



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0053665
(43) 공개일자 2022년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2803 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7010974
(22) 출원일자(국제) 2020년09월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년04월01일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2020/113287
(87) 국제공개번호 WO 2021/043220
국제공개일자 2021년03월11일
(30) 우선권주장
201910836601.9 2019년09월03일 중국(CN)
201910835819.2 2019년09월03일 중국(CN)

(71) 출원인
아케소 바이오파마, 인크.
중국 528437 광둥성 중산 토치 디벨롭먼트 존 선
농 불리바드 6
(72) 발명자
장, 평
중국 광둥 528437 중산 토치 디벨롭먼트 존 선농
로드 6
리, 빠이용
중국 광둥 528437 중산 토치 디벨롭먼트 존 선농
로드 6
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김경교, 양용

전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 항-CD47 단일클론 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 항-CD47 단일클론 항체 및 이의 용도에 관한 것이며, 상기 항체는 CCTCC NO: C2018135의 하이브리도마 세포주에 의해 분비된다.

(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

G01N 2333/70596 (2013.01)

(72) 발명자

샤, 유

중국 광둥 528437 쑹산 토치 디벨롭먼트 존 선농
로드 6

왕, 쑹민

중국 광둥 528437 쑹산 토치 디벨롭먼트 존 선농
로드 6

명세서

청구범위

청구항 1

CD47에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 포함된 하기 CDR 서열로부터 선택되는 CDR 서열을 포함하고:

(1) 서열번호 2에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및

서열번호 4에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는

(2) 서열번호 12에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및

서열번호 14에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는

(3) 서열번호 16에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및

서열번호 18에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는

(4) 서열번호 20에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및

서열번호 22에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;

바람직하게는, 상기 항체는 다음을 포함하며:

서열번호 5에 제시된 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 HCDR1;

서열번호 6에 제시된 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 HCDR2; 및

서열번호 7에 제시된 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 HCDR3;

상기 항체는 하기를 더 포함한다:

서열번호 8에 제시된 아미노산 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 LCDR1;

서열번호 9에 제시된 아미노산 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 LCDR2; 및

서열번호 10에 제시된 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 LCDR3.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 가변 영역의 FR 및 경쇄 가변 영역의 FR의 조합을 더 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

(1) 중쇄 가변 영역의 FR은 FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4를 포함하되, 상기 FR-H1은 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 23에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 상기 FR-H2는 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 24에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되며; 상기 FR-H3은 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 25에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 및 상기 FR-H4는 서열번호 26에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 26에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 26에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되며;

경쇄 가변 영역의 FR은 FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4를 포함하되, 상기 FR-L1은 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 27에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 상기 FR-L2는 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 28에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되며; 상기 FR-L3은 서열번호 29에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 29에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 29에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 및 상기 FR-L4는 서열번호 30에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 30에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 30에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되며;

(2) 중쇄 가변 영역의 FR은 FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4를 포함하되, 상기 FR-H1은 서열번호 31에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 31에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 31에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 상기 FR-H2는 서열번호 32에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 32에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 52에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되며; 상기 FR-L3은 서열번호 53에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 53에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 53에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 및 상기 FR-L4는 서열번호 54에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 54에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는 서열번호 54에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항체는 하기를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

(1) 다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 중쇄 가변 영역:

서열번호 2에 제시된 아미노산 서열, 또는

서열번호 2에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

서열번호 2에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열, 및

다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 경쇄 가변 영역:

서열번호 4에 제시된 아미노산 서열, 또는

서열번호 4에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

서열번호 4에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열;

(2) 다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 중쇄 가변 영역:

서열번호 12에 제시된 아미노산 서열, 또는

서열번호 12로 기재되는 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

서열번호 12에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및

다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 경쇄 가변 영역:

서열번호 14에 제시된 아미노산 서열, 또는

서열번호 14에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

서열번호 14에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열;

(3) 다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 중쇄 가변 영역:

서열번호 16에 제시된 아미노산 서열, 또는

서열번호 16에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

서열번호 16에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및

다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 경쇄 가변 영역:

서열번호 18에 제시된 아미노산 서열, 또는

서열번호 18에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

서열번호 18에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및

(4) 다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 중쇄 가변 영역:

서열번호 20에 제시된 아미노산 서열, 또는

서열번호 20에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

서열번호 20에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및

다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 경쇄 가변 영역:

서열번호 22에 제시된 아미노산 서열, 또는

서열번호 22에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

서열번호 22에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 나타낸 바와 같은 HCDR1-3 및 LCDR1-3을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

중쇄 가변 영역의 3개의 CDR 영역의 아미노산 서열은 다음과 같다:

HCDR1: GYTFTSYW(서열번호 5),

HCDR2: IDPSDSET(서열번호 6), 및

HCDR3: ARLYRWYFDV(서열번호 7); 및

경쇄 가변 영역의 3개의 CDR 영역의 아미노산 서열은 다음과 같다:

LCDR1: EIVGT(서열번호 8),

LCDR2: GAS(서열번호 9), 및

LCDR3: GQSYNFPYT(서열번호 10).

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 더 포함하며, 상기 불변 영역은 뮤린 이외의 종, 예를 들어, 인간 항체, 바람직하게는 인간 IgG 또는 IgM, 보다 바람직하게는 IgG1로부터 유래되고; 바람직하게는, 상기 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, ACCESSION No. P01857(서열번호 58)이거나 또는 Ig 감마-4 사슬 C 영역, ACCESSION No. P01861.1(서열번호 56)이고; 상기 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, ACCESSION No. P01834(서열번호 57)인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 및 경쇄의 조합을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

- (1) 서열번호 59에 제시된 중쇄 및 서열번호 60에 제시된 경쇄;
- (2) 서열번호 61에 제시된 중쇄 및 서열번호 62에 제시된 경쇄;
- (3) 서열번호 63에 제시된 중쇄 및 서열번호 64에 제시된 경쇄;
- (4) 서열번호 65에 제시된 중쇄 및 서열번호 66에 제시된 경쇄;
- (5) 서열번호 67에 제시된 중쇄 및 서열번호 68에 제시된 경쇄; 및
- (6) 서열번호 69에 제시된 중쇄 및 서열번호 70에 제시된 경쇄.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 EU 넘버링 시스템에 따른 234번 및/또는 235번 위치에 도입된 아미노산 돌연변이를 더 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 EU 넘버링 시스템에 따른 L234A 및/또는 L235A 돌연변이를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항체는 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 및 경쇄의 조합을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

- (1) 서열번호 59에 제시된 중쇄 및 서열번호 60에 제시된 경쇄;
- (2) 서열번호 61에 제시된 중쇄 및 서열번호 62에 제시된 경쇄; 및
- (3) 서열번호 63에 제시된 중쇄 및 서열번호 64에 제시된 경쇄.

청구항 10

분리된 폴리펩타이드로서,

- (1) 서열번호 5, 6 및 7에 제시된 서열을 포함하되, 상기 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 항체는 서열번호 8, 9 및 10에 제시된 서열을 더 포함하고;

(2) 서열번호 8, 9 및 10에 제시된 서열을 포함하되, 상기 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 항체는 서열번호 5, 6 및 7에 제시된 서열을 더 포함하고;

(3) 서열번호 2, 12, 16 및 20에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하되, 상기 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 항체는 서열번호 4, 14, 18 및 22에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 더 포함하거나; 또는

(4) 서열번호 4, 14, 18 및 22에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하되, 상기 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 단일클론 항체는 서열번호 2, 12, 16 및 20에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 더 포함하는, 분리된 폴리펩타이드.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단일쇄 항체(예를 들어, scFv), 2가 항체 및 도메인 항체로부터 선택되는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 인간화 항체, 키메라 항체 또는 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체)인, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 약 10⁻⁵ M 미만, 예를 들어, 약 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M 또는 10⁻¹⁰ M 미만의 KD로 인간 CD47 단백질에 결합하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 약 100nM 미만, 예를 들어, 약 10nM, 1nM, 0.9nM, 0.8nM, 0.7nM, 0.6nM, 0.5nM, 0.4nM, 0.3nM, 0.2nM 또는 0.1nM 미만의 EC50으로 인간 CD47 단백질에 결합하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 15

하기로부터 선택되는 폴리펩타이드를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오타이드:

(1) 서열번호 5, 6 및 7에 제시된 서열을 포함하는 폴리펩타이드이되, 상기 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체

의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 상기 항체는 서열번호 8, 9 및 10에 제시된 서열을 더 포함하고;

(2) 서열번호 8, 9 및 10에 제시된 서열을 포함하는 폴리펩타이드이되, 상기 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 상기 항체는 서열번호 5, 6 및 7에 제시된 서열을 더 포함하고;

(3) 서열번호 2, 12, 16 및 20에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리펩타이드 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열의 폴리펩타이드이되, 상기 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 상기 항체는 서열번호 4, 14, 18 및 22에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 더 포함하거나; 또는

(4) 서열번호 4, 14, 18 및 22에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리펩타이드 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열의 폴리펩타이드이되, 상기 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 상기 항체는 서열번호 2, 12, 16 및 20에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 더 포함한다.

청구항 16

제15항에 있어서,

(1) 상기 폴리뉴클레오타이드 분자는 서열번호 1, 11, 15 또는 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고;

(2) 상기 폴리뉴클레오타이드 분자는 서열번호 3, 13, 17 또는 21 또는 서열에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는, 분리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 따른 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는, 벡터.

청구항 18

제15항 또는 제16항에 따른 폴리뉴클레오타이드 분자 또는 제17항에 따른 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 19

제18항에 따른 숙주 세포를 적합한 조건하에서 배양하는 단계, 및 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 분리하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편을

제조하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 이에 커플링된 접합된 모이어티를 포함하되, 상기 접합된 모이어티는 정제 태그(예를 들어, His 태그), 세포독성제 또는 검출 가능한 표지이고; 바람직하게는, 상기 접합된 모이어티는 방사성 동위원소, 발광 물질, 착색 물질, 효소 또는 폴리에틸렌 글리콜인, 항체 접합체.

청구항 21

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 및 또 다른 항원 및/또는 또 다른 항원 에피토프에 대한 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는, 다중특이성 항체, 바람직하게는 이중특이성 항체.

청구항 22

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 23

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 제20항에 따른 항체 접합체, 제21항에 따른 다중특이성 항체 또는 제22항에 따른 융합 단백질을 포함하는, 키트.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 특이적으로 확인하는 2차 항체를 더 포함하며; 선택적으로, 상기 2차 항체는 검출 가능한 표지, 예컨대, 방사성 동위원소, 발광 물질, 착색 물질, 효소 또는 폴리에틸렌 글리콜을 더 포함하는, 키트.

청구항 25

하이브리도마 세포주 및 상기 하이브리도마 세포주에 의해 생성되는 단일클론 항체로서,

상기 하이브리도마 세포주는 CCTCC NO. 2018135의 하이브리도마 세포주 LT012인, 하이브리도마 세포주 및 상기 하이브리도마 세포주에 의해 생성되는 단일클론 항체.

청구항 26

샘플에서 인간 CD47의 존재 또는 수준을 검출하는데 있어서 또는 샘플에서 인간 CD47의 존재 또는 수준을 검출하기 위한 키트의 제조에 있어서의, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제20항에 따른 항체 접합체, 제21항에 따른 다중특이성 항체 또는 제22항에 따른 융합 단백질의 용도.

청구항 27

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제20항에 따른 항체 접합체, 제21항에 따른 다중특이성 항체 또는 제22항에 따른 융합 단백질 및 선택적으로 약제학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 28

하기를 제조하는데 있어서의 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제20항에 따른 항체 접합체, 제21항에 따른 다중특이성 항체 또는 제22항에 따른 융합 단백질의 용도:

인간 SIRP α 에 대한 인간 CD47의 결합을 차단하기 위한 약제

인간 CD47의 활성을 차단하거나 또는 인간 CD47의 수준을 하향 조절하기 위한 약제, 또는

CD47에 대한 인간 SIRP α 의 결합에 의해 매개되는 세포 반응을 차단하기 위한 약제.

청구항 29

종양을 치료하거나, 또는 종양을 치료하기 위한 약제를 제조하는데 있어서의 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항

에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제20항에 따른 항체 접합체, 제21항에 따른 다중특이성 항체 또는 제22항에 따른 융합 단백질의 용도로서,

상기 종양은 바람직하게는 CD47을 발현하는 종양, 바람직하게는 암, 예를 들어, 혈액성 악성 종양 또는 고형 종양, 보다 바람직하게는 림프종, 대장암 또는 유방암, 보다 바람직하게는 비-호지킨 림프종, 및 훨씬 더 바람직하게는 B 세포 림프종 세포인, 용도.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 약제는 주사에 적합한 형태, 바람직하게는 피하 주사, 피내 주사, 정맥 주사, 근육내 주사 또는 병변내 주사에 의해 투여하기에 적합한 형태인, 용도.

청구항 31

생체내 또는 시험관내 방법으로서,

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 제20항에 따른 항체 접합체, 제21항에 따른 다중특이성 항체 또는 제22항에 따른 융합 단백질을 포함하는 세포를 투여하는 단계 또는 유효량의 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 상기 항체 접합체, 상기 다중특이성 항체 또는 상기 융합 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 방법은:

인간 SIRP α 에 대한 CD47의 결합을 차단하기 위한 방법

인간 CD47의 활성을 차단하거나 또는 인간 CD47의 수준을 하향 조절하기 위한 방법, 및

CD47에 대한 인간 SIRP α 의 결합에 의해 매개되는 세포 반응을 차단하기 위한 방법

으로부터 선택되는, 생체내 또는 시험관내 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명 자가면역 질환의 치료 및 분자 면역학 분야, 특히 항-CD47 항체, 이를 포함하는 약제학적 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항-CD47 단일클론 항체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] CD47은 인테그린 관련 단백질(integrin associated protein: IAP)로도 지칭된다. CD47은 약 50kDa의 분자량을 갖는 5-스팬 막관통 단백질이며, 면역글로불린 슈퍼패밀리에 속한다. 이의 세포외 N-말단은 IgV 도메인이고, α v β 3(CD51/CD61) 및 α IIb β 3(CD41/CD61) 인테그린에 연결된다. CD47은 세포 전달, T 세포 및 수지상 세포(Dendritic cell: DC) 활성화 및 축삭 발달과 같은 다양한 생리학적 기능에 관여한다.

[0003] CD47은 적혈구를 포함한 모든 유형의 세포에서 발현되며, 종양 세포에서 고도로 발현된다. CD47은 2개의 리간드, 즉, 신호 조절 단백질- α (signal regulatory protein- α : SIRP α) 및 트롬보스폰딘-1(thrombospondin: TSP1)을 갖는다. 면역글로불린 도메인을 포함하는 수용체 막관통 당단백질인 SIRP α 는 SIRP 패밀리에 속하며, 주로 대식세포 및 신경 세포에서 발현된다. CD47-SIRP α 경로에서, CD47 단백질은 SIRP α 에 결합하고, 이의 면역수용체 타이로신-기반 저해 모티프(tyrosine-based inhibitory motif: ITIM)를 인산화한 다음, 세포내에서 SHP-1 단백질을 동원하여 일련의 캐스케이드 반응을 생성하여 대식세포 식균 작용을 저해한다(Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, et al. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRP α signalling pathway. *Trends in cell biology*, 2009, 19(2): 72-80.). 그러나, 정상 적혈구는 세포막 표면의 CD47이 대식세포의 SIRP α 에 결합하여 생성된 저해 신호로 인해 식균되지 않는다. (Oldenborg P A, Zheleznyak A, Fang Y F, et al. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science*, 2000, 288(5473): 2051-2054.). 3개의 펩타이드 사슬로 구성된 동형 삼량체인 TSP1은 다른 세포 표면 수용체, 매트릭스 성분 및 성장 인자와의 상호작용을 통해 세포 증식, 세포자멸사, 부착, 이동, 혈관신생 및 기타 과정에 관여한다(Jiang P, Lagenaur CF, Narayanan V. Integrin-associated Protein Is a Ligand for the P84 Neural Adhesion Molecule. *Journal of Biological Chemistry* 1999. 274:559-62).

[0004] 대식세포는 단핵구로부터 유래되며, 단핵구는 골수의 전구체 세포로부터 유래된다. 이의 주요 기능은 고정된 세

포 또는 유리 세포 형태의 세포 찌꺼기 및 병원체를 식균하고, 림프구 또는 다른 면역 세포를 활성화하여 병원체에 반응하는 것이다. 현재, 연구는 종양 세포가 대식세포 식균 작용을 피하는 메커니즘을 가짐을 시사한다. 종양 세포가 성장하는 동안, 칼레티쿨린(calreticulin)과 같은 특정 단백질이 표면에 형성되고, 종양 세포의 정체가 노출되어 종양 세포가 유인된 대식세포에 의해 식균된다. 그러나, CD47-SIRP α 경로는 대식세포 식균 작용의 저해를 활성화하기 때문에, CD47이 고도로 발현된 종양 세포는 SIRP α 가 있는 대식세포에 의해 정상 세포로 잘못 인식되어 대식세포 식균 작용을 회피한다(CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. Jaiswal S, Jamieson C H M, Pang W W, et al. *Cell*, 2009, 138(3) 271-285)).

[0005] 현재, 연구는 항-CD47 항체가 주로 두 가지 메커니즘을 통해 종양 세포를 죽임을 시사한다. 1. CD47에 대한 항-CD47 항체의 결합은 CD47-SIRP α 경로를 차단하여 대식세포가 식균 작용을 수행하도록 한다. 2. 항-CD47 항체는 DC 세포 및 CD8+ T 세포를 통해 종양-살해 효과를 발휘한다. DC 세포는 항-CD47 항체와 칼레티쿨린과 같은 전-식균성(pro-phagocytic) 분자 사이의 상승작용을 통해 종양 세포를 식균하고, 종양-관련 항원을 CD8+ T 세포에 제시하여 종양에 대한 CD8+ T 세포의 특이적 살해 효과를 발휘한다(CD47 blockade as another immune checkpoint therapy for cancer. Vonderheide R H. *Nature Medicine*, 2015, 21(10):1122). 이들 두 가지 메커니즘을 통해, 항-CD47 항체는 비-특이적 면역 및 특이적 면역 모두를 활성화하는 능력을 가질 가능성이 매우 높음을 시사한다.

[0006] 현재, 항-CD47 단일클론 항체 약물은 다양한 응용 분야에서 유망한 유용성을 가지며, 종양을 치료하는데 효과적이다. 이들은 다양한 종양을 치료하는데 사용될 수 있다. 항-CD47 단일클론 항체 약물 Hu5F9-G4는 전임상 실험에서 혈액암 및 고형 종양의 성장 및 전이를 효과적으로 저해할 수 있다(Abstract PR13: The anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 is a novel immune checkpoint inhibitor with synergistic efficacy in combination with clinically active cancer targeting antibodies[J] Chao M P, McKenna K M, Cha A, et al., 2016).

[0007] 따라서, 종양의 치료를 위한 CD47에 대한 더 높은 친화성, 더 높은 효능 및 더 적은 독성 부작용을 갖는 항체 약제의 개발은 매우 중요하다.

발명의 내용

[0008] 요약

[0009] 본 발명자들은 포유동물 세포 발현 시스템을 사용하여 재조합 인간 CD47을 항원으로 발현하여 마우스를 면역화하고, 마우스 비장 세포 및 골수종 세포의 융합으로 하이브리도마 세포를 얻었다. 하기 하이브리도마 세포주는 다수의 샘플을 스크리닝하여 수득된다.

[0010] 본 발명자들은 다음을 발견하였다:

[0011] 하이브리도마 세포주 LT012는 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 단일클론 항체(6F7로 명명됨)를 분비할 수 있으며, 단일클론 항체는 CD47에 결합하기 위해 수용체 SIRP α ECD-hFc-바이오틴과 경쟁하여 CD47에 대한 SIRP α 의 결합을 효과적으로 차단하고, 대식세포에 의한 종양 세포의 식균 작용을 더 촉진할 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명자들은 인간화 단일클론 항체 6F7(6F7H1L1, 6F7H2L2 및 6F7H3L3으로 명명됨)을 제조하였다.

