



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202229351 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：110138242

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 10 月 14 日

(51)Int. Cl.：

*C07K16/28 (2006.01)**C12N15/13 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/10/14

世界智慧財產權組織

PCT/CN2020/120869

2020/10/20

世界智慧財產權組織

PCT/CN2020/122188

(71)申請人：中國大陸商天境生物科技（上海）有限公司（中國大陸）I-MAB BIOPHARMA CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：王正毅 WANG, ZHENGYI (CN)；曹巍 CAO, WEI (CN)；郭炳詩 GUO, BINGSHI (CN)；徐聰 XU, CONG (CN)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：64 項 圖式數：21 共 146 頁

(54)名稱

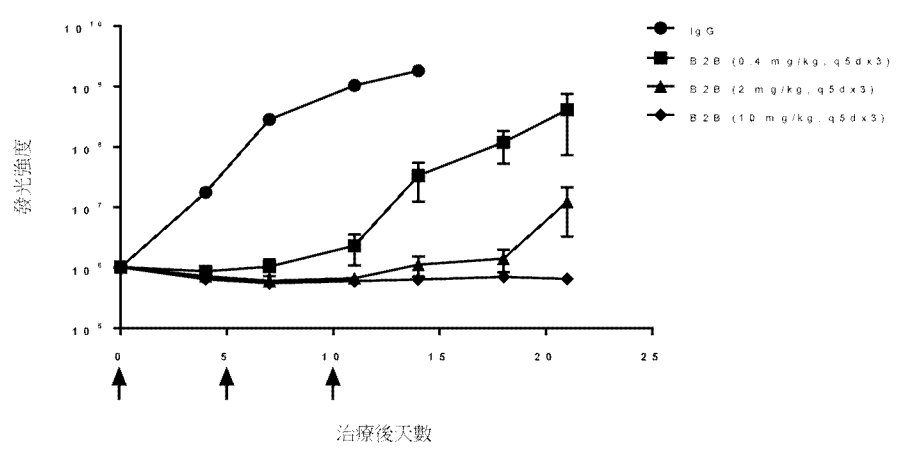
新穎之抗 CD47 抗體及其用途

(57)摘要

本發明提供在人類中具有低免疫原性且造成低程度或不造成紅血球耗乏或血球凝集之 CD47 抗體及其免疫活性片段。且亦提供含有該等抗體或抗體片段之醫藥組合物以及使用該等抗體例如作為單一藥劑或與一或多種其他治療劑之組合進行的治療方法。

Provided herein are CD47 antibodies and immunologically active fragments thereof that have low immunogenicity in humans and cause low or no level of red blood cell depletion or hemagglutination. Also provided are as well as pharmaceutical compositions containing such antibodies or antibody fragments, as well as methods of treatment using such antibodies, e.g., as single agents or in combination with other therapeutic agent(s).

指定代表圖：



【圖11】



【發明摘要】

【中文發明名稱】

新穎之抗CD47抗體及其用途

【英文發明名稱】

NOVEL ANTI-CD47 ANTIBODIES AND USES THEREOF

【中文】

本發明提供在人類中具有低免疫原性且造成低程度或不造成紅血球耗乏或血球凝集之CD47抗體及其免疫活性片段。且亦提供含有該等抗體或抗體片段之醫藥組合物以及使用該等抗體例如作為單一藥劑或與一或多種其他治療劑之組合進行的治療方法。

【英文】

Provided herein are CD47 antibodies and immunologically active fragments thereof that have low immunogenicity in humans and cause low or no level of red blood cell depletion or hemagglutination. Also provided are as well as pharmaceutical compositions containing such antibodies or antibody fragments, as well as methods of treatment using such antibodies, *e.g.*, as single agents or in combination with other therapeutic agent(s).

【指定代表圖】

圖11

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

新穎之抗CD47抗體及其用途

【英文發明名稱】

NOVEL ANTI-CD47 ANTIBODIES AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本申請案係關於抗CD47抗體、產生該等抗體之方法及該等抗體用於治療CD47相關疾病及病症之用途。

【先前技術】

【0002】 CD47 (分化簇47)首次在20世紀80年代經鑑別為人類卵巢癌上之腫瘤抗原。此後，已發現CD47於包括以下之多種人類腫瘤類型上表現：急性骨髓白血病(AML)、慢性骨髓白血病、急性淋巴母細胞白血病(ALL)、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)、多發性骨髓瘤(MM)、膀胱癌及其他實體腫瘤。高含量CD47使癌細胞避免吞噬作用，即使癌細胞具有較高含量之鈣網伴護蛋白-顯性促吞噬信號。

【0003】 CD47亦稱為整合素相關蛋白(IAP)、卵巢癌抗原OA3、Rh相關抗原及MER6，係屬於免疫球蛋白超家族之多跨度跨膜受體。其表現及活性已與多種疾病及病症有關。其為具有單個Ig樣域及五個跨膜區(membrane spanning region)之經廣泛地表現之跨膜醣蛋白，該經廣泛地表現之跨膜醣蛋白充當具有經由信號調節蛋白 α (SIRP α)之NH₂端V樣域介導之結合的SIRP α 的細胞配位體。SIRP α 主要於包括巨噬細胞、顆粒球、骨髓樹突狀細胞(DC)、肥胖細胞及其包括造血幹細胞之前驅體的骨髓細胞上表現。

【0004】 巨噬細胞經由吞噬作用自血流清除病原體及受損或老化細胞。細胞表面CD47與其於巨噬細胞上之受體SIRP α 相互作用，以抑制正常健康細胞之吞噬作用。SIRP α 抑制巨噬細胞對宿主細胞之吞噬作用，其中於巨噬細胞上之SIRP α 與於宿主目標細胞上表現之CD47的接合生成由負調節吞噬作用之SHP-1介導的抑制信號。

【0005】 與CD47抑制正常細胞吞噬作用之作用保持一致，有跡象表明，CD47僅在造血幹細胞(HSC)及先驅細胞遷移期之前及期間在該等細胞上經短暫性上調，且此等細胞上之CD47含量決定該等細胞經活體內吞沒之機率。

【0006】 CD47亦在包括骨髓白血病之多種癌症上經組成性上調。CD47在骨髓白血病株上之過度表現藉由使骨髓白血病株逃避吞噬作用來增加其病原性。已得出結論，CD47上調為在發炎介導之移動期間向正常HSC提供保護之重要機制，且白血病先驅細胞納用此能力以便逃避巨噬細胞殺滅。

【0007】 已顯示某些CD47抗體恢復吞噬作用且防止動脈粥樣硬化。參見例如Kojima等人, *Nature*, 第36卷, 86-90 (2016年8月4日)。本發明提供在人類中具有低免疫原性且造成低程度或不造成紅血球耗乏之新穎之CD47抗體或其免疫活性片段。如熟習此項技術者所熟知，該等抗體可互換地稱為「抗CD47抗體」。

【發明內容】

【0008】 本文提供特異性結合至人類CD47 (hCD47)之抗體或其免疫活性片段，其包含：(a)重鏈可變(V_H)域，該V_H域包含(1)在其N端處之麩胺酸殘基(E)；(2)包含RAWMN (SEQ ID NO: 5)之CDR-H1；(3)包含

RIKRKTDGETTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 6)之CDR-H2；(4)包含SNRAFDI (SEQ ID NO: 7)之CDR-H3；及(5)在其C端處之絲胺酸(S)；及(b)輕鏈可變(V_L)域，該V_L域包含(1)包含KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 8)之CDR-L1；(2)包含QASTRAS (SEQ ID NO: 9)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 10)之CDR-L3。

【0009】 在一些實施例中，V_H域之N端胺基酸對應於根據Kabat編號系統之位置H1，且V_H域之C端胺基酸對應於根據Kabat編號系統之位置H113。在一些實施例中，V_H域之N端胺基酸對應於根據Chothia編號系統之位置H1，且V_H域之C端胺基酸對應於根據Chothia編號系統之位置H113。在一些實施例中，V_H域之N端胺基酸對應於根據IMGT編號系統之位置H1，且V_H域之C端胺基酸對應於根據IMGT編號系統之位置H128。在一些實施例中，V_H域之N端胺基酸對應於SEQ ID NO: 1之胺基酸1，且V_H域之C端胺基酸對應於SEQ ID NO: 1之胺基酸118。在一些實施例中，V_H包含與SEQ ID NO: 1具有至少95%一致性之胺基酸序列，且V_L包含與SEQ ID NO: 2具有至少95%一致性之胺基酸序列。在一些實施例中，V_H包含SEQ ID NO: 1且V_L包含SEQ ID NO: 2。

【0010】 在一些實施例中，抗CD47抗體或其免疫活性片段包含Fc域。在一些實施例中，Fc域為人類IgG Fc域。在一些實施例中，人類IgG Fc域為IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc域。在一些實施例中，抗CD47抗體為全長抗體。在一些實施例中，全長抗CD47抗體包含有包含SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 55之重鏈及包含SEQ ID NO: 4之輕鏈。在一些實施例中，抗CD47抗體之免疫活性片段為Fab、Fab'、F(ab)'₂、Fab'-SH、單鏈Fv (scFv)、Fv片段或線性抗體。在一些實施例中，抗CD47抗體或其免疫

活性片段為單株抗體或其片段。在一些實施例中，抗CD47抗體或其免疫活性片段為嵌合或人類化的。

【0011】 在一些實施例中，抗CD47抗體或其免疫活性片段結合至於癌細胞表面上表現之hCD47。在一些實施例中，癌細胞為SK-OV-3細胞、Toledo細胞、K562細胞、HCC827細胞、Jurkat細胞、U937細胞、TF-1細胞、Raji細胞、SU-DHL-4細胞、MDA-MB-231細胞、A375細胞或SK-MES-1細胞。在一些實施例中，癌細胞為實體腫瘤癌。在一些實施例中，實體腫瘤癌為肺癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胰臟癌、肉瘤癌、頭頸癌、胃癌、腎癌或皮膚癌。在一些實施例中，癌細胞為血液癌。在一些實施例中，血液癌為非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)。

【0012】 在一些實施例中，抗CD47抗體或其免疫活性片段不結合至於血球表面上表現之hCD47。在一些實施例中，血球為紅血球。在一些實施例中，抗CD47抗體或其免疫活性片段與hCD47之結合阻止hCD47與信號調節蛋白 α (SIRP α)之相互作用。在一些實施例中，SIRP α 為人類SIRP α (hSIRP α)。在一些實施例中，抗CD47抗體或其免疫活性片段與於癌細胞表面上表現之hCD47之結合促進癌細胞之巨噬細胞介導之吞噬作用。在一些實施例中，癌細胞為SK-OV-3細胞、Toledo細胞、K562細胞、HCC827細胞、Jurkat細胞、U937細胞、TF-1細胞、Raji細胞、SU-DHL-4細胞、MDA-MB-231細胞、A375細胞或SK-MES-1細胞。在一些實施例中，癌細胞為實體腫瘤癌。在一些實施例中，實體腫瘤癌為肺癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胰臟癌、肉瘤癌、頭頸癌、胃癌、腎癌或皮膚癌。在一些實施例中，癌細胞為血液癌。在一些實施例中，血液癌為非霍奇金淋巴瘤。在一些實施例中，向個體(subject)投與抗CD47抗體或其免疫活

性片段不會造成顯著程度之個體之血球凝集或個體之紅血球耗乏。

【0013】 本文提供編碼本文所描述之抗CD47抗體或其免疫活性片段之核酸。亦提供包含該等核酸之載體。另外，提供包含本文所描述之核酸及/或載體之宿主細胞。在一些實施例中，宿主細胞為哺乳動物細胞。在一些實施例中，哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。在一些實施例中，CHO細胞為CHO-K1細胞。在一相關態樣中，提供產生抗CD47抗體或其免疫活性片段之方法，其包含：a)在有效引起抗CD47抗體或其抗原結合片段表現之條件下培養本文所描述之宿主細胞；及b)回收由宿主細胞表現之抗CD47抗體或其免疫活性片段。

【0014】 提供包含抗CD47抗體或其免疫活性片段及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

【0015】 提供治療個體之癌症之方法，其包含向個體投與有效量之抗CD47抗體，其中抗CD47抗體包含：(a)重鏈可變域(V_H)，該 V_H 包含(1)包含RAWMN (SEQ ID NO: 5)之CDR-H1；(2)包含RIKRKTDGETTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 6)之CDR-H2；及(3)包含SNRAFDI (SEQ ID NO: 7)之CDR-H3；(b)輕鏈可變(V_L)域，該 V_L 域包含(1)包含KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 8)之CDR-L1；(2)包含QASTRAS (SEQ ID NO: 9)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 10)之CDR-L3。

【0016】 在一些實施例中，癌症為實體腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤為肺腫瘤、卵巢腫瘤、結腸直腸腫瘤、胰臟腫瘤、肉瘤腫瘤、頭頸腫瘤、胃腫瘤、腎腫瘤或皮膚腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤為復發性及/或難治性實體腫瘤。

【0017】 在一些實施例中，癌症為非霍奇金淋巴瘤(NHL)，且該方法進一步包含向個體投與有效量之利妥昔單抗(rituximab)。在一些實施例中，NHL為濾泡性淋巴瘤(FL)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)或套細胞淋巴瘤(MCL)。在一些實施例中，NHL為復發性/難治性NHL。在一些實施例中，個體已經歷至少一種針對NHL之先前治療。在一些實施例中，個體已經歷2種與10種之間的針對NHL之先前療法。在一些實施例中，個體已經歷用CD20靶向劑進行之針對NHL之先前治療。在一些實施例中，個體在用CD20靶向劑進行之先前療法期間或之後惡化。

【0018】 在本文所提供之治療方法中之任一種之一些實施例中，抗CD47抗體包含人類IgG4恆定區或其包含S233P突變之變異體(其中編號係根據EU索引)。在一些實施例中，將抗CD47抗體以10 mg/kg之劑量投與個體。在一些實施例中，將抗CD47抗體以20 mg/kg之劑量投與個體。在一些實施例中，將抗CD47抗體以30 mg/kg之劑量投與個體。在一些實施例中，將抗CD47抗體每週一次(qw)投與個體。在一些實施例中，其中將抗CD47抗體經由靜脈內(IV)輸注投與個體。在治療NHL之方法之一些實施例中，以375 mg/m²之劑量一週一次(qw)投與利妥昔單抗持續前五週，且在前五週之後以375 mg/m²之劑量每4週一次(q4w)投與利妥昔單抗。

【0019】 在本文所描述之治療方法之一些實施例中，由於用抗CD47抗體進行之治療，因此個體未經歷顯著血液毒性。在一些實施例中，由於用抗CD47抗體進行之治療，因此個體未經歷任何血液毒性。在一些實施例中，血液毒性包含貧血、血球減少症及/或血球凝集。在一些實施例中，抗CD47抗體之V_H包含SEQ ID NO: 1，且抗CD47抗體之V_L包含SEQ ID NO: 2。在一些實施例中，抗CD47抗體之重鏈包含SEQ ID NO:

3或SEQ ID NO: 55，且抗CD47抗體之輕鏈包含SEQ ID NO: 4。

【0020】亦提供用於治療癌症之套組，其包含本文所描述之抗CD47抗體或醫藥組合物。在一些實施例中，套組係根據本文所提供之治療方法使用。

【0021】應理解，本文所描述之各種實施例之一種、一些或所有特性可合併以形成本發明之其他實施例。本發明之此等及其他態樣將對熟習此項技術者變得顯而易見。本發明之此等及其他實施例係藉由下文之實施方式進一步描述。

【圖式簡單說明】

【0022】圖1顯示結合至單體CD47-ECD (胞外域)之抗CD47抗體B2B、5F9及2A1之劑量依賴性反應。

【0023】圖2顯示阻斷CD47與SIRP α 之結合之抗CD47抗體B2B、5F9及2A1的劑量依賴性反應。

【0024】圖3顯示結合至CD47⁺ Raji細胞之抗CD47抗體B2B、5F9及2A1之劑量依賴性反應。

【0025】圖4顯示如藉由表面電漿子共振(BiaCore)分析所量測之CD47抗體之腫瘤細胞結合。

【0026】圖5顯示抗CD47抗體B2B與於Raji細胞上表現之CD47之結合促進人類巨噬細胞吞噬Raji細胞。

【0027】圖6顯示抗CD47抗體B2B與於各種人類腫瘤細胞株上表現之CD47之結合促進人類巨噬細胞吞噬腫瘤細胞。

【0028】圖7顯示CD47抗體與急性骨髓白血病(AML)細胞之結合。

【0029】圖8顯示CD47抗體對急性骨髓白血病(AML)細胞之吞噬。

【0030】 圖9A及圖9B顯示抗CD47抗體B2B引起最少之與紅血球(RBC)之結合且不造成RBC凝集。特定言之，圖9A顯示最少之抗CD47抗體B2B與RBC之結合，且圖9B顯示抗CD47抗體B2B不使RBC凝集。

【0031】 圖10A-10B顯示抗CD47抗體B2B在投與後未誘發食蟹獼猴之顯著血液變化。圖10A繪示單次劑量B2B治療與5F9治療相比對RBC及血紅蛋白之含量顯示最少影響。圖10B繪示用不同劑量之B2B進行之重複治療與媒劑對照相比未顯著地影響雄性及雌性食蟹獼猴之RBC。

【0032】 圖11顯示在小鼠中螢光素酶-Raji異種移植模型中用CD47抗體B2B進行之治療之活體內功效。

【0033】 圖12A顯示在投與抗CD47抗體B2B之後各別地血紅蛋白計數之時程。圖12B顯示在投與抗CD47抗體B2B之後各別地網狀紅血球計數之時程。

【0034】 圖13A及圖13B顯示在單次劑量及多次劑量之後抗CD47抗體B2B Q1W之血清藥物動力學(PK)。特定言之，圖13A顯示在單次劑量之後抗CD47抗體B2B Q1W之血清PK，且圖13B顯示在多次劑量之後抗CD47抗體B2B Q1W之血清PK。

【0035】 圖14顯示在每週投與各種濃度之CD47抗體B2B之後周邊T細胞上之CD47受體佔有率(RO)。

【0036】 圖15顯示抗CD47抗體B2B及C3C之胺基酸序列。

【0037】 圖16A顯示在第10天由Acti-pro培養基產生之B2B抗體及C3C抗體之力價。圖16B顯示由Acti-pro培養基產生之B2B抗體及C3C抗體之最終力價。

【0038】 圖17提供實例21中所描述之I期研究之研究設計。

【0039】 圖18A顯示參與**實例21**中所描述之I期研究之所有20名患者之血紅蛋白及網狀紅血球含量的時程。圖18B顯示在**實例21**中所描述之I期研究中接受最高劑量之抗CD47抗體(30 mg/kg)之患者之血紅蛋白及網狀紅血球含量的時程。

【0040】 圖19A顯示在單次劑量之後患者之抗CD47抗體冷佐巴單抗(lemzoparlimab)之血清藥物動力學。圖19B顯示在多次劑量之後患者之抗CD47抗體冷佐巴單抗qw之血清藥物動力學。

【0041】 圖20顯示每週接受20或30 mg/kg抗體投與之患者之抗CD47抗體冷佐巴單抗在周邊T細胞上之CD47受體佔有率%。

【0042】 圖21顯示接受用抗CD47抗體進行之治療之來自**實例21**之黑色素瘤患者之反應性肝轉移。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0043】 本申請案主張2020年10月14日申請之國際申請案第PCT/CN2020/120869號及2020年10月20日申請之國際申請案第PCT/CN2020/122188號之優先權，該等案之內容以全文引用之方式併入本文中。

定義

【0044】 在詳細描述實施例之前，應理解本發明不限於特定組合物或生物系統，當然，該等組合物或生物系統可變化。亦應理解，本文所用術語僅出於描述特定實施例之目的，而非意欲為限制性的。

【0045】 除非上下文另外明確指示，否則如本說明書及所附申請專利範圍中所使用之單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個提及

物。因此，舉例而言，提及「分子」視情況包括兩個或更多個該等分子之組合及其類似者。

[(0046)] 如本文所使用之術語「約」係指此技術領域中之技術人員易於知曉之各別值之常見誤差範圍。本文提及「約」一值或參數包括(且描述)關於該值或參數本身之實施例。

[(0047)] 應理解，本發明之態樣及實施例包括「包含」態樣及實施例、「由態樣及實施例組成」及「基本上由態樣及實施例組成」。

[(0048)] 術語「CD47」(其亦稱為整合素相關蛋白(IAP)、抗原表面決定子蛋白OAS、OAS、CD47/抗原、Rh相關抗原、整合素相關信號轉導子、單株抗體1D8鑑別之抗原、CD47/醣蛋白)較佳指人類CD47且尤其指包含胺基酸序列

```

MWPTVAATLJL GSACCGSAQL LFNKTKSVDF LFCNDITVVT CPVFNMKALN LTFVYVKWKH
KGRDLYTLDG ALNKSTVPID PSSAKDKVSQ LKGDASLKM DKSDAVSHTE NYTCEVTDLE
RKGCTLLEK YRVVSWPSPN ENLDVDDPI FALIDWGQF GKTKYRSG GMDKTDALJL
VAGIVLVIV LVGALDVPD KYSIKNATGI GLVTSSTGI LLDJYYVST ALGIESVIA
LIVTQVLAFL LAVVGISLCT AACLPMDGPI LLSGLSTLAL AQLIGLVYMK PVASNQRTIQ
PIPKAVDQPI NADKSKGMM NDK (SEQ ID NO: 14)

```

或該胺基酸序列變異體之蛋白質。術語「CD47」亦指任何經轉譯後修飾之變異體及構形變異體。

[(0049)] 如本文所使用之術語「抗體」係以最廣泛意義使用且尤其覆蓋完整抗體(例如全長抗體)、抗體片段(包括但不限於Fab、F(ab')₂、Fab' SH、Fv、雙功能抗體、scFv、scFv-Fc、單域抗體、單重鏈抗體及單輕鏈抗體)、單株抗體及多株抗體，只要其展現所需生物活性(例如抗原決定基結合)即可。「抗體」(或「Ab」)及「免疫球蛋白」(或「Ig」)為具有相同結構特徵之醣蛋白。儘管抗體對特定抗原展現結合特異性，但免疫球蛋白包括抗體及缺乏抗原特異性之其他抗體樣分子兩者。後一種多肽例如由淋巴系統以低含量產生且由骨髓瘤以經增加含量產生。

【0050】 如本文所使用之術語「經分離」抗體可指實質上不含其他細胞物質之抗體。在一個實施例中，經分離抗體實質上不含來自相同物種之其他蛋白質。在另一實施例中，經分離抗體由來自不同物種之細胞表現且實質上不含來自不同物種之其他蛋白質。在一些實施例中，「經分離」抗體為已經鑑別且自其天然環境之組分分離及/或回收之抗體。其天然環境之污染物組分為將干擾抗體之診斷或治療用途之物質，且可包括酶、激素及其他蛋白質或非蛋白質溶質。可使用在此項技術中熟知之蛋白質純化技術，藉由分離，使抗體實質上不含天然相關組分(或與用於產生抗體之細胞表現系統相關之組分)。在一些實施例中，將抗體純化：(1)如藉由洛瑞方法(Lowry method)所測定，達至抗體之大於75重量%且最佳超過80重量%、90重量%、95重量%或99重量%；或(2)藉由SDS-PAGE，在還原或非還原條件下，使用考馬斯藍(Coomassie blue)或較佳地銀染色達至均質。經分離抗體包括重組細胞內之原位抗體，此係因為抗體之天然環境之至少一種組分將不存在。然而，通常，經分離抗體將藉由至少一個純化步驟來製備。

【0051】 如本文所使用之術語「抗原決定基」意謂與抗體互補位結合之抗原上之任何抗原決定子。抗原決定基決定子通常由諸如胺基酸或糖側鏈之分子之化學活性表面基團組成，且通常具有特定三維結構特徵以及荷質比特徵。

【0052】 如本文所使用之術語「天然抗體及免疫球蛋白」通常為由兩個相同輕(L)鏈及兩個相同重(H)鏈構成之約150,000道爾頓之異四聚體醣蛋白。各輕鏈藉由一個共價雙硫鍵(亦稱為「VH/VL對」)連接至重鏈，而不同免疫球蛋白同型之重鏈之間的雙硫鍵數目不同。各重鏈及輕鏈亦具

有有規律地間隔之鏈內雙硫橋鍵。各重鏈在一端具有一個可變域(VH)、接著為多個恆定域。各輕鏈在一端具有可變域(VL)且在其另一端具有恆定域；輕鏈之恆定域與重鏈之第一恆定域對準，且輕鏈可變域與重鏈之可變域對準。咸信特定胺基酸殘基在輕鏈可變域與重鏈可變域之間形成介面。參見例如Chothia等人, *J. Mol. Biol.*, 186:651 (1985年)；Novotny及Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:4592 (1985年)。

【0053】如本文所使用之術語「可變」係指如下事實：在抗體當中，可變域之某些部分之序列廣泛地不同，且該等部分用於各特定抗體對於其特定抗原之結合及特異性中。然而，可變性並非均勻分佈於抗體之整個可變域中。其集中於三個區段中，該等區段稱為輕鏈可變域及重鏈可變域兩者中之互補決定區(CDR)或高變區。可變域之更高度保守部分稱為構架(FR)。天然重鏈及輕鏈之可變域各自包含由三個CDR連接之四個FR區，該等FR區很大程度上採用 β 摺疊組態，該等CDR形成連接 β 摺疊結構之環且在一些情況下形成 β 摺疊結構之一部分。各鏈中之CDR係藉由FR區極為貼近地固持在一起，且與來自另一鏈之CDR一起促進抗體之抗原結合位點形成。參見例如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991年)。恆定域不直接參與抗體與抗原之結合，但展現各種效應功能，諸如使抗體參與抗體依賴性細胞毒性。所關注之可變區序列包括本文別處詳細描述之CD47抗體之人類化可變區序列。

【0054】術語「高變區(HVR)」或「互補決定區(CDR)」可指特徵在於經增強之序列可變性及/或限定環之形成的VH域及VL域之子區。此等子區包括VH域中之三個CDR (H1、H2及H3)及VL域中之三個CDR

