



(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 201741340 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：106115273

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 05 月 09 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

C07K16/30 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2016/05/09 美國

62/333,631

(71)申請人：賽基公司 (美國) CELGENE CORPORATION (US)

美國

信號製藥有限責任公司 (美國) SIGNAL PHARMACEUTICALS, LLC (US)

美國

(72)發明人：宋 維多利亞 SUNG, VICTORIA (US)；傑克森 匹立葛蘭 JACKSON, PILGRIM (US)；艾斯科貝 羅立 ESCOUBET, LAURE (US)；黃 標 WONG, PIU (US)；哈瑞哈倫 坎達薩米 HARIHARAN, KANDASAMY (US)；貝吉斯 麥可 BURGESS, MICHAEL (US)；海吉 克立斯汀 HEGE, KRISTEN (US)；雷蒙 希達 RAYMON, HEATHER (US)

(74)代理人：李世章；彭國洋

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：9 項 圖式數：2 共 146 頁

(54)名稱

CD47 抗體及使用其之方法

CD47 ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

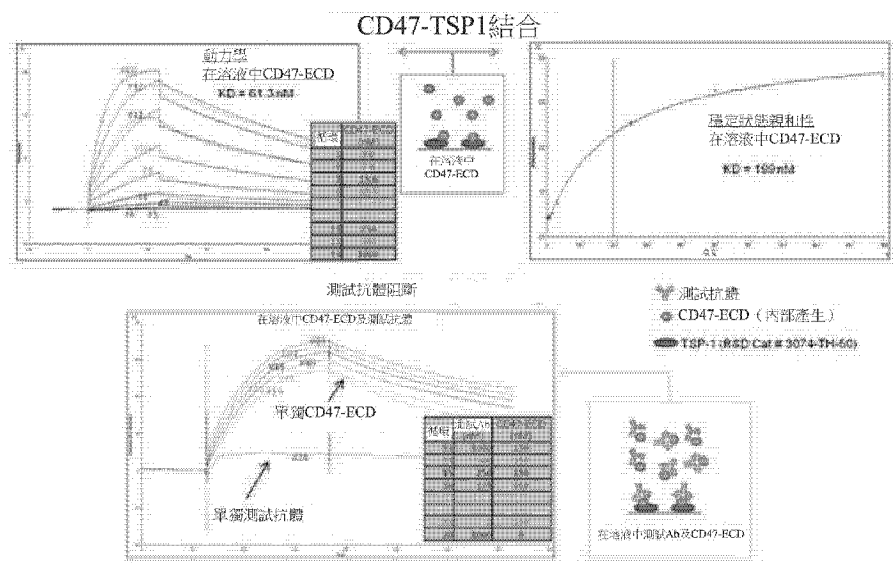
(57)摘要

本發明提供了特異性抑制在 CD47 與 CD47-信號調節蛋白 α (SIRP α)之間的相互作用而不抑制在 CD47 與血小板反應素-1(TSP-1)之間的相互作用的 CD47 抗體，以及使用此等單株抗體作為治療劑之方法。

CD47 antibodies that specifically inhibit the interaction between CD47 and the CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP α) but not the interaction between CD47 and thrombospondin-1 (TSP-1), and methods of using these monoclonal antibodies as therapeutics are provided.

指定代表圖：

第1A圖



【發明說明書】

【中文發明名稱】CD47抗體及使用其之方法

【英文發明名稱】CD47 ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明大體而言係關於識別CD47的單株抗體，更特定言之關於特異性抑制在CD47與CD47-信號調節蛋白 α (SIRP α)之間的相互作用但不抑制在CD47與血小板反應素-1 (TSP-1)之間的相互作用之CD47抗體，並且關於使用此等單株抗體作為治療劑的方法。

【先前技術】

【0002】 CD47係在允許逃避免疫監控之腫瘤細胞上高度表現的自我識別蛋白。其用作在吞噬細胞諸如巨噬細胞及樹突狀細胞的表面上表現的信號調節蛋白 α (SIRP α)的配體。在CD47與SIRP α 之間的相互作用誘導了導致抑制吞噬作用的信號傳導級聯 (signaling cascade)。利用抗CD47抗體治療可抑制CD47與SIRP α 相互作用，進而允許恢復吞噬作用。然而，已報告大部分CD47抗體導致血球凝集，其係利用現有抗體治療上靶向CD47的主要限制。血小板反應素-1蛋白 (TSP-1)係多域基質醣蛋白，已經顯示該醣蛋白係在健康組織中新血管生成及腫瘤形成的天然抑制劑。內皮細胞黏著性、運動性、及生長的正向和負向調節均已歸因於

TSP-1，其表現為與至少12個細胞黏著受體相互作用，該等細胞黏著受體包括CD36、 α_v 整合素、 β_1 整合素、黏結蛋白聚糖、及與整合素相關之蛋白質（IAP或CD47）。TSP-1亦與參與血管生成的數個蛋白酶相互作用，該等蛋白酶包括纖溶酶原、尿激酶、基質金屬蛋白酶、凝血酶、組織蛋白酶、及彈性蛋白酶。由此，存在對當投予受試者時特異性抑制在CD47與SIRP α 之間的相互作用但不抑制在CD47與TSP-1之間的相互作用之治療的需求。

【發明內容】

【0003】 本文所述之單株抗體（MAb）係抗CD47 MAb，其阻斷CD47/SIRP α 相互作用，藉以允許巨噬細胞介導之腫瘤細胞殺傷。此等抗體能夠調節，例如，阻斷、抑制、降低、拮抗、中和或另外干擾CD47表現、活性及/或信號傳導，並且此等抗體不導致顯著水平之人類紅血球（RBC）（本文亦稱為紅血球（erythrocyte））之血球凝集。然而，此等抗體在細胞表面上結合CD47並且不導致細胞凝集現象之能力不限於紅血球。此等抗體以不促進CD47陽性細胞凝集之方式獨特地結合CD47。此外或替代地，IgG4同型之抗體不導致在投藥時血小板之顯著耗盡。本文所述之抗體及其衍生物能夠調節，例如，阻斷、抑制、降低、拮抗、中和或另外干擾在CD47與SIRP α 之間的相互作用，並且此等抗體不導致顯著水平之人類

RBC 之血球凝集。本文所提供之抗體被共同地稱為「CD47 抗體」。此等 CD47 抗體係對導致人類紅血球之血球凝集的現有 CD47 抗體的顯著改良。參看，例如，Kikuchi Y., Uno S., Yoshimura Y. 等人。抗 CD47 之二價單鏈 Fv 片段誘導白血病細胞之細胞凋亡。Biochem Biophys Res Commun 2004; 315:912-8。例如，此等 CD47 抗體係對現有 CD47 抗體 B6H12、BRC126、及 CC2C6（如下文詳細描述，該等抗體各者阻斷 SIRP α ，但導致 RBC 之血球凝集）的顯著改良。例如，本文所述之 CD47 抗體係對產生親和性之 SIRP α -Fc 融合蛋白的顯著改良，當投予小鼠及/或石蟹獼猴時，該融合蛋白導致紅血球損失及經閉。參看 Weiskopf 等人，Engineered SIRP α Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies. Science 2013; 341:88)。本文所述之全 IgG CD47 抗體（例如，2A1 及包括表 1 提供之彼等的其人源化衍生物，如揭示於在美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 US20140140989 號）），其內容全文以引用方式併入本文中）不於顯著水平凝集細胞。例如，本文所揭示之 CD47 抗體不血球凝集紅血球（RBC）。本文描述了係以全 IgG 形式之 CD47 抗體，其阻斷 SIRP α 並且不導致顯著水平之凝集及/或血小板耗盡。此外，本文所揭示之 CD47 抗體不導致顯著水平之 RBC 耗盡及/或經閉。

【0004】 本文所揭示之CD47抗體呈現數種所要特性，諸如，以不作限制之實例的方式，有效阻斷在CD47與其配體SIRP α 之間的相互作用，而不導致顯著水平之紅血球之血球凝集，以及在鼠類異體移植模型中的有效抗腫瘤活性。例如，與在缺乏本文所述之CD47抗體時CD47與SIRP α 之間的相互作用之程度相比，本文所揭示之CD47抗體阻斷至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少95%、或至少99%之在CD47與SIRP α 之間的相互作用。

【0005】 本文所揭示之CD47抗體不導致顯著水平之細胞凝集，例如，本文所揭示之CD47抗體不導致顯著水平之紅血球之血球凝集。在一些情形中，顯著水平之細胞凝集指在存在現有CD47抗體時的凝集程度。在一個態樣中，與在存在現有CD47抗體時的凝集程度相比，在存在本文所揭示之CD47抗體時凝集程度降低了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少99%。在一些實施例中，若與存在現有CD47抗體時的凝集程度相比，在存在本文所揭示之CD47抗體時的凝集程度降低了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少99%，則本文所揭示之CD47抗體不導致顯著水平之凝集。在其他實施例中，若與存在CD47抗

體 1 B 4 (其 包 含 分 別 在 S E Q I D N O : 8 0 及 S E Q I D N O : 8 1 中 提 供 的 可 變 重 鏈 及 可 變 輕 鏈 序 列 , 如 揭 示 於 美 國 專 利 申 請 案 系 列 號 第 1 3 / 9 6 0 , 1 3 6 號 (公 開 案 第 U S 2 0 1 4 0 1 4 0 9 8 9 號)) 時 的 凝 集 程 度 相 比 , 在 存 在 本 文 所 揭 示 之 C D 4 7 抗 體 時 的 凝 集 程 度 降 低 了 至 少 5 % 、 至 少 1 0 % 、 至 少 2 0 % 、 至 少 3 0 % 、 至 少 4 0 % 、 至 少 5 0 % 、 至 少 6 0 % 、 至 少 7 0 % 、 至 少 8 0 % 、 至 少 9 0 % 、 或 至 少 9 9 % , 則 本 文 所 揭 示 之 C D 4 7 抗 體 不 導 致 顯 著 水 平 之 凝 集 。 本 文 所 揭 示 之 C D 4 7 抗 體 不 導 致 於 在 1 0 p M 與 1 0 μ M 之 間 的 抗 體 濃 度 (例 如 , 於 5 0 p M 、 1 0 0 p M 、 1 n M 、 1 0 n M 、 5 0 n M 、 1 0 0 n M 、 1 μ M 、 或 5 μ M 之 抗 體 濃 度) 之 顯 著 水 平 之 細 胞 凝 集 。

【 0 0 0 6 】 在 一 些 實 施 例 中 , R B C 耗 盡 之 水 平 係 藉 由 在 治 療 投 藥 (例 如 , 本 文 所 揭 示 之 抗 體) 之 後 在 受 試 者 中 量 測 R B C 計 數 來 決 定 。 在 一 些 實 施 例 中 , 若 在 投 予 本 文 所 揭 示 之 抗 體 之 後 在 受 試 者 中 的 R B C 計 數 係 在 正 常 健 康 受 試 者 之 範 圍 內 , 則 本 文 所 揭 示 之 C D 4 7 抗 體 不 導 致 顯 著 水 平 之 R B C 耗 盡 。 例 如 , 針 對 正 常 健 康 男 性 人 類 之 R B C 計 數 係 約 4 . 7 至 約 6 . 1 百 萬 細 胞 每 微 升 血 液 樣 本 。 例 如 , 針 對 正 常 健 康 女 性 人 類 之 R B C 計 數 係 4 . 2 至 約 5 . 4 百 萬 細 胞 每 微 升 血 液 樣 本 。 在 一 些 實 施 例 中 , 若 在 投 予 (5 分 鐘 、 1 0 分 鐘 、 3 0 分 鐘 、 1 小 時 、 2 小 時 、 3 小 時 、 4 小 時 、 5 小 時 、 1 2 小 時 、 2 4 小 時 、 2 天 、 4 天 、 6 天 、 1 週 、 2 週 、 3 週 、 1 月 、 2 月 、 或 更 久) 本 文 所 揭 示 之 抗 體 之 後 在 受 試

者中的 R B C 計數係至少 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、或 9 9 . 5 % 之投藥前的 R B C 計數，則本文所揭示之 C D 4 7 抗體不導致顯著水平之 R B C 耗盡。替代地或此外，若在投藥（5 分鐘、1 0 分鐘、3 0 分鐘、1 小時、2 小時、3 小時、4 小時、5 小時、1 2 小時、2 4 小時、2 天、4 天、6 天、1 週、2 週、3 週、1 月、2 月、或更久）本文所揭示之抗體之後在受試者中的 R B C 計數係至少 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、或 9 9 . 5 % 之在投予安慰劑 (p l a c e b o) 治療（媒劑）之後在受試者中的 R B C 計數，則本文所揭示之 C D 4 7 抗體不導致顯著水平之 R B C 耗盡。R B C 計數係藉由在本領域中之標準方法來決定。較佳地，本文所揭示之 C D 4 7 抗體不導致於 1 0 p M 與 1 0 μ M 之間的抗體濃度（於 5 0 p M、1 0 0 p M、1 n M、1 0 n M、5 0 n M、1 0 0 n M、1 μ M、或 5 μ M 之抗體濃度）的顯著水平之 R B C 耗盡。在一些實施例中，當於 0 . 1 m g / k g、0 . 5 m g / k g、1 m g / k g、2 m g / k g、5 m g / k g、1 0 m g / k g、1 5 m g / k g、2 0 m g / k g、2 5 m g / k g、3 0 m g / k g、5 0 m g / k g、7 5 m g / k g、1 0 0 m g / k g、更大之劑量投予時，本文所揭示之 C D 4 7 抗體不導致顯著水平之 R B C 耗盡。

【0007】 本文所揭示之 C D 4 7 抗體之 I g G 4 同型不導致顯著水平之血小板耗盡。例如，投予 I g G 4 同型之抗體導致至少 3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、或 1 0 0 % 之剩餘血小板百分數。較佳地，本文所揭示之

CD47 抗體之 IgG4 同型不導致於 10 pM 與 10 μ M 之間的抗體濃度（例如，於 50 pM、100 pM、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM、1 μ M、或 5 μ M 之抗體濃度）的顯著水平之血小板耗盡。

【0008】此外，本文所揭示之 CD47 抗體包括但不限於具有對 Fc γ 受體 (Fc γ R) 之低結合親和性的抗體。例如，與亞型抗體諸如 IgG1（野生型或突變體）、IgG4（野生型或突變體，例如，IgG4P）之恆定區相比，該抗體之恆定區具有對 Fc γ R 之較低結合親和性。

【0009】與在本領域中已知之抗體相比，本文所揭示之抗體在腫瘤模型中亦顯著地更為有效。例如，與在存在現有 CD47 抗體時巨噬細胞吞噬腫瘤細胞之能力相比，在存在本文所揭示之 CD47 抗體時巨噬細胞吞噬腫瘤細胞之能力增加了至少 5%、至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、或至少 99%。

【0010】熟習該項技術者應認識到可能定量（無需過多實驗）凝集程度，例如，RBC 之血球凝集程度。例如，熟習該項技術者應認識到血球凝集程度係藉由在存在本文所揭示之 CD47 抗體時進行血球凝集分析之後量測 RBC 點面積來確定，如以下實例所描述。在一些情形中，在存在本文所揭示之 CD47 抗體時 RBC 點之面積係與在缺乏 CD47 抗體時（亦即，在存在零血球凝集時）RBC 點之面積相比。以此方式，相對於基線對照來定量血球凝

集。較大RBC點面積對應於較高程度之血球凝集。或者，RBC點之密度測定法亦可用以定量血球凝集。

【0011】 熟習該項技術者應認識到可能定量(無需過多實驗)RBC耗盡水平。例如，熟習該項技術者應認識到RBC耗盡水平係例如藉由量測RBC計數(亦即，在血液樣本中之RBC總數)來決定，例如，藉由使用細胞計數器或血球計。熟習該項技術者應認識到在血液樣本中RBC可視需要藉由在計數之前使用例如離心分餾全血來分離。在一些情形中，在存在本文所揭示之CD47抗體時RBC計數係與在缺乏CD47抗體時(亦即，在存在零RBC耗盡時)RBC計數相比。以此方式，相對於基線對照標準化RBC耗盡水平。

【0012】 本文所述之CD47抗體係用於治療癌症或其他腫瘤病症、延遲癌症或其他腫瘤病症的進展、預防癌症或其他腫瘤病症復發或緩解癌症或其他腫瘤病症之症狀。例如，本文所述之CD47抗體係用於治療血液科惡性疾病及/或腫瘤，例如，血液科惡性疾病及/或腫瘤。例如，本文所述之CD47抗體係用於治療CD47+腫瘤。以不作限制之實例的方式，本文所述之CD47抗體可用於治療非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma; NHL)、急性淋巴球性白血病(acute lymphocytic leukemia; ALL)、急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia; AML)、慢性淋巴球性白血病(chronic lymphocytic leukemia; CLL)、慢性骨髓性白血病

(chronic myelogenous leukemia; CML)、多發性骨髓瘤(multiple myeloma; MM)、乳腺癌、卵巢癌、頭頸癌、膀胱癌、黑色素瘤、結腸直腸癌、胰腺癌、肺癌、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、及等等。固態腫瘤包括，例如，乳腺腫瘤、卵巢腫瘤、肺部腫瘤、胰腺腫瘤、前列腺腫瘤、黑色素瘤、直腸結腸瘤、肺部腫瘤、頭頸腫瘤、膀胱腫瘤、食道腫瘤、肝臟腫瘤、及腎臟腫瘤。

【0013】如本文所使用，「血液癌症」指血液癌症，並且包括白血病、淋巴瘤及骨髓瘤等等。「白血病」指血液癌症，其中產生過多在對抗感染時無效的白血球，因此排擠構成血液之其他部分，諸如血小板和紅血球。應瞭解白血病之情形被分為急性或慢性。白血病之某些形式包括，以不作限制之實例的方式，急性淋巴球性白血病(ALL)；急性骨髓性白血病(acute myeloid acute myeloid; AML)；慢性淋巴球性白血病(chronic lymphocytic leukemia; CLL)；慢性骨髓性白血病(chronic myelogenous leukemia; CML)；骨髓增生性病征 / 腫瘤(Myeloproliferative disorder/neoplasm; MPDS)；及骨髓發育不良症候群。「淋巴瘤」可指霍奇金氏淋巴瘤、無痛性及攻擊性非霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、及濾泡性淋巴瘤(小細胞及大細胞)、等等。骨髓瘤可指多發性骨髓瘤

(multiple myeloma; MM)、骨髓巨細胞瘤、重鏈骨髓瘤、及輕鏈或本斯-瓊斯(Bence-Jones)骨髓瘤。

【0014】 本文所揭示之例示性單株抗體包括，例如，本文所述之抗體。例示性抗體包括具有選自SEQ ID NOs:5-30之可變重鏈的抗體(如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))及選自SEQ ID NOs:31-47之可變輕鏈(亦如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))。該等抗體亦包括具有與在SEQ ID NOs:5-30之至少一個中闡述之序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更為一致的可變重鏈及與在SEQ ID NOs:31-47之至少一個中闡述之序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更為一致的可變輕鏈之抗體。較佳地，該等抗體識別並結合至人類CD47並且不導致顯著水平之人類紅血球之血球凝集。在本文中此等抗體分別被稱為CD47抗體。CD47抗體包括全人源單株抗體，以及人源化單株抗體及嵌合抗體。此等抗體顯示針對人類CD47之特異性，並且已經顯示該等抗體調節，例如，阻斷、抑制、降低、拮抗、中和或另外干擾CD47表現、活性及/或信號傳導而不導致顯著水平之紅血球之血球凝集、紅血球耗盡、經閉、及/或血小板耗盡。

【0015】 本文所提供之CD47呈現抑制活性，例如，藉由抑制CD47表現（例如，抑制CD47之細胞表面表現）、活性、及/或信號傳導、或藉由干擾在CD47與SIRP α 之間的相互作用來抑制。本文所提供之抗體在結合至CD47（例如，人類CD47）或另外與CD47（例如，人類CD47）相互作用時完全或部分降低或另外調節CD47表現或活動。降低或調節CD47之生物功能係完全、顯著、或部分取決於在抗體與人類CD47胜肽及/或肽之間的相互作用。當如與在缺乏與本文所述之抗體相互作用（例如，結合）時CD47表現或活性水平相比，在存在該抗體時CD47表現或活性水平減少了至少95%，例如，減少了96%、97%、98%、99%或100%時，該等抗體被認為完全抑制CD47表現或活性。當如與在缺乏與本文所述之CD47抗體結合時CD47表現或活性水平相比，在存在CD47抗體時CD47表現或活性水平減少了至少50%，例如55%、60%、75%、80%、85%或90%時，CD47抗體被認為顯著抑制CD47表現或活性。當如與在缺乏與本文所述之抗體相互作用（例如，結合）時CD47表現或活性水平相比，在存在該抗體時CD47表現或活性水平減少了小於95%，例如，10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、85%或90%時，該等抗體被認為部分抑制CD47表現或活性。

【0016】 本文所揭示之抗體亦包括特異性結合CD47的單株抗體，其中該抗體不導致顯著程度之凝集，例如，

紅血球血球凝集（「RBC血球凝集」）。本文所揭示之抗體以不促進CD47陽性細胞凝集之方式獨特地結合CD47；然而，本文所揭示之抗體在細胞表面上結合CD47並且不導致細胞凝集現象之能力不限於紅血球。額外或替代地，本文所揭示之抗體不導致顯著水平之血小板耗盡、RBC耗盡、及/或經閉。

【0017】 本文所揭示之醫藥組合物可包括如本文所揭示之抗體及載劑。此等醫藥組合物可包括在套組中，諸如，例如，診斷套組。

【0018】 本文揭示了結合至CD47的單株抗體或其免疫學活性片段，其中該抗體不導致在投藥之後顯著程度之細胞凝集，例如，該抗體不導致在投藥之後顯著水平之紅血球之血球凝集。額外或替代地，該抗體或其片段不導致顯著水平之血小板耗盡。在一些實施例中，該抗體係嵌合、人源化（humanized）、或全人源的（fully human）。在一些實施例中，該等抗體結合至人類CD47。在一些實施例中，該抗體或其免疫學活性片段預防CD47與SIRP α 相互作用。當如與在缺乏與該抗體之相互作用（例如，與該抗體結合）時CD47/SIRP α 相互作用之程度相比，在存在該抗體時CD47/SIRP α 相互作用程度減少了至少95%時，例如，96%、97%、98%、99%或100%時，該等抗體被認為完全抑制CD47與SIRP α 之相互作用。當如在缺乏與該抗體之相互作用（例如，與該抗體結合）時CD47/SIRP α 相互作用之程度相比，在存