[0013] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0014] 본 발명의 일 양태는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 관한 것이되,

[0015] 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역에 함유된 하기 CDR 서열로부터 선택되는 CDR 서열을 포함하고:

[0016] (1) 서열번호 2에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및

[0017] 서열번호 4에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는

[0018] (2) 서열번호 12에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및

[0019] 서열번호 14에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는

[0020] (3) 서열번호 16에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및

[0021] 서열번호 18에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3; 또는

- [0022] (4) 서열번호 20에 제시된 중쇄 가변 영역에 포함된 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및
- [0023] 서열번호 22에 제시된 경쇄 가변 영역에 포함된 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3;
- [0024] 바람직하게는, 항체는 다음을 포함하며:
- [0025] 서열번호 5에 제시된 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 HCDR1;
- [0026] 서열번호 6에 제시된 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 HCDR2; 및
- [0027] 서열번호 7에 제시된 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 HCDR3.
- [0028] 항체는 다음을 더 포함한다:
- [0029] 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 LCDR1;
- [0030] 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 LCDR2; 및
- [0031] 서열번호 10에 제시된 서열, 상기 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개 또는 3개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는 LCDR3.
- [0032] 본 발명의 일 실시형태에서, 항체는 다음을 포함한다:
- [0033] (1) 다음을 포함하거나 또는 이로 구성된 중쇄 가변 영역:
- [0034] 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열, 또는
- [0035] 서열번호 2에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는
- [0036] 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열, 및
- [0037] 다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 경쇄 가변 영역:
- [0038] 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열, 또는
- [0039] 서열번호 4에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는
- [0040] 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개,

25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열;

[0041] (2) 다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 중쇄 가변 영역:

[0042] 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열, 또는

[0043] 서열번호 12로 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

[0044] 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및

[0045] 다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 경쇄 가변 영역:

[0046] 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열, 또는

[0047] 서열번호 14에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

[0048] 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열;

[0049] (3) 다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 중쇄 가변 영역:

[0050] 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열, 또는

[0051] 서열번호 16에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

[0052] 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및

[0053] 다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 경쇄 가변 영역:

[0054] 서열번호 18에 제시된 아미노산 서열, 또는

[0055] 서열번호 18에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

[0056] 서열번호 18에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및

[0057] (4) 다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 중쇄 가변 영역:

[0058] 서열번호 20에 제시된 아미노산 서열, 또는

[0059] 서열번호 20에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는

[0060] 서열번호 20에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열; 및

- [0061] 다음을 포함하거나 또는 이로 구성되는 경쇄 가변 영역:
- [0062] 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열, 또는
- [0063] 서열번호 22에 제시된 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열, 또는
- [0064] 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열.
- [0065] 위의 (1) 내지 (12)의 항체의 CDR 영역의 아미노산 서열은 당업자에게 잘 알려진 기술적 수단, 예를 들어, VBASE2 데이터베이스를 통해 분석된다.
- [0066] 본 명세서에 기재된 항체 6F7, 6F7 H1L1, 6F7 H2L2 및 6F7 H3L3은 동일한 HCDR1-3 및 LCDR1-3을 공유한다.
- [0067] 중쇄 가변 영역의 3개의 CDR 영역의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0068] HCDR1: GYTFTSYW(서열번호 5),
- [0069] HCDR2: IDPSDSET(서열번호 6), 및
- [0070] HCDR3: ARLYRWYFDV(서열번호 7);
- [0071] 경쇄 가변 영역의 3개의 CDR 영역의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0072] LCDR1: EIVGTY(서열번호 8),
- [0073] LCDR2: GAS(서열번호 9), 및
- [0074] LCDR3: GQSYNFPYT(서열번호 10).
- [0075] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 항체는 다음으로 구성된 군으로부터 선택된다:
- [0076] 6F7 H1L1(G1M) 중쇄(서열번호 59)의 아미노산 서열
- [0077] 6F7 H1L1(G1M) 경쇄(서열번호 60)의 아미노산 서열
- [0078] 6F7 H2L2(G1M) 중쇄(서열번호 61)의 아미노산 서열
- [0079] 6F7 H2L2(G1M) 경쇄(서열번호 62)의 아미노산 서열
- [0080] 6F7 H3L3(G1M) 중쇄(서열번호 63)의 아미노산 서열
- [0081] 6F7 H3L3(G1M) 경쇄(서열번호 64)의 아미노산 서열
- [0082] 6F7 H1L1(hG4) 중쇄(서열번호 65)의 아미노산 서열
- [0083] 6F7 H1L1(hG4) 경쇄(서열번호 66)의 아미노산 서열
- [0084] 6F7 H2L2(hG4) 중쇄(서열번호 67)의 아미노산 서열
- [0085] 6F7 H2L2(hG4) 경쇄(서열번호 68)의 아미노산 서열
- [0086] 6F7 H3L3(hG4) 중쇄(서열번호 69)의 아미노산 서열
- [0087] 6F7 H3L3(hG4) 경쇄(서열번호 70)의 아미노산 서열.
- [0088] 본 발명의 일 실시형태에서, 항체(바람직하게는 6F7 항체)는 중쇄 가변 영역에 FR, 바람직하게는 FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4를 포함하는 FR을 추가로 포함하되, FR-H1은 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 23에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; FR-H2는 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 24에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람

직하계는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되며; FR-H3은 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 25에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 그리고 FR-H4는 서열번호 26에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 26에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 26에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0089]

본 발명의 일 실시형태에서, 항체(바람직하게는 6F7 항체)는 경쇄 가변 영역에 FR, 바람직하게는 FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4를 포함하는 FR을 추가로 포함하되, FR-L1은 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 27에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; FR-L2는 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 28에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 그리고 FR-L4는 서열번호 30에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 30에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 30에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0090]

본 발명의 일 실시형태에서, 항체(바람직하게는 6F7 H1L1 항체)는 중쇄 가변 영역에서 FR, 바람직하게는 FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4를 포함하는 FR을 추가로 포함하되, FR-H1은 서열번호 31에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 31에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 31에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; FR-H2는 서열번호 32에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 32에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 32에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 그리고 FR-H4는 서열번호 34에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 34에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%,

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 34에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0091]

본 발명의 일 실시형태에서, 항체(바람직하게는 6F7 H1L1 항체)는 경쇄 가변 영역에 FR, 바람직하게는 FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4를 포함하는 FR을 추가로 포함하되, FR-L1은 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 35에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; FR-L2는 서열번호 36에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 36에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 36에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되며; FR-L3은 서열번호 37에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 37에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 37에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 그리고 FR-L4는 서열번호 38에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 38에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 38에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0092]

본 발명의 일 실시형태에서, 항체(바람직하게는 6F7 H2L2 항체)는 중쇄 가변 영역에서 FR, 바람직하게는 FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4를 포함하는 FR을 추가로 포함하되, FR-H1은 서열번호 39에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 39에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 39에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; FR-H2는 서열번호 40에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 40에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 40에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되며; FR-H3은 서열번호 41에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 41에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 41에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 그리고 FR-H4는 서열번호 42에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 42에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 42에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0093]

본 발명의 일 실시형태에서, 항체(바람직하게는 6F7 H2L2 항체)는 경쇄 가변 영역에 FR, 바람직하게는 FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4를 포함하는 FR을 추가로 포함하되, FR-L1은 서열번호 43에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 43에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 43에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖

는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; FR-L2는 서열번호 44에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 44에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 44에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되며; FR-L3은 서열번호 45에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 45에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 45에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 및 FR-L4는 서열번호 46에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 46에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 46에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0094]

본 발명의 일 실시형태에서, 항체(바람직하게는 6F7 H3L3 항체)는 중쇄 가변 영역에서 FR, 바람직하게는 FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4를 포함하는 FR을 추가로 포함하되, FR-H1은 서열번호 47에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 47에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 47에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; FR-H2는 서열번호 48에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 48에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 48에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 그리고 FR-H4는 서열번호 50에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 50에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 50에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0095]

본 발명의 일 실시형태에서, 항체(바람직하게는 6F7 H3L3 항체)는 경쇄 가변 영역에 FR, 바람직하게는 FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4를 포함하는 FR을 추가로 포함하되, FR-L1은 서열번호 51에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 51에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 51에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; FR-L2는 서열번호 52에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 52에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 52에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되며; FR-L3은 서열번호 53에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 53에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 53에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산

서열을 포함하거나 또는 이로 구성되고; 및 FR-L4는 서열번호 54에 제시된 아미노산 서열, 서열번호 54에 제시된 서열에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 서열번호 54에 제시된 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0096] 본 발명의 일 양태는 서열번호 5, 6 및 7에 제시된 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드에 관한 것이되, 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 항체는 서열번호 8, 9 및 10에 제시된 서열을 추가로 포함한다.

[0097] 본 발명의 일 양태는 서열번호 8, 9 및 10에 제시된 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드에 관한 것이되, 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 항체는 서열번호 5, 6 및 7에 제시된 서열을 추가로 포함한다.

[0098] 본 발명의 일 양태는 서열번호 2, 12, 16 및 20에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드에 관한 것이되, 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 항체는 서열번호 4, 14, 18 및 22에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 추가로 포함하거나; 또는

[0099] 본 발명의 일 양태는 서열번호 4, 14, 18 및 22에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩타이드에 관한 것이되, 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 단일클론 항체는 서열번호 2, 12, 16 및 20에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 아미노산 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 추가로 포함한다.

[0100] 본 발명의 일 실시형태에서, 항원-결합 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, 상보성 결정 영역(CDR) 단편, 단일쇄 항체(예를 들어, scFv), 2가 항체 및 도메인 항체로부터 선택된다.

[0101] 본 발명의 실시형태에서, 항체는 인간화 항체, 키메라 항체 또는 다중특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체)이다.

[0102] 본 발명의 일 실시형태에서, 항체는 약 10⁻⁵ M 미만, 예를 들어, 약 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M 또는 10⁻¹⁰ M 미만의 KD로 인간 CD47 단백질에 결합한다. 바람직하게는, KD는 Fortebio (포르테바이오) 분자 상호작용 분석기에 의해 측정된다.

[0103] 본 발명의 일 실시형태에서, 항체는 약 100nM 미만, 예를 들어, 약 10nM, 1nM, 0.9nM, 0.8nM, 0.7nM, 0.6nM, 0.5nM, 0.4nM, 0.3nM, 0.2nM 또는 0.1nM 미만의 EC50으로 인간 CD47 단백질에 결합한다. 구체적으로, EC50은 간접 ELISA에 의해 측정된다.

- [0104] 본 발명의 일 실시형태에서, 항체는 불변 영역을 포함하며, 불변 영역은 뮤린 이외의 종, 예를 들어, 인간 항체, 바람직하게는 인간 IgG, 보다 바람직하게는 IgG1 또는 IgG4로부터 유래된다.
- [0105] 본 발명의 일 실시형태에서, 항체의 불변 영역은 인간화되며, 예를 들어, 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, 보다 바람직하게는 GenBank ACCESSION No. P01857(서열번호 58)의 Ig 감마-1 사슬 C 영역이거나, 또는 Ig 감마-4 사슬 C 영역, 보다 바람직하게는 GenBank ACCESSION No. P01861.1(서열번호 56)의 Ig 감마-4 사슬 C 영역이고; 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, 보다 바람직하게는 GenBank ACCESSION No. P01834(서열번호 57)의 Ig 카파 사슬 C 영역이다. 본 명세서에 기재된 항체는 6F7 H1L1, 6F7 H2L2 및 6F7 H3L3의 가변 영역에 기초하여 하기 불변 영역을 사용하고: 중쇄 불변 영역은 ACCESSION No. P01857(서열번호 58)의 Ig 감마-1 사슬 C 영역이거나, 또는 중쇄 불변 영역은 ACCESSION No. P01861.1(서열번호 56)의 Ig 감마-4 사슬 C 영역이며; 경쇄 불변 영역은 ACCESSION No. P01834(서열번호 57)의 Ig 카파 사슬 C 영역이다. 본 발명의 또 다른 양태는 서열번호 5, 6 및 7에 제시된 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이 되, 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 항체는 서열번호 8, 9 및 10에 제시된 서열을 추가로 포함한다.
- [0106] 본 발명의 일 양태는 서열번호 8, 9 및 10에 제시된 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이 되, 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 항체는 서열번호 5, 6 및 7에 제시된 서열을 추가로 포함한다.
- [0107] 본 발명의 일 양태는 서열번호 2, 12, 16 및 20에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 분리된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이 되, 폴리펩타이드는 항-인간 CD47 항체의 일부로서 인간 CD47에 특이적으로 결합하고, 항체는 서열번호 4, 14, 18 및 22에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 추가로 포함하고; 또는
- [0108] 본 발명의 일 양태는 서열번호 4, 14, 18 및 22에 제시된 서열로부터 선택되는 서열, 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열 또는 상기 서열과 비교하여 하나 이상(바람직하게는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개 또는 30개)의 보존적 아미노산 돌연변이(바람직하게는 치환, 삽입 또는 결실)를 갖는 아미노산 서열을 추가로 포함한다.
- [0109] 구체적으로, 폴리뉴클레오타이드 분자는 서열번호 1, 서열번호 11, 서열번호 15 또는 서열번호 19에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.
- [0110] 구체적으로, 폴리뉴클레오타이드 분자는 서열번호 3, 서열번호 13, 서열번호 17 또는 서열번호 21에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 상기 서열에 대해 적어도 85%, 바람직하게는 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하거나 또는 이로 구성된다.
- [0111] 본 발명의 또 다른 양태는 위에 기재된 바와 같은 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 분자 중 어느 하나를

포함하는 벡터에 관한 것이다.

- [0112] 본 발명의 또 다른 양태는 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 분자 중 어느 하나 또는 위에 기재된 바와 같은 본 명세서에 기재된 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.
- [0113] 본 발명의 또 다른 양태는 적합한 조건에서 본 명세서에 기재된 숙주 세포를 배양하는 단계 및 세포 배양물로부터 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 분리하는 단계를 포함하는, 위에 기재된 바와 같은 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 어느 하나를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0114] 본 발명의 일 양태는 항-인간 CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 이에 커플링된 접합된 모이어티를 포함하는 항체 접합체를 추가로 제공하되, 접합된 모이어티는 정제 태그(예를 들어, His 태그), 세포독성제 또는 검출 가능한 표지이다. 바람직하게는, 접합된 모이어티는 방사성 동위원소, 발광 물질, 착색 물질, 효소 또는 폴리에틸렌 글리콜이다.
- [0115] 본 발명의 일 양태는 항-인간 CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 또 다른 항원 및/또는 또 다른 항원 에피토프에 대한 항체 또는 항원-결합 단편을 포함하는 다중특이성 항체, 바람직하게는 이중특이성 항체를 추가로 제공한다.
- [0116] 본 발명의 일 양태는 위에 기재된 바와 같은 본 명세서에 기재된 항-인간 CD47 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 어느 하나를 포함하는 융합 단백질을 추가로 제공한다.
- [0117] 본 발명의 일 양태는 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 중 어느 하나를 포함하거나 또는 위에 기재된 바와 같은 본 명세서에 기재된 항체 접합체, 다중특이성 항체 또는 융합 단백질을 포함하는 키트를 추가로 제공한다.
- [0118] 바람직하게는, 키트는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 특이적으로 식별하는 2차 항체를 추가로 포함하며; 선택적으로, 2차 항체는 방사성 동위원소, 발광 물질, 착색 물질, 효소 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 검출 가능한 표지를 더 포함한다.
- [0119] 본 발명의 일 양태는 CCTCC NO. 2018135의 하이브리도마 세포주 LT012로부터 선택되는 하이브리도마 세포주 및 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체를 추가로 제공한다.
- [0120] 본 발명의 또 다른 양태는 샘플에서 인간 CD47의 존재 또는 수준을 검출하는데 있어서 또는 샘플에서 인간 CD47의 존재 또는 수준을 검출하기 위한 키트를 제조하는데 있어서, 위에 기재된 바와 같은 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 항체 접합체, 다중특이성 항체 또는 융합 단백질 중 어느 하나의 용도에 관한 것이다.
- [0121] 본 발명의 또 다른 양태는 위에 기재된 바와 같은 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 본 명세서에 기재된 항체 접합체, 다중특이성 항체 또는 융합 단백질 중 어느 하나 및 선택적으로, 약제학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0122] 본 발명의 또 다른 양태는 다음을 제조하는데 있어서 위에 기재된 바와 같은 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 본 명세서에 기재된 항체 접합체, 다중특이성 항체 또는 융합 단백질 중 어느 하나의 용도에 관한 것이다:
- [0123] 인간 SIRP α 에 대한 인간 CD47의 결합을 차단하기 위한 약제,
- [0124] 인간 CD47의 활성을 차단하거나 또는 인간 CD47의 수준을 하향조절하기 위한 약제, 또는
- [0125] CD47에 대한 인간 SIRP α 의 결합에 의해 매개되는 세포 반응을 차단하기 위한 약제.
- [0126] 본 발명의 일 양태는 종양의 치료에서 또는 종양의 치료를 위한 약제의 제조에 있어서, 위에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 본 명세서에 기재된 항체 접합체, 다중특이성 항체 또는 융합 단백질 중 어느 하나의 용도에 관한 것이다.
- [0127] 본 발명의 또 다른 양태는 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 본 명세서에 기재된 항체 접합체, 다중특이성 항체 또는 융합 단백질을 포함하는 세포를 투여하는 단계 또는 유효량의 위에 기재된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 본 명세서에 기재된 항체 접합체, 다중특이성 항체 또는 융합 단백질 중 어느 하나를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 생체내 또는 시험관내 방법에 관한 것이다. 방법은 다음으로부터 선택된다:

- [0128] 인간 SIRP α 에 대한 CD47의 결합을 차단하기 위한 방법
- [0129] 인간 CD47의 활성을 차단하거나 또는 인간 CD47의 수준을 하향조절하기 위한 방법, 및
- [0130] CD47에 대한 인간 SIRP α 의 결합에 의해 매개되는 세포 반응을 차단하기 위한 방법.
- [0131] 본 발명의 일 실시형태에서, 시험관내 방법은 비-치료적 및/또는 비-진단적 목적을 위한 것이다.
- [0132] 본 발명의 또 다른 양태는 관련 종양의 예방 및/또는 치료 및/또는 보조 치료 및/또는 진단에 있어서 또는 관련 종양의 예방 및/또는 치료 및/또는 보조 치료 및/또는 진단을 위한 약제의 제조에 있어서, 본 명세서에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편 또는 위에 기재된 바와 같은 본 명세서에 기재된 항체 접합체, 다중특이성 항체 또는 융합 단백질 중 어느 하나의 용도에 관한 것이다.
- [0133] 본 발명의 일 양태에서, 종양은 바람직하게는 CD47을 발현하는 종양, 바람직하게는 암, 예를 들어, 혈액성 악성 종양 또는 고형 종양, 보다 바람직하게는 림프종, 대장암 또는 유방암, 보다 바람직하게는 비-호지킨 림프종 및 훨씬 더 바람직하게는 B 세포 림프종 세포이다.
- [0134] 본 발명의 일 실시형태에서, 약제는 주사에 적합한 형태, 바람직하게는 피하 주사, 피내 주사, 정맥 주사, 근육 내 주사 또는 병변내 주사에 의한 투여에 적합한 형태이다.
- [0135] 본 발명에서, 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 또한, 본 발명에서 사용되는 세포 배양, 분자 유전학, 핵산 화학 및 면역학의 실험실 작업은 해당 분야에서 널리 사용되는 일상적인 작업이다. 한편, 본 발명을 보다 잘 이해하기 위하여, 관련 용어에 대한 정의 및 설명이 아래에 제공된다.
- [0136] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항원-결합 영역"은 주어진 항원에 특이적으로 결합하는 단백질 또는 단백질의 일부를 의미한다. 예를 들어, 항원과 상호작용하고 항체에 항원에 대한 특이성 및 친화성을 부여하는 아미노산 잔기를 포함하는 항체의 일부는 "항원-결합 영역"으로 지칭된다. 항원-결합 영역은 일반적으로 하나 이상의 "상보성-결정 영역"(CDR)을 포함한다. 소정의 항원-결합 영역은 하나 이상의 "프레임워크" 영역(FR)을 더 포함한다. CDR은 항원 결합 특이성과 친화성에 기여하는 아미노산 서열이다.
- [0137] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 표적 항원에 특이적으로 결합하기 위해 온전한 항체와 경쟁할 수 있는 임의의 아이소타입 또는 이의 항원-결합 단편의 온전한 면역글로불린을 지칭하며, 예를 들어, 키메라, 인간화, 완전 인간화 및 이중특이성 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 이러한 "항체"는 항원-결합 단백질이다. 온전한 항체는 일반적으로 적어도 2개의 전장 중쇄 및 2개의 전장 경쇄를 포함하지만, 일부 경우에는 중쇄만을 포함할 수 있는 낙타과에서 자연적으로 발생하는 항체와 같은 더 적은 수의 사슬을 포함할 수 있다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 단일 공급원에서만 유래될 수 있거나 또는 "키메라"일 수 있고, 즉, 항체의 상이한 부분은 아래에 추가로 기재되는 바와 같은 2개의 상이한 공급원으로부터 유래될 수 있다. 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 재조합 DNA 기술에 의해 또는 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 하이브리도마에서 생산될 수 있다. 달리 나타내지 않는 한, 용어 "항체"는, 2개의 전장 중쇄 및 2개의 전장 경쇄를 포함하는 항체에 더하여, 이의 유도체, 변이체 및 단편도 포함한다.
- [0138] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체" 또는 "면역글로불린 사슬"(중쇄 또는 경쇄)의 "항원-결합 단편"(또는 "단편"으로 약칭됨)은 전장의 항체에 존재하는 아미노산의 적어도 일부가 결여되어 있지만 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 일부(수득 또는 합성 여부에 관계없이)를 포함한다. 이러한 단편은 표적 항원에 특이적으로 결합하기 때문에 생물학적으로 활성이며, 주어진 에피토프에 특이적으로 결합하기 위해 다른 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 경쟁할 수 있다. 일 양태에서, 이러한 단편은 항체의 전장 경쇄 또는 중쇄에 존재하는 적어도 하나의 CDR을 보유할 것이며, 일부 실시형태에서, 단일 중쇄 및/또는 경쇄 또는 이의 일부를 포함할 것이다. 이러한 생물학적으로 활성인 단편은 재조합 DNA 기술에 의해 또는, 예를 들어, 온전한 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생성될 수 있다. 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fab/c, dAb, Fv, 도메인 항체 및 단일-사슬 항체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않으며, 인간, 마우스, 래트, 낙타 및 토끼를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 임의의 포유동물 공급원으로부터 유래될 수 있다. 하나 이상의 CDR과 같은 본 명세서에 기재된 항체의 기능적 부분이 제2 단백질 또는 소분자에 공유적으로 결합되어 신체에서 특정 표적에 대한 치료제를 생성하고, 이로 인해 이작용성 치료적 특성을 갖거나 또는 융합 단백질과 같은 연장된 혈청 반감기를 가질 수 있음이 추가로 상정된다.
- [0139] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체 전장 사슬", "전장 항체", "온전한 항체" 및 "전체 항체"는 천연 항체 구조

와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 Fc 영역에 중쇄를 갖는 항체를 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