(L1、L2及L3)。咸信H3在賦予良好結合特異性方面至關重要，且L3及H3顯示最高程度之多樣性。參見Johnson及Wu, *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo編, Human Press, Totowa, N.J., 2003年)。

【0055】多個CDR/HVR描繪係已知的。Kabat互補決定區(CDR)係基於序列可變性且為最常用的(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*,第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991年))。替代地，Chothia係指結構環之位置(Chothia及Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987年))。AbM HVR表示Kabat HVR與Chothia結構環之間的折衷，且由Oxford Molecular之AbM抗體模型化軟體使用。「contact」HVR係基於可用複合晶體結構之分析。來自此等HVR/CDR中之各者之殘基如下指出。「構架」或「FR」殘基為除HVR/CDR殘基外之彼等可變域殘基。

環	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat				編號)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia				編號)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58

H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101

【0056】 「經擴展」HVR亦為已知的：VL中之24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2)及89-97或89-96 (L3)以及VH中之26-35 (H1)、50-65或49-65 (H2)及93-102、94-102或95-102 (H3) (Kabat編號)。

【0057】 「根據Kabat之編號」可指上文Kabat等人之用於抗體彙集之重鏈可變域或輕鏈可變域的編號系統。實際線性胺基酸序列可對應於可變域之FR或HVR之縮短或嵌入而含有較少胺基酸或額外胺基酸。對於既定抗體，可藉由在抗體序列之同源區處與「標準」Kabat編號序列比對來確定殘基之Kabat編號。通常，當提及可變域中之殘基(大致為輕鏈之殘基1-107及重鏈之殘基1-113)時使用Kabat編號，而當提及重鏈恆定區中之殘基時一般使用EU編號系統或索引(例如，如同Kabat之EU索引，根據EU之編號IgG1)。

【0058】 如本文所使用之「單株」抗體係指獲自實質上同質，例如實質上相同但允許少量背景突變及/或修飾之抗體群體的抗體。「單株」表示抗體之實質上同質特徵，且不需要藉由任何特定方法產生抗體。在一些實施例中，單株抗體係藉由其HVR、VH及/或VL序列及/或結合特性來選擇，例如選自一組殖株(例如，重組型、融合瘤或噬菌體衍生型)。單株抗體可經工程改造以包括一或多個突變，例如以影響抗體之結合親和力或其他特性、產生人類化或嵌合抗體、改進抗體生產及/或同質性、工程改造多特異性抗體，其所得抗體仍視為本質上單株的。單株抗體群體可區別於多株抗體，此係因為該群體之個別單株抗體辨識相同抗原位點。多種用於產生單株抗體之技術為已知的；參見例如融合瘤方法(例如Kohler及Milstein, Nature, 256:495-97 (1975年)；Hongo等人, Hybridoma, 14 (3):

253-260 (1995年)；Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988年)；Hammerling等人, *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981年))；重組DNA方法(參見例如美國專利第4,816,567號)；噬菌體展示技術(參見例如Clackson等人, *Nature*, 352: 624-628 (1991年)；Marks等人, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992年)；Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004年)；Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004年)；Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004年)；及Lee等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004年)；以及用於在具有部分或所有編碼人類免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白基因座或基因之動物中產生人類或人類樣抗體之技術(參見例如WO 1998/24893；WO 1996/34096；WO 1996/33735；WO 1991/10741；Jakobovits等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993年)；Jakobovits等人, *Nature* 362: 255-258 (1993年)；Bruggemann等人, *Year in Immunol.* 7:33 (1993年)；美國專利第5,545,807號；第5,545,806號；第5,569,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；及第5,661,016號；Marks等人, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992年)；Lonberg等人, *Nature* 368: 856-859 (1994年)；Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994年)；Fishwild等人, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996年)；Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996年)；以及Lonberg及Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995年))。

【0059】「嵌合」抗體可指具有來自特定同型、類別或生物體之重鏈及/或輕鏈之一個部分及來自另一同型、類別或生物體之另一部分的抗

體。在一些實施例中，可變區將來自一個來源或生物體，且恆定區將來自另一來源或生物體。

【0060】「人類化抗體」可指主要具有人類序列及最少量非人類(例如，小鼠或雞)序列之抗體。在一些實施例中，人類化抗體具有來自衍生自接枝至人類接受者抗體構架(FR)上之非人類(例如，小鼠或雞)生物體之抗體的一或多個HVR序列(帶有所關注之結合特異性)。在一些實施例中，將非人類殘基進一步接枝至人類構架(不存在於來源或接受者抗體中)上，例如以改進抗體特性。一般而言，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變域中之實質上所有可變域，其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環且所有或實質上所有FR為人類免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)，通常人類免疫球蛋白恆定區之至少一部分。參見Jones等人, *Nature* 321:522-525 (1986年)；Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988年)；及Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992年)。

【0061】「人類」抗體可指具有一胺基酸序列之抗體，該胺基酸序列對應於由人類產生及/或使用用於製造如本文所揭示之人類抗體之技術中之任一種製造之抗體的胺基酸序列。人類抗體可使用此項技術中已知之各種技術產生，該等技術包括噬菌體展示庫，Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991年)；Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991年)；人類單株抗體之製備，如Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77頁 (1985年)；Boerner等人, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991年)中所描述；及藉由向經修飾以回應於抗原攻擊而產生該等抗體、但其內源性基因座已失能之基因轉殖動物投與抗

原，該動物例如為經免疫接種之異種小鼠(參見例如關於XENOMOUSE™技術之美國專利第6,075,181號及第6,150,584號)或具有一或多種人類免疫球蛋白序列之雞(參見例如WO2012162422、WO2011019844及WO2013059159)。

【0062】 存在五種主要類別之免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等免疫球蛋白中之若干可進一步分成例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2之子類(同型)。對應於不同類別之免疫球蛋白之重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同類別之免疫球蛋白之次單元結構及三維組態為眾所周知的。

【0063】 如本文所使用之術語「抗體片段」及其所有文法變異體經定義為包含完整抗體之抗原結合位點或可變區之完整抗體的一部分，在某些情況下該部分不含完整抗體之Fc區之恆定重鏈域(亦即CH2、CH3及CH4，此係視抗體同型而定)。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂及Fv片段；雙功能抗體；作為具有由一個具有連續胺基酸殘基之不間斷序列組成之一級結構之多肽的任何抗體片段(在本文中稱為「單鏈抗體片段」或「單鏈多肽」)，包括但不限於(1)單鏈Fv (scFv)分子；(2)僅含有一個輕鏈可變域之單鏈多肽或其含有該輕鏈可變域之三個CDR之片段，無締合重鏈部分；及(3)僅含有一個重鏈可變區之單鏈多肽或其含有該重鏈可變區之三個CDR之片段，無締合輕鏈部分；及由抗體片段形成之多特異性或多價結構。在包含一或多個重鏈之抗體片段中，該(等)重鏈可含有存在於完整抗體之非Fc區中之任何恆定域序列(例如IgG同型中之CH1)，且/或可含有存在於完整抗體中之任何鉸鏈區序列，且/或可含有與該(等)重鏈之鉸鏈區序列或恆定域序列融合或位於其中之白胺酸拉

鏈序列。

【0064】 抗體之木瓜酶消化產生兩個相同抗原結合片段，該等片段稱為「Fab」片段，各片段具有單一抗原結合位點；以及殘餘「Fc」片段，該等片段之名稱反映其容易結晶之能力。胃蛋白酶治療產生具有兩個抗原組合位點且仍能夠使抗原交聯之F(ab')₂片段。「Fv」為含有完整抗原辨識位點及結合位點之最小抗體片段。在雙鏈Fv物種中，此區由緊密、非共價締合之一個重鏈可變域與一個輕鏈可變域之二聚體組成。在單鏈Fv物種(scFv)中，一個重鏈可變域與一個輕鏈可變域可藉由可撓性肽連接子共價連接，以使得輕鏈與重鏈可於類似於雙鏈Fv物種中之結構的「二聚體」結構中締合。在此組態中，各可變域之三個CDR相互作用以界定VH-VL二聚體表面上之抗原結合位點。六個CDR共同地賦予抗體以抗原結合特異性。然而，即使單一可變域(或僅包含三個抗原特異性CDR之Fv之一半)能夠辨識且結合抗原，但親和力比整個結合位點低。參見例如Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, 第113卷, Rosenberg及Moore編, Springer-Verlag, New York, 第269-315頁(1994)。

【0065】 Fab片段亦含有輕鏈之恆定域及重鏈之第一恆定域(CH₁)。Fab'片段與Fab片段之不同之處在於在包括一或多個來自抗體鉸鏈區之半胱胺酸之重鏈CH₁域之羧基端處添加幾個殘基。Fab'-SH為本文中之Fab'標識，其中恆定域之一或多個半胱胺酸殘基攜帶游離硫醇基。F(ab')₂抗體片段最初以在其間具有鉸鏈半胱胺酸之Fab'片段對形式產生。抗體片段之其他化學偶合亦為已知的。

【0066】 如本文所使用之術語「醫藥學上可接受之載劑或賦形劑」係指適用於製備一般安全、無毒且既不在生物學上亦不在其他方面不合需

要之醫藥組合物或調配物的載劑或賦形劑。所用載劑或賦形劑通常為適用於向人類個體或其他哺乳動物投與之載劑或賦形劑。在製造組合物時，活性成分通常與載劑或賦形劑混合、經其稀釋或經其封閉。當載劑或賦形劑充當稀釋劑時，其可為固體、半固體或液體材料，充當抗體之活性成分之媒劑、載劑或介質。

【0067】 如本文所使用之術語「單株抗體」(mAb)係指獲自實質上均質抗體群體之抗體，亦即構成該群體之個別抗體除了可少量存在之可能性天然存在之突變以外為相同的。單株抗體為高度特異性的，係針對單一抗原位點。各mAb係針對抗原上之單一決定子。除了單株抗體之特異性之外，其有利之處亦在於其可藉由融合瘤培養來合成，未經其他免疫球蛋白污染。修飾語「單株」指示獲自實質上均質抗體群體之抗體特徵，且不應解釋為需要藉由任何特定方法產生抗體。舉例而言，根據本發明使用之單株抗體可在永生化B細胞或其融合瘤中製造，或可藉由重組DNA方法製造。

【0068】 本文中之單株抗體包括藉由以下產生之雜交及重組抗體：剪接具有恆定域(例如「人類化」抗體)、或輕鏈及重鏈、或來自一個物種之鏈及來自另一物種之鏈、或與異源蛋白之融合體的CD47抗體之可變(包括高變)域，不管來源種類或免疫球蛋白類別或子類名稱如何；以及抗體片段(例如Fab、F(ab')₂及Fv)，只要其展現所需生物活性即可。

【0069】 本文中之單株抗體特定地包括嵌合抗體(免疫球蛋白)，其中重鏈及/或輕鏈之一部分與衍生自特定物種或屬於特定抗體類別或子類之抗體中的對應序列一致或同源，而該(等)鏈之剩餘部分與衍生自另一物種或屬於另一抗體類別或子類之抗體以及該等抗體之片段中的對應序列一

致或同源，只要該等片段展現所需生物活性即可。

【0070】如本文所使用之術語「加抗原決定基標籤」係指與「抗原決定基標籤」融合之CD47抗體。抗原決定基標籤多肽具有足夠殘基以提供可製造針對其之抗體之抗原決定基，但足夠短以使得其不干擾CD47抗體之活性。抗原決定基標籤較佳足夠獨特以使得對抗原決定基具有特異性之抗體實質上不與其他抗原決定基交叉反應。合適的標籤多肽一般具有至少6個胺基酸殘基且通常具有約8-50個之間的胺基酸殘基(較佳約9-30個之間的殘基)。實例包括c-myc標籤及針對其之8F9、3C7、6E10、G4、B7及9E10抗體(參見例如Evan等人, *Mol. Cell. Biol.*, 5(12):3610-3616 (1985年))；及單純疱疹病毒醣蛋白D (gD)標籤及其抗體(參見例如Paborsky等人, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990年))。

【0071】如本文所使用之術語「標記」係指直接或間接結合至抗體之可偵測化合物或組合物。標記自身可由自身偵測(例如放射性同位素標記或螢光標記)，或在酶標記之情況下，可催化可偵測受質化合物或組合物之化學改變。

【0072】如本文所使用之術語「治療」係指經設計以改變所治療之個人(individual)或細胞在臨床病變過程期間之天然過程的臨床介入。所需治療效果包括降低疾病惡化速率、改善或緩和疾病狀態及緩解或改善預後。舉例而言，若一或多種癌症相關症狀得到減輕或消除，包括但不限於減少癌細胞增殖(或破壞癌細胞)、減少由疾病引起之症狀、提高罹患疾病者之生活品質、減少治療疾病所需之其他藥物之劑量及/或延長個人之存活期，則個人經成功「治療」。

【0073】如本文所使用之「延緩疾病惡化」意謂延遲、阻礙、減

緩、阻滯、穩定及/或延後疾病(諸如癌症)之發展。此延緩可具有不同時長，此係視所治療之疾病及/或個人之病史而定。如熟習此項技術者顯而易見，充分或顯著延緩可實際上涵蓋預防，使得個人不罹患疾病。舉例而言，可延緩諸如癌轉移發展之晚期癌症。

【0074】 例示性癌症包括但不限於卵巢癌、結腸癌、乳癌、肺癌、頭頸癌、膀胱癌、結腸直腸癌、胰臟癌、非霍奇金氏淋巴瘤、急性淋巴球性白血病、慢性淋巴球性白血病、急性骨髓白血病、慢性骨髓性白血病、多發性骨髓瘤、黑色素瘤、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、神經膠質瘤、神經膠質母細胞瘤、骨髓瘤、單核球性白血病、B細胞衍生之白血病、T細胞衍生之白血病、B細胞衍生之淋巴瘤、T細胞衍生之淋巴瘤及實體腫瘤。纖維變性疾病可為例如心肌梗塞、絞痛症、骨關節炎、肺纖維化、氣喘、囊腫纖維化、支氣管炎或氣喘。

【0075】 如本文所使用之術語「預防(*prevent/preventing/prevention*)」意在包括延緩及/或阻止病況、病症或疾病及/或其伴隨症狀之發作；防止個體罹患病況、病症或疾病；或降低個體罹患病況、病症或疾病之風險的方法。

【0076】 出於治療目的之如本文所使用之術語「個體」係指經分類為以下之任何動物：包括人類、家畜及農場動物之哺乳動物以及諸如狗、馬、貓、母牛等之動物園動物、運動動物或寵物動物。哺乳動物較佳為人類。

【0077】 包括專利申請案及公開案之本文所引用之所有參考文獻均特此以全文引用之方式併入。

概述

【0078】 本文提供阻止人類CD47 (hCD47)與SIRP α (例如人類SIRP α 或「hSIRP α 」)相互作用之新穎之抗CD47抗體。在一些實施例中，抗CD47抗體促進表現CD47之細胞(例如表現hCD47之細胞，諸如癌細胞)之巨噬細胞介導之吞噬作用。治療性抗CD47抗體研發中之挑戰中之一者已為正中目標、偏離組織毒性。紅血球亦表現CD47以防止其被免疫系統破壞，且CD47療法已遇到劑量限制性血液毒性。

【0079】 本文所描述之抗CD47抗體係自許多其他已知抗CD47抗體高度分化，此係因為本文所描述之抗CD47抗體結合CD47上之獨特抗原決定基，該抗原決定基藉由於紅血球上之醣化而經屏蔽，從而引起與於例如腫瘤細胞之表面上表現之CD47之結合增加。有利地，本文提供之抗CD47抗體在投與個體(例如人類或非人類靈長類動物)之後不會造成(例如不會造成顯著或明顯程度)血球凝集或紅血球耗乏。

【0080】 此外，申請人出乎意料地發現，相比於在相同條件下培養但表現編碼高度類似抗CD47抗體之核酸的宿主細胞，更高抗體力價獲自表現編碼本文所描述之CD47抗體之核酸的宿主細胞。特定言之，本文提供之抗CD47抗體包含在其N端處包含麩胺酸(E)且在其C端處包含絲胺酸(S)之V_H域。該等抗體可由哺乳動物宿主細胞(例如CHO細胞，諸如CHO-K1細胞)以比包含V_H域之抗CD47抗體更高之產量產生，該V_H域包含相同CDR，但在其N端處具有除麩胺酸(E)以外之胺基酸且在其C端處包含除絲胺酸(S)以外之胺基酸。

抗CD47抗體

【0081】 抗CD47抗體(或其免疫活性片段)為以足夠親和力及特異性結合至CD47 (例如人類CD47或「hCD47」)之抗體。如本文所使用之抗體

之「免疫活性片段」係指該抗體之抗原結合片段。術語「免疫活性片段」及「抗原結合片段」在本文中可互換使用。舉例而言，本文提供之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)可用作靶向及干擾與反常/異常CD47表現及/或活性相關之疾病或病況的治療劑。在一些實施例中，抗CD47抗體為嵌合(諸如人類化)單株抗體。在一些實施例中，抗CD47抗體包含本文在下文所描述之重鏈可變域(V_H)及/或輕鏈可變域(V_L)。

【0082】 在一些實施例中，抗CD47抗體(或其免疫活性片段)包含：

(a) V_H域，該V_H域包含(1)在其N端處之麩胺酸殘基(E)；(2)包含RAWMN (SEQ ID NO: 5)之CDR-H1；(3)包含RIKRKTDGETTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 6)之CDR-H2；(4)包含SNRAFDI (SEQ ID NO: 7)之CDR-H3；及(5)在其C端處之絲胺酸(S)；及(b) V_L域，該V_L域包含(1)包含KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 8)之CDR-L1；(2)包含QASTRAS (SEQ ID NO: 9)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 10)之CDR-L3。在一些實施例中，CDR序列係根據Kabat加以定義(參見例如Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991年))。在一些實施例中，抗CD47抗體(或其免疫活性片段)包含：

(a) V_H域，該V_H域包含(1)在其N端處之麩胺酸殘基(E)；(2)包含GLTFERA (SEQ ID NO: 21)之CDR-H1；(3)包含KRKTDGET (SEQ ID NO: 22)之CDR-H2；(4)包含SNRAFDI (SEQ ID NO: 7)之CDR-H3；及(5)在其C端處之絲胺酸(S)；及(b) V_L域，該V_L域包含(1)包含KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 24)之CDR-L1；(2)包含QASTRAS (SEQ ID NO: 25)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPLA (SEQ

ID NO: 26)之CDR-L3。在一些實施例中，CDR序列係根據Chothia編碼制加以定義(參見例如Chothia及Lesk (1986年) EMBO J. 5(4):823-6及Al-Lazikani等人, (1997年) JMB 273: 927-948)。在一些實施例中，抗CD47抗體(或其免疫活性片段)包含：(a) VH域，該VH域包含(1)在其N端處之麩胺酸殘基(E)；(2)包含GLTFERAW (SEQ ID NO: 27)之CDR-H1；(3)包含IKRKTDGETT (SEQ ID NO: 28)之CDR-H2；(4)包含AGSNRAFDI (SEQ ID NO: 29)之CDR-H3；及(5)在其C端處之絲胺酸(S)；及(b) VL域，該VL域包含(1)包含QSVLYAGNNRNY (SEQ ID NO:30)之CDR-L1；(2)包含QA (SEQ ID NO: 31)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 32)之CDR-L3。在一些實施例中，CDR序列係根據IMGT編碼制加以定義(參見例如Lefranc MP. (2013) IMGT Unique Numbering. : Dubitzky W., Wolkenhauer O., Cho KH., Yokota H. (編) Encyclopedia of Systems Biology. Springer, New York, NY ; https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_127)。在一些實施例中，抗CD47抗體(或其免疫活性片段)包含：(a) VH域，該VH域包含(1)在其N端處之麩胺酸殘基(E)；(2)包含GLTFERAWMN (SEQ ID NO: 33)之CDR-H1；(3)包含RIKRKTDGETTD (SEQ ID NO: 34)之CDR-H2；(4)包含SNRAFDI (SEQ ID NO: 35)之CDR-H3；及(5)在其C端處之絲胺酸(S)；及(b) VL域，該VL域包含(1)包含KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 36)之CDR-L1；(2)包含QASTRAS (SEQ ID NO: 37)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 38)之CDR-L3。在一些實施例中，CDR序列係根據AbM編碼制加以定義(參見例如Abhinandan R.K., Martin A.C. Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering

of antibody variable domains. Mol. Immunol. 2008;45:3832-3839. doi: 10.1016/j.molimm.2008.05.022)。在一些實施例中，抗CD47抗體(或其免疫活性片段)包含：(a) VH域，該VH域包含(1)在其N端處之麩胺酸殘基(E)；(2)包含ERAWMN (SEQ ID NO: 39)之CDR-H1；(3)包含WVGRIKRKTDGETTD (SEQ ID NO: 40)之CDR-H2；(4)包含AGSNRAFD (SEQ ID NO: 41)之CDR-H3；及(5)在其C端處之絲胺酸(S)；及(b) VL域，該VL域包含(1)包含LYAGNNRNYLAWY (SEQ ID NO: 42)之CDR-L1；(2)包含LLINQASTRA (SEQ ID NO: 43)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPL (SEQ ID NO: 44)之CDR-L3。在一些實施例中，CDR序列係根據Contact編碼制加以定義(參見例如McCallum等人 (1996年) J Mol Biol. 262(5):732-45；doi: 10.1006/jmbi.1996.0548)。

【0083】 為了易於參考，SEQ ID NO: 5-10之胺基酸序列及SEQ ID NO: 21-44提供於下表A中。

表A

RAWMN (SEQ ID NO: 5)	RIKRKTDGETTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 6)	SNRAFDI (SEQ ID NO: 7)
KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 8)	QASTRAS (SEQ ID NO: 9)	QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 10)
GLTFERA (SEQ ID NO: 21)	KRKTDGET (SEQ ID NO: 22)	SNRAFDI (SEQ ID NO: 23)
KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 24)	QASTRAS (SEQ ID NO: 25)	QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 26)
GLTFERAW (SEQ ID NO: 27)	IKRKTDGETT (SEQ ID NO: 28)	AGSNRAFDI (SEQ ID NO: 29)
QSVLYAGNNRNY (SEQ ID NO: 30)	QA (SEQ ID NO: 31)	QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 32)
GLTFERAWMN (SEQ ID NO: 33)	RIKRKTDGETTD (SEQ ID NO: 34)	SNRAFDI (SEQ ID NO: 35)
KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 36)	QASTRAS (SEQ ID NO: 37)	QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 38)
ERAWMN (SEQ ID NO: 39)	WVGRIKRKTDGETTD (SEQ ID NO: 40)	AGSNRAFD (SEQ ID NO: 41)
LYAGNNRNYLAWY (SEQ ID NO: 42)	LLINQASTRA (SEQ ID NO: 43)	QQYYTPPL (SEQ ID NO: 44)

包含SEQ ID NO: 1之VH域之3個CDR，其限制條件為VH域之N端胺基酸為E且VH域之C端胺基酸為S。另外或可替代地，在一些實施例中，抗CD47抗體(或其免疫活性片段)包含有包含SEQ ID NO: 2之VL域之3個CDR。在一些實施例中，VH域之3個CDR為根據Kabat、Chothia、AbM或Contact編碼制之CDR。另外或可替代地，在一些實施例中，VL域之3個CDR為根據Kabat、Chothia、AbM或Contact編碼制之CDR。在一些實施例中，抗CD47抗體之VH域包含與SEQ ID NO: 1中所闡述之胺基酸序列具有至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之胺基酸序列，其限制條件為VH域之N端胺基酸為E且VH域之C端胺基酸為S。另外地或可替代地，在一些實施例中，抗CD47抗體之VL域包含與SEQ ID NO: 2中所闡述之胺基酸序列具有至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%一致性之胺基酸序列。在一些實施例中，抗CD47抗體包含：包含SEQ ID NO: 1之VH及包含SEQ ID NO: 2之VL。在一些實施例中，抗CD47抗體為包含有包含胺基酸SEQ ID NO: 3之重鏈及包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列之輕鏈的全長抗體。在一些實施例中，抗CD47抗體為包含有包含胺基酸SEQ ID NO: 55之重鏈及包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列之輕鏈的全長抗體。

KVQIWKSGGG IWKPGGSTIRI SCAASGILFFK RAWMNWVRQA PKGELFWVGR IKRKTDGDTI
 DYAAVVKGRF SIIRDDSKNF IYIQMNSIKY IDYAVVYCAG SNRAIDFWGQ GIMVTVSSAS
 TKGPSTVITIA PCSRSISIKST AALGCIWKDY IDYAVVSWN SGALITSGVIT IPAVQSSGI
 YSISSVVTVP SSSIETKITY CNVIDIKPSNI KVIDKRVISKY GIPCPICPAI IDTGGIPSVIT
 IDYKIKIDIM IIRKIKVTCV VVDVSQIDDI VQINWYVDGV IVIDNAKIKIR IDQINSTYRV
 VSVITVITIQD WJNGKIKYCK VSNKGIDSSI EKITSKAKGQ IDYDQVYITD PSQIDMTKNQ
 VSIITCIWKGF YPSIDIAVWIK SNGQIDNNYK ITIDPVITDSIG SITTYSRITV DKSRWQKGNV
 FSCSVMIKAI IDNYTQKSTIS ISIGK (SEQ ID NO: 3)

KVQIWKSGGG IWKPGGSTIRI SCAASGILFFK RAWMNWVRQA PKGELFWVGR IKRKTDGDTI
 DYAAVVKGRF SIIRDDSKNF IYIQMNSIKY IDYAVVYCAG SNRAIDFWGQ GIMVTVSSAS
 TKGPSTVITIA PCSRSISIKST AALGCIWKDY IDYAVVSWN SGALITSGVIT IPAVQSSGI
 YSISSVVTVP SSSIETKITY CNVIDIKPSNI KVIDKRVISKY GIPCPICPAI IDTGGIPSVIT
 IDYKIKIDIM IIRKIKVTCV VVDVSQIDDI VQINWYVDGV IVIDNAKIKIR IDQINSTYRV
 VSVITVITIQD WJNGKIKYCK VSNKGIDSSI EKITSKAKGQ IDYDQVYITD PSQIDMTKNQ
 VSIITCIWKGF YPSIDIAVWIK SNGQIDNNYK ITIDPVITDSIG SITTYSRITV DKSRWQKGNV
 FSCSVMIKAI IDNYTQKSTIS ISIG (SEQ ID NO: 55)