在該抗體時CD47/SIRP α 相互作用程度減少了小於95%，例如，10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、85%或90%時，該等抗體被認為部分抑制CD47/SIRP α 相互作用。

【0019】 在受試者中充分治療或預防癌症之抗體量係例如充分降低CD47信號傳導之量（參看，例如，Yamauchi等人，2013 Blood, Jan 4. [Epub ahead of print]；Soto-Pantoja等人，2013 Expert Opin. Ther. Targets, 17: 89-103；Irandoost等人，2013 PLoS One, Epub Jan 8；Chao等人，2012 Curr. Opin. Immunol., 24: 225-32；Theocharides等人，2012 J Exp Med, 209(10): 1883-99；Csanyi等人，2012 Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 32: 2966-73；Maxhimer等人，2009 Sci. Transl. Med., 1: 3ra7；Sarfati等人，2008 Curr. Drug Targets, 9: 842-850；Miyashita等人，2004 Mol. Biol. Cell, 15: 3950-3963；E. J. Brown和W. A. Frazier, 2001 Trends Cell Biol, 11: 130-135；Oldenborg等人，2001 J. Exp. Med., 193: 855-862；Blazar等人，2001 J. Exp. Med., 194: 541-549；Oldenborg等人，2000 Science, 288: 2051-2054；以及Gao等人，1996 J. Biol. Chem., 271: 21-24）。例如，在受試者中充分治療或預防癌症之抗體量係在CD47/SIRP α 信號傳導軸中由

CD47/SIRP α 相互作用產生之巨噬細胞中充分降低吞噬細胞抑制信號之量，亦即，本文所揭示之抗體促進CD47表現細胞(CD47-expressing cell)的巨噬細胞介導吞噬(macrophage-mediated phagocytosis)。如本文所使用，術語「降低」指在存在本文所揭示之抗體時減少之CD47信號傳導。當在存在本文所揭示之CD47抗體時CD47信號傳導水平係大於或等於5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%、99%、或100%低於CD47信號傳導之對照水平（亦即，在缺乏該抗體時CD47信號傳導水平）時，CD47介導之信號傳導減少。CD47信號傳導水平使用各種標準技術之任一者來量測，諸如，藉由不作限制之實例的方式，量測下游基因活化、及/或回應於CD47活化的螢光素酶記錄器分析。熟習該項技術者應瞭解CD47信號傳導水平可使用各種分析（包括，例如，市售套組）來量測。

【0020】 在一些實施例中，該抗體或其免疫學活性片段係IgG同型。在一些實施例中，該抗體之恆定區係具有胺基酸序列SEQ ID NO: 1之人類IgG1同型，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。

【0021】 在一些實施例中，人類IgG1恆定區在胺基酸Asn297（框選，Kabat編號）處經修飾，以防止該抗體醣化(glycosylation)，例如Asn297Ala(N297A)。

在一些實施例中，於胺基酸 $\text{Leu}235$ (Kabat 編號) 處修飾該抗體之恆定區以改變 Fc 受體相互作用，例如 $\text{Leu}235\text{Glu}$ ($\text{L}235\text{E}$) 或 $\text{Leu}235\text{Ala}$ ($\text{L}235\text{A}$)。在一些實施例中，於胺基酸 $\text{Leu}234$ 處 (Kabat 編號) 修飾該抗體之恆定區以改變 Fc 受體相互作用，例如， $\text{Leu}234\text{Ala}$ ($\text{L}234\text{A}$)。在一些實施例中，於胺基酸 234 及 235 處均改變該抗體之恆定區，例如 $\text{Leu}234\text{Ala}$ 及 $\text{Leu}235\text{Ala}$ ($\text{L}234\text{A}/\text{L}235\text{A}$) (Kabat 等人之 EU 索引，1991 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*)。

【0022】 在一些實施例中，該抗體之恆定區係具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 2 的人類 $\text{IgG}2$ 同型，如揭示於美國專利申請案系列號第 $13/960,136$ 號 (公開案第 $\text{US}20140140989$ 號)。

【0023】 在一些實施例中，於胺基酸 $\text{Asn}297$ (框選， Kabat 編號) 處修飾該人類 $\text{IgG}2$ 恆定區以防止抗體醃化，例如， $\text{Asn}297\text{Ala}$ ($\text{N}297\text{A}$)。

【0024】 在一些實施例中，該抗體之恆定區係具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 3 的人類 $\text{IgG}3$ 同型，如揭示於美國專利申請案系列號第 $13/960,136$ 號 (公開案第 $\text{US}20140140989$ 號)。

【0025】 在一些實施例中，於胺基酸 $\text{Asn}297$ 處 (框選， Kabat 編號) 修飾該人類 $\text{IgG}3$ 恆定區以防止該抗體醃化，例如， $\text{Asn}297\text{Ala}$ ($\text{N}297\text{A}$)。在一些實施例中，

於胺基酸 435 處修飾該人類 IgG3 恆定區以延長半衰期，例如，Arg435H 係 (R435H) (Kabat 等人之 EU 索引，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest)。

【0026】 在一些實施例中，該抗體之恆定區係具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 4 的人類 IgG4 同型，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號 (公開案第 US20140140989 號)。

【0027】 在一些實施例中，在鉸鏈區中修飾該人類 IgG4 恆定區以防止或降低鏈交換，例如，Ser228Pro (S228P)。在其他實施例中，於胺基酸 235 處修飾該人類 IgG4 恆定區以改變 Fc 受體相互作用，例如，Leu235Glu (L235E)。在一些實施例中，在鉸鏈中並且於胺基酸 235 處修飾該人類 IgG4 恆定區，例如，Ser228Pro 及 Leu235Glu (S228P/L235E)。在一些實施例中，於胺基酸 Asn297 處 (Kabat 編號) 處修飾該人類 IgG4 恆定區以防止該抗體醣化，例如，Asn297Ala (N297A)。在本文所揭示之一些實施例中，於胺基酸位置 Ser228、Leu235、及 Asn297 處 (例如，S228P/L235E/N297A) 修飾該人類 IgG4 恆定區。

(Kabat 等人之 EU 索引，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest)。在本文所揭示之其他實施例中，該抗體係人類 IgG4 亞型並缺乏醣化作用。在此等實施例中，該醣化作用可藉由於位置

297 (Kabat 編號) 處突變 (例如 N297A) 來消除。在其他實施例中，該醮化作用可藉由在缺乏轉譯後醮化之能力的宿主細胞 (例如細菌或酵母衍生系統或經修飾之哺乳動物細胞表現系統) 中產生抗體來消除。

【0028】 在一些實施例中，該人類 IgG 恆定區經修飾以增強 FcRn 結合。增強與 FcRn 結合之 FC 突變的實例係 Met252Tyr、Ser254Thr、Thr256Glu (分別 M252Y、S254T、T256E) (Kabat 編號, Dall'Acqua 等人, 2006, J. Biol. Chem. Vol. 281 (33) 23514-23524)、或 Met428Leu 和 Asn434Ser (M428L, N434S) (Zalevsky 等人, 2010 Nature Biotech, 第28卷, (2) 157-159)。(Kabat 等人之 EU 索引, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest)。

【0029】 在一些實施例中，該人類 IgG 恆定區經修飾以改變抗體依賴細胞毒性 (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) 及/或互補依賴細胞毒性 (complement-dependent cytotoxicity; CDC)，例如，描述於 Natsume 等人, 2008 Cancer Res., 68(10): 3863-72; Idusogie 等人, 2001 J. Immunol., 166(4): 2571-5; Moore 等人, 2010 mAbs, 2(2): 181-189; Lazar 等人, 2006 PROC. NATL. ACAD. SCI., 103(11): 4005-4010, Shields *et al.*, 2001 JBC, 276(9): 6591-6604;

Stavenhagen 等人，2007 *Cancer Res.*, 67(18): 8882-8890；Stavenhagen 等人，2008 *Advan. Enzyme Regul.*, 48: 152-164；Alegre 等人，1992 *J Immunol*, 148: 3461-3468；Reviewed in Kaneko 和 Niwa，2011 *Biodrugs*, 25(1):1-11 的胺基酸修飾。

【0030】 在一些實施例中，該人類 IgG 恆定區經修飾以誘導異源二聚合。例如，於 Thr366 處在 CH3 結構域中具有胺基酸修飾，當由更為整體之胺基酸（例如，Try (T366W)）替代時，能夠優先與具有於位置 Thr366、Leu368、及 Tyr407 處至較不整體之胺基酸的胺基酸修飾的第二 CH3 結構域成對，例如分別 Ser、Ala 及 Val (T366S/L368A/Y407V)。經由 CH3 修飾之異源二聚合可藉由引入二硫鍵進一步穩定，例如藉由在相對 CH3 結構域上將 Ser354 變為 Cys (S354C) 並將 Y349 變為 Cys (Y349C)（在 Carter, 2001 *J. Immunol. Methods*, 248: 7-15 中綜述）來穩定。

【0031】 在本文所揭示之其他實施例中，該抗體缺乏醣化作用，但不於胺基酸 Asn297 (Kabat 編號) 處修飾。在此等實施例中，該醣化作用可藉由在缺乏轉譯後醣化能力的宿主細胞（例如細菌或酵母衍生系統或經修飾之哺乳動物細胞表現系統）中產生抗體來消除。

【0032】 本文亦揭示了包括一或更多個結合至CD47的單株抗體或其免疫學活性片段的醫藥組合物，其中該抗體不導致在投藥之後顯著程度之紅血球之血球凝集。

【0033】 血球凝集係同型相互作用之實例，其中當經二價CD47結合實體處理時導致兩個CD47表現細胞聚集(aggregate)或凝集。本文所揭示之抗體在細胞表面上結合CD47並且不導致細胞凝集現象之能力不限於紅血球。已經觀察到本文所揭示之抗體以不促進CD47陽性細胞系(例如，Daudi細胞)凝集之方式獨特地結合CD47。

【0034】 在一些情形中，該抗體包含選自由SEQ ID NOs: 5-30組成之群組的可變重(variable heavy; VH)鏈區，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)。該抗體可選地包含選自由SEQ ID NOs: 31-47組成之群組的可變輕(variable light; VL)鏈區，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)。在一些情形中，該抗體包含選自由SEQ ID NOs: 5-30組成之群組的VH鏈區(如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))及選自由SEQ ID NOs: 31-47組成之群組的VL鏈區(如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))。本文所揭示之抗體亦包括具有與在SEQ ID NOs: 5-30之至少一個中闡述之序列至少90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或更為一致的可變重鏈及與在SEQ ID NOs: 31-47之至少一個中闡述之序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更為一致的可變輕鏈之抗體，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。在其他態樣中，該抗體包含在SEQ ID NOs: 5、7、8、11、15-17、20-22、及27-30之任一個中提供之VH區，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號），該VH區與在SEQ ID NOs: 31-39、42、43、44、及47之任一個中提供之VL區域成對，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。在另一實施例中，該抗體包含在SEQ ID NOs: 5、7、8、11、12、15-17、20-22、及27-30之任一個中提供之VH區，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號），該VH區與在SEQ ID NOs: 31、32、35、40、41、42、43、44、及47之任一個中提供之VL區域成對，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。在又一態樣中，該抗體包含選自在表1中列出之組合的VH鏈區與VL鏈區域之組合，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。

【0035】 在一些實施例中，該CD47抗體或其免疫學活性片段包含在SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、或SEQ ID NO: 66中闡述之VH互補決定區1(complementarity determining region 1; CDR1)序列，在SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、或SEQ ID NO: 76中闡述之VH CDR2序列，在SEQ ID NO: 52或SEQ ID NO: 77中闡述之VH CDR3序列，在SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 67、或SEQ ID NO: 68中闡述之VL CDR1序列，在SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、或SEQ ID NO: 71中闡述之VL CDR2序列，以及在SEQ ID NO: 55中闡述之VL CDR3序列例如，該抗體或其免疫學活性片段包含在SEQ ID NO: 50中闡述之VH CDR1序列、在SEQ ID NO: 51中闡述之VH CDR2序列、在SEQ ID NO: 52中闡述之VH CDR3序列、在SEQ ID NO: 53中闡述之VL CDR1序列、在SEQ ID NO: 54中闡述之VL CDR2序列、及在SEQ ID NO: 55中闡述之VL CDR3序列。在另一實例中，該抗體或其免疫學活性片段包含在SEQ ID NO: 50中闡述之VH CDR1序列、在SEQ ID NO: 72中闡述之VH CDR2序列、在SEQ ID NO: 52中闡述之VH CDR3

序列、在SEQ ID NO: 53中闡述之VL CDR1序列、在SEQ ID NO: 71中闡述之VL CDR2序列、及在SEQ ID NO: 55中闡述之VL CDR3序列-全部SEQ ID參考係如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)。

【0036】 在一個實施例中，本文所揭示之抗體以將重鏈定位在CD47表現細胞膜附近而輕鏈堵塞在CD47上之SIRP α 結合位點的頭部至側面取向結合至CD47。在另一實施例中，本文所揭示之抗體以將輕鏈定位在CD47表現細胞附近而重鏈堵塞在CD47上之SIRP α 結合位點的頭部至側面取向結合至CD47。

【0037】 該等CD47抗體結合至包括當根據SEQ ID NO: 147(亦即，不包括信號序列(胺基酸1-18)之SEQ ID NO: 48)編號時CD47之胺基酸殘基1-116之任一個的抗原決定基。例如，本文所揭示之抗體結合至抗原決定基，其包括當根據SEQ ID NO: 147編號時CD47之胺基酸殘基Q31、N32、T33、T34、E35、V36、Y37、V38、K39、W40、K41、F42、K43、G44、R45、D46、I47、Y48、T49、F50、D51、G52、A53、L54、N55、K56、S57、T58、V59、P60、T61、D62、F63、S64、S65、A66、K67、I68、E69、V70、S71、Q72、L73、L74、K75、G76、D77、A78、S79、L80、K81、M82、D83、K84、S85、D86、A87、V88、S89、H90、T91、G92、N93、Y94、

T 9 5、C 9 6、E 9 7、V 9 8、T 9 9、E 1 0 0、L 1 0 1、T 1 0 2、R 1 0 3、E 1 0 4、G 1 0 5、E 1 0 6、T 1 0 7、I 1 0 8、I 1 0 9、及 E 1 1 0 中的一或更多個 — 全部 S E Q I D 參考係如揭示於美國專利申請案系列號第 1 3 / 9 6 0, 1 3 6 號（公開案第 U S 2 0 1 4 0 1 4 0 9 8 9 號）。

【0038】 在一些情形中，本文所揭示之抗體結合至不連續抗原決定基，其包括當根據 S E Q I D N O: 1 4 7 編號時 C D 4 7 之胺基酸殘基 Y 3 7、V 3 8、K 3 9、W 4 0、K 4 1、F 4 2、K 4 3、G 4 4、R 4 5、D 4 6、I 4 7、Y 4 8、T 4 9、F 5 0、及 D 5 1 中的一或更多個。例如，本文所揭示之抗體結合至不連續抗原決定基，其包含當根據 S E Q I D N O: 1 4 7 編號時 C D 4 7 之胺基酸殘基 Y 3 7、K 3 9、K 4 1、K 4 3、G 4 4、R 4 5、D 4 6、D 5 1、H 9 0、N 9 3、E 9 7、T 9 9、E 1 0 4、或 E 1 0 6。例如，本文所揭示之抗體結合至不連續抗原決定基，其至少包括當根據 S E Q I D N O: 1 4 7 編號時 C D 4 7 之 K G R D (S E Q I D N O: 5 6) 迴圈（殘基 4 3 - 4 6）之殘基。例如，本文所揭示之抗體結合至不連續抗原決定基，其至少包括當根據 S E Q I D N O: 1 4 7 編號時 C D 4 7 之殘基 Y 3 7、K 3 9、K 4 1、K G R D (S E Q I D N O: 5 6) 迴圈（殘基 4 3 - 4 6）、D 5 1、H 9 0、N 9 3、E 9 7、T 9 9、E 1 0 4、及 E 1 0 6。例如，本文所揭示之抗體結合至不連續抗原決定基，其包括當根據 S E Q I D N O: 1 4 7 編號時 C D 4 7 之殘基 Y 3 7、K 3 9、K 4 1、K G R D (S E Q I D N O: 5 6) 迴圈（殘基 4 3 - 4 6）、D 5 1、H 9 0、N 9 3、E 9 7、T 9 9、

E104、及E106-全部SEQ ID參考係如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。

【0039】 本文所述之CD47抗體之VH區主要涉及結合至CD47之KGRD（SEQ ID NO: 56，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號））迴圈。因此，本文所揭示之抗體結合的獨特抗原決定基係在CD47側面上。與在本領域中已知之現有CD47抗體相反，在近膜位置中本文所述之CD47抗體之VH結構域之取向係此等抗體之關鍵特徵，即藉由限制該等抗體使得其等不能橋接至在相鄰細胞上的CD47抗體來防止細胞凝集，例如，紅血球血球凝集。此外，因為本文所述之CD47抗體之VK結構域與頂端殘基諸如Y37、T102、及E104相互作用，該等頂端殘基涉及SIRP α 結合，所以主要是VK結構域在物理上妨礙SIRP α 結合至CD47。

【0040】 亦提供了防止CD47與SIRP α 相互作用的與本文所述之CD47抗體競爭的分離之抗體或其免疫學活性片段。

【0041】 本文揭示了包含當根據SEQ ID NO:147編號時CD47之胺基酸殘基Y37、K39、K41、K43、G44、R45、D46、D51、H90、N93、E97、T99、E104、及E106的胜肽，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。亦

提供了包含當根據 SEQ ID NO:147 編號時 CD47 之胺基酸殘基 1-116 之任一個的胜肽。例如，該胜肽包含當根據 SEQ ID NO:147 編號時 CD47 之胺基酸殘基 Q31、N32、T33、T34、E35、V36、Y37、V38、K39、W40、K41、F42、K43、G44、R45、D46、I47、Y48、T49、F50、D51、G52、A53、L54、N55、K56、S57、T58、V59、P60、T61、D62、F63、S64、S65、A66、K67、I68、E69、V70、S71、Q72、L73、L74、K75、G76、D77、A78、S79、L80、K81、M82、D83、K84、S85、D86、A87、V88、S89、H90、T91、G92、N93、Y94、T95、C96、E97、V98、T99、E100、L101、T102、R103、E104、G105、E106、T107、I108、I109、及 E110 中的一或更多個。亦提供了使用此多肽作為抗原（例如，結合 CD47 抗體之抗原）之方法。

【0042】 本發明亦提供了藉由向有需要之受試者投予一或更多個結合至 CD47 之單株抗體或其免疫學活性片段來緩解癌症或其他腫瘤性病症之症狀的方法，其中該抗體不導致在投藥之後顯著程度之紅血球之血球凝集、紅血球耗盡、經閉、及/或血小板耗盡。該抗體係在受試者中以充分緩解癌症或其他腫瘤性病症之症狀的量投予。在一些實施例中，該受試者係人類。在一些實施例中，該抗體係嵌合、人源化、或全人源的。在一些實施例中，該抗體結合至人類 CD47。在一些實施例中，該抗體或其免疫學

活性片段防止CD47與SIRP α 相互作用。在一些實施例中，該抗體或其免疫學活性片段係選自由IgG1同型、IgG2同型、IgG3同型、及IgG4同型組成之群組的IgG同型。在一些實施例中，該抗體或其免疫學活性片段係選自IgG4P及IgG4PE的IgG同型。

【0043】 在一些實施例中，本文所述之CD47抗體係與一或更多種額外試劑或額外試劑之組合結合使用。適宜額外試劑包括用於意欲應用（諸如，例如，癌症）的當前醫藥及/或外科治療劑。例如，該等CD47抗體可與一或更多種額外化學治療劑或抗腫瘤劑結合使用。或者，該額外化學治療劑係放射性治療劑。在一些實施例中，該化學治療劑係細胞死亡誘導劑。在一些實施例中，該化學治療劑誘導跨過質膜的磷脂不對稱損失，例如導致磷脂絲胺酸（phosphatidylserine; PS）之細胞表面暴露。在一些實施例中，該化學治療劑誘導內質網（endoplasmic reticulum; ER）應力。在一些實施例中，該化學治療劑係蛋白酶體抑制劑。在一些實施例中，該化學治療劑誘導ER蛋白轉移至細胞表面。在一些實施例中，該化學治療劑誘導鈣網蛋白之轉移及細胞表面暴露。

【0044】 在一些實施例中，將該CD47抗體及額外試劑調配為單一治療組合物，並且同時投予該CD47抗體及額外試劑。或者，該CD47抗體及額外試劑彼此分離，例如，將各者調配為單獨治療組合物，並且同時投予該CD47抗體及額外試劑，或者在治療療法期間於不同時間投予該

C D 4 7 抗體及額外試劑。例如，在投予額外試劑之前投予該 C D 4 7 抗體，在投予額外試劑之後投予該 C D 4 7 抗體，或以交替方式投予該 C D 4 7 抗體及額外試劑。如本文所述，以單一劑量或以多個劑量投予該 C D 4 7 抗體及額外試劑。

【0045】 本領域一般技藝人士應瞭解本文所揭示之抗體具有各種用途。例如，本文所揭示之抗體用作治療劑，作為在診斷套組中之試劑或作為診斷工具，或在競爭分析中作為試劑以產生治療試劑。

【0046】 本文所提及之專利及科學文獻建立為熟習該項技術者所獲得之知識。本文所引用的全部美國專利及已公開或未公開之美國專利申請案係以引用方式併入。本文引用的全部已公開之外國專利及專利申請案在此以引用方式併入本文中。本文引用的由入藏登記號指示的 G e n b a n k 及 N C B I 亞型在此以引用方式併入。本文引用的全部其他已公開的參考、文獻、全稿及科學文獻在此以引用方式併入。

【0047】 儘管本揭示已經參考其較佳實施例特別地示出並描述，本領域一般技藝人士應瞭解形式及細節之各種改變可在其中產生而不脫離由隨附申請專利範圍所涵蓋之本揭示之範疇。

【圖式簡單說明】

【0048】 第1A圖係描繪包括CD47-ECD動力學及CD47-ECD之穩定親和性的CD47與TSP-1結合的並列圖。第1B圖係圖示測試CD47抗體之阻斷效應之圖。第1C圖係圖示在涉及測試CD47抗體之CCRF-CEM中CD47抗體及TSP-1競爭研究結果之圖。

