를 음성 대조군으로 사용한다.
- 도 2A 및 도 2B는 클론 M1 변이체와 종양세포 및 정상세포의 CD47 결합 능력을 도시하였다. 도 2A는 M1 변이체의 Jurkat(인간 백혈병 세포주)와의 전체 세포 결합을 도시하였다. 도 2B는 M1 변이체의 적혈구 세포(RBC)와의 전체 세포 결합을 도시하였다. 항 CD47 기준 항체(마그롤리맵 유사체)를 양성 대조군으로 사용한다. 베바시주맵(항 VEGF-A 항체)을 음성 대조군으로 사용한다.
- 도 3A 내지 도 3B는 M1 고정 영역 변이체와 종양세포 및 정상세포의 전체 세포 결합 능력을 도시하였다. 고정 영역 수식을 갖는 M1 변이체의 Jurkat 세포(3A) 및 RBC(3B)와의 결합을 측정한다. 항 CD47 기준 항체(마그롤리맵 유사체)를 양성 대조군으로 사용한다. 트라스투주맵(항 HER2 항체)을 음성 대조군으로 사용한다.
- 도 4는 클론 M1 변이체가 인간 SIRP α와 CD47의 결합에 대한 차단을 도시하였다. 유세포 분석을 통해 항 CD47 항체가 인간 SIRP α와 CD47을 발현하는 Raji 세포의 결합에 대한 차단 능력을 측정한다. 항 CD47 기준 항체(마그롤리맵 유사체)를 양성 대조군으로 사용한다. IgG 이소형 대조(항PD1 항체)를 음성 대조군으로 사용한다. 항 CD47 단클론 항체가 인간 SIRP α와 CD47을 발현하는 Jurkat 세포의 결합을 차단하는 것은 염색된 평균 형광강도(MFI)를 통해 측정된 바와 같다.
- 도 5는 선택된 항체 클론의 혈액 응고 반응 활성을 도시하였다. 연속 희석된 클론 M1 및 그 변이체가 유도한 적

혈구 세포(RBC)의 응집을 나타냈다. 항 CD47 기준 항체(마그놀리맵 유사체)를 양성 대조군으로 사용한다. IgG 이소형 대조(항PD1 항체)를 음성 대조군으로 사용한다.

도 6A 내지 6D는 대식세포에 의해 매개된 Jurkat 세포 및 적혈구(RBC)에 대한 식균 과정 중 M1 변이체의 작용을 도시하였다. Jurkat 세포 또는 RBC를 CFSE로 표지하고, 연속 희석된 M1 변이체, 항 CD47 기준 항체 또는 이소형 대조군 항체(항 PD1 항체)와 함께 인큐베이션한다. 항체-Jurkat 혼합물을 Raw264.7(6A) 또는 PBMC 유래 대식세포(6C)와 함께 인큐베이션한다. 항체-RBC 혼합물을 Raw264.7(6B) 또는 PBMC 유래 대식세포(6D)와 함께 인큐베이션한다. 2시간 후, 식균 능력을 확인하기 위해 유세포 분석기를 통해 대식세포를 분석한다. 식균 능력은 총 F4/80+ 세포 중 CFSE+ F4/80+ 세포의 백분율 또는 총 CD14+ 세포 중 CFSE+ CD14+ 세포의 백분율로 표시한다. (6A) 및 (6C)에 도시된 바와 같이, M1 변이체는 Jurkat에 대한 식균을 유도한다. (6B) 및 (6D)에 도시된 바와 같이, M1 변이체는 RBC에 대한 식균을 유도하지 않는다.

도 7은 WiDr(인간 결장암) 이종이식 종양 모델에서의 M1 변이체의 항종양 활성을 도시하였다. NOD-SCID 마우스(n=8마리/그룹)에 WiDr을 피하 이식한다. 각 항체의 제1 용량은 종양 접종 7일 후 복강 내 투여한다. 이식된 마우스는 3주 동안 주 2회에 걸쳐 항체로 복강 내 치료를 진행한다. 모든 데이터 포인트는 평균값±SEM이다.

도 8은 NCI-H82(인간 소세포 폐암) 이종이식 종양 모델에서 M1 변이체의 항종양 활성을 도시하였다. NOD-SCID 마우스(n=8마리/그룹)에 NCI-H82 세포를 피하 이식한다. 각 항체의 제1 용량은 종양 접종 7일 후 투여한다. 이식된 마우스는 지정된 시간에 항체로 복강 내 치료를 진행한다. 종양 성장 곡선에서 모든 데이터 포인트는 평균 값±SEM이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0031] 본 개시는 고친화력으로 CD47에 특이적으로 결합하는 분리된 단클론 항체 및 항체 유도체를 제공하는 것으로, 이는 단일특이적 항 CD47 항체, 및 CD47 및 하나 이상의 별도의 타겟에 결합하는 다중특이적 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체는 CD47에 결합하는 전장 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체는 CD47에 결합하는 scFv를 포함한다. 본 개시는 예를 들어 암과 같은 질환 및 병증의 치료를 위한, 본원에 개시된 항체 및 항체 유도체, 및 이를 포함하는 약물 조성물의 제조 및 사용 방법을 또한 제공한다. 본 발명은 CD47에 결합하는 신규 항체에 대한 발견에 부분적으로 기반하는 것으로, 이러한 신규 항체는 종양세포를 표적으로 하며 및/또는 종양세포에 대한 면역 응답을 증가하되, 정상세포(예컨대, 적혈구)에 대한 결합 및/또는 오프 타겟 효과를 낮출 수 있다.

[0032] 제한이 아닌 명확성을 위해, 현재 개시된 주제의 구체적인 실시형태는 이하 섹션으로 구분된다.

- [0033] 1. 정의;
- [0034] 2. 항체 및 항체 유도체;
- [0035] 3. 사용 방법;
- [0036] 4. 약물 제제; 및
- [0037] 5. 제품.

[0038] 1. 정의

[0039] 본원에 언급된 바와 같은 용어인 "항체"는 전장 항체 및 그 임의의 항원 결합 프래그먼트(즉, 항체 프래그먼트)를 포함한다. "항체"는 독립된 분자 또는 항체 유도체의 일부일 수 있다. 예시적인 항체 유도체는 다기능 항체(예를 들어, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)), 항원 식별 수용체(예를 들어, 키메라 항원 수용체), 별도의 단백질 또는 비단백질 부분을 포함하는 항체 접합체(예를 들어, 항체-약물 접합체 또는 중합체 피복된 항체) 및 항체를 포함하는 기타 다기능 분자를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0040] "전장 항체", "온전 항체" 및 "전 항체"란 천연 항체와 구조가 유사하거나 또는 본원에 정의된 바와 같은 Fc 영역의 중쇄를 포함하는 항체를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 전장 항체는 두 개의 중쇄와 두 개의 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 각각 "VH" 및 "VL"이라 할 수 있다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 모두 통상적으로 세 개의 높이가 달라질 수 있는 고리를 함유하는데, 상보 결정 영역(CDR)(LC-CDR1, LC-CDR2 및 LC-CDR3을 포함하는 경쇄(LC) CDR; HC-CDR1, HC-CDR2 및 HC-CDR3을 포함하는 중쇄(HC) CDR)이라 한다. 본원에 개시된 항체 및 항원 결합 프래그먼트의 CDR 경계는 하기에 기재된 Kabat, Chothia, MacCallum, IMGT 및 AHo와 같은 공지의 관례를 통해 정의 또는 감정할

수 있다. 중쇄 또는 경쇄의 3개의 CDR은 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 측면 세그먼트 사이에 삽입되고, 이들 프레임워크는 CDR보다 더 보존되고, 추가 변 고리를 지원하는 스캐폴드를 형성하였다. 중쇄 및 경쇄의 고정 영역은 항원 결합에 관여하지 않지만, 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체 중쇄 고정 영역의 아미노산 서열에 따라 항체를 분류한다. 항체의 다섯 가지 주요 유형 또는 이소형은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM인 것으로,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$  중쇄가 존재한다는 것을 각각의 특징으로 한다. 주요 항체 유형 중 몇 가지는 IgG1( $\gamma$ 1 중쇄), IgG2( $\gamma$ 2 중쇄), IgG3( $\gamma$ 3 중쇄), IgG4( $\gamma$ 4 중쇄), IgA1( $\alpha$ 1 중쇄) 또는 IgA2( $\alpha$ 2 중쇄)와 같은 하위 유형으로 분류된다. 일부 실시양태에서, 전장 항체는 글리코실화된 것이다. 일부 실시양태에서, 전장 항체는 Fc 영역과 연결된 글리칸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 전장 항체는 분지형 글리칸을 포함한다.

[0041] 본원에 사용된 바와 같이, 용어인 항체의 "항원 결합 부분", "항체 프래그먼트" 및 "항체 부분"이란 항체의 항원과의 특이적 결합 능력을 보유하는 하나 이상의 프래그먼트를 가리킨다. 항체의 항원 결합 능력은 전장 항체의 프래그먼트를 통해 실현될 수 있음이 이미 표명되었다. 항체 프래그먼트의 예시로는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, 이중항체, 선형 항체, 단쇄 항체 분자(예를 들어, scFv 및 scFv-Fc), 단일 도메인 항체, VHH, VHH-Fc, 나노항체, 도메인 항체, 2가 도메인 항체 또는 항원에 결합하는 항체의 임의의 기타 프래그먼트 또는 그 조합을 포함하나 이에 한정되지 않는다. "VHH"는 낙타과 동물로부터 분리된 단일 도메인 항체를 가리킨다. 일부 실시양태에서, VHH는 낙타과 중쇄 항체의 중쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, VHH는 약 25kDa를 초과하지 않는 크기를 갖는다. 일부 실시양태에서, VHH는 약 20kDa를 초과하지 않는 크기를 갖는다. 일부 실시양태에서, VHH는 약 15kDa를 초과하지 않는 크기를 갖는다.

[0042] 기준 항체와 "교차 경쟁하여 결합하는 항체"란 경쟁 측정에서 기준 항체와 그 항원의 결합을 50% 이상 차단하는 항체를 가리키는 것으로, 거꾸로 말하면, 기준 항체는 경쟁 측정에서 항체와 그 항원의 결합을 50% 이상 차단한다. 예시적 경쟁 측정에 대해서는 Antibodies [항체], Harlow 및 Lane(뉴욕주 콜드 스프링 하버 실험실 출판사(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY))에 기재되어 있다.

[0043] "Fv"는 온전한 항원 식별 부위와 항원 결합 부위를 함유하는 최소 항원 프래그먼트이다. 해당 프래그먼트는 긴 밀한 비공유 결합에 의한 하나의 중쇄 가변 영역과 하나의 경쇄 가변 영역의 이합체로 구성된다. 이 두 도메인은 폴딩된 후 여섯 개의 추가 변 고리(중쇄 및 경쇄에 각각 3개 고리)를 생성하여, 항원 결합에 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 설령 단일 가변 도메인(또는 3개의 항원 특이적 CDR만 포함하는 반개의 Fv)도 항원을 식별하고 결합할 수 있지만, 때로는 그 친화력이 전체 결합 부위보다 낮다.

[0044] "단쇄 Fv"("sFv" 또는 "scFv"라고도 약칭됨)는 단일 폴리펩티드 사슬로 연결된 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 항체 도메인을 포함하는 항체 프래그먼트이다. 일부 실시양태에서, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조가 형성되도록 하는 V<sub>H</sub>와 V<sub>L</sub> 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 더 포함한다. scFv에 대한 총론은 Plueckthun의 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies [단클론 항체의 약리학], 제113권, Rosenberg 및 Moore 편집, 뉴욕 스프링거 출판사(Springer-Verlag, New York), 제269-315페이지 (1994)를 참조한다.

[0045] 본원의 목적을 위해, "수용체 인간 프레임워크" 또는 "인간 프레임워크"는 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공유 프레임워크로부터 유래된 경쇄 가변 도메인(VL) 프레임워크 또는 중쇄 가변 도메인(VH) 프레임워크를 포함하는 아미노산 서열의 프레임워크이다. 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공유 프레임워크로부터 "유래된" 수용체 인간 프레임워크는 그와 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 아미노산 서열 변화를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변화의 수는 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하 또는 2개 이하이다. 일부 실시양태에서, VL 수용체 인간 프레임워크와 VL 인간 면역 글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 공유 프레임워크 서열은 서열이 동일하다.

[0046] "친화력"은 분자(예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너(예를 들어, 항원) 사이의 비공유 상호작용의 강도 총합을 가리킨다. 별도로 설명되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이, "결합 친화력"은 결합 쌍(예를 들어, 항체와 항원) 구성원 간의 1:1 상호작용을 반영하는 내부 결합 친화력을 가리킨다. 분자 X의 그 파트너인 Y에 대한 친화력은 통상적으로 해리 상수(KD)로 표현될 수 있습니다. 친화력은 본 분야에 공지된 일반적인 방법(본원에 기재된 방법 포함)에 의해 측정될 수 있다. 이하, 결합 친화력을 측정하기 위한 구체적이고 예시적인 실시양태를 설명할 것이다.

[0047] "친화력이 성숙된" 항체란 모항체와 비교하여, 하나 이상의 CDR 또는 추가 변 영역(HVR)에서 하나 이상의 변화를 갖는 항체를 가리키며, 해당 모항체는 이와 같은 변화를 갖지 않으며, 이러한 변화는 항체로 하여금 항원에 대한 친화력을 향상시키도록 한다.

- [0048] 본원에 사용된 바와 같이, "CD47", "CD47 단백질" 또는 "CD47 폴리펩티드"란 임의의 척추 동물 유래(예를 들어 영장류 동물(예를 들어, 인간 및 사이노몰구스 원숭이)과 같은 포유동물 포함)의 임의의 CD47 폴리펩티드 또는 그 임의의 프래그먼트를 가리키며, 최대 1개, 최대 2개, 최대 3개, 최대 4개, 최대 5개, 최대 6개, 최대 7개, 최대 8개, 최대 9개 또는 최대 10개의 아미노산의 치환, 추가 및/또는 결실을 선택적으로 포함할 수 있다. 해당 용어는 가공되지 않는 전장 CD47 및 세포 내에서의 가공으로 인해 생성된 임의 형식의 CD47을 망라한다. 해당 용어는 또한 천연적으로 존재하는 CD47의 변이체, 예를 들어 스플라이스 변이체 또는 대립유전자 변이체를 망라한다. 일부 실시양태에서, CD47 폴리펩티드는 NCBI 기준 번호가 NP\_001768.1, NP\_942088.1 또는 NP\_001369235.1인 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 100%의 동원성 또는 동일성을 갖는 아미노산 서열(본원에서의 동원성은 BLAST 또는 FASTA와 같은 표준 소프트웨어를 사용하여 측정 가능)을 포함하거나 또는 갖는다. 일부 실시양태에서, CD47 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 103의 전체 또는 연속 부분의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 갖는다.
- [0049] 용어 "CD47의 ECD"란 CD47의 세포외 도메인을 가리킨다. 일부 실시양태에서, CD47의 세포외 도메인은 CD47의 N 말단 세포외 도메인이다. 일부 실시양태에서, 예시적 CD47 폴리펩티드의 N말단 ECD는 SEQ ID NO: 104에 제시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0050] 용어 "항 CD47 항체" 및 "CD47이 결합된 항체"란 해당 항체가 CD47을 표적으로 하는 진단제 및/또는 치료제로 사용될 수 있도록 충분한 친화력으로 CD47에 결합할 수 있는 항체를 가리킨다. 일 실시양태에서, BIACORE<sup>®</sup> 표면 플라즈몬 공명 분석을 통해 측정된 바와 같이, 항 CD47 항체는 관련 없는 비 CD47 단백질과의 결합 정도는 해당 항체의 CD47와의 결합의 약 10%보다 작은 것이다. 일부 실시양태에서, CD47이 결합된 항체는 <약 1 μM, <약 100nM, <약 10nM, <약 1nM, <약 0.1nM, <약 0.01nM 또는 <약 0.001nM(예를 들어, 10<sup>-8</sup>M이하, 예를 들어 10<sup>-8</sup>M 내지 10<sup>-12</sup>M, 예를 들어, 10<sup>-9</sup>M 내지 10<sup>-10</sup>M)의 해리상수(KD)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 서로 다른 물종 유래의 CD47 중 보존된 CD47 에피토프에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 단백질의 ECD 중 CD47에 있는 에피토프에 결합한다.
- [0051] 용어 "키메라" 항체란 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 공급원 또는 물종으로부터 유래되되, 중쇄 및/또는 경쇄의 나머지 부분은 서로 상이한 공급원 또는 물종으로부터 유래되는 항체를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 키메라 항체는 낙타과 중쇄 가변 영역 및 인간 Fc 영역을 포함한다.
- [0052] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "CDR" 또는 "상보적 결정 영역"은 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 영역 내의 비연속 항원 결합 부위를 가리키려고 한다. 이러한 특정 영역은 Kabat 등, J. Biol. Chem. [생물화학잡지], 252:6609-6616 (1977); Kabat 등, 미국 보건복지부, "Sequences of protein of immunological interest[면역학적 의미를 갖는 단백질 서열]"(1991); Chothia 등, J. Mol. Biol. [분자생물학잡지], 196:901-917(1987); Al-Lazikani B. 등, J. Mol. Biol. [분자생물학잡지] 273:927-948(1997), MacCallum 등, J.Mol.Biol. [분자생물학잡지], 262:732-745(1996), Abhinandan 및 Martin, Mol.Immunol. [분자면역학], 45:3832-3839 (2008), Lefranc M.P. 등, Dev.Comp.Immuno. [발전과 비교면역학], 27:55-77(2003); 및 Honegger 및 Plueckthun, J. Mol. Biol. [분자생물학잡지], 309:657-670(2001)에 이미 기재되었으며, 여기서 정의는 서로 비교할 때 폴딩되는 아미노산 잔기 또는 아미노산 잔기의 하위 집합이 포함된다. 하지만, 어느 한 정의를 응용하여 항체 또는 이식된 항체 또는 그 변이체의 CDR을 대신 지칭하는 것은, 본원에 정의되고 사용하는 용어의 범주에 속하는 것을 목적으로 한다. 대조를 위해 앞에 인용하는 참고 문헌 각각을 망라하여 정의하는 CDR의 아미노산 잔기는 아래 표 1에 나열되어 있다. CDR 예측 알고리즘 및 인터페이스는 당업계에 잘 알려져 있는 것으로, 예를 들어 Abhinandan 및 Martin, Mol.Immunol. [분자면역학], 45:3832-3839 (2008); Ehrenmann F. 등, Nucleic Acids Res. [핵산연구], 38:D301-D307 (2010); 및 Adolf-Bryfogle J. 등, Nucleic Acids Res. [핵산연구], 43:D432-D438 (2015)를 포함한다. 본 단락에 인용된 참조문헌의 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합되어, 본 출원에 사용되며 본원의 하나 이상의 청구항에 포함될 수 있다.

[0053] <표 1> CDR 정의

	Kabat <sup>1</sup>	Chothia <sup>2</sup>	MacCallum <sup>3</sup>	IMGT <sup>4</sup>	AHo <sup>5</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137

<sup>1</sup>잔기 넘버링은 Kabat 등의 명명법에 따름(위 참조)

<sup>2</sup>잔기 넘버링은 Chothia 등의 명명법에 따름(위 참조)

<sup>3</sup>잔기 넘버링은 MacCallum 등의 명명법에 따름(위 참조)

<sup>4</sup>잔기 넘버링은 Lefranc 등의 명명법에 따름(위 참조)

<sup>5</sup>잔기 넘버링은 Honegger 및 Plückthun의 명명법에 따름(위 참조)

[0054]

[0055]

"Kabat의 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "Kabat의 아미노산 위치 넘버링"이라는 표현 또한 그 변형이란 Kabat 등(위 참조)이 항체를 컴파일하기 위한 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대한 넘버링 시스템을 가리킨다. 해당 넘버링 시스템을 사용하면, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 삽입에 대응하는 더 적거나 또는 더 많은 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 이후의 단일 아미노산 삽입(Kabat에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 이후의 삽입된 잔기(예를 들어, Kabat에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)에 포함될 수 있다. 주어진 항체의 Kabat 잔기 번호는 항체 서열과 "표준" Kabat 넘버링 서열의 동원성 영역의 비교를 통해 확인될 수 있다.

[0056]

일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체의 CDR을 망라하는 아미노산 잔기는 Lefranc 등의 IMGT 명명법(위 참조)에 따라 정의된다. 일부 실시양태에서, 전장 항체 또는 scFv의 CDR을 망라하는 아미노산 잔기는 Kabat 등의 Kabat 명명법(위 참조)에 따라 정의된다. 일부 실시양태에서, 번역글로불린 중쇄(예를 들어, Fc 영역)의 잔기 번호는 Kabat 등의 EU 색인(위 참조)과 같은 번호이다. "Kabat의 EU 색인과 같은"이란 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 번호를 가리킨다.

[0057]

"프레임워크" 또는 "FR"이란 본원에 정의된 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기들을 가리킨다.

[0058]

"인간화 항체"란 비인간 CDR/HVR 유래의 아미노산 잔기 및 인간 FR 유래의 아미노산 잔기를 포함하는 키메라 항체를 가리킨다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 적어도 하나의, 통상적으로는 두 개의 대체로 전부의 가변 도메인을 포함하는 것으로서, 여기서 전부 또는 대체로 전부의 HVR/CDR은 비인간 항체의 HVR/CDR에 대응되며, 전부 또는 대체로 전부의 FR은 인간 항체의 FR에 대응된다. 인간화 항체는 인간 항체의 항체 고정 영역으로부터 유래된 적어도 일부를 선택적으로 포함할 수 있다. 항체(예를 들어, 비인간 항체)의 "인간화 형식"이란 인간화를 거친 항체를 가리킨다.

[0059]

"인간 항체"는 인간으로부터 생성된 항체의 아미노산 서열과 서로 대응되는 아미노산 서열을 갖는 항체, 및/또는 본원에 개시된 임의의 인간 항체 제조를 위한 기술을 사용하여 제조된 항체를 가리킨다. 인간 항체에 대한 이와 같은 정의는 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 명확히 배제한다. 당업계에 알려진 각종 기술(파지 라이브러리 포함)을 사용하여 인간 항체를 생성할 수 있다. Hoogenboom 및 Winter, J. Mol. Biol. [분자생물학잡지] 227:381(1991), Marks 등, J. Mol. Biol. [분자생물학잡지] 222:581(1991). 또한 인간 단클론 항체를 제조하기 위해 사용할 수 있는 것은 Cole 등, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy [단클론 항체 및 암 요법], Alan R. Liss, 제77페이지 (1985); Boerner 등, J. Immunol. [면역학 잡지], 147(1): 86- 95 (1991)에 설명된 방법이다. 또한 van Di jk 및 van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. [면역학 신견해], 5:368-74(2001)를 참조한다. 유전자 이식 동물에 항원을 투여함으로써 인간 항체를 제조할 수 있으며, 해당 유전자 이식 동물은 항원 공격에 응답하여 이와 같은 항체를 생성하도록 이미 수식되었으나, 그(예를 들어 번역된 이종 마우스(xenomice)) 내인성 유전자좌는 이미 불활성화되었다(XENOMOUSE™ 기술에 관해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 참조). 인간 B세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관해서는, Li 등, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[미국국가과학원 간행물]103:3557-3562 (2006)를 참조한다.

- [0060] 본원에서 검증된 폴리펩티드 및 항체 서열의 "아미노산 서열 동일성 백분율(%)" 또는 "동원성"에 대한 정의는, 서열 비교(임의의 보존 치환이 서열 동일성의 일부로 고려) 후, 후보 서열 중 비교된 폴리펩티드의 아미노산 잔기와 동일한 아미노산 잔기가 차지하는 백분율이다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 측정하는 목적을 위하여, 당업계 기술 범위 내의 여러 가지 방식으로 비교를 진행할 수 있는 것으로, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, Megalign(DNASTAR) 또는 MUSCLE 소프트웨어와 같은 공개적으로 얻을 수 있는 소프트웨어를 사용할 수 있다. 당업자는 비교 계측에 적합한 파라미터를 확정할 수 있는 것으로, 비교 대상인 서열 전장 범위에서 최대 비교를 달성하기 위해 필요한 모든 알고리즘을 포함한다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성 % 값은 서열 비교컴퓨터 프로그램 MUSCLE(Edgar, R.C., Nucleic Acids Research [핵산 연구] 32(5):1792-1797, 2004; Edgar, R.C., BMC Bioinformatics [BMC 바이오정보학] 5(1):113, 2004)을 사용하여 생성된다.
- [0061] "동원"이란 2개의 폴리펩티드 사이 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열의 유사성 또는 서열의 동일성을 가리킨다. 비교 대상인 두 개의 서열 중 하나의 위치가 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 서브 유닛에 의해 점유되었을 때, 예를 들어 두 DNA 분자 각각의 위치가 아데닌에 의해 점유되면 해당 분자는 해당 위치에서 동원이다. 두 개의 서열 사이의 동원성 백분율은 두 개의 서열이 갖는 매칭 또는 동원 위치의 수에 비교한 위치의 수를 나눈 다음 다시 100을 곱한 함수이다. 예를 들어, 두 개의 서열의 10개 위치 중 6개가 매칭 또는 동원인 경우, 이 두 개의 서열은 60% 동원이다. 예를 들어, DNA 서열 ATTGCC 및 TATGGC는 50%의 동원성을 갖는다. 통상적으로, 2개의 서열을 비교하여 최대 동원성을 얻을 때 비교가 이루어진다.
- [0062] 용어 "고정 도메인"이란 면역글로불린의 일부를 가리키는 것으로, 그 부분은 항원 결합 부위를 함유하는 해당 면역글로불린의 다른 부분(즉, 가변 도메인)에 비해, 보다 보존적인 아미노산 서열을 갖는다. 고정 도메인은 중쇄의 C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인(C<sub>H</sub>로 통칭) 및 경쇄의 C<sub>L</sub> 도메인을 함유한다.
- [0063] 임의의 포유동물 물종 유래의 항체(예를 들어, 면역글로불린)의 "경쇄"는 모두 그 고정 도메인의 아미노산 서열에 따라 두 가지 확실히 상이한 유형(kappa("κ") 및 lambda("λ"))로 칭함) 중 하나로 지정될 수 있다.
- [0064] "CH1 도메인"("H1"도메인의 "C1"로도 칭함)은 통상적으로 약 아미노산 118에서 약 아미노산 215까지 연장된다(EU 넘버링 시스템).
- [0065] "힌지 영역"은 통상적으로 IgG 중 인간 IgG1의 Glu216 내지 Pro230에 대응되는 영역으로 정의된다(Burton, Molec.Immunol. [분자면역학] 22:161-206 (1985)). 중쇄 간 S-S 결합을 형성하는 첫 번째 및 마지막 시스테인 잔기를 동일 위치에 위치시킴으로써, 다른 IgG 이소형의 힌지 영역을 IgG1 서열과 비교할 수 있다.
- [0066] 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인"("C2" 도메인이라고도 함)은 통상적으로 약 아미노산 231에서 약 아미노산 340까지 연장된다. CH2 도메인은 비교적 독특한 것으로, 이는 다른 하나의 도메인과 긴밀히 매칭되지 않기 때문이다. 이와 반대로, 두 개의 N 연결된 당 분지쇄는 온전한 천연 IgG 분자의 두 개의 CH2 도메인 사이에 삽입된다. 추측에 따라, 당쇄는 도메인-도메인 매칭되는 치환을 제공할 수 있고, CH2 도메인의 안정화에 도움이 된다. Burton, Molec Immunol. [분자 면역학] 22:161-206(1985).
- [0067] "CH3 도메인"("C2"도메인이라고도 함)은 CH2 도메인과 Fc 영역의 C말단 사이의 잔기(즉, 약 아미노산 잔기 341에서 항체 서열의 C말단까지, 통상적으로 IgG의 아미노산 잔기 446 또는 447에 존재)를 포함한다.
- [0068] 본원의 용어 "Fc 영역" 또는 "프래그먼트 결정화 가능 영역"은 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린 중쇄의 C말단 영역을 정의하기 위한 것이다. 비록 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 서로 다를 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 통상적으로 위치 Cys226의 아미노산 잔기 또는 Pro230에서 이의 카르복시 말단까지 연장되는 것으로 정의된다. Fc 영역의 C 말단 라이신(EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은 예를 들어, 항체의 생산 또는 정제 과정에서 제거될 수 있거나, 또는 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산에 대한 재조합 공학에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 온전한 항체의 조성물은, 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 집단 및 K447 잔기가 함유되거나 함유되지 않은 항체 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 항체에 적합한 천연 서열 Fc 영역은 인간 IgG1, IgG2(IgG2A, IgG2B), IgG3 및 IgG4를 포함한다.
- [0069] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명한다. 바람직한 FcR은 천연 인간 FcR이다. 이외, 바람직한 FcR은 IgG 항체(γ 수용체)에 결합하는 FcR이며, FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII 하위 유형의 수용체를 포함하고, 이러한 수용체의 대립유전자 변이체 및 별도 선택한 스플라이스 형태를 포함한다. FcγRII 수용체는 FcγRIIA("활성화 수용체") 및 FcγRIIB("억제 수용체")를 포함하는 것으로, 이들은 유사한 아미노산 서열을 가지며, 주요 구별점은 세포질 도메인에 있다. 활성화 수용체 FcγRIIA는 세포질 도메인에 면역 수용체 티

로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다. 억제 수용체 FcγRIIB는 세포질 도메인에 면역 수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM)를 포함한다. (M. Dareon, Annu. Rev. Immunol. [면역학 연도 평론]15:203-234 (1997) 참조) FcR은 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. [면역학 연도 평론] 9:457-92 (1991); Capel 등, Immunomethods [면역방법] 4:25-34 (1994); 및 de Haas 등, J. Lab. Clin. Med. [실험실 및 임상의학 잡지]126:330-41 (1995)에 요약되어 있다. 본원의 용어 "FcR"은 나중에 검증될 FcR을 포함하는 기타 FcR을 포함한다.