- [0140] 용어 "경쇄"는 결합 특이성을 부여하기에 충분한 가변 영역 서열을 갖는 전장 경쇄 및 이의 단편을 포함한다. 전장 경쇄는 가변 영역 도메인 V_L 및 불변 영역 도메인 C_L 을 포함한다. 경쇄의 가변 영역 도메인은 폴리펩타이드의 아미노 말단에 있다. 경쇄는 카파(κ) 및 람다(λ) 사슬을 포함한다.
- [0141] 용어 "중쇄"는 결합 특이성을 부여하기에 충분한 가변 영역 서열을 갖는 전장 중쇄 및 이의 단편을 포함한다. 전장 중쇄는 가변 영역 도메인 V_H 및 3개의 불변 영역 도메인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 을 포함한다. V_H 도메인은 폴리펩타이드의 아미노 말단에 있고, C_H 도메인은 카복실 말단에 있으며, C_{H3} 은 폴리펩타이드의 카복실 말단에 가장 가깝다. 중쇄는 IgG(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 하위유형 포함), IgA(IgA1 및 IgA2 하위유형 포함), IgM 및 IgE를 포함하는 임의의 아이소타입일 수 있다.
- [0142] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fab 단편"은 하나의 경쇄, C_{H1} 및 하나의 중쇄의 가변 영역으로 구성된다. Fab 분자의 중쇄는 또 다른 중쇄 분자와 이황화 결합을 형성할 수 없다.
- [0143] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fc" 영역은 항체의 C_{H1} 및 C_{H2} 도메인을 포함하는 2개의 중쇄 단편을 포함한다. 2개의 중쇄 단편은 2개 이상의 이황화 결합 및 C_{H3} 도메인의 소수성 상호작용에 의해 함께 고정된다.
- [0144] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fab' 단편"은 사슬간 이황화 결합이 2개의 Fab' 단편의 2개의 중쇄 사이에 형성되어 $F(ab')_2$ 분자를 형성할 수 있도록 하나의 경쇄와 하나의 중쇄의 일부(V_H 도메인, C_{H1} 도메인 및 C_{H1} 과 C_{H2} 도메인 사이의 영역의 일부 포함)를 포함한다.
- [0145] 본 명세서에서 사용되는 용어 " $F(ab')_2$ 단편"은 사슬간 이황화 결합이 2개의 중쇄 사이에 형성되도록 C_{H1} 과 C_{H2} 도메인 사이의 불변 영역의 일부를 포함하는 2개의 경쇄와 2개의 중쇄를 포함한다. 따라서, $F(ab')_2$ 단편은 2개의 중쇄 사이의 이황화 결합에 의해 함께 고정된 2개의 Fab' 단편으로 구성된다.
- [0146] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fv 영역"은 중쇄 및 경쇄로부터의 가변 영역을 포함하지만, 불변 영역이 없다.
- [0147] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fd" 단편은 V_H 및 C_{H1} 도메인으로 구성되는 항체 단편을 지칭한다(Ward et al., *Nature*, 341:544-546 (1989)).
- [0148] 본 명세서에서 사용되는 용어 "dAb" 단편은 V_H 도메인으로 구성된다(Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989)).
- [0149] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fab'-SH"는 본 명세서에서 Fab'에 대한 명칭이며, 여기서 불변 도메인의 하나 이상의 시스테인 잔기는 유리 티올기를 보유한다.
- [0150] 본 명세서에서 사용되는 용어 "Fab/c" 단편은 면역글로불린의 펩신 소화에 의해 형성된 중간체이며, Fab와 Fc 영역의 장점, 즉, 높은 친화성을 유지하면서 생체내 강한 확산성 및 낮은 대사 제거율을 겸비한다(Liu Jianjun, *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 1989(4):29-29).
- [0151] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단일-사슬 항체"는 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 플렉서블 링커에 의해 연결되어 단일 폴리펩타이드 사슬(이는 항원 결합 영역을 형성함)을 형성하는 Fv 분자이다(예를 들어, Bird et al., *Science*, 242:423-426 (1988), 및 Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:5879-5883 (1988) 참조). 단일-사슬 항체는 국제 공개 WO 88/01649 및 미국 특허 제4,946,778호와 제5,260,203호에 상세히 기술되어 있으며, 이들의 개시내용은 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.
- [0152] 본 명세서에서 사용되는 용어 "도메인 항체"는 다가 도메인 항체 또는 2가 도메인 항체를 포함하는 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역만을 포함하는 면역기능성 면역글로불린 단편이다. 일부 경우에, 2개 이상의 V_H 영역은 펩타이드 링커에 의해 공유적으로 연결되어 다가 도메인 항체(특히 2가 도메인 항체)를 생성한다. 2가 도메인 항체의 2개의 V_H 영역은 동일하거나 상이한 항원을 표적으로 할 수 있다.
- [0153] 본 명세서에서 사용되는 용어 "2가 항원-결합 단백질" 또는 "2가 항체"는 2개의 항원-결합 부위를 포함한다. 일부 경우에, 2개의 결합 부위는 동일한 항원 특이성을 갖는다. 2가 항체는 이중특이성일 수 있다.
- [0154] 본 명세서에서 사용되는 용어 "다중특이성 항원-결합 단백질" 또는 "다중특이성 항체"는 하나 이상의 항원 또는

에피토프를 표적으로 하는 항원-결합 단백질 또는 항체이다.

- [0155] 본 명세서에서 사용되는 용어 "이중특이성", "이중-특이성" 또는 "이작용성" 항원-결합 단백질 또는 항체는 각각 2개의 상이한 항원-결합 부위를 갖는 하이브리드 항원-결합 단백질 또는 항체이다. 이중특이성 항체는 다중 특이성 항원-결합 단백질 또는 다중특이성 항체이며, 하이브리도마의 융합 또는 Fab' 단편의 연결을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, Songsivilai and Lachmann, 1990, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321; Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.*, 148:1547-1553 참조. 이중특이성 항원-결합 단백질 또는 항체의 2개의 결합 부위는 동일한 또는 상이한 단백질 표적에 존재하는 2개의 상이한 에피토프에 결합할 것이다.
- [0156] 본 명세서에서 사용되는 용어 "mAb" 및 "단일클론 항체"는 자발적으로 발생할 수 있는 자연 돌연변이를 제외하고, 고도로 상동성인 항체의 그룹, 즉, 동일한 항체 분자의 그룹으로부터 유래되는 항체 또는 항체의 단편을 지칭한다. 단일클론 항체는 항원 상의 단일 에피토프에 대해 매우 특이적이다. 단일클론 항체에 비해 다중클론 항체는 일반적으로 항원 상의 상이한 에피토프를 인식하는 적어도 2개 이상의 상이한 항체를 포함한다. 단일클론 항체는 일반적으로 Kohler 등(*Nature*, 256:495, 1975)에 의해 처음 보고된 하이브리도마 기법을 사용하여 얻을 수 있지만, 재조합 DNA 기술(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)을 사용하여 얻을 수도 있다.
- [0157] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간화 항체"는 인간 면역글로불린(수용체 항체)의 CDR 영역의 전부 또는 일부가 비-인간 항체(공여체 항체)의 CDR 영역으로 대체된 경우 얻어지는 항체 또는 항체 단편을 지칭하되, 공여체 항체는 예상되는 특이성, 친화성 또는 반응성을 갖는 비-인간(예를 들어, 마우스, 래트 또는 토끼) 항체일 수 있다. 또한, 수용체 항체의 프레임워크 영역(FR)의 일부 아미노산 잔기는 또한 항체의 성능을 추가로 개선 또는 최적화하기 위해 상응하는 비-인간 항체의 아미노산 잔기 또는 다른 항체의 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 인간화 항체에 대한 자세한 내용에 대해, 예를 들어, Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); 및 Clark, *Immunol. Today*, 21:397-402 (2000)을 참조한다.
- [0158] 본 명세서에서 사용되는 용어 "에피토프"는 면역글로불린 또는 항체가 특이적으로 결합하는 항원 상의 부위를 지칭한다. "에피토프"는 또한 당해 분야에서 "항원 결정기"로도 지칭된다. 에피토프 또는 항원 결정기는 일반적으로 아미노산, 탄수화물 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹으로 구성되며, 보통 특정 3차원 구조적 특성 및 특정 전하 특성을 갖는다. 예를 들어, 에피토프는 일반적으로 "선형" 또는 "구조적"일 수 있는 고유한 공간적 구조에 적어도 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개 또는 15개의 연속 또는 비-연속 아미노산을 포함한다. 예를 들어, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996) 참조. 선형 에피토프에서, 단백질과 상호작용 분자(예를 들어, 항체) 사이의 모든 상호작용 부위는 단백질의 일차 아미노산 서열을 따라 선형으로 위치한다. 구조적 에피토프에서, 상호작용 부위는 서로 분리된 단백질의 아미노산 잔기를 가로질러 위치한다.
- [0159] 용어 "폴리펩타이드" 또는 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 용어는 또한 하나 이상의 아미노산 잔기가 자연 발생적 아미노산의 유사체 또는 모방체인 아미노산 중합체 및 자연 발생적 아미노산 중합체를 지칭하는데 사용된다. 용어는 또한, 예를 들어, 당단백질을 형성하기 위해 당류 잔기의 첨가에 의해 변형되거나 또는 인산화된 아미노산 중합체를 포함할 수 있다. 폴리펩타이드 및 단백질은 자연적으로 존재하는 세포 및 비-재조합 세포에 의해 생성될 수 있거나 또는 유전자 조작 또는 재조합 세포에 의해 생성될 수 있으며, 천연 단백질의 아미노산 서열을 갖는 분자 또는 천연 서열의 하나 이상의 아미노산에 결실, 삽입 및/또는 치환을 갖는 분자를 포함한다.
- [0160] 일부 실시형태에서, 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 특히 항체, 예컨대, 항-인간 CD47 항체(CD47 항체로도 지칭됨), CD47-결합 단백질 또는 이의 변이체, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산의 결실, 삽입 및/또는 치환을 갖는 항체 또는 서열을 포함한다.
- [0161] 용어 "폴리펩타이드 단편"은 전장 단백질과 비교하여 아미노-말단 결실, 카복실-말단 결실 및/또는 내부 결실을 갖는 폴리펩타이드를 지칭한다. 이러한 단편은 또한 전장 단백질과 비교하여 변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 이러한 단편은 약 5개 내지 500개의 아미노산 길이이다. 예를 들어, 단편은 적어도 5개, 6개, 8개, 10개, 14개, 20개, 50개, 70개, 100개, 110개, 150개, 200개, 250개, 300개, 350개, 400개 또는 450개의 아미노산 길이일 수 있다. 유용한 폴리펩타이드 단편은 결합 도메인을 포함하는 항체의 면역학적 기능 단편을 포함한다. 인간 CD47 항체의 경우에, 유용한 단편은 CDR 영역, 중쇄 또는 경쇄의 가변 도메인, 항체 사슬의 일부, 2개의 CDR을 정확히 포함하는 가변 도메인 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0162] 폴리펩타이드의 "유도체"는 삽입, 결실 또는 치환 이외의 방식으로, 예를 들어, 또 다른 화학적 모이어티와의 접합에 의해 화학적으로 변형된 폴리펩타이드(예를 들어, 항원-결합 단백질 또는 항체), 예를 들어, PEG-접합된 폴리펩타이드이다.
- [0163] 본 명세서에서 사용되는 용어 "분리된"은 자연 상태에서 인공적인 수단에 의해 얻은 것을 지칭한다. 소정의 "분리된" 물질 또는 성분이 자연에 나타난다면, 이는 자연 환경에서 변화가 발생하거나, 또는 자연 환경으로부터 분리되거나 또는 둘 다일 수 있다. 예를 들어, 소정의 비-분리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 소정의 살아있는 동물에서 자연적으로 발생하며, 이러한 자연 상태에서 분리된 높은 순도를 갖는 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 분리된 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드로 지칭된다. 용어 "분리된"은 물질의 활성에 영향을 미치지 않는 인공 또는 합성 물질 또는 기타 불순물의 존재를 배제하지 않는다.
- [0164] 본 명세서에서 사용되는 용어 "벡터"는 폴리뉴클레오타이드가 삽입될 수 있는 핵산 비히클을 지칭한다. 벡터가 삽입된 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 단백질의 발현을 허용하는 경우, 벡터는 발현 벡터로 지칭된다. 벡터는 벡터에 의해 운반되는 유전 물질 요소가 숙주 세포에서 발현될 수 있도록 형질전환, 형질도입 또는 형질감염에 의해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 다음을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 벡터가 당업자에게 잘 알려져 있다: 플라스미드; 파지미드; 코스미드; 인공 염색체, 예컨대, 효모 인공 염색체(yeast artificial chromosome: YAC), 세균 인공 염색체(bacterial artificial chromosome: BAC) 또는 P1-유래 인공 염색체(P1-derived artificial chromosome: PAC); 파지, 예컨대, 람다 파지 또는 M13 파지; 및 동물 바이러스. 벡터로 사용될 수 있는 동물 바이러스는 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스(예컨대, 단순 헤르페스 바이러스), 폭스바이러스, 마를로바이러스, 파필로마바이러스 및 파포마바이러스(예컨대, SV40)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 벡터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선별 요소 및 리포터 유전자를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 발현을 조절하는 다양한 요소를 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 복제 개시 부위를 더 포함할 수 있다.
- [0165] 본 명세서에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 원핵생물 세포, 예컨대, 대장균(*E. coli*) 또는 *B. 서브틸리스*(*B. subtilis*), 진균 세포, 예컨대, 효모 세포 또는 아스퍼질루스, 곤충 세포, 예컨대, S2 초파리 세포 또는 Sf9 또는 동물 세포, 예컨대, 섬유아세포, CHO 세포, COS 세포, NSO 세포, HeLa 세포, BHK 세포, HEK 293 세포 또는 인간 세포를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 벡터가 도입될 수 있는 세포를 지칭한다.
- [0166] 본 명세서에서 사용되는 용어 "특이적으로 결합하는"은 항체와 이를 표적으로 하는 항원 사이의 반응과 같은 2개의 분자 사이의 비-랜덤 결합 반응을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체(또는 항원에 특이적인 항체)는 항체가 약 10^{-5} M, 예컨대, 약 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만의 친화성(K_D)으로 항원에 결합하는 것을 지칭한다.
- [0167] 본 명세서에서 사용되는 용어 " K_D "는 특정 항체-항원 상호작용에 대한 해리 평형 상수를 지칭하며, 항체와 항원 간의 결합 친화성을 설명하는데 사용된다. 분자 결합 동역학에 의해 측정되는 여러 매개변수 중, K_D 값은 해리 평형 상수이다. 항체 의약 연구에서, 이는 관심 항체와 표적 항원 분자 간의 친화성의 수준을 특징 짓는 매개변수이며, $KD = k_{dis}/k_{on}$ 으로 계산된다. 평형 해리 상수가 작을수록 더 단단한 항체-항원 결합 및 항체와 항원 간의 더 높은 친화성을 나타낸다. k_{on} (결합 속도 상수)은 항원-항체 복합체 형성 속도이며, k_{on} 이 작을수록 항원에 대한 항체의 결합이 더 빠름을 시사한다. k_{dis} (해리 속도 상수)는 항체가 항원-항체 복합체로부터 해리되는 속도이며, k_{dis} 가 작을수록 항체가 항원으로로부터 해리되는 속도가 느리고 항체와 항원 사이의 결합이 더 단단함을 시사한다. 일반적으로, 항체는, 예를 들어, 비아코어 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance: SPR) 기기 또는 포르테바이오 분자 상호작용 기기에서 결정되는 약 10^{-5} M 미만, 예컨대, 약 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M 또는 10^{-10} M 미만의 해리 평형 상수(K_D)로 항원(예를 들어, L1 단백질)에 결합한다.
- [0168] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단일클론 항체" 및 "McAb"는 동일한 의미를 가지고 상호교환적으로 사용될 수 있으며; 용어 "다중클론 항체" 및 "PcAb"는 동일한 의미를 가지고 상호교환적으로 사용될 수 있으며; 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 동일한 의미를 가지고 상호교환적으로 사용될 수 있다. 또한, 본 명세서에서, 아미노산은 일반적으로 당업계에 공지된 1-문자 및 3-문자 약어로 표시된다. 예를 들어, 알라닌은 A 또는 Ala로 표시될 수 있다.
- [0169] 본 명세서에서 사용되는 용어 "하이브리도마" 및 "하이브리도마 세포주"는 상호교환적으로 사용될 수 있으며,

용어 "하이브리도마" 및 "하이브리도마 세포주"를 언급할 때, 하이브리도마의 서브클론 및 자손 세포도 또한 포함된다.

[0170] 본 명세서에서 사용되는 용어 "서열 동일성 백분율" 및 "서열 상동성 백분율"은 상호교환적으로 사용된다.

[0171] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유사성", "서열 유사성" 및 "동일성"은 서열을 정렬하고 비교함으로써 결정되는 2개 이상의 단백질 또는 폴리펩타이드 분자의 서열 간의 상관관계를 지칭한다. "동일성 백분율"은 비교되는 분자에서 동일한 아미노산 잔기의 백분율을 지칭하며, 비교할 가장 작은 분자의 크기를 기준으로 계산될 수 있다. 이러한 계산을 위해, 정렬(있는 경우)의 갭(gap)은 특정 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램(즉, "알고리즘")에 의해 해결되어야 한다. 폴리펩타이드에 대해 사용되는 경우, 용어 "실질적인 동일성"은, 예를 들어, 프로그램에 의해 제공되는 기본 갭 가중치를 사용하여 프로그램 GAP 또는 BESTFIT를 사용하여 최적으로 정렬될 때, 2개의 펩타이드 서열이 적어도 70%, 75% 또는 80%의 서열 동일성, 적어도 90% 또는 95%의 서열 동일성 또는 적어도 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 것을 의미한다. 일부 경우에, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환이 다르다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성(예를 들어, 전하 또는 친수성)을 갖는 측쇄 R기를 갖는 또 다른 아미노산 잔기로 치환된 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능 및 특성을 실질적으로 유지할 것이다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 서로 다른 경우에, 서열 동일성 백분율은 치환의 보존적 성질을 수정하기 위해 상승될 수 있다. 이러한 조정을 하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 243:307-31 (1994) 참조. 유사한 화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 그룹의 예는 다음을 포함한다: 1) 지방족 하이드록실 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 아이소류신, 2) 지방족 하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌, 3) 아마이드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민, 4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 타이로신 및 트립토판, 5) 염기성 측쇄: 라이신, 아르기닌 및 히스티딘, 6) 산성 측쇄: 아스파르트산 및 글루탐산 및 7) 황-함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환기는 발린-류신-아이소류신-글리신-알라닌, 페닐알라닌-타이로신, 트레오닌-세린, 라이신-아르기닌, 글루탐산-아스파르트산 및 아스파라긴-글루타민이다.

[0172] 선택적으로, 보존적 치환은 참조에 의해 본 명세서에 인용되어 있는 Gonnet et al., *Science*, 256:1443-45 (1992)에 개시되어 있는 PAM250 로그-우도 매트릭스(log-likelihood matrix)에서 양의 값을 갖는 임의의 변화이다. A "적당한 보존적" 치환은 PAM250 로그-우도 매트릭스에서 음이 아닌 값을 갖는 임의의 변화이다.

[0173] 폴리펩타이드의 서열 동일성은 일반적으로 서열 분석 소프트웨어에 의해 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 상이한 치환, 결실 및 다른 변형(보존적 아미노산 치환 포함)에 할당된 유사성의 측정을 사용하여 서열을 일치시킨다. 예를 들어, (프로그램에 지정된 기본 매개변수를 사용하는) "Gap" 및 "Bestfit"와 같은 프로그램을 포함하는 GCG가 밀접하게 관련된 폴리펩타이드(예를 들어, 상이한 생물학적 종으로부터의 상동 폴리펩타이드) 또는 야생형 단백질과 이의 돌연변이체 단백질 사이의 서열 상동성 또는 서열 동일성을 결정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, GCG 버전 6.1(위스콘신 대학(University of Wisconsin), 위스콘신주 소재) 참조. 폴리펩타이드 서열은 또한 기본 또는 권장 매개변수와 함께 FASTA를 사용하여 비교될 수도 있다. 켈린지 및 질의 서열과 서열 동일성 백분율 사이의 최적 중첩의 영역에 대한 정렬을 제공하는 GCG 버전 6.10 FASTA(예를 들어, FASTA2 및 FASTA3)(Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.*, 132:185-219 (2000)) 참조. 상이한 유기체로부터의 방대한 서열을 포함하는 데이터베이스와 서열을 비교할 때 선호되는 또 다른 알고리즘은 컴퓨터 프로그램 BLAST, 특히, blastp 또는 tblastn(프로그램에 의해 제공되는 기본 매개변수를 사용함)이다. 예를 들어, Altschul et al., *Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-402 (1997) 참조.

[0174] 선행 기술과 비교하여, 본 발명은 다음과 같은 이점을 갖는다:

[0175] 본 명세서에 포함된 항-CD47 단일클론 항체는 CD47에 특이적으로 결합하여 SIRPα가 CD47에 결합하는 것을 효과적으로 차단함으로써 대식세포에 의한 종양 세포의 식균 작용을 촉진할 수 있다. 종양 세포의 CD47에 대한 본 명세서에 기재된 항체(예컨대, 6F7 H1L1)의 친화성은 대조군 항체 Hu5F9-G4의 친화성과 유사한 반면, 정상 인간 RBC에 대한 친화성은 대조군 항체 Hu5F9-G4의 친화성보다 낮다. 따라서, 본 명세서에 기재된 항체는 가능한 한 정상 인간 적혈구에 영향을 미치는 것을 피하는 것에 기초하여 종양을 치료하는 더 나은 잠재력을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0176] 도 1은 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합 활성에 대한 검정의 결과를 보여준다.

도 2는 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 결합 활성에 대한 검정의 결과를 보여주며, 여기서 6F7

H1L1(hG1DM)은 6F7 H1L1(G1M)이다.

도 3은 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 인간 SIRP α ECD-hFc-바이오틴에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 경쟁적 결합 활성에 대한 검정의 결과를 보여준다.

도 4는 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 인간 SIRP α ECD-hFc-바이오틴에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 경쟁적 결합 활성에 대한 검정의 결과를 보여주며, 여기서 6F7 H1L1(hG1DM)은 6F7 H1L1(G1M)이다.

도 5는 인간 CD47에 대한 퓨린 항체 6F7의 친화도 상수를 결정한 결과를 보여준다.

도 6은 인간 CD47에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 친화도 상수를 결정한 결과를 보여준다.