【0049】 第2A圖係圖示全部CD47表現的柱狀圖。第2B圖係圖示全部JAG1表現的柱狀圖。第2C圖係圖示在包括測試CD47抗體之治療之後的平均存活率的柱狀圖。第2D圖係圖示在包括經測試CD47抗體治療之彼等的乳腺球中JAG1表現的柱狀圖。

【實施方式】

【0050】 本文揭示了特異性結合CD47（包括人類CD47）的單株抗體。在本文中此等抗體被統稱為CD47抗體。

【0051】 用於靶細胞消除之主要FC依賴功能係藉由將C1q結合至Fc區引發的互補依賴細胞毒性（complement dependent cytotoxicity；CDC）；由Fc區與Fc γ 受體（Fc γ R）（在免疫效應細胞（例如，NK細胞及嗜中性細胞）上主要為Fc γ RIIIa）相互作用介導之抗體依賴細胞毒性（antibody dependent cytotoxicity；ADCC）；以及藉由經由Fc γ RI識別經調理的靶細胞來藉由巨噬細胞進行的抗體依賴細胞吞噬作用（antibody dependent cellular

phagocytosis; AD CP)。抗體亞型在其等介導Fc依賴效應活性之能力方面具有差異。在人類中，歸因於結合C1q，IgG1及IgG3亞型具有針對CDC之高功效。此外，IgG1亞型具有對FcγR之最高親和性並且藉以就ADCC及Fc依賴ADCP而言係最為有效的。IgG4亞型沒有C1q結合親和性且具有大幅度降低之FcγR結合親和性並且藉以具有顯著減小之效應功能。

【0052】 CD47係一種屬於免疫球蛋白超科的多跨膜受體，其在巨噬細胞上與SIRPα（信號調節蛋白a）相互作用並且藉以減弱吞噬作用。控制此途徑的癌細胞逃避吞噬作用。如下文詳細描述，此係腫瘤免疫逃避之新的機制，並且治療上靶向CD47在數種癌症中具有廣泛應用。

【0053】 在眾多不同惡性腫瘤中CD47表現與更差臨床結果相關，該等惡性腫瘤包括非霍奇金氏淋巴瘤（Non-Hodgkin Lymphoma; NHL）、急性淋巴球性白血病（ALL）、急性骨髓性白血病（Acute Myelogenous Leukemia; AML）、卵巢癌、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、等等。此外，在白血病及固態腫瘤二者中已將CD47識別為癌症幹細胞標記（Jaiswal等人，2009 Cell, 138(2): 271-85；Chan等人，2009 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106(33): 14016-21；Chan等人，2010 Curr. Opin. Urol., 20(5): 393-7；Majeti R等人，2011 Oncogene, 30(9): 1009-19）。

【0054】 CD47阻斷抗體已經說明在多種體內腫瘤模型中的抗腫瘤活性。此外，已經顯示在腫瘤模型中此等抗體與其他治療抗體（包括Rituxan™及Herceptin™）協同。阻斷CD47與SIRP α 之相互作用能夠促進巨噬細胞吞噬CD47表現細胞（在Chao等人，2012 Curr. Opin. Immunol., 24(2): 225-32中綜述）。缺乏CD47之小鼠明顯抵抗放射治療，表明與放射性治療結合的靶向CD47之作用（Isenberg等人，2008 Am. J. Pathol., 173(4): 1100-1112；Maxhimer等人，2009 Sci Transl Med, 1(3): 3ra7）。此外，與野生型小鼠相比，在此等小鼠中同基因腫瘤模型顯示減少之骨轉移（Uluckan等人，2009 Cancer Res., 69(7): 3196-204）。

【0055】 已經報導大部分CD47抗體導致人類紅血球之血球凝集以及紅血球耗盡及經閉。血球凝集係同型相互作用之實例，其中當經二價CD47結合實體處理時導致兩個CD47表現細胞聚集或凝集。例如，已經記錄CD47抗體，MABL，作為全IgG或F(ab')₂，導致紅血球之血球凝集，並且，僅當MABL變為scFv或二價scFv時，減輕此效應。（參看，例如，Uno S., Kinoshita Y., Azuma Y.等人，Antitumor activity of a monoclonal antibody against CD47 in xenograft models of human leukemia. Oncol. Rep. 2007；17: 1189-94；Kikuchi Y., Uno S., Yoshimura Y.

等人，A bivalent single-chain Fv fragment against CD47 induces apoptosis for leukemic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004 ; 315: 912-8)。包括 B6H12、BRC126、及 CC2C6 之其他已知 CD47 抗體亦導致 RBC 之血球凝集，如下文詳細描述。

【0056】此外，已經報道當投予小鼠及 / 或石蟹獼猴時，CD47 抗體及拮抗 CD47 之 SIRP α -Fc 融合蛋白導致紅血球耗盡及經閉。(參看 Weiskopf 等人，Engineered SIRP α Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies. *Science* 2013 ; 341:88)。貧血係一種病症，其中血液缺乏充分量之紅血球或血紅素以將氧攜帶至組織。貧血可藉由在本領域中一般已知之數種方法來診斷。例如，經閉係藉由決定完全血液計數 (complete blood count; CBC) 來診斷，該完全血液計數決定紅血球之數量、大小、體積、及血紅素含量。貧血亦藉由量測血液鐵水平及 / 或血清鐵蛋白水平來診斷，該水平係身體總鐵儲存之指示。此外，經閉係藉由維生素 B12 及葉酸鹽之水平、網狀紅血球計數、及膽紅素來診斷。

【0057】因此，細胞之聚集、RBC 耗盡、及經閉表示利用現有全 IgG 抗體及 / 或 SIRP α -Fc 融合蛋白治療上靶向 CD47 之主要限制。

【0058】 此外，CD47抗體之重要特性係阻斷CD47與SIRP α 之相互作用以促進巨噬細胞吞噬CD47表現細胞的能力。眾多現有CD47抗體阻斷SIRP α ；然而，在本文所述之發明之前，阻斷SIRP α 之現有抗體導致血球凝集之副作用，如上文所述該血球凝集係不期望的。其他現有抗體，諸如2D3，不導致血球凝集；然而，此等抗體亦不阻斷SIRP α ，在促進吞噬作用方面呈現無效。因此，在本文所述之發明之前，存在對識別阻斷SIRP α 而不導致細胞凝集的CD47抗體的迫切需求。

【0059】 本文所揭示之CD47抗體避免不期望之血球凝集效應，藉以增加治療上靶向CD47之效率，並且維持阻斷CD47與SIRP α 相互作用的能力，藉以促進吞噬CD47表現細胞。特別地，本文所揭示之全IgG CD47抗體（例如，2A1及包括在表1中提供之彼等的其人源化衍生物）不會以顯著程度凝集細胞。例如，本文所揭示之CD47抗體不會以顯著程度血球凝集RBC。本文描述了以全IgG形式之第一種CD47抗體，其阻斷SIRP α 並且不導致顯著程度之血球凝集及/或RBC耗盡。總之，本文所揭示之抗體（例如，2A1抗體及其人源化衍生物）在其阻斷SIRP α 但不導致顯著程度之血球凝集及/或RBC耗盡之能力方面在現有CD47抗體中係獨特的。

【0060】 本文所揭示之CD47抗體呈現數種期望特性，諸如，以不作限制之實例的方式，有效阻斷在CD47與其配體SIRP α 之間的相互作用，而不導致顯著程度之

紅血球之血球凝集或另外調節之紅血球之血球凝集，以及有效抗腫瘤活性。例如，如與在缺乏本文所述之CD47抗體時在CD47與SIRP α 之間的相互作用之程度相比，本文所揭示之CD47抗體阻斷至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少95%、或至少99%之在CD47與SIRP α 之間的相互作用。本文所揭示之CD47抗體不導致顯著程度之細胞凝集，例如，本文所揭示之CD47抗體不導致顯著程度之紅血球之血球凝集。例如，與在存在現有CD47抗體時的凝集程度相比，在存在本文所揭示之CD47抗體時凝集程度降低了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少99%。在一些實施例中，若與在存在CD47抗體1B4（其包含分別提供於SEQ ID NO:80及SEQ ID NO:81的可變重鏈及可變輕鏈序列，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號））之凝集程度相比，在存在本文所揭示之CD47抗體時凝集程度降低了至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少99%，則本文所揭示之CD47抗體不導致顯著程度之凝集。本文所揭示之CD47抗體不導致顯著水平之RBC耗盡。例如，在投予（5分鐘、10分鐘、30分鐘、1小時、2小時、3小時、4小時、5小時、12小時、

24 小時、2 天、4 天、6 天、1 週、2 週、3 週、1 月、2 月、或更久) 本文所揭示之抗體之後在受試者中 R B C 計數係至少 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 %、99.5 % 之在投藥之前的 R B C 計數。替代地或此外，在投予(5 分鐘、10 分鐘、30 分鐘、1 小時、2 小時、3 小時、4 小時、5 小時、12 小時、24 小時、2 天、4 天、6 天、1 週、2 週、3 週、1 月、2 月、或更久) 本文所揭示之抗體之後在受試者中 R B C 計數係至少 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 %、99.5 % 之在投予安慰劑治療(例如，媒劑)之後在受試者中的 R B C 計數。R B C 計數係藉由在本領域中之標準方法來決定。與在本領域中已知之抗體相比，本文所揭示之抗體在腫瘤模型中亦係顯著地更為有效。例如，與在存在現有 C D 4 7 抗體時巨噬細胞吞噬腫瘤細胞之能力相比，在存在本文所揭示之 C D 4 7 抗體時巨噬細胞吞噬腫瘤細胞之能力增加了至少 5 %、至少 10 %、至少 20 %、至少 30 %、至少 40 %、至少 50 %、至少 60 %、至少 70 %、至少 80 %、至少 90 %、或至少 99 %。

【0061】 熟習該項技術者應認識到能夠定量(無需過多實驗)凝集程度，例如，R B C 之血球凝集程度。例如，熟習該項技術者應認識到血球凝集之程度係藉由在存在本文所揭示之 C D 4 7 抗體時進行血球凝集分析之後量測 R B C 點面積來確定，如下文實例所描述。在一些情形中，在存在本文所揭示之 C D 4 7 抗體時 R B C 點之面積係與在

缺乏 CD 47 抗體時（亦即，在存在零血球凝集時）RBC 點面積相比。以此方式，相對於基線對照定量血球凝集。較大 RBC 點面積對應於高水平之血球凝集。或者，RBC 點之密度測定法亦可用以定量血球凝集。

【0062】此外，抗體，諸如本文所揭示之 CD 47 抗體，可在投藥時血小板耗盡方面（例如，以 Fc 依賴方式）具有重要作用。例如，利用結合至 CD 47 的 IgG1 亞型抗體治療石蟹獼猴可於多個劑量導致顯著血小板耗盡。參看，例如，實例 12 及第 12 C 圖至第 12 D 圖。血小板耗盡之缺點係，當嚴重時，其可導致致死阻血凝毒素。本發明係部分基於令人驚訝之發現，即抗體減少 Fc γ R 結合之突變導致不可偵測之低度的血小板耗盡，甚至於高劑量（例如，100 mg/kg）也是如此。參看，例如，實例 12 及第 12 G 圖至第 12 H 圖。因此，具有嚴重降低之 Fc γ R 結合及效應功能的 CD 47 結合抗體不導致血小板耗盡。

【0063】血小板計數可使用為本領域一般技藝人士一般已知之常規方法來量測。可將隨著時間推移之剩餘血小板百分數計算為在投予本文所揭示之治療劑（例如，CD 47 抗體）之後於某個時間點的剩餘血小板計數，該剩餘血小板計數有時在投予該治療劑之前（例如，1 小時、3 小時、6 小時、12 小時、1 天、2 天、4 天、5 天、6 天、或更久）經標準化為血小板計數。可將顯著血小板耗盡定義為在投藥之後小於 100%（例如，小於 95%、90%、85%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、

20%、或10%)的剩餘血小板百分數。本文所揭示之治療劑(例如,抗體)導致不顯著水平之血小板耗盡(例如,在投予之後至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或100%的剩餘血小板水平)。本文所揭示之CD47抗體結合至人類CD47並且阻斷其與SIRP α 之相互作用(第1B圖、第3圖、及第7J圖,如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))。此等抗體不導致顯著程度之人類紅血球之血球凝集(第4圖,如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,13號(公開案第US20140140989號))。此外,此等抗體可具有不導致顯著水平之血小板耗盡之性質(例如,實例12及第12圖,如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,13號(公開案第US20140140989號))。此等抗體能夠促進巨噬細胞吞噬腫瘤細胞(第9圖,如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,13號(公開案第US20140140989號))。此外,CD47抗體在人類白血病之小鼠模型中呈現有效抗腫瘤活性(第10圖,如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,13號(公開案第US20140140989號))。因此,本文所揭示之CD47抗體解決了治療靶向之CD47的主要限制因素。由此,本文所揭示之CD47抗體在治療多種癌症方面保持非常重要。

【0064】 特異性結合人類CD47的本文所揭示之抗體阻斷、抑制、破壞或另外調節在人類CD47與人類SIRP α

之間的相互作用，而不導致顯著程度之紅血球之血球凝集或另外調節紅血球之血球凝集。

【0065】 本文所揭示之抗體結合至CD47抗原決定基，其中平衡結合常數(K_d) $\leq 1\ \mu\text{M}$ ，例如， $\leq 100\ \text{nM}$ ，較佳地 $\leq 10\ \text{nM}$ ，並且更佳地 $\leq 1\ \text{nM}$ 。例如，本文所提供之CD47抗體呈現近似在 $\leq 1\ \text{nM}$ 至約 $1\ \text{pM}$ 之範圍中的 K_d 。

【0066】 本文所揭示之CD47抗體用以調節、阻斷、抑制、降低、拮抗、中和或另外干擾廣泛分佈之CD47之功能活性。CD47之功能活性包括例如，經由與SIRP α 相互作用之信號傳導、在細胞黏附至細胞間基質時調節（例如，增加）細胞內鈣濃度、與血小板反應素之C末端細胞結合域相互作用、與血纖維蛋白原相互作用、以及與各種整合素相互作用。例如，該CD47抗體藉由部分或完全調節、阻斷、抑制、降低拮抗、中和、或另外干擾CD47結合至SIRP α 來完全或部分抑制CD47功能活性。

【0067】 當如與在缺乏與本文所述之CD47抗體結合時CD47功能活性之水平相比，在存在CD47抗體時CD47功能活性之水平減少了至少95%，例如，96%、97%、98%、99%或100%時，CD47抗體被認為完全調節、阻斷、抑制、降低、拮抗、中和或另外干擾CD47功能活性。當如與在缺乏與本文所述之CD47抗體結合時CD47之活性水平相比，在存在CD47抗體時CD47活性之水平減少了至少50%時，例如，55%、60%、75%、

80%、85%或90%時，CD47抗體被認為顯著阻斷、抑制、降低、拮抗、中和或另外干擾CD47功能活性。當如與在缺乏與本文所述之CD47抗體結合時CD47之活性水平相比，在存在CD47抗體時CD47之活性水平減少了小於95%時，例如，10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、80%、85%或90%時，CD47抗體被認為部分調節、阻斷、抑制、降低、拮抗、中和或另外干擾CD47功能活性。

定義

【0068】 除非另外定義，與本發明結合使用之科學及技術術語應具有為本領域一般技藝人士通常理解的含義。此外，除非上下文另外需要，單數術語應包括複數形式並且複數術語應包括單數形式。一般而言，結合本文所述細胞和組織培養、分子生物學、蛋白質和寡核苷酸或多核苷酸化學以及雜交使用之命名法及技術係在本領域中熟知並且通常使用之彼等。標準技術係用於重組DNA、寡核苷酸合成、及組織培養與轉化（例如，電穿孔、脂轉染）。酶促反應及純化技術根據製造商之說明書或在本領域中常規方法或如本文所述進行。一般根據在本領域中熟知之習知方法並且如貫穿本發明說明書中所引用且論述的各種一般及更特定的參考文獻所述來進行前述技術及過程。參看，例如，Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

N.Y.(1989))。結合本文所述之分析化學、合成有機化學、及藥物與醫藥化學使用的命名法、實驗室過程及技術係在本領域中熟知並且通常使用之彼等。標準技術係用於化學合成、化學分析、藥物製備、調配、及遞送、以及治療患者。

【0069】 如根據本揭示所採用，除非另外指明，以下術語應理解為具有以下含義：

【0070】 如本文所使用，術語CD47、整合素相關之蛋白質(integrin-associated protein; IAP)、卵巢癌抗原OA3、Rh相關之抗原及MERG係同物異名並且可相互交換使用。

【0071】 術語紅血球(red blood cell)及紅血球(erythrocyte)係同物異名並且本文相互交換使用。

【0072】 術語凝集作用指細胞凝集，而術語血球凝集指細胞之特定子集（亦即，紅血球）之凝集。因此，血球凝集係凝集作用之一種類型。

【0073】 如本文所使用，術語「抗體」指免疫球蛋白分子及免疫球蛋白(Ig)分子之免疫學活性部分，亦即，含有特異性結合抗原（與抗原免疫反應）的抗原結合位點之分子。「特異性結合」或「免疫反應」或「對抗」意謂抗體與所要抗原之一或更多個抗原決定位反應並且不與其他胜肽反應或於更低親和性($K_d > 10^{-6}$)處結合。抗體包括但不限於多株、單株、嵌合、dAb（結構域抗體）、單

鏈、 Fab 、 Fab' 與 $F(ab')_2$ 片段、 F_v 、 $scFvs$ 、及 Fab 表現庫。

【0074】 已知基本抗體結構單元包含四聚體。各個四聚體係由兩個相同胜肽鏈對構成，各對具有一個「輕」鏈（約25 kDa）及一個「重」鏈（約50-70 kDa）。各鏈之胺基末端部分包括主要負責抗原識別的約100至110或更多個胺基酸之可變區。各鏈之羧基末端部分定義主要負責效應功能的恆定區。一般而言，獲自人類之抗體分子係關於任何類別IgG、IgM、IgA、IgE及IgD，其等存在於分子中之重鏈性質彼此不同。某些類別亦具有亞型（亦稱為同型），諸如IgG₁、IgG₂、及其他。此外，在人類中，輕鏈可係κ鏈或λ鏈。

【0075】 如本文所使用，術語「單株抗體」（MAb）或「單株抗體組合物」指僅含有由獨特輕鏈基因產物及獨特重鏈基因產物組成之一個分子種類之抗體分子的抗體分子群體。特定言之，單株抗體之互補決定區（CDR）在該群體之全部分子中係一致的。MAb含有能夠與抗原之特定抗原決定基免疫反應的抗原結合位點，其特徵在於對抗原決定基具有獨特結合親和性。

【0076】 一般而言，獲自人類之抗體分子係關於任何類別IgG、IgM、IgA、IgE及IgD，其等存在於分子中之重鏈性質彼此不同。某些種類亦具有亞型，諸如IgG₁、IgG₂、及其他。此外，在人類中，輕鏈可係κ鏈或λ鏈。

【0077】術語「抗原結合位點」或「結合部分」指參與抗原結合的免疫球蛋白分子之部分。該抗原結合位點係由重（「H」）及輕（「L」）鏈之N末端可變（「V」）區之胺基酸殘基形成。在重鏈及輕鏈之V區中之三個高度分散延伸段被稱為「高變區(hypervariable region)」，位於被稱作「構架區(framework region)」或「FR」的更保守側翼延伸段之間。因此，術語「FR」指在免疫球蛋白中高變區之間及在該高變區鄰近天然發現的胺基酸序列。在抗體分子中，在三維空間中相對於彼此設置輕鏈之三個高變區及重鏈之三個高變區以形成抗原結合表面。抗原結合表面係與結合抗原之三維表面互補，並且重鏈及輕鏈各者之三個高變區被稱為「互補決定區」或「CDR」。將胺基酸分配至各個結構域係根據Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)) 或 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia 等人, Nature 342:878-883 (1989) 之定義。

【0078】如本文所使用，術語「抗原決定基」包括能夠特異性結合至免疫球蛋白或其片段、或T細胞受體之任何蛋白質決定子。術語「抗原決定基」包括能夠特異性結合至免疫球蛋白或T細胞受體之任何蛋白質決定子。抗原決定子通常由分子的化學活性表面基團諸如胺基酸或糖側鏈組成，並且通常具有特定三維結構特性及特定電荷特

性。據說當解離常數係 $\leq 1 \mu\text{M}$ ；例如， $\leq 100 \text{ nM}$ ，較佳地 $\leq 10 \text{ nM}$ 及更佳地 $\leq 1 \text{ nM}$ 時，抗體特異性結合抗原。

【0079】如本文所使用，術語「免疫學結合」、及「免疫學結合性質」指出現在免疫球蛋白分子及免疫球蛋白特異的抗原之間的非共價相互作用類型。免疫學結合相互作用之強度或親和性可以該相互作用之解離常數 (K_d) 表達，其中較小 K_d 表示較高親和性。經選擇之胜肽的免疫學結合性質可使用在本領域中熟知之方法定量。一種此方法需要量測抗原結合位點/抗原複合物形成及解離之速率，其中彼等速率取決於複合物配偶體之濃度、相互作用之親和性、及在兩個方向中等效地影響該速率之幾何參數。因此，「締合速率常數 (on rate constant)」 (k_{on}) 及「解離速率常數 (off rate constant)」 (k_{off}) 均可藉由計算締合及解離之濃度及實際速率來決定。參看 *Nature* 361:186-87 (1993)。 K_{off}/k_{on} 之比例能夠抵消與親和力無關之所有參數，因而等同於解離常數 K_d 。(一般參看 Davies 等人，(1990) *Annual Rev. Biochem.* 59:439-473)。據說當平衡結合常數 (K_d) 係 $\leq 1 \mu\text{M}$ ，較佳地 $\leq 100 \text{ nM}$ ，更佳地 $\leq 10 \text{ nM}$ ，並且最佳地 $\leq 100 \text{ pM}$ 至約 1 pM 時，本文所揭示之抗體特異性結合至 CD47，如由分析諸如放射性配體結合分析、表面電漿子共振 (surface plasmon resonance; SPR)、流式細胞儀結合分析、或為本領域一般技藝人士已知之相似分析所量測。

【0080】 如本文所使用的術語「分離之多核苷酸」應意謂基因組、cDNA、或合成來源或其一些組合之多核苷酸，根據其來源，「分離之多核苷酸」(1)不與「分離之多核苷酸」天然存在其中的全部或部分多核苷酸締合，(2)可操作地連接至在自然中不與其連接的多核苷酸，或(3)在自然中不作為較大序列之部分存在。