DIVMTQSIIDS IAVSIGIRAT INCKSSQSVI YAGNNIRNYIA WYQQKIPGQIP KITLINQASTR
 ASGVINDRSG SGSGIDDTIT ISSIQADIVA IYYCQQYYIT IDYAGGGTKI IDKRIVAAIS
 VIDYIPSDIQ IKSGIASVVC IDNDYIPDA KVQWKVDNAI QSGNSQMSVI IQDSDKISTYS
 ISSITITSKA DYDKIKVYAC IVIDQGLSSP VIKSINRDKC (SEQ ID NO: 4)

[(0087)] 在一些實施例中，抗CD47抗體(或其免疫活性片段)結合至來自至少兩個不同物種之CD47 (例如與其交叉反應)。在一些實施例中，舉例而言，抗CD47抗體(或抗體變異體)結合至hCD47蛋白(或其胞外域)及來自非人類靈長類動物(諸如食蟹獼猴或恆河猴)之CD47 (或其胞外域)。在一些實施例中，抗CD47抗體可對人類CD47具有完全特異性且可能不展現物種交叉反應性或其他類型之非人類交叉反應性。

[(0088)] 特異性結合至hCD47之抗CD47抗體可屬於如上文所定義之各種類型之抗體中之任一者，但在某些實施例中，其為人類、人類化或嵌合抗體。在一些實施例中，抗CD47抗體為人類抗體。在一些實施例中，抗CD47為人類化抗體或包含人類抗體恆定域(例如人類Fc域，諸如人類IgG Fc域，例如人類IgG1、人類IgG2、人類IgG3或人類IgG4 Fc域)。在一些實施例中，本發明抗體為嵌合抗體。參見例如美國專利第4,816,567號及Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984年)。在一些實施例中，嵌合抗體包含非人類可變區(例如衍生自

雞、小鼠、大鼠、倉鼠、兔或諸如猴之非人類靈長類動物之可變區)及人類恆定區。在一些實施例中，嵌合抗體為「類別轉換的」抗體，其中類別或子類已自親本抗體之類別或子類變化。嵌合抗體包括其抗原結合片段。

【0089】 在一些實施例中，嵌合抗體為人類化抗體。非人類抗體可經人類化以降低對人類之免疫原性，同時保持親本非人類抗體之特異性及親和力。一般而言，人類化抗體包含一或多個可變域，其中例如CDR之HVR (或其部分)衍生自非人類抗體(例如，雞抗體)且FR (或其部分)衍生自人類抗體序列。人類化抗體視情況亦將包含人類恆定區之至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體中之一些FR殘基經來自非人類抗體(例如，衍生HVR或CDR殘基之抗體)之對應殘基取代，例如以恢復或提高抗體特異性或親和力。人類化抗體及其製造方法綜述於例如Almagro及Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008年)中。

【0090】 適用於人類化之人類構架區包括但不限於：使用「最佳擬合」方法選擇之構架區；衍生自具有輕鏈或重鏈可變區之特定子組之人類抗體之共同序列的構架區；人類體細胞突變構架區或人類生殖系構架區；及衍生自篩檢FR庫之構架區。參見例如Sims等人 *J. Immunol.* 151:2296 (1993年)；Carter等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992年)；Presta等人 *J. Immunol.*, 151:2623 (1993年)；Almagro及Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008年)；及Baca等人, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997年)。

【0091】 在一些實施例中，本發明之抗CD47抗體為人類抗體。可使用此項技術中已知之各種技術產生人類抗體。在一些實施例中，人類抗體係由諸如經基因工程改造之雞(參見例如美國專利第8,592,644號及第

9,380,769號)及/或本文所描述之小鼠的非人類動物產生。人類抗體一般描述於Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008年)中。

【0092】 在一些實施例中，本發明之抗CD47抗體為包括但不限於Fab、F(ab')₂、Fab'-SH、Fv或scFv片段之抗體片段或單域、單重鏈或單輕鏈抗體。抗體片段可例如藉由酶消化或藉由重組技術生成。在一些實施例中，完整抗體之蛋白分解消化係用於生成抗體片段，例如如Morimoto等人, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992年)及Brennan等人, *Science*, 229:81 (1985年)中所描述。在一些實施例中，抗體片段係由重組宿主細胞產生。舉例而言，Fab、Fv及ScFv抗體片段由大腸桿菌表現且自大腸桿菌分泌。可替代地，抗體片段可自抗體噬菌體庫分離。

【0093】 Fab'-SH片段可直接自大腸桿菌回收且以化學方式偶合以形成F(ab')₂片段。參見Carter等人, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992年)。F(ab')₂片段亦可直接自重組宿主細胞培養物分離。包含救助受體結合抗原決定基殘基之具有經延長之活體內半衰期之Fab及F(ab')₂片段描述於美國專利第5,869,046號中。

【0094】 在一些實施例中，抗體為單鏈Fv片段(scFv)。參見WO 93/16185以及美國專利第5,571,894號及第5,587,458號。scFv融合蛋白可經構築以在scFv之胺基端或羧基端處產生效應蛋白之融合物。舉例而言，抗體片段亦可為「線性抗體」，例如如美國專利第5,641,870號中所描述。該等線性抗體可為單特異性或雙特異性的。

【0095】 在一些實施例中，抗CD47抗體(或其免疫活性片段)特異性辨識(諸如結合至)於細胞表面上表現之hCD47。在一些實施例中，抗

CD47抗體特異性辨識於癌細胞表面上表現之hCD47。在一些實施例中，抗CD47抗體特異性辨識於癌細胞株之細胞表面上表現之hCD47，該癌細胞株包括但不限於例如SK-OV-3、Toledo、K562、HCC827、Jurkat、U937、TF-1、Raji、SU-DHL-4、MDA-MB-231、A375及SK-MES-1細胞株。在一些實施例中，抗CD47抗體特異性辨識於個體之癌細胞(例如肺癌細胞、卵巢癌細胞、結腸直腸癌細胞、胰臟癌細胞、肉瘤癌細胞、頭頸癌細胞、胃癌細胞、腎癌細胞、皮膚癌細胞及非霍奇金淋巴瘤細胞)之細胞表面上表現之hCD47。在一些實施例中，本文所描述之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)與hCD47 (例如於細胞表面上表現之hCD47)之結合阻止hCD47與信號調節蛋白 α (SIRP α)，諸如人類SIRP α (「hSIRP α 」)相互作用。在一些實施例中，本文所描述之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)與於癌細胞表面上表現之hCD47之結合促進癌細胞之巨噬細胞介導之吞噬作用。在一些實施例中，抗CD47抗體或其免疫活性片段不結合至於血球表面上表現之hCD47。在一些實施例中，向個體(例如人類或非人類靈長類動物)投與本文所描述之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)不會誘發或造成顯著之個體之血液毒性(例如貧血、血球減少症或血球凝集)或顯著之個體之紅血球耗乏。在一些實施例中，向個體(例如人類或非人類靈長類動物)投與本文所描述之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)不會誘發或造成個體之血液毒性(例如貧血、血球減少症或血球凝集)或個體之紅血球耗乏。

編碼抗CD47抗體之核酸

【0096】 亦考慮編碼本文所描述之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)之核酸分子。在一些實施例中，提供編碼抗CD47抗體之核酸(或核酸組)，該抗CD47抗體包括本文所描述之抗CD47抗體中之任一者。在一些

實施例中，一或多個編碼抗CD47/抗體(或其免疫活性片段)之核酸序列(諸如一或多個DNA序列)已例如出於增加製造過程期間之抗CD47/抗體之生產產量之目的經最佳化(諸如進一步最佳化)以使由一或多種核酸轉錄之RNA的轉譯及穩定性最大化。例示性最佳化包括但不限於例如移除重複序列、移除殺手模體及剪接位點、減少GC含量(鳥嘌呤+胞嘧啶含量)、移除/置換可形成mRNA二級結構或不穩定模體之序列及/或最佳化給定宿主細胞(例如CHO細胞，諸如CHO-K1細胞)中之密碼子使用。密碼子最佳化為用於藉由適應宿主生物體之密碼子偏倚及tRNA頻率來改善基因表現且提高所關注核酸之轉譯效率的方法。在一些實施例中，一或多種編碼本文所描述之抗CD47/抗體之核酸已經密碼子最佳化，例如經密碼子最佳化以在CHO細胞(諸如CHO-K1細胞)中表現。

[(0097)] 在一些實施例中，編碼本文提供之抗CD47/抗體之V_H域之核酸包含與SEQ ID NO: 45具有至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之多核苷酸，其限制條件為由該核酸編碼之V_H域之胺基酸序列包含N端胺基E及C端S。在一些實施例中，編碼本文提供之抗CD47/抗體之V_L域之核酸包含與SEQ ID NO: 46具有至少約95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之多核苷酸。SEQ ID NO: 45及46提供於下文：

```
GAGGTGCAAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGACTCGTGAAGCCTGGAGGAAGCCTGAGGCTGTCCCTGTG
CCGCTTCCGGCCCTCACCCTTCGAGCGGGCTTGGATGAACCTGGGTGAGGCAAGCCCCCTGGAAAGGGCCCT
GGAAATGGGTGGGCGGGATCAAGAGGAAACAGATGGCGAGACCACCGATTAAGCGCGCTCCCGTGAAG
GGCCGGTATTAGCAATCTCCAGGGACGACTCCAAAGAACACCCCTGTATTCTGCAGATGAACAGCCCTGAAGA
CCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTGGCAGCAACAGGGCCCTTTGATATTCTGGGGCCAGGGCAC
CATGGTGAAGTGTCCCTCC (SEQ ID NO: 45)
```

```
GACATCGTGAATGACCCAGTCCCCTGATTTCCCTGGCCGTGAGCCCTGGGCGAAAGGGCTACCAATCAACT
GCAAGTCCCTCCAGAGCGTGCCTGTACGCGGGCAACAAACGGAACTATTCTGGCTTGGTACCAGCAGAA
GCCCGGCCAGCCCTCCCAAGCTGCTGATCAACCAAGGCTAGCAACAGGGCTTCCGGCGTGGCTGATAGG
TTTACGGGCTCCGGCTCCGGCACCGAGTTTACCCCTGATCAATCTCCCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGG
CCAATCTACTACTGCCAGCACTACTACACCCCTCCTCTGGCCCTTGGCGGGCCACCAAGCTGGAGAT
CAAG (SEQ ID NO: 46)
```

【0098】 在一些實施例中，編碼本文所描述之抗CD47抗體之核酸(或核酸組)可進一步包含編碼肽標籤(諸如蛋白質純化標籤，例如His標籤、HA標籤)之核酸序列。在一些實施例中，編碼抗CD47抗體(或其免疫活性片段)之核酸(或核酸組)包含前導序列。在一些實施例中，提供包含在至少中等嚴格雜交條件下與編碼本文所描述之抗CD47抗體之核酸序列雜交之核苷酸序列的核酸。

【0099】 亦提供其中插入本文所描述之核酸之載體。

【0100】 簡單概括言之，由編碼抗CD47抗體(或其抗原結合片段)之天然或合成核酸進行之抗CD47抗體(或其抗原結合片段)表現可藉由將核酸插入適當表現載體中來達成，以使得核酸可操作地連接至包括例如啟動子(例如組成性、可調節、組織特異性啟動子)及3'非轉譯區(UTR)的5'及3'調節元件。載體可適合於真核宿主細胞中複製及整合。典型選殖及表現載體含有適用於調節所需核酸序列表現之轉錄及轉譯終止子、起始序列及啟動子。

【0101】 核酸可經選殖至許多類型之載體中。舉例而言，核酸可經選殖至包括但不限於質體、噬菌質體(phagemid)、噬菌體衍生物、動物病毒及黏質體之載體中。特別關注之載體包括表現載體、複製載體、探針生成載體及定序載體。

【0102】 此外，表現載體可以病毒載體形式提供給細胞。病毒載體技術為此項技術中眾所周知的且描述於例如Sambrook等人(2001年, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)及其他病毒學與分子生物學手冊中。適用作載體之病毒包括但不限於反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒及慢病毒。一般而

言，合適載體含有在至少一種生物體中起作用之複製起點、啟動子序列、適宜的限制性核酸內切酶位點及一或多種可選標記物(參見例如WO 01/96584；WO 01/29058；及美國專利第6,326,193號)。

【0103】 已研發出多種基於病毒之系統以用於基因轉移至哺乳動物細胞中。舉例而言，反轉錄病毒提供用於基因遞送系統之適宜平台。可將所選基因插入載體中且使用此項技術中已知之技術封裝於反轉錄病毒粒子中。接著，可分離重組病毒且活體內或離體遞送至個體之細胞中。多種反轉錄病毒系統為此項技術中已知的。在一些實施例中，使用腺病毒載體。多種腺病毒載體為此項技術中已知的。在一些實施例中，使用慢病毒載體。衍生自諸如慢病毒之反轉錄病毒之載體為達成長期基因轉移之合適工具，此係因為其允許轉殖基因長期穩定地整合且繁殖於子細胞中。慢病毒載體優於衍生自諸如鼠類白血病毒之致癌反轉錄病毒之載體的附加優勢在於其可轉導諸如肝細胞之非增殖細胞。其亦具有低免疫原性之附加優勢。

【0104】 例如強化子之額外啟動子元件調節轉錄起始頻率。通常，此等元件位於起始位點上游之30-110鹼基對(bp)區中，但多種啟動子最近已顯示含有亦位於起始位點下游之功能元件。啟動子元件之間間距通常為靈活的，以使得當元件相對於彼此倒置或移動時保留啟動子功能。在胸苷激酶(tk)啟動子中，啟動子元件之間間距在活性開始下降之前可增加至相隔50 bp。

【0105】 合適啟動子之一個實例為即刻早期巨細胞病毒(CMV)啟動子序列。此啟動子序列為能夠驅動與其可操作地連接之任何多核苷酸序列之高精度表現之強組成性啟動子序列。合適啟動子之另一實例為延長生長

因子-1 α (EF-1 α)。然而，亦可使用其他組成性啟動子序列，包括但不限於猴病毒40 (SV40)早期啟動子、小鼠乳房腫瘤病毒(MMTV)、人類免疫缺乏病毒(HIV)長末端重複序列(LTR)啟動子、MoMuLV啟動子、禽類白血病毒啟動子、艾司坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus)即刻早期啟動子、勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)啟動子以及諸如但不限於肌動蛋白啟動子、肌凝蛋白啟動子、血紅蛋白啟動子及肌酸激酶啟動子之人類基因啟動子。此外，本發明應不限於使用組成性啟動子。亦考慮可誘導啟動子作為本發明之一部分。可誘導啟動子之使用提供分子開關，該分子開關能夠在需要該表現時打開其可操作地連接之多核苷酸序列之表現或在不需要表現時關閉該表現。可誘導啟動子之實例包括但不限於金屬硫蛋白啟動子、糖皮質激素啟動子、孕酮啟動子及四環素啟動子。

【0106】 在一些實施例中，一或多種編碼抗CD47抗體(或其免疫活性片段)之核酸之表現為可誘導的。在一些實施例中，一或多種編碼抗CD47抗體(或其免疫活性片段)之核酸可操作地連接至可誘導啟動子，該可誘導啟動子包括此項技術中已知之任何可誘導啟動子。在一些實施例中，一或多種編碼本文所描述之抗CD47抗體之核酸已經工程改造以編碼抗原決定基標籤，例如以便於純化或偵測抗體。例示性抗原決定基標籤包括但不限於例如6 $\times$ His (亦稱為His標籤或六組胺酸標籤)、FLAG、HA、Myc、V5、GFP (綠色螢光蛋白，例如增強型綠色螢光蛋白或EGFP)、GST (麩胱甘肽-S-轉移酶)、 β -GAL (β -半乳糖苷酶)、螢光素酶、MBP (麥芽糖結合蛋白)、RFP (紅色螢光蛋白)及VSV-G (水泡性口炎病毒醣蛋白)。

抗體生產方法

【0107】 本發明之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)可藉由此項技術中已知之任何方式產生。例示性抗體生產技術描述於下文；然而，此等例示性技術僅出於說明之目的而提供且不意欲為限制性的。另外，進一步描述經考慮用於與本文所描述之抗體一起使用之例示性抗體特性。

【0108】 為了製備抗原，該抗原可經純化或以其他方式獲自天然來源，或其可使用重組技術表現。在一些實施例中，抗原可用作可溶性蛋白。在一些實施例中，抗原可結合至另一多肽或其他部分，例如以增加其免疫原性。舉例而言，本文所描述之抗原可與Fc區偶合。在一些實施例中，於其細胞表面上表現抗原之細胞可用作抗原。

【0109】 可藉由多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射抗原及佐劑而在動物中培養多株抗體。舉例而言，本文描述了對雞進行免疫接種之描述。在一些實施例中，使用雙功能劑或衍生劑使抗原與例如匙孔螺血氰蛋白、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑之免疫原性蛋白結合。本文提供用於對雞進行免疫接種之例示性方法。適用於諸如哺乳動物之多種其他生物體之相關方法為此項技術中熟知的。

【0110】 如上文所描述，可藉由多種方法產生單株抗體。在一些實施例中，使用首次由Kohler等人, *Nature*, 256:495 (1975年)描述且進一步描述於Hongo等人, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995年)；Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988年)；及Hammerling等人, : *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981年)中之融合瘤方法製造本發明之單株抗體。人類融合瘤技術(三源融合瘤技術)描述於Vollmers及Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005年)以及

Vollmers及Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005年)中。可針對所關注之抗體之存在，例如藉由活體外結合檢驗、免疫沈澱、ELISA、RIA等對融合瘤細胞生長於其中之培養基進行篩檢；且可例如藉由斯卡查德分析(Scatchard analysis)測定結合親和力。產生具有所需結合特性之抗體之融合瘤可使用已知培養技術進行次選殖及生長，在動物中以腹水性腫瘤形式活體內生長，及其類似者。

【0111】 在一些實施例中，使用諸如噬菌體展現庫之庫方法製造單株抗體。參見例如Hoogenboom等人 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人編, Human Press, Totowa, NJ, 2001年)。在一些實施例中，VH及VL基因之組庫係藉由聚合酶鏈反應(PCR)進行選殖且在噬菌體庫中隨機重組，隨後針對抗原結合噬菌體對其進行篩檢，例如如Winter等人, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994年)中所描述。噬菌體通常展現呈單鏈Fv (scFv)片段或Fab片段形式之抗體片段。可替代地，原始組庫可經選殖(例如自人類選殖)以不經任何免疫接種即提供針對廣泛範圍之非自體抗原以及自體抗原之抗體的單一來源，如Griffiths等人, *EMBO J*, 12: 725-734 (1993年)所描述。最後，原始庫亦可藉由以下以合成方式製造：自幹細胞選殖未重排V基因區段，且使用含有用於編碼高度可變CDR3區且實現活體外重排之隨機序列之PCR引子，如Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992年)所描述。

【0112】 抗體可使用重組方法產生。為了重組產生抗抗原抗體，分離編碼該抗體之核酸且插入可複製載體中以用於進一步選殖(DNA擴增)或用於表現。編碼該抗體之DNA可易於使用習知程序分離及定序(例如藉由

使用能夠與編碼抗體重鏈及輕鏈之基因特異性結合之寡核苷酸探針)。許多載體為可用的。載體組分一般包括但不限於以下中之一或多者：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、強化子元件、啟動子及轉錄終止序列。

【0113】 本發明之抗體可用例如在成熟蛋白或多肽之N端處具有特異性裂解位點之信號序列或其他多肽的異源多肽以重組方式以融合多肽形式產生。所選異源信號序列可為由宿主細胞辨識及處理(例如藉由信號肽酶裂解)之信號序列。對於不辨識及處理天然抗體信號序列之原核宿主細胞，信號序列經選自例如鹼性磷酸酶、青黴素酶、lpp或熱穩定腸毒素II前導子之原核信號序列取代。為了進行酵母分泌，天然信號序列可經例如酵母轉化酶前導子、因子前導子(包括酵母菌及克魯維酵母(*Kluyveromyces*) α -因子前導子)或酸性磷酸酶前導子、白色念珠菌(*C. albicans*)葡萄糖澱粉酶前導子等取代。在哺乳動物細胞表現中，哺乳動物信號序列以及例如單純疱疹gD信號之病毒分泌性前導子為可用的。

【0114】 表現載體及選殖載體兩者均含有使得載體能夠在一或多個所選宿主細胞中複製，例如以允許載體獨立於宿主染色體DNA而複製的核酸序列。此序列可包括複製起點或自主複製序列。用於各種細菌、酵母及病毒之該等序列為眾所周知的。一般而言，哺乳動物表現載體不需要複製起點組分(可使用SV40起點，此係因為其含有早期啟動子)。

【0115】 表現載體及選殖載體可含有選擇基因或可選標記物。典型的選擇基因編碼如下蛋白質：(a)賦予抗生素或例如安比西林(ampicillin)、新黴素(neomycin)、甲胺喋呤或四環素之其他毒素抗性；(b)補體營養缺陷性不足；或(c)供應無法自複雜培養基中獲得之關鍵營養

素。主要選擇之實例使用藥物新黴素、黴酚酸(mycophenolic acid)及潮黴素(hygromycin)。適用於哺乳動物細胞之可選標記物之另一實例為使得能夠鑑別編碼抗體之核酸吸收勝任型細胞之標記物，諸如DHFR、麩醯胺酸合成酶(GS)、胸苷激酶；金屬硫蛋白-I及金屬硫蛋白-II，較佳地靈長類動物金屬硫蛋白基因；腺苷去胺酶、鳥胺酸去羧酶及其類似物。舉例而言，經DHFR基因轉型之缺乏內源性DHFR活性之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株係藉由在含有作為DHFR競爭性拮抗劑之甲胺喋呤(Mtx)之培養基中培養轉型體來加以鑑別。

【0116】可替代地，經編碼所關注抗體之DNA序列、野生型DHFR基因及諸如胺基醣苷3'-磷酸轉移酶(APH)之另一可選標記物轉型或共轉型之宿主細胞(尤其含有內源性DHFR之野生型宿主)可藉由使細胞在含有針對諸如胺基醣苷抗生素，例如康黴素(kanamycin)、新黴素或G418之可選標記物之選擇劑的培養基中生長來加以選擇。

【0117】表現載體及選殖載體一般含有由宿主生物體辨識且與編碼抗體之核酸可操作地連接的啟動子。適合於與原核宿主一起使用之啟動子包括*phoA*啟動子、 β -內醯胺酶及乳糖啟動子系統、鹼性磷酸酶啟動子、色胺酸(trp)啟動子系統及諸如*tac*啟動子之雜交啟動子。然而，其他已知的細菌啟動子為合適的。用於真核生物之啟動子序列為已知的。酵母啟動子為此項技術中眾所周知的且可包括由生長條件調節之可誘導啟動子/強化子。幾乎所有的真核基因均具有位於轉錄起始位點上游約25至30個鹼基處之富AT區。實例包括不限於用於3-磷酸甘油酸激酶或諸如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸去氫酶、己糖激酶、丙酮酸去羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸異構酶、3-磷酸甘油酸變位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸異構

酶、磷酸葡萄糖異構酶及葡萄糖激酶之其他醣解酶的啟動子。哺乳動物宿主細胞中自載體進行之抗體轉錄可例如由獲自病毒基因體之啟動子控制。SV40病毒之早期及晚期啟動子宜以亦含有SV40病毒複製起點之SV40限制片段形式獲得。人類巨細胞病毒之即刻早期啟動子宜以HindIII E限制片段形式獲得。可替代地，可使用勞斯肉瘤病毒長末端重複序列作為啟動子。

【0118】 編碼本發明抗體之DNA由高級真核生物進行之轉錄通常藉由將強化子序列插入載體中來增加。現已知來自哺乳動物基因(球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白及胰島素)之許多強化子序列。然而，通常，吾人將使用來自真核細胞病毒之強化子。

【0119】 真核宿主細胞(酵母細胞、真菌細胞、昆蟲細胞、植物細胞、動物細胞、人類細胞或來自其他多細胞生物體之有核細胞)中使用之表現載體亦將含有終止轉錄及穩定mRNA所需之序列。

【0120】 本文中適用於在載體中選殖或表現DNA之宿主細胞為上文所描述之原核生物、酵母或高級真核細胞。適用於此目的之原核生物包括真細菌，諸如革蘭氏陰性(Gram-negative)或革蘭氏陽性(Gram-positive)生物體，例如腸內菌科(Enterobacteriaceae)，諸如艾氏菌屬(*Escherichia*)，例如大腸桿菌；腸桿菌屬(*Enterobacter*)、伊文氏桿菌屬(*Erwinia*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)；沙門桿菌屬(*Salmonella*)，例如鼠傷寒沙門桿菌(*Salmonella typhimurium*)；鋸桿菌屬(*Serratia*)，例如黏質鋸桿菌屬(*Serratia marcescans*)；及志賀桿菌屬(*Shigella*)等。除原核生物以外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為適用於編碼抗體之載體之選殖或表現宿主。低級真核宿主微生物體中最常使

用釀酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通麵包酵母。可選擇某些真菌及酵母株，其中醱化路徑已「人類化」，從而使得產生具有部分或完全人類醱化模式之抗體。參見例如Li等人, *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006年)。

【0121】棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄、浮萍(duckweed) (浮萍科(*Leninaceae*))、苜蓿(蒺藜苜蓿(*M. truncatula*))及煙草之植物細胞培養物亦可用作宿主。

【0122】適用於表現醱化抗體之宿主細胞亦衍生自多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物細胞及昆蟲細胞。已鑑別出多種桿狀病毒株及變異體以及來自諸如草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (毛蟲)、埃及斑蚊(*Aedes aegypti*) (蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*) (蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*) (果蠅)及家蠶(*Bombyx mori*)之宿主的對應許可昆蟲宿主細胞。