도 7은 인간 CD47에 대한 Hu5F9-G4의 친화도 상수를 결정한 결과를 보여준다.

도 8은 인간 RBC에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 결합 곡선을 보여준다(FACS).

도 9는 종양 세포 라지에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 결합 활성을 보여준다(FACS).

도 10은 LOVO에 대한 SIRP에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 경쟁적 결합 활성에 대한 검정을 보여준다(FACS).

도 11은 6F7 H1L1(G1M) 항체에 의한 인간 적혈구의 응집을 보여준다.

도 12는 인간 RBC에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합 곡선을 보여준다(FACS).

도 13은 종양 세포 라지에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합 활성을 보여준다(FACS).

도 14는 종양 세포 라지에 대한 SIRP에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 경쟁적 결합 활성을 보여준다(FACS).

도 15는 종양 세포 LOVO에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합 곡선을 보여준다(FACS).

도 16은 LOVO에 대한 SIRP에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 경쟁적 결합 활성에 대한 검정을 보여준다(FACS).

도 17은 항-CD47 항체에 의한 인간 적혈구의 응집을 보여준다.

도 18은 피하 이식된 MDA-MB-231 종양에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 치료적 효과를 보여준다.

도 19는 사이노물구스 원숭이에 대한 6F7 H1L1(hG4) 및 Hu5F9-G4의 단회 투여 후 헤모글로빈의 농도 변화를 보여준다.

도 20은 사이노물구스 원숭이에 대한 6F7 H1L1(hG4) 및 Hu5F9-G4의 단회 투여 후 헤마토크릿의 변화를 보여준다.

생물학적 물질의 기탁에 대한 참고사항:

하이브리도마 세포주 LT012는 2018년 6월 21일자로 중국 전형 배양물 기탁센터(CCTCC, China Center for Type Culture Collection)에 CCTCC NO. C2018135로 기탁되었으며, 기탁기관의 주소는 중국 우한시 우한 대학교, 우편 번호: 430072이다.

기탁기관명 : 중국 전형 배양물 기탁센터

수탁번호 : CCTCCC2018135

수탁일자 : 2018621

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0177] 하기 실시예를 참조하여 본 발명의 실시형태가 상세히 설명될 것이다. 당업자는 하기 실시예가 단지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해할 것이다. 기술 또는 조건이 명시되지 않은 경우, 실시예는 당해 기술분야의 문헌에 기술된 기술 또는 조건(예를 들어, J. Sambrook 등이 저술하고 Huang Peitang 등이 번역한 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Science Press 참조) 또는 제품 매뉴얼에 따라 실시하였다. 사용된 시약 또는 기기는 제조사가 명시되지 않은 경우 시판되고 있는 종래의 제품이다.

[0178] 본 발명의 하기 실시예에서, BALB/C 마우스는 Guangdong Medical Laboratory Animal Center에서 구입하였다.

[0179] 사용된 대조군 항체 약제는 Hu5F9-G4(Forty Seven, Inc.의 CD47 항체 Hu5F9-G4의 서열, 즉, 중쇄 가변 영역으

로서 US20150183874의 서열번호 37, 경쇄 가변 영역으로서 서열번호 42 및 Ig 감마-4 사슬 불변 영역 (GenbankID: P01861.1)을 사용하여 Zhongshan Akeso Biopharma Ltd.에서 합성됨)였다.

[0180] **실시예 1: 항-인간 CD47 항체 6F7의 제조**

[0181] **1. 하이브리도마 세포주 6F7의 제조**

[0182] 하이브리도마 세포주 6F7의 항-CD47 항체를 제조하기 위해 사용된 항원은 CD47 IgV TEV-His(GenbankID: NP 942088.1의 19번 내지 141번 위치의 인간 CD47 성숙 펩타이드 및 TEV(아미노산 서열: ENLYFQG, 서열번호 74)-his 태그 융합 단백질을 포함, Zhongshan Akeso Biopharma Ltd.에 의해 합성됨) 및 3T3-CD47 세포(NIH/3T3, 제조업체: ATCC, 카탈로그 번호: CRL-1658; NIH/3T3에 기초하여 인간 CD47 성숙 펩타이드를 세포 내로 형질감염시켜 3T3-CD47 안정한 발현 세포주를 구축함)였다. 면역화된 마우스의 비장 세포를 마우스의 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 제조하였다. CD47 IgV TEV-His 및 3T3-CD47 세포를 별도로 항원으로 사용하여, 하이브리도마 세포를 간접 ELISA에 의해 스크리닝하여 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 분비할 수 있는 하이브리도마 세포를 얻었다. ELISA 스크리닝에 의해 얻어진 하이브리도마 세포를 경쟁적 ELISA에 의해 스크리닝하여 수용체 인간 SIRP αECD-hFc-바이오틴(SIRP αECD는 단백질 GenBank ACCESSION No. NP_542970.1의 31번 내지 373번 위치의 SIRP α의 세포외 영역을 지칭함; hFc는 인간 IgG Fc 정제 표지, 구체적으로 GenbankID: P01857의 114번 내지 330번 위치의 Ig 감마-1 사슬 C 영역을 지칭함)을 갖는 CD47 IgV TEV-His에 결합하기 위해 경쟁할 수 있는 단일클론 항체를 분비할 수 있는 하이브리도마 세포주를 얻은 다음, 제한 희석을 거쳐 안정한 하이브리도마 세포주를 얻었다. 하이브리도마 세포주를 하이브리도마 세포주 LT012로 명명하고, 이에 의해 분비되는 단일클론 항체를 6F7로 명명하였다.

[0183] 하이브리도마 세포주 LT012(CD47-6F7)는 2018년 6월 21일자로 중국의 CCTCC에 CCTCC NO. C2018135로 기탁되었으며, 기탁기관의 주소는 중국 우한시 우한 대학교, 우편 번호: 430072이다.

[0184] **2. 항-CD47 항체 6F7의 제조**

[0185] 위에서 제조된 세포주 LT011, LT012 및 LT015를 5% CO₂, 37°C 인큐베이터에서 화학적으로 정의된 배지(CD 배지; 1% 스트렙토마이신 포함)를 사용하여 별도로 배양하였다. 7일 후, 상청액을 수집하고, 고속 원심분리하고, 미세 여과막을 통한 진공 여과에 의해 그리고 HiTrap 단백질 A HP 칼럼을 통해 정제하여 항체 6F7을 얻었다.

[0186] **실시예 2: 항-CD47 항체 6F7의 서열 분석**

[0187] RNeasy pure Cell/Bacteria Kit(Tiangen, 카탈로그 번호 DP430)의 매뉴얼에 기재된 방법에 따라 실시예 1에서 배양된 세포주 LT012로부터 mRNA를 추출하였다.

[0188] RT-PCR을 위한 인비트로젠(Invitrogen) SuperScript® III First-Strand 합성 시스템의 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하고, PCR에 의해 증폭하였다.

[0189] PCR-증폭된 산물을 pEASY-T1 클로닝 키트(트랜스젠(Transgen) CT101)의 매뉴얼에 따라 직접 TA 클로닝을 진행하였다.

[0190] TA-클로닝된 산물을 직접 시퀀싱하였으며, 시퀀싱 결과는 다음과 같다:

[0191] 중쇄 가변 영역의 핵산 서열은 351bp의 길이로 서열번호 1에 제시되어 있다.

[0192] 코딩된 아미노산 서열은 117개의 아미노산의 길이로 서열번호 2에 제시되어 있으며, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 5, 6 및 7에 제시되어 있다.

[0193] 경쇄 가변 영역의 핵산 서열은 321bp의 길이로 서열번호 3에 제시되어 있다.

[0194] 코딩된 아미노산 서열은 107개의 아미노산의 길이로 서열번호 4에 제시되어 있으며, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 8, 9 및 10에 제시되어 있다.

[0195] **실시예 3: 인간화 항-인간 CD47 항체 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) 및 6F7 H3L3(hG4)의 경쇄 및 중쇄의 설계 및 제조**

[0196] **1. 인간화 항-인간 CD47 항체 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) 및 6F7 H3L3(hG4)의 경쇄 및 중쇄의 설계**

[0197] 인간 CD47 단백질의 3차원 결정 구조(Hage T, Reinemer P, Sebald W., Crystals of a 1:1 Complex Between Human Interleukin-4 and the Extracellular Domain of Its Receptor Alpha Chain, *Eur. J. Biochem.*, 1998;

258(2):831-6) 및 실시예 2에서 얻은 항체 6F7의 서열에 기초하여, 항체 6F7H1L1, 6F7 H2L2 및 6F7 H3L3의 가변 영역 서열을 컴퓨터 모델링 및 돌연변이 설계에 의해 얻었다(NCBI 데이터베이스로부터의 항체 불변 영역 서열: 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-4 사슬 C 영역, ACCESSION NO. P01861.1이고; 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, ACCESSION NO. P01834임).

[0198] 설계된 가변 영역 서열은 다음과 같다:

[0199] (1) 인간화 단일클론 항체 6F7 H1L1의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열

[0200] 중쇄 가변 영역의 핵산 서열은 351bp의 길이로 서열번호 11에 제시되어 있다.

[0201] 코딩된 아미노산 서열은 117개의 아미노산의 길이로 서열번호 12에 제시되어 있으며, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 5, 6 및 7에 제시되어 있다.

[0202] 경쇄 가변 영역의 핵산 서열은 321bp의 길이로 서열번호 13에 제시되어 있다.

[0203] 코딩된 아미노산 서열은 107개의 아미노산의 길이로 서열번호 14에 제시되어 있으며, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 8, 9 및 10에 제시되어 있다.

[0204] (2) 인간화 단일클론 항체 6F7 H2L2의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열

[0205] 중쇄 가변 영역의 핵산 서열은 351bp의 길이로 서열번호 15에 제시되어 있다.

[0206] 코딩된 아미노산 서열은 117개의 아미노산의 길이로 서열번호 16에 제시되어 있으며, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 5, 6 및 7에 제시되어 있다.

[0207] 경쇄 가변 영역의 핵산 서열은 321bp의 길이로 서열번호 17에 제시되어 있다.

[0208] 코딩된 아미노산 서열은 107개의 아미노산의 길이로 서열번호 18에 제시되어 있으며, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 8, 9 및 10에 제시되어 있다.

[0209] (3) 인간화 단일클론 항체 6F7 H3L3의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열

[0210] 중쇄 가변 영역의 핵산 서열은 351bp의 길이로 서열번호 19에 제시되어 있다.

[0211] 코딩된 아미노산 서열은 117개의 아미노산의 길이로 서열번호 20에 제시되어 있으며, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 5, 6 및 7에 제시되어 있다.

[0212] 경쇄 가변 영역의 핵산 서열은 321bp의 길이로 서열번호 21에 제시되어 있다.

[0213] 코딩된 아미노산 서열은 107개의 아미노산의 길이로 서열번호 22에 제시되어 있으며, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3의 서열은 각각 서열번호 8, 9 및 10에 제시되어 있다.

[0214] 2. 인간화 항체 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) 및 6F7 H3L3(hG4)의 제조

[0215] 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-4 사슬 C 영역, ACCESSION: P01861.1이고; 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, ACCESSION: P01834이다.

[0216] 6F7 H1L1(hG4)의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 6F7 H2L2(hG4)의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA 및 6F7 H3L3(hG4)의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA를 pUC57simple(진스크립트(Genscript)에 의해 제공됨) 벡터에 별도로 클로닝하여 각각 pUC57simple-6F7H1, pUC57simple-6F7L1; pUC57simple-6F7H2, pUC57simple-6F7L2; 및 pUC57simple-6F7H3, pUC57simple-6F7L3을 얻었다. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition)에 기술되어 있는 표준 기법을 참조하여, 유전자의 EcoRI&HindIII 소화에 의해 합성된 중쇄 및 경쇄 전장 유전자를 EcoRI&HindIII 소화를 제한함으로써 발현 벡터 pcDNA3.1에 서브클로닝하여 발현 플라스미드 pcDNA3.1-6F7H1, pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2, pcDNA3.1-6F7L2, pcDNA3.1-6F7H3 및 pcDNA3.1-6F7L3을 얻고, 재조합 발현 플라스미드의 중쇄 및 경쇄 유전자를 추가로 시퀀싱하였다. 그런 다음, 상응하는 경쇄 및 중쇄 재조합 플라스미드(pcDNA3.1-6F7H1/pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2/pcDNA3.1-6F7L2 및 pcDNA3.1-6F7H3/pcDNA3.1-6F7L3)를 포함하는 설계된 유전자 조합을 별도로 293F 세포에 동시 형질감염시키고, 배양 용액을 수집하고, 정제하였다. 서열을 확인한 후, 내독소가 없는 발현 플라스미드를 제조하고, 항체 발현을 위해 HEK293 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 7일 후에 배양 용액을 수집하고, 단백질 A 칼럼(MabSelect SURE(GE))에서 친화성 정제를 수행하여 인간화 항체를 얻었다.

- [0217] 실시예 4: 인간화 항-인간 CD47 항체 6F7 H1L1(G1M), 6F7 H2L2(G1M) 및 6F7 H3L3(G1M)의 경쇄 및 중쇄의 설계 및 제조
- [0218] 1. 인간화 항-인간 CD47 항체 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) 및 6F7 H3L3(G1)의 경쇄 및 중쇄의 설계
- [0219] 인간 CD47 단백질의 3차원 결정 구조(Hage T, Reinemer P, Sebald W., Crystals of a 1:1 Complex Between Human Interleukin-4 and the Extracellular Domain of Its Receptor Alpha Chain, *Eur. J. Biochem.*, 1998; 258(2):831-6) 및 실시예 2에서 얻은 항체 6F7의 서열에 기초하여, 항체 6F7H1L1, 6F7 H2L2 및 6F7 H3L3의 가변 영역 서열을 컴퓨터 모델링 및 돌연변이 설계에 의해 얻었다(NCBI 데이터베이스로부터의 항체 불변 영역 서열: 중쇄 불변 영역은 Ig 감마-1 사슬 C 영역, ACCESSION No. P01857이고; 경쇄 불변 영역은 Ig 카파 사슬 C 영역, ACCESSION No. P01834임). 실시예 3의 인간화 항체와 구별하기 위하여, 위의 인간화 항체를 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) 및 6F7 H3L3(G1)으로 명명하였다.
- [0220] 본 실시예에서 설계된 인간화 항체 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) 및 6F7 H3L3(G1)의 가변 영역 서열은 실시예 3의 6F7 H1L1(hG4), 6F7 H2L2(hG4) 및 6F7 H3L3(hG4)의 것과 동일하였다.
- [0221] 2. 인간화 항체 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) 및 6F7 H3L3(G1)의 제조
- [0222] 중쇄 불변 영역은 모두 Ig 감마-1 사슬 C 영역, ACCESSION: P01857이었고; 경쇄 불변 영역은 모두 Ig 카파 사슬 C 영역, ACCESSION: P01834였다.
- [0223] 6F7 H1L1의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA, 6F7 H2L2의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA 및 6F7 H3L3의 중쇄 cDNA 및 경쇄 cDNA를 별도로 pUC57simple(진스크립트에 의해 제공됨) 벡터에 클로닝하여 각각 pUC57simple-6F7H1, pUC57simple-6F7L1; pUC57simple-6F7H2, pUC57simple-6F7L2; 및 pUC57simple-6F7H3, pUC57simple-6F7L3을 얻었다. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition)에 기술되어 있는 표준 기법을 참조하여, 유전자의 EcoRI&HindIII 소화에 의해 합성된 중쇄 및 경쇄 전장 유전자를 EcoRI&HindIII 소화를 제한함으로써 발현 벡터 pcDNA3.1에 서브클로닝하여 발현 플라스미드 pcDNA3.1-6F7H1, pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2, pcDNA3.1-6F7L2, pcDNA3.1-6F7H3 및 pcDNA3.1-6F7L3을 얻고, 재조합 발현 플라스미드의 중쇄 및 경쇄 유전자를 추가로 시퀀싱하였다. 그런 다음, 상응하는 경쇄 및 중쇄 재조합 플라스미드(pcDNA3.1-6F7H1/pcDNA3.1-6F7L1, pcDNA3.1-6F7H2/pcDNA3.1-6F7L2 및 pcDNA3.1-6F7H3/pcDNA3.1-6F7L3)를 포함하는 설계된 유전자 조합을 별도로 293F 세포에 동시 형질감염시키고, 배양 용액을 수집하고, 정제하였다. 서열을 확인한 후, 내독소가 없는 발현 플라스미드를 제조하고, 항체 발현을 위해 HEK293 세포에 일시적으로 형질감염시켰다. 7일 후 배양 용액을 수집하고, 단백질 A 칼럼(MabSelect SURE(GE))에서 친화성 정제를 수행하여 인간화 항체를 얻었다.
- [0224] 3. 인간화 항체 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) 및 6F7 H3L3(G1)에 기초한 비-가변 영역 아미노산 돌연변이의 설계
- [0225] 6F7 H1L1(G1), 6F7 H2L2(G1) 및 6F7 H3L3(G1)에 기초하여, 중쇄의 힌지 영역의 위치 234번 위치에 류신-대-알라닌 점 돌연변이를 도입(L234A)하고 235번 위치에 류신-대-알라닌 점 돌연변이를 도입(L235A)하여 새로운 인간화 항체를 얻고, 각각 6F7 H1L1(G1M), 6F7 H2L2(G1M) 및 6F7 H3L3(G1M)으로 명명하였다.
- [0226] 실시예 5: ELISA에 의한 항원에 대한 항체의 결합 활성에 대한 검정
- [0227] 1. ELISA에 의한 항원 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 항체 6F7 H1L1(hG4)의 결합 활성에 대한 검정
- [0228] 실험 절차: 마이크로플레이트를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 인간 CD47 IgV TEV-His로 코팅하고, 4°C에서 12시간 동안 인큐베이션하였다. 항원-코팅된 마이크로플레이트를 PBS로 3회 행군 다음, PBS 중 1% BSA로 2시간 동안 차단시켰다. 마이크로플레이트를 PBS로 3회 행구었다. PBST 용액으로 연속 희석한 항체를 마이크로플레이트의 웰에 첨가하였으며, 항체에 대한 희석 구매는 표 2에 자세히 나와 있다. 테스트 항체를 포함하는 마이크로플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, PBST로 3회 세척하였다. 1:5000의 비로 희석된 HRP-표지된 염소 항-인간 IgG(H+L)(잭슨 면역리서치 인코포레이티드(Jackson ImmunoResearch Inc.)로부터 구입함, 카탈로그 번호: 109-035-088) 2차 항체 작업 용액을 첨가하고, 마이크로플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. TMB(네오젠(Neogen), 308177)를 첨가하여 암실에서 5분간 발색시킨 후, 정지 용액을 첨가하여 발색을 종결시켰다. 그런 다음, 마이크로플레이트를 즉시 마이크로플레이트 판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각 웰의 OD 값을 450nm에서 판독하였다. 데이터를 SoftMax Pro 6.2.1로 분석하였다.
- [0229] 항원 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 항체 6F7 H1L1(hG4)의 결합을 검출한 결과를 도 1에 나타내었다. 모든 투여량에 대한 OD 값은 표 1에 나타내었다. 가로 좌표로서 항체 농도, 세로 좌표로서 흡광도 값을 사용하여 곡선 피

팅에 의해 항체의 결합 EC_{50} 을 계산하였으며, 결과를 아래 표 1에 나타내었다.

[0230] 결과는 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합 EC_{50} 이 Hu5F9-G4와 유사한 0.078nM임을 보여준다.

표 1

인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합 활성에 대한 검정의 결과

항체 희석 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	항원 코팅: 인간 CD47 IgV TEV-His (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	6F7 H1L1(hG4)		Hu5F9-G4	
0.333	2.639	2.723	2.929	3.056
1:3	2.566	2.608	2.623	2.955
1:9	2.159	2.217	2.394	2.513
1:27	1.425	1.522	1.652	1.838
1:81	0.749	0.765	0.866	0.938
1:243	0.329	0.333	0.396	0.431
1:729	0.133	0.143	0.160	0.173
0	0.052	0.050	0.049	0.047
2차 항체	염소 항-인간 IgG Fc, HRP			
EC_{50} (nM)	0.078		0.068	

[0231]

[0232] 2. ELISA에 의한 항원 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 항체 6F7 H1L1(G1M)의 결합 활성에 대한 검정

[0233] 실험 절차: 마이크로플레이트를 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 인간 CD47 IgV TEV-His로 코팅하고, 4℃에서 12시간 동안 인큐베이션 하였다. 항원-코팅된 마이크로플레이트를 PBS로 3회 행군 다음, PBS 중 1% BSA로 2시간 동안 차단시켰다. 마이크로플레이트를 PBS로 3회 행구었다. PBST 용액으로 연속 희석한 항체를 마이크로플레이트의 웰에 첨가하였으며, 항체에 대한 희석 구배는 표 2에 자세히 나와 있다. 테스트 항체를 포함하는 마이크로플레이트를 37℃에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, PBST로 3회 세척하였다. 1:5000의 비로 희석된 HRP-표지된 염소 항-인간 IgG(H+L)(잭슨 이뮤노리서치 인코포레이티드로부터 구입함, 카탈로그 번호: 109-035-088) 2차 항체 작업 용액을 첨가하고, 마이크로플레이트를 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. TMB(네오젠, 308177)를 첨가하여 암실에서 5분간 발색시킨 후, 정지 용액을 첨가하여 발색을 종결시켰다. 그런 다음, 마이크로플레이트를 즉시 마이크로플레이트 판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각 웰의 OD 값을 450nm에서 판독하였다. 데이터를 SoftMax Pro 6.2.1로 분석하였다.

[0234] 항원 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 항체 6F7 H1L1(G1M)의 결합을 검출한 결과를 도 2에 나타내었다. 모든 투여량에 대한 OD 값은 표 2에 나타내었다. 가로 좌표로서 항체 농도, 세로 좌표로서 흡광도 값을 사용하여 곡선 피팅에 의해 항체의 결합 EC_{50} 을 계산하였으며, 결과를 아래 표 2에 나타내었다.