【0081】 本文提及之術語「分離之蛋白質」意謂cDNA、重組RNA、或合成來源或其一些組合之蛋白質，根據其來源，或衍生源，「分離之蛋白質」(1)不與天然存在之蛋白質締合，(2)不具有來自相同來源的其他蛋白質，例如，不具有鼠類蛋白質，(3)藉由來自不同種類之細胞表現，(4)不在自然中出現。

【0082】 術語「胜肽」本文用作通用術語以指天然蛋白、片段、或胜肽序列類似物。因此，天然蛋白片段及類似物係胜肽屬之種類。

【0083】 如本文所使用之應用於某個對象的術語「天然存在」指物體可在自然界中被發現的事實。例如，存在於有機體（包括病毒）中的可從自然界來源分離並且尚未由實驗室人員有意修飾或以其他方式天然存在之胜肽或多核苷酸序列。

【0084】 如本文所使用之術語「可操作地連接」指如此描述之組分位置處於允許其以其意欲之方式起作用的關係中。與編碼序列「可操作地連接」的控制序列以在與控制序列相容之條件下實現編碼序列之表現的方式連接。

【0085】 如本文所使用之術語「控制序列」指影響與之相連的編碼序列之表現及處理所必須的多核苷酸序列。此等控制序列之性質取決於宿主有機體而不同，在原核生物中，此等控制序列一般包括啟動子、核糖體結合位點、及轉錄終止序列，在真核生物中，此等控制序列一般而言包括啟動子及轉錄終止序列。術語「控制序列」意欲至少包括其存在對表現及處理起重要作用之全部組分，並且亦可包括其存在係有利的額外組分，例如，前導序列及融合配偶體序列。如本文提及之術語「多核苷酸」指長度至少為10個鹼基之核苷酸之聚合體，核糖核苷酸或脫氧核糖核苷酸或任一類型核苷酸之經修飾形式。該術語包括DNA之單鏈及雙鏈形式。

【0086】 本文提及之術語「寡核苷酸」包括藉由天然存在及非天然存在之寡核苷酸鏈連接起來之天然存在及經修飾的核苷酸。寡核苷酸係一般包含200個鹼基或更少之長度的多核苷酸子集。較佳地寡核苷酸係10至60個鹼基長度並且最佳地12、13、14、15、16、17、18、19、或20至40個鹼基長度。寡核苷酸一般係單鏈，例如，用於探針，儘管寡核苷酸可係雙鏈，例如，用於構造基因突變體。本文所揭示之寡核苷酸係有義或反義寡核苷酸。

【0087】 本文提及之術語「天然存在之核苷酸」包括脫氧核糖核苷酸及核糖核苷酸。本文提及之術語「經修飾之核苷酸」包括具有經修飾或經取代之糖基的核苷酸及其類似者。本文提及之術語「寡核苷酸連接」包括寡核苷酸連

接諸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯、磷醯胺酸酯、及其類似者。參看，例如，LaPlanche等人，Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986)；Stec等人，J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984)，Stein等人，Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988)，Zon等人，Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991)；Zon等人，Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach，第87-108頁(F. Eckstein編輯，Oxford University Press，Oxford England (1991))；Stec等人，美國專利第5,151,510號；Uhlmann & Peyman，Chem. Reviews 90:543 (1990)。若需要，寡核苷酸可包括用於偵測之標記。

【0088】 本文提及之術語「選擇性雜交」意謂可偵測及特異性結合。根據本發明之多核苷酸、寡核苷酸及其片段與核酸鏈在雜交及洗滌條件下選擇性雜交，該等雜交及洗滌條件使與非特異性核酸之可偵測結合的可觀量(appreciable amount)達到最小。如在本領域中已知並在本文中所論述，可使用非常嚴格的條件以獲得選擇性雜交的條件。一般而言，在本文揭示之多核苷酸、寡核苷酸、及片段與所關注之核酸序列之間的核酸序列同源性係至少80%，並且更通常地，優先將同源性增加到至少85%、90%、95%、99%、及100%。若兩段胺基酸序列部分或完全一致，則它們係同源的。例如，85%同源

性意謂當兩段序列以最大匹配方式比對時，85%之胺基酸係一致的。在最大匹配時允許存在間隙（在匹配之兩個序列之任一者中）；間隙長度5或更小係較佳的而2或更小係更佳的。替代地及較佳地，當本文使用此術語時，若兩段蛋白質序列（或源自至少30個胺基酸長度之該等序列的胜肽序列）使用具有突變資料矩陣之ALIGN程式而具有大於5（標準偏差單位）的比對得分及6或更大之間隙罰分，則該兩段蛋白質序列係同源的。參看Dayhoff, M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, 第101-110頁（第5卷，National Biomedical Research Foundation (1972)）及此卷之增刊2，第1-10頁。當使用ALIGN程式最優比對時，若兩個序列或其部分的胺基酸有大於或等於50%係一致的，則該兩個序列或其部分更佳地係同源。術語「對應於」在本文用以意謂多核苷酸序列與參考多核苷酸序列之全部或部分同源（亦即，一致，在進化上不嚴格相關），或胜肽序列與參考胜肽序列一致。與之不同的是，本文使用術語「互補」意謂互補序列與參考多核苷酸序列之全部或部分同源。為了說明，核苷酸序列「TATAC」對應於參考序列「TATAC」並且與參考序列「GTATA」互補。

【0089】 以下術語用以描述在二或更多個多核苷酸或胺基酸序列之間的序列關係：「參考序列」、「比較窗（comparison window）」、「序列一致性」、「序列一致性百分數」、及「大體一致性」。「參考序列」係用

作序列比較基礎之定義序列，參考序列可係較大序列之子集，例如，作為序列表中給定全長cDNA或基因序列之片段，或者可包含完整的cDNA或基因序列。一般而言，參考序列係至少18個核苷酸或6個胺基酸長度，經常為至少24個核苷酸或8個胺基酸長度，並且通常至少48個核苷酸或16個胺基酸長度。由於兩個多核苷酸或胺基酸序列可各者(1)包含在兩個分子之間相似的序列（亦即，完整多核苷酸或胺基酸序列之部分），以及(2)可進一步包含在兩個多核苷酸或胺基酸序列之間不同的序列，在二（或更多個）分子之間的序列比較通常藉由在「比較窗」內比較兩個分子之序列來進行，以識別並比較局部區域之序列相似性。如本文所使用，「比較窗」指至少18個連續核苷酸位置或6個胺基酸之概念片段，其中多核苷酸序列或胺基酸序列可與至少18個連續核苷酸或6個胺基酸序列之參考序列比較並且其中與參考序列（其不包含添加或缺失）相比，在比較窗中該部分多核苷酸序列可包含20%或更少的添加、缺失、取代、及其類似者（亦即，間隙）以達成兩段序列最優比對。用於比對比較窗之序列之最優比對可藉由下列進行：Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)的局部同源性演算法、Needleman & Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970)的同源性比對演算法、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988)的相似性檢索方法、此等演算法之電腦化實施（GAP、

BESTFIT、FASTA、及在 Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 中之 TFASTA，（ Genetics Computer Group，575 Science Dr.，Madison, Wis.）、Geneworks、或 MacVector 軟體包）、或藉由檢查，並且選擇由各種方法產生之最佳比對（亦即，在比較窗內導致最高百分數之同源性）。

【0090】術語「序列一致性」意謂兩個多核苷酸或胺基酸序列在比較窗內係一致的（亦即，以核苷酸對核苷酸或殘基對殘基為基礎）。術語「序列一致性百分數」藉由以下方法計算，即在比較窗內比較兩個最佳比對序列，決定兩個序列中出現一致核酸鹼基（例如，A、T、C、G、U 或 I）或殘基的位置數以產生匹配位置數，用匹配位置數除以在比較窗中的位置總數（亦即，窗大小），以及將結果乘以 100 以產生序列一致性百分數。如本文所使用之術語「大體上一致性」指示多核苷酸或胺基酸序列之特性，其中該多核苷酸或胺基酸包含在至少 18 個核苷酸（6 個胺基酸）位置之比較窗內，經常在至少 24 至 48 個核苷酸（8 至 16 個胺基酸）位置之窗內與參考序列相比具有至少 85% 序列一致性，較佳地至少 90 至 95% 序列一致性，更通常地至少 99% 序列一致性的序列，其中序列一致性百分數係藉由在比較窗內比較參考序列與某一序列來計算，該序列包括總計為參考序列之 20% 或更少的缺失或添加。該參考序列可係較大序列之子集。

【0091】 如本文所使用，二十種習知胺基酸及其縮寫遵循習知用法。參看 *Immunology - A Synthesis*（第二版，E.S. Golub 及 D.R. Gren 編輯，Sinauer Associates, Sunderland 7 Mass. (1991)）。二十種習知胺基酸、非天然胺基酸（諸如 α -、 α -二取代胺基酸、N-烷基胺基酸、乳酸）及其他非習知胺基酸之立體同位素（例如，D-胺基酸）亦可用於本文所揭示之胜肽的適宜組分。非習知胺基酸之實例包括：4-羥脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸、 ϵ -N,N,N-三甲基離胺酸、 ϵ -N-乙醯基離胺酸、O-磷絲胺酸、N-乙醯絲胺酸、N-甲醯甲硫胺酸、3-甲基組胺酸、5-羥基離胺酸、 σ -N-甲基精胺酸、及其他相似胺基酸及亞胺基酸（例如，4-羥基脯胺酸）。在本文所使用之胜肽表示方法中，根據標準用途及慣例，左手方向係胺基末端方向並且右手方向係羧基末端方向。

【0092】 相似地，除非另外說明，單鏈多核苷酸序列之左手末端係5'末端，雙鏈多核苷酸序列之左手方向被稱為5'方向。新生RNA轉錄體之5'至3'添加方向被稱為轉錄方向，在DNA鏈上具有與RNA相同之序列並且在該RNA轉錄體的5'末端的5'-序列區被稱為「上游序列」，在DNA鏈上具有與RNA相同之序列並且在RNA轉錄體的3'末端的3'-序列區被稱為「下游序列」。

【0093】 對胜肽而言，術語「大體上一致性」意謂當諸如藉由程式GAP或BESTFIT使用預設間隙權重最優比對時兩個肽序列共享至少80%序列一致性，較佳地至少

90% 序列一致性，更佳地至少 95% 序列一致性，並且最佳地至少 99% 序列一致性。

【0094】 較佳地，不一致之殘基位置藉由保守性胺基酸取代來區別。

【0095】 保守性胺基酸取代指具有相似側鏈之殘基的相互交換性。例如，具有脂肪族側鏈之胺基酸之群組係甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、及異白胺酸；具有脂肪族羥基側鏈之胺基酸之群組係絲胺酸及蘇胺酸；具有含醯胺側鏈之胺基酸之群組係天冬醯胺酸及麩醯胺酸；具有芳族側鏈之胺基酸之群組係苯丙胺酸、酪胺酸、及色胺酸；具有鹼基側鏈之胺基酸之群組係離胺酸、精胺酸、及組胺酸；以及具有含硫側鏈之胺基酸之群組係半胱胺酸及甲硫胺酸。較佳保守性胺基酸取代群組係：纈胺酸 - 白胺酸 - 異白胺酸、苯丙胺酸 - 酪胺酸、離胺酸 - 精胺酸、丙胺酸 - 纈胺酸、麩胺酸 - 天冬胺酸、及天冬醯胺酸 - 麩醯胺酸。

【0096】 如本文所論述，考慮了本發明包含在抗體或免疫球蛋白分子之胺基酸序列中微小變異，若胺基酸序列之變異保持至少 75%，更佳地至少 80%、90%、95% 並且最佳地 99%。特定言之，考慮了保守性胺基酸替代。保守性替代係在其側鏈上相關之胺基酸家族內發生的彼等。遺傳編碼之胺基酸一般被分為以下家族：(1) 酸性胺基酸係天冬胺酸、麩胺酸；(2) 鹼性胺基酸係離胺酸、精胺酸、組胺酸；(3) 非極性胺基酸係丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸，

以及(4)不帶電之極性胺基酸係甘胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸。親水性胺基酸包括精胺酸、天冬醯胺酸、天冬胺酸、麩醯胺酸、麩氨酸、組胺酸、離胺酸、絲胺酸、及蘇胺酸。疏水性胺基酸包括丙胺酸、半胱胺酸、異白胺酸、白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、脯胺酸、色胺酸、酪胺酸及纈胺酸。其他胺基酸家族包括(i)絲胺酸及蘇胺酸，其係脂肪羥基族；(ii)天冬醯胺酸及麩醯胺酸，其係含有醯胺之家族；(iii)丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸，其係脂肪族；以及(iv)苯丙胺酸、色胺酸、及酪胺酸，其係芳族。例如，合理地預期利用異白胺酸或纈胺酸單獨替代白胺酸、利用麩胺酸單獨替代天冬胺酸、利用絲胺酸單獨替代蘇胺酸、或利用結構相關之胺基酸相似替代胺基酸將不會對所得分子之結合或性質產生重大影響，特別地若該替代不涉及在架構位點內的胺基酸時如此。胺基酸改變是否產生功能肽可容易地藉由分析胜肽衍生物之特異活性來決定。分析在本文中詳細描述。抗體或免疫球蛋白分子之片段或類似物可容易地由本領域中一般技藝人士製備。片段或類似物之較佳胺基末端及羧基末端在功能結構域之邊界附近出現。結構及功能結構域可藉由比較核苷酸及/或胺基酸序列資料與公用或專有序列資料庫來識別。較佳地，電腦化之比較方法係用以識別在已知結構及/或功能之其他蛋白質中出現的序列基元或預測之蛋白質構象結構域。用以識別折疊為已知三維結構的蛋白質序列之方法係已知。Bowie等

人，*Science* 253:164 (1991)。因此，前述實例說明本領域一般技藝人士可識別根據本發明可用以定義結構及功能結構域的序列基元及結構構象。

【0097】 較佳胺基酸取代係彼等：(1)降低對蛋白分解之敏感性，(2)降低對氧化之敏感性，(3)改變用於形成蛋白質複合物之結合親和性，(4)改變結合親和性，以及(4)賦予或修飾此等類似物之其他物理化學或功能性質。類似物可包括與天然出現之肽序列不同的序列之各種突變蛋白。例如，單個或多個胺基酸取代基（較佳地保守性胺基酸取代基）可在天然出現之序列中（較佳地在形成分子間接觸的結構域外部之胜肽部分中）製備。保守性胺基酸取代不應大體上改變親本序列之結構特性（例如，替代胺基酸不應趨於斷裂在親本序列中出現的螺旋或破壞表徵親本序列的其他類型二次結構）。本領域識別之胜肽二級及三級結構之實例描述於 *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton 編輯, W.H. Freeman and Company, New York (1984))；*Introduction to Protein Structure* (C. Branden 和 J. Tooze 編輯, Garland Publishing, New York, NY (1991))；以及 Thornton 等人，*Nature* 354:105 (1991)。

【0098】 如本文所使用之術語「胜肽片段」指具有胺基末端及/或羧基末端缺失的胜肽，但其中剩餘胺基酸序列係與例如從全長 cDNA 序列推導的天然存在序列之對應

位置一致。片段通常係至少5、6、8或10個胺基酸長，較佳地至少14個胺基酸長，更佳地至少20個胺基酸長，通常至少50個胺基酸長，並且甚至更佳地至少70個胺基酸長。如本文所使用之術語「類似物」指由至少25個胺基酸部分構成的胜肽，該胜肽與推導之胺基酸序列之部分大體上一致並且在適宜結合條件下特異性結合至CD47。通常，胜肽類似物包含相對於天然存在序列之保守性胺基酸取代（或添加或缺失）。類似物通常係至少20個胺基酸長，較佳地至少50個胺基酸長或更長，並且可通常與全長之天然存在之胜肽一般長。

【0099】 肽類似物在製藥工業中普遍用作具有與模版肽之彼等性質類似之性質的非肽藥物。此等類型之非肽化合物被稱為「肽模擬物(peptide mimetic)」或「肽模擬物(peptidomimetic)」。*Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986)*, *Veber & Freidinger, TINS p. 392 (1985)*; 以及*Evans*等人, *J. Med. Chem. 30:1229 (1987)*。此等化合物通常藉助電腦化之分子模型化來開發。與治療上可用之肽結構相似的肽模擬物可用以產生等效治療或預防效應。一般而言，肽模擬物與範例胜肽（亦即，具有生物化學性質或藥理學活性的胜肽）諸如人類抗體結構相似，但具有一或更多個視情況藉由在本領域中熟知之方法由選自由下列組成之群組的鍵聯來替代的肽連接： $--CH_2NH--$ 、 $--CH_2S--$ 、 $--CH_2--CH_2--$ 、 $--CH.dbd.CH--$ （順及反）、

--COCH₂--、CH(OH)CH₂--、及--CH₂SO--。利用相同類型之D-胺基酸系統性取代共有序列之一或更多個胺基酸（例如，D-離胺酸替換L-離胺酸）可用以產生更穩定肽。此外，包含共有序列或大體上一致之共有序列變異的受限肽可藉由在本領域中已知之方法產生(Rizo & Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992))；例如，藉由添加能夠形成使肽環化的分子間二硫橋的內部半胱胺酸殘基。

【0100】術語「試劑」本文用以指示化合物、化合物之混合物、生物巨分子、或由生物材料製備之萃取物。

【0101】如本文所使用，術語「標記」或「標記的」指結合可偵測標記物，例如，藉由結合放射性標記之胺基酸或附接至可由標記之抗生物素蛋白（例如，含有螢光標記物或可由光學或量熱方法偵測之酶促活性的抗生蛋白鏈菌素）偵測的生物素部分之胜肽。在某些情況下，標記或標記物亦可係治療劑。標記胜肽及醣蛋白之各種方法在本領域中已知並且可使用。用於胜肽之標記之實例包括但不限於下列：放射性同位素或放射性核類（例如，³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I）、螢光標記（例如，FITC、若丹明、鐳系元素磷光體）、酶標記（例如，辣根過氧化物酶、p-半乳糖苷酶、螢光素酶、鹼性磷酸酶）、化學發光劑、生物素基團、由二次指針識別的預定之胜肽抗原決定基（例如，白胺酸拉鏈對序列，二次抗體之結合位點、金屬結合域、抗原決定基標記）。

在一些實施例中，標記藉由各種長度之間隔臂附接以降低可能之空間位阻。如本文所使用之術語「醫藥試劑或藥物」指當適當投予患者時能夠誘發期望治療效應的化合物或組合物。

【0102】 術語「抗腫瘤劑」本文用於指具有在人類中抑制腫瘤發展或進程之功能性質的試劑，特定言之惡性（癌症）病灶，諸如惡性腫瘤、肉瘤、淋巴瘤、或白血病。抑制轉移通常係抗腫瘤劑之性質。

【0103】 根據在本領域中習知用法使用本文之其他化學術語，如由 *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S. 編輯, McGraw-Hill, San Francisco (1985)) 所例示。

【0104】 如本文所使用，「大體上純的」意謂目標種類係存在之主要種類（亦即，以莫耳計，其在該組合物中的含量比任何其他各別種類都更豐裕），並且較佳地大體上純的部分係組合物，其中目標種類包含至少約50%（以莫耳計）之所存在之全部巨分子種類。

【0105】 一般而言，大體上純的組合物將包含大於約80%存在於該組合物中之全部巨分子種類，更佳地大於約85%、90%、95%、及99%。最佳地，目標種類經純化為基本均質（不能藉由習知偵測方法偵測到組合物中的污染種類），其中該組合物基本上由單一巨分子種類組成。

CD47 抗體

【0106】 本文所揭示之單株抗體具有結合CD47，抑制SIRP α 結合至CD47、減少CD47-SIRP α -介導之信號傳導、促進吞噬作用、以及抑制腫瘤生長及/或轉移的能力。例如在實例中使用本文所述之細胞分析來決定抑制。

【0107】 本文所揭示之例示性抗體包括2A1抗體、2A1抗體之嵌合版本、及2A1之人源化變異體。本文所揭示之例示性抗體包括具有選自SEQ ID NOs:5-30的可變重(VH)鏈(如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))並且具有選自SEQ ID NOs:31-47的可變輕(VL)鏈(如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))的抗體。特別地，例示性抗體包括表1提供之彼等，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)。

【0108】 本發明亦包括結合至與本文所述之CD47抗體相同的抗原決定基的抗體。例如，本文所揭示之抗體特异性結合至在人類CD47上包括一或更多個胺基酸殘基的抗原決定基(參看，例如，GenBank入藏登記號Q08722.1)。

【0109】 例示性人類CD47之胺基酸序列在下文中提供(GenBank入藏登記號Q08722.1(GI:1171879)，其以引用方式併入本文中)。信號序列(胺基酸1-18)參考SEQ ID NO:48用底線標出，如揭示於美國專利申

請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)。

【0110】出於簡明目的，不包括信號序列之例示性人類CD47之胺基酸序列作為SEQ ID NO:147提供，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)。

【0111】例示性人類CD47-IgV結構域之胺基酸序列作為SEQ ID NO:49提供，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)。本文所揭示之例示性單株抗體包括，例如，具有在以下序列中顯示的可變重(VH)鏈區及/或可變輕(VL)鏈區的人源化抗體。

【0112】CD47抗體之可變重(VH)鏈區在下文中提供。CD抗體之VH鏈之互補決定區(CDR)在下文中著重指出。在一些實施例中，VH CDR1之胺基酸序列係GFNIKDY YLH (SEQ ID NO:50)、GYTFTY YLH (SEQ ID NO:57)、GFTFTY YLH (SEQ ID NO:58)、GYNFTY YLH (SEQ ID NO:59)、GYTITY YLH (SEQ ID NO:60)、GYTFKY YLH (SEQ ID NO:61)、GYTFTDY YLH (SEQ ID NO:62)、GFTFTDY YLH (SEQ ID NO:63)、GFTITDY YLH (SEQ ID NO:64)、GYTFKDY YLH (SEQ ID NO:65)、或GFTFKDY YLH (SEQ ID NO:66)。在一些實施例中，VH CDR2之胺基酸序列係

WIDPDNGDTE (SEQ ID NO:51)、WIDPDQGDTE (SEQ ID NO:72)、WIDPDYGDTE (SEQ ID NO:73)、WIDPDSGDTE (SEQ ID NO:74)、WIDPDNADTE (SEQ ID NO:75)、或 WIDPDNTDTE (SEQ ID NO:76)。在一些實施例中，VH CDR3 之胺基酸序列係 NAAYGSSSYPM DY (SEQ ID NO:52) 或 NAAYGSSPYPM DY (SEQ ID NO:77)-全部 SED ID 參考係如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號 (公開案第 US 20140140989 號)。