[0070] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "에피토프"란 항체 또는 항체 유도체에 결합되는 항원에 있는 특정 원자 또는 아미노산 기를 가리킨다. 만약 2개의 항체 또는 항원 결합 부분이 항원에 대하여 경쟁적 결합이 나타난다면, 이들은 해당 항원 내의 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0071] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "특이적 결합", "특이적 식별" 및 "...에 대하여 특이성 존재"란 계측 가능하고 재현 가능한 상호작용, 예컨대 표적과 항체 또는 항체 부분 간의 결합을 가리키는 것으로, 이는 이형 분자(생물 분자 포함) 집단 존재 시의 표적의 존재를 결정한다. 예를 들어, 표적(에피토프일 수 있음)을 특이적으로 식별하는 항체 또는 항체 부분은 다른 표적과 결합할 때보다 더 큰 친화력 또는 결합력, 더 큰 준비성 및/또는 더 긴 지속기간 동안 해당 표적에 결합하는 항체 또는 항체 부분이다. 일부 실시양태에서, 방사성 면역 측정(RIA)을 통해 계측된 바와 같이, 항체의 관련 없는 표적과의 결합 정도는 항체의 표적과의 결합 정도의 약 10%보다 작은 것이다. 일부 실시양태에서, 표적에 특이적으로 결합하는 항체는  $\leq 10^{-5}M$ ,  $\leq 10^{-6}M$ ,  $\leq 10^{-7}M$ ,  $\leq 10^{-8}M$ ,  $\leq 10^{-9}M$ ,  $\leq 10^{-10}M$ ,  $\leq 10^{-11}M$  또는  $\leq 10^{-12}M$ 의 해리상수( $K_D$ )를 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체는 서로 다른 물종 유래의 단백질 중 보존된 단백질에 있는 에피토프를 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 특이적 결합은 배타적 결합을 포함 가능하나 배타적 결합을 요구하지는 않는다. 항체 또는 항원 결합 도메인의 결합 특이성은 당업계 알려진 방법을 통해 실험을 진행하여 확인할 수 있다. 이와 같은 방법은 웨스턴 블랏(Western blot), ELISA 시험, RIA 시험, ECL 시험, IRMA 시험, EIA 시험, BIACORE™ 시험 및 펩티드 스캔을 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0072] "분리된" 항체(또는 작제물)는 이의 생산 환경의 구성성분(예를 들어, 천연 또는 재조합)으로부터 이미 검증, 분리 및/또는 회수된 항체이다. 일부 실시양태에서, 분리된 폴리펩티드는 이의 생성 환경으로부터 유래한 모든 기타 성분과의 결합이 없거나 또는 대체로 없다.

[0073] 본원에 기재된 작제물, 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 인코딩하는 "분리된" 핵산 분자는 이의 생성 환경에서 통상적으로 이와 관련되는 적어도 하나의 오염물 핵산 분자로부터 검증 및 분리시킨 핵산 분자이다. 일부 실시양태에서, 분리된 핵산은 이의 생산 환경과 관련있는 모든 성분과의 결합이 없거나 또는 대체로 없다. 본원에 기재된 폴리펩티드 및 항체를 인코딩하는 분리된 핵산 분자 형식은 천연 존재하는 형식 또는 배경과는 다르다. 따라서, 분리된 핵산 분자는 세포에 천연 존재하는 본원에 기재된 폴리펩티드 및 항체의 핵산과는 다르다. 분리된 핵산은 통상적으로 핵산 분자를 포함하는 세포에 함유되는 핵산 분자를 포함하지만, 해당 핵산 분자는 염색체 외에 또는 그 자연 염색체 위치와 다른 염색체 위치에 존재한다.

[0074] 핵산이 다른 핵산 서열과 기능적 관계가 될 때, 해당 핵산은 "작동 가능하게 연결된" 것이다. 예를 들어, 전서열 또는 분비성 선도서열의 DNA가 폴리펩티드 분비에 관여하는 전단백질로서 발현된다면, 해당 전서열 또는 분비성 선도서열 DNA는 해당 폴리펩티드의 DNA에 작동 가능하게 연결되고; 만약 촉진자 또는 증폭자가 인코딩 서열의 전사에 영향을 끼치면, 해당 촉진자 또는 증폭자는 해당 서열에 작동 가능하게 연결되거나, 또는 만약 리보솜 결합 부위가 번역에 편리하기 위해 위치된다면 해당 리보솜 결합 부위는 인코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 통상적으로, "작동 가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 연속적이며, 또한 분비성 선도서열의 상황 하에서는 연속적이고 판독 프레임 내에 있음을 의미한다. 그러나 증폭자는 연속적일 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 절찰 반응에 의해 실현된다. 이와 같은 부위가 존재하지 않는다면, 일반적인 관행에 따라 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 사용한다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"란 연결된 다른 핵산을 전과할 수 있는 핵산 분자를 가리킨다. 해당 용어는 자가 복제 핵산 구조인 벡터, 및 벡터가 도입된 숙주 세포 유전체에 결합된 벡터를 포함한다. 일부 벡터들은 작동 가능하게 연결되는 핵산의 발현을 가이드할 수 있다. 본원에서는 이와 같은 벡터를 "발현 벡터"라고 한다.

[0076] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"이란 외인성 핵산을 숙주 세포로 옮기고 또는 도입하는 과정을 가리킨다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 이미 형질감염, 형질전환 또는 형질도입된 세포인 것으로, 해당 세포는 일차 목표 세포 및 그 자손

을 포함한다.

- [0077] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포계" 및 "숙주 세포 배양물"은 서로 교환해서 사용 가능하며, 외인성 핵산이 도입된 세포를 가리키고, 이와 같은 세포의 자손을 포함한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환 세포"를 포함하며, 이는 계대의 수와 관계없이 일차 형질전환된 세포 및 그로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손의 핵산 함량은 부모 세포의 핵산 함량과 완전히 동일하지 않을 수 있으며, 돌연변이를 함유할 수 있다. 본원은 원시의 형질전환된 세포 중 선별 또는 선택된 세포와 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손을 포함한다.
- [0078] 용어 "피시험자", "개체" 및 "환자"는 본원에서 서로 교환해서 사용 가능한 것으로, 포유동물을 가리키며, 인간, 소, 말, 고양이, 개, 설치류 또는 영장류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 피시험자는 인간이다.
- [0079] 약제의 "유효량"이란 원하는 투여량 및 시간 내에 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하는 데 효과적인 양을 가리킨다. 해당 특정 용량은 선택된 특정 약제, 지켜야 하는 투약 방안, 그 약제의 다른 화합물과의 조합 투여 여부, 투여 시간, 영상화될 조직 및 그 약제를 휴대하는 물리적 전달 시스템 중 하나 이상에 의해 달라질 수 있다.
- [0080] 본 출원의 물질/분자, 작용제 또는 길항제의 "치료 유효량"은 질환 상태, 연령, 성별과 개체 체중 및 해당 물질/분자, 작용제 또는 길항제의 개체에서 원하는 응답을 유발하는 능력 등 요소에 따라 달라질 수 있다. 치료 유효량은 또한 해당 물질/분자, 작용제 또는 길항제의 임의의 독성 또는 유해 작용이 모두 치료 유익 작용에 의해 상쇄되는 양이기도 하다. 치료 유효량은 1회 이상의 투여로 전달될 수 있다.
- [0081] 본원에 사용된 바와 같이, "치료(treatment 또는 treating)"는 유익하거나 또는 원하는 결과(임상 결과 포함)를 얻기 위한 방법이다. 본 출원의 목적으로, 유익하거나 또는 원하는 임상 결과는, 질환으로 인한 하나 이상의 증상 완화, 질환의 정도 감소, 질환의 안정화(예를 들어, 질환의 악화를 예방 또는 지연), 질환의 확산(예를 들어, 이전)을 예방 또는 지연, 질환의 재발을 예방 또는 지연, 질환의 진행을 지연 또는 완화, 질환 상태 개선, 질환의 완화(부분적으로 또는 전체적으로) 제공, 질환 치료에 필요한 하나 이상의 기타 약물의 용량 감소, 질환의 진행 지연, 삶의 질 향상 또는 개선, 체중 증가 및/또는 생존기간 연장 중 하나 이상을 포함하나 이에 한정되지 않는다. "치료"는 또한 암의 병리학적 결과(예를 들어, 종양 부피)를 감소시키는 것을 망라한다. 본 출원의 방법은 이러한 치료 측면 중의 임의의 하나 이상을 고려하였다. "치료"는 반드시 치료받는 질환이 완치된다는 것을 의미하지는 않는다.
- [0082] 본원에 기재된 본 출원의 실시양태은 "...로 이루어진" 및/또는 "대체로 ...로 이루어진" 실시양태을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0083] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약(about)" 또는 "대략(approximately)"이란 당업자가 확정하는 특정 값에 대해 허용 가능한 오차 범위 내를 의미하며, 이는 부분적으로 해당 값을 계측하거나 또는 측정하는 방식에 따른 것이며, 즉, 계측 시스템의 제한을 받는다. 일부 실시양태에서, "약"은 당업계의 실천에 따라 3개 이상의 표준 편차 범위 내를 의미할 수 있다. 일부 실시양태에서, "약"은 주어진 값의 최대 20%(예를 들어 최대 10%, 최대 5% 또는 최대 1%)의 범위를 표시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 특히 생물학적 시스템 및 방법과 관련하여, 해당 용어는 어느 한 값의 자릿수 이내, 예를 들어 5배 이내 또는 2배 이내를 의미할 수 있다.
- [0084] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조절"이란 긍정적 또는 부정적 변화를 가리킨다. 예시적인 조절은 약 1%, 약 2%, 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 50%, 약 75%, 또는 약 100%의 변화를 포함한다.
- [0085] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "증가"는 적어도 약 5%의 긍정적인 변화를 가리킨다. 변화는 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 75%, 약 100% 또는 이보다 더 많을 수 있다.
- [0086] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "감소"는 적어도 약 5%의 부정적인 변화를 의미한다. 변화는 약 5%, 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 75% 또는 심지어 약 100%일 수 있다.
- [0087] 본원에 사용된 용어 "약 X-Y"는 "약 X 내지 약 Y"와 동일한 의미를 갖는다.
- [0088] 본원 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형식의 "하나(a)", "또는(or)" 및 "이러한/해당/해당(the)"는 위아랫에서 별도로 설명하지 않는 한, 복수 지시 대상을 포함한다.
- [0089] "이펙터 기능"이란 항체의 이소형의 상이함에 따라 달라지는 항체의 Fc 영역에 기인하는 생물학적 활성을 가리킨다. 항체 이펙터 기능의 예시로는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포 독성(CDC), Fc 수용체 결합, 항체 의존성 세

포 매개된 세포 독성(ADCC), 식균 작용, 세포 표면 수용체(예를 들어, B세포 수용체)의 하향 조절 및 B세포 활성화가 포함된다.

- [0090] "면역접합체"는 하나 이상의 이중 분자(세포 독성제를 포함하나 이에 한정되지 않음)에 접합된 항체를 가리킨다.
- [0091] 용어 "약물 제제"란 제제에 포함된 활성 성분의 생물학적 활성을 효과적이게 하는 형식으로 존재하며, 해당 제제가 투여되는 피시험자에게 허용 불가할 정도의 독성을 갖는 다른 성분이 함유되지 않은 제제를 가리킨다.
- [0092] 본원에 사용된 바와 같이, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 약물 제제 중 활성성분 이외의 피시험자에게 독성이 없는 성분을 가리킨다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 완충제, 부형제, 안정제 또는 방부제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0093] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"이란 항체와 항원의 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 가리킨다. 일부 실시양태에서, 천연 항체 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각은 VH 및 VL)은 통상적으로 유사한 구조를 갖고, 각 도메인은 네 개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 세 개의 CDR을 포함한다. (예를 들어 Kindt 등, Kuby Immunology [쿠비면역학], 제61판, W. H. 푸리만회사(W.H.Freeman and Co.), 제91페이지 (2007). 참조) 단일 VH 또는 VL 도메인은 항원 결합에 특이성을 충분히 부여할 수 있다. 또한, VH 또는 VL 도메인을 사용하여 항원에 결합하는 항체로부터 특정 항원에 결합하는 항체를 분리시킴으로써, 상보적인 VL 또는 VH 도메인의 라이브러리를 선별할 수 있다. Portolano 등, J. Immunol.[면역학 잡지] 150: 880- 887 (1993); Clarkson 등, Nature [자연] 352: 624- 628 (1991)을 참조한다.
- [0094] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항원 식별 수용체"란 항원에 대한 결합에 응답하여 면역 응답 세포(예를 들어, T세포)를 활성화시킬 수 있는 수용체를 가리킨다. 항원 식별 수용체의 비제한적 예시로는 천연 및 수식된 T세포 수용체("TCR") 및 키메라 항원 수용체("CAR")를 포함한다.
- [0095] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"이란 면역 응답 세포를 활성화 또는 자극할 수 있는 세포내 신호전달 도메인에 융합될 수 있는 세포외 항원 결합 도메인 및 막통과 도메인을 포함하는 분자를 가리킨다. 일부 실시양태에서, CAR의 세포외 항원 결합 도메인은 항체 또는 항체 프래그먼트, 예를 들어 VHH 또는 scFv를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체(예를 들어, VHH 또는 scFv)는 세포내 신호전달 도메인에 융합되는 막통과 도메인과 융합된다. 일부 실시양태에서, CAR은 항원에 대한 높은 결합 친화력 또는 결합력을 갖도록 선택된다.
- [0096] "면역 응답 세포"란 면역 응답에서 작용하는 세포 또는 이의 선조세포 또는 자손을 가리킨다.
- [0097] 2. 항체 및 항체 유도체
- [0098] 본 개시는 항체 및 항체 유도체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시는 CD47에 결합하는 단클론 항체에 대한 발견에 부분적으로 기반하며, 이러한 항체는 항종양 치료에 사용 가능하며, 여기서 항체는 선택적으로 종양 세포를 표적으로 하고, 및/또는 CD47에 의해 매개되는 신호 경로를 억제함으로써, 종양세포에 대한 유익한 항종양 작용을 유도하게 된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 길항제 항체인 것으로, 이는 CD47 수용체 기능을 억제한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 CD47 수용체와 그 리간드 중 하나 이상 간의 상호작용을 억제한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 CD47 수용체로 인한 면역억제 신호를 차단하거나 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 기준 항체(예를 들어, 마그롤리맵 유사체)와 비교하여 정상 세포(예를 들어, 적혈구)에 대한 결합 및/또는 독성이 낮거나 감소된 것을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 기준 항체(예를 들어, 마그롤리맵 유사체)와 비교하여 탁월한 치료 효과를 나타낸다.
- [0099] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체는 단클론 항체이거나 이를 포함할 수 있는 것으로, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 인간 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 인간화 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 수용체 인간 프레임워크, 예를 들어 인간 면역글로불린 프레임워크 또는 인간 공유 프레임워크를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 인간 항체를 포함한다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체는 항체 프래그먼트, 예를 들어 Fv, Fab, Fab', scFv, 이중항체 또는 F(ab')<sub>2</sub>프래그먼트일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 전장항체(예를 들어, 온전한 IgG4 항체) 또는 본원에 정의된 바와 같은 기타 항체 유형 또는 이소형이다. 일부 실시양태에서, 본 출원에 기재된 바(예를 들어, 본원에 상세히 기재된 섹션 2.1-2.12)와 같이, 본 개시의 항체 또는 항체 유도체는 임의의 특징을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다.

[0101] 본 개시의 항체 및 항체 유도체는 예를 들어 증식물 또는 암의 진단 또는 치료에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체를 사용하여 발진을 억제하는 종양 형성 및 암은 통상적으로 면역요법에 응답하는 종양 형성 및 암을 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양 형성 및 암은 유선암(예를 들어, 유선 세포암), 난소암(예를 들어, 난소 세포암) 및 신장 세포암(RCC)을 포함한다. 본 개시의 방법을 사용하여 치료할 수 있는 기타 암의 예시로는 흑색종(예를 들어, 전이성 악성 흑색종), 전립선암, 결장암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 뇌종양, 만성 또는 급성 백혈병(급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 만성 림프성 백혈병을 포함), 림프종(예를 들어, 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종, 림프구성 림프종, 원발성 중추신경계(CNS)림프종, T세포 림프종), 비인두암, 두 또는 경부암, 피부암 또는 안내 악성 흑색종, 자궁암, 직장암, 항문주위암, 위종양, 고환암, 자궁암, 수란관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 외음암, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 유선암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 소아 고형종양, 방광암, 신장암 또는 요관암, 유방암, 골반암, 중추신경계(CNS) 증식물, 중앙혈관신생, 척추 종양, 뇌간신경교종, 뇌하수체선종, 카포시육종, 포피모양암종, 편평세포암, 환경유발성암(석면으로 인한 암(예를 들어, 중피종) 포함) 및 이들 암의 조합을 포함한다.

[0102] 2.1.1 예시적 항 CD47 항체

[0103] 본 개시는 CD47 단백질에 결합하는 분리된 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시의 항 CD47 항체는 CD47에 결합하는 ECD이다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 CD47의 N말단 ECD에 결합하는 것으로, 해당 N말단 ECD는 SEQ ID NO: 104에 제시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체와 본원에 기재된 항 CD47 항체(예를 들어, 클론 M1 및 그 변이체(예를 들어, M1#21 및 M1#55))는 동일한 에피토프에 결합한다.

[0104] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항 CD47 항체는 CD47에 기반한 신호경로의 길항제로 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 CD47 수용체와 그 리간드 중 하나 이상 간의 상호작용을 차단 또는 감소할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 CD47 수용체와 그의 리간드 간의 상호작용을 적어도 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 99%, 또는 약 99.9%를 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 CD47 수용체의 다운스트림 면역억제 신호전달을 차단할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체를 사용한 치료는 피시험자에게서 항종양 효과를 나타냈는데, 이로써 종양 성장을 감소시키고 및/또는 피시험자의 생존기간을 연장시키게 된다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 면역 세포(예를 들어, T세포 및/또는 NK세포)의 면역 응답 및/또는 항종양 작용을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 기준 항 CD47 항체(예를 들어, 마그롤리맵 유사체)와 비교하여 정상 세포(예를 들어, 적혈구)에 대한 결합 및/또는 독성이 감소된 것으로 나타냈는데, 이로써 오프 타겟 효과 감소를 나타냈다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 기준 항 CD47 항체(예를 들어, 마그롤리맵 유사체)와 비교하여 탁월한 항종양 효과를 나타낸다. 마그롤리맵 단일항체는 Hu5F9-G4라고도 하는 것으로, 이는 Liu 등(2015)의 "항암 치료 잠재력을 갖는 인간화 항 CD47 항체의 임상전 개발(Pre-Clinical Development of a Humanized Anti-CD47 Antibody with Anti-Cancer Therapeutic Potential)", PLOS ONE [공공과학도서관: 종합] 10(9): e0137345에서 개시된 임상단계에 처한 항 CD47 항체이다.

[0105] 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-7} M$  또는 더 낮은 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-8} M$  또는 더 낮은 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $5 \times 10^{-9} M$  또는 더 낮은 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-9} M$  또는 더 낮은 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-10} M$  또는 더 낮은 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-11} M$  내지 약  $1 \times 10^{-7} M$  사이의 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-10} M$  내지 약  $1 \times 10^{-8} M$  사이의 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-10} M$  내지 약  $5 \times 10^{-8} M$  사이의 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-10} M$  내지 약  $1 \times 10^{-9} M$  사이의 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $2 \times 10^{-10} M$  내지 약  $5 \times 10^{-9} M$  사이의 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-9} M$  내지 약  $5 \times 10^{-8} M$  사이의 KD로 CD47에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-10} M$  내지 약  $5 \times 10^{-9} M$  사이의 KD로 CD47에 결합한다.

[0106] 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는: a) (1) SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51 및 61 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR-H1;

(2) SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52 및 62 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR-H2; 및 (3) SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53 및 63 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR-H3;을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 b) (1) SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54 및 64 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR-L1; (2) SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55 및 65 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR-L2; 및 (3) SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56 및 66 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 최대 약 3개의 아미노산으로 치환된 변이체를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR-L3;을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0107]

일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 기준 항 CD47 항체와 교차 경쟁하는 것으로, 해당 기준 항 CD47 항체는: a) (1) SEQ ID NO: 1에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 2에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 3에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 4에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 5에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 6에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; b) (1) SEQ ID NO: 11에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 12에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 13에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 14에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 15에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 16에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; c) (1) SEQ ID NO: 21에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 22에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 23에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 24에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 25에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 26에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; d) (1) SEQ ID NO: 31에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 32에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 33에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 34에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 35에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 36에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; e) (1) SEQ ID NO: 41에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 42에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 43에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 44에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 45에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 46에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; f) (1) SEQ ID NO: 51에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 52에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 53에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 54에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 55에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 56에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열; 또는 g) (1) SEQ ID NO: 61에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H1, (2) SEQ ID NO: 62에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H2, 및 (3) SEQ ID NO: 63에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-H3을 함유하는 중쇄 가변 도메인(VH) 서열; 및 (1) SEQ ID NO: 64에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L1, (2) SEQ ID NO: 65에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L2, 및 (3) SEQ ID NO: 66에 제시되는 아미노산 서열을 포함하는 CDR-L3을 함유하는 경쇄 가변 도메인(VL) 서열;을 포함한다.

[0108]

일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 CDR-H1 도메인, CDR-H2 도메인 및 CDR-H3 도메인을 포함하고, 해당 경쇄 가변 영역은 CDR-L1 도메인, CDR-L2 도메인 및 CDR-L3 도메인을 포함하며, 해당 CDR-H1 도메인, 해당 CDR-H2 도메인 및 해당 CDR-H3 도메인은 기준 중쇄 가변 영역에 포함되는 CDR-H1 도메인, CDR-H2 도메인 및 CDR-H3 도메인을 각각 함유하고, 해당 기준 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57 및 67로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하며, 해당 CDR-L1 도메인, 해당 CDR-L2 도메인 및 해당 CDR-L3 도메인은 기준 경쇄 가변 영역에 포함되는 CDR-L1 도메인, CDR-L2 도메인 및 CDR-L3 도메인을 각각 함유하고, 해당 기준 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58 및 68로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.





가변 영역을 포함하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 27에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 28에 제시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 37에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 38에 제시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 47에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 48에 제시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 57에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 58에 제시되는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 해당 중쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 67에 제시되는 아미노산 서열을 포함하고, 해당 경쇄 가변 영역은 SEQ ID NO: 68에 제시되는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0119] 일부 실시양태에서, 중쇄 가변 영역에 포함되는 아미노산 서열 중 임의의 하나는 최대 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개 또는 약 10개의 아미노산 치환, 결실 및/또는 추가를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환은 보존적 치환이다.
- [0120] 일부 실시양태에서, 항체는 인간 프레임워크를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 과지 디스플레이 라이브러리로부터 분리된다.
- [0121] 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 Fc 영역을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 또한 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 인간 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 Fc 영역으로 이루어진 군으로부터 선택되는 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포에 의해 매개된 세포 독성(ADCC)을 조절하는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포에 의해 매개된 세포 독성(ADCC)을 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포에 의해 매개된 세포 독성(ADCC)을 증가시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG4 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG4 Fc 영역은 S228P의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 C말단 라이신을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 C말단 라이신의 결실을 포함한다.
- [0122] 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것으로, 해당 중쇄 및 경쇄는 각각 SEQ ID NO: 69 및 70에 제시되는 아미노산 서열(M1#21)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것으로, 해당 중쇄 및 경쇄는 각각 SEQ ID NO: 69 및 72에 제시되는 아미노산 서열(M1#21P)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것으로, 해당 중쇄 및 경쇄는 각각 SEQ ID NO: 71 및 70에 제시되는 아미노산 서열(M1#21K)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것으로, 해당 중쇄 및 경쇄는 각각 SEQ ID NO: 71 및 72에 제시되는 아미노산 서열(M1#21KP)을 포함한다.
- [0123] 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것으로, 해당 중쇄 및 경쇄는 각각 SEQ ID NO: 59 및 60에 제시되는 아미노산 서열(M1#55)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것으로, 해당 중쇄 및 경쇄는 각각 SEQ ID NO: 59 및 74에 제시되는 아미노산 서열(M1#55P)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것으로, 해당 중쇄 및 경쇄는 각각 SEQ ID NO: 73 및 60에 제시되는 아미노산 서열(M1#55K)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 것으로, 해당 중쇄 및 경쇄는 각각 SEQ ID NO: 73 및 74에 제시되는 아미노산 서열(M1#55KP)을 포함한다.
- [0124] 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 전장 면역글로불린, 단쇄 Fv(scFv) 프래그먼트, Fab 프래그먼트, Fab' 프래그먼트, F(ab')<sub>2</sub>, Fv 프래그먼트, 이황화 결합 안정화 Fv 프래그먼트(dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, VHH, Fv-Fc 융합체, scFv-Fc 융합체, VHH-Fv 융합체, 이중항체, 삼중항체, 사중항체 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0125] 일부 실시양태에서, 항체는 분자 크기가 비교적 큰 항체 유도체에 포함된다. 일부 실시양태에서, 항체 유도체는 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체)이며, 해당 다중특이적 항체는 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항체 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 중앙 관련 항원이다. 일부 실시양태에서, 중앙 관련 항원은 Her-2, B7H3, EGFR, PD-L1, MSLN, c-Met, B세포 성숙 항원(BCMA), 탄산무수화효소IX(CAIX), 암배아항원(CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, CD276(B7H3), 상피 당단백질(EGP2), 영양막 세포 표면 항원 2(TROP-2), 상피 당단백질-40(EGP-

40), 상피세포 부착 분자(EpCAM), 수용체 타이로신 단백질 키나아제 erb-B2, 3, 4, 염산 결합 단백질(FBP), 태아 아세틸콜린 수용체(AChR), 염산 수용체-a, 강글리오시드 G2(GD2), 강글리오시드 G3(GD3), 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 키나아제 삽입 도메인 수용체(KDR), Lewis A(CA 1.9.9), Lewis Y(LeY), 글리피칸-3(GPC3), L1 세포 부착 분자(L1CAM), 뮤신 16(Muc-16), 뮤신 1(Muc-1), NG2D 리간드, 암 배아 항원(h5T4), 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막항원(PSMA), 중앙 관련 당단백질 72(TAG-72), 클라우딘 18.2 (CLDN18.2), 혈관 내피 성장 인자 R2(VEGF-R2), 빌름스(Wilms) 종양 단백질(WT-1), 1형 타이로신 단백질 키나아제 막관통 수용체(ROR1), PVR, PVRL2 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 면역 체크포인트 조절제이다. 일부 실시양태에서, 면역 체크포인트 조절제는 TIGIT, PD1, CTLA4, LAG-3, 2B4, BTLA 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항체 유도체 또는 다중특이적 항체의 제2 항원과의 결합은 면역 체크포인트 조절제를 억제한다. 일부 실시양태에서, 제2 항원은 면역 공동자극 분자 또는 T세포 수용체/CD3 복합물의 서브유닛이다. 일부 실시양태에서, 면역 공동자극 분자는 CD28, ICOS, CD27, 4-1BB, OX40 및 CD40 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항체 유도체 또는 다중특이적 항체의 제2 항원과의 결합은 면역 공동자극 분자를 활성화시킨다. 일부 실시양태에서, T세포 수용체/CD3 복합물의 서브유닛은 CD3  $\gamma$ , CD3  $\delta$ , CD3  $\epsilon$  및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항체 유도체 또는 다중특이적 항체의 제2 항원과의 결합은 T세포 수용체/CD3 복합물을 활성화시킨다.

[0126] 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 링커를 통해 제2 항원 결합 부분에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 펩티드 링커이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 약 4개 내지 약 30개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 약 4개 내지 약 15개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 SEQ ID NO: 75-102로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0127] 일부 실시양태에서, 항 CD47 항체는 치료제 또는 표지에 접합된다. 일부 실시양태에서, 표지는 방사성 동위원소, 형광 염료 및 효소로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 치료제는 세포 독소 또는 방사성 동위원소이다.

[0128] 2.2 항체 친화력

[0129] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체는 그 표적 항원에 대하여 높은 결합 친화력을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약  $1 \times 10^{-7}$  M 또는 더 낮은 KD로 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약  $1 \times 10^{-8}$  M 또는 더 낮은 KD로 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약  $5 \times 10^{-9}$  M 또는 더 낮은 KD로 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약  $1 \times 10^{-9}$  M 또는 더 낮은 KD로 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약  $1 \times 10^{-10}$  M 또는 더 낮은 KD로 표적에 결합한다.

[0130] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약  $1 \times 10^{-11}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-7}$  M 사이의 KD로 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약  $1 \times 10^{-10}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-7}$  M 사이의 KD로 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약  $1 \times 10^{-10}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-8}$  M 사이의 KD로 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약  $1 \times 10^{-11}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-9}$  M 사이의 KD로 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약  $2 \times 10^{-10}$  M 내지 약  $5 \times 10^{-9}$  M 사이의 KD로 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약  $1 \times 10^{-9}$  M 내지 약  $5 \times 10^{-8}$  M 사이의 KD로 표적에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 약  $1 \times 10^{-10}$  M 내지 약  $1 \times 10^{-9}$  M 사이의 KD로 표적에 결합한다.