【0123】脊椎動物細胞可用作宿主，且脊椎動物細胞在培養物(組織培養物)中之繁殖已成為常規程序。適用哺乳動物宿主細胞株之實例為經SV40轉型之猴腎CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚腎細胞株(293細胞或經次選殖以在懸浮培養物中生長之293細胞，Graham等人, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977年))；幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；小鼠塞特利氏細胞(mouse sertoli cell) (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980年))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；人類子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；水牛鼠(buffalo rat)肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；人類肝細胞

(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳房腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 細胞(Mather等人, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982年)); MRC 5細胞; FS4細胞; 及人類肝腫瘤株(Hep G2)。其他適用哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞, 該等CHO細胞包括DHFR⁻ CHO細胞(Urlaub等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980年)); 及骨髓瘤細胞株, 該等骨髓瘤細胞株諸如NS0及Sp2/0。關於適用於抗體生產之某些哺乳動物宿主細胞株之綜述, 參見例如Yazaki及Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B. K. C. Lo編, Humana Press, Totowa, N.J., 2003年), 第255-268頁。在一些實施例中, 宿主細胞為CHO-K1細胞。CHO-K1細胞株為CHO細胞株之次殖株(參見例如[www\(dot\)phe-culturecollections\(dot\)org\(dot\)uk/media/128263/chok1-cell-line-profile\(dot\)pdf](http://www(dot)phe-culturecollections(dot)org(dot)uk/media/128263/chok1-cell-line-profile(dot)pdf)及[web\(dot\)expasy\(dot\)org/cellosaurus/CVCL_0214](http://web(dot)expasy(dot)org/cellosaurus/CVCL_0214))。

【0124】本發明之宿主細胞(例如CHO-K1細胞)可在多種培養基中加以培養。諸如Ham's F10 (Sigma)、最低必需培養基(MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)及杜爾貝科氏改良伊格爾氏培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM) (Sigma)之市售培養基適用於培養宿主細胞。另外, Ham等人, *Meth. Enz.* 58:44 (1979年); Barnes等人, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980年); 美國專利第4,767,704號、第4,657,866號、第4,927,762號、第4,560,655號或第5,122,469號; WO 90/03430、WO 87/00195; 或美國專利Re.30,985中所描述之培養基中之任一種可用作宿主細胞培養基。此等培養基中之任一種可視需要補充激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、運鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸

如GENTAMYCIN™藥物)、痕量元素(經定義為通常以在微莫耳濃度範圍內之最終濃度存在之無機化合物)及葡萄糖或等效能量來源。亦可包括呈熟習此項技術者已知之適當濃度之任何其他必需補充劑。諸如溫度、pH及其類似者之培養條件為先前與經選擇用於表現之宿主細胞一起使用之培養條件且將對熟習此項技術者顯而易知。

【0125】 當使用重組技術時，抗體可在細胞內、在周質空間中產生或直接分泌至培養基中。若在細胞內產生抗體，則作為第一步驟，例如藉由離心或超濾來移除作為宿主細胞或溶解片段之微粒碎片。Carter等人, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992年)描述經分泌至大腸桿菌之周質空間中之抗體之分離程序。

【0126】 由細胞製備之抗體組合物可使用例如氫氧磷灰石層析、疏水相互作用層析、凝膠電泳、透析及親和力層析來純化，其中親和力層析為通常較佳之純化步驟之一。在一些實施例中，本文所描述之抗CD47抗體包含抗原決定基標籤(例如經由可裂解連接子連接至抗體之標籤)以便於純化。例示性抗原決定基標籤包括但不限於例如6× His (亦稱為His標籤或六組胺酸標籤)、FLAG、HA、Myc、V5、GFP (綠色螢光蛋白，例如增強型綠色螢光蛋白或EGFP)、GST (麩胱甘肽-S-轉移酶)、β-GAL (β-半乳糖苷酶)、螢光素酶、MBP (麥芽糖結合蛋白)、RFP (紅色螢光蛋白)及VSV-G (水泡性口炎病毒糖蛋白)。

【0127】 因此，在一些實施例中，提供製造抗CD47抗體(或其免疫活性片段)之方法，該抗體包含：(a)重鏈可變(V_H)域，該V_H域包含(1)在其N端處之麩胺酸殘基(E)；(2)包含RAWMN (SEQ ID NO: 5)之CDR-H1；(3)包含RIKRKTDGETTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 6)之CDR-H2；

(4)包含SNRAFDI (SEQ ID NO: 7)之CDR-H3；及(5)在其C端處之絲胺酸(S)；及(b)輕鏈可變(V_L)域，該V_L域包含(1)包含KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 8)之CDR-L1；(2)包含QASTRAS (SEQ ID NO: 9)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 10)之CDR-L3，該方法包含：a)在有效引起該抗體(或片段)表現之條件下培養包含編碼抗CD47抗體(或其免疫活性片段)之核酸的宿主細胞(諸如CHO細胞)；及b)回收由宿主細胞表現之抗CD47抗體(或其片段)。在一些實施例中，該方法進一步包含c)純化抗體之步驟。在一些實施例中，純化抗CD47抗體包含至少一個諸如蛋白A或蛋白L層析步驟之層析步驟。在一些實施例中，宿主細胞為哺乳動物細胞。在一些實施例中，宿主細胞為例如CHO-K1細胞之CHO細胞。在一些實施例中，宿主細胞包含一或多種編碼抗CD47抗體之載體。在一些實施例中，宿主細胞已經一或多種編碼抗CD47抗體之核酸轉染(例如短暫轉染或穩定轉染)。在一些實施例中，製造抗CD47抗體之方法為製造規模生產方法(諸如醱酵方法)。在一些實施例中，製造抗CD47抗體之「製造規模」生產方法(例如醱酵方法)需要以範圍在約400 L至約80,000 L之間(諸如在約400 L至約25,000 L之間，例如約4,000 L、6,000 L、8,000 L、10,000 L、12,000 L、14,000 L或16,000 L中之任一者)之培養體積培養及生長宿主細胞。

醱化變異體

【0128】 在一些實施例中，本文提供之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)改變以增加或降低抗CD47抗體(或其免疫活性片段)醱化之程度。向抗CD47抗體(或其免疫活性片段)添加或缺失醱化位點宜可藉由改變抗CD47抗體(或其免疫活性片段)或其多肽部分之胺基酸序列以使得產生或

移除一或多個醣化位點來實現。

【0129】 在抗CD47抗體(或其免疫活性片段)包含Fc區之情況下，與其連接之糖類可改變。由哺乳動物細胞產生之原生抗體通常包含一般藉由N鍵連接至Fc區之CH2域之Asn297的分支鏈雙觸角寡醣。參見例如Wright等人, *TIBTECH* 15:26-32 (1997)。寡醣可包括例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖及唾液酸以及連接至雙觸角寡醣結構之「主幹」中之GlcNAc之岩藻醣的各種糖類。在一些實施例中，可對本文之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)中之寡醣進行修飾以便產生具有某些經改善特性之抗CD47抗體變異體(或其包含Fc區之免疫活性片段)。

【0130】 連接至Fc之CH2域之N-聚醣為異質的。在CHO細胞中生成之抗體或Fc融合蛋白係藉由岩藻醣基轉移酶活動進行岩藻醣基化。參見Shoji-Hosaka等人, *J. Biochem.* 2006, 140:777- 83。通常，可在人類血清中偵測到小百分比之天然存在之去岩藻醣基化IgG。Fc之N-醣化對與FcγR之結合至關重要；且N-聚醣之去岩藻醣基化增加Fc與FcγRIIIa之結合能力。經增加之FcγRIIIa結合可增強ADCC，此在需要細胞毒性之某些抗體治療應用中可為有利的。

【0131】 在一些實施例中，當Fc介導之細胞毒性非所需時，經增強之效應功能可為不利的。在一些實施例中，Fc片段或CH2域未經醣化。在一些實施例中，CH2域中之N-醣化位點經突變以防止醣化。

【0132】 在一些實施例中，提供抗CD47抗體變異體(或其免疫活性片段)，其包含Fc區，其中附接至Fc區之糖類結構具有經減少之岩藻醣或不具有岩藻醣，岩藻醣可改善ADCC功能。

免疫結合物及共價修飾

【0133】 本發明亦關於包含結合至第二部分之抗體的免疫結合物。在一些實施例中，第二部分為諸如化學治療劑、毒素(例如，細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(亦即，放射性結合物)之細胞毒性劑。

【0134】 可使用之酶活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈、相思子毒素A鏈、莫迪素A鏈、 α -帚麴菌素、光桐蛋白、康乃馨蛋白、美洲商陸蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻瘋樹毒蛋白、巴豆毒素、肥皂草抑制劑、白樹素、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素(enomycin)及單端孢菌毒素(tricothecenes)。多種放射性核種可用於產生放射性結合抗體。實例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及 ^{186}Re 。適用於生成該等免疫結合物之例示性化學治療劑描述於本文別處。

【0135】 在某些實施例中，本文提供之人類化抗CD47抗體(或其抗原結合片段)結合至美登素(maytansine)、類美登素(maytansinoid)或卡奇黴素(calicheamicin)。在某些實施例中，本文提供之人類化抗CD47抗體(或其抗原結合片段)結合至類美登素DM1。

【0136】 抗體與細胞毒性劑之結合物係使用多種雙功能蛋白質偶合劑來製造，該等偶合劑諸如為N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯HCl)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮鎘衍生物(諸如雙(對重氮鎘苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如2,6-二異氰酸

甲代亞苯酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人, *Science* 238: 1098 (1987年)中所描述來製備。碳14標記之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二仲乙三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於將放射性核苷酸結合至抗體之例示性螯合劑。參見WO94/11026。

【0137】 在另一實施例中，抗體可結合至「受體」(諸如鏈黴抗生物素蛋白)以用於腫瘤預靶向中，其中向患者投與抗體-受體結合物，接著使用清除劑自循環中移除未經結合之結合物，且隨後投與結合至細胞毒性劑(例如放射性核苷酸)之「配位體」(例如抗生物素蛋白)。

【0138】 亦提供包含共價接合至至少一種其他抗體之本文所描述之人類化抗CD47抗體的異結合抗體。舉例而言，已提出異結合抗體使免疫系統細胞靶向不合需要之細胞(美國專利第4,676,980號)及用於治療HIV感染。包含本文所描述之人類化抗CD47抗體之異結合抗體可使用已知的合成蛋白質化學反應方法活體外製備，該等方法包括涉及交聯劑之方法。舉例而言，免疫毒素可使用雙硫鍵交換反應或藉由形成硫醚鍵來構築。適於此目的之試劑之實例包括亞胺基硫醇酯及甲基-4-巰基丁醯亞胺酯及例如美國專利第4,676,980號中揭示之試劑。

【0139】 亦提供包含至少一個共價修飾之人類化抗CD47抗體。一種共價修飾包括使人類化抗CD47之靶向胺基酸殘基與有機衍生劑反應，該有機衍生劑能夠與抗體之所選側鏈或N端或C端殘基反應。常用交聯劑包括但不限於例如1,1-雙(重氮乙醯基)-2-苯乙烷、戊二醛；N-羥基丁二醯亞胺酯，例如4-疊氮柳酸酯；同型雙官能醯亞胺酯，包括二丁二醯亞胺酯，諸如3,3'-二硫代雙(丁二醯亞胺基-丙酸酯)；雙官能順丁烯二醯亞胺，

諸如雙N-順丁烯二醯亞胺基-1,8-辛烷；及試劑，諸如甲基-3-[(對疊氮苯基)-二硫基]醯亞胺丙酯。

【0140】 其他修飾包括分別將麩醯胺醯基及天冬醯胺醯基殘基去醯胺化為對應之麩胺醯基及天冬胺醯基殘基、羥基化脯胺酸及離胺酸、磷酸化絲胺醯基或羥丁胺醯基殘基之羥基、甲基化離胺酸、精胺酸及組胺酸側鏈之 α -胺基[T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 第79-86頁(1983年)]、乙醯化N端胺及醯胺化任何C端羧基。

【0141】 另一類型之共價修飾包含以美國專利第4,640,835號、第4,496,689號、第4,301,144號、第4,670,417號、第4,791,192號或第4,179,337號中所闡述之方式使本文提供之人類化抗CD47抗體(或其抗原結合片段)連接至例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯之各種非蛋白質聚合物中之一者。

經半胱胺酸工程改造之變異體

【0142】 在一些實施例中，可能需要產生經半胱胺酸工程改造之抗CD47抗體，其中一或多個胺基酸殘基經半胱胺酸殘基取代。在一些實施例中，經取代之殘基存在於抗CD47抗體之可及位點處。藉由用半胱胺酸取代彼等殘基，反應性硫醇基由此定位於抗CD47抗體之可及位點處且可用於使抗CD47抗體與諸如藥物部分或連接子-藥物部分之其他部分結合以產生如本文中進一步描述之抗CD47免疫結合物。經半胱胺酸工程改造之抗CD47抗體可如例如美國專利第7,521,541號中所描述生成。

效應功能工程改造

【0143】 可能需要關於效應功能修飾本文提供之抗CD47抗體以便

增強例如抗體治療癌症之有效性。舉例而言，可將一或多個半胱胺酸殘基引入Fc區中，由此允許在此區中形成鏈間雙硫鍵。因此生成之同二聚抗體可具有經改善之內化能力及/或經增加之補體介導之細胞殺滅及抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。參見Caron等人, *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992年)及Shapes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992年)。具有經增強之抗腫瘤活性之同二聚抗體亦可使用異雙功能交叉連接子來製備，如Wolff等人, *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993年)中所描述。可替代地，抗體可經工程改造以包含常用Fc區且可由此具有經增強之補體溶解及ADCC能力。參見Stevenson等人, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989年)。

【0144】可進行Fc區序列之突變或改變以改善FcR結合(例如與FcγR、FcRn之結合)。在一些實施例中，本文提供之抗CD47抗體包含至少一種經改變之效應功能，例如相較於原生IgG或親本抗體而言經改變之ADCC、CDC及/或FcRn結合。在一些實施例中，包含突變或改變之抗體之效應功能相對於親本抗體而言增強。在一些實施例中，包含突變或改變之抗體之效應功能相對於親本抗體而言減弱。若干適用特異性突變之實例描述於例如Shields, RL等人 (2001年) *JBC* 276(6)6591-6604；Presta, L.G., (2002年) *Biochemical Society Transactions* 30(4):487-490；及WO 00/42072中。

【0145】在一些實施例中，本文提供之抗CD47抗體包含Fc受體突變，例如Fc區之至少一個位置處之取代突變。一或多個該取代突變可發生於Fc域中之胺基酸位置，該等胺基酸位置包括但不限於例如238、239、246、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、

294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439，其中Fc區中之殘基編號係根據EU編號系統。在一些實施例中，抗CD47抗體包含有包含兩種人類IgG4 Fc域單體之人類IgG4 Fc區，其中各單體包含S228P取代(其中殘基編號係根據EU編號系統)。額外合適突變為此項技術中熟知的。例示性突變闡述於例如美國專利第7,332,581號中。

醫藥調配物及其投與

【0146】 本文提供之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)可與醫藥學上可接受之載劑或賦形劑一起調配以使得其適用於向有需要之個體(例如哺乳動物，諸如人類)投與。抗體之合適調配物係藉由將具有所需純度之抗體(或其免疫活性片段)與視情況選用之醫藥學上可接受之載劑、緩衝劑、賦形劑或穩定劑(*Remington's Pharmaceutical Sciences* 第16版, Osol, A. Ed. (1980年))混合以凍乾調配物或水溶液形式獲得。醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包括：緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苯甲銨；氯化六羥季銨；苯紮氯銨、苄索氯銨；酚、丁醇或苯甲醇；對羥苯甲酸烷酯，諸如對羥苯甲酸甲酯或對羥苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及包

括葡萄糖、甘露糖或糊精之其他糖類；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成鹽相對離子，諸如鈉；金屬複合物(例如Zn-蛋白質複合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

【0147】 本文提供之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)亦可經調配為免疫脂質體。含有抗體之脂質體係藉由諸如描述於以下中之此項技術中已知之方法來製備：Epstein等人, *PNAS USA*, 82: 3688 (1985年)；Hwang等人, *PNAS USA*, 77: 4030 (1980年)；及美國專利第4,485,045號及第4,544,545號。具有經延長之循環時間之脂質體揭示於美國專利第5,013,556號中。

【0148】 特別適用之脂質體可藉由反相蒸發法，用包含磷脂醯膽鹼、膽固醇及PEG衍生之磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)之脂質組合物生成。脂質體係經由孔隙尺寸限定之過濾器擠出以產生具有所需直徑之脂質體。本發明抗體之Fab'片段可經由雙硫鍵交換反應結合至如Martin等人, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982年)中所描述之脂質體。抗贅生劑、生長抑制劑或化學治療劑(諸如小紅莓)視情況亦含於脂質體內。參見Gabizon等人, *J. National Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989年)。

【0149】 含有CD47抗體之活性成分亦可包覆於微膠囊中，該微膠囊係例如藉由凝聚技術或藉由介面聚合來製備，例如分別製備為羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊；包覆於膠體藥物遞送系統(例如脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)中或巨乳液中。該等技術揭示於Remington's *Pharmaceutical Sciences* 第16版, Osol, A.編(1980年)中。

【0150】 包含本文提供之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)之醫藥調配物亦可含有所治療之特定適應症所必需之超過一種活性化合物，較佳地具有不會對彼此產生不利影響之互補活性的活性化合物。舉例而言，可能需要提供除本文提供之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)以外之抗贅生劑、生長抑制劑、細胞毒性劑或化學治療劑。該等分子適合地以對預期目的有效之量組合存在。該等其他藥劑之有效量視調配物中存在之抗體之量、疾病或病症或治療之類型及上文所論述之其他因素而定。該等其他藥劑之有效量視調配物中存在之抗體之量、疾病或病症或治療之類型及上文所論述之其他因素而定。此等藥劑一般以如本文所描述之相同劑量及投與途徑或迄今為止採用之劑量之約1%至99%使用。

【0151】 在一些實施例中，本發明抗體經凍乾。該等凍乾調配物可經合適稀釋劑復原至高蛋白濃度，且復原調配物可經投與至哺乳動物(諸如人類)。

【0152】 在某些實施例中，待用於活體內投與之醫藥調配物為無菌的。此易於藉由例如經由無菌過濾膜過濾包含本文提供之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)之溶液來實現。

【0153】 本文所描述之抗CD47抗體之治療劑量可經調配為至少約0.01微克/公斤體重、至少約0.05微克/公斤體重、至少約0.1微克/公斤體重、至少約0.5微克/公斤體重、至少約1微克/公斤體重、至少約2.5微克/公斤體重、至少約5微克/公斤體重及不超過約100微克/公斤體重之劑量。熟習此項技術者應理解，該等指南將針對活性劑之分子量進行調整，例如在抗體片段之使用中或在抗體結合物之使用中。用於例如鼻內、吸入等之局部投與或用於例如腹膜內(I.P.)、靜脈內(I.V.)、皮內(I.D.)、肌內(I.M.)

及其類似方式之全身性投與的劑量亦可變化。

【0154】 本發明之CD47抗體或醫藥組合物可藉由包括非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內之任何合適方式投與。非經腸輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。另外，抗CD47抗體適合地藉由脈衝輸注，特定地在抗體劑量遞減之情況下來投與。

【0155】 為了預防或治療疾病，抗體之適當劑量將視如上文所定義之待治療疾病之類型、疾病之嚴重度及過程、是否出於預防性目的投與抗體、先前療法、患者之臨床病史及對抗體之反應以及主治醫師之判斷而定。一次性或經一系列治療適合地向患者投與抗體。

偵測及/或診斷方法

【0156】 本文提供之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)可用於偵測及診斷方法中。可使用本文所描述之抗體定性地及/或定量地測定來自個體之樣本(例如生物樣本，諸如組織樣本)中之CD47 (例如hCD47)蛋白之存在及/或量。在某些實施例中，偵測CD47蛋白之存在及/或量之方法包含使生物樣本與本文所描述之抗CD47抗體在容許抗體結合至CD47之條件下接觸，及偵測在抗體與CD47之間是否形成複合物。該方法可為活體外或活體內方法。在一個實施例中，該方法用於選擇有資格進行用抗CD47抗體進行之療法之個體。在一些實施例中，樣本係在用抗CD47抗體治療個體之前自個體獲得。在一些實施例中，組織樣本為經福馬林固定及經石蠟包埋的、存檔的、新鮮的或冷凍的。在一些實施例中，相比於第二樣本中之CD47之存在及/或量，第一樣本中之CD47之存在及/或量增加或升高。在某些實施例中，相比於第二樣本中之CD47之存在及/或量，第一樣本中之CD47之存在及/或量降低或減少。在某些實施例中，第二樣本為參考樣

本、參考細胞、參考組織、對照樣本、對照細胞或對照組織。樣本中之CD47之存在及/或量可藉由多種方法加以分析，該等方法中之許多方法為此項技術中已知且熟習此項技術者理解的，包括但不限於免疫組織化學(IHC)、西方墨點分析、免疫沈澱、分子結合檢驗、ELISA、ELIFA、螢光活化細胞分選(FACS)、MassARRAY、蛋白質體學、生物化學酶活性檢驗。亦可使用多工免疫檢驗，諸如可獲自Rules Based Medicine或Meso Scale Discovery (「MSD」)之多工免疫檢驗。偵測來自個體之樣本(例如生物樣本，諸如組織樣本)中之CD47 (例如hCD47)蛋白之存在及/或量可與諸如形態學染色及/或螢光原位雜交之額外技術組合執行。

【0157】 在一些實施例中，例如相對於非癌組織樣本而言，在腫瘤上或在腫瘤樣本中評估CD47表現。如本文所使用，腫瘤或腫瘤樣本可涵蓋腫瘤細胞所佔據之腫瘤區域之一部分或全部。在一些實施例中，腫瘤或腫瘤樣本可進一步涵蓋腫瘤相關瘤內細胞及/或腫瘤相關基質(例如連續瘤周結締組織增生性基質)所佔據之腫瘤區域。在一些實施例中，在腫瘤細胞上評估CD47表現。在一些實施例中，樣本為臨床樣本。在一些實施例中，樣本用於診斷性檢驗中。在一些實施例中，樣本係自原發性腫瘤或轉移性腫瘤獲得。組織生物檢體通常用於獲得代表性腫瘤組織塊。可替代地，腫瘤細胞可以組織或流體形式間接獲得，已知或認為該等組織或流體含有所關注之腫瘤細胞。舉例而言，本文所描述之偵測方法中所用之樣本可藉由但不限於切除術、支氣管鏡檢、細針抽吸、支氣管刷檢或自痰、胸膜液、腦脊髓液、血液、血清及尿液獲得。上文所論述之用於偵測癌症樣本中之目標基因或基因產物之相同技術可應用於其他身體樣本。癌細胞可能自癌症病灶蛻掉且出現在該身體樣本中。在一些實施例中，早期癌症診

斷可藉由篩檢該等身體樣本之CD47蛋白之存在及/或量來達成。在一些實施例中，療法(例如用抗CD47抗體進行之療法)之進展可更易於藉由測試該等身體樣本之CD47蛋白之存在及/或量加以監測。

治療方法

【0158】 本文提供治療與異常CD47表現(例如CD47過度表現)相關之疾病或病症之方法，該方法包含向有需要之個體投與有效量之本文所描述之抗CD47抗體。在一些實施例中，疾病或病症為癌症。

實體腫瘤治療

【0159】 在一些實施例中，提供治療個體之實體腫瘤之方法，其包含向個體投與有效量之抗CD47抗體，其中抗CD47抗體包含：(a)重鏈可變(V_H)域，該V_H域包含(1)包含RAWMN (SEQ ID NO: 5)之CDR-H1；(2)包含RIKRKTDGETTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 6)之CDR-H2；及(3)包含SNRAFDI (SEQ ID NO: 7)之CDR-H3；(b)輕鏈可變(V_L)域，該V_L域包含(1)包含KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 8)之CDR-L1；(2)包含QASTRAS (SEQ ID NO: 9)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 10)之CDR-L3。在一些實施例中，V_H進一步包含在其N端處之麩胺酸殘基(E)及在其C端處之絲胺酸(S)。在一些實施例中，抗CD47進一步包含人類IgG4 Fc區。

【0160】 在一些實施例中，實體腫瘤為復發性實體腫瘤(例如，在針對實體腫瘤之先前治療期間或之後復發)及/或難治性實體腫瘤(例如，難以用針對實體腫瘤之先前治療加以治療或對針對實體腫瘤之先前治療無反應)。在一些實施例中，「先前治療」係指包含投與一或多種治療劑之治療方案。亦即，針對實體腫瘤之「先前治療」可包含用單一治療劑進行之治

療或用治療劑組合進行之治療。在一些實施例中，實體腫瘤為肺腫瘤、卵巢腫瘤、結腸直腸腫瘤、胰臟腫瘤、肉瘤腫瘤、頭頸腫瘤、胃腫瘤、腎腫瘤或皮膚腫瘤(例如黑色素瘤)。在一些實施例中，實體腫瘤為轉移性實體腫瘤。

【0161】 在一些實施例中，將抗CD47抗體以約10 mg/kg至約30 mg/kg，包括約10 mg/kg、20 mg/kg及30 mg/kg中之任一者之劑量投與個體。在一些實施例中，將抗CD47抗體一週一次(亦即qw或qlw)投與個體。在一些實施例中，經由靜脈內(IV)輸注投與抗CD47抗體。在一些實施例中，由於用抗CD47抗體進行之治療，因此個體未經歷任何治療相關副作用(TRAЕ)。在一些實施例中，個體未經歷任何大於1級或2級之TRAЕ。在一些實施例中，TRAЕ係根據不良事件常見術語準則(CTCAE) 5.0版中概述之準則進行分級。參見例如 [ctep\(dot\)cancer\(dot\)gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7\(dot\)pdf](https://ctep(dot)cancer(dot)gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7(dot)pdf)。