【0113】 CD47 抗體之可變輕 (VL) 鏈區在下文中提供。CD47 抗體之 VL 鏈之 CDR 在下文中著重指出。在一些實施例中，VL CDR1 之胺基酸序列係 KASQDIHRYLS (SEQ ID NO:53)、RASQDIHRYLA (SEQ ID NO:67)、或 RARQGIHRYLS (SEQ ID NO:68)。在一些實施例中，VL CDR2 之胺基酸序列係 RANRLVD (SEQ ID NO:54)、RANRLQS (SEQ ID NO:69)、RANRRAT (SEQ ID NO:70)、或 RANRLVS (SEQ ID NO:71)。在一些實施例中，VL CDR3 之胺基酸序列係 LQYDEFPTYT (SEQ ID NO:55)-全部 SED ID 參考係如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號 (公開案第 US 20140140989 號)。

【0114】 在一些情形中，本文所述之CD47抗體包含選自SEQ ID NOs:5-30的可變重鏈區及選自SEQ ID NOs:31-47的可變輕鏈區。例示性CD47抗體包含在SEQ ID NO:5中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:31中闡述的可變輕鏈區；在SEQ ID NO:7中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:35中闡述的可變輕鏈區；在SEQ ID NO:11中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:42中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:5中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:32中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:7中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:33中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:7中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:34中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:7中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:36中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:7中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:37中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:7中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:38中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:29中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:35中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:30中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:35中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:7中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:43中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:11中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:43中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:11中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:47中闡述的可變輕鏈

區、在SEQ ID NO:15中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:43中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:15中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:44中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:11中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:44中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:22中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:35中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:7中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:39中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:8中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:39中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:16中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:35中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:20中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:35中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:21中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:35中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:17中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:35中闡述的可變輕鏈區、在SEQ ID NO:28中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:35中闡述的可變輕鏈區、或在SEQ ID NO:27中闡述的可變重鏈區及在SEQ ID NO:35中闡述的可變輕鏈區 - 全部SED ID參考係如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。

【0115】 本文所述之CD47抗體包含提供於SEQ ID NOs:5-30的VH區的任一個，該VH區與提供於SEQ ID NOs:31-47的VL區的任一個成對。特別地，本文所述之CD47抗體包含提供於SEQ ID NOs:5、7、8、11、

15-17、20-22、及27-30的VH區的任一個，該VH區與提供於SEQ ID NOs:31-39、42、43、44、及47的VL區的任一個成對-全部SED ID參考係如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。

【0116】 本文所述之CD47抗體包含提供於SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、及SEQ ID NO:66的VH CDR1區的任一個，提供於SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、及SEQ ID NO:76的VH CDR2區的任一個，提供於SEQ ID NO:52及SEQ ID NO:77的VH CDR3區域的任一個，提供於SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:67、及SEQ ID NO:68的VL CDR1區的任一個，提供於SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:70、及SEQ ID NO:71的VL CDR2區的任一個，及提供於SEQ ID NO:55的VL CDR3區-全部SED ID參考係如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。

【0117】 熟習該項技術者應認識到可能藉由確定單株抗體是否防止本文所揭示之單株抗體結合至CD47來確定（無需過多實驗）該單株抗體是否具有與本文所揭示之

單株抗體（例如，2A1抗體、或具有如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）選自SEQ ID NOs:5-31之可變重鏈及如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）選自SEQ ID NOs:31-47之可變輕鏈的抗體）相同的特異性。若所測試之單株抗體與本文所揭示之單株抗體競爭，表現為本文所揭示之單株抗體結合的減少，則兩種單株抗體結合至同一者或緊密相關之抗原決定基。

【0118】 用於決定單株抗體是否具有本文所揭示之單株抗體之特異性的替代方法係使用可溶CD47蛋白質（通常該抗體會對其有反應）預培育本文所揭示之單株抗體，並且隨後添加所測試之單株抗體以決定是否抑制所測試之單株抗體結合CD47之能力。若抑制所測試之單株抗體，則在全部可能性中，其具有與本文所揭示之單株抗體相同或功能上等效的抗原決定基特異性。

本發明之抗體

【0119】 篩選本文所揭示之單株抗體亦可例如藉由量測CD47及/或CD47/SIRP α 介導之信號傳導並決定測試單株抗體是否能夠調節、抑制、降低、拮抗、中和或另外干擾CD47及/或CD47/SIRP α 介導之信號傳導來進行。此等分析可包括競爭性結合分析。此外，此等分析可量測生物讀數，例如促進巨噬細胞吞噬CD47表現細胞之能力，如在實例9中所描述（第9圖，如揭示於美國專利

申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 US 20140140989 號））。

【0120】在本領域中已知之各個程序可用來生產抗 CD47 或抗其衍生物、片段、類似物、同源物或直向同源物的單株抗體。（參看，例如，Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E，及 Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 其等以引用方式併入本文中）。全人源抗體係抗體分子，其中包括 CDR 的輕鏈及重鏈二者之整個序列來自人類基因。在本文中，此等抗體被稱為「人類抗體」或「全人源抗體」。例如，使用在下文提供之實例中描述之程序製備人類單株抗體。人類單株抗體亦可藉由使用三源融合瘤技術；人類 B 細胞融合瘤技術（參看 Kozbor 等人，1983 Immunol Today 4: 72）；以及 EBV 融合瘤技術來製備以產生人類單株抗體（參看 Cole 等人，1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 第 77-96 頁）。人類單株抗體可經採用並且可藉由使用人類融合瘤（參看 Cote 等人，1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030）或藉由體外利用 Epstein Barr 病毒轉化人類 B 細胞（參看，Cole 等人，1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., 第 77-96 頁）來產生。

【0121】 抗體藉由熟知技術（諸如使用蛋白質A或蛋白質G的親和層析法）來純化，其主要提供免疫血清之IgG部分。隨後或替代地，將作為免疫球蛋白靶的特異性抗原或其抗原決定基可固定在柱上以藉由免疫親和層析法純化免疫特異性抗體。純化免疫球蛋白例如由Wilkinson（The Scientist，由The Scientist，Inc.公開，Philadelphia Pa.，第14卷，第8號（2000年4月17日），第25-28頁）論述。

【0122】 本文所揭示之CD47抗體係單株抗體。例如，藉由利用膜結合及/或可溶CD47（諸如，例如，人類CD47或其免疫原性片段、衍生物或變異體）免疫動物產生調節、阻斷、抑制、降低、拮抗、中和或另外干擾CD47-及/或CD47/SIRP α 介導之細胞信號傳導的單株抗體。或者，利用經載體（含有編碼CD47之核酸分子）轉染之細胞免疫該動物使得CD47經表現並與經轉染細胞之表面締合。或者，該等抗體藉由針對結合至CD47篩選含有抗體或抗原結合域序列的文庫而獲得。例如，在噬菌體中製備此文庫，由於蛋白質或肽融合至在經組裝之噬菌體粒子及含於噬菌體粒子中之編碼DNA序列的表面上表現之噬菌體外殼蛋白（亦即，「噬菌體呈現庫」）。隨後針對與CD47反應而篩選獲自骨髓瘤/B細胞融合之融合瘤。

【0123】 例如，使用融合瘤方法（諸如由Kohler和Milstein，Nature，256:495（1975）描述之彼等）製備單株抗體。在融合瘤方法中，通常利用免疫劑免疫小

鼠、倉鼠、或其他適當宿主動物以誘發產生或能夠產生將特異性結合至免疫劑之抗體的淋巴細胞。或者，可在體外免疫淋巴細胞。

【0124】 免疫劑將通常包括蛋白抗原、其片段或其融合蛋白。一般而言，若人類源細胞係期望的，則使用末梢血液淋巴細胞，或者若非人類哺乳動物源係期望的，則使用脾臟細胞或淋巴結細胞。隨後使用適宜融合劑諸如聚乙二醇使淋巴細胞與永生化細胞系融合以形成融合瘤細胞（*Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986)* 第59-103頁）。永生化細胞系通常係經轉化的哺乳動物細胞，特定言之嚙齒類、牛及人類源之骨髓瘤細胞。通常，採用大鼠或小鼠骨髓瘤細胞系。融合瘤細胞可在適宜培養基中培養，該培養基較佳地含有一或更多種抑制未融合、永生化細胞之生長或存活之物質。例如，若親本細胞缺乏酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶（*HGPRT*或*HPRT*），用於融合瘤之培養基通常將包括次黃嘌呤、胺嘌呤、及胸腺核苷（「*HAT*培養基」），此等物質防止*HGPRT*缺陷型細胞生長。

【0125】 本文所揭示之永生化細胞系包括藉由經選擇之抗體產生細胞有效融合、支援抗體之穩定高水準表現的彼等並且對諸如*HAT*培養基等培養基敏感。更佳永生化細胞系係鼠類骨髓瘤系，例如，其可獲自*Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif.*

及 the American Type Culture Collection, Manassas, Va.。亦已描述人類骨髓瘤及小鼠-人類雜交骨髓瘤細胞系用於產生單株抗體。參看 Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984) ; Brodeur 等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) 第51-63頁)。

【0126】可隨後針對存在抗該抗原之單株抗體分析其中培養融合瘤細胞之培養基。較佳地，藉由融合瘤細胞產生之單株抗體之結合特異性藉由免疫沉澱或藉由體外結合分析諸如放射性免疫分析 (radioimmunoassay; RIA) 或酶聯結免疫吸附劑分析法 (enzyme-linked immunoabsorbent assay; ELISA) 來確定。此等技術及分析在本領域中已知。單株抗體之結合親和性可例如藉由 Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980) 確定。此外，在單株抗體之治療應用中，識別具有針對靶抗原之高度特異性及高結合親和性的抗體係重要的。

【0127】在識別所要融合瘤細胞之後，該殖株 (clone) 可藉由限制稀釋程序次選殖並且藉由標準方法生長。參看 Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) 第59-103頁。用於此目的之適宜培養基包括例如 Dulbecco's

Modified Eagle's 培養基及 RPMI-1640 培養基。或者，該融合瘤細胞可在體內作為哺乳動物之腹水生長。

【0128】由次選殖分泌之單株抗體可藉由習知免疫球蛋白純化程序（諸如，例如，蛋白質 A-瓊脂糖凝膠、羥基磷灰石層析法、凝膠電泳、透析、或親和性層析法）從培養基或腹水流體分離或純化。

【0129】單株抗體亦可藉由重組 DNA 方法諸如描述於美國專利第 4,816,567 號之彼等來製備。編碼本文所揭示之單株抗體的 DNA 可使用習知程序（例如，藉由使用能夠特異性結合至編碼鼠類抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針）容易地分離並測序。本文所揭示之融合瘤細胞用作此 DNA 之較佳源。一旦分離，可將 DNA 置於表現載體中，其隨後經轉染為不另外產生免疫球蛋白的宿主細胞諸如中國倉鼠卵巢 (Chinese hamster ovary; CHO) 細胞、人胚胎腎 (Human Embryonic Kidney; HEK) 293 細胞、猿猴 COS 細胞、PER.C6™、NS0 細胞、SP2/0、YB2/0、或骨髓瘤細胞以在重組宿主細胞中獲得單株抗體之合成。該 DNA 亦可經修飾，例如，藉由在同源鼠類序列之位置取代用於人類重鏈及輕鏈恆定域的編碼序列（參看美國專利第 4,816,567 號；Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)）或藉由共價連接免疫球蛋白編碼序列與非免疫球蛋白胜肽的全部或部分編碼序列。此非免疫球蛋白胜肽可取代為本文所揭示之抗體的

恆定域，或者可取代為本文所揭示之抗體之一個抗原結合位點之可變結構域以產生嵌合二價抗體。

人類抗體及抗體之人源化 (Humanization)

【0130】 本文所揭示之單株抗體包括全人源抗體或人源化抗體。此等抗體適宜投予人類而不造成人對所投予之免疫球蛋白產生免疫反應。

【0131】 例如，使用在下文提供之實例中描述的程序產生CD47抗體。例如，使用在小鼠及隨後融合瘤代中經修飾之RIMMS（重複免疫多位點）免疫策略來識別本文所揭示之CD47抗體。

【0132】 在其他替代方法中，例如，使用僅含有人類序列之抗體使用噬菌體呈現方法研發CD47抗體。此等途徑在本領域中熟知，例如，在WO92/01047及美國專利第6,521,404號中，其等以引用方式併入本文中。以此途徑，使用cd47或其片段之天然或重組源篩選攜帶隨機輕鏈及重鏈對之噬菌體的組合文庫。以另一途徑，CD47抗體可藉由一過程來產生，其中該過程之至少一個步驟包括利用人類CD47蛋白免疫基因轉殖之非人類動物。以此途徑，此異種非人類動物之一些內源性重鏈及/或κ輕鏈基因座已被禁用並且不能夠進行回應於抗原產生編碼免疫球蛋白之基因所需的重排。此外，至少一個人類重鏈基因座及至少一個人類輕鏈基因座已經穩定轉染為動物。因此，回應於投予之抗原，人類基因座重排以提供對抗原免疫特

異性的編碼人類可變區的基因。由此，在免疫時，異種小鼠產生分泌全人源免疫球蛋白的B細胞。

【0133】 用於產生異種非人類動物的各種技術在本領域中熟知。參看，例如，美國專利第6,075,181號及第6,150,584號，該等專利全文以引用方式併入本文中。隨著第一種XenoMouse™株生成，證實了此一般策略，如公開於1994年。參看Green等人，Nature Genetics 7:13-21 (1994)，其全文以引用方式併入本文中。亦參看美國專利第6,162,963號；第6,150,584號；第6,114,598號；第6,075,181號；以及第5,939,598號及日本專利第3 068 180 B2號、第3 068 506 B2號、及第3 068 507 B2號以及歐洲專利第EP 0 463 151 B1號以及國際專利申請案第WO 94/02602號、第WO 96/34096號、第WO 98/24893號、第WO 00/76310號以及相關家族成員。

【0134】 在替代途徑中，其他已採用「微基因座」途徑，其中外源Ig基因座係經由包含來自Ig基因座之片段（個別基因）來模擬。因此，一或更多個V_H基因、一或更多個D_H基因、一或更多個J_H基因、μ恆定區、及第二恆定區（較佳地γ恆定區）形成構建體來插入動物中。參看，例如，美國專利第5,545,806號；第5,545,807號；第5,591,669號；第5,612,205號；第5,625,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；第5,643,763號；第5,661,016號；第5,721,367號；第5,770,429號；第

5,789,215 號；第 5,789,650 號；第 5,814,318 號；第 5,877,397 號；第 5,874,299 號；第 6,023,010 號；以及第 6,255,458 號；以及歐洲專利第 0 546 073 B1 號；以及國際專利申請案第 WO 92/03918 號、第 WO 92/22645 號、第 WO 92/22647 號、第 WO 92/22670 號、第 WO 93/12227 號、第 WO 94/00569 號、第 WO 94/25585 號、第 WO 96/14436 號、第 WO 97/13852 號、及第 WO 98/24884 號以及相關家族成員。

【0135】亦已說明經由微細胞融合引入染色體之大片段或整條染色體的小鼠產生人類抗體。參看歐洲專利申請案第 773 288 號及第 843 961 號。

【0136】人類抗小鼠抗體 (human anti-mouse antibody; HAMA) 應答已使在工業上製備嵌合或其他形式的人源化之抗體。儘管嵌合抗體具有人類恆定區及免疫可變區，期望觀察到某些人類抗嵌合抗體 (human anti-chimeric antibody; HACA) 應答，特定言之在抗體之長期或多倍劑量應用中。因此，應期望提供抗 CD47 的全人源抗體，以消除或另外緩解 HAMA 或 HACA 應答之影響及/或效應。

【0137】具有減少免疫原性之抗體之產生亦使用適當文庫經由人源化、嵌合及呈現技術來達成。應瞭解鼠類抗體或來自其他種類之抗體可使用在本領域中熟知之技術人源化或靈長類動物源化。參看，例如，Winter & Harris, Immunol Today 14:43-46 (1993) 及

Wright 等人，Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992)。所關注抗體可藉由重組DNA技術改造，以利用對應人類序列取代CH1、CH2、CH3、鉸鏈結構域、及/或架構結構域（參看WO 92102190及美國專利第5,530,101號；第5,585,089號；第5,693,761號；第5,693,792號；第5,714,350號；以及第5,777,085號）。此外，用於構造嵌合免疫球蛋白基因之Ig cDNA之用途在本領域中已知（Liu等人，Proc. Natl. Acads. Scis. 84:3439 (1987)及J. Immunol. 139:3521 (1987)）。mRNA從融合瘤或產生抗體之其他細胞分離並且用於產生cDNA。所關注之cDNA可使用特異性引子藉由聚合酶鏈反應擴增（參看美國專利第4,683,195號及第4,683,202號）。或者，製成並篩選文庫以分離所關注之序列。隨後將編碼抗體可變區之DNA序列融合為人類恆定區序列。人類恆定區基因序列可發現於Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of immunological Interest, N.I.H.公開案第91-3242號。人類C區基因容易地獲自己知殖株。同型之選擇將藉由所要效應子功能引導，諸如補體固定，或在抗體依賴細胞毒性方面之活性。較佳同型係IgG1、IgG2、IgG3、及IgG4。可使用人類輕鏈恆定區 κ 或 λ 之任一個。該嵌合人源化抗體隨後藉由習知方法表現。

【0138】 抗體片段，諸如v、F(ab')₂及Fab可藉由分裂完整蛋白質來製備，例如，藉由蛋白酶或化學品分裂。

或者，設計截短之基因。例如，編碼 $F(a b')_2$ 片段之一部分之嵌合基因應包括編碼 H 鏈之 CH1 結構域及鉸鏈區的 DNA 序列，接著轉譯終止密碼子以產生截短之分子。

【0139】 H 及 L J 區之共有序列可用以設計用作引子之寡核苷酸以將可用限制位點引入 J 區，進而用於將 V 區部分隨後連接至人類 C 區部分。C 區 cDNA 可藉由定向誘變修飾以在人類序列的類似位置放置限制位點。

【0140】 表現載體包括質體、逆轉錄病毒、YAC、EBV 來源之游離基因體、及其類似者。方便的載體係編碼功能完整的人 CH 或 CL 免疫球蛋白序列、具有經改造以便任何 VH 或 VL 序列能夠容易地插入及表現的合適限制位點的載體。在此等載體中，剪接一般發生在插入之 J 區中的剪接供體位點與在人源 C 區之前的剪接受體位點之間，並且亦於在人類 CH 外顯子中發生之剪接區域處。聚腺苷酸化及轉錄終止發生於編碼區域之天然染色體位點下游。所得嵌合抗體可結合至任何強啟動子，包括逆轉錄病毒 LTR，例如，SV-40 早期啟動子，(Okayama 等人，Mol. Cell. Biol. 3:280 (1983))、勞斯(Rous)肉瘤病毒 LTR (Gorman 等人，P.N.A.S. 79:6777 (1982))、及莫洛尼氏(moloney)鼠類白血病毒 LTR (Grosschedl 等人，Cell 41:885 (1985))。此外，如應瞭解，可使用天然 Ig 啟動子及其類似者。

【0141】 此外，人類抗體或來自其他種類之抗體可經由呈現型技術產生，包括不限於噬菌體呈現、逆轉錄病毒呈

現、核糖體呈現、及其他技術，使用在本領域中熟知之技術並且所得分子可經歷額外成熟，諸如親和力成熟，該等些技術係在本領域中熟知的。Wright 等人，Crit, Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), Hanes and Pliickthun PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 94:4937-4942 (1997) (核糖體呈現)，Parmley 和 Smith Gene 73:305-318 (1988) (噬菌體呈現)，Scott, TIBS，卷17:241-245 (1992)，Cwirla 等人，PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 87:6378-6382 (1990)，Russel 等人，Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993)，Hoganboom 等人，Immunol. Reviews 130:43-68 (1992)，Chiswell and McCafferty TIBTECH；10:80-8A (1992)，以及美國專利第5,733,743號。若呈現技術用以產生非人類抗體，此等抗體可如上文所述人源化。

【0142】 使用此等技術，抗體可產生為CD47表現細胞、CD47之可溶形式、其抗原決定基或肽、及其表現文庫（參看，例如，美國專利第5,703,057號），該等抗體可隨後經如上文所述針對本文所述之活性來篩選。

【0143】 本文所揭示之CD47抗體可藉由含有編碼上文所述之單鏈抗體之DNA片段的載體來表現。

【0144】 此等包括載體、脂質體、裸DNA、佐劑輔助之DNA、基因槍、導管、等等。載體包括化學共軛物諸如描述於WO 93/64701，其具有靶向部分（例如，細胞

表面受體之配體)及核酸結合部分(例如,聚離胺酸)、病毒載體(例如,DNA或RNA病毒載體)、融合蛋白諸如描述於PCT/US95/02140(WO 95/22618)(其係含有靶部分(例如,對靶細胞特異性的抗體)及核酸結合部分(例如,魚精蛋白)的融合蛋白)、質體、噬菌體、等等。該等載體可係染色體、非染色體或合成的。

【0145】如本文所揭示之載體包括病毒載體、融合蛋白及化學共軛物。逆轉錄病毒受體包括莫洛尼(moloney)鼠類白血病毒。DNA病毒載體係較佳的。此等載體包括痘載體諸如正痘或禽痘病毒載體,疱疹病毒載體諸如I型單純疱疹病毒(herpes simplex I virus; HSV)載體(參看Geller, A. I.等人,J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F.等人, in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover編輯(Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I.等人, Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I.等人, Proc Natl. Acad. Sci. USA 87:1149 (1990))、腺病毒載體(參看 LeGal LaSalle 等人, Science, 259:988 (1993); Davidson 等人, Nat. Genet. 3:219 (1993); Yang 等人, J. Virol. 69:2004 (1995))及腺相關之病毒載體(參看Kaplitt, M. G.等人, Nat. Genet. 8:148 (1994))。

【0146】 痘病毒載體將基因引入細胞質。禽痘病毒載體僅導致短期表現核酸。針對將核酸引入神經細胞而言，腺病毒、腺相關病毒載體及單純疱疹病毒 (herpes simplex virus; HSV) 載體係較佳的。與腺相關病毒 (約4個月) 相比，腺病毒載體導致更短期表現 (約2個月)，其繼而短於 HSV 載體。選擇之特定載體將取決於靶細胞及所處理之條件。該引入可藉由標準技術，例如，感染、轉染、轉導或轉化。基因轉移模式之實例包括例如，裸 DNA、CaPO₄ 沉澱、DEAE 類糊精、電穿孔、原生質體融合、脂轉染、細胞顯微注射、及病毒載體。