[0131] 항체 또는 항체 유도체의 KD는 당업계에서 알려진 방법을 통해 측정할 수 있다. 이와 같은 방법은 웨스턴 블랏, ELISA 시험, RIA 시험, ECL 시험, IRMA 시험, EIA 시험, Octet 시험, BIACORE® 시험 및 펩티드 스캔을 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0132] 일부 실시양태에서, KD는 BIACORE® 표면 플라즈마 공명 측정법을 사용하여 측정할 수 있다. 예를 들어, 25°C 하에서 BIACORE®-2000 또는 BIACORE® 3000(비야코어사, 피스카타웨이, 뉴저지(Biacore, Inc., Piscataway, NJ))을 사용하여 고정된 항원 CMS 칩 상에서 약 10개 응답 단위(RU)로 측정하는 것이나, 이에 한정되지는 않는다.

다. 일부 실시양태에서는, 공급업체 설명서에 따라, 카르복시메틸화 덱스트란 바이오센서 칩(CMS, 비아코어사)을 N-에틸-N'-(3-디메틸 아미노프로필)-카르보디이미드 염산염(EDC) 및 N-히드록시숙신아미드(NHS)로 활성화시킨다. 항원을 pH 4.8의 10mM 아세트산 나트륨을 사용하여 5 µg/mL(약 0.2µM)로 희석하고, 그 다음, 5µL/분의 유속으로 주입하여, 대략 10개 반응 단위(RU)의 커플링 단백질을 획득한다. 항원 주입 완료 후, 반응되지 않은 기를 밀폐하기 위해 1M 에탄올아민을 주입한다. 동역학 측정에 있어서, 25° C 하에서, Fab의 2배 연속 희석액(0.78nM 내지 500nM)을 대략 25µL/분의 유속으로 0.05% 폴리소르베이트 20(TWEEN-20TM) 계면활성제를 함유하는 PBS(PBST)에 주입한다. 결합 속도( $k_{on}$ ) 및 해리 속도( $k_{off}$ )는 간단한 일대일 랭뮤어 결합 모델(BIACORE® 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 결합 및 해리 센서그램을 동시에 피팅하여 계산한다. 평행 해리상수(KD)는 비율  $k_{off}/k_{on}$ 로 계산할 수 있다. 예를 들어, Chen 등, J. Mol. Biol. [분자생물학잡지] 293:865-881(1999)을 참조한다. 만약 위에 기재된 표면 플라즈몬 공명 분석법을 통해 측정된 결합 속도(on-rate)가  $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 을 초과한다면, 해당 결합 속도는 형광 소광 기술을 사용하여 확인할 수 있고, 해당 기술은 농도가 증가하는 항원이 존재하는 상황 하에서, 25° C 하에서, 컷오프 구성의 분광광도계(Aviv 기구) 또는 교반 큐벳이 달린 8000 시리즈 SLM-AMINCO™ 분광광도계(ThermoSpectronic)와 같은 분광기가 측정된 바와 같이, 20nM 항원 항체(Fab 형식)의 PBS(pH7.2) 용액의 형광 방출 강도(여기=295nm; 방출=340nm, 16nm 통과대역)의 증가 또는 감소를 측정한다.

[0133] 2.3 항체 프래그먼트

[0134] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체는 항원 결합 프래그먼트 또는 항체 프래그먼트를 포함한다. 항체 프래그먼트는 Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, VHH, Fv 및 scFv 프래그먼트, 및 본원에 기재된 기타 프래그먼트를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 일부 항체 프래그먼트에 대한 총론은, Hudson 등, Nat. Med.[자연-의학] 9:129-134 (2003)를 참조한다. scFv 프래그먼트에 대한 총론은, 예를 들어, Pluckthtin, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies[단클론 항체의 약리학], 제113권, Rosenberg 및 Moore 편집, (스프링거 출판사(Springer-Verlag), 뉴욕), 제269-315페이지 (1994)를 참조하고; 또한 WO 93/16185; 및 미국 특허 번호 5,571,894 및 5,587,458을 참조한다. 셀비지 수용체(salvage receptor) 결합 에피토프 잔기를 포함하고 증가된 체내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab)<sub>2</sub> 프래그먼트에 대한 토론은 미국 특허 번호 5,869,046을 참조한다.

[0135] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체는 이중항체일 수 있다. 이중 항체는 두 개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 프래그먼트이며, 이는 2가이거나 또는 이중특이적일 수 있다. 예를 들어, EP 404,097, WO 1993/01161; Hudson 등, Nat. Med. [자연-의학] 9: 129-134 (2003) 및 Hollinger 등, Proc.Natl.Acad.Sci.USA [미국국가과학원 간행물] 90: 6444-6448 (1993)을 참조한다. 삼중 항체 및 사중 항체 역시 Hudson 등, Nat. Med.[자연-의학] 9:129-134 (2003)에 기재되어 있다.

[0136] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체는 단일 도메인 항체를 포함할 수 있다. 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부, 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 프래그먼트이다. 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체(Domantis사, 월섬, 매사추세츠(Domantis, Inc., Waltham, MA), 미국특허 번호 6,248,516 B1 참조)이다. 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 낙타과 동물 단일 도메인 항체이다. 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 VHH이다. 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 단일 도메인 항체는 인간화 항체이다.

[0137] 항체 프래그먼트는 다양한 기술을 통해 제조할 수 있으며, 이러한 기술은 본원에 기재된 바와 같이 온전한 항체의 단백질 수분해 소화 및 숙주 세포 재조합(예를 들어, 대장균 또는 파지)을 통해 생성하는 것을 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0138] 2.4 키메라 항체 및 인간화 항체

[0139] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체는 키메라 항체이다. 일부 키메라 항체에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567; 및 Morrison 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [미국국가과학원 간행물]81:6851-6855 (1984)에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 키메라 항체는 비인간 가변 영역(예를 들어, 마우스로부터 유래된 가변 영역) 및 인간 고정 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 항체는 유형 또는 하위 유형이 부모 항체의 유형 또는 하위 유형과 비교하여 이미 변경된 "유형이 전환된" 항체이다. 키메라 항체는 그 항원 결합 프래그먼트를 포함한다.

[0140] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체는 인간화 항체일 수 있다. 통상적으로, 비인간 항체를 인간화시킴으로써 인

간에 대한 면역원성을 감소시키는 동시에 부모 비인간 항체의 특이성 및 친화력을 유지한다. 통상적으로, 인간화 항체는 하나 이상의 가변 도메인을 포함하는 것으로, 여기서 HVR(예를 들어, CDR)(또는 이의 일부)은 비인간 항체로부터 유래되고, 하나 이상의 프레임워크 영역(FR)(또는 이의 임의의 일부)은 인간으로부터 유래된다. 인간화 항체는 또한 선택적으로 인간 고정 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 항체의 특이성 또는 친화력을 회복 또는 개선시키기 위해, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는 비인간 유래 항체(예를 들어, HVR 잔기로부터 유래되는 항체)의 상응 잔기에 의해 치환된다.

[0141] 인간화 항체 및 그 제조 방법에 대해서는, 예를 들어 Almagro 및 Fransson, *Front. Biosci.* [바이오 과학 전연] 13:1619-1633 (2008)에 기재되어 있고; 또한 예를 들어 Riechmann 등, *Nature*[자연] 332: 323-329 (1988); Queen 등, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* [미국국가과학원 간행물] 86:10029-10033(1989), 미국 특허 번호 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321 및 7,087,409; Kashmiri 등, *Methods*[방법] 36:25-34 (2005)(SDR(a-CDR) 그래프팅에 대해 기재); Padlan, *Mol. Immunol.*[분자면역학] 28:489-498( 1991)("표면 재수정"에 대해 기재); Dall'Acqua 등, *Methods*[방법] 36:43-60(2005)("FR 서플링"에 대해 기재); 및 Osbourn 등, *Methods*[방법] 36:61-68(2005) 및 Klimka 등, *Br. J. Cancer* [영국 암 잡지] 83:252-260 (2000)(FR 서플링의 "가이드된 선택" 접근법에 대해 기재)에 기재되어 있다.

[0142] 인간화에 사용될 수 있는 인간 프레임워크 영역은: "최적 피팅" 방법을 사용하여 선택된 프레임워크 영역(예를 들어, Sims 등, *J. Immunol.*[면역학 잡지] 151:2296(1993) 참조); 특정 경쇄 가변 영역 하위 그룹 또는 중쇄 가변 영역 하위 그룹의 인간 항체의 공유 서열로부터 유래된 프레임워크 영역(예를 들어, Carter 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [미국국가과학원 간행물] 89:4285 (1992); 및 Presta 등, *J. Immunol.* [면역학잡지]151:2623 (1993) 참조); 인간 성숙(체세포 돌연변이) 프레임워크 영역 또는 인종계 프레임워크 영역(예를 들어, Almagro 및 Fransson, *Front. Biosci.*[바이오과학 전연] 13:1619-1633 (2008) 참조); 및 FR 라이브러리를 선별하여 획득한 프레임워크 영역(예를 들어, Baca 등, *J. Biol. Chem.*[생물화학 잡지] 272:10678-10684 (1997) 및 Rosok 등, *J. Biol. Chem.*[생물화학 잡지] 271:22611-22618 (1996) 참조);를 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0143] 2.5 인간 항체

[0144] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체는 인간 항체(예를 들어, 인간 도메인 항체 또는 인간 DAb)일 수 있다. 당업계에서 공지된 다양한 기술을 사용하여 인간 항체를 생성할 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 van Dijk와 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* [당대 약리학 관점]5:368-74 (2001), Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* [당대 면역학 관점]20:450-459 (2008), 및 Chen, *Mol. Immunol.*[분자 면역학] 47(4):912-21 (2010)에 기재되어 있다. 온전한 인간 단일 도메인 항체(또는 DAb)를 생성할 수 있는 유전자 이식 마우스 또는 래트는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어 US20090307787A1, 미국 특허 번호 8,754,287, US20150289489A1, US20100122358A1 및 WO2004049794를 참조한다.

[0145] 유전자 이식 동물에 면역원을 투여하는 것을 통해 인간 항체(예를 들어, 인간 DAb)를 제조할 수 있으며, 해당 유전자 이식 동물은 항원 공격에 응답하여 온전한 인간 항체 또는 인간 가변 영역을 갖는 온전한 항체를 생성하도록 이미 수식되었다. 이와 같은 동물은 통상적으로 인간 면역글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유하는 것으로, 이는 내인성 면역글로불린 유전자좌를 대체하거나, 또는 염색체외에 존재하거나 또는 동물의 염색체에 무작위로 통합된다. 이와 같은 유전자 이식 마우스에서, 내인성 면역글로불린 유전자좌는 통상적으로 이미 불활화되어 있다. 유전자 이식 동물로부터 인간 항체를 획득하는 방법에 대한 총론은 Lonberg, *Nat. Biotech.*[자연-바이오 기술]23:1117-1125(2005)를 참조한다. 또한 예를 들어, XENOMOUSE™ 기술을 기재하는 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584; HuMab® 기술을 기재하는 미국 특허 번호 5,770,429; K-M MOUSE® 기술을 기재하는 미국 특허 번호 7,041,870 및 VelociMouse®를 기재하는 미국 특허 출원 공개 번호 US 2007/0061900을 참조한다. 이와 같은 동물에 의해 생성된 온전한 항체로부터의 인간 가변 영역은, 예를 들어 상이한 인간 고정 영역과의 결합을 통해 추가로 수식될 수 있다.

[0146] 또한, 하이브리도마에 기반한 방법을 통해 인간 항체(예를 들어, 인간 DAb)를 제조할 수 있다. 인간 단클론 항체를 생성하기 위한 인간 골수종 및 마우스 인간 이종골수종 세포주에 대해 이미 기재된 바 있다(예를 들어, Kozbor, *J. Immunol.* [면역학 잡지]133:3001 (1984); Brodeur 등, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, [단클론 항체 생산기술 및 응용] 제51-63페이지, 마셀 데커, 뉴욕(Marcel Dekker, Inc., New York), 1987; 및 Boerner 등, *J. Immunol.* [면역학 잡지]147:86 (1991)). 인간 B세포 하이

브리도마 기술에 의해 생성된 인간 항체는 또한 Li 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [미국국가과학원 간행물] 103:3557-3562 (2006)에 기재되어 있다. 기타 방법은 예를 들어 미국 특허 번호 7,189,826(하이브리도마 세포주로부터의 단클론 인간 IgM 항체 생성에 대해 기재) 및 Ni, Xiandai Mianyixue [현재 면역학] 26(4):265-268(2006)(인간-인간 하이브리도마에 대해 기재)에 기재된 방법을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술(Trioma 기술)은 또한 Vollmers 및 Brandlein, Histology and Histopathology [조직학 및 조직병리학] 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers 및 Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology [실험 및 임상 약리학에서의 방법 및 발견] 27(3):185-91 (2005)에 기재되어 있다.

[0147] 또한 인간화 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론의 가변 도메인 서열을 분리함으로써 인간 항체 (예를 들어, 인간 DAb)를 생성할 수 있다. 그 다음, 이와 같은 가변 도메인 서열을 원하는 인간 고정 도메인에 결합시킬 수 있다. 항체 라이브러리에서 인간 항체를 선택하는 기술은 아래에 기재되어 있다.

[0148] 2.6 라이브러리 유래 항체

[0149] 본 개시의 항체는 원하는 활성을 갖는 항체의 조합 라이브러리를 선별함으로써 분리될 수 있다. 예를 들어, 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고 이와 같은 라이브러리 중 원하는 결합 특성을 갖는 항체를 선별하기 위한 다양한 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 이와 같은 방법은, 예를 들어 Hoogenboom 등, Methods in Molecular Biology [분자생물학방법]178:1-37 (O'Brien 등 편집, 후마나, 토토와, 뉴저지(Human Press, Totowa, NJ), 2001)에 기재되어 있으며, 또한 예를 들어, McCafferty 등, Nature 348:552-554, Clackson 등, Nature 352:624-628 (1991), Marks 등, J. Mol. Biol. Biol. [분자생물학잡지]222:581-597 (1992), Marks 및 Bradbury, Methods in Molecular Biology [분자생물학 방법]248:161-175(Lo 편집, 후마나, 토토와, 뉴저지 (Human Press, Totowa, NJ), 2003); Sidhu 등, J. Mol. Biol.[분자생물학잡지] 338(2):299-310 (2004); Lee 등, J. Mol. Biol.[분자생물학잡지] 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl.Acad.Sci.USA [미국국가과학원 간행물] 101(34):12467-12472 (2004) 및 Lee 등, J. Immunol.Methods [면역학방법 잡지]284(1-2):119-132 (2004)에 기재되어 있다. 단일 도메인 항체 라이브러리를 구축하는 방법은 이미 기재된 바 있고, 예를 들어, 미국 특허 번호 7371849를 참조한다.

[0150] 일부 파지 디스플레이 방법에서, Winter 등, Ann.Rev.Immunol. [면역학 연도 총론] 12:433-455 (1994)에 기재된 바와 같이, 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 통해 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub> 유전자 라이브러리를 각각 클론하고, 파지 라이브러리에서 무작위로 재조합한 후, 항원 결합 파지를 선별할 수 있는 것이다. 파지는 통상적으로 항체 프래그먼트를 scFv 프래그먼트 또는 Fab 프래그먼트로서 디스플레이한다. 면역 출처의 라이브러리는 별도의 하이브리도마를 구축할 필요 없이, 면역원에 대하여 높은 친화력 항체를 제공할 수 있다. Griffiths 등, EMBO J[유럽 분자생물학학회 잡지] 12:725-734 (1993)에 기재된 바와 같이, 대안적으로, 아무런 면역을 필요로 하지 않는 상황 하에서 원시 라이브러리(예를 들어, 인간으로부터 획득)를 복사함으로써, 광범위한 범위의 비자체 및 자체 항원의 항체의 단일 출처를 제공할 수 있는 것이다. 마지막으로, Hoogenboom 및 Winter, J. Mol. Biol. [분자생물학잡지] 227:381-388(1992)에 기재된 바와 같이, 줄기 세포로부터 재배열되지 않은 V 유전자 프래그먼트를 복사하고, 추가 변 CDR3 영역을 인코딩하고 체외에서 재배열을 완성하기 위한 무작위 서열을 함유하는 PCR 프라이머를 사용하여, 원시 라이브러리를 합성 제조할 수 있다. 인간 항체 파지 라이브러리를 기재하는 특허 출판물은 예를 들어 미국 특허 번호 5,750,373 및 미국 특허 공개번호 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 및 2009/0002360을 포함한다.

[0151] 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체 또는 항체 프래그먼트는 본원에서는 인간 항체 또는 인간 항체 프래그먼트로 간주된다.

[0152] 2.7 항체 변이체

[0153] 본 개시는 또한 개시된 항체의 아미노산 서열 변이체를 제공한다. 예를 들어, 항체의 결합 친화력 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선할 수 있다. 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적절한 수식을 도입하거나 또는 펩티드 합성을 통해 항체의 아미노산 서열 변이체를 제조할 수 있다. 이와 같은 수식은 항체의 아미노산 서열 내의 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합을 진행하여 최종 작제물을 얻을 수 있으며, 그 조건은 최종적(즉, 수식을 받은) 항체가 원하는 특성(예를 들어, 항원 결합)을 갖는다는 것이다.

[0154] 2.7.1 치환, 삽입 및 결실 변이체

[0155] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 항체 변이체를 제공한다. 돌연변이 유도의 목표 부위는

HVR(또는 CDR) 및 FR을 포함한다. 보존적 치환은 표 2에서 "바람직한 치환"이라는 제목 아래 란에 표시된다. 표 2에서 "예시적인 치환"이라는 제목 아래에, 보다 실질적인 변화를 제공하였고, 아미노산 측쇄 부류를 참조하여 아래에서 추가적으로 기재된 바와 같다. 아미노산 치환을 목표 항체에 도입하여, 원하는 활성(예를 들어, 보존/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC)을 갖는 생성물을 선별할 수 있다.

[0156] <표 2> 아미노산 치환

원시 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 노르루신	Leu
Leu (L)	노르루신, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, 노르루신	Leu

[0157]

[0158] 아미노산은 공동의 측쇄 특성에 따라 그룹화될 수 있다: (1)소수성: 노르루신, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2)중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3)산성: Asp, Glu; (4)염기성: His, Lys, Arg; (5)측쇄 방향 확정에 영향을 끼치는 잔기: Gly, Pro; 및(6) 방향족: Trp, Tyr, Phe. 일부 실시양태에서, 비보존적 치환은 이러한 유형 중 하나의 유형의 구성원을 다른 하나의 유형의 구성원으로 교환하는 것이 필요할 것이다.

[0159]

일부 실시양태에서, 하나의 유형의 치환 변이체는 부모 항체(예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것에 관한다. 통상적으로, 추가적인 연구를 위해 선택되는 수득된 변이체는 부모 항체에 비해 상대적으로 일부 생물학적 특성(예를 들어, 증가된 친화력, 감소된 면역원성)에 대한 수식(예를 들어, 개선)을 가지고 및/또는 부모 항체의 일부 생물학적 특성을 대체로 보존할 것이다. 예시적인 치환 변이체는 친화력이 성숙된 항체인 것으로, 이는 예를 들어, 파지 디스플레이에 기반한 친화력이 성숙된 기술(예컨대, 본원에 개시된 기술)을 사용하여 편리하게 생성할 수 있다. 요약하면, 하나 이상의 HVR(또는 CDR) 잔기에 대해 돌연변이시키고, 변이체 항체를 파지에 디스플레이하여 특정 생물학적 활성(예를 들어, 결합 친화력)을 갖는 변이체 항체를 선별한다.

[0160]

HVR(또는 CDR)에서 변경(예를 들어, 치환)을 진행할 수 있어, 예를 들어 항체 친화력을 개선시킨다. 이와 같은 변경은 HVR(또는 CDR) "핫스팟"(즉, 체세포 성숙 과정 기간 고빈도 돌연변이가 일어나는 코돈에 의해 인코딩되는 잔기)(예를 들어, Chowdhury, Methods Mol. Biol. [분자생물학 방법] 207:179-196 (2008)) 및/또는 SDR(a-CDR)에서 진행될 수 있고, 또한 수득된 변이체 VH 또는 VL의 결합 친화력을 테스트한다. 2차 라이브러리의 구축 및 2차 라이브러리로부터의 재선택에 의해 진행되는 친화력 성숙은 이미, 예를 들어 Hoogenboom 등, Methods in Molecular Biology [분자생물학방법]178:1-37(O'Brien 등 편집, 후마나, 토토티와, 뉴저지(In Human Press, Totowa, NJ), (2001))에 기재되어 있다. 친화력 성숙의 일부 실시양태에서, 다양한 방법(예를 들어, 오류 유발 PCR, 사슬 셔플링 또는 올리고뉴클레오타이드 지정 돌연변이 유발) 중 어느 한 방법을 통해, 성숙을 위해 선택되는 가변 유전자에 다양성을 도입시킨다. 그 다음, 2차 라이브러리를 구축한다. 그 다음, 원하는 친화력을 갖는 임의의 항체 변이체를 감정하기 위해 라이브러리를 선별한다. 다양성을 도입하는 또 다른 방법은 HVR(또는 CDR) 지정 방법에 관한 것으로, 여기서 여러 개의 HVR(또는 CDR) 잔기(예를 들어, 한번에 4 내지 6개 잔기)가 무작위화되도록 한다. 예를 들어 알라닌 스캔 돌연변이 유발 또는 모델링을 사용하여 항원 결합 중 관련되는 HVR(또는 CDR) 잔기를 특이적으로 감정할 수 있다. 특히, CDR-H3 및 CDR-L3은 자주 표적화된다.

[0161]

일부 실시양태에서, 이와 같은 변경이 대체로 항체의 항원 결합 능력을 감소시키지만 않으면 치환, 삽입 또는 결실은 하나 이상의 HVR(또는 CDR) 내에서 발생할 수 있다. 예를 들어, HVR(또는 CDR)에서 대체로 결합 친화력

을 감소시키지 않는 보존적 변경(예를 들어, 본원에 제공된 보존적 치환)을 진행할 수 있다. 이와 같은 변경은 HVR(또는 CDR) "핫스팟" 또는 CDR 외부에 있을 수 있다. 위에서 제공된 변이체 VHH 서열의 일부 실시양태에서, 각각의 HVR(또는 CDR)은 흑여는 변경되지 않거나, 그렇지 않으면 흑여는 1개, 2개 또는 3개 이하의 아미노산 치환을 포함한다.

[0162] Cunningham 및 Wells(1989) Science [과학] 244: 1081-1085에 기재된 바와 같이, 돌연변이 유발을 표적으로 할 수 있는 항체의 잔기 또는 영역을 감정하는 유용한 방법을 "알라닌 스캔 돌연변이 유발"이라고 한다. 이와 같은 방법에서, 표적 잔기 또는 표적 잔기 그룹(예를 들어 Arg, Asp, His, Lys 및 Glu와 같은 전하를 갖는 잔기)을 감정하고, 중성 또는 음전하를 띤 아미노산(예를 들어 알라닌산 또는 폴리알라닌)으로 치환하여, 항체와 항원의 상호작용이 영향을 받았는지 여부를 확인한다. 초기 치환에 대한 기능적 민감성을 증명하기 위해, 아미노산 위치에 별도의 치환을 도입시킬 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 항원-항체 복합체의 결정 구조는 항체와 항원 사이의 접촉점을 감정하는 데 사용된다. 이와 같은 접촉 잔기 및 인접 잔기는 치환 후보로서 표적화되거나 제거될 수 있다. 원하는 특성을 포함하는지 여부를 확인하기 위해 변이체를 선별할 수 있다.

[0163] 아미노산 서열 삽입은, 그 길이가 하나의 잔기 내지 100개 이상 잔기를 함유하는 폴리펩티드 범위 내에 있는 아미노기 말단 및/또는 카르복실기 말단 융합; 및 단일 또는 다수개 아미노산 잔기의 서열 내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예시로는, N-말단 메티오닐기 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 기타 삽입 변이체는 항체의 N말단 또는 C말단의 효소(예를 들어, ADEPT용) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드와의 융합을 포함한다.

[0164] 2.7.2 글리코실화 변이체

[0165] 일부 실시양태에서, 항체를 변경시켜 작제물 글리코실화 정도를 증가 또는 감소시킨다. 항체에 대한 글리코실화 부위의 추가 또는 결실은 아미노산 서열을 변경시켜 하나 이상의 글리코실화 부위를 생성 또는 제거함으로써 편리하게 구현될 수 있다.

[0166] 항체가 Fc 영역(예를 들어, scFv-Fc)을 포함할 때, 그에 연결되는 당은 변경할 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생성된 천연 항체는 통상적으로 N쇄에 의해 Fc 영역 C<sub>H</sub>2 도메인의 Asn297에 연결되는 분지형 바이안테너리 올리고당(biantennary oligosaccharide)을 포함한다. 예를 들어, Wright 등, TIBTECH, [생물기술추이] 15:26-32 (1997)를 참조한다. 올리고당은 다양한 당, 예를 들어 만노오스, N-아세틸글루코사민(GlcNAc), 갈락토오스 및 시알산, 및 바이안테너리 올리고당 구조의 "줄기"에서 GlcNAc에 연결된 푸코오스(fucose)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 내의 올리고당에 대하여 수식하여, 일부 개선된 특성을 갖는 항체 변이체를 생성할 수 있다.

[0167] 일부 실시양태에서, 항체는 Fc 영역에 (직접 또는 간접적으로) 연결된 푸코오스가 결여된 당 구조를 갖는다. 예를 들어, 이와 같은 항체에서 푸코오스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. MALDI-TOF 질량 분석법(WO 2008/077546에 기재된 바와 같음)을 통해 계측한 바와 같이, 푸코오스의 양은 당쇄 내 Asn297에 위치되는 푸코오스가 Asn 297에 연결된 모든 당 구조(예를 들어 복합형, 하이브리드형 및 고만노오스 구조)의 총합에 대한 평균 양을 계산하는 것을 통해 확인된다. Asn297이란 Fc 영역에서 약 위치 297(Fc 영역 잔기의 EU 넘버링)에 위치하는 아스파라긴 잔기를 가리키나; 항체의 사소한 서열 변화로 인해 Asn297 역시 위치 297의 업스트림 또는 다운스트림 약 ±3개 아미노산 위치에 위치할 수 있는 것으로, 즉, 위치 294와 300 사이에 위치할 수도 있다. 이와 같은 푸코오실화된 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 US 2003/0157108(Presta, L.); US 2004/0093621(교와 핫코 고교 캄파니(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))를 참조한다. "어푸코실화된" 또는 "푸코스 결핍형" 항체 변이체와 관련된 출판 문헌에 대한 예시로는, US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki 등, J. Mol.Biol.[분자생물학잡지] 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki 등, Biotech.Bioeng.[생물기술 및 생물공정] 87:614(2004)을 포함한다. 어푸코실화된 항체를 생성할 수 있는 세포주의 예시로는, 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포(Ripka 등, Arch. Biochem. Biophys. [생물화학 및 생물물리학 간행물] 249:533-545 (1986); 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1, Presta, L.; 및 WO 2004/056312 A1, Adams 등), 및 α-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자(FUT8) 녹아웃 CHO 세포와 같은 녹아웃 세포주(예를 들어, Yamane-Ohnuki 등, Biotech. Bioeng. [생물기술 및 생물공정] 87:614 (2004); Kanda, Y. 등, Biotechnol. Bioeng. [생물기술 및 생물공정] 94(4):680-688 (2006); 및 WO2003/085107 참조)를 포함한다.