【0162】 在一些實施例中，由於用抗CD47抗體進行之治療，因此個體未經歷顯著血液毒性。在一些實施例中，由於用抗CD47抗體進行之治療，因此個體未經歷任何血液毒性。在一些實施例中，血液毒性包含貧血、血球減少症及/或血球凝集。在一些實施例中，在用抗CD47抗體進行之治療期間，個體不需要針對血液毒性之治療。

【0163】 在一些實施例中，抗CD47抗體之V_H包含SEQ ID NO: 1，且抗CD47抗體之V_L包含SEQ ID NO: 2。在一些實施例中，抗CD47抗體之重鏈包含SEQ ID NO: 3且抗CD47抗體之輕鏈包含SEQ ID NO: 4。在一些實施例中，抗CD47抗體之重鏈包含SEQ ID NO: 55且抗CD47抗體之輕

鏈包含SEQ ID NO: 4。

非霍奇金淋巴瘤(NHL)治療

【0164】 在一些實施例中，提供治療個體之非霍奇金淋巴瘤(NHL)之方法，其包含向個體投與有效量之抗CD47抗體及視情況選用之有效量之利妥昔單抗，其中抗CD47抗體包含：(a)重鏈可變(V_H)域，該V_H域包含(1)包含RAWMN (SEQ ID NO: 5)之CDR-H1；(2)包含RIKRKTDGETTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 6)之CDR-H2；及(3)包含SNRAFDI (SEQ ID NO: 7)之CDR-H3；(b)輕鏈可變(V_L)域，該V_L域包含(1)包含KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 8)之CDR-L1；(2)包含QASTRAS (SEQ ID NO: 9)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 10)之CDR-L3。在一些實施例中，V_H進一步包含在其N端處之麩胺酸殘基(E)及在其C端處之絲胺酸(S)。

【0165】 在一些實施例中，抗CD47進一步包含人類IgG4 Fc區。在一些實施例中，NHL為濾泡性淋巴瘤(FL)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)或套細胞淋巴瘤(MCL)。在一些實施例中，NHL為復發性NHL (例如在針對NHL之先前治療期間或之後復發)及/或難治性NHL (例如難以用針對NHL之先前治療加以治療或對針對NHL之先前治療無反應)。在一些實施例中，個體已經歷至少一種針對NHL之先前治療(例如2種與10種之間的先前治療)。在一些實施例中，「先前治療」係指包含投與一或多種治療劑之治療方案。亦即，針對NHL之「先前治療」可包含用單一治療劑進行之治療或用治療劑組合進行之治療。在一些實施例中，個體已經歷包含抗CD20劑之針對NHL之先前治療。在一些實施例中，抗CD20劑為抗CD20抗體(例如但不限於利妥昔單抗、阿托珠單抗(obinutuzumab)及/或奧

伐木單抗(ofatumumab))。在一些實施例中，個體在用抗CD20劑(例如，作為單一藥劑或與一或多種治療劑之組合)進行之治療期間或之後惡化(例如，展現NHL疾病惡化)。

【0166】 在一些實施例中，將抗CD47抗體一週一次(亦即qw或q1w)投與個體。在一些實施例中，將抗CD47抗體每7天一次投與個體。在一些實施例中，經由靜脈內(IV)輸注投與抗CD47抗體。

【0167】 在一些實施例中，將利妥昔單抗經由IV輸注以375 mg/m²之劑量一週一次(qw或q1w)投與個體持續五週，且在五週之後以375 mg/m²之劑量每4週一次(例如q4w、q28d或每月)投與個體。在一些實施例中，根據處方標籤說明投與利妥昔單抗(參見例如 [www\(dot\)accessdata\(dot\)fda\(dot\)gov/drugsatfda_docs/label/2018/103705s54501bl\(dot\)pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/103705s54501bl.pdf)處之FDA處方標籤及 [www\(dot\)ema\(dot\)europa\(dot\)eu/en/documents/overview/mabthera-epar-medicine-overview_en.pdf](http://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/mabthera-epar-medicine-overview_en.pdf)處之EMA處方標籤)。

【0168】 在一些實施例中，由於用抗CD47抗體進行之治療，因此個體未經歷任何治療相關副作用(TRAЕ)。在一些實施例中，個體未經歷任何大於1級或2級之TRAЕ。在一些實施例中，TRAЕ係根據不良事件常見術語準則(CTCAE) 5.0版中概述之準則進行分級。參見例如 [ctep\(dot\)cancer\(dot\)gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7\(dot\)pdf](http://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7.pdf)。

【0169】 在一些實施例中，由於用抗CD47抗體進行之治療，因此個體未經歷顯著血液毒性。在一些實施例中，由於用抗CD47抗體進行之治療，因此個體未經歷任何血液毒性。在一些實施例中，血液毒性包含貧

血、血球減少症及/或血球凝集。在一些實施例中，在用抗CD47抗體進行之治療期間，個體不需要針對血液毒性之治療。

【0170】 在一些實施例中，抗CD47抗體之V_H包含SEQ ID NO: 1，且抗CD47抗體之V_L包含SEQ ID NO: 2。在一些實施例中，抗CD47抗體之重鏈包含SEQ ID NO: 3且抗CD47抗體之輕鏈包含SEQ ID NO: 4。在一些實施例中，抗CD47抗體之重鏈包含SEQ ID NO: 55且抗CD47抗體之輕鏈包含SEQ ID NO: 4。在一些實施例中，抗CD47抗體為冷佐巴單抗(lemzoparlimab)。

製品及套組

【0171】 提供包含適用於治療CD47相關疾病之材料之製品，該疾病例如為CD47表現性(諸如CD47過度表現性)癌症，例如實體腫瘤癌(諸如肺癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胰臟癌、肉瘤癌、頭頸癌、胃癌、腎癌或皮膚癌等)；或血液癌，例如非霍奇金淋巴瘤(諸如瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤(FL)、套細胞淋巴瘤(MCL)等)。在某些實施例中，製品或套組包含容器，該容器含有本文所描述之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)或組合物中之一或多種。在某些實施例中，製品或套組包含容器，該容器含有一或多種編碼本文所描述之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)或組合物中之一種(或多種)之核酸。在一些實施例中，套組包括產生如本文所描述之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)之細胞株的細胞。在一些實施例中，套組包括一或多種例如CD47 (或其片段)或CD47⁺細胞之陽性對照。在一些實施例中，套組包括例如實質上不含CD47之表面或溶液或不表現CD47之細胞的陰性對照。

【0172】 在某些實施例中，製品或套組包含容器及處於容器上或容

器隨附之標籤或藥品說明書。合適容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、IV 溶液袋、試管等。容器可由諸如玻璃或塑膠之各種材料形成。容器容納一種組合物本身或與有效治療、預防及/或診斷CD47相關疾病或病症之另一組合物之組合，該疾病或病症例如為癌症，諸如實體腫瘤癌(例如肺癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胰臟癌、肉瘤癌、頭頸癌、胃癌、腎癌或皮膚癌等)或血液癌(例如非霍奇金淋巴瘤(NHL)，諸如瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤(FL)、套細胞淋巴瘤(MCL)等)。容器可具有無菌出入口(例如，容器可為靜脈內溶液袋或具有可藉由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。組合物中之至少一種藥劑為本文所描述之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)。在一些實施例中，標籤或藥品說明書指示組合物用於治療CD47相關疾病或病症(例如癌症，諸如實體腫瘤癌(例如肺癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胰臟癌、肉瘤癌、頭頸癌、胃癌、腎癌或皮膚癌等)或血液癌(例如非霍奇金淋巴瘤(NHL)，諸如瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤(FL)、套細胞淋巴瘤(MCL)等)。在一些實施例中，標籤或藥品說明書指示組合物用於治療諸如復發性實體腫瘤及/或難治性實體腫瘤之實體腫瘤(例如肺腫瘤、卵巢腫瘤、結腸直腸腫瘤、胰臟腫瘤、肉瘤腫瘤、頭頸腫瘤、胃腫瘤、腎腫瘤或皮膚腫瘤)。在一些實施例中，標籤或藥品說明書指示組合物與利妥昔單抗組合用於治療個體，例如已經歷至少一種針對NHL之先前治療，諸如用抗CD20劑進行之治療之個體的非霍奇金淋巴瘤(NHL)，諸如復發性NHL及/或難治性NHL。

【0173】 此外，製品或套組可包含(a)其中含有組合物之第一容器，其中組合物包含本文所描述之抗CD47抗體(或其免疫活性片段)；及(b)其中含有組合物之第二容器，其中組合物包含另一細胞毒性劑或其他治療劑

(例如利妥昔單抗，其中套組係用於治療NHL)。另外，製品可進一步包含額外容器，該容器包含諸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液之醫藥學上可接受之緩衝劑。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所需之其他材料，該等材料包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

【0174】亦提供適用於各種目的，例如用於分離或偵測例如獲自個體之組織樣本中之CD47，視情況與製品組合之套組。為了分離且純化CD47，套組可含有與珠粒(例如瓊脂糖凝膠珠粒)偶合之本文提供之抗CD47抗體(或其片段)。可提供含有抗體(或其片段)之套組以例如在ELISA或西方墨點法中活體外偵測及定量CD47。如同製品，套組包含容器及處於容器上或容器隨附之標籤或藥品說明書。舉例而言，容器容納包含至少一種本文提供之抗CD47抗體之組合物。可包括額外容器，該等容器含有例如稀釋劑及緩衝劑、對照抗體。在抗體經酶標記之情況下，套組將包括酶所需之受質及輔因子(例如提供可偵測發色團或螢光團之受質前驅體)。各種試劑之相對量可廣泛變化以提供實質上使檢驗靈敏度最佳化之試劑溶液中之濃度。特定言之，試劑可以乾燥粉末，通常凍乾粉末形式提供，該等粉末包括賦形劑，其在溶解時將提供具有適當濃度之試劑溶液。標籤或藥品說明書可提供組合物之描述以及用於預期活體外或診斷性用途(例如偵測CD47、診斷CD47相關疾病或病症)或監測CD47相關疾病或病症之治療進展的說明書。

【0175】本說明書中所引用之所有公開案及專利申請案均以引用之方式併入本文中，如同各個別公開案或專利申請案特定地且個別地指示為以引用之方式併入一般。

實例

【0176】 提出以下實例以便向一般熟習此項技術者提供如何製造且使用本發明之完整揭示內容及描述，且不意欲限制本發明人視為其發明之內容之範疇，其亦不意欲表示以下實驗為所執行之所有或唯一實驗。已努力確保關於所用數字(例如量、溫度等)之精確度，但應考慮一些實驗誤差及偏差。除非另外指示，否則份數為重量份，分子量為重量平均分子量，溫度以攝氏度為單位，且壓力為大氣壓或近大氣壓。

材料及方法

噬菌體庫建立

【0177】 CD47為具有胞外N端IgV域、五個跨膜域及短C端胞內尾之50 kDa膜受體。與人類Fc或經生物素標記之人類CD47-IgV域(ACROBiosystems)結合之人類CD47-IgV域用作用於噬菌體庫淘選之抗原。

【0178】 使用噬菌質體載體構築噬菌體庫，該等噬菌質體載體由自> 50名健康人類個體之脾或骨髓擴增之抗體基因片段組成。抗體格式為單鏈可變片段(scFv、VH + 連接子+ VL)。庫大小為 1.1×10^{10} 且如下分析序列多樣性。對於自庫選取且經進一步定序之62個殖株，16個序列經截短，具有框移突變或琥珀密碼子；46個序列具有全長scFv，其所有HCDR3序列均為獨特的。在46個全長scFv中，13個序列具有 λ 輕鏈，且33個序列具有 κ 輕鏈。

噬菌體淘選及殖株選擇

【0179】 為了獲得特異性結合至人類CD47-IgV域之噬菌體殖株，使用兩種噬菌體淘選方法。

1. 針對人類CD47-IgV之噬菌體庫免疫管淘選

【0180】 在此方法中，首先將如上文所描述發展之噬菌體庫在塗有酪蛋白之免疫管中培育2小時。使用人類CD47-IgV-Fc融合蛋白用於第一輪淘選。藉由用PBST洗滌5-20次移除未經結合之噬菌體。用新製100 mM三乙胺溶液溶離經結合之噬菌體，且藉由添加Tris-HCl緩衝劑將其中和，從而變為第一輸出噬菌體池。經由使TG-1細胞感染大腸桿菌來拯救此第一輸出噬菌體池以用於擴增，接著使用經生物素標記之人類CD47-IgV作為抗原進行第二輪淘選。以相同方法溶離經結合之噬菌體且其變為第二輸出噬菌體池，隨後拯救第二輸出噬菌體池，且隨後再次接著使用人類CD47-IgV-Fc融合蛋白作為抗原進行第三輪淘選。經結合之噬菌體隨後變為第三輸出噬菌體池且使用經生物素標記之人類CD47-IgV經歷第四輪淘選。

2. 針對人類CD47-IgV之噬菌體庫溶液淘選

【0181】 在此第二方法中，首先在經酪蛋白阻斷之100 μ L鏈黴抗生物素蛋白磁珠中培育噬菌體庫以耗乏鏈黴抗生物素蛋白珠粒結合子。使用鏈黴抗生物素蛋白-磁珠及AG0084-huIgG1/k用於負耗乏。拯救經耗乏之庫，接著使用經生物素標記之人類CD47-IgV作為抗原進行第二輪淘選，且進一步經歷用經酪蛋白阻斷之鏈黴抗生物素蛋白磁珠進行之負耗乏。藉由用PBST洗滌5-20次移除未經結合之噬菌體。用新製100 mM三乙胺溶液溶離經結合之噬菌體，藉由添加Tris-HCl緩衝劑將其中和，且隨後對其進行拯救，接著使用人類CD47-IgV-Fc融合蛋白進行第三輪淘選且用AG0084-huIgG1/k進行耗乏。經結合之噬菌體隨後變為第三輸出噬菌體池且使用經生物素標記之人類CD47-IgV經歷第四輪淘選且用經酪蛋白阻斷

之鏈黴抗生物素蛋白磁珠進行負耗乏。

【0182】 在此過程之後，獲得且富集特異性結合至人類CD47-IgV域之多個噬菌體菌株。隨後，稀釋噬菌體菌株且將其塗鋪以在37°C下生長8小時且藉由塗有抗 κ 抗體之過濾器捕捉隔夜。將經生物素標記之人類CD47-IgV (50 nM)及中性抗生物素蛋白-AP結合物(1:1000稀釋度)施用至過濾器以偵測經正結合之噬菌體菌株。選取陽性噬菌斑且將其溶離至100 μ L噬菌體溶離緩衝劑中。使用約10-15 μ L經溶離噬菌體來感染1 mL XL1藍細胞以製造高力價噬菌體(HT)以用於噬菌體單點ELISA (SPE)。使自過濾器升液器選取之陽性單一菌株經受人類CD47-IgV-Fc融合蛋白與經生物素標記之人類CD47-IgV域蛋白之結合。亦對此等陽性單一菌株之VH及VL基因進行定序。將具有獨特VH及VL基因之所有陽性命中(positive hit)選殖至表現載體pFUSE2ss-CLIg-hk (輕鏈，InvivoGen，目錄號pfuse2ss-hclk)及pFUSEss-CHIg-hG1 (重鏈，InvivoGen，目錄號pfusess-hchg1)中。在HEK293細胞中表現抗體且藉由蛋白A加瓊脂糖純化抗體。

抗CD47抗體之親和力成熟

【0183】 如上文所描述獲得之CD47抗體之結合親和力可藉由活體外親和力成熟，例如藉由產生亦在本發明之範疇內之經突變序列之位點特異性隨機化突變來改善。

【0184】 舉例而言，基於BiaCore分析，對CD47抗體之重鏈及輕鏈之CDR序列之分析可鑑別HCDR1區及LCDR1區中可隨機化/經突變之若干殘基。因此，可構築隨機突變誘發庫且將其引入特異性殘基中以生成各種新序列。在平衡條件下使用於溶液相中之經生物素標記之可溶性CD47 ECD淘選CDR突變誘發庫。在伴隨抗原濃度降低之多輪淘選之後，選擇

富集輸出結合子以用於結合ELISA試驗且隨後轉化成全IgG，使全IgG經受BiaCore分析以特異性選擇解離速率經改善之序列。經由此篩檢過程，可針對用於臨床應用之總體最佳特性構築本發明之額外抗體分子。

實例1. 對結合至重組CD47-ECD (胞外域)之噬菌體菌株之ELISA篩檢

【0185】 在室溫(RT)下將2 µg/mL於磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)中之重組人類CD47 IgV-Fc融合蛋白(Acrobiosystems)塗佈至微量滴定盤上2小時。塗佈抗原後，在RT下用PBS/0.05% Tween (PBST)及1% BSA阻斷孔1小時。用PBST洗滌孔之後，將來自單一菌株之經純化噬菌體添加至孔中且在RT下培育1小時。為了偵測結合噬菌體菌株，添加針對M13之辣根過氧化酶(HRP)結合型二級抗體(Jackson Immuno Research)，接著添加螢光受質(Roche)。在所有培育步驟之間，用PBST洗滌盤之孔三次。在TECAN Spectrafluor盤讀取器中量測螢光。選擇陽性噬菌體菌株以用於對重鏈及輕鏈基因進行定序。

【0186】 如上文所描述獲得之CD47抗體顯示針對重組人類CD47 IgV-Fc融合蛋白之良好結合活性。

實例2. 對阻斷CD47與SIRPα相互作用之抗體之ELISA分析

【0187】 在RT下將1 µg/mL於PBS中之重組人類CD47 IgV/小鼠Fc融合蛋白或經生物素標記之CD47 IgV蛋白(Acrobiosystems)塗佈至微量滴定盤上2小時。塗佈抗原後，在RT下用PBS/0.05% Tween (PBST)及1% BSA阻斷孔1小時。用PBST洗滌孔之後，將稀釋於PBS中之抗體添加至孔中(5 µg/mL)且在RT下培育1小時。為了偵測抗體之結合，添加針對人類Fc之HRP結合型二級抗體(Jackson Immuno Research)，接著添加螢光受質(Roche)。在所有培育步驟之間，用PBST洗滌盤之孔三次。在TECAN

Spectrafluor盤讀取器中量測螢光。

【0188】 CD47抗體A1A及B2B顯示針對重組人類CD47-Fc融合蛋白及經生物素標記之CD47蛋白之良好結合活性。

實例3. 對阻斷CD47與SIRP α 相互作用之抗體之ELISA分析

【0189】 在4°C下將1 μ g/mL於PBS中之重組hCD47 IgV-Fc融合蛋白(Acrobiosystems)塗佈至微量滴定盤上16小時。在RT下用1% BSA/PBST阻斷1小時之後，在RT下在不存在或存在抗CD47抗體(10 μ g/mL)之情況下添加1 μ g/ml SIRP α -His蛋白1小時。隨後，洗滌盤三次且在RT下與HRP結合型抗His二級抗體一起培育1小時。洗滌之後，將TMB溶液添加至各孔中30分鐘，且用2.0 M H₂SO₄停止反應，且量測在490 nm下之OD。

【0190】 CD47抗體A1A及B2B有效阻斷CD47與SIRP α 之結合。B2B及A1A之VH域、VL域、重鏈及輕鏈之胺基酸序列示於圖15中。

實例4. 結合至單體CD47-ECD之抗CD47抗體之劑量依賴性反應

【0191】 在直接結合及競爭篩檢之後，相比於兩種已知參考抗CD47抗體，亦即F59及2A1，選擇抗CD47抗體B2B用於此試驗。在RT下將1 μ g/mL於PBS中之經生物素標記之CD47蛋白(Acrobiosystems)塗佈至微量滴定盤上2小時。塗佈抗原後，在RT下用PBS/0.05% Tween (PBST)及1% BSA阻斷孔1小時。用PBST洗滌孔之後，將不同濃度之抗CD47抗體添加至孔中且在RT下培育1小時。為了偵測抗體與CD47之結合，添加針對人類Fc之HRP結合型二級抗體(Jackson Immuno Research)，接著添加螢光受質(Roche)。在所有培育步驟之間，用PBST洗滌盤之孔三次。在TECAN Spectrafluor盤讀取器中量測螢光。

【0192】 參考抗體5F9及2A1係根據Hu5F9及CC-90002之序列產

生，如由Stanford University、Inhibrx有限責任公司及Celgene公司處之研究人員所揭示（參見例如美國專利第9,017,675 B2號、美國專利第9,382,320號、美國專利第9,221,908號、美國專利申請公開案第2014/0140989號及WO 2016/109415），且用於相同研究。

【0193】如圖1中所示，抗CD47抗體B2B顯示優於5F9及2A1之結合活性之針對單體CD47-ECD之結合活性。B2B之0.09 nM EC50低於5F9之EC50 (0.11 nM)及2A1之EC50 (0.25 nM)。

實例5. 結合至二聚體CD47-ECD之抗CD47抗體之劑量依賴性反應

【0194】在實例4中鑑別之兩種抗CD47抗體(亦即A1A及B2B)亦用於此研究中。

【0195】在RT下將1 µg/ml於PBS中之CD47 IgV/小鼠Fc融合蛋白(Acrobiosystems)塗佈至微量滴定盤上2小時。塗佈抗原後，在RT下用PBS/0.05% Tween (PBST)及1% BSA阻斷孔1小時。用PBST洗滌孔之後，將不同濃度之抗CD47抗體添加至孔中且在RT下培育1小時。為了偵測結合抗體，添加針對人類Fc之HRP結合型二級抗體(Jackson Immuno Research)，接著添加螢光受質(Roche)。在所有培育步驟之間，用PBST洗滌盤之孔三次。在TECAN Spectrafluor盤讀取器中量測螢光。

【0196】抗CD47抗體B2B顯示以劑量依賴性方式針對二聚體CD47-ECD之結合活性。

實例6. 阻斷CD47與SIRPα結合之抗CD47抗體之劑量依賴性反應

【0197】在4℃下將1 µg/ml於PBS中之重組CD47-Fc融合蛋白(Acrobiosystems)塗佈至微量滴定盤上16小時。在RT下用1% BSA/PBST阻斷1小時之後，在RT下在不存在或存在不同濃度之抗CD47抗體之情況

下添加1 $\mu\text{g/mL}$ SIRP α -His蛋白1小時。隨後，洗滌盤三次且在RT下與HRP結合型抗His二級抗體一起培育1小時。洗滌之後，將TMB溶液添加至各孔中30分鐘，且用2 M H_2SO_4 停止反應，且量測在490 nm下之OD。

【0198】如圖2中所示，抗CD47抗體B2B顯示以劑量依賴性方式阻斷CD47與SIRP α 結合之活性，其中 EC_{50} 為0.18 nM。

實例7A. 結合至CD47⁺ Raji細胞之抗CD47抗體之劑量依賴性反應

【0199】在4°C下用不同濃度之抗CD47抗體染色內源性表現於表面上之人類CD47之Raji細胞30分鐘。隨後，用PBS洗滌細胞三次，接著與經APC標記之抗人類Fc特異性抗體(Invitrogen)一起在4°C下培育30分鐘。使用FACSCanto (Becton-Dickinson)來量測結合。

【0200】如圖3中所示，抗CD47抗體B2B顯示遵循相同之劑量依賴性模式之結合至CD47⁺ Raji細胞之活性，其中 EC_{50} 為0.12 nM。

實例7B. 結合至腫瘤細胞之抗CD47抗體之劑量依賴性反應

【0201】用不同腫瘤譜系中一組12個腫瘤細胞株進行類似研究，該等腫瘤譜系包括用於評估本發明抗體之結合強度之白血病譜系及實體腫瘤譜系。

【0202】如圖4中所示，抗CD47抗體B2B顯示在12個測試細胞株(亦即SK-OV-3、Toledo、K562、HCC827、Jurkat、U937、TF-1、Raji、SU-DHL-4、MDA-MB-231、A375及SK-MES-1)上與5F9相當之結合強度模式，此在如下文所論述之相同腫瘤細胞株中經B2B及5F9之吞噬作用模式緊密校正。

實例8A. 對人類巨噬細胞對腫瘤細胞之吞噬作用之研究

【0203】自人類血液分離周邊血液單核細胞(PBMC)，且將單核球

分化成巨噬細胞，持續6天。將單核球衍生之巨噬細胞(MDM)刮下且再塗鋪於24孔器皿中且使其黏附24小時。選擇內源性表現CD47之Raji細胞作為目標細胞，且使其經1 μ M羧基螢光素丁二醯亞胺酯(CFSE)標記10分鐘，隨後以5:1腫瘤細胞/吞噬細胞之比率添加至單核球衍生之巨噬細胞(MDM)中。隨後，添加各種劑量之抗CD47抗體。在培育3小時之後，用PBS洗掉未經吞噬目標細胞且刮掉剩餘吞噬細胞，用巨噬細胞標記物CD14抗體染色，且藉由流動式細胞測量術進行分析。藉由對CD14⁺細胞閘控且隨後評估CFSE⁺細胞百分比來量測吞噬作用。

【0204】如圖5中所示，抗CD47抗體B2B顯示在促進人類巨噬細胞對腫瘤細胞之吞噬作用方面與抗CD47抗體5F9及2A1之活性類似的活性。

實例8B. 對腫瘤細胞之吞噬作用之進一步研究

【0205】用不同腫瘤譜系中一組12個腫瘤細胞株進行類似研究，該等腫瘤譜系包括用於評估本發明抗體之吞噬強度之白血病譜系及實體腫瘤譜系。如圖6中所示，抗CD47抗體B2B顯示在促進SK-OV-3、Toledo、K562、HCC827、Jurkat、U937、TF-1、Raji、SU-DHL-4、MDA-MB-231、A375及SK-MES-1細胞之吞噬作用方面與抗CD47抗體5F9之活性相當的活性。

實例9. 紅血球(RBC)凝集檢驗中之RBC保留特性

【0206】將人類RBC在PBS中稀釋至10%且在圓底96孔盤之孔中滴定抗CD47抗體之情況下在37°C下培育2小時。血球凝集之跡象係藉由未沈降RBC之存在來證實，未沈降RBC與未血球凝集RBC之斑點紅點相比呈現為混濁。