【0147】 該載體可用以基本上靶向任何所要靶細胞。例如，立體定位感染可用於將載體 (例如腺病毒，HSV) 引入所要位置。此外，該等粒子可藉由使用小型泵注射系統 (諸如 SynchroMed 注射系統) 腦室內 (intracerebroventricular; icy) 注射來遞送。亦已經證明基於整體流動、分期對流之方法有效運用於遞送巨分子至腦之延伸區域並且可用於將載體遞送至靶細胞。參看 Bobo 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994)；Morrison 等人，Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994)。可使用之其他方法包括導管、靜脈內、非經口、腹膜內及皮下注射，以及口服或其他已知投藥途徑。

【0148】 此等載體可用以表現大量抗體，該等抗體可以各種方式使用。例如，用以在樣本中偵測 CD47 之存在。

該抗體亦可用以嘗試結合至並且破壞CD47及/或CD47/SIRP α 相互作用及CD47/SIRP α 介導之信號傳導。

【0149】技術可適用於產生針對本文所揭示之抗原蛋白特異性的單鏈抗體（參看，例如，美國專利第4,946,778號）。此外，方法可適用於構造Fab表現文庫（參看例如，Huse等人，1989 Science 246: 1275-1281）以允許快速並有效識別，具有針對蛋白質或其衍生物、片段、類似物或同源物之所要特異性的單株Fab片段。含有蛋白抗原之個體遺傳型之抗體片段可藉由在本領域中已知之技術產生，包括但不限於：(i)藉由抗體分子之胃蛋白酶消化產生的F(ab')₂片段；(ii)藉由減少F(ab')₂片段之二硫橋產生的Fab片段；(iii)藉由利用木瓜酶及還原劑處理抗體分子產生的Fab片段以及(iv)F_v片段。

【0150】本發明亦包括F_v、Fab、Fab'及F(ab')₂CD47片段、單鏈CD47抗體、單一結構域抗體（例如，奈米抗體(nanobody)或VHH）、雙特異性CD47抗體、及雜交共軛CD47抗體。

【0151】雙特異性抗體係具有針對至少兩種不同抗原之結合特異性的抗體。在當前情形中，結合特異性之一係針對CD47。第二結合靶係任何其他抗原，並且有利地係細胞表面蛋白或受體或受體子單位。

【0152】 用於製備雙特異性抗體之方法係在本領域中已知。傳統上，重組產生雙特異性抗體係基於兩個免疫球蛋白重鏈/輕鏈對之共同表現，其中兩個重鏈具有不同特異性（Milstein和Cuello，Nature，305:537-539（1983））。由於隨機分組免疫球蛋白重鏈及輕鏈，此等融合瘤（四夾雜瘤）產生十個不同抗體分子之可能混合物，其中僅一個具有正確雙特異性結構。正確分子之純化通常藉由親和性層析步驟達成。相似程序揭示於1993年5月13日公開的WO 93/08829及在Traunecker等人，EMBO J.，10:3655-3659（1991）中。

【0153】 具有所要結合特異性之抗體可變結構域（抗體-抗原結合位點）可經融合至免疫球蛋白恆定域序列。該融合較佳地係具有免疫球蛋白重鏈恆定域，包含至少部分鉸鏈、CH₂、及CH₃區。較佳地，具有含有輕鏈結合所需位點的第一重鏈恆定區（CH₁）存在於至少一個融合物中。編碼免疫球蛋白重鏈融合及（若需要）免疫球蛋白輕鏈之DNA經插入獨立表現載體，並且共同轉染至適宜宿主有機體中。針對產生雙特異性抗體之進一步細節請參看，例如，Suresh等人，Methods in Enzymology，121:210（1986）。

【0154】 根據描述於WO 96/27011之另一途徑，在一對抗體分子之間的介面可經改造以最大化從重組細胞培養回收的異二聚體之百分數。較佳介面包含抗體恆定域之CH₃區之至少一部分。在此方法中，來自第一抗體分

子之介面之一或更多個小胺基酸側鏈經由較大側鏈（例如，酪胺酸或色胺酸）替代。藉由利用較小側鏈（例如，丙胺酸或蘇胺酸）替代大胺基酸側鏈，在第二抗體分子之介面上產生與大側鏈一致或相似大小之互補「空腔（cavity）」。此提供了用於增大異二聚體之產量高於其他非所要之最終產物（諸如同型二聚體）的一種機制。

【0155】 雙特異性抗體可經製備為全長抗體或抗體片段（例如， $F(ab')_2$ 雙特異性抗體）。用於由抗體片段產生雙特異性抗體之技術已經描述於文獻中。例如，雙特異性抗體可使用化學鍵聯來製備。Brennan 等人，*Science* 229:81 (1985) 描述了一種程序，其中完整抗體經蛋白水解裂解以產生 $F(ab')_2$ 片段。此等片段在存在二硫醇複合劑亞砷酸鈉時還原以穩定鄰近的二硫醇並防止分子間二硫化物形成。產生之 Fab' 片段隨後轉化為硫代硝基苯甲酸 (TNB) 衍生物。 Fab' -TNB 衍生物之一隨後經巰基乙胺還原轉化為 Fab' -硫醇，並與等莫耳量之其他 Fab' -TNB 衍生物混合以形成雙特異性抗體。產生之雙特異性抗體可用作選擇性固定酶的試劑。

【0156】 此外， Fab' 片段可從大腸桿菌直接回收並化學偶聯以形成雙特異性抗體。Shalaby 等人，*J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) 描述了產生全人源化雙特異性抗體 $F(ab')_2$ 分子。各個 Fab' 片段獨立地從大腸桿菌分泌並且經歷體外直接化學偶聯以形成雙特異性抗體。因此形成之雙特異性抗體能結合至過度表現 ErbB2

受體的細胞及正常人類T細胞，以及觸發抗人類乳腺腫瘤靶之人類細胞毒性淋巴細胞之裂解活性。

【0157】亦已描述了用於直接由重組細胞培養製備並分離雙特異性抗體片段之各種技術。例如，雙特異性抗體已經使用白胺酸拉鏈產生。Kostelny等人，J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。來自Fos及Jun蛋白質之白胺酸拉鏈肽藉由基因融合連接至兩個不同抗體之Fab'部分。抗體同型二聚體於鉸鏈區還原以形成單體並隨後再次氧化以形成抗體異二聚體。此方法亦可採用以產生抗體同型二聚體。由Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)所描述之「雙功能抗體」技術已提供了用於製備雙特異性抗體片段的替代機制。該等片段包含藉由接頭連接至輕鏈可變結構域(V_L)之重鏈可變結構域(V_H)，該接頭係過短以允許在相同鏈上兩個結構域之間成對。由此，迫使一個片段之V_H及V_L結構域與另一片段之互補V_L及V_H結構域成對，藉以形成兩個抗原結合位點。亦已報導了用於藉由使用單鏈Fv(single-chain Fv; sFv)二聚體製備雙特異性抗體片段之另一策略。參看Gruber等人，J. Immunol. 152:5368 (1994)。

【0158】考慮了具有大於兩價之抗體。例如，可製備三特異性抗體。Tutt等人，J. Immunol. 147:60 (1991)。

【0159】 例示性雙特異性抗體可結合至兩個不同抗原決定基，至少一個抗原決定基源自本文所揭示之蛋白質抗原。或者，免疫球蛋白分子之抗抗原臂可與臂結合，該臂結合至在白血球上之觸發分子諸如T細胞受體分子（例如，CD2、CD3、CD28、或B7），或Fc受體針對IgG（Fc γ R），諸如Fc γ RI（CD64）、Fc γ RII（CD32）及Fc γ RIII（CD16），以使細胞防禦機制集中針對表現特定抗原之細胞。雙特異性抗體亦可用以將細胞毒性劑引至表現特定抗原之細胞。此等抗體具有抗原結合臂及結合至細胞毒性劑或放射性核種螯合劑之臂，諸如EOTUBE、DPTA、DOTA、或TETA。所關注之另一雙特異性抗體結合本文所述至蛋白抗原並且進一步結合組織因子（tissue factor; TF）。

【0160】 異源共軛抗體亦在本文所揭示之範疇中。異源共軛抗體係由兩個共價結合之抗體構成。例如，已經提出此等抗體將免疫系統細胞靶向非所要細胞（參看美國專利第4,676,980號）並且用於治療HIV感染（參看WO 91/00360；WO 92/200373；EP 03089）。亦考慮了該等抗體可使用在合成蛋白化學中之已知方法（包括涉及交聯劑之彼等）在體外製備。例如，免疫毒素可使用二硫化物交換反應或藉由形成硫醚鍵來構建。出於此目的之適宜試劑之實例包括亞胺基硫雜環戊烷及甲基-4-巰基丁醯亞胺酸鹽及揭示（例如）於美國專利第4,676,980號之彼等。

【0161】 相對於效應子功能修飾本文所揭示之抗體係可能的，以增強（例如）抗體在治療與異常CD47信號傳導相關之疾病及病況方面之有效性。例如，半胱胺酸殘基（等）可經引入Fc區，藉以允許在此區域中形成鏈間二硫鍵。因此產生之同型二聚抗體可具有經改良之內化能力及/或增加之互補介導細胞殺傷及抗體依賴細胞毒性（ADCC）。參看Caron等人，J. Exp Med.，176: 1191-1195（1992）；Shopes, J. Immunol.，148: 2918-2922（1992）。或者，抗體可經改造使其具有雙Fc區並且可藉以具有經增強之補體裂解及ADCC能力。參看Stevenson等人，Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230（1989）。

【0162】 本文所揭示之免疫共軛物包括包含共軛至細胞毒性劑之抗體的彼等，諸如毒素（例如，細菌、真菌、植物、或動物來源的酶活毒素，或其片段）、或放射性同位素（亦即，放射性共軛物）。

【0163】 可使用之酶活毒素及其片段包括白喉症A鏈、白喉症毒素之未結合活性片段、外毒素A鏈（來自綠膿桿菌）、蓖麻毒蛋白A鏈、相思豆毒蛋白A鏈、非洲蒴蓮毒蛋白A鏈、 α -帚麴菌素、光桐蛋白、香石竹毒蛋白、垂序登陸蛋白（PAPI、PAPII、和PAP-S）、苦瓜蛋白抑制劑、麻風毒素蛋白、巴豆毒蛋白、石鹼草抑制劑、多花白樹毒蛋白、絲林黴素、局限麴菌素、酚黴素、及黴菌

毒素。各種放射性核種可用於產生放射性共軛抗體。實例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、及 ^{186}Re 。

【0164】 抗體及細胞毒性劑之共軛物可使用各種雙功能蛋白質偶聯劑製備，該等偶聯劑諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二巰基)丙酸酯(SPD P)、亞胺基硫醇(iminothiolane; IT)、亞胺酸酯之雙功能衍生物(諸如二甲基己二酸亞胺酯(dimethyl adipimide HCl)、活性酯類(諸如二琥珀醯亞胺基辛二酸酯)、醛類(諸如戊二醛(glutaraldehyde))、雙-疊氮化合物(諸如雙(對-疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮衍生物(諸如雙-(對-重氮基苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如亞甲代苯基2,6-二異氰酸酯)、及雙-活性氟化物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如，蓖麻毒蛋白免疫毒素可如描述於Vitetta等人，Science 238: 1098 (1987)來製備。碳-14-標記之1-異硫氰醯苄基-3-甲基二乙烯三胺基戊乙酸(MX-DTPA)係用於將放射性核苷酸共軛至抗體的例示性螯合劑。參看WO 94/11026。

【0165】 本領域一般技藝人士應認識到多種可能部分可經偶聯至本文所揭示之所得抗體。參看，例如，「Conjugate Vaccines」，Contributions to Microbiology and Immunology，J. M. Cruse和R. E. Lewis, Jr (編)，Carger Press，New York，(1989)，其全部內容以引用方式併入本文中。

【0166】 偶聯可藉由結合兩個分子之任何化學反應達成，只要抗體及其他部分保留其各自活性。此鍵聯可包括眾多化學機制，例如，共價結合、親和性結合、插入、配位結合及複合。然而，較佳結合係共價結合。共價結合可藉由直接縮合現有側鏈或藉由結合外部橋接分子來達成。眾多二價或多價連接劑係用於將蛋白質分子（諸如本文所揭示之抗體）偶聯至其他分子。例如，代表性偶聯劑可包括有機化合物諸如硫酯、碳化二醯亞胺、琥珀醯亞胺酯、二異氰酸酯、戊二醛、重氮苯及環己烷二胺。此列舉不意欲窮盡在本領域中已知之各類偶聯劑，而是係更普遍偶聯劑之舉例。參看 Killen 和 Lindstrom, *Jour. Immun.* 133:1335-2549 (1984)；Jansen 等人，*Immunol. Rev.* 62:185-216 (1982)；以及 Vitetta 等人，*Science* 238:1098 (1987)。

【0167】 本文所揭示之接頭包括描述於文獻中之彼等。參看，例如，Ramakrishnan, S. 等人，*Cancer Res.* 44:201-208 (1984)，其描述 MBS（M-馬來醯苯甲醯-N-羥基琥珀醯亞胺酯）之用途。亦參看美國專利第 5,030,719 號，描述了以寡肽接頭之方式將鹵化醯肼衍生物偶聯在一種抗體上。特別較佳之接頭包括：(i) EDC（1-乙基-3-(3-二甲基胺基-丙基)碳化二醯亞胺氫氯化物）；(ii) SMPT（4-琥珀醯亞胺氧基羧基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)-甲苯（Pierce Chem. Co., Cat. (21558G)）；(iii) SPDP（琥珀醯亞胺醯基-6[3-(2-吡

啖基二硫基)丙醯胺基]己酸酯)(Pierce Chem.Co., Cat #21651G); (iv) 硫化-LC-SPDP (硫化琥珀醯亞胺醯基-6[3-(2-吡啶基二硫基)-丙醯胺]己酸酯(Pierce Chem.Co., Cat.#2165-G); 以及(v) 共軛至EDC的硫化-NHS(N-羥基硫化-琥珀醯亞胺: Pierce Chem. Co., Cat. #24510)。

【0168】 本文所述之接頭含有具有不同屬性之組分，因此導致具有不同物理化學性質之共軛物。例如，與芳族羧酸鹽之硫化-NHS酯相比，烷基羧酸鹽之硫化-NHS酯係更穩定的。與硫化-NHS酯相比，含有接頭之NHS-酯係較不易溶。此外，接頭SMPT含有空間位阻二硫鍵，並且可形成具有增加之穩定性的共軛物。與其他鍵聯相比，二硫鍵聯係一般而言較不穩定，因為二硫鍵聯在體外裂解，導致可獲得之較少共軛物。硫化-NHS，特定言之，可增強碳化二醯亞胺偶聯之穩定性。當與硫化NHS結合使用時，碳化二醯亞胺偶聯（諸如EDC）形成酯，該酯與單獨碳化二亞胺偶聯反應相比更抗水解作用。

【0169】 本文所揭示之抗體亦可經調配為免疫脂質體。含有該抗體之脂質體藉由在本領域中已知之方法製備，諸如描述於Epstein等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 以及美國專利第4,485,045號及第4,544,545號。具有增強循環時間之脂質體揭示於美國專利第5,013,556號。

【0170】 脂質體可藉由利用脂質組合物逆相蒸發方法產生，該脂質組合物包含磷脂醯膽鹼、膽固醇、及PEG衍生之磷脂醯乙醇胺（PEG-derivatized phosphatidylethanolamine；PEG-PE）。脂質體經由規定孔徑之過濾器擠出以產生具有所要直徑之脂質體。本文所揭示之抗體的Fab'片段可經由二硫交換反應共軛至脂質體，如描述於Martin等人，J. Biol. Chem.，257：286-288（1982）。

抗CD47之抗體的用途

【0171】 應瞭解投予根據本發明之治療實體將與結合至調配物中的適宜載劑、賦形劑、及其他試劑一起投予以提供給經改良之轉移、遞送、耐受、及其類似者。多種適當調配物可發現於全部醫藥化學家已知之藥典：Remington's Pharmaceutical Sciences（第15版，Mack Publishing Company，Easton，Pa.（1975）），特定言之其中由Blaug，Seymour所寫之第87章。此等調配物包括，例如，粉末、糊劑、軟膏、凍膠劑、石蠟、油類、脂質、含有脂質（陽離子或陰離子）之泡囊（諸如Lipofectin™）、DNA共軛物、無水吸附糊劑、水包油及油包水乳劑、乳劑卡波蠟（各種分子量之聚乙二醇）、半固體凝膠、及含有卡波蠟之半固體混合物。根據本發明在治療及治療劑中前述混合物之任一者可係適當地，若在調配物中活性成分未由調配物失活並且該調配物係生理學相容的並且與投藥途徑相容。亦參看

Baldrick P. 「 Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance 」, Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. 「 Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals 」, Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman W N 「 Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery - some emerging concepts 」, J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell 等人 「 Compendium of excipients for parenteral formulations 」 PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) 及其中與醫藥化學家熟知之調配物、賦形劑及載劑相關之額外資訊的引用。

【0172】 本文所揭示之抗體，其包括本文所揭示之單株抗體，可用作治療劑。此等試劑將一般用於在受試者中診斷、預測、監控、治療、緩解、及/或預防與異常CD47表現、活性及/或信號傳導相關之疾病或病理。一種治療療法係藉由使用標準方法識別受試者來進行，例如患有（或處於發展風險）與異常CD47表現、活性及/或信號傳導相關疾病或病況（例如，癌症或其他腫瘤病）之人類患者。抗體製劑，較佳地具有對其靶抗原高特異性及高親和性之抗體製劑，經投予受試者並且一般具有歸因於其與靶結合的效果。投予該抗體可阻斷(abrogate)或抑制或干擾靶（例如，CD47）之表現、活性及/或信號傳導功

能。投予該抗體可阻斷或抑制或干擾靶（例如，CD47）與天然結合之內源配體（例如，SIRP α ）結合。例如，該抗體結合至靶並且調節、阻斷、抑制、減少、拮抗、中和、或另外干擾CD47表現、活性及/或信號傳導。

【0173】 與異常CD47表現、活性及/或信號傳導相關之疾病或病況包括，以不作限制之實例的方式，血液癌症及/或固態腫瘤。血液癌症包括，例如，白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。某些形式之白血病包括，以不作限制之實例的方式，急性淋巴球性白血病（ALL）；急性骨髓白血病（AML）；慢性淋巴球性白血病（CLL）；慢性骨髓性白血病（CML）；骨髓增生性病變/腫瘤（MPDS）；以及骨髓發育不良症狀。某些形式之淋巴瘤包括，以不作限制之實例的方式，霍奇金氏淋巴瘤、無痛性及攻擊性非霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、及濾泡性淋巴瘤（小細胞及大細胞）。某些形式之骨髓瘤包括，以不作限制之實例的方式，多發性骨髓瘤（MM）、骨髓巨細胞瘤、重鏈骨髓瘤、及輕鏈或本斯-瓊斯骨髓瘤。固態腫瘤包括，例如，乳腺腫瘤、卵巢腫瘤、肺部腫瘤、胰臟腫瘤、前列腺腫瘤、黑色素腫瘤、結腸直腸腫瘤、肺部腫瘤、頭頸腫瘤、膀胱腫瘤、食道腫瘤、肝臟腫瘤、及腎臟腫瘤。

【0174】 與癌症及其他腫瘤病相關之症狀包括，例如，發炎、發燒、全身不適、發燒、疼痛、通常局限至發炎區域、食欲減輕、體重減輕、水腫、頭痛、疲勞、皮疹、經

閉、肌肉無力、肌肉疲勞及腹部症候群諸如，例如，腹部疼痛、腹瀉或便秘。

【0175】 治療有效量之本文所揭示之抗體一般係關於達成治療目的所需之量。如上提及，此可係在抗體與其靶抗原之間的結合相互作用，在某些情形下，干擾靶之功能。待投予之所需量將進一步取決於抗體對其特異性抗原之結合親和性，並且亦將取決於投予之抗體在投予之其他受試者中的自由量的衰減速率。本文所揭示之抗體或抗體片段的用於治療有效劑量之普遍範圍可係，以不作限制之實例的方式，從約 0.1 mg/kg 體重至約 100 mg/kg 體重。在一些實施例中，投予受試者之本文所揭示之抗體的劑量係 0.1 mg/kg 、 0.5 mg/kg 、 1 mg/kg 、 2 mg/kg 、 5 mg/kg 、 10 mg/kg 、 15 mg/kg 、 20 mg/kg 、 25 mg/kg 、 30 mg/kg 、 50 mg/kg 、 75 mg/kg 、 100 mg/kg 、或更高。普遍給藥頻率可例如從每天兩次至每週一次變化。

【0176】 與用於診斷或治療特定發炎相關之病況的任何已知方法相關地確定治療之有效性。緩解發炎相關病況之一或更多種症狀指示該抗體呈現臨床益處。

【0177】 用於篩選具有所要特異性之抗體的方法包括但不限於酶聯結免疫吸附劑分析法 (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA) 及在本領域中已知之其他免疫介導之技術。

【0178】 抗CD47之抗體可用於關於定位及/或量化CD47的在本領域中已知之方法（例如，用於量測CD47及/或CD47與SIRP α 二者在適當生理樣本中之水平、用於診斷方法、用於成像蛋白質、及其類似者）。在給定實施例中，含有源自抗體之抗原結合域的對CD47特異性之抗體，或其衍生物、片段、類似物或同源物係用作生理學活性化合物（後文稱為「治療劑」）。

【0179】 對CD47特異性之抗體可用於藉由標準技術諸如免疫親和性、層析法或免疫沉澱分離CD47胜肽。抗CD47蛋白之抗體（或其片段）可作為臨床測試程序之部分診斷上用於監控在組織中之蛋白質水平，例如，用以例如決定給定治療療法之效率。偵測可藉由將抗體偶聯（亦即，物理連接）至可偵測物質來促進。可偵測物質之實例包括各種酶、輔成基、螢光材料、發光材料、生物發光材料、及放射性材料。適宜酶之實例包括辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、或乙醯膽鹼酶；適宜輔成基複合物之實例包括抗生蛋白鏈菌素/生物素及抗生物蛋白/生物素；適宜螢光材料之實例包括繖形酮、螢光黃、螢光異硫氰酸鹽、若丹明、二氯三嗪基螢光素、丹磺醯氯或紅藻素；發光材料之實例包括魯米諾；生物發光材料之實例包括螢光素酶、螢光素、及水母蛋白，以及適宜放射性材料之實例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