- [0168] 일부 실시양태에서, 항체는 이등분된 올리고당(bisected oligosaccharide)을 갖고, 예를 들어 항체의 Fc 영역에 연결된 바이안테너리 올리고당은 GlcNAc에 의해 이등분된다. 이와 같은 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 증가된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 이와 같은 항체 변이체의 예시로는, 예를 들어 WO 2003/011878(Jean-Mairet 등); 미국 특허 번호 6,602,684(Umana 등); 및 US 2005/0123546(Umana 등)에 기재되어 있다. Fc 영역에 연결된 올리고당 중 적어도 하나의 갈락토스 잔기를 갖는 항체 변이체가 또한 제공된다. 이와 같은 항체 변이체는 향상된 CDC 기능을 가질 수 있다. 이와 같은 항체 변이체는, 예를 들어 WO 1997/30087(Patel 등); WO 1998/58964(Raju, S.); 및 WO 1999/22764(Raju, S.)에 기재되어 있다.
- [0169] 2.7.3 Fc 영역 변이체
- [0170] 일부 실시양태에서, 현재 개시된 항체 또는 항체 유도체의 Fc 영역은 하나 이상의 아미노산 위치에서 아미노산 수식(예를 들어, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열(예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 수식을 항체 부분의 Fc 영역(예를 들어, scFv-Fc 또는 VHH-Fc)으로 도입함으로써, Fc 영역 변이체를 생성할 수 있다.
- [0171] 일부 실시양태에서, 해당 Fc 영역은 전부는 아니지만 일부 이펙터 기능을 갖고 있으며, 이와 같은 기능은 이를 응용함에 있어서 이상적인 후보물질로 되도록 하며, 이러한 응용에서, 항체의 체내에서의 반감기가 매우 중요하지만 일부 이펙터 기능(예컨대, 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 유해한 것이다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해, 체외 및/또는 체내 세포 독성 측정을 수행할 수 있다. 예를 들어, Fc 수용체(FcR) 결합 측정을 수행하여, 항체에 FcγR 결합이 결합(따라서 ADCC 활성이 결합될 가능성이 있음)하지만, FcRn 결합 능력은 보존하는 것을 확보하도록 한다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현하는 반면, 단핵 세포는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII을 발현한다. 조혈 세포에서의 FcR 발현은 Ravetch 및 Kinet, *Annu.Rev.Immunol.* [면역학 연도 총론] 9:457-492(1991) 464페이지의 표 2에 요약되어 있다. 목표 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 체외 측정의 비제한적인 예시로는, 미국 특허 번호 5,500,362(예를 들어, Hellstrom, I. 등, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* [미국국가과학원 간행물] 83:7059-7063 (1986)) 및 Hellstrom, I 등, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* [미국국가과학원 간행물] 82:1499-1502(1985); 5,821,337(Bruggemann, M. 등, *J.Exp.Med.*[실험의학잡지]166:1351-1361(1987) 참조)에 기재되어 있다. 대안적으로, 비방사성 측정 방법(예를 들어 유세포 분석에 사용된 ACT1체 비방사성 세포 독성 측정(마운틴뷰, 캘리포니아주(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA)); 및 CytoTox 96<sup>®</sup> 비방사성 세포 독성 측정(프로메가, 매디슨, 위스콘신주(Promega, Madison WI)) 참조)을 채택할 수 있다. 이와 같은 측정에 사용된 유용한 이펙터 세포에는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 자연 살해(NK) 세포가 포함된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 체내에서, 예를 들어 동물 모델에서, 목표 분자의 ADCC 활성을 평가할 수 있으며, 이는 예컨대 Clynes 등, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* [미국국가과학원 간행물] 95:652-656 (1998)에서 공개되었다. 또한, C1q 결합 측정을 진행하여, 항체가 C1q에 결합할 수 없고 또한 이로 인해 CDC 활성이 결합되어 있음을 확인할 수 있다. 예를 들어 WO 2006/029879 및 WO 2005/100402에서 C1q 및 C3c가 ELISA에 결합하는 것을 참조한다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 측정을 진행할 수 있다(예를 들어, Gazzano-Santoro 등, *J. Immunol. Methods*[면역학방법 잡지] 202:163 (1996); Cragg, M.S. 등, *Blood*[혈액] 101:1045-1052 (2003); 및 Cragg, M.S. 및 M.J. Glennie 등, *Blood*[혈액] 103:2738-2743(2004) 참조). FcRn 결합 및 체내 청소/반감기 측정은 또한 당업계에서 알려진 방법을 사용하여 수행될 수 있다(예를 들어, Petkova, S.B. 등, *Int'l. Immunol.* [국제면역학] 18(12):1759-1769 (2006) 참조).
- [0172] 감소된 이펙터 기능을 갖는 항체에는, Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 잔기가 치환된 항체가 포함된다(미국 특허 번호 6,737,056). 이와 같은 Fc 돌연변이체는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상의 위치에서 치환된 Fc 돌연변이체를 포함하고, 잔기 265 및 297이 알라닌에 의해 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체(미국 특허 번호 7,332,581)를 포함한다.
- [0173] FcR에 대한 결합이 강화되거나 감소된 일부 항체 변이체에 대하여 기재하였다. (예를 들어, 미국 특허 6,737,056; WO 2004/056312 및 Shields 등, *J. Biol. Chem.* [생물화학잡지] 9(2):6591-6604 (2001) 참조)
- [0174] 일부 실시양태에서, Fc 영역은 잔기의 EU 넘버링에 근거한 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 영역이다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 영역은 L234A 돌연변이 및/또는 L235A 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG2 Fc 영역 또는 IgG4 Fc 영역이다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 F234A 및/또는 L235A 돌연변이를 포함하는 IgG4 Fc 영역이다.
- [0175] 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG1 Fc 영역이다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포에 의해

매개된 세포 독성(ADCC)을 조절하는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포에 의해 매개된 세포 독성(ADCC)을 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 영역은 항체 의존성 세포에 의해 매개된 세포 독성(ADCC)을 증강시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P, Y300L 및 P396L의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 영역은 S239D, A330L 및 I332E의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 영역은 L235V, F243L, R292P 및 Y300L의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG1 Fc 영역은 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334에서 치환을 포함한다.

[0176] 일부 실시양태에서, Fc 영역은 IgG4 Fc 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, IgG4 Fc 영역은 S228P 돌연변이를 포함한다.

[0177] 일부 실시양태에서, Fc 영역은 C말단 라이신을 포함한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 C말단 라이신의 결실을 포함한다.

[0178] 일부 실시양태에서, Fc 영역에 대한 변경은 C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포 독성(CDC)에 대한 변경(즉, 향상 또는 감소)을 초래하고, 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642 및 Idusogie 등, J. Immunol.[면역학 잡지] 164:4178-4184 (2000)에 기재된 바와 같다.

[0179] 일부 실시양태에서, 항체(예를 들어, scFv-Fc 또는 VHH-Fc) 변이체는, 변이체 Fc 영역을 포함하고, 해당 변이체 Fc 영역은 반감기를 변경하고 및/또는 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합을 변경하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 연장된 반감기 및 신생아 Fc 수용체(FcRn)와의 개선된 결합을 갖는 항체에 있어서, 해당 FcRn은 모 IgG를 태아로 전이시키는 역할을 하는 것(Guyer 등, J. Immunol.[면역학 잡지] 117: 587 (1976) 및 Kim 등, J. Immunol.[면역학 잡지] 24: 249 (1994))은 US2005/0014934A1에 기재되어 있다(Hinton 등,). 이러한 항체는 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 Fc 영역을 포함하고, 이러한 치환은 Fc 영역이 FcRn과의 결합을 변경시킨다. 이와 같은 Fc 변이체는 Fc 영역 잔기 중 하나 이상의 잔기에서 치환(예를 들어 Fc 영역 잔기 434의 치환)을 갖는 Fc 변이체를 포함한다(미국 특허 번호 7,371,826).

[0180] 또한, Duncan 및 Winter, Nature [자연] 322: 738-40 (1988); 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 Fc 영역 변이체에 관한 기타 예시의 WO 94/29351을 참조한다.

[0181] 2.7.4 시스템인 조작된 항체 변이체

[0182] 일부 실시양태에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스템 잔기에 의해 치환된 "thioMAB"와 같은 시스템인 조작된 항체 부분을 생성하는 것을 기대할 수 있다. 일부 실시양태에서, 치환된 잔기는 항체 접근 가능 부위에서 나타난다. 본원에 추가적으로 기재될 바와 같이, 이러한 잔기를 시스템인으로 치환함으로써, 반응성 티올기는 항체의 접근 가능한 부위에 위치하고 항체를 기타 부분(예컨대, 약물 부분 또는 링커-약물 부분)에 접합하는 데 사용하여, 면역접합체를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하기 잔기 중 임의의 하나 이상의 잔기는 시스템인에 의해 치환될 수 있다: 중쇄의 A118(EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400(EU 넘버링). 시스템인 조작된 항체 부분은 예를 들어 미국 특허 번호 7,521,541에 기재된 바와 같이 생성될 수 있다.

[0183] 2.8 항체 유도체

[0184] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 추가적으로 당업계에서 알려져 있고 획득하기 쉬운 별도의 단백질 또는 비단백질 부분을 포함하는 항체 유도체로 수식될 수 있다. 항체 유도 작용에 적합한 비단백질 부분은 수용성 중합체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 수용성 중합체의 비제한적인 예시로는, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈, 폴리-1,3-디옥산, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/무수말레산 공중합체, 폴리아미노산(호모폴리머 또는 랜덤 공중합체), 및 텍스트란 또는 폴리(n-에틸렌 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 호모폴리머, 폴리프로필렌옥사이드/에틸렌옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올(예를 들어 글리세린), 폴리비닐 알코올, 및 이들의 혼합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에 있을때의 안정성으로 인해 제조에서 우세를 가질 수 있다. 해당 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 연결된 중합체의 수는 변화할 수 있으며, 하나 넘는 중합체가 연결된 경우 이들은 동일한 분자 또는 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 양 및/또는 유형은 개선된 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 한정된 조건 하에서 진단 등을 위해 사용될 것인지 여부 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 요소를 기반으로 하여 확인될 수 있다.

[0185] 일부 실시양태에서, 항체는 하나 이상의 생물학적 활성을 갖는 단백질, 폴리펩티드 또는 그 프래그먼트를 포함

하는 항체 유도체로 추가로 수식될 수 있다. 본원에서 서로 교환해서 사용 가능한 바와 같이, "생물학적 활성" 또는 "생물학적 활성을 갖는"이란 특정 기능을 수행하기 위해 체내에서 생물학적 활성을 나타내는 것을 의미한다. 예를 들어, 특정 생물 분자(예컨대 단백질, DNA 등)에 결합한 다음, 해당 생물 분자의 활성을 촉진하거나 억제하는 것을 의미할 수 있다. 일부 실시양태에서, 생물학적 활성 단백질 또는 그 프래그먼트는, 질환 또는 병세의 예방 또는 치료를 위한 활성 약물 물질로서 환자에게 투여되는 단백질 및 폴리펩티드; 및 진단 목적으로 사용되는 단백질 및 폴리펩티드(예컨대 진단 테스트 또는 체외 측정에서 사용되는 효소); 및 질환의 예방을 위해 환자에게 투여되는 단백질 및 폴리펩티드(예컨대 백신)를 포함한다.

[0186] 2.9 생성 방법

[0187] 본원에 개시된 항체 및 항체 유도체는 당업계에 획득 가능하거나 또는 이미 알려진 임의의 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 항체 및 항체 유도체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,816,567에 기재된 바와 같이 재조합 방법 및 조성물을 사용하여 생성될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 항체 및 항체 유도체 생성하는 자세한 과정은 아래 실시예에 기재되어 있다.

[0188] 현재 개시된 주제는 또한 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체를 인코딩하는 분리된 핵산을 제공한다. 예를 들어, 분리된 핵산은 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및/또는 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열(예를 들어, 항체의 경쇄 및/또는 중쇄)을 인코딩할 수 있다.

[0189] 일부 실시양태에서, 핵산은 하나 이상의 벡터(예를 들어, 발현 벡터)에 존재할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "벡터"란 연결된 다른 핵산을 운송할 수 있는 핵산 분자를 가리킨다. 한 가지 벡터는 "플라스미드"이며, 이는 다른 DNA 구간을 연결시킬 수 있는 고리형 이중 DNA 고리를 가리킨다. 다른 한 가지의 벡터는 바이러스 벡터이며, 다른 DNA 구간을 바이러스 유전체에 연결시킬 수 있다. 일부 벡터는 이들을 도입한 숙주 세포에서 스스로 복제할 수 있다(예를 들어, 박테리아 복제 개시점을 갖는 박테리아 벡터 및 부가형 포유동물 벡터). 기타 벡터(예를 들어, 비부가형 포유동물 벡터)는 숙주 세포로 도입 후, 숙주 세포의 유전체에 통합됨으로써, 숙주 세포 유전체를 따라 함께 복제된다. 또한, 일부 벡터(발현 벡터)는 이들과 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 가이드할 수 있다. 일반적으로 재조합 DNA 기술에 사용되는 발현 벡터는 종종 플라스미드(벡터) 형식이다. 그러나 개시된 주제는 동등한 기능을 갖는 바이러스 벡터(예를 들어 복제 결함성 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스)와 같은 기타 형태의 발현 벡터를 포함하고자 한다.

[0190] 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체의 상이한 부분은 단일 폴리시스트론 발현 카세트, 단일 벡터 내의 다수개 발현 카세트, 또는 다중 벡터에서 구축될 수 있다. 폴리시스트론 발현 카세트를 생성하는 요소의 예시로는, 다양한 바이러스 및 비바이러스 내부 리보솜 진입 부위(IRES, 예를 들어 FGF-1 IRES, FGF-2 IRES, VEGF IRES, IGF-II IRES, NF- $\kappa$ B IRES, RUNX1 IRES, p53 IRES, A형 간염 IRES, C형 간염 IRES, 페스티바이러스 IRES, 구제역 IRES, 피코르나바이러스 IRES, 폴리오바이러스 IRES 및 너심근염 바이러스 IRES) 및 절단 가능한 링커(예를 들어 P2A, T2A, E2A 및 F2A 펩티드와 같은 2A 펩티드)를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 또한 역전사 바이러스 벡터와 적절한 패키징 세포주의 조합 역시 적절한 것이며, 여기서, 합캡시드 단백질은 인간 세포를 감염시킬 수 있는 기능을 갖는다. PA12(Miller 등 (1985) Mol. Cell. Biol.[분자세포 생물학] 5:431-437); PA317(Miller 등 (1986) Mol. Cell.Biol.[분자세포 생물학]6:2895-2902) 및 CRIP(Danos 등 (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA [미국국가과학원 간행물]85:6460-6464)을 포함하나 이에 한정되지 않는 양친매성 바이러스를 생성하는 다양한 세포주는 이미 알려져 있다. 비양친매성 입자 역시 적합한 것이며, 예를 들어 VSVG, RD114 또는 GALV로 피막된 가형 과립 및 당업계에 알려진 임의의 기타 비양친매성 입자이다.

[0191] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체 또는 항체 유도체를 인코딩하는 핵산 및/또는 해당 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터를 숙주 세포로 도입시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 형질감염, 전기천공법, 미세주입, 핵산 서열을 함유하는 바이러스 또는 파지 벡터로의 감염, 세포 융합, 염색체에 의해 매개된 유전자 전이, 미니세포에 의해 매개된 유전자 전이, 스페로플라스트 융합 등을 포함하나 이에 한정되지 않는 당업계에 알려진 임의의 방법을 통해 세포로 도입시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 예를 들어 단일 도메인 항체 및/또는 단일 도메인 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 예를 들어 (1) 항체의 VL을 포함하는 아미노산 서열 및 VH를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제1 벡터 및 항체의 VH를 포함하는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산을 포함하는 제2 벡터;로 형질전환된 숙주 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 림프성 세포(예를 들어, YO, NSO, Sp20 세포)와 같은 진핵 세포이다.

- [0192] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체를 제조하는 방법은, 해당 항체 또는 항체 유도체를 인코딩하는 핵산이 이미 도입된 숙주 세포를 그 항체 또는 항체 유도체를 발현하기에 적합한 조건 하에 배양하는 단계, 및 선택적으로 해당 숙주 세포 및/또는 숙주 세포 배지로부터 그 항체 또는 항체 유도체를 회수하는 단계;를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 크로마토그래피 기술을 통해 숙주 세포로부터 회수된다.
- [0193] 본 개시의 항체 또는 항체 유도체의 재조합 생성을 위해, 예를 들어 위에 기재된 바와 같은 항체 또는 항체 유도체를 인코딩하는 핵산을 분리시키고 숙주 세포에서의 추가 복제 및/또는 발현을 위해 하나 이상의 벡터 내로 삽입할 수 있다. 이와 같은 핵산은 통상적인 절차를 사용하여(예를 들어, 항체 또는 항체 유도체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용) 쉽게 분리되고 시퀀싱될 수 있다. 항체를 인코딩하는 벡터를 복제 또는 발현하기에 적합한 숙주 세포는 본원에 기재된 원핵 또는 진핵 세포를 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 항체 유도체는 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않을 때 박테리아에서 생성될 수 있다. 박테리아에서 항체 프래그먼트 및 폴리펩티드의 발현에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 5,648,237, 5,789,199 및 5,840,523을 참조한다. (또한, Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol.[분자생물학방법] 248 (B.K.C. Lo 편집, 후마나, 토토와, 뉴저지(Human Press, Totowa, NJ), 2003) 제245-254페이지, 항체 프래그먼트의 대장균에서의 발현에 대해 기재, 참조). 발현 후, 항체 또는 항체 유도체는 박테리아 세포 페이스트로부터 가용성 분획으로 분리될 수 있고 추가로 정제될 수 있다.
- [0194] 원핵 생물 외에도, 진핵 미생물(예컨대, 사상성 진균 또는 효모균)도 항체의 벡터 인코딩에 적합한 복제 또는 발현 숙주이고, 글리코실화 경로가 이미 "인간화"된 것을 포함하여, 이로써 부분적 또는 완전적인 인간 글리코실화 양상을 갖는 항체 또는 항체 유도체의 진균 및 효모균주를 생성한다. Gemgross, *Nat. Biotech.*[자연-생물기술] 22:1409-1414 (2004) 및 Li 등, *Nat. Biotech.* [자연-생물기술]24:210-215 (2006) 참조. 글리코실화된 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 또한 다세포 생물(무척추동물 및 척추동물)로부터 유래될 수 있다. 무척추동물 세포의 예시로는 식물 세포 및 곤충 세포를 포함한다. 특히 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 형질감염을 위해 곤충 세포와 함께 사용될 수 있는 다수의 바칼로바이러스 균주가 이미 감정되었다. 일부 실시양태에서, 식물 세포 배양물은 숙주 세포로 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 및 6,417,429(유전자 이식 식물에서 항체를 생성하는 PLANTIBODIES™ 기술에 대해 기재)를 참조한다.
- [0195] 일부 실시양태에서, 척추동물 세포 역시 숙주로 사용될 수 있다. 예를 들어, 현탁액에서 성장하도록 적응된 포유동물 세포주가 유용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 비제한적 예시로는 SY40(COS-7) 형질전환된 원숭이 신장 세포주 CV1; 인간 배아 신장 세포주(293 또는 293 세포, 예를 들어 Graham 등, *J Gen Viral.*[유전자 바이러스 잡지] 36:59 (1977)에 기재); 아기 햄스터 신장 세포(BHK); 마우스 Sertoli 세포(TM4 세포, 예를 들어 Mather, *Biol. Reprod.* [번식생물학] 23:243-251 (1980)에 기재); 원숭이 신장 세포(CV 1); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76); 인간 자궁경부암 세포(HELA); 개 신장 세포(MDCK; 물소 래트(buffalo rat) 간 세포(BRL 3A)); 인간 폐세포(W138); 인간 간세포(Hep 02); 마우스 유방 종양(MMT 060562); TRI 세포(예를 들어 Mather 등, *Annals N. Y. Acad.Sci.*[뉴욕과학원 연간 간행물] 383:44-68(1982)에 기재된 바와 같음); MRC 5 세포; 및 FS4 세포;이다. 다른 유용한 포유동물 숙주 세포주는, DHFK CHO 세포(Urlaub 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [미국국가과학원 간행물] 77:42 I6 (1980))를 포함하는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포; 및 YO, NSO 및 Sp2/0과 같은 골수종 세포주;를 포함한다. 항체 또는 항체 유도체의 생성에 적합한 특정 포유동물 숙주 세포주에 대한 총론은, 예를 들어 Yazaki 및 Wu, *Methods in Molecular Biology*, [분자생물학방법] 제248권 (B.K.C. Lo 편집, 후마나, 토토와, 뉴저지(Human Press, Totowa, NJ), 제255-268페이지 (2003))을 참조한다.
- [0196] 일부 실시양태에서, 이중특이성 및/또는 다중특이성 항체를 제조하기 위한 기술은, 동일한 특이성을 갖는 두 개의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 쌍의 재조합 발현, 여기서 중쇄 또는 경쇄 중 하나 또는 둘은 상이한 특이성을 갖는 항원 결합 부분(예를 들어, VHH 또는 scFv)에 융합되고; 상이한 특이성을 갖는 두 개의 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 쌍의 재조합 공동 발현(Milstein 및 Cuello, *Nature* [자연] 305:537 (1983), PCT 특허 출원 번호 WO 93/08829 및 Traunecker 등, *EMBO J* [유럽 분자생물학학회 잡지] 10:3655(1991) 참조); 및 "손잡이 구조" 공학(예를 들어, 미국 특허 번호 5,731,168 참조);을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이중특이적 항체는 또한 항체 Fc-이종이량체 분자의 생성을 위한 조작된 정전기적 조작(WO 2009/089004A 1); 두 개 이상의 항체 또는 프래그먼트의 가교결합(예를 들어, 미국 특허 번호 4,676,980 및 Brennan 등, *Science*, 229:81 (1985) 참조); 이중특이적 항체를 생성하기 위한 류신 지퍼의 사용(예를 들어, Kostelny 등, *J Immunol.* [면역학 잡지] 148(5):

1547-1553 (1992) 참조); 이중특이적 항체 프래그먼트를 제조하기 위한 "이중항체" 기술(예를 들어, Hollinger 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA [미국국가과학원 간행물] 90:6444-6448 (1993) 참조); 및 단쇄 Fv(sFv) 이합체(예를 들어, Gruber 등, J. Immunol. [면역학 잡지] 152:5368 (1994) 참조); 및 삼중특이성 항체의 제조(예를 들어 Tutt 등, J Immunol. [면역학 잡지] 147:60 (1991));의 방법으로 제조될 수 있다.

[0197] 본 개시의 이중특이성 및 다중특이성 분자는 또한 화학적 기술(예를 들어, Kranz(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [미국국가과학원 간행물] 78:5807 참조), "폴리오마" 기술(예를 들어, 미국 특허 4,474,893 참조) 또는 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 현재 개시된 주제의 이중특이적 및 다중특이적 분자는 또한 당 업계에 알려져 있고 본원에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여, 접합 부분을 통해 특이성(예를 들어, 제1 에피토프 및 제2 에피토프 결합 특이성)을 결합하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 이중특이성 및 다중특이성 분자의 각각의 결합 특이성은 재조합 융합 단백질 기술을 통해 함께 생성될 수 있거나, 또는 별도로 생성된 다음 서로 접합될 수 있다. 결합 특이성이 단백질 또는 펩티드인 경우, 다양한 커플링제 또는 가교제를 사용하여 공유 결합을 수행할 수 있다. 가교제의 비제한적 예시로는 단백질 A, 카르보다이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), N-숙신이미딜-3-(2-피리디닐디티오)프로피오네이트(SPDP) 및 설포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(설포-SMCC)(예를 들어, Karpovsky (1984) J. Exp. Med. [실험의학잡지] 160:1686; Liu (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA [미국국가과학원 간행물] 82:8648 참조)를 포함한다. 다른 방법으로는 Paulus(Behring Ins. Mitt. [베링연구소 통보] (1985), 제78기, 제118-132페이지); Brennan((1985) Science [과학] 229:81-83); Glennie((1987) J Immunol. [면역학 잡지] 139:2367- 2375)에 기재된 방법을 포함한다. 결합 특이성이 항체(예를 들어, 두 가지 인간화 항체)인 경우, 이들은 두 개 중쇄의 C말단 힌지 영역의 설프하이드릴 결합을 통해 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 접합 전에 홀수 개(예를 들어, 하나)의 설프히드릴 잔기를 포함하도록 수식될 수 있다.

[0198] 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체의 두 가지 결합 특이성은 동일한 벡터에서 인코딩되고, 동일한 숙주 세포에서 발현 및 조립될 수 있다. 이 접근법은 이중특이성 및 다중특이성 분자가 MAb×MAb, MAb×Fab, Fab×F(ab')<sub>2</sub> 또는 리간드×Fab 융합 단백질일 때 특히 유용하다. 일부 실시양태에서, 본 개시의 이중특이적 항체는 하나의 단쇄 항체 및 결합 결정자를 포함하는 단쇄 이중특이성 분자 또는 두 개의 결합 결정자를 포함하는 단쇄 이중특이적 분자와 같은 단쇄 분자일 수 있다. 이중특이성 및 다중특이성 분자는 또한 단쇄 분자일 수 있거나 또는 적어도 두 개의 단쇄 분자를 포함할 수 있다. 이중특이성 분자 및 다중특이적 분자의 제조 방법은 예를 들어 미국 특허 번호 5,260,203; 미국 특허 번호 5,455,030; 미국 특허 번호 4,881,175; 미국 특허 번호 5,132,405; 미국 특허 번호 5,091,513; 미국 특허 번호 5,476,786; 미국 특허 번호 5,013,653; 미국 특허 번호 5,258,498; 및 미국 특허 번호 5,482,858에 기재되어 있다. 본원에는 3개 이상의 기능성 항원 결합 부위(예를 들어, 에피토프 결합 부위)를 갖는 조작된 항체("문어 항체" 포함)(예를 들어 US 2006/0025576A1 참조)를 또한 포함한다.

[0199] 일부 실시양태에서, 동물 시스템을 사용하여 본 개시의 항체 또는 항체 유도체를 생성할 수 있다. 하이브리도마를 제조하기 위한 한 가지의 동물 시스템은 마우스 시스템이다.

[0200] 마우스에서의 하이브리도마 생성은 잘 확립된 과정이다. 융합을 위해 면역화된 비장 세포를 분리시키기 위한 면역화 방안 및 기술은 당업계에 알려져 있다. 융합 파트너(예를 들어, 무린 골수종세포) 및 융합 절차도 알려진 것이다(예를 들어 Harlow 및 Lane (1988), Antibodies, A Laboratory Manual [항체실험실매뉴얼], 콜드스프링하버실험실출판사, 뉴욕(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York) 참조).

[0201] 2.10 측정

[0202] 당업계에 알려지거나 본원에 제공된 다양한 측정을 통해 본원에서 제공되는 본 개시의 항체 및 항체 유도체에 대해 감정, 선별을 수행하거나, 또는 이들의 물리적/화학적 특성 및/또는 생물학적 활성에 대해 특징으로 표현할 수 있다.

[0203] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체 또는 항체 유도체의 항원 결합 활성은 알려져 있는 방법(예컨대 효소결합면역흡착측정법(ELISA), 방사성 면역 측정(RIA) 또는 웨스턴 블롯 측정)을 통해 테스트될 수 있다. 이러한 측정 각각은 통상적으로 특정 목적 단백질-항체 복합체에 특이적으로 표지된 시약(예를 들어 항체)을 사용하여 해당 목적 복합체의 존재를 검출한다. 예를 들어, 항체 또는 항체 유도체는, 예를 들어 항체 또는 항체 유도체를 인식하고 특이적으로 결합하는 효소 결합 항체 또는 항체 프래그먼트를 사용하여 검출될 수 있다. 대안적으로, 항체 또는 항체 유도체는 다양한 기타 면역 측정 중 임의의 하나를 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항체 유도체를 방사성 표지화하여 방사성면역 측정(RIA)에서 사용될 수 있다(예를 들어, Weintraub, B.,

Principles of Radioimmunoassays [방사성면역 측정의 원칙], Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques [방사성 리간드 측정기술의 제7차 교육 과정], The Endocrine Society [내분비 학회], 1986년 3월, 참조로서 본원에 통합). 예컨대 게이저(Geiger) 계수기 또는 신틸레이션 계수기를 사용하거나 자동 방사선 촬영 등 수단으로 방사성 동위원소를 검출할 수 있다.

[0204] 일부 실시양태에서, 경쟁 측정은 본 개시의 항체와 경쟁하여 CD47을 결합하는 항체 또는 항체 유도체를 감정하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이와 같은 경쟁성 항체는 본원에 개시된 항체와 동일한 에피토프(예를 들어, 선형 에피토프 또는 형태적 에피토프)에 결합한다. Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols [에피토프 매핑 방안]," Methods in Molecular Biology [분자생물학적 방법], 제66권 (후마나, 토토와, 뉴저지 (Human Press, Totowa, NJ))에서 항체가 결합된 에피토프를 매핑하기 위한 상세한 예시적인 방법을 제공하였다.

[0205] 경쟁 측정의 비제한적 예시에서, 고정된 CD47은 CD47에 결합하는 제1 표지 항체 또는 항체 유도체 및 제1 항체와 경쟁하여 CD47을 결합하는 능력을 테스트하는 제2 미표지 항체를 포함하는 용액에서 인큐베이션될 수 있다. 제2 항체는 하이브리도마 상정액에 존재할 수 있다. 대조군으로서, 고정화된 CD47을 제1 표지 항체는 포함하되, 제2 미표지 항체는 포함하지 않는 용액에서 인큐베이션한다. CD47과 제1 항체의 결합을 허용하는 조건 하에서 인큐베이션한 후, 과량의 결합되지 않은 항체를 제거하고, 고정된 CD47과 관련된 표지의 양을 계측한다. 고정된 CD47과 관련된 표지의 양이 대조 샘플에 비해 테스트 샘플에서 크게 감소했다면, 이는 제2 항체가 제1 항체와 경쟁하여 CD47을 결합하고 있음을 나타낸다. Harlow 및 Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual [항체실험실 매뉴얼] 제14장 콜드스프링하버실험실, 뉴욕(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)을 참조한다.

[0206] 본 개시는 생물학적 활성을 갖는 항 CD47 항체 또는 그 항체 유도체를 감정하기 위한 측정을 제공한다. 생물학적 활성은 예를 들어 면역 세포의 활성화 또는 리포터 분자(예를 들어 NFAT 리포터 분자 또는 NF-κB 리포터 분자 포함)의 면역 활성화를 포함할 수 있다. 또한, 체내 및/또는 체외에서 이와 같은 생물학적 활성을 갖는 항체를 제공한다.

[0207] 2.11 면역접합체

[0208] 현재 개시된 주제는 또한 면역접합체를 제공하며, 해당 면역접합체는 하나 이상의 검출 프로브 및/또는 세포 독성제(예컨대, 화학요법제 또는 약물, 성장 억제제, 독소(예를 들어, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 유래의 효소 활성 독소, 또는 이들의 프래그먼트)) 또는 방사성 동위원소에 접합되는 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체를 포함한다. 예를 들어, 개시된 주제의 항체 또는 항원 결합 부분은 하나 이상의 기타 결합 분자(예컨대, 다른 항체, 항체 프래그먼트, 펩티드 또는 결합 모방체)에 기능적으로 연결될 수 있다(예를 들어, 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유 결합 또는 기타 방식).