【0207】抗CD47抗體B2B在高達30 μ g/ μ L或甚至高達150 μ g/mL之

測試濃度下不造成RBC凝集。

實例10. RBC結合檢驗

【0208】藉由流動式細胞測量術檢查針對人類RBC之CD47抗體之結合。在4℃下將人類RBC與CD47抗體(10 µg/mL)一起培育1小時，接著在4℃下添加別藻藍蛋白(APC)結合型二級抗體30分鐘。

【0209】如圖9A中所示，抗CD47抗體B2B在測試濃度下僅引起極低RBC結合(通常低於15%)，而參考抗CD47抗體5F9在相同濃度下顯示高得多之RBC結合(通常在70%-90%之間)。

實例11. RBC凝集檢驗

【0210】自六個雄性及六個雌性健康個人收集RBC以藉由添加CD47抗體分析RBC凝集。

【0211】如圖9B中所示，抗CD47抗體B2B不顯示RBC凝集，但參考抗CD47抗體5F9及2A1造成顯著凝集。

實例12. 血小板結合檢驗

【0212】藉由流動式細胞測量術檢查針對人類血小板之本發明CD47抗體之結合。將人類周邊全血與本文所描述之測試CD47抗體(10 µg/mL)或SIRPα-Ig融合物一起培育，且將CD61染色為血小板之細胞表面標記物。藉由對CD61陽性群體(血小板)閘控且進一步檢查CD47或SIRPα-Ig融合物結合百分比來量測抗CD47抗體或SIRPα-Ig融合物之結合。

【0213】抗CD47抗體B2B並不明顯地結合至人類血小板，而SIRPα-Ig融合蛋白明顯地結合至人類血小板。

實例13. 由CD47抗體誘發之原發性人類急性骨髓白血病細胞之吞噬作用

【0214】用1 µM羧基螢光素丁二醯亞胺酯(CFSE)標記來自人類急

性骨髓白血病(AML)患者之原發性周邊血液單核細胞(PBMC) 10分鐘，隨後以5:1腫瘤細胞/吞噬細胞之比率添加至單核球衍生之巨噬細胞(MDM)中，且添加各種濃度之指定CD47抗體。在3小時培育之後，用PBS洗掉未經吞噬之目標細胞且刮掉剩餘吞噬細胞，用CD14抗體染色，且藉由流動式細胞測量術進行分析。藉由對CD14⁺細胞閘控且隨後評估CFSE⁺細胞百分比來量測吞噬作用。如先前所描述量測吞噬作用。

【0215】分別如圖7及圖8中所示，抗CD47抗體B2B顯示顯著之AML結合能力(大於95%)及吞噬能力(至少36%)，此與參考抗CD47抗體5F9之活性相當。

實例14. 抗CD47抗體B2B在螢光素酶-Raji細胞株衍生之異種移植(CDX)模型中之活體內功效

【0216】使NOD scid γ (NSG)小鼠經由尾部靜脈注射以1百萬個細胞/小鼠之濃度移植Raji Luc-EGFP (增強型綠色螢光蛋白)。使小鼠活體內成像以測定移植後五天之移植含量。使用抗CD47抗體B2B進行之治療係以不同劑量自同一天開始。向對照組給予媒劑。經由腹膜內注射每隔一天向所有小鼠進行注射。在抗體治療之後第0、4、7、11、14、18及21天，經由IVIS Lumina III成像系統使小鼠活體內成像。藉由經由活體內活體成像系統分析生物發光輻射度來量測小鼠中之腫瘤生長。

【0217】在Raji-異種移植研究結束時，將所有小鼠安樂死。自經B2B治療之小鼠及經媒劑治療之小鼠分離脾細胞，且藉由流動式細胞測量術分析對M1巨噬細胞百分比(F4/80陽性巨噬細胞中之陽性CD80 %)及M2巨噬細胞百分比(F4/80陽性巨噬細胞中之陽性CD206 %)進行分析。

【0218】圖11顯示經抗CD47抗體B2B治療之小鼠之發光強度在10

mg/kg治療之後持續降低，但在較低濃度之治療之後僅略微增加。此表明B2B有效誘導攜帶腫瘤之小鼠之巨噬細胞極化。

實例15. 食蟹獼猴中之藥理學安全性研究

【0219】 先導-單次劑量：向未處理食蟹獼猴靜脈內輸注媒劑(n=2)、抗CD47抗體B2B (n=3，劑量=15 mg/kg)或抗CD47抗體5F9 (n=3，劑量=15 mg/kg)。在血液收集之後24小時內、在抗CD47抗體投與之前兩次及在抗體投與之後3、6、10、14及21天分析血液學(全血球計數或「CBC」)。檢查包括紅血球計數(亦稱為紅血球或「RBC」)、血紅蛋白(或「HGB」)、絕對網狀紅血球計數及血小板計數之CBC參數。

【0220】 先導-重複劑量：類似地，向未處理食蟹獼猴(n=2隻)靜脈內注射20 mg/kg劑量之抗CD47抗體B2B。在不同時間點藉由靜脈穿刺將來自各猴之血液樣本收集至無抗凝血劑之試管中。在抗體投與之後的指定時間點檢查血液學(CBC)參數。在抗體投與之後的指定時間點，血液參數包括紅血球計數(RBC)、血紅蛋白(HGB)計數、血小板計數及淋巴球計數。

【0221】 圖10A及圖10B顯示抗CD47抗體B2B在投與後未誘發食蟹獼猴之顯著血液變化。

【0222】符合優良實驗室操作規範(GLP)之食蟹獼猴中4週重複劑量靜脈內(IV)毒性研究如下執行。向未處理食蟹獼猴靜脈內輸注10 mg/kg、30 mg/kg或100 mg/kg重複劑量(每週給藥)之抗CD47抗體B2B。在指定時間點檢查包括紅血球計數(RBC)、血紅蛋白(HGB)計數、血小板計數及淋巴球計數之血液學(CBC)參數。**圖10A**顯示單次劑量B2B治療與5F9治療相比對RBC及血紅蛋白之含量具有最少影響。**圖10B**顯示用不同劑量之

B2B進行之重複治療與媒劑對照相比未顯著地影響雄性及雌性食蟹獼猴之RBC。

實例16. 患有復發性/難治性實體腫瘤及淋巴瘤之患者之臨床研究

【0223】 在患有復發性/難治性惡性病之患者中用抗CD47抗體B2B進行雙部分臨床研究。臨床研究之部分1由B2B劑量遞增組成，且部分2為劑量擴展研究。在劑量遞增(部分1)期間，向患有復發性/難治性實體腫瘤之患者投與靜脈內週劑量(1 mg/kg至30 mg/kg)之B2B以基於實體腫瘤反應評估準則(RECIST 1.1版)及iRECIST來測定耐受性、安全性、藥物動力學(PK)、藥效動力學(PD)及抗腫瘤活性。(參見例如Eisenhauer等人(2009) *European J. Cancer*. 45:228-247及Seymour等人(2017) *Lancet Oncol.* 18(3): e143-e152。

【0224】 更特定言之，將二十名患有復發性/難治性實體腫瘤之患者分派至五個B2B劑量遞增群組(1、3、10、20及30 mg/kg)中之一個中。B2B毒性之可管控程度高達30 mg/kg而未觀測到任何劑量限制性毒性(DLT)。最常見之治療相關不良事件(TRAЕ)為貧血(30.0%，n=6)、疲勞(25.0%，n=5)、輸注相關反應(20.0%，n=4)及腹瀉(15.0%，n=3)。所有TRAЕ均為1級或2級。在所有群組中觀測到在第一週期期間血紅蛋白短暫地非劑量依賴性地平均減少1.5 mg/dL (範圍：0.4-2.6 mg/dL)，此與臨床前良好實驗室操作規範毒性研究之結果一致。在任何群組中未觀測到實驗室或臨床溶血跡象。初步結果指示在單次劑量後，B2B之藥物動力學似乎在中等至高劑量含量下為線性的。CD47受體佔有率在20 mg/kg及更大之峰值濃度下在周邊T細胞上顯示完全飽和。

【0225】 如圖12-14中所示，本發明之抗CD47抗體(亦即，B2B)之

安全程度似乎高達30 mg/kg且在患有復發性/難治性實體腫瘤之患者中具有有利之藥物動力學(PK)及藥效動力學(PD)特徵。已觀測到大於2級之TRAE。

實例17. 抗CD47抗體生產

【0226】 合成編碼抗體B2B之重鏈(SEQ ID NO. 3)及輕鏈(SEQ ID NO. 4)之cDNA且分別將其選殖至內部載體PIM4.0中。隨後，將包含該等cDNA之載體穩定共轉染至CHO-K1宿主細胞中以產生抗體。同時產生經包含編碼抗體C3C重鏈(SEQ ID NO. 7)及輕鏈(SEQ ID NO. 8)之核酸之載體穩定轉染的參考細胞株。

【0227】 在小型池選擇及一系列擴增之後，將表現B2B或C3C之CHO-K1細胞分別以 5×10^5 個細胞/毫升之密度接種至於50 mL旋轉管中之ActiPro培養基中。各抗體製備有三個批料，各批料之工作體積為20 mL。使用細胞加打7a (CB7a)及細胞加打7b (CB7b) (10:1)作為饋料培養基。簡言之，在第3天、第6天、第8天、第10天及第12天添加0%~5.0% CB7a及0%~0.5% CB7a。饋料百分比及饋料日係基於生長及代謝概況而加以調整。亦將葡萄糖添加至培養物中。在Kuhner振盪器(36.5°C、75%濕度、6% CO₂、225 RPM)中培育饋料批式培養物。(a)當活細胞密度(VCD)達到約 16×10^6 個細胞/毫升時或(b)在第7天，以先到者為準，將培養溫度變為31°C。

【0228】 在第10天及第14天採集來自各批料之饋料批式培養物。藉由蛋白A-HPLC量測來自所採集培養物之上清液之力價。各批料之力價如表I以及圖16A及圖16B中所示。

表1. 饋料批式培養物之生產力價

池ID	第14天時之最終力價(g/L)	平均最終運作力價(g/L)	第10天時之力價(g/L)	第10天時之平均運作力價(g/L)
B2B-批料1	2.90	2.58±0.37	1.74	1.58±0.24
B2B-批料2	2.65		1.70	
B2B-批料3	2.18		1.30	
C3C-批料1	1.99	1.79±0.18	1.18	1.09±0.11
C3C-批料2	1.74		0.97	
C3C-批料3	1.65		1.12	

【0229】 藉由單步蛋白A純化進一步純化各抗體之前兩個池之饋料批式培養物的上清液。隨後，使經蛋白A純化之抗體經受藉由如表2中所示之粒徑排阻層析法(SEC)及如表3中所示之毛細管電泳(CE)進行之品質分析。

表2. 最前面的穩定池之SEC概況

池ID	主峰(%)	HMW峰(%)	LMW峰(%)
B2B-批料3	97.5	2.4	0.1
B2B-批料2	97.7	2.2	0.1
C3C-批料1	97.8	1.6	0.6
C3C-批料2	98.2	1.3	0.5

表3. 最前面的穩定池之CE概況

池ID	主峰(%)	LC+HC (%)	LC (%)	HC (%)
B2B-批料3	95.9	97.7	33.3	64.4
B2B-批料2	95.4	98.2	33.4	64.8
C3C-批料1	93.2	97.7	33.0	64.7
C3C-批料2	93.3	98.2	33.6	64.6

【0230】 以上結果表明與表現抗體C3C之CHO-K1細胞相比，表現抗體B2B之CHO-K1細胞在第10天及終結日(例如第14天)產生顯著較高之抗體平均力價。表1顯示與抗體C3C相比優異之由CHO-K1細胞進行之抗B2B抗體生產。表2及表3顯示由CHO-K1細胞表現之抗體B2B之產物品質與由CHO-K1細胞表現之抗體C2C之產物品質相當。

實例18：在患有復發性/難治性惡性病之個體中作為經分化之抗CD47抗體

之冷佐巴單抗之第一次住院患者研究的初始單一療法結果

背景

【0231】 CD47在大部分癌症上經表現。阻斷CD47與SIRP α 之間的相互作用引起對「不要吃我」信號之抑制且導致表現CD47之腫瘤細胞之吞噬作用。作為藥物類別之抗CD47抗體已作為針對癌症之有前景療法出現，該療法由患有淋巴瘤(參見例如**實例22**)及白血病之患者之初始臨床資料支持。然而，CD47亦於紅血球(RBC)上天然地表現。初始臨床及臨床前研究已顯示，各種治療性抗CD47抗體可能會導致血液毒性，亦即嚴重貧血或血小板減少症。

【0232】 冷佐巴單抗(亦稱為TJ011133、TJC4或B2B)為IgG4同型之新穎之完全人類CD47抗體。其係藉由設計來加以獨特地選擇以與RBC最低程度地相互作用且與相同類別之其他CD47抗體高度區分開。冷佐巴單抗在食蟹獼猴中僅誘發最低程度及短暫之RBC含量減少(參見例如**圖9B**)。冷佐巴單抗之RBC保留特性在機制上可歸因於其對經RBC上之醣化屏蔽之CD47之獨特醣-抗原決定基的辨識。冷佐巴單抗對於(a)與各種腫瘤細胞類型結合、(b)活體外腫瘤吞噬作用及(c)小鼠異種移植模型中之腫瘤根除保持強烈活性。

方法/研究設計

【0233】 此實例提供1期研究之初步結果，該1期研究經設計以評估患有晚期復發性或難治性實體腫瘤及淋巴瘤之個體中之冷佐巴單抗之安全性、耐受性、最大可耐受劑量(MTD)或最大投與劑量(MAD)、藥物動力學(PK)及藥效動力學(PD)以及推薦2期劑量(RP2D)。在研究之部分1中，使用標準3+3設計中之單一藥劑劑量遞增。參見**圖17**。將冷佐巴單抗作為

每週IV輸注物以不具有在投與治療性抗CD47抗體時常用之任何初打劑量(例如一或多次低(~1 mg/kg)週劑量)之連續劑量群組(1、3、10、20及30 mg/kg)投與患有晚期復發性或難治性實體腫瘤之患者。

結果

基線特徵

【0234】 二十名患有晚期復發性或難治性實體腫瘤(亦即肺、卵巢、結腸直腸、胰臟、肉瘤、頭頸、胃、腎及皮膚)之患者參與單一療法劑量遞增研究。給予1、3、10、20或30 mg/kg冷佐巴單抗qw之患者基線特徵及患者數目示於表4中：

表4：基線特徵

		1 mg/kg (N=4)	3 mg/kg (N=4)	10 mg/kg (N=5)	20 mg/kg (N=6)	30 mg/kg (N=3)	總計 (N=20)
年齡	中值 (範圍)	69 (63、76)	59 (35、68)	61 (54、63)	59 (53、75)	59 (58、74)	62 (35、76)
性別	雌性	3	0	3	2	0	8 (40%)
	雄性	1	4	1	3	3	12 (60%)
種族	非裔美國	0	0	0	0	1	1 (5%)
	亞洲	0	0	0	1	0	1 (5%)
	白種	4	4	3	3	2	18 (90%)
ECOG PS	0	0	0	1	2	1	4 (25%)
	1	4	4	3	3	2	16 (75%)

安全性

【0235】 在整個研究中未報導劑量限制性毒性(DLT)或藥物相關嚴重副作用(SAE)。所有治療相關副作用(TAAE)均為1級或2級，一個3級脂肪酶增加之TAAE除外。參見表5 (GR=級別)。使用不良事件常見術語準則 (CTCAE) 5.0 版 對 所 有 毒 性 進 行 分 級 。 參 見 例 如 [ctep\(dot\)cancer\(dot\)gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7\(dot\)pdf](http://ctep(dot)cancer(dot)gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7(dot)pdf)。

表5：群組之治療相關不良事件(TRAЕ)

不良事件	1 mg/kg (N=4)		3 mg/kg (N=4)		10 mg/kg (N=4)		20 mg/kg (N=4)		30 mg/kg (N=3)		總計 (N=20)
	GR ANY	GR 3	GR ANY	GR 3	GR ANY	GR 3	GR ANY	GR 3	GR ANY	GR 3	GR ANY
貧血	0	0	2	0	2	0	1	0	1	0	6 (30%)
嗜中性白血球減少症	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (5%)
淋巴球計數減少	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1 (5%)
血小板計數減少	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1 (5%)
血液膽紅素增加	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1 (5%)
血液LDH減少	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (5%)
脂肪酶增加	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1 (5%)
疲勞	0	0	2	0	2	0	1	0	2	0	7 (35%)
發冷	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1 (5%)
輸注相關反應	0	0	0	0	2	0	2	0	1	0	5 (25%)
便秘	0	0	0		0	0	1	0	0	0	1 (5%)
腹瀉	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3 (15%)
噁心	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1 (5%)
呼吸困難	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (5%)
低血壓	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (5%)

對血紅蛋白及網狀紅血球含量之影響

【0236】 在所有群組中觀測到在第一週期(亦即，21天)期間血紅蛋白含量短暫地減少。圖18A顯示所有20名患者之血紅蛋白及網狀紅血球含量之時程，且圖18B顯示接受最高劑量(30 mg/kg)之冷佐巴單抗之患者之血紅蛋白及網狀紅血球含量之時程。平均下降為~10%且不為劑量依賴性的。此發現與臨床前良好實驗室操作規範(GLP)毒性研究之結果一致。所報導之藥物相關貧血中無一者視為本質上嚴重或溶血性的。

藥物動力學(PK)

【0237】 在單次劑量後，在高於10 mg/kg之劑量下，冷佐巴單抗之PK概況呈現線性，然而其暴露量大於在1至10 mg/kg之劑量範圍內之成比例劑量，此表明在較高劑量下，冷佐巴單抗可克服CD47下沉效應。圖19A顯示在單次劑量後患者之冷佐巴單抗之血清PK，且圖19B顯示在多次劑量後患者之冷佐巴單抗qw之血清PK。在第一次治療之後確認五個個體對於抗藥物抗體(ADA)呈陽性：3個係1 mg/kg，1個係3 mg/kg且1個係10 mg/kg。未見到ADA對安全性或PK有影響。

藥效動力學(PD)

【0238】 CD47在周邊T細胞上之最大飽和(受體佔有率RO)係在每週投與冷佐巴單抗之後以20及30 mg/kg達成。參見圖20。

初步功效

【0239】 在30 mg/kg單一療法群組中觀測到一個經確認部分反應(PR) (1/3)。持續30 mg/kg qw單一療法且完成5個週期。患者患有轉移性黑色素瘤且已接受用納武單抗(nivolumab) (抗PD1抗體)及伊匹單抗(ipilimumab) (抗CTLA抗體)進行之先前全身性治療。參見圖21，其顯示黑色素瘤患者之反應性肝轉移。

結論

【0240】 在無初打給藥策略之情況下每週高達30 mg/kg之冷佐巴單抗呈現安全及良好耐受的。未觀測到劑量限制毒性且未達到最大耐受劑量。最常見不良事件包括疲勞及短暫貧血。未注意到治療相關嚴重不良事件。冷佐巴單抗PK在單次劑量後在中等至高劑量含量下似乎為線性的而無顯著下沉效應。在用檢查點抑制劑進行之先前治療失敗之一名患者(30

mg/kg)中觀測到單一療法臨床活性(部分反應)。

參考文獻

Willingham等人 (2012年) *PNAS USA*. 109(17): 6662-6667

Liu等人 (2015年) *PLOS One*. 10(9): e0137345

Sikic等人 (2019年) *J Clin Oncol*. 37:946-953。

實例22：作為經分化之抗CD47抗體之冷佐巴單抗與利妥昔單抗之組合在復發性及難治性非霍奇金氏淋巴瘤中之初始臨床結果

前言

【0241】 冷佐巴單抗(亦稱為TJ011133、TJC4及B2B)為靶向不同CD47抗原決定基之經分化之CD47 IgG4抗體，該抗體賦予獨特之紅血球保留特性，同時保留強抗腫瘤活性，如在患有實體腫瘤之患者中所展現。(參見實例21。) 冷佐巴單抗不誘發顯著血液毒性且可在不需要其他CD47抗體所需之一或多次初打劑量(例如，一或多次~1 mg/kg之低週劑量)之情況下投與。當在淋巴瘤動物模型中與利妥昔單抗組合時，冷佐巴單抗展現經增強之治療效果。

方法

【0242】 此為徵選患有CD20陽性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、具有至少兩種前線療法之復發性及難治性(R/R)患者之1b期研究。在3+3劑量遞增設計、接著為劑量擴展設計中，向患者投與冷佐巴單抗。將冷佐巴單抗以20 mg/kg之劑量每週或30 mg/kg之劑量每週與利妥昔單抗(375 mg/m²每週達5次劑量，接著為每月一次(q4w或每28天)達3次劑量)組合靜脈內投與。基於盧加諾準則(Lugano criteria)評估安全性、耐受性、藥物動力學(PK)、藥效動力學(PD)及抗腫瘤活性(參見Cheson等人 (2014年) *Journal*

of Clinical Oncology. 32:27, 3059-3067及Van Heertum等人 (2017年)
Drug Des Devel Ther. 11: 1719-1728)。

結果

【0243】 將八名經大量預治療、患有復發性/難治性非霍奇金淋巴瘤(R/R NHL)、在先前CD20靶向療法時惡化之患者徵選至20 mg/kg (n=6)及30 mg/kg (n=2)冷佐巴單抗與利妥昔單抗之組合的劑量群組中。診斷包括瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL) [n=2]、套細胞淋巴瘤(MCL) [n=1]及濾泡性淋巴瘤(FL) [n=5]。患者之中值年齡為63歲(範圍：43-83歲)且患者具有中值4次先前療法(範圍：2-10次)。**安全性及耐受性：**最常見之治療相關不良事件(TRAЕ)為輸注相關反應(n=4)、搔癢症(n=3)、疲勞(n=3)、疹(n=2)、便秘(n=2)及呼吸困難(n=2)。所有TRAЕ均為1級或2級，其中一個例外為在20 mg/kg劑量含量下報導為3級TRAЕ之TRAЕ，包括肋膜積液、心搏過速、咳嗽、搔癢症、疲勞、疹及呼吸困難。觀測到分別為貧血及血小板減少症之一個分離發作之輕度血液不良事件(AE)，且不需要治療。**PK及PD：**利妥昔單抗之共同投與並不影響冷佐巴單抗之PK或免疫原性。平均而言，在來自以20及30 mg/kg給藥之患者之活檢淋巴結中分別偵測到80%及90% CD47受體佔有率，此指示顯著腫瘤目標接合。**抗腫瘤活性：**在7名功效可評估患者中，觀測到FL之3個完全反應(CR) [1個經變換FL-DLBCL + 2個FL]及1個部分反應(PR) (ORR=57%)以及3種穩定疾病(3-6個月之間的SD持續時間)。總體疾病控制率(DCR)為100%。在所有可評估患者中觀測到腫瘤縮小。由於在第一週期時自研究撤回之後的臨床疾病惡化，因此一名患者之治療功效不可評估。達至治療初始反應之中值時間為2個月，且在資料截止時所有反應者均保持臨床反應。在繼續治療期間，

兩名患者出現經改善之反應。一名患有經變換FL-DLBCL之患者在第2個月時自PR改善至在第8個月時之CR，且另一患有FL之患者在第2個月時自SD改善至在第4個月時之PR。

結論

【0244】 與單一療法結果(參見**實例21**)一致，在患有R/R NHL之患者中，以20-30 mg/kg與利妥昔單抗組合給予之冷佐巴單抗安全且良好耐受，而不需要通常與其他治療性抗CD47抗體一起使用之初打劑量。在兩種劑量含量下均達到高程度之腫瘤內目標接合。組合療法在經大量預治療、在先前CD20靶向療法時惡化之R/R NHL患者中展現臨床活性跡象。

【0245】 已就本發明人所發現或提出之特定實施例而言描述本發明以包含用於實踐本發明之較佳模式。熟習此項技術者應瞭解，根據本發明，可在不脫離本發明之預期範疇之情況下在舉例說明之特定實施例中作出許多修改及改變。舉例而言，由於密碼子冗餘，因此可在不影響蛋白質序列之情況下對基礎DNA序列作出改變。此外，由於生物功能等效性考慮因素，因此可在不影響生物作用之種類或量之情況下對蛋白質結構作出改變。所有該等修改均意欲包括在隨附申請專利範圍之範疇內。

胺基酸及核酸序列

SEQ ID NO.	序列	描述
1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFERAWMNWVRQAPGK GLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISRDDSKNTLYLQMNSL KTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGTMVTVSS	B2B 之 VH
2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYAGNNRNYLAWYQQ KPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGTEFTLISSLQAEDVAIY YCQQYYTPPLAFGGGTKLEIK	B2B之VL
3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFERAWMNWVRQAPGK GLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISRDDSKNTLYLQMNSL KTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVTPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ	B2B之HC

	FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	
4	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYAGNNRNYLAWYQQ KPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGTEFTLISSLQAEDVAIY YCQQYYTPPLAFGGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	B2B之LC
5	RAWMN	B2B 之 HCDR1 (Kabat)
6	RIKRKTDGETTDYAAPVKG	B2B 之 HCDR2 (Kabat)
7	SNRAFDI	B2B 之 HCDR3 (Kabat)
8	KSSQSVLYAGNNRNYLA	B2B 之 LCDR1 (Kabat)
9	QASTRAS	B2B 之 LCDR2 (Kabat)
10	QQYYTPPLA	B2B 之 LCDR3 (Kabat)
11	KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFERAWMNWVRQAPGK GLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISRDDSKNTLYLQMNSL KTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGTMTVSA	C3C 之 VH
12	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYAGNNRNYLAWYQQ KPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGTEFTLISSLQAEDVAIY YCQQYYTPPLAFGGGGTKLEIK	C3C之VL
13	KVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFERAWMNWVRQAPGK GLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISRDDSKNTLYLQMNSL KTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGTMTVSAASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	C3C之HC
14	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYAGNNRNYLAWYQQ KPGQPPKLLINQASTRASGVPDRFSGSGSGTEFTLISSLQAEDVAIY YCQQYYTPPLAFGGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	C3C之LC
15	RAWMN	C3C 之 CDR-H1