【0180】 本文所揭示之抗體亦可用作在樣本中偵測CD47及/或CD47與SIRP α 蛋白（或其蛋白質片段）二

者之存在的試劑。在一些實施例中，該抗體含有可偵測標記。抗體係多株，或更佳地，單株。使用完整抗體或其片段（例如，Fab、scFv、或F(ab')₂）。關於探針或抗體，術語「標記的」意欲包含藉由將可偵測物質偶聯（亦即，物理連接）至該探針或抗體直接標記探針或抗體，以及藉由與直接標記之另一試劑反應來間接標記該探針或抗體。間接標記之實例包括使用螢光標記之二次抗體及利用生物素末端標記之DNA探針偵測初級抗體，使得其可利用螢光標記之抗生蛋白鏈菌素來偵測。術語「生物樣本」意欲包括從受試者分離之組織、細胞及生物流體，以及存在於受試者中之組織、細胞及流體。術語「生物樣本」之用途由此包括血液及血液之部分或組分，該血液包括血清、血漿、或淋巴。亦即，本文所揭示之偵測方法可用以在體外以及體內生物樣本中偵測分析物mRNA、蛋白質、或基因組DNA。例如，用於偵測分析物mRNA之體外技術包括Northern雜交及原位雜交。用於偵測分析物蛋白質之體外技術包括酶聯結免疫吸附劑分析法（ELISA）、Western墨點、免疫沉澱、及免疫螢光法。用於偵測分析物基因組DNA之體外技術包括Southern雜交。用於進行免疫分析之程序描述（例如）於「ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology」，第42卷，J. R. Crowther（編輯）Human Press, Totowa, N.J., 1995；「Immunoassay」，E. Diamandis 和 T. Christopoulos, Academic

Press, Inc., San Diego, Calif., 1996 ; 以及「Practice and Theory of Enzyme Immunoassays」, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985。此外，用於偵測分析物蛋白質之體內技術包括將標記之抗分析物蛋白質抗體引入受試者中。例如，該抗體可經放射性標記物來標記，在受試者該標記物之存在及位置中可藉由標準成像技術來偵測。

CD47 抗體之治療投藥及調配物

【0181】 本文所揭示之抗體（本文亦稱為「活性化合物」）及其衍生物、片段、類似物及同源物可結合至適宜用於投藥的醫藥組合物。涉及製備此等組合物之原理及注意事項，以及組分選擇之指南提供於例如 Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 第 19 版（Alfonso R. Gennaro 等人編輯）Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995 ; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994 ; 以及 Peptide And Protein Drug Delivery（Advances In Parenteral Sciences, 第 4 卷）, 1991, M. Dekker, New York。

【0182】 此等組合物通常包含抗體及醫藥學可接受之載劑。其中使用抗體片段，特異性結合至靶蛋白質之結合

域的最小抑制片段係較佳的。例如，基於抗體之可變區序列，肽分子可經設計為保留結合靶蛋白質序列之能力。此等肽可經化學合成及/或藉由重組DNA技術產生。（參看，例如，Marasco等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)）。

【0183】如本文所使用，術語「醫藥學上可接收之載劑」意欲包括與醫藥投藥相容的任何及全部溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌試劑、等滲劑及吸收延遲劑、及其類似者。適宜載劑描述於最新版 Remington's Pharmaceutical Sciences（在本領域中的標準參考文獻），其以引用方式併入本文中。此等載劑或稀釋劑之較佳實例包括，但不限於，水、鹽水、林格氏溶液、右旋糖溶液、及5%人類血清白蛋白。亦可使用脂質體及不含水媒劑諸如不揮發油。用於醫藥學活性物質之此等介質及試劑之用途係在本領域中熟知的。除了任何常規介質或試劑與該活性化合物不相容之外，考慮了其在該組合物中之用途。

【0184】用於體內投藥之調配物必須係無菌的。此可藉由無菌過濾膜過濾容易地達成。

【0185】如本文所揭示之醫藥組合物可經調配以與其意欲之投藥途徑相容。投藥途徑之實例包括非經口，例如，靜脈內、真皮內、皮下、口服（例如，吸入）、經皮（亦即，局部）、經黏膜、及直腸投藥。用於非經口、經皮、或皮下應用之溶液或懸浮液可包括以下組分：用於注

射的無菌稀釋劑諸如水、鹽水溶液、不揮發性油、聚乙二醇、甘油酯、丙二醇或其他合成溶劑；抗細菌劑諸如苯甲醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑諸如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑諸如乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA)；緩衝劑諸如乙酸酯、檸檬酸酯或磷酸酯，以及用於調節毒性之試劑諸如氯化鈉或右旋糖。pH可利用酸或鹼（諸如氫氯酸或氫氧化鈉）調節。非經口製劑可包裹在安瓶、拋棄式注射器或由玻璃或塑膠製成的多劑量瓶中。

【0186】適用於注射用途之醫藥組合物包括無菌含水溶液（其中水可溶）或分散液及用於臨時製備無菌可注射溶液或分散液的無菌粉末。針對靜脈內投藥，適宜載劑包括生理鹽水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) 或磷酸鹽緩衝鹽水(phosphate buffered saline; PBS)。在全部情形中，該組合物必須係無菌的並且應係流體性達到易於注射的程度。在製造及儲存條件下其必須係穩定的並且必須保存於抗微生物諸如細菌及真菌污染的條件下。該載劑可係含有，例如，水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇、及液體聚乙二醇、及其類似者）、及其適宜混合物的溶劑或分散介質。適當流動性可例如藉由使用包衣諸如卵磷酯、藉由分散液之情形中維持所需粒子大小及藉由使用表面活性劑來維持。預防微生物作用可藉由各種抗細菌及抗真菌劑來達成，例如，對氧苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗壞血酸、乙汞

硫柳酸鈉、及其類似者。在眾多情形中，在該組合物中包括等滲劑（例如，糖類、多元醇諸如甘露醇、山梨醇、氯化鈉）應係較佳地。可注射組合物之延長吸收可藉由在該組合物中包括延遲吸收的試劑（例如單硬脂酸鋁及明膠）來達到。

【0187】 無菌可注射溶液可藉由結合在適當溶劑中以所需量之活性化合物與如所需上文提列舉出之成分之一或組合接著過濾無菌來製備。一般而言，分散液藉由將活性化合物結合至無菌媒劑來製備，該無菌媒劑含有鹼性分散液基質及來自上文列舉出之彼等的所需之其他成分。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末之情形下，製備方法係由先前之其無菌過濾溶液產生活性成分加上任何額外所需成分之粉末的真空乾燥及冰凍乾燥。

【0188】 口服組合物一般包括惰性稀釋劑或可食用載劑。其等可封裝在明膠膠囊中或壓縮為錠劑。出於口服治療給藥之目的，該活性化合物可與賦形劑結合並以錠劑、喉錠、或膠囊形式使用。口服組合物亦可使用流體載劑製備用作漱口水，其中在該流體載劑中之化合物口服施加並漱口並且咳出或吞嚥。醫藥學相容之結合試劑及/或佐劑材料可作為該組合物之部分包括在內。錠劑、藥丸、膠囊、喉錠及其類似物可含有任何以下成分、或相似性質之化合物：黏結劑諸如微晶纖維素、紫雲英樹膠或明膠；賦形劑諸如澱粉或乳糖，破碎劑諸如海藻酸、澱粉羥基乙酸鈉（Primogel）、或玉米澱粉；潤滑劑諸如硬脂酸鎂或

Sterotes；助流劑諸如膠體二氧化矽；甜味劑諸如蔗糖或糖精；或調味劑諸如薄荷、柳酸甲脂、或橙味香精。

【0189】 針對吸入投藥，該等化合物以氣溶膠噴霧形式，從加壓容器或分配器遞送，該加壓容器或分配器含有適宜推進劑，例如，氣體諸如二氧化碳、或霧化劑。

【0190】 全身給藥亦可藉由經黏膜或經皮方式。針對經黏膜或經皮投藥，適用於透過屏障之滲透劑係用於該調配物中。此等滲透劑一般在本領域中已知，並且包括，例如，針對經黏膜投藥，清潔劑、膽鹽、及梭鏈孢酸衍生物。經黏膜投藥可經由使用噴鼻劑或栓劑達成。針對經皮投藥，該等活性化合物經調配為軟膏、油膏、凝膠、或乳膏，如在本領域中一般已知。

【0191】 該等化合物亦可以栓劑（例如，利用習知栓劑基底諸如可哥豆油及其他甘油酯）或滯留性灌腸劑之形式製備以用於經直腸遞送。

【0192】 在一個實施例中，該等活性化合物與保護該化合物不會從體內快速消除之載劑一起製備，諸如持續/控制釋放調配物，包括植入物劑微膠囊化遞送系統。可使用可生物降解、生物相容之聚合物，諸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯、及聚乳酸。用於製備此等調配物之方法應為本領域一般技藝人士顯而易見。

【0193】 例如，該等活性成分可包夾在製備之微膠囊中，例如，藉由凝聚技術或藉由介面聚合（例如，分別羥

甲基纖維素或明膠-微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)、在膠體藥物遞送系統中(例如,脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子、及奈米膠囊)或在巨乳液(macroemulsion)中。

【0194】 持續釋放製劑可製備。持續釋放製劑之適宜實例包括含有該抗體之固體疏水聚合物之半透性基質,其基質係以成型物體(例如,膜,或微膠囊)之形式。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如,聚(2-羥基乙基-甲基丙烯酸酯)、或聚(乙烯醇))、聚乳酸交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與 γ 乙基-L-麩胺酸鹽之共聚物、不可降解之乙烯醋酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物諸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物及利普安(leuprolide acetate)構成的可注射微球體)及聚-D-(-)-3-羥丁酸。儘管聚合物諸如乙烯醋酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸能夠釋放分子超過100天,某些水凝膠釋放蛋白質的持續時間要短一些。

【0195】 該等材料亦可商業獲自Alza Corporation及Nova Pharmaceuticals, Inc.。脂質懸浮液(包括利用對病毒抗原之單株抗體靶向感染細胞的脂質體)並且亦可用作醫藥學上可接受之載劑。此等可根據為本領域一般技藝人士已知之方法製備,例如,如描述於美國專利第4,522,811號。

【0196】 口服或非經口組合物可經調配為劑量單位形式以便於投藥及劑量均一。如本文使用之劑量單位元形式

指物理上分離之單位，其適合作為待治療受試者的單位劑量；各個單位含有與所需醫藥載劑相關之經計算以產生所要治療效果的預定量之活性化合物。用於本文所揭示之劑量單位形式之說明書受限於並且直接取決於該活性化合物之獨特特性及待達成之特定治療效果，以及將此活性化合物組合用於個體治療領域中的固有限制。

【0197】 醫藥組合物可連同投藥指導一起包括在容器、包裝、或分配器中。

【0198】 該調配物亦可含有治療特定適應症所需的大於一種活性化合物，較佳地具有互補活性但相互無副作用之彼等。替代地或此外，該組合物可包含增強其功能的試劑，諸如，例如，細胞毒性劑、細胞介素、化學治療劑、或生長抑制劑。此等分子以適宜地對意欲目的有效之量組合存在。

【0199】 如本文所揭示之活性化合物可以組合療法投予，亦即，與其他試劑（例如，治療劑）結合，該試劑可用於治療病理病症或病況，諸如各種形式之癌症、自體免疫病及發炎疾病。在此上下文中術語「組合」意謂基本上同時，或者同時或順次地給予該等試劑。若順次地給予，則在開始投予第二種化合物時，較佳地仍可於治療位點偵測到有效濃度之兩種化合物的第一種。

【0200】 例如，組合療法可包括與一或更多種額外治療劑共同調配及/或共同投予的一或更多種本文所揭示之抗體，該額外治療劑係例如一或更多種細胞介素及生長因子

抑制劑、免疫抑止劑、消炎劑、代謝抑制劑、酶抑制劑、及/或細胞毒性或細胞生長抑制劑，如下文更詳細描述。此等組合療法可有利地採用較低劑量之所投予治療劑，因此避免與各種單一療法相關之可能毒性或併發症。

【0201】 如本文所揭示之治療劑可與如本文所揭示之抗體結合使用並且包括在發炎應答中於不同階段干擾的彼等試劑。一或更多種本文所述之抗體可與一或更多種額外試劑共同調配及/或共同投予，該額外試劑係諸如其他細胞介素或生長因子拮抗劑（例如，可溶受體、肽抑制劑、小分子、配體融合物）；或結合至其他靶的抗體或其抗原結合片段（例如，結合至其他細胞介素或生長因數之抗體，其受體、或其他細胞表面分子）；以及抗發炎細胞介素或其促效劑。

【0202】 本文所揭示之抗體可用作抗自體免疫疾病、發炎疾病、等等的疫苗佐劑。用於治療此等類型病況之佐劑的組合係適宜與涉及自體免疫的來自靶向之自身抗原（亦即，自體抗原）的廣泛抗原結合使用，例如，髓鞘鹼性蛋白質；發炎自體抗原，例如，澱粉狀肽蛋白、或移植抗原，例如，異體抗原。該抗原可包含源自蛋白質之肽或胜肽以及任何下列之片段：醣類、蛋白質、多核苷酸或寡核苷酸、自體抗原、澱粉狀肽蛋白質、移植抗原、過敏原、或其他巨分子組分。在一些實例中，大於一個抗原係包括在該抗原組合物中。

其他治療劑之設計及產生

【0203】 基於本文相對於CD47產生並表徵之抗體之活性，促進設計除抗體部分外的其他治療方式。此等方式包括不作限制之高級抗體治療劑，諸如雙特異性抗體、免疫毒素、及放射性標記之治療劑，產生肽治療劑、基因療法，特定言之胞內抗體、反義治療劑、及小分子。

【0204】 例如，與雙特異性抗體結合，可產生雙特異性抗體，其包含(i)共軛在一起的兩個抗體 - 一者對CD47具有特異性並且另一者對第二種分子具有特異性，(ii)單個抗體，其中一條鏈對CD47具有特異性並且第二條鏈對第二種分子具有特異性，或者(iii)單鏈抗體，對CD47及第二種分子具有特異性。此等雙特異性抗體使用熟知之技術產生，例如，與(i)及(ii)相關，參看，例如，Fanger等人，Immunol Methods 4:72-81 (1994)及Wright等人，Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992)，並且與(iii)相關，參看，例如，Traunecker等人，Int. J. Cancer (增刊) 7:51-52 (1992)。

【0205】 與免疫毒素相關，抗體可採用在本領域中熟知之技術修飾以用作免疫毒素。參看，例如，Vitetta Immunol. Today 14:252 (1993)。亦參看美國專利第5,194,594號。與放射性標記之抗體的製劑相關，此等經修飾之抗體亦可採用在本領域中已知之技術容易地製備。參看，例如，Jungmans等人，Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (第2版，Chafner和Longo編輯，Lippincott Raven

(1996))。亦參看美國專利第4,681,581號、第4,735,210號、第5,101,827號、第5,102,990號(Re 35,500)、第5,648,471號、及第5,697,902號。免疫毒素及放射性標記之分子各者應可能殺傷表現CD47之細胞。

【0206】與產生治療肽相關，經由採用關於CD47及其抗體諸如本文所揭示之抗體之結構資訊或篩選肽文庫，可產生抗CD47之治療肽。設計及篩選肽治療劑與Houghten等人，*Biotechniques* 13:412-421 (1992)，Houghten *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* 82:5131-5135 (1985)，Pinalla等人，*Biotechniques* 13:901-905 (1992)，Blake和Litzi-Davis *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992)相關論述。免疫毒素及放射性標記之分子亦可製備，並且以如上文關於抗體論述與肽部分相關的相似方式製備。假設CD47分子（或一形式，諸如剪接變異體或替代形式）在疾病過程中係功能活性的，亦可能經由習知技術設計基因及其反義治療劑。此等形式可用於調節CD47之功能。本文所揭示之有關抗體促進設計及使用與其相關之功能分析。用於反義治療劑之設計及策略在國際專利申請案第WO 94/29444號中詳細論述。用於基因療法之設計及策略係熟知的。然而，特定言之，涉及胞內抗體的基因療法技術之使用經證明特別具有優越性。參看，例如，Chen等人，*Human Gene Therapy* 5:595-601

(1994) 及 Marasco Gene Therapy 4:11-15 (1997)。基因治療劑的總體設計和相關注意事項亦在國際專利申請案第 WO 97/38137 號中論述。

【0207】 CD47 分子之結構及其與如本文揭示之其他分子（諸如 SIRP α 及 / 或本文所揭示之抗體）之相互作用可促進額外治療形式之合理設計。在此方面，合理藥物設計技術諸如 X 射線結晶學、電腦輔助（或幫助）分子模型化（computer-aided (or assisted) molecular modeling; CAMM）、定量或定性結構活性關係（quantitative or qualitative structure-activity relationship; QSAR）、及相似技術可採用以集中於藥物發現研究。合理設計允許預測可與分子或其特異性形式相互作用的蛋白質或合成結構，該分子或其特異性形式可用於修飾或調節 IL-6Rc 之活性。此等結構可在生物系統中化學合成或表現。此途徑已在 Capsey 等人，Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (Stockton Press, NY (1988)) 中綜述。此外，組合文庫可經設計及合成並用於篩選程式，諸如高通量篩選研究。

篩選方法

【0208】 本發明提供了用於識別調節劑之方法（本文亦稱為「篩選分析」），該調節劑亦即調節或另外干擾 CD47 與 SIRP α 結合的候選物或測試化合物或試劑（例如，肽、肽模擬物、小分子或其他藥物），或調節或另外干擾 CD47

及 / 或 $CD47-SIRP\alpha$ 之信號傳導功能的候選物或測試化合物或試劑。亦提供了識別可用於治療與異常 $CD47$ 及 / 或 $CD47-SIRP\alpha$ 表現、活性及 / 或信號傳導相關之病況的化合物之方法。該篩選方法可包括在本領域中已知或使用之彼等或本文所述之彼等。例如， $CD47$ 可經固定在微量滴定盤上並且在存在 $SIRP\alpha$ 時利用候選物或測試化合物（例如， $CD47$ 抗體）培育。隨後，可使用二次抗體偵測結合之 $SIRP\alpha$ ，並且吸收度可在盤讀數器上偵測。

【0209】亦提供了識別能夠促進巨噬細胞吞噬腫瘤細胞的化合物之方法。此等方法可包括在本領域中已知或使用之彼等或本文所述之彼等。例如，在存在候選化合物（例如， $CD47$ 抗體）時使用標記之腫瘤細胞培育巨噬細胞。在一段時期之後，可觀察到該巨噬細胞內化腫瘤標記以識別吞噬作用。關於此等方法之額外細節（例如， $SIRP\alpha$ 阻斷分析及吞噬分析）在實例中提供。在此等篩選分析中識別之化合物亦在本文中揭示。

【0210】揭示了篩選調節 $CD47$ 之信號傳導功能的候選物或測試化合物之分析。本文所揭示之測試化合物可使用在本領域中已知之組合文庫方法中的數個途徑之任一個獲得，包括：生物文庫；可空間尋址之平行固相或液相文庫；需要反摺積 (deconvolution) 之合成文庫方法；「單珠單化合物」文庫方法；以及使用親和層析選擇之合成文庫方法。生物文庫途徑受限於肽文庫，而其他四種途徑可應用至肽、非肽寡聚體或化合物之小分子文庫。參

看，例如，Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145)。

【0211】 本文所使用之「小分子」意謂指一種組合物，其具有小於約5 kD並且最佳地小於約4 kD之分子量。小分子可係例如核酸、肽、胜肽、肽模擬物、碳水化合物、脂質或其他有機或無機分子。化學及/或生物混合物之文庫，諸如真菌、細菌、或藻成萃取物，係在本領域中已知並且可利用本文所揭示之分析之任一者篩選。

【0212】 用於合成分子文庫之方法的實例可發現於本領域中，例如：DeWitt等人，1993 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6909；Erb等人，1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11422；Zuckermann等人，1994 *J. Med. Chem.* 37: 2678；Cho等人，1993 *Science* 261: 1303；Carrell等人，1994 *Angew. Chem. Int. 編輯 Engl.* 33: 2059；Carell等人，1994 *Angew. Chem. Int. 編輯 Engl.* 33: 2061；以及Gallop等人，1994 *J. Med. Chem.* 37: 1233。

【0213】 化合物文庫可存在於溶液中（參看，例如，Houghten, 1992 *Biotechniques* 13: 412-421）、或在珠粒上（參看Lam, 1991 *Nature* 354: 82-84）、在晶片上（參看Fodor, 1993 *Nature* 364: 555-556）細菌（參看美國專利第5,223,409號）、孢子（參看美國專利第5,233,409號）、質體（參看Cull等人，1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869）或

在噬菌體上(參看Scott和Smith, 1990 Science 249: 386-390; Devlin, 1990 Science 249: 404-406; Cwirla等人, 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 6378-6382; Felici, 1991 J. Mol. Biol. 222: 301-310; 以及美國專利第5,233,409號)。

【0214】 候選化合物可經引入抗體-抗原複合物並確定候選化合物是否破壞抗體-抗原複合物, 其中破壞此複合物指示該候選化合物調節CD47之信號傳導功能及/或在CD47與SIRP α 之間的相互作用。如本文所揭示之可溶CD47及/或CD47和SIRP α 蛋白質二者經提供並暴露於至少一個中和單株抗體。偵測到形成抗體-抗原, 並且一或更多個候選化合物經引入該複合物。若在引入一或更多個候選化合物之後破壞抗體-抗原複合物, 則該等候選化合物可用於治療與異常CD47及/或CD47-SIRP α 信號傳導相關之病況。

【0215】 確定測試化合物干擾或破壞抗體-抗原複合物之能力可例如藉由偶聯測試化合物與放射性同位素或酶標記達成使得結合測試化合物與抗原或其生物活性部分可藉由在該複合物中偵測標記之化合物確定。例如, 測試化合物可利用 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、或 ^3H 直接或間接地標記, 並且藉由直接計數放射性發射或藉由閃爍計數偵測放射性同位素。或者, 測試化合物可利用例如辣根過氧化物酶、鹼性磷酸酶、或螢光素酶進行酶標記, 並且藉由對適當底物轉化為產物的決定來偵測酶標記。