표 2

인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 결합 활성에 대한 검정의 결과

항체 희석 ($\mu\text{g/ml}$)	항원 코팅: 인간 CD47 IgV TEV-His (2 $\mu\text{g/ml}$)			
	6F7 H1L1(G1M)		Hu5F9-G4	
1.000	2.298	2.307	2.390	2.428
0.333	2.410	2.438	2.505	2.566
0.111	2.482	2.352	2.275	2.305
0.037	2.301	2.182	1.847	1.854
0.012	1.697	1.737	1.270	1.264
0.004	1.141	0.987	0.599	0.580
0.001	0.476	0.492	0.282	0.275
0	0.047	0.046	0.047	0.046
2차 항체	염소 항-인간 IgG (H+L), HRP			
EC50 (nM)	0.037		0.093	

[0235]

[0236]

결과는 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 결합 EC50이 Hu5F9-G4보다 약간 더 높은 0.037nM임을 보여준다.

[0237]

3. 경쟁적 ELISA에 의한 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 인간 SIRP α ECD-hFc-바이오틴에 대한 항체 6F7 H1L1(hG4)의 경쟁적 결합 활성에 대한 검정

[0238]

실험 절차: 마이크로플레이트를 웰당 50 μl 의 2 $\mu\text{g/ml}$ 의 인간 CD47 IgV TEV-His로 코팅하고, 4°C에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 한 번 세척하고, 두드려서 건조시키고, 웰당 300 μl 의 1% BSA(PBS 중)로 차단시키고, 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하고, 3회 세척하고, 두드려서 건조시켰다. 항체를 초기 농도로 3 $\mu\text{g/ml}$ (최종 농도: 1.5 $\mu\text{g/ml}$)로 희석하고, 1:3 연속 희석을 수행하여 블랭크 대조군 외에 총 7개의 농도를 얻었다. 위의 농도에 대해 2개의 이중 웰을 웰당 50 μl 의 최종 부피로 설정하고, 플레이트를 10분 동안 인큐베이션하였다. 0.2 $\mu\text{g/ml}$ (최종 농도: 0.1 $\mu\text{g/ml}$)의 인간 SIRP α ECD-hFc-바이오틴(Zhongshan Akeso Biopharma Ltd.에 의해 합성됨)을 웰당 50 μl 로 마이크로플레이트에 첨가하고, 1:1의 부피비로 항체와 함께 부드럽게 혼합하고, 마이크로플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 3회 세척하고, 두드려서 건조시켰다. 50 μl 의 SA-HRP(KPL, 14-30-00) 작업 용액을 각 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 4회 세척하고, 두드려서 건조시켰다. 50 μl 의 TMB 발색 용액을 각 웰에 첨가하여 암실의 실온에서 5분 동안 발색시킨 후, 각 웰에 50 μl 의 정지 용액을 첨가하여 발색을 종결시켰다. 그런 다음, 마이크로플레이트를 즉시 마이크로플레이트 판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각 웰의 OD 값을 450nm에서 판독하였다. 데이터를 SoftMax Pro 6.2.1로 분석하고 처리하였다.

[0239]

결과는 도 3에 나타나 있다. 모든 투여량에 대한 OD 값은 표 3에 나타나 있다. 결합된 항체의 흡광도 강도를 정량적으로 분석하여, 곡선 시뮬레이션을 수행하여 항체의 결합 효율 EC50을 얻었다(표 3).

[0240]

결과는 6F7 H1L1(hG4)이 항원 인간 CD47 IgV TEV-His의 이의 수용체 인간 SIRP α ECD-hFc-바이오틴에 대한 결합을 효과적으로 차단할 수 있으며, 차단 효율은 용량-의존적 관계를 나타내고; 6F7 H1L1(hG4)의 차단 EC50은 Hu5F9-G4와 동일한 0.194nM이었음을 보여준다.

표 3

인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 인간 SIRPα ECD-hFc-바이오틴에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 경쟁적 결합 활성에 대한 검정의 결과

항체 희석 (μg/ml)	항원 코팅: 인간 CD47 IgV TEV-His (2 μg/ml)			
	6F7 H1L1(hG4)		Hu5F9-G4	
1.5	0.077	0.080	0.072	0.081
1:3	0.073	0.071	0.069	0.082
1:9	0.092	0.088	0.062	0.074
1:27	0.320	0.289	0.290	0.349
1:81	0.654	0.679	0.793	0.776
1:243	0.970	0.944	1.102	1.030
1:729	1.035	1.016	1.142	1.038
0	0.859	0.904	1.124	0.928
인간 SIRPα ECD-hFc-바이오틴, 0.1 μg/ml				
2차 항체	SA-HRP			
EC50 (nM)	0.194		0.205	

[0241]

[0242]

4. 경쟁적 ELISA에 의한 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 인간 SIRPα ECD-hFc-바이오틴에 대한 항체 6F7 H1L1(G1M)의 경쟁적 결합 활성에 대한 검정

[0243]

실험 절차: 마이크로플레이트를 웰당 50μl의 2 μg/ml의 인간 CD47 IgV TEV-His로 코팅하고, 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 한 번 세척하고, 두드려서 건조시키고, 웰당 300μl의 1% BSA(PBS 중)로 차단시키고, 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하고, 3회 세척하고, 두드려서 건조시켰다. 항체를 초기 농도로 3 μg/ml(최종 농도: 0.5 μg/ml)로 희석하고, 1:3 연속 희석을 수행하여 블랭크 대조군 외에 총 7개의 농도를 얻었다. 위의 농도에 대해 2개의 이중 웰을 웰당 50μl의 최종 부피로 설정하고, 플레이트를 10분 동안 인큐베이션하였다. 0.2 μg/ml(최종 농도: 0.1 μg/ml)의 인간 SIRPα ECD-hFc-바이오틴을 웰당 50μl로 마이크로플레이트에 첨가하고, 1:1의 부피비로 항체와 함께 부드럽게 혼합하고, 마이크로플레이트를 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 3회 세척하고, 두드려서 건조시켰다. 50μl의 SA-HRP(KPL, 14-30-00) 작업 용액을 각 웰에 첨가하고, 마이크로플레이트를 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트를 4회 세척하고, 두드려서 건조시켰다. 50μl의 TMB 발색 용액을 각 웰에 첨가하여 암실의 실온에서 5분 동안 발색시킨 후, 각 웰에 50μl의 정지 용액을 첨가하여 발색을 종결시켰다. 그런 다음, 마이크로플레이트를 즉시 마이크로플레이트 판독기에 넣고, 마이크로플레이트의 각 웰의 OD 값을 450nm에서 판독하였다. 데이터를 SoftMax Pro 6.2.1로 분석하고 처리하였다.

[0244]

결과는 도 4에 나타나 있다. 모든 투여량에 대한 OD 값은 표 4에 나타나 있다. 결합된 항체의 흡광도 강도를 정량적으로 분석하여, 곡선 시뮬레이션을 수행하여 항체의 결합 효율 EC50을 얻었다(표 4).

표 4

인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 인간 SIRP α ECD-hFc-바이오틴에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 경쟁적 결합 활성에 대한 검정의 결과

항체 희석 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	항원 코팅: 인간 CD47 IgV TEV-His (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	6F7 H1L1(G1M)		Hu5F9-G4	
0.5	0.076	0.070	0.056	0.057
1:3	0.104	0.096	0.075	0.066
1:9	0.420	0.435	0.530	0.408
1:27	1.017	1.119	0.932	0.968
1:81	1.196	1.304	1.075	1.104
1:243	1.265	1.394	1.221	1.151
1:729	1.225	1.312	1.173	1.056
0	1.045	1.191	1.070	1.132
인간 SIRP α ECD-hFc-바이오틴, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$				
2차 항체	SA-HRP (1:4000)			
EC50 (nM)	0.274		0.310	

[0245]

[0246]

결과는 6F7 H1L1(G1M)이 항원 인간 CD47 IgV TEV-His의 이의 수용체 인간 SIRP α ECD-hFc-바이오틴에 대한 결합을 효과적으로 차단할 수 있으며, 차단 효율은 용량-의존적 관계를 나타내고; 6F7 H1L1(G1M)의 차단 EC50은 Hu5F9-G4와 유사한 0.274nM이었음을 보여준다.

[0247]

실시예 6: 인간 CD47에 대한 무린 항체 6F7의 친화도 상수의 결정

[0248]

항원 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 무린 항체 6F7의 결합의 동역학 매개변수를 포르테바이오 시스템(ForteBio system)(Forteio, 모델: QKe)을 사용하여 결정하였다.

[0249]

EDC/NHS를 사용하여 AR2G 센서(Forteio, 카탈로그 번호: 18-5092)를 활성화하고, 항체를 활성화된 AR2G 센서에 아민 커플링에 의해 고정하였다. 센서를 PBST에서 300초 동안 평형화하였다. 센서에 고정된 항원은 3.125nM 내지 100nM(연속 2배 희석) 농도의 항원으로 420초 동안 항체에 결합시켰다. 항원 및 항체를 PBST에서 600초 동안 해리시켰다.

[0250]

인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 무린 항체 6F7 및 Hu5F9-G4(대조군 항체로서)의 친화도 상수의 결정의 결과는 표 5 및 도 5에 나타나 있다.

표 5

인간 CD47에 대한 무린 항체 6F7의 친화도 상수를 결정한 결과

항체	KD (M)	kon(1/Ms)	kon 오차	kdis(1/s)	kdis 오차	Rmax 범위(nm)
6F7	6.52E-10	3.93E+05	7.41E+03	2.56E-04	9.48E-06	0.1684-0.2614
Hu5F9-G4	6.38E-10	5.26E+05	9.79E+03	3.36E-04	9.38E-06	0.1400-0.3609

[0251]

KD는 친화도 상수를 지칭한다; KD = kdis/kon.

[0252]

결과는 다음을 보여준다: 표 5 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 무린 항체 6F7 및 Hu5F9-G4의 친화도 상수는 각각 비슷하게 6.52E-10M 및 6.38E-10M이었다. 이는 6F7의 CDR 영역이 Hu5F9-G4의 CDR 영역과 비교하여 CD47에 결합하는 능력이 비슷하다는 것을 시사한다.

[0253]

실시예 7: 인간 CD47에 대한 항체 6F7 H1L1(hG4)의 친화도 상수의 결정

[0254] 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 항체 6F7 H1L1(hG4)의 친화도 상수를 매뉴얼에 따라 Biacore system (Forteio, 모델: QKe)을 사용하여 결정하였다. 완충 용액은 PBST였다. 인간 CD47 IgV-TEV-His를 171.6 RU의 고정 신호 값으로 아민 커플링에 의해 CM5 칩의 표면에 고정하였다. 항체는 0.78nM 내지 12.5nM(2배 희석) 농도의 항체로 30 μ l/분의 유속으로 120초 동안 인간 CD47에 결합시켰다. 항체 및 인간 CD47을 300초 동안 해리시켰다. 30 μ l/분의 유속으로 30초 동안 3M MgCl₂로 칩을 재생하였다. 데이터를 1:1 모델 피팅에 의해 분석하여 친화도 상수를 얻었다. Biacore Control 2.0 소프트웨어를 사용하여 데이터를 획득하고, Biacore T200 Evaluation 2.0 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 6F7 H1L1(hG4) 및 Hu5F9-G4(대조군 항체로서)의 친화도 상수를 결정한 결과는 표 6 및 도 6과 도 7에 나타나 있다.

[0255] 결과는 다음을 보여준다: 도면에 나타나 있는 바와 같이, 인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 6F7 H1L1(hG4) 및 Hu5F9-G4의 친화도 상수가 각각 1.52E-10M 및 4.42E-11M이며, 인간 CD47에 결합하는 6F7 H1L1(hG4)의 더 큰 능력을 시사한다.

표 6

인간 CD47 IgV TEV-His에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 친화도 상수를 결정한 결과						
항체 명칭	KD (M)	ka(1/Ms)	SE(ka)	kd(1/s)	SE(kd)	Rmax (RU)
6F7H1L1 (hG4)	1.52E-10	2.54E+06	1.48E+04	3.88E-04	1.14E-06	253.21-272.60
Hu5F9-G4	4.42E-11	3.00E+06	8.49E+03	1.32E-04	5.69E-07	238.81-327.23

KD는 친화도 상수를 지칭한다; KD = kdis/kon.

[0256]

[0257] 실시예 8: 6F7 H1L1(G1M)의 세포 생리활성(Bioactivity)에 대한 연구

[0258] 1. FACS에 의한 정상 인간 RBC에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 결합의 검출

[0259] 정상 인간 적혈구를 생물안전 작업대에서 분리하였다: 혈액 완충액 A 및 B를 1:9의 비로 잘 혼합하여 혈액 완충액을 얻고; 20ml의 신선한 혈액을 60ml의 혈액 완충액과 잘 혼합하고; 15ml의 Ficoll Paque 시약을 50ml의 원심 분리 튜브에 첨가한 다음, 희석된 신선한 혈액을 3:4의 비로 시약의 표면에 천천히 첨가하고, 즉, 20ml의 희석된 혈액을 각 튜브에 첨가하고; 1550rpm에서 30분 동안 원심분리를 수행하고; 원심분리 튜브 바닥의 PBC를 천천히 피펫팅하고, PBS로 3회 세척하고, 원심분리하고; 세포 펠릿을 500 μ l의 1% PBSA로 재현탁하여 계수하고; RBC의 농도를 조정하고, 세포를 튜브당 0.3백만개의 세포로 1.5ml 원심분리 튜브로 옮기고; 5600rpm에서 5분 동안 원심분리를 수행하고, 상청액을 버리고; 해당 농도(최종 농도: 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001nM)를 갖는 100 μ l의 항체를 실험 설계에 따라 각 튜브에 첨가하고, 블랭크 그룹(PBSA + 세포) 및 아이소타입 대조군(hIgG) 그룹을 설계한 후 얼음 위에서 1시간 동안 인큐베이션하고; 500 μ l의 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버리고; 100 μ l의 FITC 염소 항-인간 IgG(1:500)를 각 튜브에 첨가하고, 및 생성된 혼합물을 잘 혼합하고, 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하고; 500 μ l의 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버리고; 200 μ l의 1% 세척 완충액을 각 튜브에 첨가하여 세포를 재현탁시키고, 형광 신호를 유세포 분석기에서 FITC 채널로 검출하였다.

[0260] Flowing 소프트웨어를 사용하여 결과를 분석하고, GraphPad prism 5에서 샘플 농도 및 MFI를 사용하여 별도로 곡선 피팅을 수행하여 EC50을 계산하였다.

[0261] 정상 인간 RBC의 세포막 표면의 CD47에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 결합의 결과는 도 8에 나타나 있다. 결과는 비슷한 결합 EC50 값으로 각각 0.077nM 및 0.057nM를 가져, 동일한 표적에 대한 6F7 H1L1(G1M) 및 시판 약제 Hu5F9-G4 모두 정상 인간 RBC의 세포막 표면의 CD47에 특이적으로 결합할 수 있음을 보여준다.

[0262] 2. FACS에 의한 라지(Raji)에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 결합 활성 검정

[0263] 대수기의 라지(Raji) 세포를 수집하고, 원심분리하고 세척하였다. 세포 펠릿을 1% PBSA에 재현탁시켜 계수하고, 생존 능력을 결정하였다. 세포를 3.0×10^5 개 세포/500 μ l/튜브에 따라 1.5ml 튜브에 옮기고, 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 100 μ l의 연속 희석된 해당 항체를 실험 설계에 따라 각 튜브에 첨가하고, 블랭크 그룹(PBSA + 세포) 및 아이소타입 대조군(hIgG) 그룹을 설계한 후, 얼음 위에서 1시간 동안 인큐베이션

하였다. 그런 다음, 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 100 μ l의 FITC 염소 항-인간 IgG(1:500)를 각 튜브에 첨가하고, 혼합물을 잘 혼합하고, 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 500 μ l의 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 1% PBSA를 각 튜브에 첨가하여 세포를 재현탁시키고, 형광 신호를 유세포 분석기에서 FITC 채널로 검출하였다. MFI 및 샘플 농도를 사용하여 곡선 피팅을 별도로 수행하여 EC50을 계산하였다.

[0264] 라지(Raji)에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 결합 활성의 결과는 도 9에 나타나 있다. 도면에 나타낸 바와 같이, 결과는 비슷한 결합 EC50으로 각각 0.013nM 및 0.012nM을 가져, 6F7 H1L1(G1M) 및 Hu5F9-G4는 모두 라지 세포의 세포막 표면의 CD47에 특이적으로 결합할 수 있음을 보여준다.

[0265] 3. FACS에 의한 LOVO에 대한 SIRP에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 경쟁적 결합 생리활성(Bioactivity)에 대한 검정

[0266] 대수기의 LOVO 세포(Chinese Academy of Sciences Cell Bank, Accession No. bio-73085)를 일상적으로 수집하고, 원심분리하고 세척하였다. 세포 펠릿을 1% PBSA에 재현탁시켜 계수하고, 생존 능력을 결정하였다. 1% PBSA로 세포 농도를 적합한 범위로 조정하고, 세포를 튜브당 500 μ l로 1.5ml 튜브로 그룹으로 옮겨 총 0.3백만 개의 세포를 생성하였다. 세포를 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 연속 희석된 항체를 첨가하고(최종 농도 내림차순: 300, 100, 10, 1, 0.3, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001nM), 블랭크 대조군(100 μ l의 1% PBSA + 세포) 및 아이소타입 대조군(인간 hIgG)을 설정한 후 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 100 μ l의 SIRP α -mFc를 각 튜브에 첨가하고, 혼합물을 20nM의 최종 농도로 잘 혼합하고, 1시간 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 100 μ l의 FITC 염소 항-마우스 IgG(1:500 희석)를 각 튜브에 첨가한 후, 암실에서 40분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 200 μ l의 1% PBSA를 첨가하여 세포 펠릿을 재현탁시키고, 현탁액을 유세포 분석 튜브로 옮겼다. 형광 신호를 유세포 분석기에서 FITC 채널로 검출하였다. MFI 및 샘플 농도를 사용하여 곡선 피팅을 별도로 수행하여 EC50을 계산하였다.

[0267] LOVO에 대한 SIRP에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 경쟁적 결합 활성을 검정하였다. 결과는 도 10에 나타나 있다. 도면에 나타낸 바와 같이, 비슷한 경쟁적 결합 EC50으로 각각 0.16nM 및 0.24nM을 가져, 6F7 H1L1(G1M) 및 Hu5F9-G4는 모두 LOVO의 막 표면의 CD47에 결합하기 위해 SIRP와 경쟁할 수 있으며, 이에 따라 SIRP가 CD47에 결합하는 것을 차단할 수 있다.

[0268] 4. 정상 인간 RBC의 응집에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 효과

[0269] 정상 인간 RBC의 제조: 인간 혈액 PBMC를 Ficoll-Paque Plus 시약의 매뉴얼에 따라 분리하고, 위해 바닥에 침전된 적혈구를 본 실험에 사용하였다. 적혈구를 1×10^7 /ml의 농도로 PBS로 희석하여 적혈구 현탁액을 얻은 다음, 이를 첨가하고 둥근 바닥 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 상응하는 농도의 양성 항체를 첨가하고, 0.1 g/ml의 텍스트란 T500을 대조군에 첨가하고, 상응하는 hIgG 또는 PBS를 음성 대조군에 첨가한 후, 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 적혈구의 응집을 검사하고, 사진을 찍었다.

[0270] 정상 인간 적혈구의 응집에 대한 6F7 H1L1(G1M)의 효과는 도 11에 나타나 있다. 도면에 나타낸 바와 같이, 6F7 H1L1(G1M) 및 대조군 항체 Hu5F9-G4는 항체 농도가 20 μ g/ml보다 낮은 경우 적혈구의 응집에 영향을 미치지 않았지만; 항체 농도가 20 μ g/ml보다 더 높은 경우, Hu5F9-G4에 의한 현저한 적혈구 응집의 축진이 관찰될 수 있는 반면, 6F7 H1L1(G1M)은 여전히 적혈구의 응집에 영향을 미치지 않았다.

[0271] 실시예 9: 6F7 H1L1(hG4)의 세포 생리(Bioactivity)활성에 대한 연구

[0272] 1. FACS에 의한 정상 인간 RBC에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합의 검출

[0273] 실험 절차: 혈액 완충액 A(D-+)-글루코스: 1g; CaCl₂: 0.0056g; MgCl₂ · 6H₂O: 0.1992g; KCl: 0.4026g; Tris: 17.5650g; 1ℓ의 초순수에 용해시킴) 및 B(NaCl: 8.19 g, 1ℓ의 초순수에 용해시킴)를 1:9의 비로 혼합하여 혈액 완충액을 얻었다. 신선한 혈액을 혈액 완충액(농축 후 1:3의 혈액 희석 비)과 잘 혼합하였다. 15ml의 Ficoll Paque plus 시약(GE, 카탈로그 번호 17-1440-02)을 50ml 원심분리 튜브에 첨가하고, 희석된 신선한 혈액을 3:4의 부피비로 시약 표면에 천천히 첨가, 즉, 20ml의 희석된 혈액을 각 튜브에 첨가하였다. 밸런싱 후 튜브를 각각 1550rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 중간 버퍼 코트 층의 PBMC를 피펫팅하였다. 혈액 완충액을 1:4의 세포 대 혈액 완충액의 부피비로 첨가하였다. 생성된 혼합물을 잘 혼합하고, 950rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 20ml의 혈액 완충액을 첨가하여 PBMC를 재현탁시켰다. 생성된 현탁액을 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 원심분리를 수행한 후, 2회 세척하였다. 세포를 10ml의 RPMI-1640(FBS-무함유)으로 1회 세척하였다.