		(Kabat)
16	RIKRKTDGETTDYAAPVKG	C3C 之 CDR-H2 (Kabat)
17	SNRAFDI	C3C 之 CDR-H3 (Kabat)
18	KSSQSVLYAGNNRNYLA	C3C 之 CDR-L1 (Kabat)
19	QASTRAS	C3C 之 CDR-L2 (Kabat)
20	QQYYTPPLA	C3C 之 CDR-L3 (Kabat)
21	GLTFERA	B2B 之 CDR-H1 (Chothia)
22	KRKTDGET	B2B 之 CDR-H2 (Chothia)
23	SNRAFDI	B2B 之 CDR-H3 (Chothia)
24	KSSQSVLYAGNNRNYLA	B2B 之 CDR-L1 (Chothia)
25	QASTRAS	B2B 之 CDR-L2 (Chothia)
26	QQYYTPPLA	B2B 之 CDR-L3 (Chothia)
27	GLTFERAW	B2B 之 CDR-H1 (IMGT)
28	IKRKTDGETT	B2B 之 CDR-H2 (IMGT)
29	AGSNRAFDI	B2B 之 CDR-H3 (IMGT)
30	QSVLYAGNNRNY	B2B 之 CDR-L1 (IMGT)
31	QA	B2B 之 CDR-L2 (IMGT)

32	QQYYTPPLA	B2B 之 CDR-L3 (IMGT)
33	GLTFERAWMN	B2B 之 CDR-H1 (AbM)
34	RIKRKTDGETTD	B2B 之 CDR-H2 (AbM)
35	SNRAFDI	B2B 之 CDR-H3 (AbM)
36	KSSQSVLYAGNNRNYLA	B2B 之 CDR-L1 (AbM)
37	QASTRAS	B2B 之 CDR-L2 (AbM)
38	QQYYTPPLA	B2B 之 CDR-L3 (AbM)
39	ERAWMN	B2B 之 CDR-H1 (Contact)
40	WVGRIKRKTDGETTD	B2B 之 CDR-H2 (Contact)
41	AGSNRAFD	B2B 之 CDR-H3 (Contact)
42	LYAGNNRNYLAWY	B2B 之 CDR-L1 (Contact)
43	LLINQASTRA	B2B 之 CDR-L2 (Contact)
44	QQYYTPPL	B2B 之 CDR-L3 (Contact)
45	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGACTCGTGAAGCCTG GAGGAAGCCTGAGGCTGTCCTGTGCCGCTTCCGGCCTCACCTTC GAGCGGGCTTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGG GCCTGGAATGGGTGGGCGCGATCAAGAGGAAAACAGATGGCG AGACCACCGATTACGCCGCTCCCGTGAAGGGCCGGTTTAGCAT CTCCAGGGACGACTCCAAGAACACCCTGTATCTGCAGATGAAC AGCCTGAAGACCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTGGCA GCAACAGGGCCTTTGATATCTGGGGCCAGGGCACCATGGTGAC AGTGTCTCTCC	B2B 之 VH
46	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGATTCCCTGGCCGTGAGCCT	B2B之VL

	GGGCGAAAGGGCTACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGAGCGTG CTGTACGCCGGCAACAACCGGAACTATCTGGCTTGGTACCAGC AGAAGCCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCAACCAGGCTAG CACCAGGGGCTTCCGGCGTGCCTGATAGGTTTCAGCGGCTCCGGCT CCGGCACCGAGTTTACCCTGATCATCTCCTCCCTGCAGGCCGAG GATGTGGCCATCTACTACTGCCAGCAGTACTACACCCCTCCTCT GGCCTTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG	
47	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGACTCGTGAAGCCTG GAGGAAGCCTGAGGCTGTCCTGTGCCGCTTCCGGCCTCACCTTC GAGCGGGCTTGGATGAACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGAAAGG GCCTGGAATGGGTGGGCCGGATCAAGAGGAAAACAGATGGCG AGACCACCGATTACGCCGCTCCCGTGAAGGGCCGGTTTAGCAT CTCCAGGGACGACTCCAAGAACACCCCTGTATCTGCAGATGAAC AGCCTGAAGACCGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGCTGGCA GCAACAGGGCCTTTGATATCTGGGGCCAGGGCACCATGGTGAC AGTGTCTCCGCCTCCACAAAGGGACCTTCCGTGTTCCCTCTGG CCCCTTGTTCCCGGTCCACCTCCGAAAGCACCGCTGCTCTGGGC TGCCTCGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCCCGTGACCGTGAGCTG GAACTCCGGCGCTCTGACAAGCGGCGTGCATACCTTCCCTGCCG TGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCTAGCTCCTCCCTGGGCACCAAAACCTACACCTGCAATG TGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTCGA GTCCAAGTACGGCCCTCCTTGCCCTCCCTGCCCGCTCCCGAGT TTCTGGGAGGACCCAGCGTGTTCCTCTTCCCCCCTAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCCGGACACCTGAGGTACCTGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCAAGAGGATCCTGAGGTCCAGTTCAACTG GTACGTGGACGGAGTGGAGGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCT CGGGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTATAGGGTGGTGAGCGTGC TCACAGTGCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAA ATGCAAGGTGTCCAACAAGGGACTCCCCAGCAGCATCGAAAAG ACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAGCCCAGGGAACCCCAAGGTGT ACACACTGCCCCCCTCCCAAGAGGAAATGACCAAGAATCAGGT GTCCCTGACCTGCCTGGTGAAAGGCTTTTACCCCAGCGACATCG CTGTGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAATAACTATAA GACCACCCCCCGTGCTGGATAGCGACGGATCCTTCTTCTCTCT ACTCCCGGCTGACCGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGGAGGGCAA CGTGTTTCAGCTGCTCCGTTCATGCACGAGGCCCTGCATAACCACT ACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGTGA	B2B之HC
48	GACATCGTGATGACCCAGTCCCCTGATTCCCTGGCCGTGAGCCT GGGCGAAAGGGCTACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGAGCGTG CTGTACGCCGGCAACAACCGGAACTATCTGGCTTGGTACCAGC AGAAGCCCCGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCAACCAGGCTAG CACCAGGGGCTTCCGGCGTGCCTGATAGGTTTCAGCGGCTCCGGCT CCGGCACCGAGTTTACCCTGATCATCTCCTCCCTGCAGGCCGAG GATGTGGCCATCTACTACTGCCAGCAGTACTACACCCCTCCTCT GGCCTTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACAGTG GCCGCCCCCTCCGTGTTTCATTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCT GAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCT ACCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCT GCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACTC CAAAGACAGCACATACAGCCTGTCCAGCACCCCTGACCCTGTCC	B2B之LC

	AAGGCTGACTATGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGA CCCACCAGGGACTGAGCTCCCCTGTGACCAAGTCCTTCAACCG GGGAGAGTGCTGA	
49	CGGGCTTGGATGAAC	B2B 之 HCDR1 (Kabat)
50	CGGATCAAGAGGAAAACAGATGGCGAGACCACCGATTACGCC GCTCCCGTGAAGGGC	B2B 之 HCDR2 (Kabat)
51	AGCAACAGGGCCTTTGATATC	B2B 之 HCDR3 (Kabat)
52	AAGTCCTCCCAGAGCGTGCTGTACGCCGGCAACAACCGGAACT ATCTGGCT	B2B 之 LCDR1 (Kabat)
53	CAGGCTAGCACCAGGGCTTCC	B2B 之 LCDR2 (Kabat)
54	CAGCAGTACTACACCCCTCCTCTGGCC	B2B 之 LCDR3 (Kabat)
55	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGLTFERAWMNWVRQAPGK GLEWVGRIKRKTDGETTDYAAPVKGRFSISRDDSKNTLYLQMNSL KTEDTAVYYCAGSNRAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG	B2B之HC

【序列表】

<110> 中國大陸喬天境生物科技（上海）有限公司(I-MAB BIOPHARMA CO., LTD.)

<120> 新穎之抗CD47抗體及其用途

<130> 23300-20002.41

<140> TW 110138242

<141> 2021-10-14

<150> PCT/CN2020/122188

<151> 2020-10-20

<150> PCT/CN2020/120869

<151> 2020-10-14

<160> 55

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 1

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

<210> 2
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 2
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ala
20 25 30
Gly Asn Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Asn Gln Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Thr Pro Pro Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 3
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 3
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Glu Arg Ala
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Glu Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Gly Ser Asn Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
115				120				125							
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
130				135				140							
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
145				150				155				160			
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
165				170				175							
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
180				185				190							
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
195				200				205							
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys
210				215				220							
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
225				230				235				240			
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
245				250				255							
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
260				265				270							
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
275				280				285							
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
290				295				300							
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305				310				315				320			
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
325				330				335							
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
340				345				350							
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
355				360				365							
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
370				375				380							
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385				390				395				400			
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
405				410				415							
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
420				425				430							
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys			
435				440				445							

<210> 4
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 4

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

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 5

Arg Ala Trp Met Asn
1 5

<210> 6

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 6

Arg Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Glu Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15
Val Lys Gly

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 7

Ser Asn Arg Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 8

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ala Gly Asn Asn Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 9

Gln Ala Ser Thr Arg Ala Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 10
Gln Gln Tyr Tyr Thr Pro Pro Leu Ala
1 5

<210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 11
Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Glu Arg Ala
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Glu Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Gly Ser Asn Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 12
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 12
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ala
20 25 30
Gly Asn Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Asn Gln Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95
Tyr Tyr Thr Pro Pro Leu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 13
<211> 445
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 13
Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Glu Arg Ala
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Glu Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Gly Ser Asn Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 14
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 14
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ala
20 25 30
Gly Asn Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

354045

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Asn Gln Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val

505560

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Ile

65707580

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

859095

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

100105110

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

115120125

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

130135140

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

145150155160

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

165170175

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

180185190

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

195200205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210215220

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 15
Arg Ala Trp Met Asn
15

<210> 16
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 16
Arg Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Glu Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
151015
Val Lys Gly

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 17
Ser Asn Arg Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 18
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ala Gly Asn Asn Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 19
Gln Ala Ser Thr Arg Ala Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 20
Gln Gln Tyr Tyr Thr Pro Pro Leu Ala
1 5

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 21
Gly Leu Thr Phe Glu Arg Ala
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 22
Lys Arg Lys Thr Asp Gly Glu Thr
1 5

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 23
Ser Asn Arg Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 24
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ala Gly Asn Asn Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 25
Gln Ala Ser Thr Arg Ala Ser
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 26
Gln Gln Tyr Tyr Thr Pro Pro Leu Ala
1 5

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 27
Gly Leu Thr Phe Glu Arg Ala Trp
1 5

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 28
Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Glu Thr Thr
1 5 10

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 29
Ala Gly Ser Asn Arg Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 30
Gln Ser Val Leu Tyr Ala Gly Asn Asn Arg Asn Tyr
1 5 10

<210> 31
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 31
Gln Ala
1

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 32
Gln Gln Tyr Tyr Thr Pro Pro Leu Ala
1 5

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 33
Gly Leu Thr Phe Glu Arg Ala Trp Met Asn
1 5 10

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 34
Arg Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Glu Thr Thr Asp
1 5 10

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 35

Ser Asn Arg Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 36
Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ala Gly Asn Asn Arg Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Ala

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 37
Gln Ala Ser Thr Arg Ala Ser
1 5

<210> 38
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 38
Gln Gln Tyr Tyr Thr Pro Pro Leu Ala
1 5

<210> 39
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 39
Glu Arg Ala Trp Met Asn
1 5

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 40
Trp Val Gly Arg Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Glu Thr Thr Asp
1 5 10 15

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 41
Ala Gly Ser Asn Arg Ala Phe Asp
1 5

<210> 42
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 42
Leu Tyr Ala Gly Asn Asn Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr
1 5 10

<210> 43
<211> 10
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 43

Leu Leu Ile Asn Gln Ala Ser Thr Arg Ala
1 5 10

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 44

Gln Gln Tyr Tyr Thr Pro Pro Leu
1 5

<210> 45

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 45

gaggtgcagc tggtggagag cggaggcgga ctcgtgaagc ctggaggaag cctgaggctg 60
tcctgtgccg ctccggcct caccttcgag cgggcttgga tgaactgggt gaggcaggcc 120
cctggaaagg gcctggaatg ggtgggccgg atcaagagga aaacagatgg cgagaccacc 180
gattacgccg ctcccgtaga gggccggttt agcatctcca gggacgactc caagaacacc 240
ctgtatctgc agatgaacag cctgaagacc gaggacaccg ctgtgtacta ctgcgctggc 300
agcaacaggg cctttgatat ctggggccag ggcaccatgg tgacagtgtc ctcc 354

<210> 46

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 46

gacatcgtga tgaccagtc ccctgattcc ctggccgtga gcctgggcga aagggtacc 60
atcaactgca agtcctccca gagcgtgctg tacgccggca acaaccggaa ctatctggt 120

tggtaccagc agaagcccgg ccagcctccc aagctgctga tcaaccaggc tagcaccagg 180
gcttccggcg tgcctgatag gttcagcggc tccggctccg gcaccgagtt taccctgac 240
atctcctccc tgcaggccga ggatgtggcc atctactact gccagcagta ctacaccct 300
cctctggcct ttggcggcgg caccaagctg gagatcaag 339

<210> 47
<211> 1338
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 47
gaggtgcagc tggtagagag cggaggcggg ctctgaagc ctggagggaag cctgaggctg 60
tcctgtgccg ctcccgccct caccctcgag cgggcttgga tgaactgggt gaggcaggcc 120
cctggaaagg gcctggaatg ggtgggcccg atcaagagga aaacagatgg cgagaccacc 180
gattacgccg ctcccgtaga gggccggttt agcatctcca gggacgactc caagaacacc 240
ctgtatctgc agatgaacag cctgaagacc gaggacaccg ctgtgtacta ctgcgctggc 300
agcaacaggg ctttgataat ctggggccag ggcaccatgg tgacagtgtc ctccgcctcc 360
acaaagggac ctcccggtt cctcttggcc cttgttccc ggtccacctc cgaaagcacc 420
gctgctctgg gctgcctcgt caaggactac ttccctgagc ccgtgaccgt gagctggaac 480
tccggcgctc tgacaagcgg cgtgcatacc ttccctgccg tgcctgaaag cagcggcctg 540
tatagcctga gcagcgtggg gaccgtgcct agctcctccc tgggcacca aacctacacc 600
tgcaatgtgg accacaagcc ttccaacacc aagggtggaca agcgggtcga gtccaagtac 660
ggccctcctt gccctccctg ccccgctccc gagtttctgg gaggaccag cgtgttcctc 720
ttcccccta agcccaagga caccctgatg atcagccgga cacctgaggt cacctgcgtg 780
gtggtggatg tgagccaaga ggatcctgag gtccagttca actggtacgt ggacggagtg 840
gaggtgcata acgccaagac caagcctcgg gaggagcagt tcaactccac ctatagggtg 900
gtgagcgtgc tcacagtgtc ccaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caaatgcaag 960
gtgtccaaca agggactccc cagcagcatc gaaaagacca tcagcaaggc caaaggccag 1020
cccagggaac cccaggtgta cacactgccc cctcccaag aggaaatgac caagaatcag 1080
gtgtccctga cctgcctggt gaaaggcttt taccacagcg acatcgctgt cgagtgggag 1140
agcaacggcc agcctgagaa taactataag accaccccc ccgtgctgga tagcgacgga 1200
tccttcttcc tctactcccg gctgaccgtg gataagtccc ggtggcagga gggcaacgtg 1260
ttcagctgct ccgtcatgca cgaggccctg cataaccact acaccagaa gtcctgagc 1320
ctgtccctgg gcaagtga 1338

<210> 48
<211> 663
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 48
gacatcgtga tgaccagtc cctgattec ctggccgtga gcctgggcga aagggtacc 60
atcaactgca agtccctcca gagcgtgctg tacgccgca acaaccgga ctatctggct 120
tggtaccagc agaagcccgg ccagcctccc aagctgctga tcaaccaggc tagcaccagg 180

gcttccggcg tgcctgatag gttcagcggc tccggctccg gcaccgagtt taccctgac 240
atctctctccc tgcaggccga ggatgtggcc atctactact gccagcagta ctacaccct 300
cctctggcct ttggcggcgg caccaagctg gagatcaaga ggacagtggc cgtccccctcc 360
gtgttcattt tccctccctc cgacgagcag ctgaagtccg gcaccgcctc cgtgggtgtgc 420
ctgctgaaca acttctaccc cagggaggcc aagggtgcagt ggaagggtgga caatgccctg 480
cagagcggca acagccagga gagcgtcacc gaggcaggact ccaaagacag cacatacagc 540
ctgtccagca ccttgacct gtccaaggt gactatgaga agcacaaggt gtacgcctgc 600
gagggtgacc accagggact gagctccct gtgaccaagt ccttcaaccg gggagagtgc 660
tga 663

<210> 49
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 49
cgggcttggg tgaac 15

<210> 50
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 50
cggatcaaga ggaaaacaga tggcgagacc accgattacg ccgtccccgt gaagggc 57

<210> 51
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 51
agcaacaggg cctttgatat c 21

<210> 52
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 52
aagtcctccc agagcgtgct gtacgccggc aacaaccgga actatctggc t 51

<210> 53
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 53
caggctagca ccagggttc c 21

<210> 54
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 54
cagcagtact acaccctcc tctggcc 27

<210> 55
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構築體

<400> 55
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Glu Arg Ala
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Lys Arg Lys Thr Asp Gly Glu Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
50 55 60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Gly Ser Asn Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115						120						125					
Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly		
130						135						140					
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn		
145						150						155					
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln		
165						170						175					
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser		
180						185						190					
Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser		
195						200						205					
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys		
210						215						220					
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu		
225						230						235					
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu		
245						250						255					
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln		
260						265						270					
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys		
275						280						285					
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu		
290						295						300					
Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys		
305						310						315					
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys		
325						330						335					
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser		
340						345						350					
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys		
355						360						365					
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln		
370						375						380					
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly		
385						390						395					
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln		
405						410						415					
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn		
420						425						430					
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly						
435						440											

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種特異性結合至人類CD47 (hCD47)之抗體或其免疫活性片段，其包含：

(a)重鏈可變(V_H)域，該V_H域包含(1)在其N端處之麩胺酸殘基(E)；(2)包含RAWMN (SEQ ID NO: 5)之CDR-H1；(3)包含RIKRKTDGETTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 6)之CDR-H2；(4)包含SNRAFDI (SEQ ID NO: 7)之CDR-H3；及(5)在其C端處之絲胺酸(S)；及

(b)輕鏈可變(V_L)域，該V_L域包含(1)包含KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 8)之CDR-L1；(2)包含QASTRAS (SEQ ID NO: 9)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 10)之CDR-L3。

【請求項2】

如請求項1之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該V_H域之該N端胺基酸對應於根據Kabat編號系統之位置H1，且該V_H域之該C端胺基酸對應於根據該Kabat編號系統之位置H113。

【請求項3】

如請求項1之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該V_H域之該N端胺基酸對應於根據Chothia編號系統之位置H1，且該V_H域之該C端胺基酸對應於根據該Chothia編號系統之位置H113。

【請求項4】

如請求項1之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該V_H域之該N端胺基酸對應於根據IMGT編號系統之位置H1，且該V_H域之該C端胺基酸對應於根據該IMGT編號系統之位置H128。

【請求項5】

如請求項1至4中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該V_H域之該N端胺基酸對應於SEQ ID NO: 1之胺基酸1，且該V_H域之該C端胺基酸對應於SEQ ID NO: 1之胺基酸118。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該V_H包含與SEQ ID NO: 1具有至少95%一致性之胺基酸序列，且該V_L包含與SEQ ID NO: 2具有至少95%一致性之胺基酸序列。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該V_H包含SEQ ID NO: 1，且該V_L包含SEQ ID NO: 2。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其包含Fc域。

【請求項9】

如請求項8之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其包含人類IgG Fc域。

【請求項10】

如請求項9之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該人類IgG Fc域為IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc域。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項之抗CD47抗體，其中該抗體為全長抗體。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之抗CD47抗體，其包含有包含SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 55之重鏈及包含SEQ ID NO: 4之輕鏈。

【請求項13】

如請求項1至10中任一項之抗CD47抗體之免疫活性片段，其中該片段為Fab、Fab'、F(ab)'2、Fab'-SH、單鏈Fv (scFv)、Fv片段或線性抗體。

【請求項14】

如請求項1至13中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該抗體或其片段為單株抗體或其片段。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該抗體或其片段為嵌合或人類化的。

【請求項16】

如請求項1至15中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該抗體或片段結合至於癌細胞表面上表現之hCD47。

【請求項17】

如請求項16之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該癌細胞為SK-OV-3細胞、Toledo細胞、K562細胞、HCC827細胞、Jurkat細胞、U937細胞、TF-1細胞、Raji細胞、SU-DHL-4細胞、MDA-MB-231細胞、A375細胞或SK-MES-1細胞。

【請求項18】

如請求項16之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該癌細胞為實體腫瘤癌。

【請求項19】

如請求項18之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該實體腫瘤癌為肺癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胰臟癌、肉瘤癌、頭頸癌、胃癌、腎癌或皮膚癌。

【請求項20】

如請求項16之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該癌細胞為血液癌。

【請求項21】

如請求項20之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該血液癌為非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)。

【請求項22】

如請求項1至21中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該抗體或片段不結合至於血球表面上表現之hCD47。

【請求項23】

如請求項22之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該血球為紅血球。

【請求項24】

如請求項1至23中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該抗體或其片段與hCD47之該結合阻止該hCD47與信號調節蛋白 α (SIRP α)之相互作用。

【請求項25】

如請求項24之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該SIRP α 為人類SIRP α (hSIRP α)。

【請求項26】

如請求項1至25中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該抗體或其片段與於該癌細胞表面上表現之hCD47之該結合促進該癌細胞之巨噬細胞介導之吞噬作用。

【請求項27】

如請求項26之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該癌細胞為SK-OV-3細胞、Toledo細胞、K562細胞、HCC827細胞、Jurkat細胞、U937細胞、TF-1細胞、Raji細胞、SU-DHL-4細胞、MDA-MB-231細胞、A375細胞或SK-MES-1細胞。

【請求項28】

如請求項26之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該癌細胞為實體腫瘤癌。

【請求項29】

如請求項28之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該實體腫瘤癌為肺癌、卵巢癌、結腸直腸癌、胰臟癌、肉瘤癌、頭頸癌、胃癌、腎癌或皮膚癌。

【請求項30】

如請求項26之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該癌細胞為血液癌。

【請求項31】

如請求項30之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中該血液癌為非霍奇金淋巴瘤。

【請求項32】

如請求項1至31中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段，其中向個體投與該抗體或其片段不會造成顯著程度之該個體之血球凝集或該個體之紅血球耗乏。

【請求項33】

一種核酸，其編碼如請求項1至32中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段。

【請求項34】

一種載體，其包含如請求項33之核酸。

【請求項35】

一種宿主細胞，其包含如請求項33之核酸或如請求項34之載體。

【請求項36】

如請求項35之宿主細胞，其中該宿主細胞為哺乳動物細胞。

【請求項37】

如請求項36之宿主細胞，其中該哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。

【請求項38】

如請求項37之宿主細胞，其中該CHO細胞為CHO-K1細胞。

【請求項39】

一種產生抗CD47抗體或其免疫活性片段之方法，其包含：

a)在有效引起該抗CD47抗體或其抗原結合片段表現之條件下培養如請求項35至38中任一項之宿主細胞；及

b)回收由該宿主細胞表現之該抗CD47抗體或其免疫活性片段。

【請求項40】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至32中任一項之抗CD47抗體或其免疫活性片段及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項41】

一種治療個體之癌症之方法，其包含向該個體投與有效量之抗CD47抗體，

其中該抗CD47抗體包含

(a)重鏈可變域(V_H)，該 V_H 包含(1)包含RAWMN (SEQ ID NO: 5)之CDR-H1；(2)包含RIKRKTDGETTDYAAPVKG (SEQ ID NO: 6)之CDR-H2；及(3)包含SNRAFDI (SEQ ID NO: 7)之CDR-H3；

(b)輕鏈可變(V_L)域，該 V_L 域包含(1)包含KSSQSVLYAGNNRNYLA (SEQ ID NO: 8)之CDR-L1；(2)包含QASTRAS (SEQ ID NO: 9)之CDR-L2；及(3)包含QQYYTPPLA (SEQ ID NO: 10)之CDR-L3。

【請求項42】

如請求項41之方法，其中該癌症為實體腫瘤。

【請求項43】

如請求項42或43之方法，其中該實體腫瘤為肺腫瘤、卵巢腫瘤、結腸直腸腫瘤、胰臟腫瘤、肉瘤腫瘤、頭頸腫瘤、胃腫瘤、腎腫瘤或皮膚腫瘤。

【請求項44】

如請求項42或43之方法，其中該實體腫瘤為復發性及/或難治性實體腫瘤。

【請求項45】

如請求項41之方法，其中該癌症為非霍奇金淋巴瘤(NHL)，且其中

該方法進一步包含向該個體投與有效量之利妥昔單抗(rituximab)。

【請求項46】

如請求項45之方法，其中該NHL為濾泡性淋巴瘤(FL)、瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)或套細胞淋巴瘤(MCL)。