[0209] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 항체 약물 접합체(ADC)이며, 여기서 항체는 하나 이상의 약물에 접합되는 것으로, 메이트탄시노이드(미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 참조); 모노메틸 오리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF(MMAE 및 MMAF)와 같은 아우리스타틴(auristatin)(미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588 및 7,498,298 참조); 돌라스타틴; 칼리케아미신 또는 이의 유도체(미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 및 5,877,296, Hinman 등, [암 연구] 53:3336-3342 (1993) 및 Lode 등, [암 연구] 58:2925-2928 (1998)); 도노마이신 또는 페니실린신(Kratz 등, Current Med. Chem. [현대약물화학] 13:477-523 (2006); Jeffrey 등, Bioorganic & Med.Chem.Letters [생물유기화학 및 의약화학통신] 16:358-362 (2006), Torgov 등, Bioconj.Chem.[생물접합화학] 16:717-721(2005), Nagy 등, Proc.Natl.Acad.Sci.USA[미국국가과학원 간행물] 97 829-834(2000); Dubowchik 등, Bioorg.& Med.Chem.Letters [생물유기화학 및 의약화학통신] 12:1529-1532(2002); King 등, J Med.Chem. [의약화학잡지] 45:4336-4343(2002); 및 미국 특허 번호 6,630,579를 참조)와 같은 안트라사이클린; 메토티렉세이트 빈데신, 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀(larotaxel), 테세탁셀(tesetaxel) 및 오르타탁셀(ortataxel)과 같은 타산; 트리코테센(trichothecene) 및 CC1065를 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0210] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 효소 활성 독소 또는 그 프래그먼트에 접합된 본원에 기재된 항체를 포함하고, 해당 효소 활성 독소 또는 그 프래그먼트는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 사슬(녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, α-사르신, 유동단백질(*Aleurites fordii* proteins), 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolaca americana*) 단백질(PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 커신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토겔린(*mitogellin*), 제한토신(*restrictocin*), 페노

마이신(*phenomycin*), 에노마이신(*enomycin*) 및 트리코테센(*tricothecenes*)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0211] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 방사성접합체를 형성하기 위해 방사성 원자에 접합된 본원에 기재된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소를 사용하여 방사성접합체를 생성할 수 있다. 비제한적인 예시로는 At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup>, Pb<sup>212</sup> 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성 접합체를 검출에 사용하는 경우, 심광현상연구를 위한 tc99m 또는 1123과 같은 방사성 원자, 또는 요오드 123, 요오드 131, 인듐 11, 붐소 19, 탄소 13, 질소 15, 산소 17, 가돌리늄, 망간 또는 철과 같은 핵자기공명(NMR) 영상(자기 공명 영상, MRI라고도 함)을 위한 스핀 표지를 포함할 수 있다.

[0212] 다양한 이중 기능적 단백질 커플링제(예를 들어, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카복실레이트(SMCC), 이미노티올란(IT), 이미도에스테르의 이중 기능성 유도체(예를 들어, 디메틸 아디피미데이트HC1), 활성 에스테르(예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드(예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들어, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 이활성 붐소 화합물(예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠))을 사용하여 항체 및 세포 독성제의 접합체를 제조할 수 있다. 예를 들어, Vitetta 등, Science [과학], 238: 1098 (1987)에 기재된 바와 같이 리신 면역 독소를 제조할 수 있다. 탄소 4-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민-펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사성 뉴클레오타이드를 항체에 접합하기 위한 예시적인 킬레이트제이다. WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포에서 세포독성 약물 방출을 촉진시키는 "절단 가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커, 펩티다제-민감성 링커, 광 불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 이황화물 함유 링커가 사용될 수 있다(Chari 등, Cancer Res.[암 연구] 52:127- 131 (1992); 미국 특허 번호 5,208,020).

[0213] 본원에서 면역접합체 또는 ADC는 가교제로 제조한 접합체를 명확히 망라하나, 이에 한정되지 않고, 이러한 가교제는 상업적으로 구입 가능한 BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 설폰-EMCS, 설폰-GMBS, 설폰-KMUS, 설폰-MBS, 설폰-SIAB, 설폰-SMCC, 및 설폰-SMPB, 및 SVSB(숙신이미딜-(4-비닐설폰)벤조에이트)(예를 들어, 미국 일리노이주 록퍼드 의피어스 바이오테크놀로지 회사(Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)로부터 유래)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0214] 2.12 항원 식별 수용체

[0215] 현재 개시된 주제는 또한, 본원에 개시된 항체 또는 항체 프래그먼트를 포함하는 항원 식별 수용체를 제공한다. 항원 식별 수용체는 항원에 대한 결합에 응답하여 면역 응답 세포(예를 들어, T세포)를 활성화, 자극 또는 억제할 수 있는 수용체이다. 항원-식별 수용체의 비제한적 예시로는 천연 및 재조합 T세포 수용체("TCR"), 키메라 공동자극 수용체(CCR), 키메라 항원 수용체("CAR") 또는 억제성 CAR(iCAR)을 포함한다. 항원 식별 수용체의 설계 및 사용 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 국제 공개 WO 2018/027155, WO 2019/099483, WO 2019/157454, WO 2019/133969, WO 2019/ 099993, WO 2015/142314, WO 2018/027197 및 WO 2014055668에 기재되어 있다.

[0216] 일부 실시양태에서, 현재 개시된 주제는 본원에 개시된 항체 또는 항체 프래그먼트를 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다. CAR은 조작된 수용체인 것으로, 이는 목표 특이성을 면역 이펙터 세포로 이식 또는 부여할 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 단클론 항체의 특이성을 T세포로 이식하는 데 사용될 수 있으며; 그 인코딩 서열의 이식은 벡터에 의해 촉진된다. 일부 실시양태에서, CAR은 "1세대" CAR인 것으로, 이는 통상적으로 세포외 항원 결합 도메인(예를 들어, scFv 또는 VHH), 막관통 도메인 및 세포질/세포내 신호전달 도메인으로 구성되며, 해당 세포외 항원 결합 도메인(예를 들어, scFv 또는 VHH)은 해당 막관통 도메인과 융합되고, 해당 막관통과 도메인은 해당 세포질/세포내 신호전달 도메인과 융합된다. "1세대" CAR은 드노보(de novo) 항원 식별을 제공하며, HLA에 의해 매개된 항원 제시에 의존하지 않고, 단일 융합 분자 중의 이들의 CD3z 사슬 신호전달 도메인을 통해 면역 응답 세포(예를 들어, CD4+ 및 CD8+ T세포)의 활성화를 일으킬 수 있다. 일부 실시양태에서, CAR은 "2세대" CAR인 것으로, 이는 다양한 공동자극 분자(예를 들어 CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, CD27, CD40/My88 및 NKGD2)에서 CAR의 세포질 꼬리부까지에 이르는 세포내 신호전달 도메인을 또한 포함하여, 면역 응답 세포에 별도의 신호를 제공하며, 이로써 "2세대" CAR은 공동자극(예를 들어, CD28 또는 4-1BB) 및 활성화(CD3z) 양자 모두를 제공하는 CAR을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 "3세대" CAR인 것으로, 이는 다수개의 공동자극 도메인(예를 들어, CD28 및 4-1BB) 및 활성화(CD3z)를 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 2세대 CAR이다. 일부 실시양태에서, CAR은 항원에 결합하는 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하며, 해당 세포내 신호전달 도메인은 공동자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서,

CAR은 세포의 항원 결합 도메인 및 막통과 도메인 사이에 위치되는 힌지 사슬/스페이서 영역을 또한 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포의 항원 결합 도메인은 본원에 개시된 항체 또는 항체 프래그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 프래그먼트는 VHH 또는 scFv를 포함한다.

[0217] 일부 실시양태에서, 현재 개시된 주제는 본원에 개시된 항체 또는 항체 프래그먼트를 포함하는 재조합 TCR을 제공한다. 천연 TCR은 이항화 결합으로 연결된 이중이량체 단백질을 포함하는 단백질 복합물이며, 해당 이중이량체 단백질은 CD3 사슬을 함유하는 분자를 발현하는 복합물 일부 중 두 개의 가변 사슬로 구성된다. 천연 TCR은 T세포 표면에 존재하고, 주요 조직 상용성 복합체(MHC) 분자와 결합하는 펩티드로서의 항원에 대한 식별을 담당한다. 일부 실시양태에서, 천연 TCR은  $\alpha$  사슬 및  $\beta$  사슬을 포함한다(*TRA* 및 *TRB* 유전자로 각각 인코딩). 일부 실시양태에서, 천연 TCR은  $\gamma$  사슬 및  $\delta$  사슬을 포함한다(*TRG* 및 *TRD* 유전자로 각각 인코딩).  $\alpha$  사슬,  $\beta$  사슬,  $\gamma$  사슬 및  $\delta$  사슬 중 각 사슬은 두 개의 세포의 도메인인 가변(V) 영역 및 고정(C) 영역을 포함한다. 고정 영역은 세포막에 인접해 있고, 그 다음 막관통 영역, 짧은 세포질 꼬리부 순으로 인접해 있다. 가변 영역은 펩티드/MHC 복합체와 결합한다. 각각의 가변 영역은 세 개의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는다. 일부 실시양태에서, TCR은 CD3  $\delta$ , CD3  $\gamma$ , CD3  $\epsilon$  및 CD3  $\zeta$ 를 갖는 수용체 복합체를 포함한다. TCR 복합체가 그 항원 및 MHC(펩티드/MHC)에 결합하는 경우, TCR 복합체를 발현하는 T세포는 활성화된다.

[0218] 일부 실시양태에서, 재조합 TCR은 비천연적으로 존재하는 TCR이다. 일부 실시양태에서, 해당 재조합 TCR은 재조합  $\alpha$  사슬 및/또는 재조합  $\beta$  사슬을 포함하는 것으로, 해당 재조합  $\alpha$  사슬 및/또는 해당 재조합  $\beta$  사슬의 가변 영역 일부 또는 전체는 본원에 개시된 항체 또는 항체 프래그먼트에 의해 대체된다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 프래그먼트는 VHH, VH, VL 또는 scFv를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 프래그먼트는 VHH를 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 TCR은 MHC/HLA 비의존성 방식으로 목표 항원에 결합한다. 일부 비제한적인 실시양태에서, 항원의 결합은 재조합 TCR을 포함하는 면역 응답 세포를 활성화시킬 수 있다.

[0219] 현재 개시된 주제는 (a) 본원에 개시된 항원 식별 수용체(예를 들어, CAR 또는 TCR)를 포함하는 면역 응답 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항원 식별 수용체는 면역 응답 세포를 활성화시킬 수 있다. 현재 개시된 주제의 면역 응답 세포는 림프계 세포일 수 있다. B세포, T세포 및 자연 살해(NK) 세포를 포함하는 림프계는 항체 생성, 세포 면역계의 조절, 혈액 내 외래물질 검출, 숙주의 외래 세포에 대한 검출 등을 제공한다. 림프계의 면역 응답 세포의 비제한적 예시로는 T세포, 자연 살해(NK) 세포, 배아 줄기세포 및 만능 줄기세포(예를 들어, 림프구양 세포를 분화시킬 수 있는 만능 줄기세포)를 포함한다. T세포는 흉선에서의 성숙한 림프구일 수 있으며, 주로 세포에 의해 매개된 면역을 담당한다. T세포는 적응성 면역계에 관여한다. 현재 개시된 주제의 T세포는 임의 유형의 T세포일 수 있으며, 보조 T세포, 세포 독성 T세포, 기억 T세포(중앙 기억 T세포, 줄기세포양 기억 T세포(또는 줄기세포양 기억형 T세포) 및 TEM 세포 및 TEMRA 세포와 같은 두 가지 유형의 이펙터 기억 T세포 포함), 조절성 T세포(억제성 T세포라고도 함), 자연 살해 T세포, 점막 관련 고정 T세포 및 gd T세포를 포함하거나 이에 한정되지 않는다. 세포 독성 T세포(CTL 또는 살해 T세포)는 감염된 체세포 또는 종양세포의 사멸을 유도할 수 있는 T 림프구의 하위 집합이다. 환자 자신의 T세포는 항원 식별 수용체(예를 들어 CAR 또는 TCR)를 도입함으로써 유전적으로 수식하여 특정 항원을 표적으로 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 응답 세포는 T세포이다. T세포는 CD4+ T세포 또는 CD8+ T세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, T세포는 CD4+ T세포이다. 일부 실시양태에서, T세포는 CD8+ T세포이다. 자연 살해(NK) 세포는 림프구일 수 있으며, 이는 세포에 의해 매개된 면역을 일부이고 선천적 면역 응답 과정에서 작용을 한다. NK 세포는 사전 활성화할 필요 없이 표적 세포에 대해 그 세포 독성 작용을 발휘할 수 있다. 현재 개시된 주제의 인간 림프구의 유형은, 말초 기증자 림프구, 예를 들어 Sadelain, M. 등 2003 Nat Rev Cancer [자연-암 총론] 3:35-45(유전적으로 수식되어 CAR을 발현하는 말초 기증자 림프구를 개시함); Morgan, R.A. 등 2006 [과학] 314:126-129(유전적으로 수식되어 a 및 b 이중이량체를 포함하는 전장 종양 항원 식별 T세포 수용체 복합체를 표현하는 말초 기증자 림프구를 개시함); Panelli, M.C. 등 2000 J Immunol [면역학 잡지] 164:495-504; Panelli, M.C. 등 2000 J Immunol [면역학 잡지] 164:4382-4392(종양 생검에서 종양 침윤 T 림프구(TIL)로부터 유래된 림프구 배양물을 개시함); 및 Dupont, J. 등 2005 Cancer Res [암 연구] 65:5417-5427; Papanicolaou, G.A. 등 2003 Blood [혈액] 102:2498-2505(인공 항원 제시 세포(AAPC) 또는 펄스 수지상 세포를 사용하여 체외에서 항원 특이적 말초 혈액 백혈구에 대한 선택적 확장 개시함)에서 개시된 말초 기증자 림프구를 포함하거나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 면역 응답 세포(예를 들어, T세포)는 자가, 비자가(예를 들어, 동종이체적)이거나 또는 체외 유래의 조작된 선조세포 또는 줄기세포일 수 있다.

[0220] 3. 사용 방법

[0221] 현재 개시된 주제는 또한 개시된 항체 또는 항체 유도체를 사용하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 해당

방법은 현재 개시된 항체 또는 항체 유도체의 치료 용도에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 해당 방법은 현재 개시된 항체 또는 항체 유도체의 진단 용도에 관한 것이다.

[0222] 3.1 치료 방법

[0223] 본 개시는 질환 및 병증을 치료하거나 또는 면역 응답을 증가시키기 위해 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체를 사용하는 방법 및 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체, 항체 유도체 및/또는 이를 포함하는 약물 조성물을 피시험자(예를 들어, 인간과 같은 포유동물)에게 투여하여, 질환 및 병증을 치료하거나 또는 면역 응답을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 질환 또는 병증은 면역 체크포인트 억제 및/또는 이상적 CD47 활성화에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체를 통해 치료할 수 있는 질환 또는 병증은 종양 형성(예를 들어, 암)을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0224] 일부 실시양태에서, 본 개시는 약물 제조를 위해서 사용되는 본원에 기재된 항체 또는 항체 유도체(또는 그 프래그먼트)를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시는 암 치료용 약물 제조를 위해서 사용되는 본원에 기재된 항체 또는 항체 유도체(또는 그 프래그먼트)를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시는 피시험자의 암 치료를 위해 사용되는 본원에 기재된 항체 또는 항체 유도체(또는 그 프래그먼트)를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시는 피시험자의 암 치료를 위해 사용되는 본원에 제공된 항체 또는 항체 유도체(또는 그 프래그먼트)를 포함하는 약물 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암(예를 들어, 백혈병, 림프종 및 골수종), 난소암, 유방암, 방광암, 뇌암, 결장암, 장암, 간암, 폐암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 위 종양, 교모세포종, 후두암, 흑색종, 신경모세포종, 선암종, 신경아교종, 연조직 육종 및 다양한 암(전립선암 및 소세포 폐암 포함)일 수 있다. 적합한 암으로는 종양학 분야에서 알려진 임의의 암을 또한 포함하는 것으로, 성상세포종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 희소돌기아교종, 뇌실세포종, 수모세포종, 원시신경외배엽종양(PNET), 연골육종, 골육종, 췌관 선암종, 소세포 및 대세포 폐 선암종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 편평세포암, 기관지폐포암종, 상피 선암종 및 이들의 간 전이, 림프관육종, 림프관내피종, 간세포 암종, 담관암, 활막종, 중피종, 유인 종양, 횡문근육종, 결장암, 기저 세포 암종, 한선종, 유두 암종, 피지 암종, 유두 선암종, 낭선암종, 수질 암종, 기관지 암종, 신세포 암종, 담관암종, 용모막암종, 정액종, 배아 암종, 윌름스 종양, 고환 종양, 수모세포종, 두개 인두종, 뇌실막종, 송과종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종, 백혈병, 다발성 골수종, 발덴스트롬 거대글로불린혈증(Waldenström's macroglobulinemia), 유선 종양(예컨대, 관 선암종 및 소엽 선암종), 자궁경부 편평 및 선암종, 자궁 및 난소 암종, 전립선 선암종, 방광 이행 편평 세포 암종, B 및 T세포 림프종(결절성 및 미만성), 형질세포종, 급성 및 만성 백혈병, 악성 육종, 연조직 및 평활근 육종을 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0225] 일부 실시양태에서, 암은 흑색종, NSCLC, 두경부암, 요로상피암, 유방암(예를 들어, 삼중 음성 유방암(TNBC)), 위암, 담관암, 고전적 호지킨 림프종(cHL), 비호지킨 림프종 원발성 종격동 B세포 림프종(NHL PMBCL), 중피종, 난소암, 폐암(예를 들어, 소세포폐암), 식도암, 비인두암(NPC), 담도암, 결장직장암, 자궁경부암 또는 갑상선암 일 수 있다.

[0226] 일부 실시양태에서, 치료 대상인 피시험자는 포유동물(예를 들어, 인간, 비인간 영장류, 래트, 마우스, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 등)이다. 일부 실시양태에서, 피시험자는 인간이다. 일부 실시양태에서, 피시험자는 암이 의심되거나 또는 암 발병 위험이 있거나, 또는 암 또는 비정상적인 CD47 발현 또는 활성을 갖는 임의의 기타 질환을 앓고 있다는 진단을 받는다.

[0227] 암 또는 비정상적인 CD47 활성을 나타내는 임의의 기타 질환에 대한 다양한 진단 방법 및 이러한 질환에 대한 임상적 설명은 당업계에 알려져 있다. 이와 같은 방법에는 예를 들어 면역조직화학, PCR, 형광동소혼성화(FISH)가 포함되나 이에 한정되지는 않는다. 비정상적인 CD47 활성 또는 발현에 대한 진단 방법의 기타 자세한 내용은 예를 들어 Gupta 등 (2009) Mod Pathol. [현대병리학] 22(1):128-133; Lopez-Rios 등 (2013) J Clin Pathol [임상병리학 잡지] 66(5):381-385; Ellison 등(2013) J Clin Pathol [임상병리학 잡지] 66(2):79-89; 및 Guha 등 (2013) PLoS ONE [공공 과학 도서관: 일반] 8(6):e67782에 기재되어 있다.

[0228] 임의의 적합한 경로를 통해 투여할 수 있고, 예를 들어 정맥내, 근육내 또는 피하 경로를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 항체 유도체(또는 그 프래그먼트) 및/또는 조성물은 제2, 제3 또는 제4 약제(예를 들어 항종양제, 성장 억제제, 세포 독성제 또는 화학적 치료제 포함)와 조합하여 투여되어, 비정상적인 CD47 활성화와 관련되는 질환 또는 병증을 치료한다. 이와 같은 약제는, 예를 들어, 도세탁셀, 제피티닙, FOLFIRI(이리노테칸, 5-플루오로우라실 및 류코보린), 이리노테칸, 시스플라틴, 카보플라틴, 파클리탁셀, 베바시주맵(항 VEGF 항체), FOLFOX-4, 주입 플루오로우라실, 류코보린 및 옥살리플라틴, 아파티닙, 켐시타빈, 카페

시타빈, 페메트렉세드, 티반티닙, 에베롤리무스, CpG-ODN, 라파마이신, 레날리도마이드, 베무라페닙, 엔도스타틴, 라파티닙, PX-866, Imprime PGG 및 이로티닙을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체(또는 그 프래그먼트)는 별도의 약제에 접합된다.

[0229] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체 또는 항체 유도체(또는 그 프래그먼트) 및/또는 조성물은 하나 이상의 별도의 요법(예컨대 방사선 요법, 수술, 화학 요법, 및/또는 표적 요법)과 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체, 항체 유도체(또는 그 프래그먼트) 및/또는 조성물은 방사선 요법과 조합하여 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체, 항체 유도체(또는 그 프래그먼트) 및/또는 조성물과 방사선 요법의 조합은 본원에 개시된 신생물 또는 암을 치료하기 위한 것이다.

[0230] 치료할 징후 및 당업자에게 숙지된 투약과 관련된 요소에 따라, 본원에 제공된 항체 또는 항체 유도체는 독성 및 부작용을 최소화하면서 해당 징후를 치료하는 데 효과적인 용량으로 투여될 것이다. 암 치료의 경우, 전형적인 투여량은 예를 들어 0.001 µg 내지 1000 µg 범위일 수 있지만, 이러한 예시적인 범위보다 낮거나 높은 투여량도 본 발명의 범위 내에 포함된다. 1일 투여량은 총 체중의 약 0.1 µg/kg 내지 약 100mg/kg, 총 체중의 약 0.1 µg/kg 내지 약 100 µg/kg, 또는 총 체중의 약 1 µg/kg 내지 약 100 µg일 수 있다. 위에 언급한 바와 같이, 치료 받은 환자를 주기적으로 평가함으로써 치료 또는 예방의 효능을 모니터링할 수 있다. 수일 이상에 걸쳐 반복 투여하는 경우, 병세에 따라, 원하는 질환 증상 억제가 발생할 때까지 치료를 반복한다. 그러나, 기타 투여량 방안이 유용할 수 있으며 이는 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 원하는 투여량은 조성물을 단일 볼루스로 투여하거나, 조성물을 여러번 볼루스로 투여하거나, 연속 주입에 의해 조성물을 투여함으로써 전달될 수 있다.

[0231] 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체를 포함하는 약물 조성물은 하루에 1회, 2회, 3회 또는 4회 투여될 수 있다. 조성물은 또한 매일 투여하는 빈도보다 낮은 빈도(예를 들어 주 6회, 주 5회, 주 4회, 주 3회, 주 2회, 주 1회, 2주에 1회, 3주에 1회, 월 1회, 2개월에 1회, 3개월에 또는 6개월에 1회)로 투여될 수 있다. 조성물은 또한 예컨대 삼입물에서 서방형 제제로서 투여될 수 있고, 해당 삼입물이 일정 시간 내에 사용되도록 해당 조성물을 점차적으로 방출시키며, 해당 조성물은 월 1회, 2-6개월에 1회, 년 1회 또는 심지어 1회성 투여와 같은 비교적 낮은 빈도로 투여하는 것이 허용된다. 서방 장치(예컨대, 펠렛(pellet), 나노 입자, 마이크로 입자, 나노 스피어, 마이크로 스피어)는 주사 또는 수술에 의해 다양한 위치로 이식되어 투여를 전개할 수 있다.

[0232] 예를 들어, 종양 퇴행, 종양 무게 또는 크기 감소, 진행 시간, 생존 기간, 무진행 생존, 전체 반응률, 응답 지속 시간, 삶의 질, 단백질 발현 및/또는 활성으로 암 치료를 평가할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 요법 효능을 확인하는 방법을 택할 수 있고, 예를 들어 방사선 영상을 통해 반응을 계측하는 것을 포함한다.

[0233] 일부 실시양태에서, 치료 효능을 종양 성장 억제 백분율(% TGI)로 계측하고, 등식  $100 - (T/C \times 100)$ 으로 계산하며, 여기서, T는 치료된 종양의 평균 상대적 종양 부피이고, C는 치료되지 않은 종양의 평균 상대적 종양 부피이다. 일부 실시양태에서, %TGI는 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 또는 95% 초과이다.

[0234] 3.2 진단 및 영상화 방법

[0235] 표지된 항체 또는 항체 유도체는 진단 목적으로 사용될 수 있어, CD47 발현, 비정상적인 발현 및/또는 활성과 관련된 질환 및/또는 병증을 검출, 진단 또는 모니터링한다. 예를 들어, 본원에 제공된 항체 또는 항체 유도체는 동소, 체내, 체외 및 체외 진단 측정 또는 영상화 측정에 사용될 수 있다. CD47 폴리펩티드 발현을 검출하기 위한 방법은, (a) 하나 이상의 항체 또는 항체 유도체를 사용하여 개체의 세포(예를 들어, 조직) 또는 체액에서 폴리펩티드의 발현을 측정하는 단계, 및 (b) 유전자 발현 수준과 표준 유전자 발현 수준을 비교하는 단계, 여기서, 표준 발현 수준에 비해, 측정된 유전자 발현 수준의 증가 또는 감소는 이상 발현을 나타낸다.

[0236] 본원에 제공된 별도의 실시양태는 동물(예를 들어, 인간과 같은 포유동물) 중 CD47의 발현 또는 이상 발현과 관련된 질환 또는 병증을 진단하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 포유동물의 CD47 분자를 검출하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 진단은, (a) 유효량의 표지된 항체 또는 항체 유도체를 포유동물에게 투여하는 단계; (b) 표지된 항체 또는 항체 유도체가 CD47 분자를 발현하는 피시험자 체내의 부위에 우선적으로 집중되(또한 결합되지 않은 표지된 분자를 배경 수준으로 제거됨)도록, 투여 후 일정 시간 대기하는 단계; (c) 배경 수준 확인하는 단계; 및 (d) 해당 배경 수준보다 높은 표지된 분자의 검출이 피시험자에게 CD47 발현 또는 이상 발현과 관련되는 특정 질환 또는 병증을 앓고 있음을 나타내도록, 피시험자로부터 해당 표지된 분자를 검출하는 단계;를 포함한다. 배경 수준은 상이한 방법을 통해 확인할 수 있고, 이러한 방법은 표지된 분자의 검출된 양을 특정 시스템에 대해 사전에 이미 확인한 표준값과 비교하는 단계를 포함한다.

[0237] 본원에 제공된 항체 및 항체 유도체는 당업계에서 이미 알려진 전형적인 면역조직학 방법을 사용하여 생물 샘플의 단백질 수준을 측정하는 데 사용될 수 있다(예를 들어, Jalkanen 등, J. Cell. Biol. [세포생물학 잡지] 101:976-985(1985); Jalkanen 등, J. Cell. Biol. [세포생물학 잡지] 105:3087-3096(1987) 참조). 단백질 유전자 발현 검출에 사용될 수 있는 기타의 항체에 기반한 방법은 효소결합면역흡착측정법(ELISA) 및 방사면역측정법(RIA)과 같은 면역 측정법을 포함한다. 적합한 항체 측정 표지는 당업계에 알려져 있는 것으로, 글루코스 산화효소와 같은 효소 표지; 요오드(<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), 탄소(<sup>14</sup>C), 황(<sup>35</sup>S), 삼중수소(<sup>3</sup>H), 인듐(<sup>115m</sup>In, <sup>113m</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In) 및 테크네튬(<sup>99</sup>Tc, <sup>99m</sup>Tc), 티타늄(<sup>201</sup>Ti), 갈륨(<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), 팔라듐(<sup>103</sup>Pd), 몰리브덴(<sup>99</sup>Mo), 크세논(<sup>133</sup>Xe), 불소(<sup>18</sup>F), <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh, <sup>97</sup>Ru와 같은 방사성 동위원소; 루미놀; 및 플루오레세인과 로다민과 같은 형광 표지, 및 비오틴을 포함한다.

[0238] 당업계에 알려진 기술을 본원에 제공된 표지된 항체(또는 그 프래그먼트)에 응용할 수 있다. 이러한 기술에는 이중 기능성 접합체의 사용(예를 들어, 미국 특허 번호 5,756,065; 5,714,631; 5,696,239; 5,652,361; 5,505,931; 5,489,425; 5,435,990; 5,428,139; 5,342,604; 5,274,119; 4,994,560; 및 5,808,003 참조)을 포함하나 이에 한정되지는 않는다.

[0239] 대안적으로 또는 추가적으로, 예를 들어 CD47을 인코딩하는 핵산 또는 이의 상보적 서열에 대응되는 핵산에 기반한 프로브를 사용하는 형광동소혼성화(FISH; 1998년 10월 개시된 W098/45479 참조), DNA 블로팅, RNA 블로팅 또는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기술(예컨대, 실시간 정량 PCR(RT-PCR))을 통해, 세포 중 CD47 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 또는 mRNA의 수준을 측정할 수 있다. CD47 과발현은 또한, 예를 들어 항체에 기반한 측정을 사용하여 생물학적 유체(예컨대, 혈청)의 배출 항원을 측정하여 연구할 수도 있다(또한, 예를 들어, 1990년 6월 12일에 공개된 미국 특허 번호 4,933,294; 1991년 4월 18일에 W091/05264; 1995년 3월 28일에 공개된 미국 특허 번호 5,401,638; 및 Sias 등, J. Immunol. Methods [면역학 잡지] 132:73- 80(1990) 참조). 위에 기재된 측정 외에, 당업자는 다양한 체내 및 체외 측정을 획득할 수 있다. 예를 들어, 포유동물 체내의 세포를 항체에 노출시킬 수 있고, 해당 항체는 선택적으로 검출 가능한 표지(예를 들어 방사성 동위원소)로 표지하고, 체세포에 대한 항체의 결합은 예를 들어 방사능에 대한 외부 스캐닝 또는 해당 항체에 이전에 노출된 포유동물로부터 채취한 샘플(예를 들어, 생검 또는 기타 생물학적 샘플)을 분석함으로써 평가될 수 있다.