원심분리를 수행하고, 상청액을 버렸다. 세포를 5ml의 RPMI-1640(10% FBS 함유)에 재현탁시키고, 샘플당 3×10^5 개의 세포로 계수하였다. 500 μ l의 1% PBSA를 각 튜브에 첨가한 후, 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 버렸다. 각 튜브에 해당 농도(최종 농도: 300nM, 100nM, 10nM, 1nM, 0.1nM, 0.01nM, 0.001nM)의 100 μ l의 항체를 첨가하고, 블랭크(PBSA + 세포) 및 아이소타입 대조군을 설계한 후, 얼음 위에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 100 μ l의 FITC 염소 항-인간 IgG(잭슨(Jacson), 카탈로그 번호 109-095-098, 1:500 희석) 또는 FITC 염소 항-마우스 IgG(비디 바이오사이언스(BD bioscience), 카탈로그 번호 555988)(1:500)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 잘 혼합하고, 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 200 μ l의 1% 세척 완충액을 각 튜브에 첨가하여 세포를 재현탁시키고, 형광 신호를 유세포 분석기에서 FITC 채널로 검출하였다. 결과를 Flowing 소프트웨어를 사용하여 분석하고, GraphPad prism 5에서 샘플 농도 및 MFI를 사용하여 별도로 곡선 피팅을 수행하여 EC50을 계산하였다.

[0274] 정상 인간 RBC의 세포막 표면의 CD47에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합의 결과는 도 12 및 표 7에 나타나 있다. 결과는 동일한 표적에 대한 6F7 H1L1(hG4) 및 시판 약물 Hu5F9-G4는 모두가 정상 인간 RBC의 세포막 표면의 CD47에 특이적으로 결합할 수 있음을 보여주며, 결합 EC50은 각각 0.60nM 및 0.06nM이고, RBC에 대한 Hu5F9-G4의 친화도는 6F7 H1L1(hG4)의 친화도보다 10배 더 높다.

표 7

FACS에 의해 인간 RBC에 대한 항-CD47 항체의 결합을 검출한 결과

농도 (nM)/MFI	0.00123	0.0123	0.123	1.23	3.7	11.1	33.3	EC50
Hu5F9-G4	19.48	59.35	132.68	212.25	207.52	219.34	219.02	0.06
6F7 H1L1(hG4)	10.25	19.55	47.29	134.58	152.50	185.31	190.18	0.60

[0275]

2. FACS에 의한 라지(Raji)에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합 활성 검증

[0276]

[0277] 종양 세포 라지(Chinese Academy of Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences Cell Center, 카탈로그 번호 TCHu 44)에 대한 CD47 항체의 결합 생리활성(bioactivity)을 유세포 분석에 의해 검증하였다.

[0277]

[0278] 라지 세포를 계수하고, 샘플당 3×10^5 개의 세포로 생존 능력을 결정하였다. 500 μ l의 1% PBSA를 각 튜브에 첨가한 후, 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 실험 설계에 따라 연속 희석된 항체를 첨가하고, 블랭크(PBSA + 세포) 그룹 및 아이소타입 대조군 그룹(인간 IgG)을 설계한 후, 얼음 위에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 100 μ l의 FITC 염소 항-인간 IgG(1:500) 또는 FITC 염소 항-마우스 IgG(1:500)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 잘 혼합하고, 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 500 μ l의 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 200 μ l의 세척 완충액을 각 튜브에 첨가하여 세포를 재현탁시키고, 형광 신호를 유세포 분석기에서 FITC 채널로 검출하였다.

[0278]

[0279] 라지에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합 활성의 결과는 도 13 및 표 8에 나타나 있다. 도면 및 표에 나타낸 바와 같이, 결과는 비슷한 결합 EC50으로 각각 0.32nM 및 0.22nM을 가져, 6F7 H1L1(hG4) 및 Hu5F9-G4는 모두 라지 세포의 세포막 표면의 CD47에 특이적으로 결합할 수 있음을 보여준다.

[0279]

표 8

FACS에 의해 종양 세포 라지에 대한 항-CD47 항체의 결합을 검출한 결과

농도 (nM)/MFI	0.00123	0.0123	0.123	1.23	3.7	11.1	33.3	EC50
Hu5F9-G4	10.83	13.67	47.74	176.60	177.11	183.49	185.86	0.22
6F7 H1L1 (hG4)	11.05	16.40	44.71	155.29	163.61	173.42	161.61	0.32

[0280]

[0281] 3. FACS에 의한 라지(Raji)에 대한 SIRP에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 경쟁적 결합 활성 검증

[0282] 대수기의 라지 세포를 통상적으로 수집하고, 원심분리하고 세척하였다. 세포 펠릿을 1% PBSA에 재현탁시켜 계수하고, 생존 능력을 결정하였다. 1% PBSA로 세포 농도를 적합한 범위로 조정하고, 세포를 튜브당 500 μ l로 1.5ml 튜브에 그룹으로 옮겨, 총 0.3백만 개의 세포를 생성하였다. 세포를 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 연속 희석된(최종 농도 내림차순: 1, 0.3, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001nM) 항체를 첨가하고, 블랭크 대조군(100 μ l의 1% PBSA + 세포) 및 아이소타입 대조군(인간 hIgG)을 설정한 후, 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 100 μ l의 SIRP α -ECD-mFc(mFc의 서열은 서열번호 71에 제시됨)를 각 튜브에 첨가하고, 혼합물을 20nM의 최종 농도로 잘 혼합하고, 1시간 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 100 μ l의 FITC 염소 항-마우스 IgG(1:500 희석)를 각 튜브에 첨가한 후, 암실에서 40분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 500 μ l의 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 200 μ l의 1% PBSA를 첨가하여 세포 펠릿을 재현탁시켰다. 형광 신호를 유세포 분석기에서 FITC 채널로 검출하였다.

[0283] 중앙 세포 라지에 대한 SIRP에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 경쟁적 결합의 결과는 도 14 및 표 9에 나타나 있다. 도면 및 표에 나타난 바와 같이, 비슷한 경쟁적 결합 EC50으로 각각 0.017nM 및 0.014nM을 가져, 6F7 H1L1(hG4) 및 Hu5F9-G4는 모두 라지의 막 표면의 CD47에 결합하기 위해 SIRP와 경쟁할 수 있으며, 이에 따라 SIRP가 CD47에 결합하는 것을 차단할 수 있다.

표 9

FACS에 의해 라지 세포에 대한 SIRP에 대한 항-CD47 항체의 경쟁적 결합을 검출한 결과

농도 (nM)/MFI	0.0001	0.001	0.01	0.1	0.3	1	EC50
Hu5F9-G4	54.83	49.37	37.16	10.77	10.34	11.4	0.014
6F7 H1L1(hG4)	50.27	54.37	42.64	16.80	15.66	14.83	0.017

[0284]

[0285] 4. FACS에 의한 LOVO에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합 활성에 대한 검증

[0286] 대수기의 LOVO 세포(Chinese Academy of Sciences Cell Bank, Accession No. bio-73085)를 수집하고, 원심분리하고 세척하였다. 세포 펠릿을 500 μ l의 1% PBSA에 재현탁시켜 계수하고, 생존 능력을 결정하였다. 세포를 3.0×10^5 개 세포/500 μ l/튜브에 따라 1.5ml 튜브에 옮기고, 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 실험 설계에 따라 100 μ l의 연속 희석된 해당 항체를 각 튜브에 첨가하고, 블랭크 그룹(PBSA + 세포) 및 아이소타입 대조군 그룹(서열번호 72의 중쇄 서열 및 서열번호 73의 경쇄 서열을 갖는 인간 hIgG)을 설계한 후, 얼음 위에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 500 μ l의 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 100 μ l의 FITC 염소 항-인간 IgG(1:500)를 각 튜브에 첨가하고, 혼합물을 잘 혼합하고, 암실에서 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 500 μ l의 1% PBSA를 첨가한 후 5600rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상청액을 버렸다. 200 μ l의 1% PBSA를 각 튜브에 첨가하여 세포를 재현탁시키고, 현탁액을 유세포 분석기 튜브로 옮기고, 유세포 분석기 BD FACSCalibur에 의해 검출하였다. 결과를 Flowing 소프트웨어를 사용하여 분석하고, GraphPad prism 5에서 샘플 농도 및 MFI를 사용하여 별도로 곡선 피팅을 수행하여 EC50을 계산하였다.

[0287] LOVO에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 결합의 결과는 도 15 및 표 10에 나타나 있다. 도면 및 표에 나타난 바와 같이, 6F7 H1L1(hG4) 및 Hu5F9-G4는 모두 LOVO 세포의 세포막 표면의 CD47에 특이적으로 결합할 수 있으며, 이의 결합 EC50은 각각 0.02nM 및 0.06nM이다. 6F7 H1L1(hG4)의 결합 활성은 Hu5F9-G4의 결합 활성보다 약간 더 높다.

표 10

FACS에 의해 LOVO에 대한 항-CD47 항체의 결합을 검출한 결과

농도 (nM)/MFI	0.0001	0.001	0.01	0.1	0.3	1	EC50
Hu5F9-G4	11.35	13.04	30.44	102.94	145.13	150.57	0.06
6F7 H1L1 (hG4)	15.26	25.41	48.15	135.95	146.67	149.81	0.02

5. FACS에 의한 LOVO에 대한 SIRP에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 경쟁적 결합 생리활성 검정

실험 절차는 라지(Raji) 세포를 LOVO 세포로 변경한 것을 제외하고는 실시예 3과 동일하다.

LOVO에 대한 SIRP에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 경쟁적 결합 활성에 대한 검정의 결과는 도 16 및 표 11에 나타나 있다. 도면 및 표에 나타낸 바와 같이, 6F7 H1L1(hG4) 및 Hu5F9-G4는 LOVO의 막 표면의 CD47에 대한 결합을 위해 SIRP와 경쟁할 수 있으며, 이에 따라 SIRP가 CD47에 결합하는 것을 차단할 수 있으며, 이의 경쟁적 결합 EC50은 각각 0.10nM 및 0.24nM이다. 6F7 H1L1(hG4)의 경쟁적 결합 활성은 Hu5F9-G4의 경쟁적 결합 활성보다 약간 더 높다.

표 11

FACS에 의해 LOVO 세포에 대한 SIRP에 대한 항-CD47 항체의 경쟁적 결합을 검출한 결과

농도 (nM)/MFI	0.0001	0.001	0.01	0.1	0.3	1	10	100	300	EC50
Hu5F9-G4	69.81	62.47	64.45	47.30	38.98	11.63	10.51	9.59	9.93	0.24
6F7 H1L1(hG4)	56.79	59.59	64.52	34.21	23.76	26.52	17.46	11.35	9.44	0.10

6. 정상 인간 RBC의 응집에 대한 항-CD47 항체의 효과

정상 인간 RBC의 제조: 인간 혈액 PBMC를 Ficoll-Paque Plus 시약(GE, 카탈로그 번호 17-1440-02)의 매뉴얼에 따라 분리하고, 바닥에 침전된 적혈구를 본 실험에 사용하였다. 적혈구를 1×10^7 /ml의 농도로 PBS로 희석하여 적혈구 현탁액을 얻은 다음, 이를 둥근 바닥 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 해당 농도의 양성 항체를 첨가하고, 0.1 g/ml 텍스트란 T500을 대조군에 첨가하고, 상응하는 인간 IgG1(아케소 바이오파마(Akeso Biopharma)) 또는 PBS를 음성 대조군에 첨가한 후, 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 적혈구의 응집을 검사하고, 사진을 찍었다.

정상 인간 적혈구의 응집에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 효과는 도 17에 나타나 있다. 도면에 나타낸 바와 같이, 6F7 H1L1(hG4)은 테스트된 모든 농도에서 적혈구의 응집을 일으키지 않았으며, 대조군 항체 Hu5F9-G4는 3.3 μ g/ml 미만의 농도에서 적혈구의 응집을 일으키지 않았다. 농도가 10 μ g/ml 이상인 경우, Hu5F9-G4에 의한 적혈구의 현저한 응집의 축진이 관찰될 수 있다.

실시예 10: 피하 이식된 MDA-MB-231 종양에 대한 6F7 H1L1(hG4)의 치료적 효과

6F7 H1L1(hG4)의 투여 후 SCID/베이지 마우스에 피하 이식된 인간 유방암 세포 MDA-MB-231 종양의 부피를 측정함으로써 6F7 H1L1(hG4)의 생체내 활성을 연구하였다. 수집된 MDA-MB-231(ATCC, 카탈로그 번호 HTB-26) 세포를 오른쪽 옆구리에 5×10^6 개 세포/마우스로 총 40마리의 마우스에 대해 SCID/베이지 마우스에 피하 이식하였다. 종양 부피가 약 100mm³ 내지 120mm³에 도달했을 때, 마우스를 평균 종양 부피에 따라 7마리의 마우스의 5개 그룹: 모델 그룹, Hu5F9-G4 고용량 그룹, Hu5F9-G4 저용량 그룹, 6F7 H1L1(hG4) 고용량 그룹과 6F7 H1L1(hG4) 저용량 그룹으로 고르게 나누되, 고용량 그룹은 0.2 mg/kg의 용량으로 처리하고, 저용량 그룹은 0.02 mg/kg의 용량으로 처리하였다. 그룹화 날짜는 D0로 표시하고, D0, D3, D7, D10, D14 및 D17에 투여를 수행하였다.

그룹화 후 버니어 캘리퍼를 사용하여 매주 2회 종양 크기를 측정하고, 공식 $TV = 0.5 \times ab^2$ 에 따라 종양 부피

를 계산하였으며, 여기서 a는 종양의 장경이고, b는 종양의 단경이며, TV는 종양의 부피이다. TGI(%)(tumor growth inhibition rate: 종양 성장 저해율)를 공식 $\%TGI = (1 - (Ti - T0) / (Ci - C0)) \times 100\%$ 에 따라 종양 부피로부터 계산하였으며, 여기서 Ti 및 Ci는 각각 치료 및 모델 그룹의 i일에 평균 종양 부피이고, T0 및 C0는 각각 치료 및 모델 그룹의 0일째 평균 종양 부피이다. GraphPad 소프트웨어에 의해 처리된 그룹간 비교 후 분산의 일원 분석에 의해 결과를 평가하였다.

[0299] 결과는 도 18에 나타나 있다. 그룹화 후 제24일에, 대조군 항체 Hu5F9-G4 고용량 그룹 및 6F7 H1L1(hG4) 고용량 그룹 모두에서, MDA-MB-231 종양의 성장은 효과적으로 저해되었고(P < 0.01), Hu5F9-G4 및 6F7 H1L1(hG4)에 의한 MDA-MB-231 종양의 성장의 저해는 용량-반응 관계를 나타내었다. 대조군 항체 Hu5F9-G4 고용량 그룹, 6F7 H1L1(hG4) 고용량 그룹 및 6F7 H1L1(hG4) 저용량 그룹에 대한 TGI 값(%)은 각각 67%, 63% 및 25%였다. 대조군 항체 그룹과 비교하여, 6F7 H1L1(hG4) 저용량 그룹은 Hu5F9-G4 저용량 그룹보다 유의하게 더 높은 효능을 나타내고, 6F7 H1L1(hG4) 고용량 그룹 및 대조군 항체 고용량 그룹은 비슷한 효능을 나타낸다(P > 0.05).

[0300] 실시예 11: 헤모글로빈 및 헤마토크릿에 대한 사이노물구스 원숭이에 대한 6F7 H1L1(hG4) 및 Hu5F9-G4의 단회 투여의 효과

[0301] 4마리의 사이노물구스 원숭이를 체중 및 성별에 따라 절반은 수컷이고 절반은 암컷인 2마리의 원숭이로 이루어진 2개의 그룹으로 무작위로 배정하였다. 6F7 H1L1(hG4) 그룹 및 Hu5F9-G4 그룹을 설정하고, 10 mg/kg의 용량으로 정맥 투여하였다. 헤모글로빈 및 헤마토크릿은 혈액학 분석기를 사용하여 검출하였다.

[0302] 결과는 도 19과 도 20 및 표 12에 나타나 있다.

[0303] 결과는 H1L1(hG4) 및 Hu5F9-G4를 사이노물구스 원숭이에게 10 mg/kg으로 단회 투여한 후 헤모글로빈과 헤마토크릿이 상이한 정도로 감소하였으며, Hu5F9-G4 그룹의 빈혈 수준이 6F7 H1L1(hG4) 그룹보다 높은 빈혈 수준으로 2일 내지 7일 후에 가장 낮은 빈혈 지점에 도달하였고; 원숭이는 투여 후 약 20일에 기준선 수준으로 두 항체에 의해 야기된 빈혈로부터 자발적으로 회복될 수 있었음을 보여준다.

표 12

6F7 H1L1(hG4) 및 Hu5F9-G4의 단회 투여 후 사이노물구스 원숭이에 대한 개별 헤모글로빈 및 헤마토크릿 데이터

지수	HGB g/dL				HCT %			
	6F7 H1L1(hG4) 수컷	6F7 H1L1(hG4) 암컷	Hu5F9-G4 수컷	Hu5F9-G4 암컷	6F7 H1L1(hG4) 수컷	6F7 H1L1(hG4) 암컷	Hu5F9-G4 수컷	Hu5F9-G4 암컷
투여 7일 전	12.9	12.6	12.4	13.3	42.5	42.1	41.4	44.5
투여 3일 전	13	12.3	12.5	12.6	41.9	41.4	41.7	42.3
투여 후 0일	13.1	11.6	11.5	12.5	42.1	37.7	37.9	40.8
투여 후 1일	11.6	9.6	9.2	9.9	37.1	31.8	27.1	31.7
투여 후 2일	10.8	9.3	7.7	8.8	33.3	29.4	21.6	27.5
투여 후 4일	10.5	9.4	6.4	8.3	31.9	30.2	18.2	25.1
투여 후 7일	10.6	9.9	5.9	9.6	33.1	32.1	18.3	30.6
투여 후 10일	10.5	10.8	7.7	10.2	33	36.5	26.5	34.4
투여 후 13일	11.9	11.3	9	10.8	36.9	36.7	31.5	36.9
투여 후 20일	12.3	12.3	10.6	11.9	38.1	39.7	36.2	39.5

[0304]

[0305] 이상, 본 발명의 실시형태를 상세히 설명하였지만, 본 발명은 이들 실시형태에 한정되는 것은 아니다. 당업자는 본 발명의 사상을 침해하지 않고 다양한 등가의 수정 또는 대체를 할 수 있다. 이러한 등가의 수정 또는 대체는 본 출원의 청구범위에 의해 정의된 범위에 포함된다.

[0306] 서열목록

6F7 중쇄 가변 영역:

CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGAGCAGAGCTGGTGAGGCCAGGAGCATCCGTG
AAGCTGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGGG
TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCATGATCGACCCAAGCG
ATTCCGAGACCCACAACAATCAGATGTTTAAGGACAAGGCCACCCTGACAGTGG
ATAAGAGCTCCAATACCGCCTACATGCACCTGTCTAGCCTGACATCTGAGGACAG
CGCCGTGTATCACTGCGCCCGGCTGTACAGATGGTATTTTGACGTGTGGGGAGCA
GGAACCACAGTGACCGTGTCTCT (서열번호 1)

QVQLQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPQGLEWIGMIDPSD
SETHNNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVVYHCARLYRWYFDVWGA
GTTVTVSS (서열번호 2)

[0307]

6F7 경쇄 가변 영역:

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGTCTATGAGCATGTCCCTGGGCGAGAGG
GTGACCCGTGCTCTGTAAAGGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGTTTC
AGCAGAAGCCACACCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCAATCGGT
ATACAGGCGTGCCTGACAGATTACCGGCTCTGGCAGCGCCACAGACTTCACCCT
GACAATCTCTAACGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGATTATCACTGCGGCCAGAG
CTACAATTTCCCTTATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG
(서열번호 3)

NIVMTQSPKSMMSLGERVTLSCKASEIVGTYVSWFQQKPHQSPKLLIYGASNRYTG
VPDRFTGSGSATDFLTISNVQAEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGKLEIK (서열번호
4)

6F7CDR

HCDR1: GYTFTSYW (서열번호 5)

HCDR2: IDPSDSET (서열번호 6)

HCDR3: ARLYRWYFDV (서열번호 7)

LCDR1: EIVGTY (서열번호 8)

LCDR2: GAS (서열번호 9)

LCDR3: GQSYNFPYT (서열번호 10)

6F7H1:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTG
AAGCTGAGCTGTAAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACAAGCTATTGGATGAACTGG
GTGCGGCAGAGACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAATGATCGACCCTTCC
GATTCTGAGACCCACAATGCCCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTG
GACAAGAGCACCTCCACAGCCTACATGCACCTGAGCTCCCTGCGGTCCGAGGAC
ACAGCCGTGTACTATTGCGCCAGGCTGTACCGCTGGTATTTTGACGTGTGGGGAG
CAGGAACCACAGTGACCGTGTCTAGC (서열번호 11)

[0308]

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGLEWIGMIDPSD
SETHNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDYAVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSS (서열번호 12)

6F7L1:

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACAATGTCTATGAGCCCAGGAGAGAGG
GTGACCCGTGCTCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGTTTC
AGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGTCTGATCTACGGAGCAAGCAACAGGT
ATACCGGAGTGCAGCAGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTTACCCT
GACAATCAGCTCCGTGCAGCCTGAGGACCTGGCCGATTATCACTGCGGCCAGTCT
TACAATTTCCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (서열번호
13)

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRYTG
VPAFSGSGSGTDFTLTISVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGKLEIK (서열번호
14)

[0309]

6F7H2:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTG
AAGGTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGGG
TGCGGCAGAGACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGAATCATCGACCCTTCCG
ATTCTGAGACCTCTAATGCCAGAAAGTTTCAGGGCCGGGTGACCCTGACAGTGG
ACAAGAGCACCTCCACAGCCTACATGCACCTGAGCTCCCTGAGGAGCGAGGACA
CAGCCGTGTACTATTGCGCCAGGCTGTACCGCTGGTATTTTGACGTGTGGGGAGC
AGGAACCACAGTGACCGTGTCTAGC (서열번호 15)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQLEWIGIIDPSDS
ETSNQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGT
TVTVSS (서열번호 16)