【請求項47】

如請求項45或46之方法，其中該NHL為復發性/難治性NHL。

【請求項48】

如請求項45至47中任一項之方法，其中該個體已經歷至少一種針對NHL之先前治療。

【請求項49】

如請求項48之方法，其中該個體已經歷2種與10種之間的針對NHL之先前療法。

【請求項50】

如請求項48或49之方法，其中該個體已經歷用CD20靶向劑進行之針對NHL之先前治療。

【請求項51】

如請求項50之方法，其中該個體在該用CD20靶向劑進行之先前療法期間或之後惡化。

【請求項52】

如請求項41至51中任一項之方法，其中該抗CD47抗體包含人類IgG4恆定區或其包含S233P突變之變異體(其中編號係根據EU索引)。

【請求項53】

如請求項41至52中任一項之方法，其中將該抗CD47抗體以10 mg/kg

之劑量投與該個體。

【請求項54】

如請求項41至52中任一項之方法，其中將該抗CD47抗體以20 mg/kg之劑量投與該個體。

【請求項55】

如請求項41至52中任一項之方法，其中將該抗CD47抗體以30 mg/kg之劑量投與該個體。

【請求項56】

如請求項41至55中任一項之方法，其中將該抗CD47抗體每週一次(qw)投與該個體。

【請求項57】

如請求項41至56中任一項之方法，其中將該抗CD47抗體經由靜脈內(IV)輸注投與該個體。

【請求項58】

如請求項45至57中任一項之方法，其中以375 mg/m²之劑量一週一次(qw)投與該利妥昔單抗持續前五週，且在該前五週之後以375 mg/m²之劑量每4週一次(q4w)投與該利妥昔單抗。

【請求項59】

如請求項41至58中任一項之方法，其中由於用該抗CD47抗體進行之該治療，因此該個體未經歷顯著血液毒性。

【請求項60】

如請求項59之方法，其中由於用該抗CD47抗體進行之治療，因此該個體未經歷任何血液毒性。

【請求項61】

如請求項59或60之方法，其中該血液毒性包含貧血、血球減少症及/或血球凝集。

【請求項62】

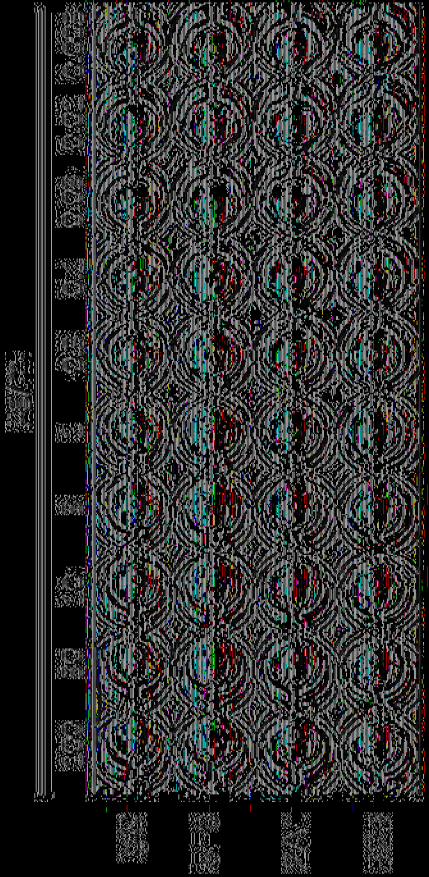
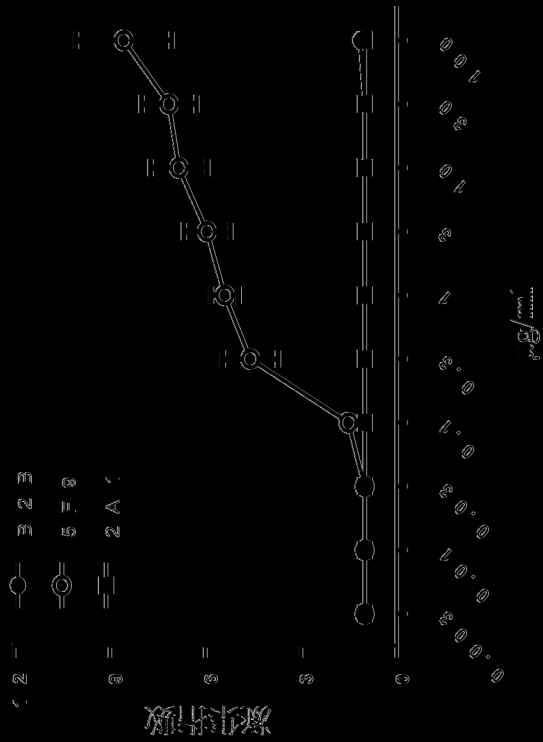
如請求項41至61中任一項之方法，其中該抗CD47抗體之該V_H包含SEQ ID NO: 1，且該抗CD47抗體之該V_L包含SEQ ID NO: 2。

【請求項63】

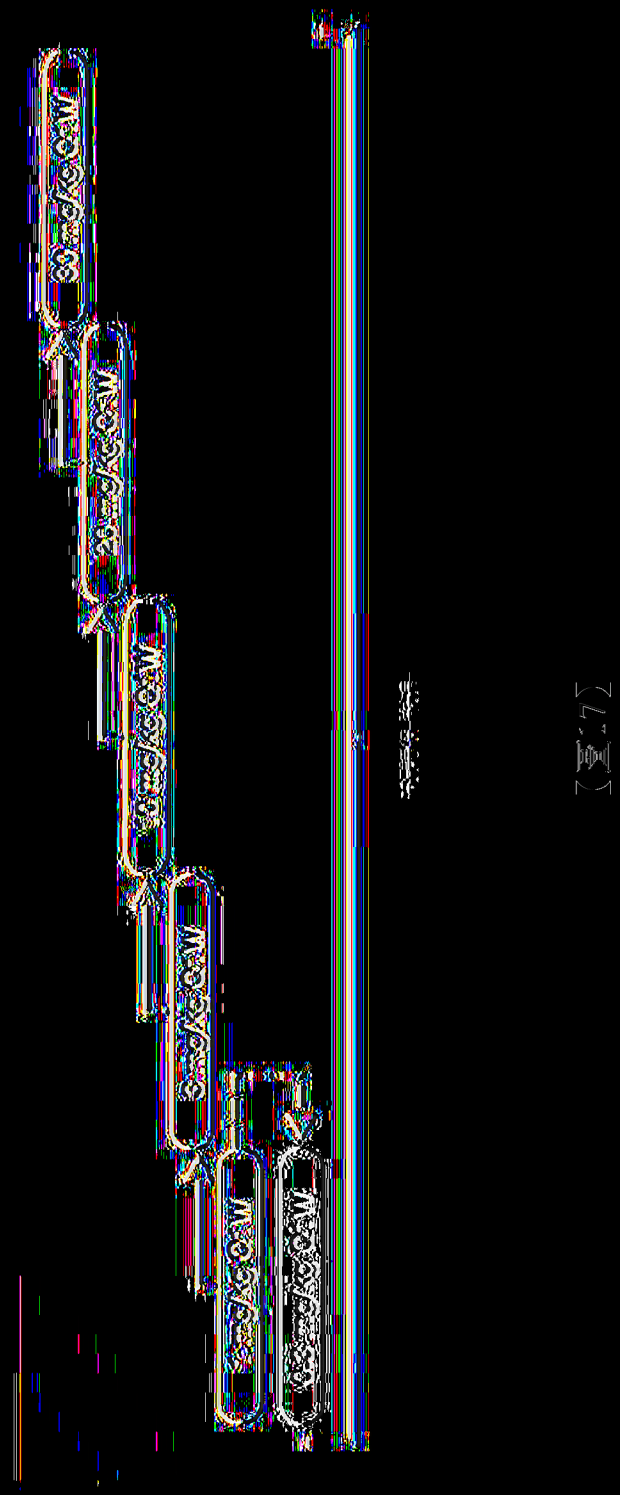
如請求項41至62中任一項之方法，其中該抗CD47抗體之該重鏈包含SEQ ID NO: 3或SEQ ID NO: 55，且該抗CD47抗體之該輕鏈包含SEQ ID NO: 4。

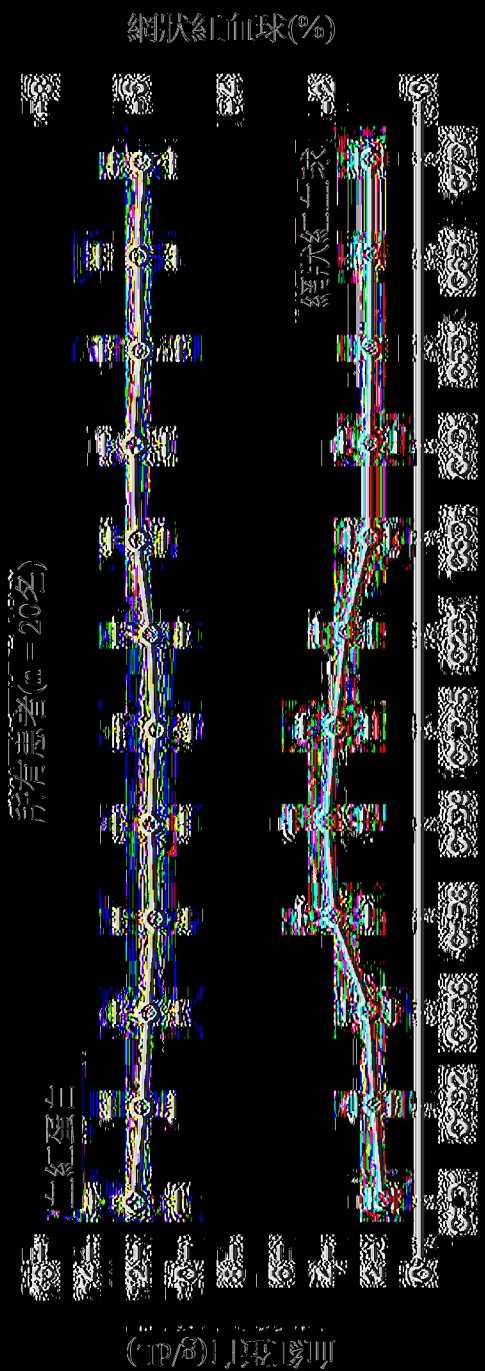
【請求項64】

一種用於治療癌症之套組，其包含如請求項1至32中任一項之抗體或如請求項40之組合物。

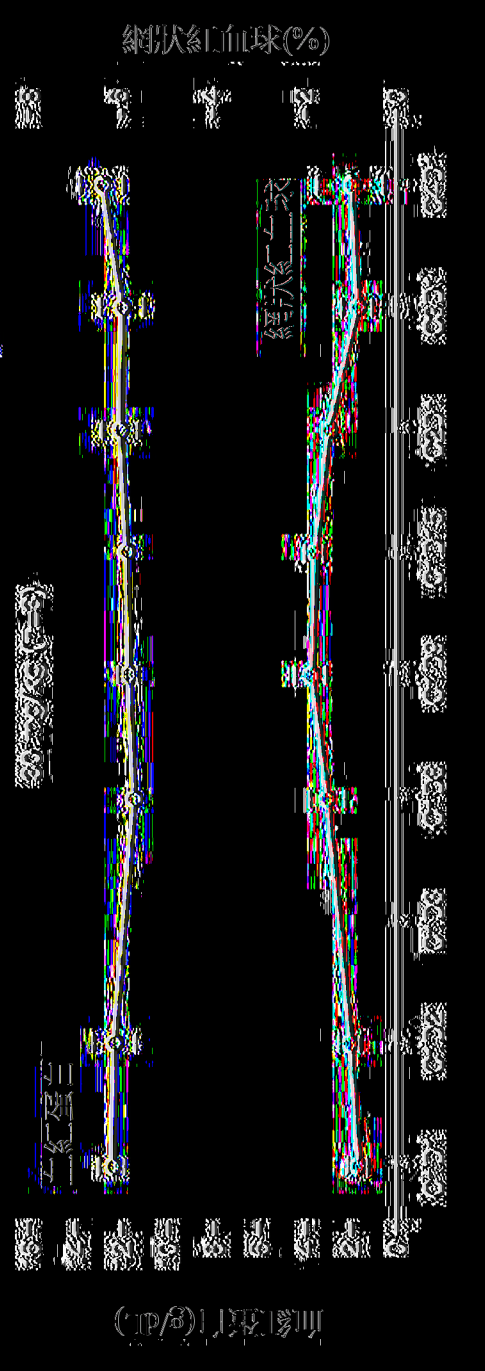


[圖9A]

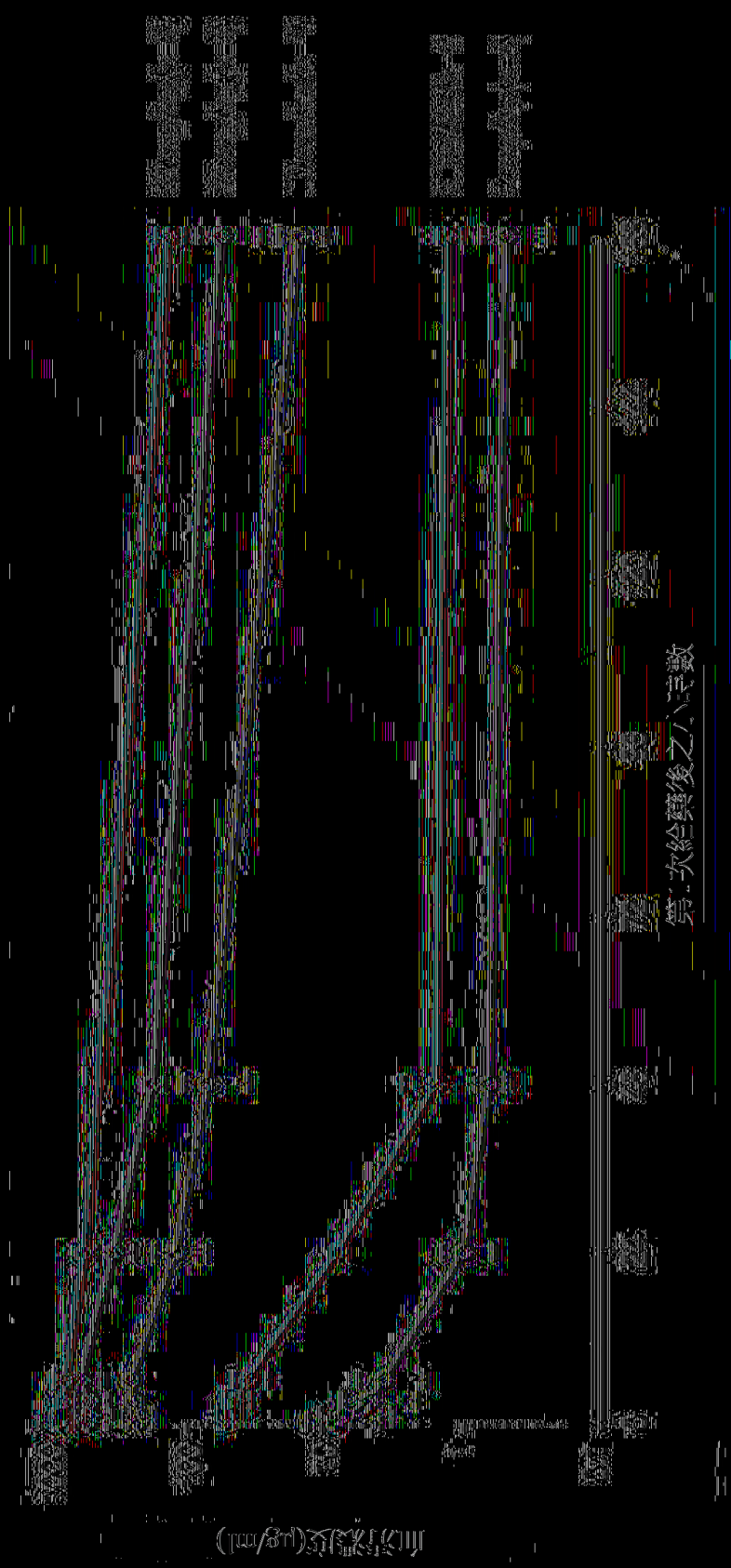




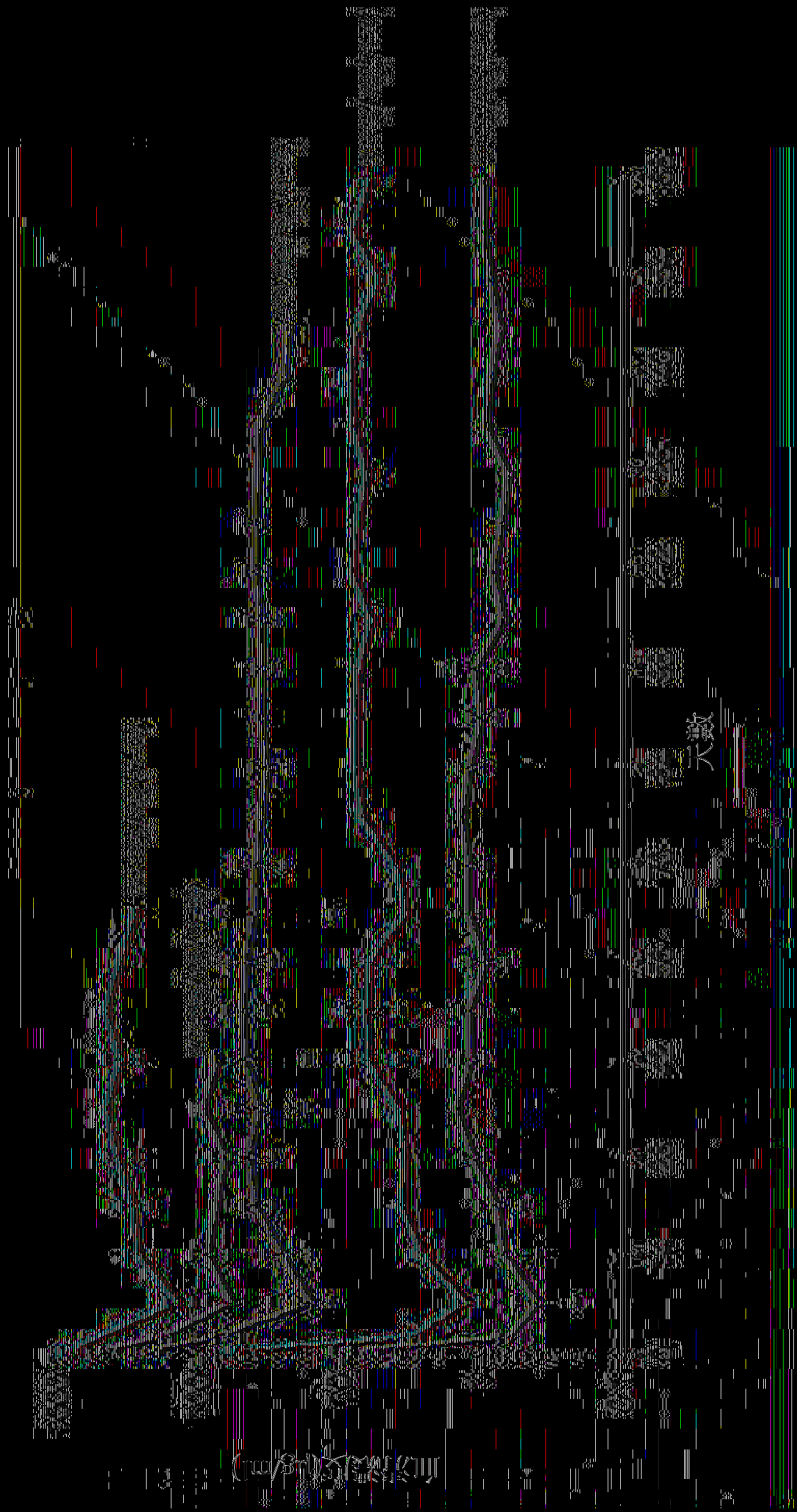
[圖18A]



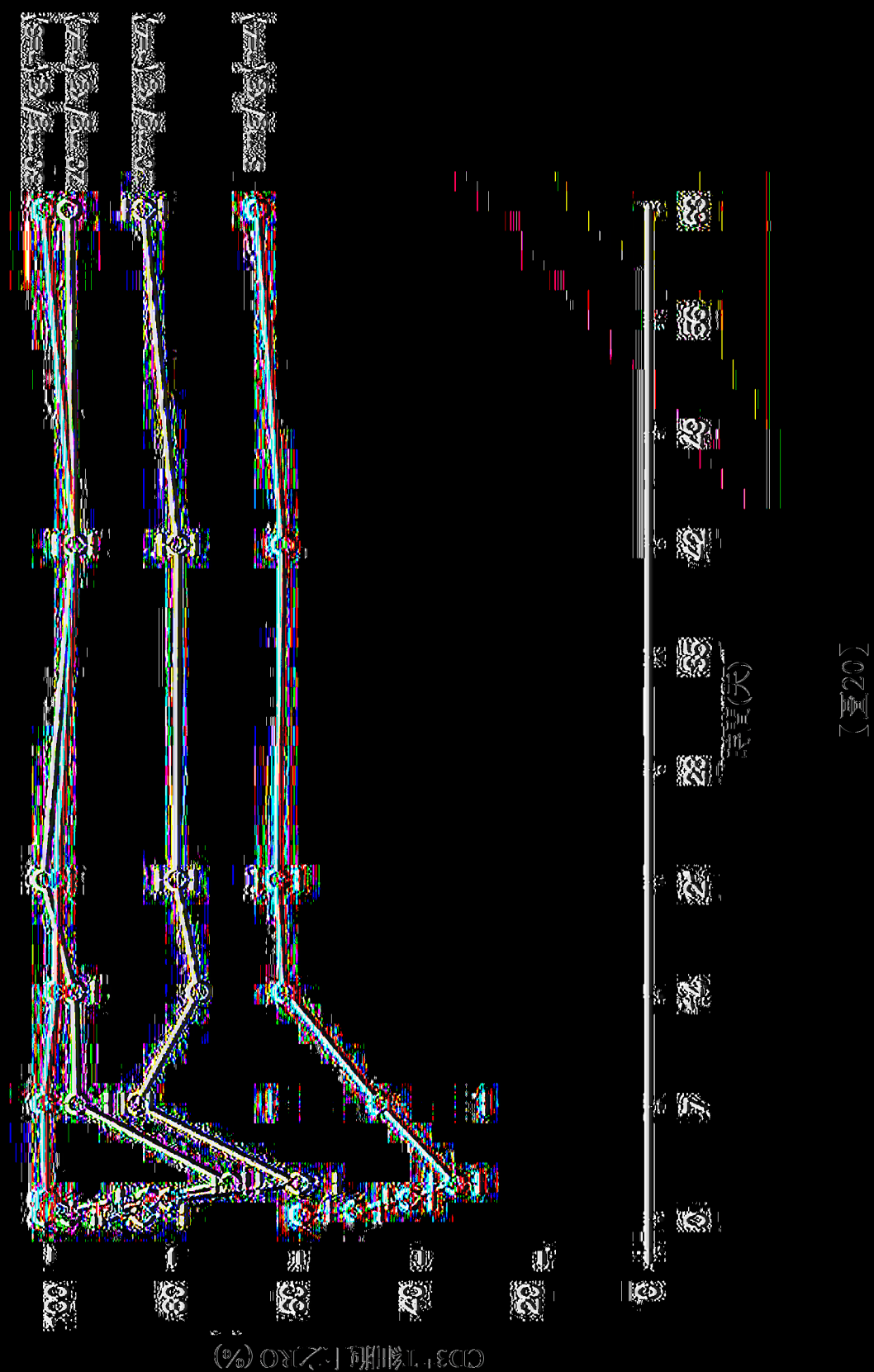
[圖18B]

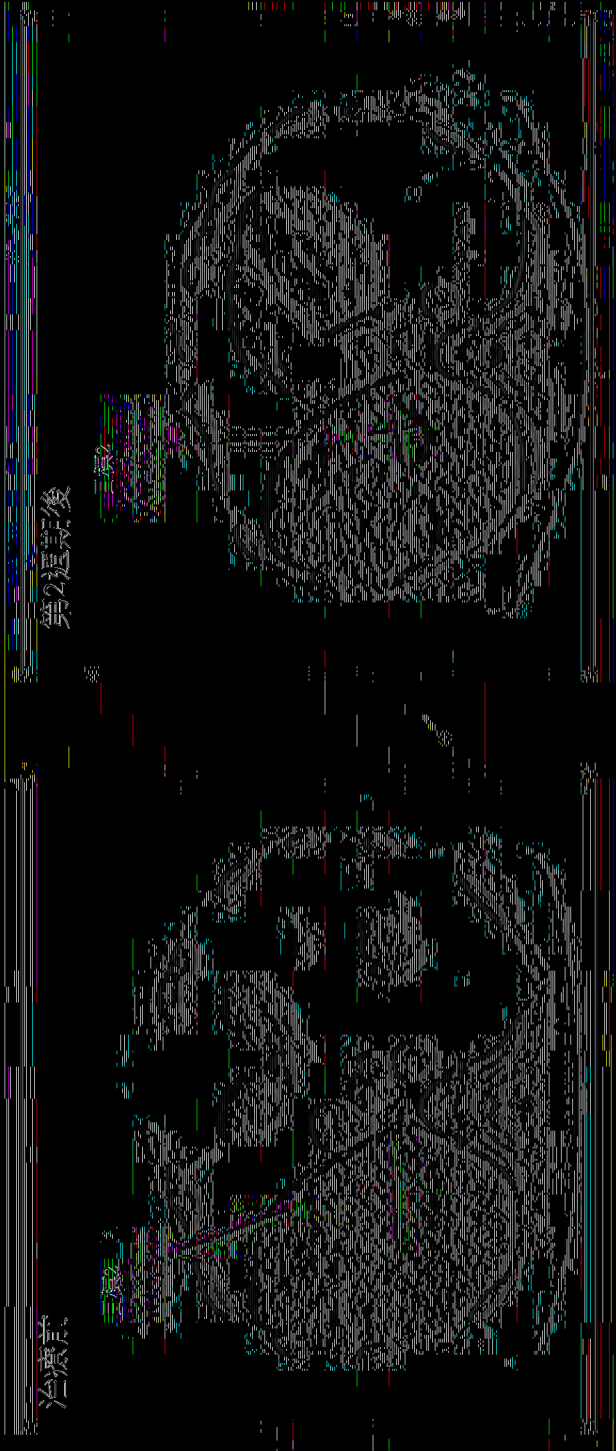


[圖 9A]



[圖 13]





【圖2】