[0240] 4. 약물 제제

[0241] 현재 개시된 주제는 또한 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약물 제제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 약물 조성물은 현재 개시된 주제의 다양한(예를 들어, 2종 이상) 항체 및/또는 항체 유도체의 조합을 포함할 수 있다.

[0242] 일부 실시양태에서, 원하는 순도를 갖는 항체 또는 항체 유도체를 하나 이상의 선택적인 약학적으로 허용 가능한 담체와 조합함으로써, 개시의 약물 제제("Remington's Pharmaceutical Sciences"(레미스톤 약물과학)제16판, Osol, A. 편집(1980))을 제조할 수 있으며, 그 형식은 동결건조 제제 또는 수용액이다. 동결건조 제제는 미국 특허 번호 6,267,958에 기재되었으나 이에 한정되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 항체 제제 수용액은 미국 특허 번호 6,171,586 및 W02006/044908에 기재된 항체 제제 수용액을 포함할 수 있으며, 후자의 제제는 히스티딘-아세트이트 완충액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 유도체는 약 80% 초과, 약 90% 초과, 약 91% 초과, 약 92% 초과, 약 93% 초과, 약 94% 초과, 95% 초과, 약 96% 초과, 약 97% 초과, 약 98% 초과, 약 99% 초과, 약 99.1% 초과, 약 99.2% 초과, 약 99.3% 초과, 약 99.4% 초과, 약 99.5% 초과, 약 99.6% 초과, 약 99.7% 초과, 약 99.8% 초과, 또는 약 99.9% 초과를 가질 수 있다.

[0243] 약학적으로 허용 가능한 담체는 통상적으로 그 택한 투여량 및 농도 하에서는 수용자에게 무해한 것으로, 이는 인산염, 구연산염 및 기타 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 방부제(예컨대 염화옥타데실디메틸벤질암모늄, 염화헥사메틸암모늄, 염화벤잘코늄, 염화페네틸암모늄, 페놀, 부탄올 또는 벤질 알코올, 알킬 파라벤(예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤), 카테콜, m-페닐렌 디페놀, 시클로헥산올, 3-펜탄올 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 포도당, 만노오스 또는 텍스트린을 포함하는 당당류, 이당류 및 기타 당; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염 형성 계수 이온; 금속 착물(예를 들어 Zn-단백질 착물); 및/또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본원에서의 예시적인 약학적으로 허용 가능한 담체는 또한 간질 약물 분산제를 포함하는

것으로, 예컨대 가용성 중성 활성 히알루로니다제 당단백질(sHASEGP), 예를 들어 rHuPH20(HYLENEX®, 백스터 인터내셔널(Baxter International Inc.))과 같은 인간 가용성 PH-20 히알루로니다제 당단백질이다. 일부 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법(rHuPH20 포함)은 미국 특허 공개 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, sHASEGP는 하나 이상의 별도의 글리코사미노글리카나제(예컨대, 콘드로이티나제)와 조합된다.

[0244] 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 경구외, 척수 또는 표피 투여(예를 들어 주사 또는 주입을 통해)에 적합하다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물(예를 들어, 항 CD47 항체)을 재료 내에 코팅시켜, 해당 화합물이 산 또는 화합물을 불활성화시킬 수 있는 기타 자연조건의 영향을 받지 않도록 방지한다.

[0245] 본 개시의 약물 조성물은 또한 조합 요법으로 투여될 수도 있는 것으로, 즉 기타 약제와 조합하여 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약물 조성물은 또한, 징후를 치료함에 있어서 필요한 하나를 초과하는 활성 성분을 포함할 수 있는 것으로, 예를 들어 서로의 상보적 활성에 불리한 영향을 끼치지 않는 활성성분이다. 일부 실시양태에서, 약물 제제는 제1 치료제에 의해 치료되는 동일한 질환을 치료하기 위한 제2 활성 성분을 포함할 수 있다. 이러한 활성 성분은 예상적 목적에 유효한 양으로 적절하게 조합되어 존재한다. 예를 들어, 본원에 개시된 제제는 또한, 특정 징후를 치료함에 있어서 필요한 하나를 초과하는 활성 성분을 포함할 수 있는 것으로, 서로의 상보적 활성에 불리한 영향을 끼치지 않는 활성성분을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어, 동일한 질환을 치료하는 데 사용할 수 있는 제2 치료제를 추가로 제공하는 것을 기대할 수 있다. 이러한 활성 성분은 예상적 목적에 유효한 양으로 적절하게 조합되어 존재한다.

[0246] 본 개시의 조성물은 당업계에 알려진 다양한 방법을 통해 투여될 수 있다. 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 수 있습니다. 활성 화합물은 삽입물, 경피 패치 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 방출 조절 제제과 같이 화합물의 빠른 방출을 방지하는 담체를 사용하여 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르소에스테르 및 폴리락트산과 같은 생분해성, 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 이와 같은 제제를 제조하는 여러 방법은 예를 들어 "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems"(방출 지연 및 방출 조절 약물 전달 시스템), J.R. Robinson 편집, 마셀 데커, 뉴욕(Marcel Dekker, Inc., New York.), 1978에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 약물 조성물은 미국 식품의약국(U.S. Food and Drug Administration)의 "양호 생산 규범"(Good Manufacturing Practice(GMP))에 따라 제조된다.

[0247] 본원에 개시된 항체 또는 항체 유도체를 함유하는 서방형 제제 또한 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예시로는, 항체 또는 항체 유도체를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 기질을 포함하고, 이러한 기질은 성형 제품 형태의 기질이고 예를 들어 박막 또는 마이크로캡슐이다. 일부 실시양태에서, 활성 성분은 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐(예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴 마이크로캡슐 및 폴리-(메틸 메타크릴레이트) 마이크로캡슐)에 캡슐화될 수 있고, 콜로이드성 약물 전달 시스템(예를 들어 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노 입자 및 나노 캡슐)에 캡슐화될 수 있으며 또는 매크로에멀전에 캡슐화될 수 있다. 이와 같은 기술은 "Remington's Pharmaceutical Sciences"(레미스톤 약물과학) 제16판, Osol, A. 편집(1980)에 개시되어 있다.

[0248] 본 개시의 항체 또는 항체 유도체를 일부 투여 경로로 투여하기 위해서는, 화합물의 불활성화를 방지하는 물질로 해당 화합물을 코팅시키거나 함께 투여하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 화합물은 적합한 담체(예를 들어 리포솜) 또는 희석제로 피시험자에게 투여될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 희석제는 염수 및 완충 수용액을 포함한다. 리포솜은 수중유중수(water-in-oil-in-water) CGF 에멀전 및 일반적인 리포솜을 포함한다 (Strejan 등 (1984) J Neuroimmunol. [신경면역학 잡지] 7:27).

[0249] 약학적으로 허용 가능한 담체는 무균 수용액 또는 분산액 및 무균 주사액 또는 분산액 즉석 제조용 무균 분말을 포함한다. 약물 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 시약의 사용은 당업계에 알려져 있다.

[0250] 임의의 일반적인 매질 또는 약제가 활성 화합물과 상용될 수 없는 한, 이를 본 개시의 약물 조성물에 사용하는 것을 고려할 수 있다. 또한 보충 활성 화합물을 조성물에 첨가할 수 있다.

[0251] 치료 조성물은 통상적으로 반드시 무균이어야 하고, 대체로 등장성이어야 하며, 제조 및 저장 조건 하에서 안정적이어야 한다. 해당 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜 또는 고약물 농도에 적합한 기타 정렬 구조로 배합될 수 있다. 해당 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리 에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들어, 코팅(예를

들어, 레시틴)을 사용하고, 분산액의 경우 필요한 입자의 크기를 유지하고 계면활성제를 사용함으로써 적당한 유동성을 유지할 수 있다. 많은 경우에, 조성물에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알코올(예컨대 만니톨, 소르비톨) 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직하다. 조성물에 흡수를 지연시키는 약제(예를 들어, 모노스테아레이트 및 젤라틴)을 포함시킴으로써, 주사형 약물의 연장된 흡수를 실현할 수 있다.

[0252] 필요에 따라 필요한 양의 본원에 개시된 하나 이상의 항체 또는 항체 유도체를 위에 나열된 성분 중 하나 또는 그 조합과 함께 적절한 용매에 첨가한 후, 무균 미세여과(예를 들어, 멸균 여과막을 통해 여과)를 통해 무균 주사 가능한 용액을 제조한다. 통상적으로, 활성 화합물을 기본 분산 매질과 위에 열거한 기타 필요한 성분을 함유한 무균 용매에 첨가함으로써 분산액을 제조한다. 무균 주사 가능한 용액을 제조하기 위한 무균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 사전에 무균 여과된 용액으로부터 활성 성분과 임의 별도의 원하는 성분의 분말에 대한 진공 건조 및 냉동 건조(동결)이다.

[0253] 치료 조성물은 또한 당업계에 알려진 의료 장치를 사용하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 치료 조성물은 바늘이 없는 피하 주사 장치, 예컨대 미국 특허 번호 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 또는 4,596,556에 개시된 장치를 이용하여 투여할 수 있다. 본 개시에 사용될 수 있는 삽입물 및 모듈의 예시로는, 제어된 속도로 약물을 분배하기 위한 이식형 미세주입 펌프를 개시한 미국 특허 번호 4,487,603; 피부를 통해 약물을 투여하는 치료 장치를 개시한 미국 특허 번호 4,486,194; 정확한 주입 속도로 약물을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 개시한 미국 특허 번호 4,447,233; 연속 약물 전달을 위한 가변 흐름 이식형 주입 장치를 개시한 미국 특허 번호 4,447,224; 다중 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 개시한 미국 특허 번호 4,439,196; 및 삼투성 약물 전달 시스템을 개시한 미국 특허 번호 4,475,196을 포함한다. 이와 같은 기타의 삽입물, 전달 시스템 및 모듈은 많이 알려져 있다.

[0254] 치료 조성물의 경우, 본 개시의 제제는 경구, 비강, 국소(구강 및 설하 포함), 직장, 질 및/또는 비경구 투여에 적합한 제제를 포함한다. 이러한 제제는 편리하게 단위 투여량으로 존재할 수 있으며, 약학 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 담체 재료와 함께 조합하여 단일 제형의 항체 또는 항체 유도체의 양은 치료받는 피시험자 및 특정 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 담체 재료와 함께 조합하여 단일 제형의 항체 또는 항체 유도체의 양은 통상적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양이다. 통상적으로, 백분율을 기준으로, 해당 양은 약 0.01% 내지 약 99% 활성 성분, 약 0.1% 내지 약 70% 활성 성분, 또는 약 1% 내지 약 30% 활성 성분 범위이다.

[0255] 국소 또는 경피 투여를 위한 본 개시의 조성물의 제형은 산제, 스프레이, 연고제, 페이스트, 연고제, 세제, 젤 제, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 화합물은 무균 조건 하에 약학적으로 허용 가능한 담체 및 필요할 수 있는 임의의 방부제, 완충액 또는 추진제와 혼합될 수 있다.

[0256] 표현 “비경구 투여” 및 “비경구 투여를 거쳐”란 장내 투여 및 국소 투여 이외의 통상적으로 주사에 의한 투여 방식을 가리키는 것으로 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 피막내, 안와내, 심장내, 진피내, 복막내, 기관내, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0257] 이러한 약물 조성물은 또한 방부제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수도 있다. 위의 멸균 절차, 및 다양한 항세균제 및 항진균제(예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르비산 등)를 추가함으로써, 미생물이 없도록 방지할 수 있다. 또한, 당, 염화나트륨 등과 같은 등장화제를 조성물에 추가하는 것이 기대할 수 있다. 이외, 흡수를 지연시키는 약제(예컨대, 모노스테아레이트 및 젤라틴)를 추가함으로써, 주사형 약물의 연장된 흡수를 실현할 수 있다.

[0258] 일부 실시양태에서, 본 개시의 항체 또는 항체 유도체가 약물로서 인간 및 동물에 투여되는 경우, 이들은 단독으로 또는 약학적으로 허용 가능한 담체와 조합하여 약물 조성물로서 투여될 수 있고, 해당 약물 조성물은 예를 들어 약 0.01% 내지 약 99.5%(또는 약 0.1% 내지 90%)의 항체 또는 항체 유도체를 포함한다.

[0259] 5. 제품

[0260] 현재 개시된 주제는 위에 기재된 병증을 치료, 예방 및/또는 진단하기 위한 재료를 포함하는 제품(예를 들어, 키트)을 또한 제공한다.

[0261] 일부 실시양태에서, 제품/키트는 용기 및 용기에 있거나 용기와 관련된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 적합한 용기의 비제한적인 예시로는 병, 바이알, 주사기, 정맥 주사액 백 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 비닐과 같은 다양한 재료로 형성될 수 있다. 용기는 병세의 치료, 예방 및/또는 진단에 효과적인 조성물을 수용

가능하며(자체 또는 다른 조성물과 조합), 무균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개가 있는 바이알일 수 있다).

[0262] 일부 실시양태에서, 조성물 중 적어도 하나의 활성제는 본 개시의 항체 또는 항체 유도체이다. 라벨 또는 패키 지 삽입물은 해당 조성물이 선택된 병세를 치료하기 위한 것임을 나타낼 수 있다.

[0263] 일부 실시양태에서, 제품/키트는 (a) 본 개시의 항체 또는 항체 유도체를 포함하는 조성물이 담긴 제1 용기; 및 (b) 별도의 세포 독성제 또는 치료제를 포함하는 조성물이 담긴 제2 용기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제품/키트는 조성물이 특정 병세 치료에 사용될 수 있음을 나타내는 패키징 삽입물을 또는 포함 할 수 있다.

[0264] 대안적으로 또는 추가적으로, 제품/키트는 별도의 용기(예를 들어, 제2 용기 또는 제3 용기)를 또한 포함할 수 있는 것으로, 해당 별도의 용기는 주사용 정균수(BWFI), 인산염 완충 식염수, 링거 용액 및 포도당 용액을 포함 하나 이에 한정되지 않는 약학적으로 허용 가능한 완충제를 포함한다. 제품/키트는 기타 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 주사기를 비롯한 상업적 및 사용자 관점에서 볼 때 필요할 기타 재료를 포함할 수 있다.

[0265] <서열표>

SEQ ID NO	명칭	아미노산 서열
1.	클론 M1 VH CDR1	<u>GYYS</u>
2.	클론 M1 VH CDR2	<u>EINHSGSTNYNPSLKS</u>

3.	클론 M1 VH CDR3	<u>FTGRPYGMDV</u>
4.	클론 M1 VL CDR1	<u>SGSESNIGSHKVK</u>
5.	클론 M1 VL CDR2	<u>GNDORRS</u>
6.	클론 M1 VL CDR3	<u>AAWDDSLNGRV</u>
7.	클론 M1 VH	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSF <u>GYYS</u> WIRQPPGKLEWIG <u>EINHSGSTNYN</u> <u>PSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYCAR <u>FTGRPYGMDV</u> WGQGTITVTVSS
8.	클론 M1 VL	SALSYELTQPPSVSATPGQRTIS <u>SGSESNIG</u> <u>SHKVK</u> WYQQFAGAAPRLIH <u>GNDORRS</u> GV PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYY <u>CAA</u> <u>WDDSLNGRV</u> FGGGTKLTVLGQP
9.	클론 M1 HC	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSF <u>GYYS</u> WIRQPPGKLEWIG <u>EINHSGSTNYN</u> <u>PSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYCAR <u>FTGRPYGMDV</u> WGQGTITVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVME ALHNHYTQKSLSLGLGK
10.	클론 M1 LC	SALSYELTQPPSVSATPGQRTIS <u>SGSESNIG</u> <u>SHKVK</u> WYQQFAGAAPRLIH <u>GNDORRS</u> GV PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYY <u>CAA</u> <u>WDDSLNGRV</u> FGGGTKLTVLGQP <u>KAAPSVTL</u> FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW

[0267]

		KADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVALTE CS
11.	클론 M1#11 VH CDR1	<u>GYYS</u>
12.	클론 M1#11 VH CDR2	<u>EINHSGSTNYNPSLKS</u>
13.	클론 M1#11 VH CDR3	<u>FHGRPYGMDV</u>
14.	클론 M1#11 VL CDR1	<u>SGSESNIGSHKVK</u>
15.	클론 M1#11 VL CDR2	<u>GNDORRR</u>
16.	클론 M1#11 VL CDR3	<u>AAWDDSLYGRV</u>
17.	클론 M1#11 VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGFS <u>GYYS</u> WIRQPPGKLEWIG <u>EINHSGSTNYN</u> <u>PSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYICAR <u>FHGRPYGMDV</u> WGQTTVTVSS
18.	클론 M1#11 VL	SALSYELTQPPSVSATPGQRTISC <u>SGSESNIG</u> <u>SHKVK</u> WYQQFAGAAPRLIH <u>GNDORRR</u> GV PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AA</u> <u>WDDSLYGRV</u> FGGGTKLTVLGQP
19.	클론 M1#11 HC	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGFS <u>GYYS</u> WIRQPPGKLEWIG <u>EINHSGSTNYN</u> <u>PSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYICAR <u>FHGRPYGMDV</u> WGQTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW

[0268]

		YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYVTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVME ALHNHYTQKSLSLGLG
20.	클론 M1#11 LC	SALSYELTQPPSVSATPGQRTVISC <u>SGSESNIG</u> <u>SHKVK</u> WYQQFAGAAPRLLIH <u>GNDQRRR</u> GV PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEADYCYC <u>AA</u> <u>WDDSLYGRV</u> FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLS LTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVLALTE CS
21.	클론 M1#25 VH CDR1	<u>GYYS</u>
22.	클론 M1#25 VH CDR2	<u>EINHSGSVNYP</u> <u>SLKS</u>
23.	클론 M1#25 VH CDR3	<u>FTGRPYGMDV</u>
24.	클론 M1#25 VL CDR1	<u>SGSESNIGSHKVK</u>
25.	클론 M1#25 VL CDR2	<u>GNDQRRS</u>
26.	클론 M1#25 VL CDR3	<u>AAWDDSLAGRV</u>
27.	클론 M1#25 VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF <u>GYYS</u> WIRQPPGKLEWIG <u>EINHSGSVNYP</u> <u>SLKSR</u> VTISVDTSKNQFSLRLLSSVTAADTA MYFCAR <u>FTGRPYGMDV</u> WGQGITVTVSS
28.	클론 M1#25 VL	SALSYELTQPPSVSATPGQRTVISC <u>SGSESNIG</u> <u>SHKVK</u> WYQQFAGAAPRLLIH <u>GNDQRRS</u> GV

[0269]

		PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAA <u>WDDSLAGRV</u> FGGGTKLTVLGQP
29.	클론 M1#25 HC	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF <u>GYYS</u> WIRQPPGKLEWIGE <u>EINHSGSVNYN</u> <u>PSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYICAR <u>FTGRPYGMDV</u> WGQGTITVSSA STKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLG
30.	클론 M1#25 LC	SALSYELTQPPSVSATPGQRTISCS <u>SGSESNIG</u> <u>SHKVK</u> WYQQFAGAAPRLLIH <u>GNDORRSGV</u> PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAA <u>WDDSLAGRV</u> FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVLALTE CS
31.	클론 M1#33 VH CDR1	<u>GYYS</u>
32.	클론 M1#33 VH CDR2	<u>EINHSGSTRYNPSLKS</u>
33.	클론 M1#33 VH CDR3	<u>FIGRPYGMV</u>
34.	클론 M1#33 VL	<u>SGSESNIGSHKVK</u>

[0270]

	CDR1	
35.	클론 M1#33 VL CDR2	<b><u>DNDORRS</u></b>
36.	클론 M1#33 VL CDR3	<b><u>AAWDDSLNGRV</u></b>
37.	클론 M1#33 VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF <b><u>GYYS</u></b> WIRQPPGKLEWIG <b><u>EINHS</u></b> GSTRYN <b><u>PSLKS</u></b> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYECAR <b><u>FIGRPYYGMDV</u></b> WGQGTITVTVSS
38.	클론 M1#33 VL	SALSYELTQPPSVSATPGQRTIS <b><u>SGSES</u></b> NIG <b><u>SHKVK</u></b> WYQQFAGAAPRLIH <b><u>DNDORRS</u></b> GV DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <b><u>AA</u></b> <b><u>WDDSLNGRV</u></b> FGGGTKLTVLGQP
39.	클론 M1#33 HC	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF <b><u>GYYS</u></b> WIRQPPGKLEWIG <b><u>EINHS</u></b> GSTRYN <b><u>PSLKS</u></b> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYECAR <b><u>FIGRPYYGMDV</u></b> WGQGTITVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVD KRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHSDWLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVSFCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLG
40.	클론 M1#33 LC	SALSYELTQPPSVSATPGQRTIS <b><u>SGSES</u></b> NIG <b><u>SHKVK</u></b> WYQQFAGAAPRLIH <b><u>DNDORRS</u></b> GV DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <b><u>AA</u></b> <b><u>WDDSLNGRV</u></b> FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW

[0271]

		KADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVALTE CS
41.	클론 M1#46 VH CDR1	<u>GYWWS</u>
42.	클론 M1#46 VH CDR2	<u>EINHSGSTNYNPSLKS</u>
43.	클론 M1#46 VH CDR3	<u>FSGRPYYGMDV</u>
44.	클론 M1#46 VL CDR1	<u>SGSESNIGSHKVK</u>
45.	클론 M1#46 VL CDR2	<u>GNDORRS</u>
46.	클론 M1#46 VL CDR3	<u>AAWDDSLYGRV</u>
47.	클론 M1#46 VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF <u>GYWWS</u> WIRQPPGKGLEWIGE <u>EINHSGSTNYN</u> <u>PSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLRSLSSVTAADTA MYICAR <u>FSGRPYYGMDV</u> WGQGTITVTVSS
48.	클론 M1#46 VL	SALSYELTQPPSVSATPGQRTVISC <u>SGSESNIG</u> <u>SHKVK</u> WYQQFAGAAPRLIH <u>GNDORRS</u> GV PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEADYYC <u>AA</u> <u>WDDSLYGRV</u> FGGGTKLTVLGQP
49.	클론 M1#46 HC	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF <u>GYWWS</u> WIRQPPGKGLEWIGE <u>EINHSGSTNYN</u> <u>PSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLRSLSSVTAADTA MYICAR <u>FSGRPYYGMDV</u> WGQGTITVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW

[0272]

		YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLG
50.	클론 M1#46 LC	SALSYELTQPPSVSATPGQRTVISC <u>SGSESNIG</u> <u>SHKVK</u> WYQQFAGAAPRLLIH <u>GNDQRRSGV</u> PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAA <u>WDDSLYGRV</u> FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVVALTE CS
51.	클론 M1#55 VH CDR1	<u>GYYS</u>
52.	클론 M1#55 VH CDR2	<u>EINHSGSTNYNPSLKS</u>
53.	클론 M1#55 VH CDR3	<u>FKGRPYYGMDV</u>
54.	클론 M1#55 VL CDR1	<u>SGSESNIGSHKVK</u>
55.	클론 M1#55 VL CDR2	<u>GNDORRE</u>
56.	클론 M1#55 VL CDR3	<u>AAWDDSLYGRV</u>
57.	클론 M1#55 VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF <u>GYYS</u> WIRQPPGKLEWIG <u>EINHSGSTNYN</u> <u>PSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYCAR <u>FKGRPYYGMDV</u> WGQGTITVTVSS
58.	클론 M1#55 VL	SALSYELTQPPSVSATPGQRTVISC <u>SGSESNIG</u> <u>SHKVK</u> WYQQFAGAAPRLLIH <u>GNDORREGV</u>

[0273]

		<u>PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAA</u> <u>WDDSLYGRV</u> FGGGTKLTVLGQP
59.	클론 M1#55 HC	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSF <u>GYYS</u> WIRQPPGKLEWIG <u>EINHS</u> STNYN <u>PSLKS</u> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYICAR <u>FKGR</u> <u>PYYGMDV</u> WGQTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV DKRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
60.	클론 M1#55 LC	SALSYELTQPPSVSATPGQRTIS <u>SGSES</u> NIG <u>SHKVK</u> WYQQFAGAAPRLIH <u>GNDORRE</u> GV PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAA <u>WDDSLYGRV</u> FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVALTCS
61.	클론 M1#21 VH CDR1	<u>GYYS</u>
62.	클론 M1#21 VH CDR2	<u>EINOSGSTNYNPSLKS</u>
63.	클론 M1#21 VH CDR3	<u>FTGR</u> <u>PYYGMDV</u>
64.	클론 M1#21 VL	<u>SGSES</u> NIG <u>SHKVK</u>

[0274]

	CDR1	
65.	클론 M1#21 VL CDR2	<u><b>GNDORFS</b></u>
66.	클론 M1#21 VL CDR3	<u><b>AAWDDSLYGRV</b></u>
67.	클론 M1#21 VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF <u><b>GYYS</b></u> WIRQPPGKLEWIG <u><b>EINQSGSTNYN</b></u> <u><b>PSLKS</b></u> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYICAR <u><b>FTGRPYGMDV</b></u> WGQGTTVTVSS
68.	클론 M1#21 VL	SALSYELTQPPSVSATPGQRTIS <u><b>SGSES</b></u> <u><b>NIG</b></u> <u><b>SHKVK</b></u> WYQQFAGAAPRLIH <u><b>GNDORFS</b></u> GVP DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEADYYC <u><b>AA</b></u> <u><b>WDDSLYGRV</b></u> FGGGTKLTVLGQP
69.	클론 M1#21 HC	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF <u><b>GYYS</b></u> WIRQPPGKLEWIG <u><b>EINQSGSTNYN</b></u> <u><b>PSLKS</b></u> RVTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYICAR <u><b>FTGRPYGMDV</b></u> WGQGTTVTVSSA STKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVD KRVESKYGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNQKEYCKVSNKGLPSSIEKTIK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVME ALHNHYTQKSLSLGLG
70.	클론 M1#21 LC	SALSYELTQPPSVSATPGQRTIS <u><b>SGSES</b></u> <u><b>NIG</b></u> <u><b>SHKVK</b></u> WYQQFAGAAPRLIH <u><b>GNDORFS</b></u> GVP DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEADYYC <u><b>AA</b></u> <u><b>WDDSLYGRV</b></u> FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW

[0275]

		KADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVALTE CS
71.	클론 M1#21 HC-2	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF <u>GYYSW</u> WIRQPPGKGLEWIG <u>INQSGSTNYN</u> <u>PSLKSR</u> VTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYYCAR <u>FTGRPYGMDV</u> WGQTTVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPCCPPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLK
72.	클론 M1#21 LC-2	SALSYELTQPPSVSATPGQRTISCS <u>SGSES</u> <u>NIG</u> <u>SHKVK</u> WYQQFAGAAPRLIH <u>GNDQRF</u> SGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AA</u> <u>WDDSLYGRV</u> FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS
73.	클론 M1#55 HC-2	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF <u>GYYSW</u> WIRQPPGKGLEWIG <u>INHSGSTNYN</u> <u>PSLKSR</u> VTISVDTSKNQFSLRLSSVTAADTA MYYCAR <u>FKGRPYGMDV</u> WGQTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKV

[0276]

		DKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDL DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLK
74.	클론 MI#55 LC-2	SALSYELTQPPSVSATPGQRTISCSGSESNIG <u>SHKVKWYQQFAGAAPRLLIHGNDORREGV</u> PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAA <u>WDDSLYGRV</u> FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTE CS
75.	예시적 링커	GSGGSGGSGGSG
76.	예시적 링커	GGGGSGGGSGGGGS
77.	예시적 링커	GGGSG
78.	예시적 링커	GGGSGGGGSG
79.	예시적 링커	GGSGGGSG
80.	예시적 링커	GGSGGGSGGGSG
81.	예시적 링커	GSGGSG
82.	예시적 링커	GSGGSGGSG
83.	예시적 링커	GSGGSGG
84.	예시적 링커	GGGGSGGGSGGGGSGGGGSG
85.	예시적 링커	PAPAP
86.	예시적 링커	PAPAPPAPAPPAPAP
87.	예시적 링커	IKRTVAA
88.	예시적 링커	VSSASTK
89.	예시적 링커	ASTK

[0277]

90.	예시적 링커	ASTKSGSGSGSG
91.	예시적 링커	AEAAAAKA
92.	예시적 링커	AEAAAKEAAAAKA
93.	예시적 링커	GRPGS GRPGS
94.	예시적 링커	GRPGS GRPGS GRPGS GRPGS
95.	예시적 링커	GRGGS GRGGS
96.	예시적 링커	GRGGS GRGGS GRGGS GRGGS
97.	예시적 링커	GKPGS GKPGS
98.	예시적 링커	GKPGS GKPGS GKPGS GKPGS
99.	예시적 링커	GEPGS GEPGS
100.	예시적 링커	GEGGS GEGGS GEGGS GEGGS
101.	예시적 링커	GDPGS GDPGS
102.	예시적 링커	GDPGS GDPGS GDPGS GDPGS
103.	CD47 폴리펩티드	MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEF TFCNDTVVPCFVTNMEAQNTTEVYVKWKF KGRDIYTFDGLNKSSTVPTDFSSAKIEVSQLL KGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTRE GETHIELKYRVVSWFSPNENILIVPIFAILLF WGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVIT VIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILI LLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYILAVV GLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLV YMKFVASNQKTIQPPRKAVEEPLNE
104.	CD47 N말단 ECD	QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVPCFVTNMEAQ NTTEVYVKWKFGRDIYTFDGLNKSSTVPT DFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTG NYTCEVTELTREGETHIELKYRVVSWFSP

[0278]

[0279]

이하 실시예는 단지 현재 개시된 주제에 대한 설명일 뿐, 어떠한 방식으로든 본 발명을 제한하는 것으로 간주되어서는 아니된다.