6F7L2:

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGAGG
GTGACCCTGTCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACGTGTCTTGGTTTC
AGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTATGGCGCCAGCAACAGGG
CAACCGGCATCCCCGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGACTTTACCCT
GACAATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACCTGGCCGATTACTATTGCGGCCAGTCT
TACAATTTCCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (서열번호
17)

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRATGI
PARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK (서열번호 18)

6F7H3:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTG
AAGGTGAGCTGTAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACATCCTATTGGATGAACTGGG
TGCGGCAGGCACCAGGACAGGGACTGGAGTGGATCGGCATCATCGACCCTTCCG
ATTCTGAGACCTCTTACGCCAGAAAGTTTCAGGGCAGGGTGACCCTGACAGTGG
ACAAGAGCACCTCCACAGCCTATATGGAGCTGAGCTCCCTGCGCAGCGAGGACA

CAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGCTGTACAGATGGTATTTTGACGTGTGGGGAGC
AGGAACCACAGTGACCGTGTCTAGC (서열번호 19)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPQGQLEWIGIIDPSDS
ETSYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGT
TVTVSS (서열번호 20)

6F7L3:

AACATCGTGATGACCCAGTCCCCAGCCACACTGTCTCTGAGCCCAGGAGAGAGG
GTGACCCTGTCTGTAGAGCCTCTGAGATCGTGGGCACATACCTGTCTTGGTATC
AGCAGAAGCCAGGACAGGCACCTAGGCTGCTGATCTACGGAGCCAGCACCAGGG
CAACAGGCATCCCCGCACGCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTTACCCT
GACAATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCCGTGTACTATTGCGGCCAGTCT
TACAATTTCCCATATACCTTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG (서열번호
21)

[0310]

[0311]

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSERASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI
PARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIK (서열번호 22)

6F7 중쇄 프레임워크 영역

FR-H1: QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKAS (서열번호 23)

FR-H2: MNWVKQRPGQGLEWIGM (서열번호 24)

FR-H3: HNNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYHC (서열번호 25)

FR-H4: WGAGTTVTVSS (서열번호 26)

6F7 경쇄 프레임워크 영역

FR-L1: NIVMTQSPKSMMSLGERVTLSCKAS (서열번호 27)

FR-L2: VSWFQQKPHQSPKLLIY (서열번호 28)

FR-L3: NRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISNVQAEDLADYHC (서열번호 29)

FR-L4: FGGGTKLEIK (서열번호 30)

6F7H1 프레임워크 영역

FR-H1: QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKAS (서열번호 31)

FR-H2: MNWVRQRPGQGLEWIGM (서열번호 32)

FR-H3: HNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYC (서열번호 33)

FR-H4: WGAGTTVTVSS (서열번호 34)

6F7L1 프레임워크 영역

FR-L1: NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSERAS (서열번호 35)

FR-L2: VSWFQQKPGQAPRLLIY (서열번호 36)

FR-L3: NRYTGVPARFSGSGSGTDFTLTISVQPEDLADYHC (서열번호 37)

FR-L4: FGGGTKLEIK (서열번호 38)

6F7H2 프레임워크 영역

FR-H1: QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCAS (서열번호 39)

FR-H2: MNWVRQRPGQGLEWIGI (서열번호 40)

FR-H3: SNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYC (서열번호 41)

FR-H4: WGAGTTVTVSS (서열번호 42)

6F7L2 프레임워크 영역

FR-L1: NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSERAS (서열번호 43)

FR-L2: VSWFQQKPGQAPRLLIY (서열번호 44)

FR-L3: NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDLADYYC (서열번호 45)

FR-L4: FGGGTKLEIK (서열번호 46)

6F7H3 프레임워크 영역

FR-H1: QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCAS (서열번호 47)

FR-H2: MNWVRQAPGQGLEWIGI (서열번호 48)

FR-H3: SYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC (서열번호 49)

FR-H4: WGAGTTVTVSS (서열번호 50)

[0312]

[0313]

6F7L3 프레임워크 영역

FR-L1: NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRAS (서열번호 51)

FR-L2: LSWYQQKPGQAPRLLIY (서열번호 52)

FR-L3: TRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYC (서열번호 53)

FR-L4: FGGGTKLEIK (서열번호 54)

IgG1M 중쇄 불변 영역

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호55)

중쇄 불변 영역 Ig 감마-4 사슬 C 영역

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호56)

경쇄 불변 영역 Ig 카파 사슬 C 영역

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
(서열번호57)

중쇄 불변 영역 Ig 감마-1 사슬 C 영역

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK

[0314]

TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호58)

6F7H1L1(G1M) 중쇄의 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQLEWIGMIDPSD
SETHNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDYAVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(서열번호59)

[0315]

6F7H1L1(G1M) 경쇄의 아미노산 서열

NIVMTQSPATMSMSPGERVTLSRCASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRYTG
VPARFSGSGSGTDFLTITSSVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호60)

6F7H2L2(G1M) 중쇄의 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQLEWIGIIDPSDS
ETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDYAVYYCARLYRWYFDVWGAGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(서열번호61)

6F7H2L2(G1M) 경쇄의 아미노산 서열

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRCASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRATGI
PARFSGSGSGTDFLTITSSLPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호62)

6F7H3L3(G1M) 중쇄의 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPQGQLEWIGIIDPSDS
ETSYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARLYRWYFDVWGAGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(서열번호63)

[0316]

6F7H3L3(G1M) 경쇄의 아미노산 서열

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSRCASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI
PARFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호64)

[0317]

6F7H1L1(hG4) 중쇄의 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQGLEWIGMIDPSD
SETHNAQKFQGKATLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAG
TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSC
PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호65)

6F7H1L1(hG4) 경쇄의 아미노산 서열

NIVMTQSPATMSMPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRYTG
VPAFSGSGSGTDFTLTISVQPEDLADYHCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열번호66)

6F7H2L2(hG4) 중쇄의 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQRPQGQGLEWIGIIDPSDS
ETSNAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMHLSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGT
TVTIVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호67)

6F7H2L2(hG4) 경쇄의 아미노산 서열

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYVSWFQQKPGQAPRLLIYGASNRATGI
PARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDLADYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열번호68)

6F7H3L3(hG4) 중쇄의 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPQGQGLEWIGIIDPSDS
ETSYAQKFQGRVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLYRWYFDVWGAGT
TVTIVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (서열번호69)

[0318]

6F7H3L3(hG4) 경쇄의 아미노산 서열

NIVMTQSPATLSLSPGERVTLSCRASEIVGTYLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI
PARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCGQSYNFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열번호70)

[0319]

mFc 태그의 서열: (서열번호 71)

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQI
SWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPA
PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKT
ELNYKNTEPVLDSGSGYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR
TPGK

hIgG의 중쇄 서열(서열번호 72)

EVQLEQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFTTYWIEWIKQRPGHSLWIGEILPGSDST
YYNEKVKGKVTFTADASSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGFYVYWGQGTTLT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

hIgG의 경쇄 서열(서열번호 73)

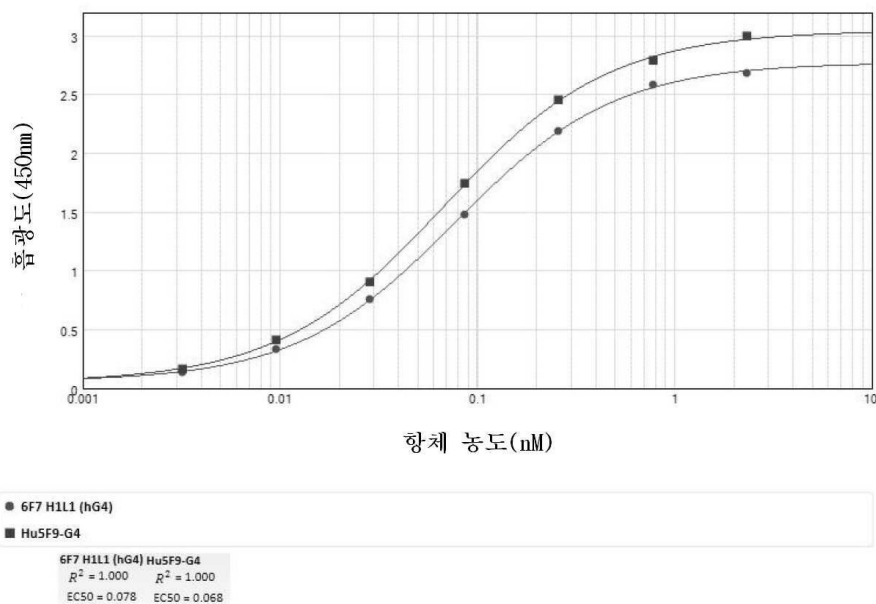
DIELTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYTSQSMGIP
SRFSGSGSGTDFTLSINSETEDEFGVYFCQQSGSWPRTFGGGTKLDIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

TEV 아미노산 서열은 ENLYFQG (서열번호 74)임.

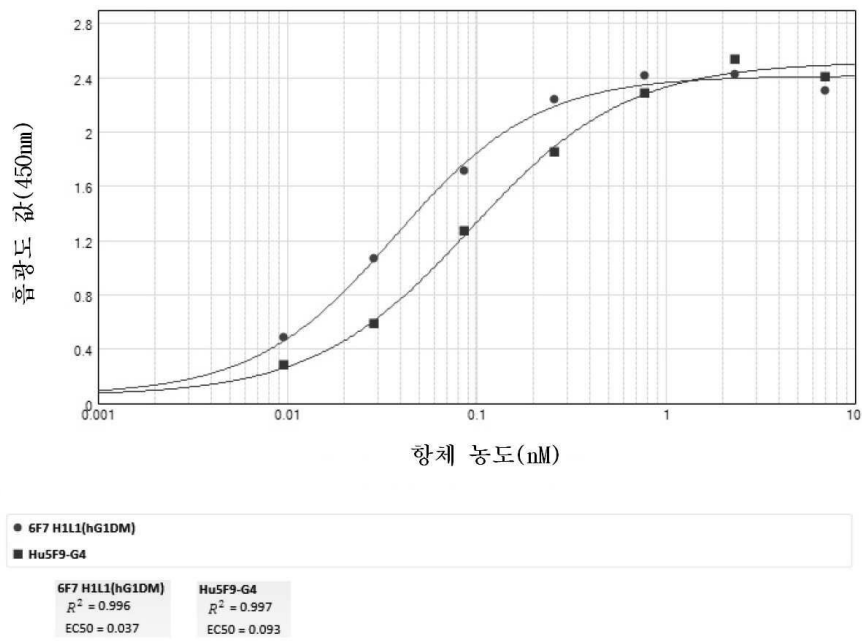
[0320]

도면

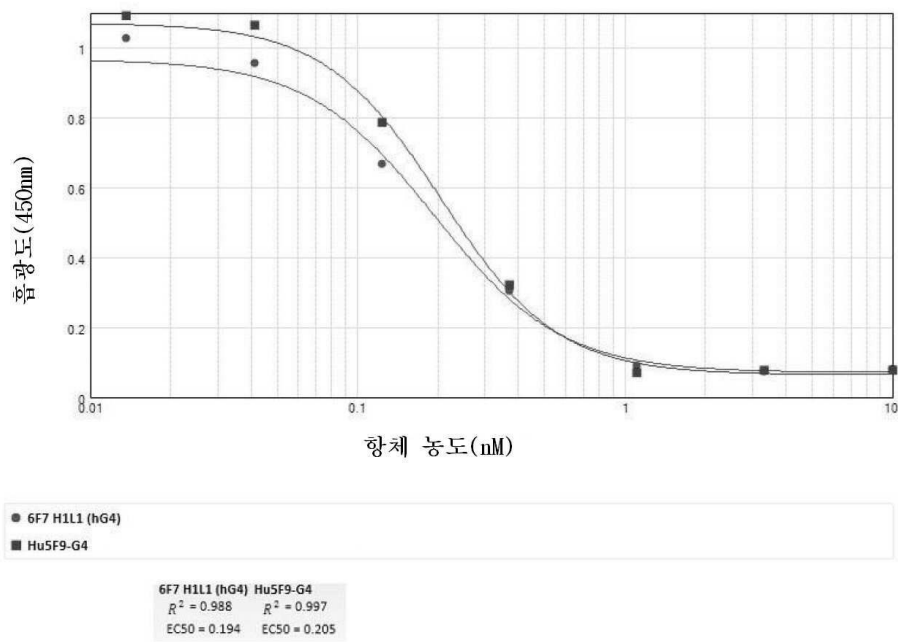
도면1



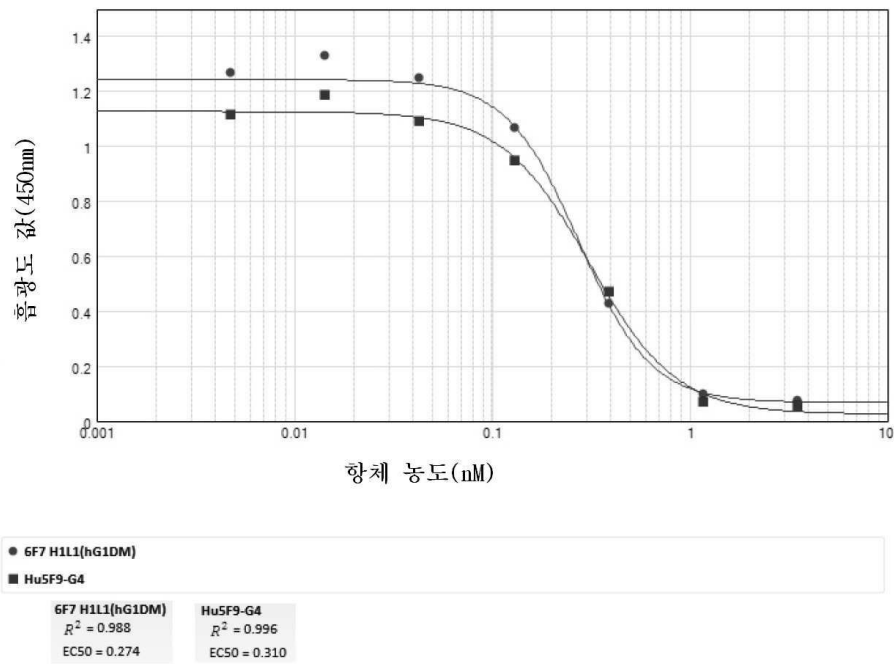
도면2



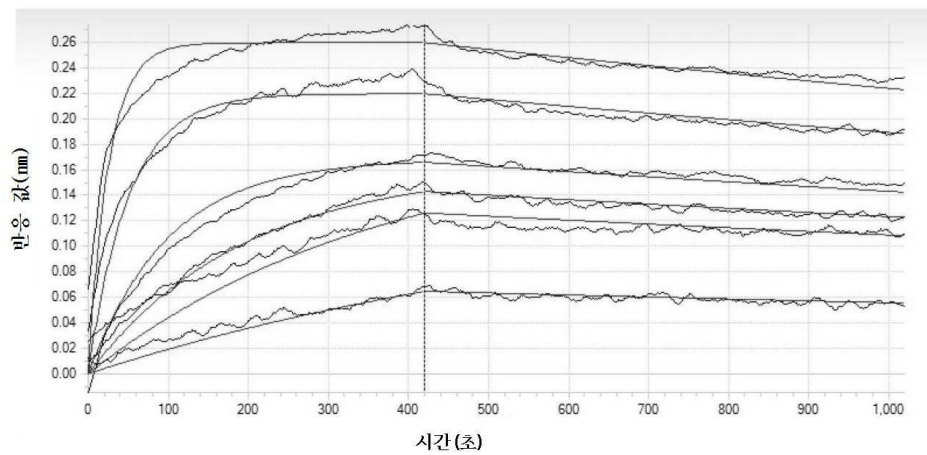
도면3



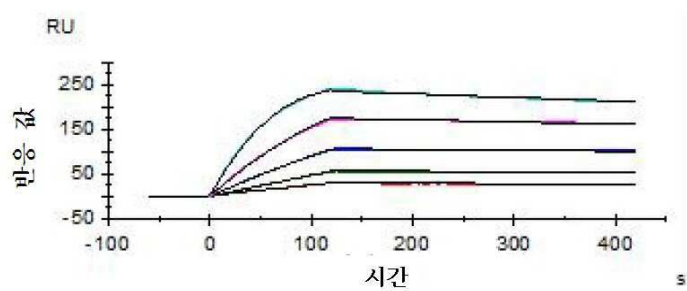
도면4



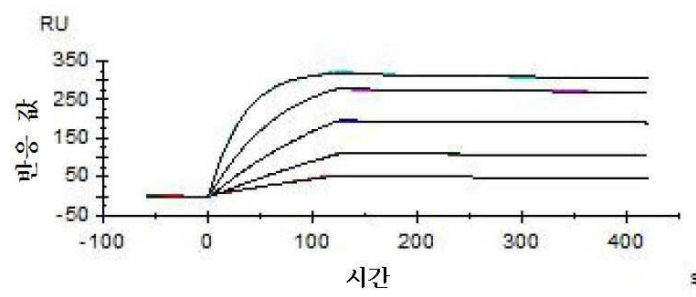
도면5



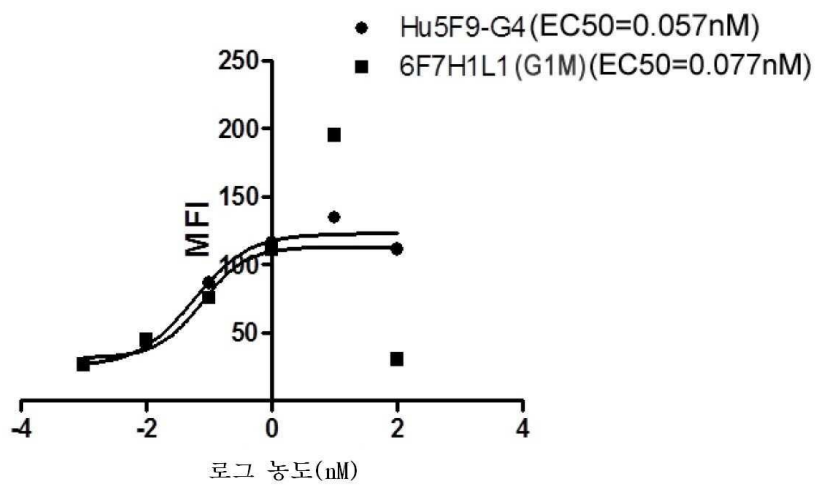
도면6



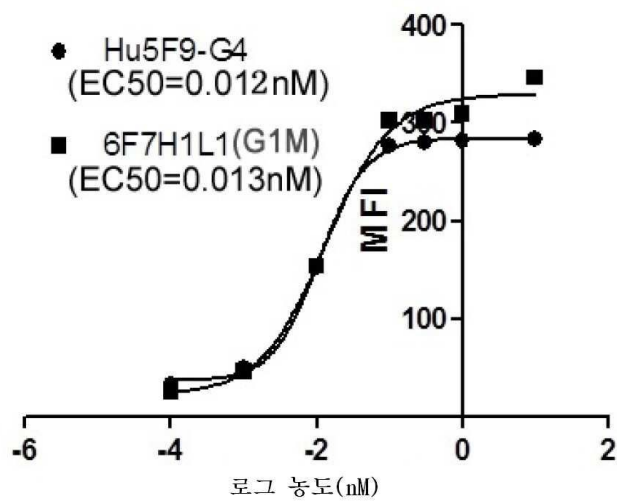
도면7



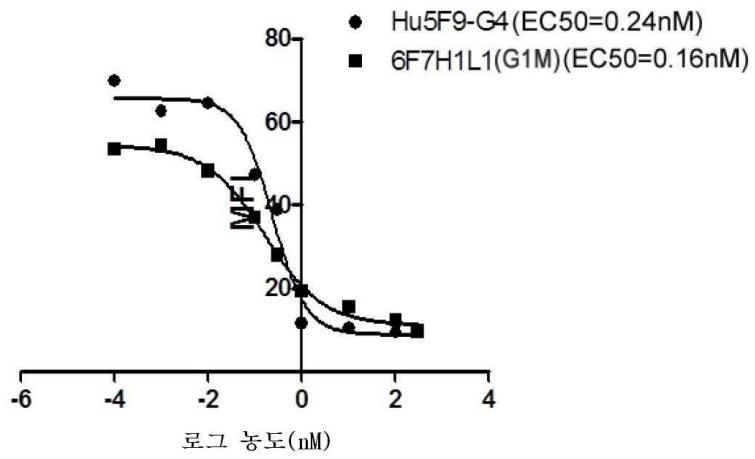
도면8



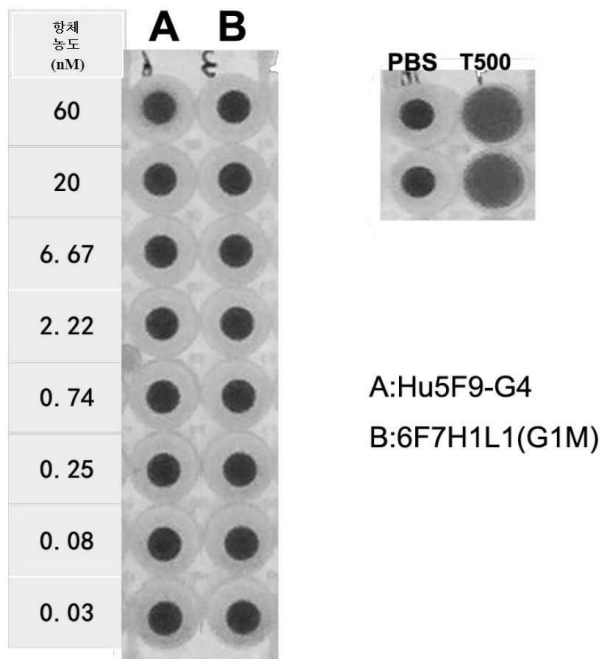
도면9



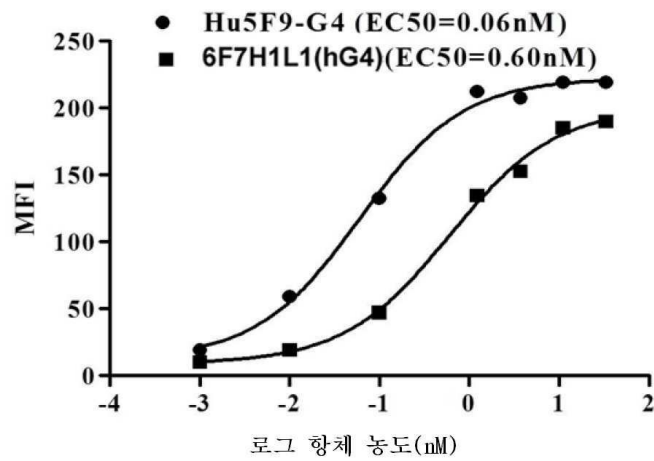
도면10



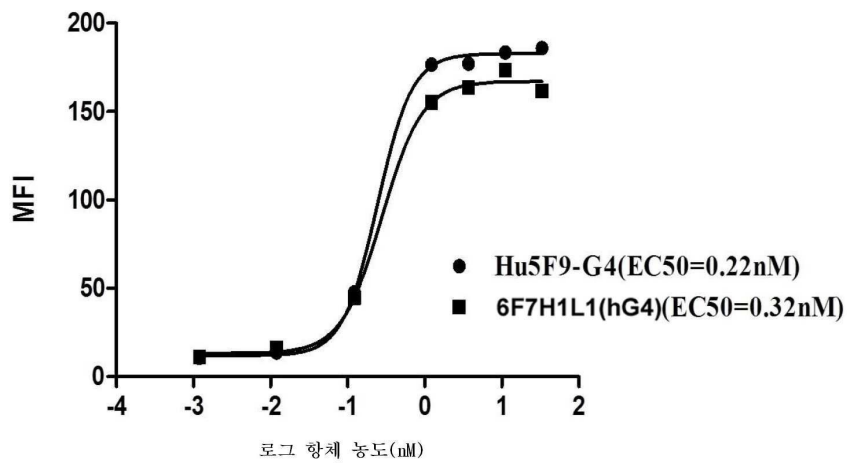
도면11



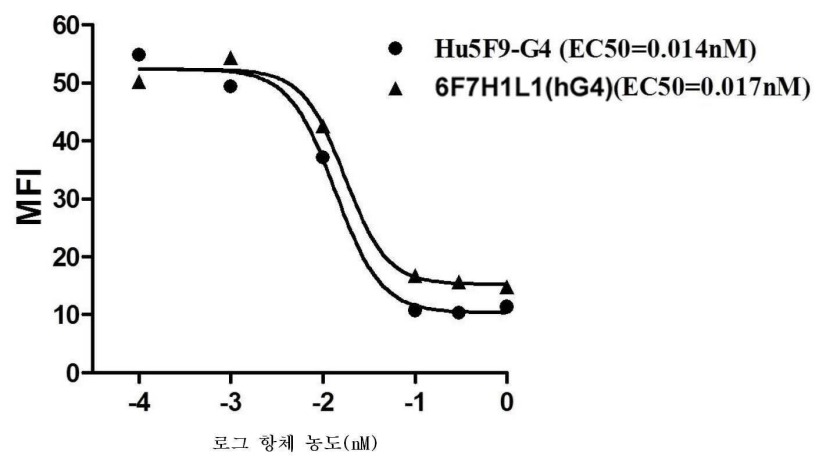
도면12



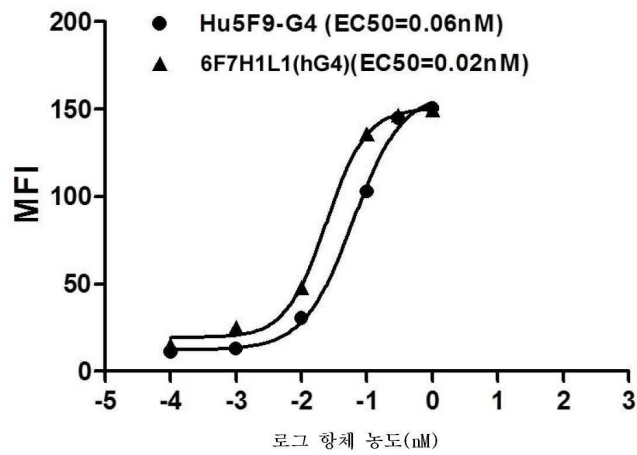
도면13



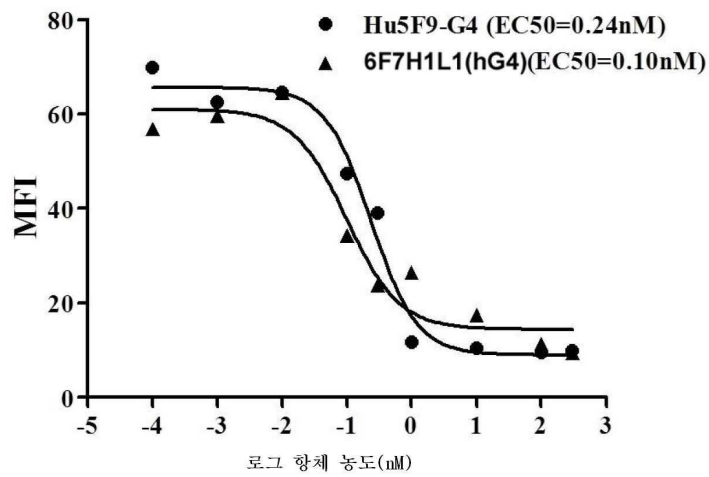
도면14



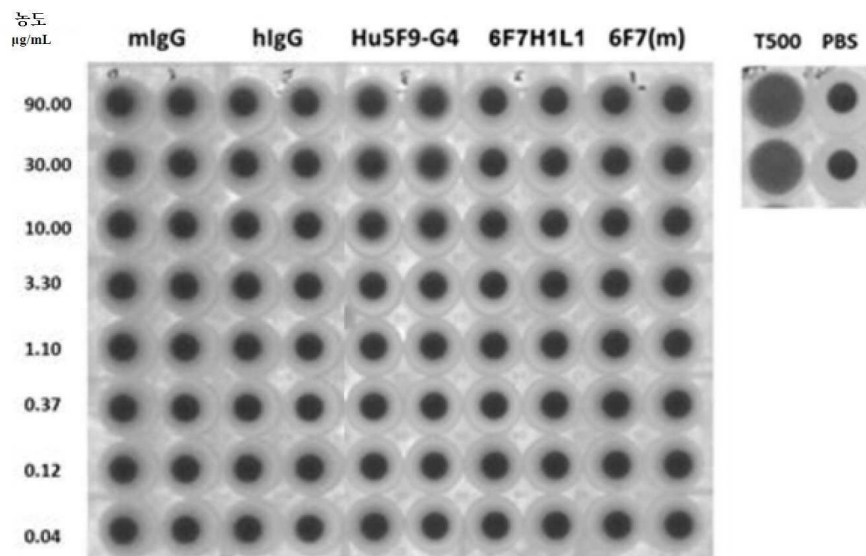
도면15



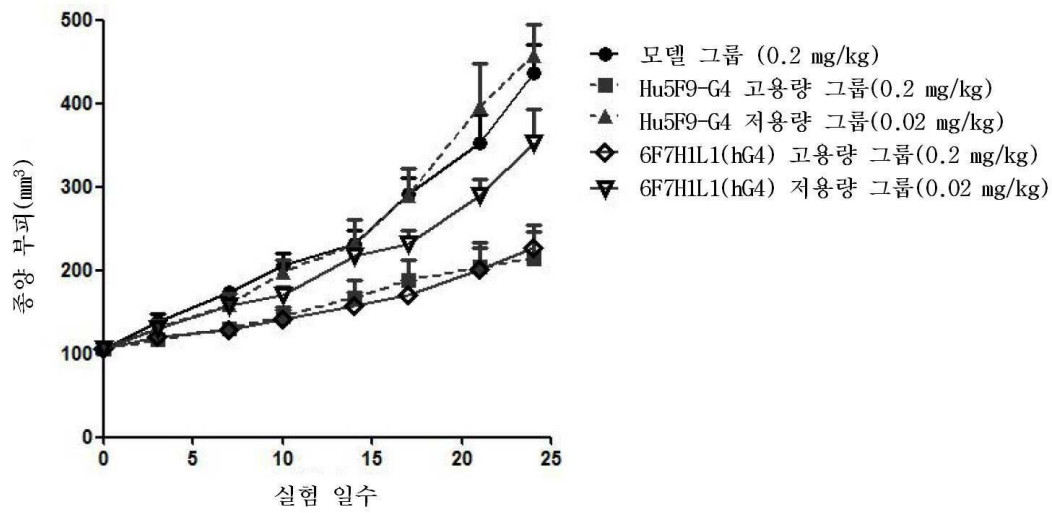
도면16



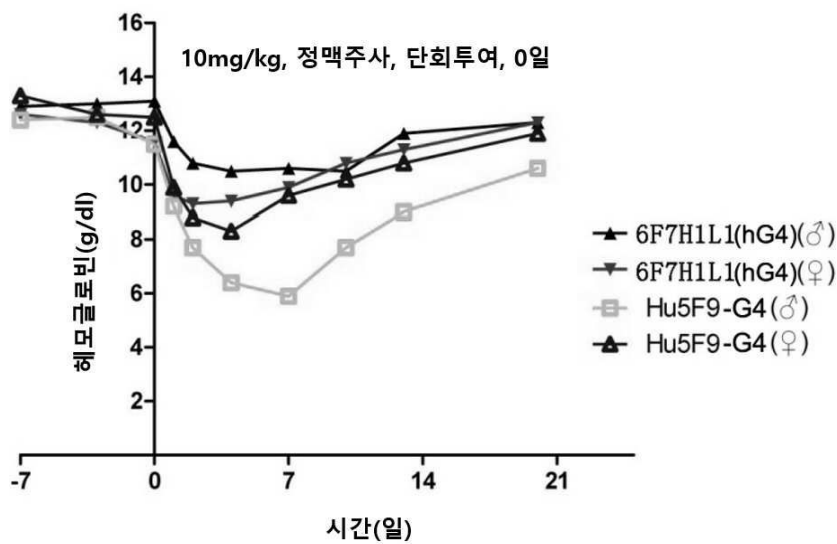
도면17



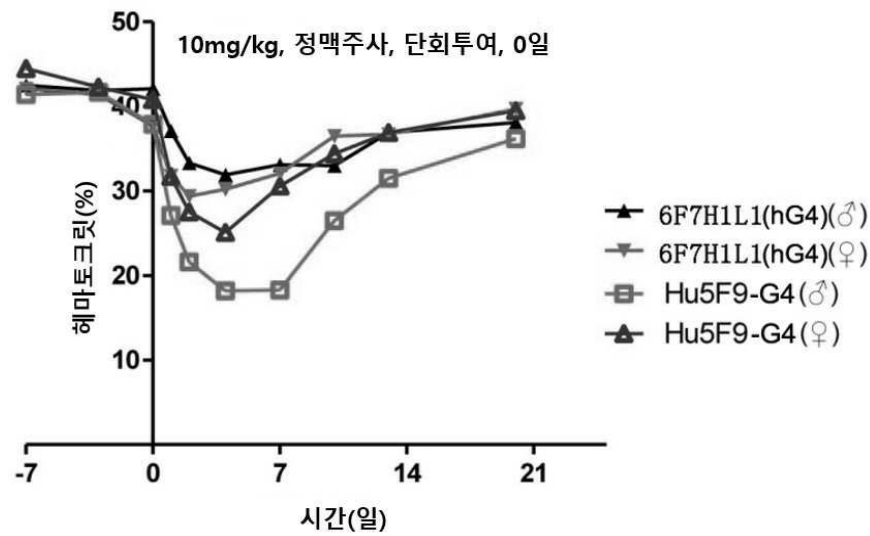
도면18



도면19



도면20



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Akeso Biopharma, Inc

<120> ANTI-CD47 MONOCLONAL ANTIBODY AND USE THEREOF

<130> FP220046

<160> 74

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 1

```
caggtgcagc tgcagcagcc aggagcagag ctggtgaggc caggagcatc cgtgaagctg    60
tcttgtaagg ccagcggcta caccctcaca tcctattgga tgaactgggt gaagcagagg    120
cctggacagg gactggagtg gatcggcatg atcgacccaa gcgattccga gaccacaac    180
```

```
aatcagatgt ttaaggacaa ggccaccctg acagtggata agagctccaa taccgcctac    240
atgcacctgt ctacgctgac atctgaggac agcgccgtgt atcactgcgc ccggctgtac    300
agatggtatt ttgacgtgtg gggagcagga accacagtga ccgtgtcttc t          351
```

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Asn Asn Gln Met Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 3

aacatcgtga tgaccagtc cccaagtct atgagcatgt ccctgggcga gagggtgacc 60

ctgtcctgta aggcctctga gatcgtgggc acatacgtgt cttggtttca gcagaagcca 120

caccagagcc ccaagctgct gatctacggc gcctccaatc ggtatacagg cgtgcctgac 180

agattcaccg gctctggcag cgccacagac ttcacctga caatctctaa cgtgcaggcc 240

gaggacctgg ccgattatca ctgcggccag agctacaatt tcccttatac ctttgccggc 300

ggcacaagc tggagatcaa g 321

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 4

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Ile Val Gly Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 5

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 6

Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr

1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 7

Ala Arg Leu Tyr Arg Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 8

Glu Ile Val Gly Thr Tyr

1 5

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 9

Gly Ala Ser

1

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 10

Gly Gln Ser Tyr Asn Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 11

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 11

caggtgcagc tgggtgcagag cggagcagag gtggtgaagc caggagcctc tgtgaagctg 60

agctgtaagg cctccggcta caccttcaca agctattgga tgaactgggt gcggcagaga 120

ccaggacagg gactggagtg gatcggaatg atcgaccctt ccgattctga gaccacacaat 180

gcccagaagt ttcagggaac gccaccctg acagtggaca agagcacctc cacagcctac 240

atgcacctga gctccctgcg gtccgaggac acagccgtgt actattgcgc caggctgtac 300

cgctggtatt ttgacgtgtg gggagcagga accacagtga ccgtgtctag c 351

<210> 12

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Asn Ala Gln Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95
Ala Arg Leu Tyr Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 13
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Artificial Sequence
<400> 13
aacatcgtga tgacccagtc cccagccaca atgtctatga gcccaggaga gagggtgacc 60
ctgtcctgta gagcctctga gatcgtgggc acatacgtgt cttggtttca gcagaagcca 120

ggacaggcac ctaggctgct gatctacgga gcaagcaaca ggtataccgg agtgccagca 180
cgcttctccg gcctcggcag cggcacagac ttaccctga caatcagctc cgtgcagcct 240
gaggacctgg ccgattatca ctgcggccag tcttacaatt tcccatatac ctttggcggc 300
ggcacaaagc tggagatcaa g 321
<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Artificial Sequence
<400> 14
Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Met Ser Met Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 15

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 15

caggtgcagc tgggtcagag cggagcagag gtggtgaagc caggagcctc tgtgaaggtg 60

agctgtaagg cctccggcta caccttcaca tcctattgga tgaactgggt gcggcagaga 120

ccaggacagg gactggagtg gatcggaatc atcgaccctt ccgattctga gacctctaata 180

gcccagaagt ttcagggccg ggtgaccttg acagtggaca agagcacctc cacagcctac 240

atgcacctga gctccctgag gagcgaggac acagccgtgt actattgcgc caggctgtac 300

cgctggtatt ttgacgtgtg gggagcagga accacagtga ccgtgtctag c 351

<210> 16

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ile Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Ser Asn Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Met His Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

Ala Arg Leu Tyr Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 17

 $\langle 211 \rangle$ 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 17

aacatcgtga tgaccagtc ccagccaca ctgtctctga gccaggaga gagggtgacc 60
ctgtcctgta gagcctctga gatcgtgggc acatacgtgt cttggtttca gcagaagcca 120

ggacaggcac ctaggctgct gatctatggc gccagcaaca gggcaaccgg catccccga 180
cgcttctccg gctctggcag cggcacagac ttaccctga caatcagctc cctgcagcct 240
gaggacctgg ccgattacta ttgcggccag tcttacaatt tcccatatac ctttggcggc 300
ggcacaaagc tggagatcaa g 321

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 18

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ile Val Gly Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 19

cagggtgcagc tgggtgcagag cggagcagag gtggtgaagc caggagcctc tgtgaaggtg 60
agctgtaagg cctccggcta caccttcaca tcctattgga tgaactgggt gcggcaggca 120
ccaggacagg gactggagtg gatcggcatc atcgaccctt ccgattctga gacctcttac 180

gcccagaagt ttcagggcag ggtgacctg acagtggaca agagcacctc cacagcctat 240
atggagctga gtcacctgcg cagcaggac acagccgtgt actattgcgc ccggctgtac 300
agatggtatt ttgacgtgtg gggagcagga accacagtga ccgtgtctag c 351

<210> 20

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 20

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

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

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

85 90 95
Ala Arg Leu Tyr Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 21

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 21

aacatcgtga tgaccagtc cccagccaca ctgtctctga gcccaggaga gagggtgacc 60

ctgtctctga gagcctctga gatcgtgggc acatacctgt cttggtatca gcagaagcca 120

ggacaggcac ctaggctgct gatctacgga gccagcacca gggcaacagg catccccgca 180

cgtttctccg gctctggcag cggcaccgac tttaacctga caatcagctc cctgcagcct 240

gaggattttg ccgtgtacta ttgcggccag tcttacaatt tcccatatac ctttggcggc 300

ggcacaaagc tggagatcaa g 321

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 22

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ile Val Gly Thr Tyr

20 25 30

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

35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

<210> 23

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 23

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

20 25

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 24

Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15
Met

<210> 25

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 25

His Asn Asn Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys

1 5 10 15

Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp

20 25 30

Ser Ala Val Tyr His Cys

35

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 26

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 27

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400>

> 27

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 28

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

1 5 10 15

Tyr

<210> 29

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 29

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

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala

20 25 30

Asp Tyr His Cys

35

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400>

> 30

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 31

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 31

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 32

Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10 15

Met

<210> 33

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 33

His Asn Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 34

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 35

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 35

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser

20 25

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 36

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

1 5 10 15

Tyr

<210> 37

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 37

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

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala

20 25 30

Asp Tyr His Cys

35

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 38

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 39

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 39

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 40

Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10 15

Ile

<210> 41

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 41

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 42

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 43

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 43

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser

20 25

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 44

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

1 5 10 15

Tyr

<210> 45

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 45

Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Leu Ala

20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys

35

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 46

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 47

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 47

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser

20 25

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 48

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10 15

Ile

<210> 49

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 49

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 50

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 50

Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 51

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 51

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser

20

25

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 52

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

1

5

10

15

Tyr

<210> 53

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 53

Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1

5

10

15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala

20

25

30

Val Tyr Tyr Cys

35

<210> 54

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Synthetic Artificial Sequence

<400> 54

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1

5

10

<210> 55

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 56

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

325

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 57

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 58

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

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

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

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

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 59
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Artificial Sequence
 <400> 59
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Asn Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Tyr Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

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

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

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

<210> 60

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 60

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 61

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 61

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

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

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

130	135	140	
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
145	150	155	160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
	180	185	190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
	195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
	210	215	220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val			
225	230	235	240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
	245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu			
	260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys			
	275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys			
305	310	315	320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile			
	325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro			
	340	345	350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu			
	355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn			
	370	375	380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 62
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Artificial Sequence
 <400> 62
 Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ile Val Gly Thr Tyr
 20 25 30

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

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 63

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 63

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

<210> 64

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 64

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

1

5

10

15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ile Val Gly Thr Tyr

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Phe Pro Tyr

85

90

95

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

100

105

110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210
 <210> 65
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Artificial Sequence
 <400> 65

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

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

65 70 75 80
 Met His Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Tyr Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr

100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys

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

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

 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

 325 330 335
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 340 345 350

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 66
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 66

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115

120

125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130

135

140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145

150

155

160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165

170

175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

180

185

190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 67

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 67

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Ile Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Ser Asn Ala Gln Lys Phe

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

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

				85				90				95			
Ala	Arg	Leu	Tyr	Arg	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr
100				105				110							
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
115				120				125							
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
130				135				140							
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145				150				155				160			
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
165				170				175							
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
180				185				190							
Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn
195				200				205							
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro
210				215				220							
Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
225				230				235				240			
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
245				250				255							
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe
260				265				270							
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
275				280				285							
Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
290				295				300							
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
305				310				315				320			
Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
325				330				335							

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 68

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 68

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

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ile Val Gly Thr Tyr

20 25 30

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Phe Pro Tyr

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 69

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 69

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

 Gly Ile Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Leu Tyr Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr			
	100	105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu			
	115	120	125
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys			
	130	135	140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser			
	145	150	155
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
	165	170	175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
	180	185	190
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn			
	195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro			
	210	215	220
Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
	225	230	235
			240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
	245	250	255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe			
	260	265	270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro			
	275	280	285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr			
	290	295	300
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val			
	305	310	315
			320

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 70

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 70

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Ser Tyr Asn Phe Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 71
<211> 232
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Artificial Sequence
<400> 71
Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
20 25 30
Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val
35 40 45
Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
50 55 60

Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp

65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln

85 90 95

Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp

100 105 110

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

115 120 125

Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr

130 135 140

Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu

145 150 155 160

Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr

165 170 175

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

180 185 190

Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr

195 200 205

Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys

210 215 220

Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

225 230

<210> 72

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 72

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

1 5 10 15

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

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

 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Asp Gly Phe Tyr Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

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

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

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

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 340 345 350
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 73

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Artificial Sequence

<400> 73

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

1 5 10 15
 Asp Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Thr Ser Gln Ser Met Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Gly Ser Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 74
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Artificial Sequence
 <400> 74
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
 1 5