[0280]

**실시예**

[0281]

**실시예 1: 저하된 탈표적 결합을 갖는 항 CD47 항체에 대한 감정**

[0282]

내부 합성된 원초 인간 Fab 파지 라이브러리로부터 항 CD47 클론을 분리시키고, 효소결합면역흡착측정법(ELISA) 및 형광활성화 세포선택장치(FACS)에 의해 CD47 N말단 ECD에 대한 선별을 진행한다. 8개의 건강한 기증자로부터 분리해낸 PBMC 샘플을 사용하여 원초 인간 Fab 파지 라이브러리를 생성한다. 그 다음, 표준 조립 PCR 기술을 사용하여 수득한 클론의 VL 및 VH의 뉴클레오티드 서열을 인간 IgG4의 고정 영역에 융합시키고, 수득한 클론을 사용하여 전장 항체를 생성한다. 원초 Fab 파지 라이브러리에서 두 개의 선도 클론(lead clone)인 M1 및 M2를 감정하였다.

[0283]

그 다음, CD47을 발현하는 세포(Raji 세포, B세포 림프종)와 FACS 완충액(2% FBS를 함유하는 1×PBS)에서 연속 희석된 항 CD47 단클론 항체를 4°C에서 30분 동안 함께 인큐베이션하여, 항 CD47 항체의 전체 세포 결합 능력을 테스트한다. FACS 완충액으로 세포를 세척하고, 결합을 염소 항인간 IgG(H+L) FITC 항체 또는 염소 항마우스 IgG(H+L) FITC 항체로 4°C에서 30분 동안 재검출한다. Cytomics FC 500(벡크만콜터(Beckman Coulter Inc.))을 사용하여 유세포 분석을 수행한다. 항 CD47 기준 항체(Liu 등 (2015), PLOS ONE [공공 과학 도서관: 일반] 10(9): e0137345에서 개시된 서열 정보에 기반한 사내 합성 마그롤리맵(magrolimab) 유사체)를 양성 대조군으로 사용한다. IgG 이소형 대조군(항 PD1 항체) 및 IgG 이소형 대조군(항 PD1 항체)을 음성 대조군으로 사용한다. 도 1에 도시된 바와 같이, CD47을 발현하는 Raji 세포에 대한 항체 클론 M1 및 M2의 결합은 유세포 분석에 의해 검출한다.

[0284]

그 다음, 표준 방안에 따라, 항체 클론 M1에 대해 체외 파지 디스플레이에 기반한 친화력 성숙을 진행하여,

CD47 항원에 대한 친화력을 증강시킨다. 요약하면, 하나 이상의 CDR 잔기를 돌연변이시키고, 변이체 항체를 파지 상에 디스플레이하여, 효소결합면역흡착측정법(ELISA) 및 형광활성화 세포선택장치(FACS)에 의해 CD47 단백질에 대해 보다 나은 결합 능력을 갖는 변이체 항체를 선별해낸다.

[0285] 위에 기재된 방법을 사용하여 M1 변이체의 Jurkat 세포에 대한 전체 세포 결합 능력을 테스트한다. 항 CD47 기준 항체(마그롤리맵 유사체)를 양성 대조군으로 사용한다. 베바시주맵(항 VEGF-A 항체)을 음성 대조군으로 사용한다. 도 2A에 도시된 바와 같이, 클론 M1 및 그 변이체(M1#11, M1#21, M1#25, M1#33, M1#46 및 M1#55)는 Jurkat 세포(천연적으로 CD47을 발현하는 인간 백혈병 세포주)에 결합할 수 있다.

[0286] 비록 CD47은 면역계를 피하기 위해 많은 유형의 종양 조직으로 발현되지만, 이는 적혈구(RBC)에서도 발현된다. 정상 조직(예컨대, RBC)과의 결합이 저하된 항 CD47 항체를 선별한다. 위에 기재된 방법을 사용하여 M1 변이체의 RBC에 대한 전체 세포 결합 능력을 테스트한다. 항 CD47 기준 항체(마그롤리맵 유사체)를 양성 대조군으로 사용한다. 베바시주맵(항 VEGF-A 항체)을 음성 대조군으로 사용한다. 도 2B에 도시된 바와 같이, 약리학적으로 허용 가능한 농도 수준에서, 클론 M1 및 그의 변이체(M1#11, M1#21, M1#25, M1#33, M1#46 및 M1#55)는 몰로리맵 유사체와 비교하여 RBC에 대한 결합이 모두 감소된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 클론 M1 및 그 변이체가 CD47을 발현하는 종양 조직을 표적으로 할 수 있고, 몰로리맵 유사체와 비교하여, RBC에 대한 탈표적 결합이 저하된 것으로 나타났다.

[0287] 또한, 고정 영역에서의 수식이 있는 M1 변이체에 대한 테스트도 진행하였다. 예를 들어, M1#21K는 M1#21에 비해 C말단 라이신이 추가되어 있고, M1#21KP는 M1#21K의 경쇄 고정 영역에 하나의 아미노산 치환을 함유한다. 위에 기재된 방법을 사용하여 이러한 고정 영역 변이체의 Jurkat 세포 및 RBC에 대한 전체 세포 결합 능력을 테스트한다. 항 CD47 기준 항체(마그롤리맵 유사체)를 양성 대조군으로 사용한다. 트라스투주맵(항 HER2 항체)을 음성 대조군으로 사용한다. 도 3A에 도시된 바와 같이, 고정 영역 변이체(M1#21K 및 M1#21KP)는 M1#21과 동일한 방식으로 Jurkat 세포(천연적으로 CD47을 발현하는 인간 백혈병 세포주)에 결합할 수 있다. 도 3B에 도시된 바와 같이, M1#21과 유사하게, 몰로리맵 유사체와 비교하면, 고정 영역 변이체(M1#21K 및 M1#21KP) 모두가 RBC와의 결합이 저하된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 클론 M1 및 그 변이체가 CD47을 발현하는 종양 조직을 표적으로 할 수 있고, 몰로리맵 유사체와 비교하여, RBC에 대한 탈표적 결합이 저하된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 또한, 몰로리맵 유사체와 비교하여, 고정 영역에서의 수식은 CD47을 발현하는 종양 조직을 표적으로 하는 M1 변이체의 능력 또는 RBC와의 저하된 탈표적 결합을 변경시키지 않는다는 것을 나타냈다.

[0288] **실시예 2: 항 CD47 항체가 인간 SIRP α 과 CD47의 결합에 대한 억제**

[0289] 항 CD47 항체가 CD47에 의해 매개되는 신호경로에 대한 억제 작용을 테스트하기 위해, 항체가 CD47과 SIRP α (CD47의 리간드)의 결합을 차단하는 능력을 테스트하였다. CD47을 발현하는 세포(Jurkat)(1E5개 세포/웰)를 세척하고, FACS 완충액(2% FBS를 함유하는 1× PBS)에 재현탁시킨다. 상이한 농도의 테스트 항체를 고정 농도의 비오틴-인간 SIRP α-Fc와 혼합하고 4°C에서 30분 동안 세포와 함께 인큐베이션한다. 결합되지 않은 항체와 비오틴-인간 SIRP α-Fc를 세척하고 제거한 다음, 세포를 스트렙트아비딘-PE로 4°C에서 30분 동안 염색한다. Cytomics FC 500(벡크만콜터(Beckman Coulter Inc.))을 사용하여 유세포 분석을 수행한다. 항 CD47 기준 항체(몰로리맵 유사체) 및 IgG 이소형 대조군(항 PD1 항체)을 각각 양성 및 음성 대조군으로 사용한다.

[0290] 도 4에 도시된 바와 같이, 몰로리맵 유사체와 비교하여 클론 M1 및 그의 변이체는 CD47과 SIRP α 의 결합을 차단하는 능력이 유사한 것으로 나타났다. 결과는 클론 M1 및 그 변이체가 CD47에 대한 길항 항체로서 정상적으로 기능함을 나타냈다.

[0291] **실시예 3: 항 CD47 항체의 적혈구에 대한 저하된 탈표적 효과**

[0292] 비록 CD47은 면역계를 피하기 위해 많은 유형의 종양 조직으로 발현되지만, 이는 적혈구(RBC)에서도 발현된다. RBC에 대한 항 CD47 항체의 탈표적 효과를 평가하기 위하여, 이들의 적혈구 응집 유도에 대한 효과를 테스트하였다. 인간 RBC를 0.9% NaCl 완충액으로 2회 세척하고, 0.9% NaCl 완충액에서 10%로 희석한 다음, 37°C에서 연속 희석된 항체와 함께 등근 바닥 96웰 플레이트에서 2시간 동안 또는 밤새 인큐베이션했습니다. 응집된 RBC는 웰의 바닥을 고르게 덮는 반면 비응집된 세포는 웰의 바닥에 빨간색 점을 형성한다. 항 CD47 기준 항체(마그롤리맵 유사체)를 양성 대조군으로 사용한다. 이소형 대조군(항 PD1 IgG4)을 음성 대조군으로 사용한다.

[0293] 도 5에 도시된 바와 같이, 항 CD47 기준 항체(몰로리맵 유사체)는 용량 의존적 방식으로 RBC 응집을 유도한다. 이와 대조적으로, 클론 M1 및 그 변이체는 그 어떠한 RBC 응집도 유도하지 않은 것으로, IgG 이소형 대조군(항 PD1 항체)과 유사하다.

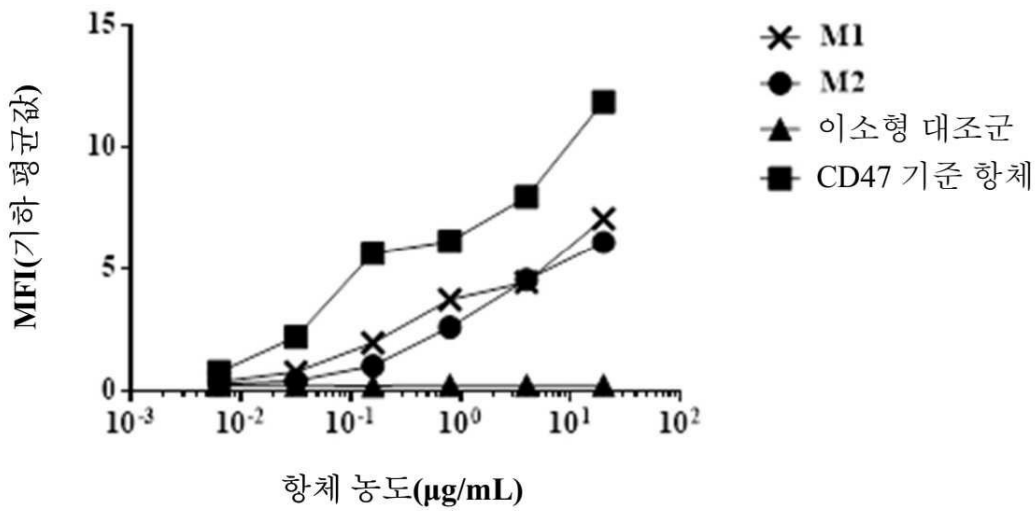
- [0294] 또한, 이전 연구에서는 항 CD47 항체가 대식세포에 의해 매개된 종양세포에 대한 식균 작용을 유도하여 항종양 효과를 발휘할 수 있음을 나타냈다. RBC에 대한 항 CD47 항체의 탈표적 효과를 평가하기 위하여, 이들의 대식세포에 의해 매개된 RBC 및 종양세포에 대한 식균에 대한 작용을 테스트하였다. Raw264.7 세포(불멸화 대식세포) 및 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 분리된 대식세포를 48웰 플레이트에 접종 및 플레이팅하여 밤새 배양한다. 인간 백혈병 세포주 Jurkat는 CD47의 과발현으로 인해 표적 세포로 사용된다.
- [0295] Jurkat 세포 또는 RBC를 37°C에서 10분 동안 CFSE로 표지하고, 완전한 RPMI-1640 배지로 세척한 다음, 연속 희석된 클론 M1 및 그 변이체, 항 CD47 기준 항체(몰로리맵 유사체) 또는 이소형 대조 항체(항 PD1 항체, 음성 대조군)와 함께 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 그 다음, 항체-표적 세포 혼합물을 Raw264.7 세포 또는 PBMC 유래 대식세포를 1:1(Jurkat 세포의 경우) 또는 10:1(RBC의 경우) 비율로 2시간 동안 인큐베이션한다. 그 후, 식균되지 않은 표적 세포를 제거한다. 남아있는 식세포를 긁어내고, PE-Cyanine 7로 접합된 F4/80 항체 또는 CD14 항체(eBioscience)로 염색하고, 유세포 분석에 의해 분석한다. 식균 능력은 총 F4/80+ 세포에서 F4/80+ CFSE+ 세포의 백분율 또는 총 CD14+ 세포에서 CD14+ CFSE+ 세포의 백분율로 계산한다.
- [0296] 몰로리맵 유사체, 클론 M1 및 그 변이체는 모두 Jurkat에 대한 Raw264.7 세포(도 6A) 및 PBMC 유래 대식세포(도 6C)에 의해 매개된 식균 작용을 유도한다. 그러나, 몰로리맵 유사체와 반대로, 클론 M1 및 그 변이체는 모두 RBC에 대한 Raw264.7 세포(도 6B) 및 PBMC 유래 대식세포(도 6D)에 의해 매개된 식균 작용을 유도하지 않는다. 이러한 결과는, 몰로리맵 유사체와 비교하여 클론 M1 및 그의 변이체가 정상 조직에 대해 감소된 탈표적 효과를 나타내지만, 이들이 대식세포에 의해 매개된 종양 세포에 대한 식균을 유도하는 항종양 효과를 유지함을 나타낸다.
- [0297] **실시예 4: WiDr(인간 결장암) 이종이식 종양 마우스 모델에서 항 CD47 항체의 항종양 효능**
- [0298] NOD/SCID(비비만 당뇨병/중증 복합 면역결핍) 마우스에 의해 발현되는 SIRP α는 인간 CD47에 강력하게 결합하고 인간 SIRP α와 인간 CD47의 결합을 모방할 수 있기 때문에, 모든 체내 연구에서는 다 NOD/SCID 마우스를 사용한다. 체내 실험은 규정된 지침에 따라 수행한다.
- [0299] WiDr(인간 결장암) 이종이식 종양 마우스 모델에서 항 CD47 항체의 체내 항종양 효능을 NOD/SCID 마우스를 사용하여 평가한다. 마우스에  $3 \times 10^6$  개의 WiDr 인간 결장암 세포를 피하 이식한다. 종양 접종 7일 후, 마우스를 용매 대조군(위약), CD47 기준 항체(몰로리맵 유사체) 및 M1 변이체인 M1#21로 3주 동안 주 2회씩 3mg/kg 및 10mg/kg의 용량으로 복강내 처리하였다. 종양 형성은 주 2회씩 관찰한다. 종양 부피는 TV(종양 부피)=(길이×넓이<sup>2</sup>)/2로 계산한다.
- [0300] 종양 성장 곡선은 도 7에 도시된 바와 같다. 데이터는, 몰로리맵 유사체 및 M1#21이 두 가지 상이한 투여량 방안에서 모두 NCI-H82 암 세포에 대하여 유의한 종양 성장 억제를 나타내고, M1#21은 두 가지 투여량 방안 각각에서 모두 몰로리맵 유사체와 비교하여 더 나은 종양 성장 억제를 나타냈다.
- [0301] **실시예 5: NCI-H82(인간 소세포 폐암) 이종이식 종양 마우스 모델에서 항 CD47 항체의 항종양 효능**
- [0302] NCI-H82(인간 소세포 폐암) 이종이식 종양 마우스 모델에서 항 CD47 항체의 체내 항종양 효능을 NOD/SCID 마우스를 사용하여 평가한다. 마우스에  $3 \times 10^6$  개의 인간 CD47을 발현하는 소세포 폐암 세포 NCI-H82를 피하 이식한다. 종양 접종 7일 후, 0일째, 3일째, 7일째 및 14일째에 마우스를 용매 대조군(위약), CD47 기준 항체(몰로리맵 유사체), 클론 M1 및 그 변이체(M1#21 및 M1#55)로 복강내 처리를 진행한다. 주 2회씩 종양을 관찰하고 측정한다. 종양 부피는 TV(종양 부피)=(길이×넓이<sup>2</sup>)/2로 계산한다.
- [0303] 종양 성장 곡선은 도 8에 도시된 바와 같다. 데이터는, 몰로리맵 유사체, 클론 M1 및 그 변이체 M1#21 및 M1#55 모두가 NCI-H82 암 세포에 대하여 유의한 종양 성장 억제를 나타내고, M1#21 및 M1#55는 모두 몰로리맵 유사체와 비교하여 증강된 종양 억제를 나타냈다.
- [0304] 기재되어 있고 청구하고자 하는 여러가지 실시양태 외에, 개시된 주제는 또한 본원에 개시되고 청구된 특징의 기타 조합을 갖는 기타 실시양태를 대상으로 한다. 이와 같이, 본원에 제시된 특정 특징들은 그 개시된 주제의 범위 내에서 기타 방식으로 서로 조합될 수 있고, 그 개시된 주제는 본원에 개시된 특징의 임의의 적합한 조합을 포함한다. 예시적 및 설명적 목적을 위해, 개시된 주제의 구체적인 실시양태에 대한 설명은 위에 제공되어 있다. 위의 설명은 배타적이고 또는 개시된 주제를 개시된 실시양태에만 제한되려는 것이 아니다.
- [0305] 개시된 주제의 정신 또는 범위를 벗어나지 않는 한, 개시된 주제의 조성 및 방법에 대해 다양한 수정 및 변형이

이루어질 수 있는 것은 당업자에게 자명한 것이다. 따라서, 개시된 주제는 첨부된 청구범위 및 그 균등물의 범위 내에서의 수정 및 변형을 포함하도록 의도된다.

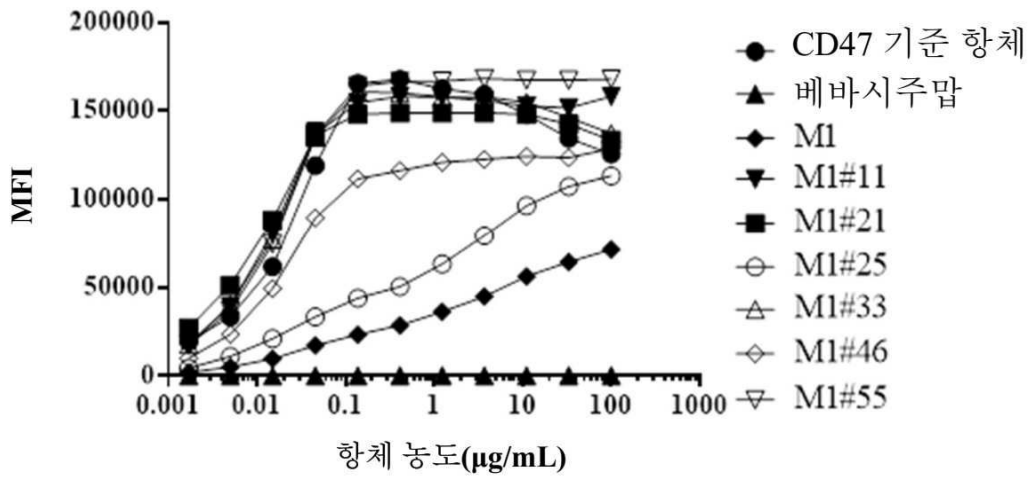
[0306] 본원은 다양한 출판물, 특허 및 특허 출원을 인용하였고, 그 전체 내용은 인용방식을 통해 본원에 통합된다.

도면

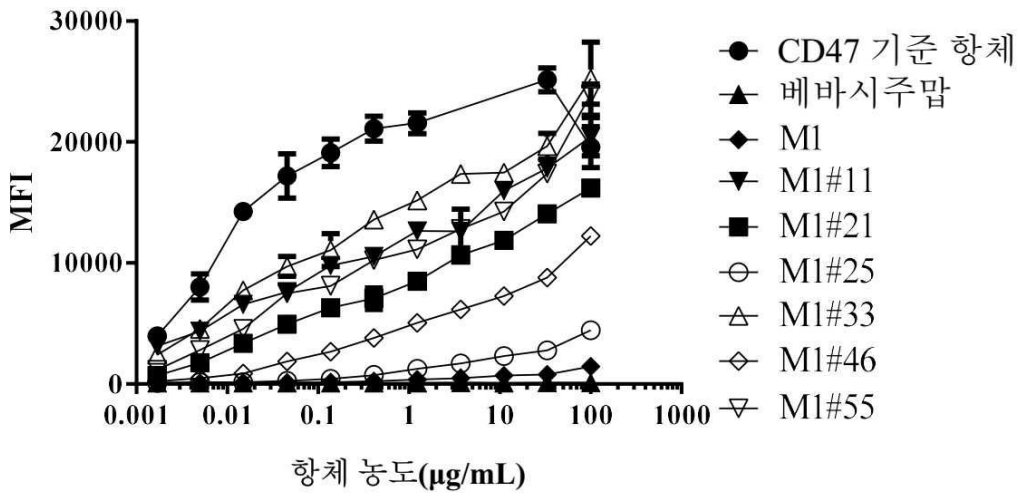
도면1



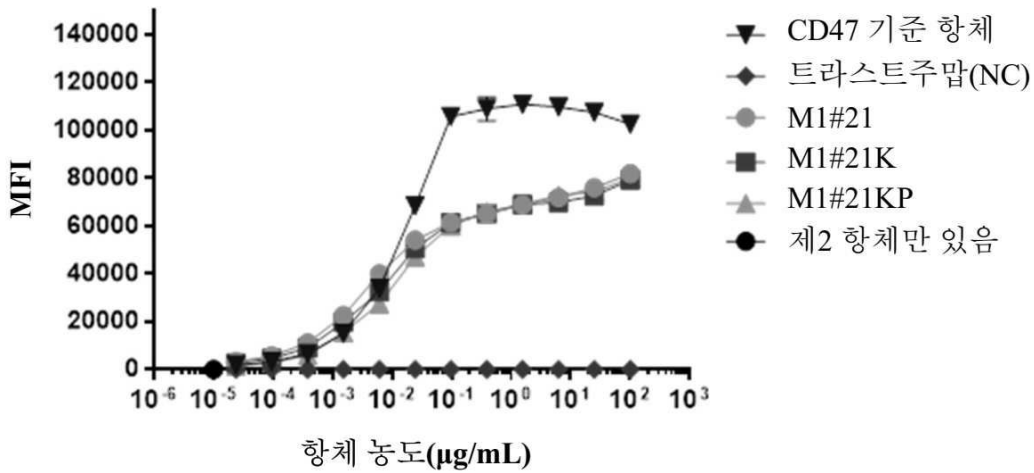
도면2a



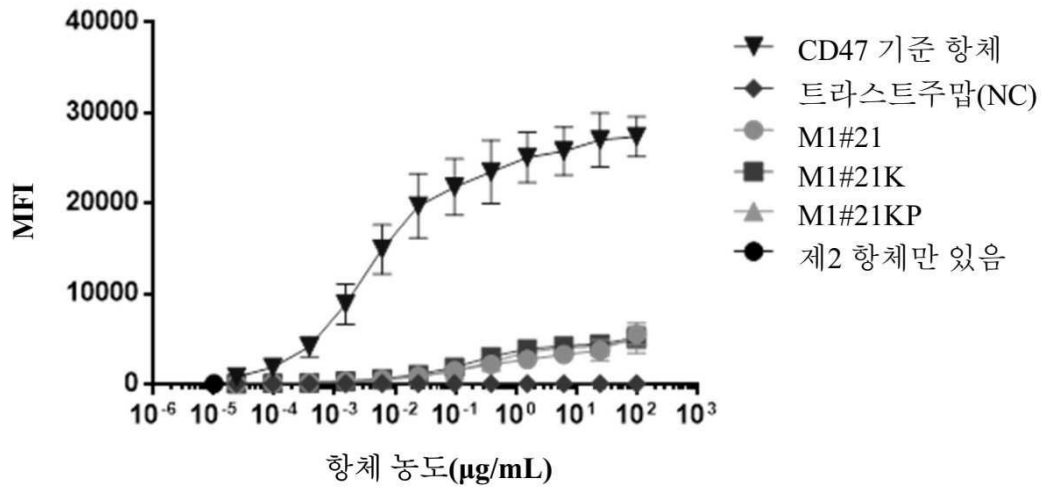
도면2b



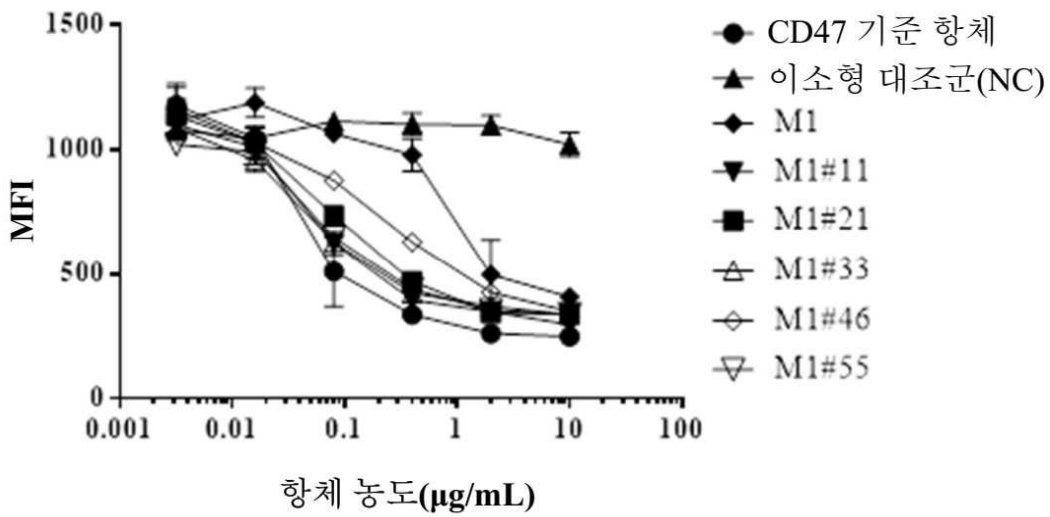
도면3a



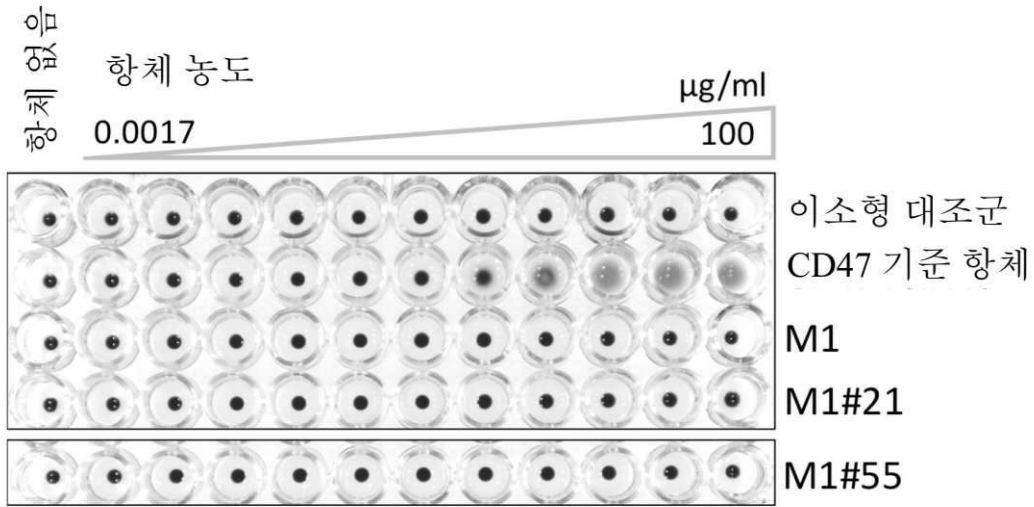
도면3b



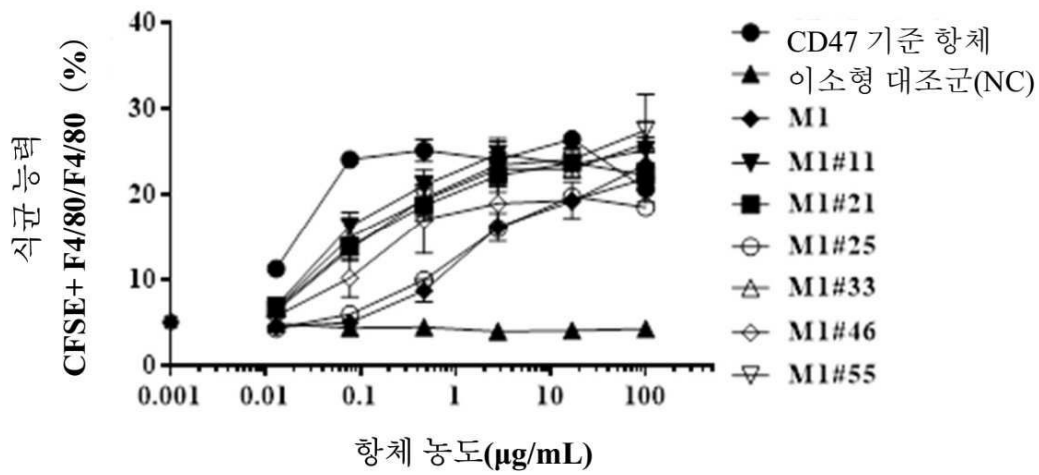
도면4



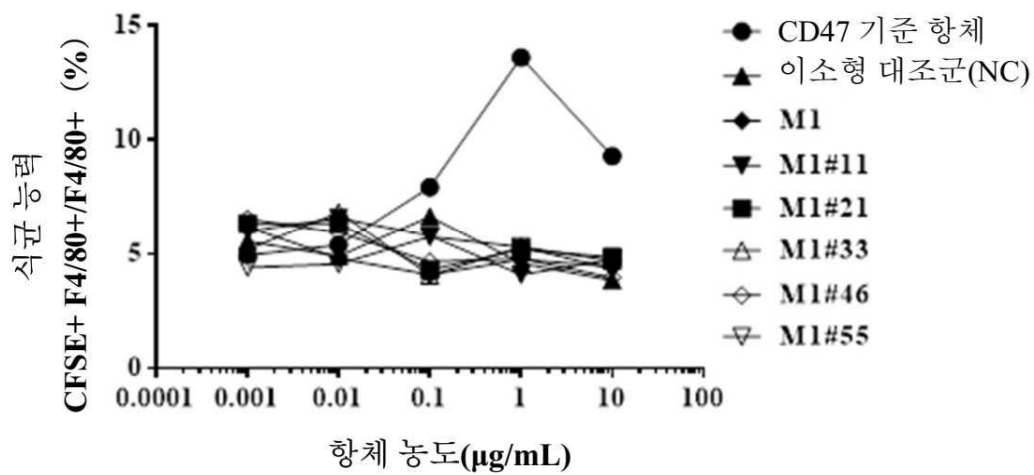
도면5



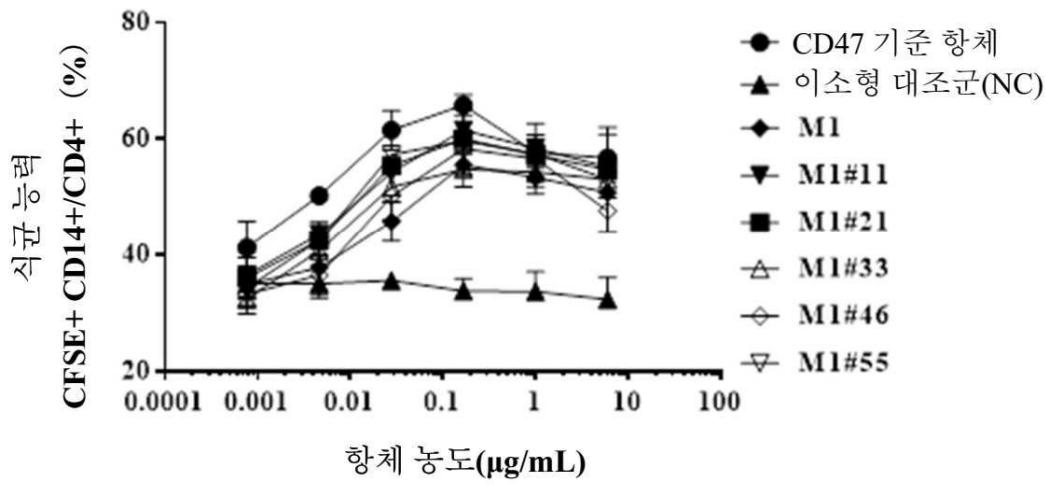
도면6a



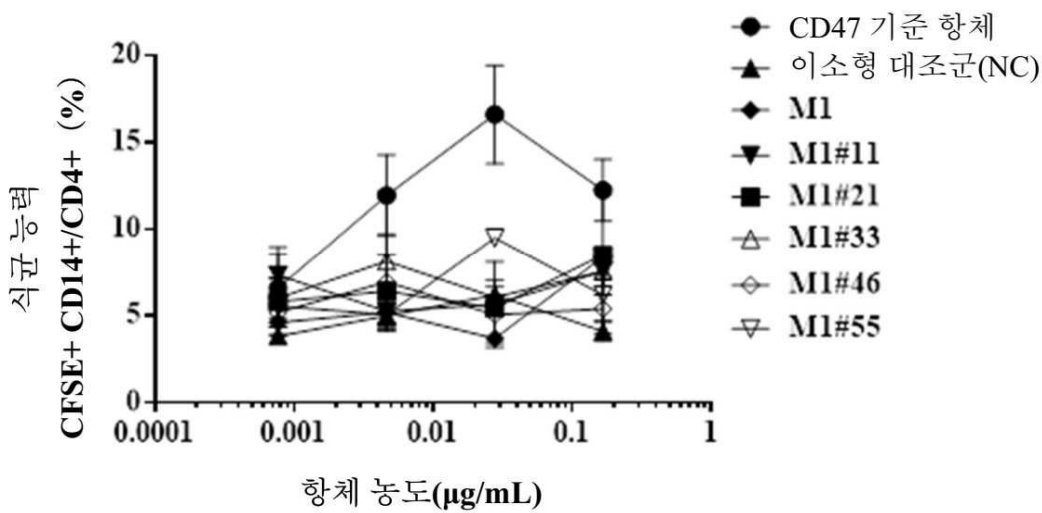
도면6b



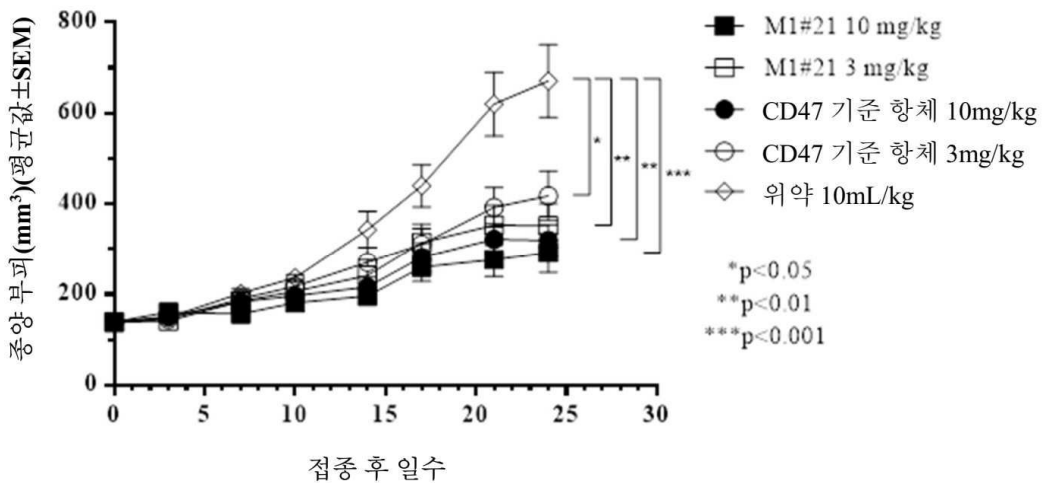
도면6c



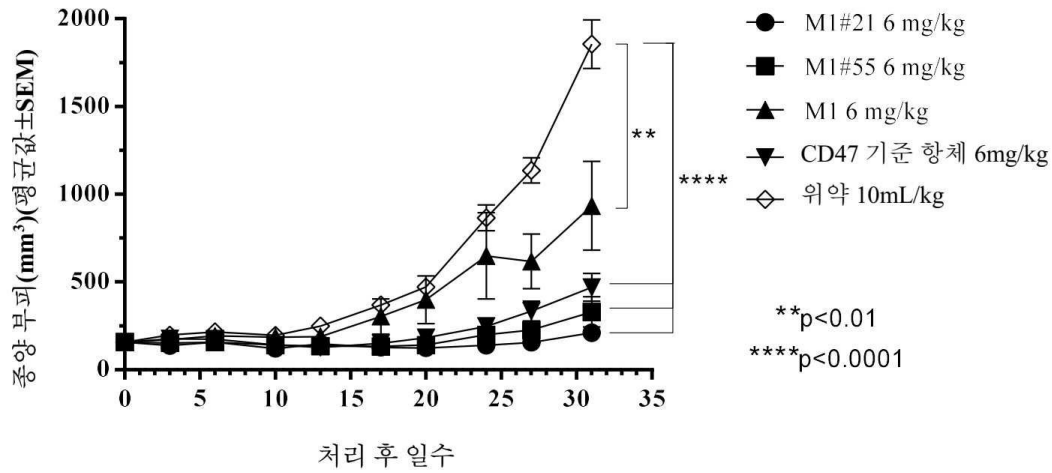
도면6d



도면7



도면8



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Shanghai Henlius Biotech, Inc.  
 Shanghai Henlius Biopharmaceutical Co., Ltd.  
 Shanghai Henlius Biologics Co., Ltd.

<120> ANTI-CD47 ANTIBODIES AND METHODS OF USE

<130> P2021TC1834

<150> PCT/CN2020/118320

<151> 2020-09-28

<160> 104

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(5)

<223> Clone M1 VH CDR1

<400> 1

Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 2  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(16)  
 <223> Clone M1 VH CDR2  
 <400> 2  
 Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 3  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(11)  
 <223> Clone M1 VH CDR3  
 <400> 3  
 Phe Thr Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1                    5                    10  
 <210>  
 > 4  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(13)  
 <223> Clone M1 VL CDR1  
 <400> 4  
 Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile Gly Ser His Lys Val Lys  
 1                    5                    10  
 <210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(7)  
 <223> Clone M1 VL CDR2  
 <400> 5  
 Gly Asn Asp Gln Arg Arg Ser  
 1                    5  
 <210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(11)  
 <223> Clone M1 VL CDR3  
 <400> 6  
 Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Arg Val  
 1                    5                    10  
 <210> 7  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN  
 <222> (1)..(119)  
 <223> Clone M1 VH  
 <400> 7  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
                   20                    25                    30  
  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45  
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
                   50                    55                    60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu



<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(446)

<223> Clone M1 HC

<400> 9

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Arg Phe Thr Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100                    105                    110

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

115                    120                    125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130                    135                    140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145                    150                    155                    160

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

165                    170                    175

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

180                    185                    190

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

195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro

210 215 220  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

275 280 285  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

340 345 350  
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415  
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435 440 445

<210> 10  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> CHAIN  
 <222> (1)..(219)  
 <223> Clone M1 LC  
 <400> 10

Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Thr

1                    5                    10                    15  
 Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile

                  20                    25                    30  
 Gly Ser His Lys Val Lys Trp Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Ala Pro

                  35                    40                    45  
 Arg Leu Leu Ile His Gly Asn Asp Gln Arg Arg Ser Gly Val Pro Asp

                  50                    55                    60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser

65                    70                    75                    80  
 Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp

                  85                    90                    95  
 Asp Ser Leu Asn Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val

                  100                    105                    110  
 Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser

                  115                    120                    125  
 Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser

                  130                    135                    140  
 Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser

                  145                    150                    155                    160  
 Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn

                  165                    170                    175  
 Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp

                  180                    185                    190

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr

195 200 205

Val Glu Lys Thr Val Ala Leu Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(5)

<223> Clone M1#11 VH CDR1

<400> 11

Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(16)

<223> Clone M1#11 VH CDR2

<400> 12

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

1 5 10 15

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(11)

<223> Clone M1#11 VH CDR3

<400> 13

Phe His Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1                    5                    10  
 <210> 14  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(13)  
 <223> Clone M1#11 VL CDR1  
 <400> 14  
 Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile Gly Ser His Lys Val Lys

1                    5                    10  
  
 <210> 15  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(7)  
 <223> Clone M1#11VL CDR2  
 <400> 15  
 Gly Asn Asp Gln Arg Arg Arg

1                    5  
 <210> 16  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(11)  
 <223> Clone M1#11 VL CDR3  
 <400> 16  
 Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Tyr Gly Arg Val

1                    5                    10  
 <210> 17  
 <211> 119  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(119)

<223> Clone M1#11 VH

<400> 17

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Arg Phe His Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

                  100                    105                    110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

                  115

<210> 18

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(116)

<223> Clone M1#11 VL

<400> 18

Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Thr

1                    5                    10                    15

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile

20 25 30  
 Gly Ser His Lys Val Lys Trp Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Ala Pro  
 35 40 45

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

Leu Gly Gln Pro  
 115

<210> 19

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(445)

<223> Clone M1#11 HC

<400> 19

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

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



Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
                   340                          345                          350  
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
                   355                          360                          365  
  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
                   370                          375                          380  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385                          390                          395                          400  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
                           405                          410                          415  
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
                   420                          425                          430  
  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
                   435                          440                          445  
  
 <210> 20  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> CHAIN  
 <222> (1)..(219)  
 <223> Clone M1#11 LC  
 <400> 20  
  
 Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Thr  
 1                  5                          10                          15  
 Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile  
                   20                          25                          30  
  
 Gly Ser His Lys Val Lys Trp Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Ala Pro  
                   35                          40                          45  
 Arg Leu Leu Ile His Gly Asn Asp Gln Arg Arg Arg Gly Val Pro Asp  
                   50                          55                          60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser  
 65                  70                          75                          80

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp  
 85 90 95

Asp Ser Leu Tyr Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
 100 105 110

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser  
 115 120 125

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser  
 130 135 140

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser  
 145 150 155 160

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn  
 165 170 175

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp  
 180 185 190

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr  
 195 200 205

Val Glu Lys Thr Val Ala Leu Thr Glu Cys Ser  
 210 215

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(5)

<223> Clone M1#25 VH CDR1

<400> 21

Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(16)

<223> Clone M1#25 VH CDR2

<400> 22

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

1                    5                    10                    15

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(11)

<223> Clone M1#25 VH CDR3

<400> 23

Phe Thr Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1                    5                    10

<210> 24

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(13)

<223> Clone M1#25 VL CDR1

<400> 24

Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile Gly Ser His Lys Val Lys

1                    5                    10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(7)

<223> Clone M1#25 VL CDR2

<400> 25

Gly Asn Asp Gln Arg Arg Ser

1                    5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(11)

<223> Clone M1#25 VL CDR3

<400> 26

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ala Gly Arg Val

1                    5                    10

<210> 27

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(119)

<223> Clone M1#25 VH

<400> 27

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Arg Phe Thr Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 28

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(116)

<223> Clone M1#25 VL

<400> 28

Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Thr  
 1 5 10 15

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile  
 20 25 30

Gly Ser His Lys Val Lys Trp Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Ala Pro  
 35 40 45

Arg Leu Leu Ile His Gly Asn Asp Gln Arg Arg Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser  
 65 70 75 80

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp  
 85 90 95

Asp Ser Leu Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
 100 105 110

Leu Gly Gln Pro  
 115

<210> 29

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221>

CHAIN

<222> (1)..(445)

<223> Clone M1#25 HC

<400> 29

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
                   20                    25                    30  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45  
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Val Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
  
                   50                    55                    60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
                   85                    90                    95  
 Arg Phe Thr Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
                   100                    105                    110  
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
  
                   115                    120                    125  
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
                   130                    135                    140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145                    150                    155                    160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
                   165                    170                    175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
  
                   180                    185                    190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
                   195                    200                    205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
                   210                    215                    220



<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(219)

<223> Clone M1#25 LC

<400> 30

Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Thr  
1                   5                   10                   15

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile  
                  20                   25                   30

Gly Ser His Lys Val Lys Trp Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Ala Pro  
                  35                   40                   45

Arg Leu Leu Ile His Gly Asn Asp Gln Arg Arg Ser Gly Val Pro Asp  
50                   55                   60

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser  
65                   70                   75                   80

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp  
                  85                   90                   95

Asp Ser Leu Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
                  100                   105                   110

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser  
115                   120                   125

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser  
130                   135                   140

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser  
145                   150                   155                   160

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn  
                  165                   170                   175

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp  
                  180                   185                   190

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr  
195                   200                   205

Val Glu Lys Thr Val Ala Leu Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<

222> (1)..(5)

<223> Clone M1#33 VH CDR1

<400> 31

Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(16)

<223> Clone M1#33 VH CDR2

<400> 32

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(11)

<223> Clone M1#33 VH CDR3

<400> 33

Phe Ile Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1 5 10

<210> 34

<211> 13

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(13)  
 <223> Clone M1#33 VL CDR1  
 <400> 34  
 Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile Gly Ser His Lys Val Lys  
 1                    5                    10

<210> 35  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(7)  
 <223> Clone M1#33 VL CDR2  
 <400> 35  
 Asp Asn Asp Gln Arg Arg Ser

1                    5  
 <210> 36  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(11)  
 <223> Clone M1#33 VL CDR3  
 <400> 36  
 Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Arg Val  
 1                    5                    10

<210> 37  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> CHAIN  
 <222> (1)..(119)

<223> Clone M1#33 VH

<400> 37

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

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

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
                   50                    55                    60

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

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

Arg Phe Ile Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
                   100                    105                    110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 38

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(116)

<223> Clone M1#33 VL

<400> 38

Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Thr

1                    5                    10                    15

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile  
                   20                    25                    30

Gly Ser His Lys Val Lys Trp Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Ala Pro  
                   35                    40                    45

Arg Leu Leu Ile His Asp Asn Asp Gln Arg Arg Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser

65 70 75 80

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp  
 85 90 95

Asp Ser Leu Asn Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
 100 105 110

Leu Gly Gln Pro  
 115

<210> 39  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> CHAIN  
 <222> (1)..(445)  
 <223> Clone M1#33 HC  
 <400> 39

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

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

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

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

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

Arg Phe Ile Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val

355 360 365  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 435 440 445

<210> 40

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(219)

<223> Clone M1#33 LC

<400> 40

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

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

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



<400> 42  
 Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1                    5                    10                    15

<210> 43  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(11)  
 <223> Clone M1#46 VH CDR3

<400> 43  
 Phe Ser Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1                    5                    10

<210> 44  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(13)  
 <223> Clone M1#46 VL CDR1

<400> 44  
 Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile Gly Ser His Lys Val Lys  
 1                    5                    10

<210> 45  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(7)  
 <223> Clone M1#46 VL CDR2

<400> 45  
 Gly Asn Asp Gln Arg Arg Ser  
 1                    5

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(11)

<223> Clone M1#46 VL CDR3

<400> 46

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Tyr Gly Arg Val

1                    5                    10

<210> 47

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(119)

<223> Clone M1#46 VH

<400> 47

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Arg Phe Ser Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100                    105                    110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 48

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(116)

<223> Clone M1#46 VL

<400> 48

Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Thr

1                    5                    10                    15

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile

                  20                    25                    30

Gly Ser His Lys Val Lys Trp Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Ala Pro

                  35                    40                    45

Arg Leu Leu Ile His Gly Asn Asp Gln Arg Arg Ser Gly Val Pro Asp

                  50                    55                    60

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser

65                    70                    75                    80

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

Leu Gly Gln Pro

                  115

<210> 49

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(445)

<223> Clone M1#46 HC

<400> 49

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

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

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

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

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

Arg Phe Ser Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240

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

245 250 255  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
 435 440 445

<210> 50

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(219)

<223> Clone M1#46 LC



<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(5)  
 <223> Clone M1#55 VH CDR1  
 <400> 51

Gly Tyr Tyr Trp Ser  
 1                    5

<210> 52  
 <211> 16

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(16)

<223> Clone M1#55 VH CDR2  
 <400> 52

Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1                    5                    10                    15

<210> 53  
 <211> 11

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(11)

<223> Clone M1#55 VH CDR3  
 <400> 53

Phe Lys Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val  
 1                    5                    10

<210> 54  
 <211> 13

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN

<222> (1)..(13)

<223> Clone M1#55 VL CDR1

<400> 54

Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile Gly Ser His Lys Val Lys

1                    5                    10

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(7)

<223> Clone M1#55 VL CDR2

<400> 55

Gly Asn Asp Gln Arg Arg Glu

1                    5

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(11)

<223> Clone M1#55 VL CDR3

<400> 56

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Tyr Gly Arg Val

1                    5                    10

<210> 57

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(119)

<223> Clone M1#55 VH

<400> 57

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
                   20                    25                    30  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45  
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
                   50                    55                    60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
                   85                    90                    95  
 Arg Phe Lys Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
                   100                    105                    110  
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
                   115  
 <210> 58  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> CHAIN  
 <222> (1)..(116)  
 <223> Clone M1#55 VL  
 <400> 58  
 Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Thr  
 1                    5                    10                    15  
 Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile  
                   20                    25                    30  
 Gly Ser His Lys Val Lys Trp Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Ala Pro  
                   35                    40                    45  
 Arg Leu Leu Ile His Gly Asn Asp Gln Arg Arg Glu Gly Val Pro Asp  
                   50                    55                    60

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

Asp Ser Leu Tyr Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
                          100                      105                      110

Leu Gly Gln Pro  
                          115

<210> 59

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(445)

<223> Clone M1#55 HC

<400> 59

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

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
                          50                      55                      60

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

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

Arg Phe Lys Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
                          100                      105                      110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
                          115                      120                      125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160  
  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
 195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
 210 215 220  
  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270  
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285  
  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320  
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350  
  
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 355 360 365  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly



115 120 125  
 Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser  
 130 135 140

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser  
 145 150 155 160

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn  
 165 170 175

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp  
 180 185 190

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr  
 195 200 205

Val Glu Lys Thr Val Ala Leu Thr Glu Cys Ser  
 210 215

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(5)

<223> Clone M1#21 VH CDR1

<400> 61

Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 62

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(16)

<223> Clone M1#21 VH CDR2

<400> 62

Glu Ile Asn Gln Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1                    5                    10                    15

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(11)

<223> Clone M1#21 VH CDR3

<400> 63

Phe Thr Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val

1                    5                    10

<210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(13)

<223> Clone M1#21 VL CDR1

<400> 64

Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile Gly Ser His Lys Val Lys

1                    5                    10

<210> 65

<211>

7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(7)

<223> Clone M1#21 VL CDR2

<400> 65

Gly Asn Asp Gln Arg Phe Ser

1                    5

<210> 66

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(11)

<223> Clone M1#21 VL CDR3

<400> 66

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Tyr Gly Arg Val

1                    5                    10

<210> 67

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(119)

<223> Clone M1#21 VH

<400> 67

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Gly Glu Ile Asn Gln Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Arg Phe Thr Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

                  100                    105                    110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

                  115

<210> 68  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> CHAIN  
 <222> (1)..(116)  
 <223> Clone M1#21 VL  
 <400> 68

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

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

Leu Gly Gln Pro  
                   115

<210> 69  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> CHAIN  
 <222> (1)..(445)  
 <223> Clone M1#21 HC  
 <400> 69

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

1                    5                    10                    15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr  
                          20                    25                    30  
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                          35                    40                    45  
  
 Gly Glu Ile Asn Gln Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
                          50                    55                    60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
                          85                    90                    95  
 Arg Phe Thr Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
                          100                    105                    110  
  
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
                          115                    120                    125  
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
                          130                    135                    140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145                    150                    155                    160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
                          165                    170                    175  
  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
                          180                    185                    190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
                          195                    200                    205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro  
                          210                    215                    220  
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe  
 225                    230                    235                    240  
  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
                          245                    250                    255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
                   260                  265                  270  
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
                   275                  280                  285  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
                   290                  295                  300  
  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305                  310                  315                  320  
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
                   325                  330                  335  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
                   340                  345                  350  
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
                   355                  360                  365  
  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
                   370                  375                  380  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385                  390                  395                  400  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
                   405                  410                  415  
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
                   420                  425                  430  
  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
                   435                  440                  445  
  
 <210> 70  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> CHAIN  
 <222> (1)..(219)  
 <223> Clone M1#21 LC  
 <400> 70

Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Thr  
 1                    5                    10                    15

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile  
                   20                    25                    30

Gly Ser His Lys Val Lys Trp Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Ala Pro  
                   35                    40                    45

Arg Leu Leu Ile His Gly Asn Asp Gln Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp  
                   50                    55                    60

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser  
 65                    70                    75                    80

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp  
                   85                    90                    95

Asp Ser Leu Tyr Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
                   100                    105                    110

Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser  
                   115                    120                    125

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser  
                   130                    135                    140

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser  
 145                    150                    155                    160

Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn  
                   165                    170                    175

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp  
                   180                    185                    190

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr  
                   195                    200                    205

Val Glu Lys Thr Val Ala Leu Thr Glu Cys Ser  
                   210                    215

<210> 71

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(446)

<223> Clone M1#21 HC-2

<400> 71

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

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

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

Gly Glu Ile Asn Gln Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
                         50                    55                    60

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

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

Arg Phe Thr Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
                         100                    105                    110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
                         115                    120                    125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu  
                         130                    135                    140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
145                    150                    155                    160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
                         165                    170                    175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
                         180                    185                    190

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro  
                         195                    200                    205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(219)

<223> Clone M1#21 LC-2

<400> 72

Ser Ala Leu Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Thr

1                    5                    10                    15

Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Glu Ser Asn Ile

                  20                    25                    30

Gly Ser His Lys Val Lys Trp Tyr Gln Gln Phe Ala Gly Ala Ala Pro

                  35                    40                    45

Arg Leu Leu Ile His Gly Asn Asp Gln Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp

                  50                    55                    60

Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser

65                    70                    75                    80

Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser

                  130                    135                    140

Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp

                  180                    185                    190

Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr

                  195                    200                    205

Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210

215

<210> 73

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(446)

<223> Clone M1#55 HC-2

<400> 73

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Arg Phe Lys Gly Arg Pro Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100                    105                    110

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

115                    120                    125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu

130                    135                    140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145                    150                    155                    160

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



Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445

<210> 74

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> CHAIN

<222> (1)..(219)

<223> Clone M1#55 LC-2

<400> 74

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

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

Asp Ser Leu Tyr Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val  
 100 105 110  
 Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser  
 115 120 125  
 Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser  
 130 135 140  
 Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser



<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(5)

<223> 77Exemplary linker

<400> 77

Gly Gly Gly Ser Gly

1                    5

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(10)

<223> 78Exemplary linker

<400> 78

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1                    5                    10

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(8)

<223> 79Exemplary linker

<400> 79

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly

1                    5

<210> 80

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(12)

<223> 80Exemplary linker

<400> 80  
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
1                    5                    10

<210> 81  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> DOMAIN  
<222> (1)..(6)  
<223> 81Exemplary linker  
<400> 81

Gly Ser Gly Gly Ser Gly  
1                    5

<210> 82  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> DOMAIN  
<222> (1)..(9)  
<223> 82Exemplary linker  
<400> 82

Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly  
1                    5

<210> 83  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> DOMAIN  
<222> (1)..(7)  
<223> 83Exemplary linker  
<400> 83

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
1                    5

<210> 84

<211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN

<222> (1)..(21)

<223> 84Exemplary linker

<400> 84

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1                    5                    10                    15

Gly Gly Gly Ser Gly

20

<210> 85

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(5)

<223> 85Exemplary linker

<400> 85

Pro Ala Pro Ala Pro

1                    5

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(15)

<223> 86Exemplary linker

<400> 86

Pro Ala Pro Ala Pro Pro Ala Pro Ala Pro Pro Ala Pro Ala Pro

1                    5                    10                    15

<210> 87

<211> 7

<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> DOMAIN  
<222> (1)..(7)  
<223> 87Exemplary linker  
<400> 87

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
1                    5

<210> 88  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> DOMAIN  
<222> (1)..(7)  
<223> 88Exemplary linker

<400> 88  
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
1                    5

<210> 89  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> CONFLICT  
<222> (1)..(4)  
<223> 89Exemplary linker

<400> 89  
Ala Ser Thr Lys  
1

<210> 90  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> DOMAIN  
<222> (1)..(12)

<223> 90Exemplary linker  
 <400> 90  
 Ala Ser Thr Lys Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly  
 1                    5                    10

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(7)

<223> 91Exemplary linker

<400> 91

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1                    5

<210> 92

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(12)

<223> 92Exemplary linker

<400> 92

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

1                    5                    10

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221>

> DOMAIN

<222> (1)..(10)

<223> 93Exemplary linker

<400> 93

Gly Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Gly Ser

1                    5                    10

<210> 94

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(20)

<223> 94Exemplary linker

<400> 94

Gly Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Gly Ser Gly Arg Pro Gly Ser Gly

1                    5                    10                    15

Arg Pro Gly Ser

                         20

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(10)

<223> 95Exemplary linker

<400> 95

Gly Arg Gly Gly Ser Gly Arg Gly Gly Ser

1                    5                    10

<210> 96

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(20)

<223> 96Exemplary linker

<400> 96

Gly Arg Gly Gly Ser Gly Arg Gly Gly Ser Gly Arg Gly Gly Ser Gly

1                    5                    10                    15

Arg Gly Gly Ser

20

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(10)

<223> 97Exemplary linker

<400> 97

Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser

1                    5                    10

<210> 98

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(20)

<223> 98Exemplary linker

<400> 98

Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly

1                    5                    10                    15

Lys Pro Gly Ser

20

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(10)

<223> 99Exemplary linker

<400> 99

Gly Glu Pro Gly Ser Gly Glu Pro Gly Ser

1                    5                    10

<210> 100  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> CONFLICT  
 <222> (1)..(20)  
 <223> 100Exemplary linker  
 <400> 100  
 Gly Glu Gly Gly Ser Gly Glu Gly Gly Ser Gly Glu Gly Gly Ser Gly  
 1                    5                    10                    15

Glu Gly Gly Ser  
                   20

<210> 101  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(10)  
 <223> 101Exemplary linker  
 <400> 101  
 Gly Asp Pro Gly Ser Gly Asp Pro Gly Ser  
 1                    5                    10

<210> 102  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><221> DOMAIN  
 <222> (1)..(20)  
 <223> 102Exemplary linker  
 <400> 102  
 Gly Asp Pro Gly Ser Gly Asp Pro Gly Ser Gly Asp Pro Gly Ser Gly  
 1                    5                    10                    15

Asp Pro Gly Ser

20

<210> 103

<211> 312

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(312)

<223> CD47 polypeptide

<400> 103

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