【0216】 該分析可包含使抗體-抗原複合物與測試化合物接觸，並且確定測試化合物與抗原相互作用或另外破壞現有抗體-抗原複合物之能力。確定測試化合物與抗原相互作用及/或破壞抗體-抗原複合物之能力亦可包含確定與抗體相比測試化合物優先結合至抗原或其生物活性部分之能力。

【0217】 該分析亦可包含使抗體-抗原複合物與測試化合物接觸並且確定測試化合物調節抗體-抗原複合物之能力。確定測試化合物調節抗體-抗原複合物之能力可例如藉由在存在測試化合物時確定抗原結合或與抗體相互作用之能力來達成。

【0218】 熟習該項技術者應認識到，在本文所揭示之任何篩選方法中，該抗體可係中和抗體，其調節或另外干擾CD47活性及/或信號傳導。

【0219】 本文所揭示之篩選方法可作為基於細胞之分析或作為非細胞分析進行。本文所揭示之無細胞分析適用於使用可溶形式或膜結合形式之CD47及其片段。在包含膜結合形式之CD47的無細胞分析之情形中，可期望採用助溶劑使得在溶液中維持膜結合形式之蛋白質。此等助溶劑之實例包括非離子清潔劑諸如正辛基葡萄糖苷、正十二烷基葡萄糖苷、正十二烷基麥芽糖苷、辛醯-N-甲基葡萄糖醯胺、癸醯基-N-甲基葡萄糖醯胺、Triton™ X-100、Triton™ X-114、Thesit™、異十三烷基聚(乙二醇醚)_n、N-十二烷基N,N-二甲基-3-胺合-1-丙烷磺酸

鹽、3-(3-膽鹼胺基丙基)二甲胺基-1-丙烷磺酸鹽(CHAPS)、或3-(3-膽鹼胺基)二甲胺基-2-羥基-1-丙烷磺酸鹽(CHAPSO)。

【0220】可期望固定抗體或抗原以促進從非複合形式之一種或兩種以下引入之候選化合物分離出複合形式，以及適應分析自動化。在存在或缺乏候選化合物時觀察抗體-抗原複合物可在適用於含有反應物之任何容器中達成。此等容器之實例包括微量滴定盤、測試管、及微離心管。可提供融合蛋白，該融合蛋白添加有允許一種或全部兩種蛋白質結合至基質的結構域。例如，GST抗體融合蛋白或GST-抗原融合蛋白可吸附至麩胱甘肽脂糖珠粒(Sigma Chemical, St. Louis, Mo.)或麩胱甘肽衍生之微量滴定盤上，其隨後與測試化合物結合，並且在有助於複合物形成的條件下培育該混合物（例如，於鹽及pH的生理條件）。在培育之後，該珠粒或微量滴定盤孔經洗滌以移除任何未結合之組分，在珠粒情形下固定基質，直接或間接決定複合物。或者，該等複合物可從該基質解離，並且抗體-抗原複合物形成水平可使用標準技術確定。

【0221】用於將蛋白質固定在基質上之其他技術亦可用於本文所揭示之篩選分析中。例如，抗體（例如，2A1抗體，或具有如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）選自SEQ ID NOs:5-30的可變重鏈及如揭示於美國專利申

請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)選自SEQ ID NOs:31-47的可變輕鏈的抗體)或抗原(例如,CD47蛋白質)可採用生物素和抗生蛋白鏈菌素之共軛物固定。生物素化之抗體或抗原分子可使用在本領域中熟知之技術(例如,生物素化套組,Pierce Chemicals, Rockford, Ill.)由生物素-NHS(N-羥基-琥珀醯亞胺)製備,並且固定在抗生蛋白鏈菌素塗佈之96孔板(Pierce Chemical)之孔中。或者,與所關注抗體或抗原反應但不干擾形成所關注之抗體-抗原複合物的其他抗體可衍生至板之孔中,並且未結合之抗體或抗原在孔中藉由抗體共軛捕獲。除上文針對GST-固定之複合物所述之彼等外,用於偵測此等複合物之方法包括使用與抗體或抗原反應之此等其他抗體免疫偵測複合物。亦提供了藉由任何前述篩選分析識別之新穎試劑及其用於如本文所述之治療的用途。

診斷及預防調配物

【0222】 本文所揭示之CD47 MA b係用於診斷及預防調配物。在一個實施例中,本文所揭示之CD47 MA b經投予處於發展一或更多種前述疾病(諸如例如不作限制之癌症或其他腫瘤病)之風險的患者。患者及器官對一或更多種前述癌症或其他腫瘤病之傾向可使用基因型、血清或生化標記物來確定。

【0223】 在本文所揭示之另一實施例中,該CD47抗體經投予至經診斷患有一或更多種上述疾病(諸如例如不作

限制之癌症或其他腫瘤病)相關臨床適應症的人類個體。在診斷時，該CD47抗體經投予以緩解或逆轉與一或更多種前述疾病相關之臨床適應症之效果。

【0224】 本文所揭示之抗體亦可用於在患者樣本中偵測CD47及/或SIRP α 並且由此可用作診斷劑。例如，本文所揭示之CD47抗體用於體外分析，例如，ELISA，以在患者樣本中偵測CD47及/或SIRP α 水平。

【0225】 在一個實施例中，本文所揭示之CD47抗體經固定在固體支撐物(例如，微量滴定盤之一個或更多個孔)上。經固定之抗體用作可存在於測試樣本中之任何CD47及/或SIRP α 的捕獲抗體。在接觸經固定之抗體與患者樣本之前，該固體支撐經沖洗並經阻斷劑諸如奶蛋白或白蛋白處理以防止非特異性吸附分析物。

【0226】 隨後該等孔經疑似含有抗原的測試樣本或含有標準量抗原之溶液處理。此樣本係例如來自疑似具有一定水平之循環抗原的受試者的血清樣本，該抗原被認為係病理學的診斷特徵。在沖洗掉測試樣本或標準物之後，該固體支撐經可偵測地標記之第二種抗體處理。該標記之第二抗體用作偵測抗體。量測可偵測標記之水平，並且藉由與標準樣本得到的標準曲線相比確定在測試樣本中CD47及/或SIRP α 之濃度。

【0227】 應瞭解，基於在體外診斷分析使用本文所揭示之CD47抗體獲得之結果，可能基於CD47及/或SIRP α 之表現水平在受試者中分段疾病(例如，與局部缺血、自

體免疫或發炎病況相關之臨床適應症)。針對給定疾病，從診斷為處於在疾病進程中之各個階段及/或處於在治療性治療該疾病之各個點的受試者採得血液樣本。使用可為進展或療法的各個階段提供統計顯著結果之一群樣本，可指出可看作係各階段特性的抗原濃度範圍。

【0228】 本文所引用之全部公開案及專利文獻以引用方式併入本文中，如同各個此公開案或文獻特別並且獨立地指示以引用方式併入本文中。所引用之公開案及專利文獻並非意欲承認任何此等出版物或文獻為相關之現有技術，亦不構成承認任何此等出版物或文獻的內容或日期之承認。本發明現以書面描述之方式描述，熟習該項技術者應意識到本發明在各種實施例中實踐並且上述說明及下文實例係出於說明之目的並且不限制隨附之申請專利範圍。

實例

【0229】 包括構成之實驗及獲得之結果的以下實例僅出於說明目的提供並且不意欲構成對本發明之限制。

實例 1

產生及選擇 CD47 抗體

【0230】 CD47 抗體藉由利用表示 CD47-IgV (免疫球蛋白類可變型) 之重組蛋白免疫小鼠，在多個位點中實施經修飾之快速免疫策略 (Kilpatrick 等人, (1997)

Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS.

Hybridoma 16, 381-389) 而產生。此外，在經免疫組中半數小鼠接收抗小鼠 GITR 促效抗體 DTA-1 之單一注射。在免疫方案之後，來自全部小鼠 (DTA-1, 經處理及未經處理) 之淋巴結收集並解離，藉以實現 B 細胞分離及隨後融合為小鼠骨髓瘤細胞系。藉由 ELISA 及藉由流式細胞儀在 Daudi (ATCC# CCL-213) 細胞上針對結合至 CD47 來篩選融合瘤上澄液 (第 1A 圖，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號 (公開案第 US20140140989 號))。亦針對阻斷 CD47-SIRP α 相互作用之能力分析融合瘤上澄液 (第 1B 圖，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號 (公開案第 US20140140989 號))。重組 CD47 經固定在 Medisorp (NUNC) 微量滴定盤上並且隨後在存在融合至人類 IgG Fc 結構域之重組人類 SIRP α -ECD 時與融合瘤上澄液一起培育。結合之 SIRP α 使用 HRP 共軛之抗人類 IgG Fc 特異性二次抗體 (Jackson Immuno Research) 偵測並在盤讀數器中偵測於 650 nm 的吸收度。

實例 2

CD47 抗體之特性分析

【0231】 本文所揭示之例示性鼠類 CD47 抗體在第 2 圖中圖示，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號 (公開案第 US20140140989 號)。SIRP α 阻斷 CD47 抗體的親和性排序係在 Raji (ATCC# CCL-86) 上 (第

2A圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號））及CCRF-CEM（ATCC# CCL-119）細胞（第2B圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號））上藉由流式細胞儀進行。結合之CD47抗體使用FITC共軛之抗小鼠IgG二次抗體（Jackson ImmunoResearch）偵測。在本領域中已知之CD47抗體，B6H12，作為陽性對照包括在內。參看，例如，美國專利第5,057,604號。在第2B圖中，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號），B6H12及2D3二者，市售非SIRP α 阻斷抗體，與本文所產生之抗體相比。與B6H12及2D3抗體相比，本文所揭示之抗體呈現向內源（細胞表面）形式之CD47的較高親和性。

實例3

CD47抗體之SIRP α 阻斷活性

【0232】藉由CD47抗體之SIRP α 阻斷功效藉由ELISA量測，其中重組組胺酸標記之CD47-IgV經固定在Medisorp微量滴定盤上。在存在增加量之CD47抗體時監控結合融合至人類IgG之Fc結構域的重組SIRP α 。使用HRP共軛之抗人類IgG（Fc特異性）二次抗體（Jackson ImmunoResearch）確定結合之SIRP α 。與B6H12抗體相比，本文所揭示之抗體呈現增強之SIRP α 阻斷功效。如揭示於美國專利申請案系列號第

13/960,136號（公開案第US20140140989號），第3A圖圖示基於ELISA之SIRP α 阻斷分析之表示資料。

【0233】CD47抗體藉由流式細胞儀分析其阻斷重組SIRP α 結合至細胞表面CD47之能力。在該分析中CCRF-CEM(ATCC#CCL-119)細胞用作CD47之來源並且在存在增加量之CD47抗體時監控結合融合至人類IgG之Fc結構域的重組SIRP α 。使用APC共軛之抗人類IgG（Fc特異性）二次抗體（Jackson ImmunoResearch）確定結合之SIRP α （第3B圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號））。B6H12及市售非SIRP α 阻斷之CD47抗體2D3，其中分別使用陽性及陰性對照。

實例4

CD47抗體介導之同型相互作用

【0234】在CD47陽性細胞之間分析SIRP α 阻斷之CD47抗體誘導細胞凝集（如已知為同型相互作用）之能力。Daudi及Raji細胞用作候選CD47表現細胞系。在檢查之抗體中，本文所揭示之2A1抗體係唯一不促進CD47表現細胞之同型相互作用的SIRP α 阻斷抗體。

實例5

CD47抗體之血球凝集活性

【0235】同型相互作用之一個實例係血球凝集，如由RBC聚集證實。針對RBC凝集篩選CD47抗體，如由抗體防止人類RBC沉澱之能力觀察。出乎意料的是，針對

其不能促進血球凝集而具有高親和性及阻斷SIRP α 之能力而言，在其他CD47抗體中發現2A1抗體係獨特的。呈現降低之血球凝集的其他抗體不阻斷SIRP α 結合至CD47。

【0236】 為評估CD47抗體之血球凝集能力，在PBS中將人類RBC稀釋至10%並於37℃培育2至6小時，在圓底96孔盤中經CD47抗體滴定。血球凝集之證據係藉由存在與未血球凝集之RBC之點狀紅斑相比表現為渾濁的未沉澱之RBC而言明。出乎意料的是，如第4A圖所示，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號），本文所揭示之CD47抗體，特定言之本文稱為2A1之抗體，不呈現血球凝集活性。該圖圖示血球凝集分析的定量，指示在存在該抗體時藉由定量RBC團粒之面積決定的「血球凝集指數」，該「血球凝集指數」相對於在缺乏該抗體時的血球凝集指數進行標準化。

【0237】 鼠類9E4抗體於全部測試濃度導致最完全之血球凝集。因此，該9E4抗體結合CD47並且阻斷CD47與SIRP α 相互作用；然而，該9E4抗體導致完全血球凝集。該9E4抗體之VH鏈區經提供為SEQ ID NO:78，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。該9E4抗體之VL鏈區經提供為SEQ ID NO:79，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。

【0238】 對照抗體 B 6 H 1 2 如針對 S I R P α 阻斷 C D 4 7 抗體所期望的那樣導致血球凝集。為調查 2 A 1 抗體之未血球凝集活性之獨特性，在 R B C 血球凝集分析中篩選數個其他 C D 4 7 抗體（第 4 B 圖，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 U S 20140140989 號））。在此分析中包括嵌合版本之 2 A 1 抗體（2 A 1 - x i），其由 2 A 1 之鼠類可變重鏈區、於胺基酸 106（亦即，M 106 I）處修飾之 2 A 1 之鼠類可變輕鏈區、及人類 I g G 1 及人類 I g κ 之恆定區組成。2 A 1 抗體及 2 A 1 - x i 抗體之 V H 及 V L 區序列提供在表 1 中，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 U S 20140140989 號）。抗體於 12.5、25、50、及 100 n m 測試。出乎意料的是，在第 4 B 圖中檢查之 C D 4 7 抗體中，2 A 1 係稀少的，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 U S 20140140989 號），亦即在第 4 B 圖中其係缺失或具有減少之血球凝集活性的唯一抗體，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 U S 20140140989 號）。如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 U S 20140140989 號），第 4 E 圖圖示 2 A 1、嵌合 2 A 1（2 A 1 - x i）、及人源化變異不導致血球凝集。

【0239】 如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 U S 20140140989 號），第 4 C 圖圖示在 R B C 血球凝集分析中篩選額外 C D 4 7 抗體之

結果。如第4C圖所示，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號），不阻斷SIRP α 的市售CD47單株抗體2D3不導致血球凝集。然而，阻斷SIRP α 的其他市售CD47抗體（例如，CC2C6、BRC126、及B6H12）導致血球凝集（第4C圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號））。因此，在本文所述之發明之前，阻斷SIRP α 之現有抗體導致血球凝集，而不阻斷SIRP α 的現有抗體（諸如2D3）不導致血球凝集。總之，在其阻斷SIRP α 但不導致血球凝集之能力方面，在現有CD47抗體中本文所揭示之抗體（例如，2A1抗體及其人源化衍生物）係獨特的。

【0240】在血球凝集分析中重新測試高濃度範圍之選擇CD47抗體（第4D圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號））。此分析揭示了B6H12及9E4血球凝集之pro區域效應，其中血球凝集於測試濃度範圍之高及低端減少。血球凝集指數之圖解表示亦著重指出pro區域效應。在第4C圖及第4E圖中pro區域效應亦係證據，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。重要的是，小鼠2A1及嵌合2A1CD47抗體於全部濃度沒有血球凝集活性。

【0241】如第4E圖所示，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號），鼠類1B4抗體呈現狹窄範圍之血球凝集。

【0242】該1B4抗體之VH鏈區提供為SEQ ID NO:80，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。該1B4抗體之VL鏈區提供為SEQ ID NO:81，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）。

【0243】如上測試源自鼠類2A1之人源化抗體之血球凝集能力。重要的是，在各種人類IgG同型（IgG1、IgG4-S228P、及IgG4-S228P/L235E）中代表性人源化抗體AB6.12不導致任何RBC血球凝集。2A1及2A1-xi作為未血球凝集抗體之對照包括在內，而B6H12和9E4作為血球凝集之陽性對照包括在內（第4F圖如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號））。

實例6

結合至石蟹獼猴CD47

【0244】評估鼠類2A1結合至石蟹獼(cyno)猴CD47之能力。先前已報導了B6H12抗體與cyno Cd47交叉反應並且在該分析中用作在cyno CD47上存在的陽性對照。用以量測2A1結合至石蟹獼猴CD47之實驗經設計以比較在石蟹獼猴B細胞及人類細胞上結合2A1與

CD47，其中Raji細胞系用作人類CD47陽性細胞。石蟹獼猴末梢血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cell; PBMC)藉由菲科派克(ficoll-paque)梯度離心法從石蟹獼猴全血分離。石蟹獼猴及人類B細胞(Raji)利用於10 µg/ml之人類CD20抗體奧法木單抗(ofatumumab)(Arzerra)標記，並且與鼠類CD47抗體2A1或B6H12之稀釋系列反應。利用人類CD20抗體標記之B細胞經共軛至DyLite 649之多株抗人類抗體偵測，而CD47鼠類抗體經共軛至DyLite 488之多株抗小鼠抗體偵測。細胞藉由流式細胞儀分析，首先藉由FSC及SSC在活細胞上門控，隨後在針對FL4陽性(CD20陽性)之細胞上，並且最後量測中間FL1(CD47陽性)。該資料藉由針對在各個細胞群上之各個抗體的最大信號除以於各個濃度之信號來標準化。如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)，在第5圖中圖示的標準化結果揭示了2A1不與cyno CD47交叉反應並且與人類CD47相比具有一致親和性。根據上文提出之結果，與本文所揭示之抗體相比，在Raji及石蟹獼猴B細胞上B6H12對細胞表面CD47均具有較低親和性。

實例7

嵌合抗體產生

【0245】為識別鼠類2A1抗體之重鏈(VH)及輕鏈(VL)之可變區序列，核醣核酸(RNA)從融合瘤分離並且

用於逆相轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR) (Phusion RT-PCR Kit Thermo Scientific)中以產生第一鏈cDNA。覆蓋VH及VL二者之抗體前導序列之鼠類之全部功能的變質引子組係用於PCR中，其中第一鏈cDNA用作模版。

【0246】 正向引子(鼠類IgG前導)提供為VH1-1 (SEQ ID NO:82); VH1-2 (SEQ ID NO:83); VH1-3 (SEQ ID NO:84); VH1-4 (SEQ ID NO:85); VH1-5 (SEQ ID NO:86); VH1-6 (SEQ ID NO:87); VH1-7 (SEQ ID NO:88); VH1-8 (SEQ ID NO:89); VH1-9 (SEQ ID NO:90); VH1-10 (SEQ ID NO:91); VH1-11 (SEQ ID NO:92); VH1-12 (SEQ ID NO:93); VH1-13 (SEQ ID NO:94); VH1-14 (SEQ ID NO:95); VH1-15 (SEQ ID NO:96); VH2-1 (SEQ ID NO:97); VH2-2 (SEQ ID NO:98); VH3-1 (SEQ ID NO:99); VH3-2 (SEQ ID NO:100); VH4 (SEQ ID NO:101); VH5-1 (SEQ ID NO:102); VH5-2 (SEQ ID NO:103); VH6 (SEQ ID NO:104); VH7-1 (SEQ ID NO:105); VH7-2 (SEQ ID NO:106); VH8 (SEQ ID NO:107); VH9 (SEQ ID NO:108); VH10 (SEQ ID NO:109); VH11 (SEQ ID NO:110); VH12 (SEQ ID NO:111); VH14 (SEQ ID NO:112); VH15 (SEQ ID NO:113)，其中全部SEQ ID參考係如揭示於美國

專 利 申 請 案 系 列 號 第 13/960,136 號 (公 開 案 第 US20140140989 號) 。

【0247】 反 向 引 子 (鼠 類 IgG 恆 定) 提 供 為 HC-rev (SEQ ID NO:114, 如 揭 示 於 美 國 專 利 申 請 案 系 列 號 第 13/960,136 號 (公 開 案 第 US20140140989 號)) 。

【0248】 正 向 引 子 (鼠 類 Igκ 前 導 序 列) 提 供 為 VK1-1 (SEQ ID NO:115) ; VK1-2 (SEQ ID NO:116) ; VK2 (SEQ ID NO:117) ; VK4/5-1 (SEQ ID NO:118) ; VK4/5-2 (SEQ ID NO:119) ; VK8-1 (SEQ ID NO:120) ; VK8-2 (SEQ ID NO:121) ; VK9A/9B-1 (SEQ ID NO:122) ; VK9A/9B-2 (SEQ ID NO:123) ; VK10 (SEQ ID NO:124) ; VK11 (SEQ ID NO:125) ; VK12/13-1 (SEQ ID NO:126) ; VK12/13-2 (SEQ ID NO:127) ; VK12/13-3 (SEQ ID NO:128) ; VK12/13-4 (SEQ ID NO:129) ; VK12/13-5 (SEQ ID NO:130) ; VK19/28-1 (SEQ ID NO:131) ; VK19/28-2 (SEQ ID NO:132) ; VK19/28-3 (SEQ ID NO:133) ; VK20 (SEQ ID NO:134) ; VK21-1 (SEQ ID NO:135) ; VK21-2 (SEQ ID NO:136) ; VK22-1 (SEQ ID NO:137) ; VK22-2 (SEQ ID NO:138) ; VK23 (SEQ ID NO:139) ; VK24/25-1 (SEQ ID NO:140) ; VK24/25-2 (SEQ ID NO:141) ; VK32 (SEQ ID NO:142) ; VK33/34 (SEQ ID NO:143) ;

VK31/38C (SEQ ID NO:144) VKRF (SEQ ID NO:145), 其中全部SEQ ID參考係如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)。

【0249】 反向引子(鼠類gκ恆定)提供為LC-rev (SEQ ID NO:146, 如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))。

【0250】 擴增之VH及VL隨後經同框(in-frame)選殖為分別含有適當抗體分泌序列及人類IgG1及Igκ恆定區的載體以產生鼠類:人類嵌合DNA構建體。此等構建體共同轉染至293Freestyle細胞(Life Technologies)中並且所得抗體藉由蛋白質A層析法從細胞培養上澄液純化。為確定已識別正確VH及VL序列, 嵌合2A1(指示2A1-xi)與鼠類親本2A1抗體比較及在Raji細胞上藉由流式細胞儀CD47結合分析(第6圖, 如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))。在此分析中B6H12亦作為陽性對照包括在內。結合之2A1-xi使用FITC共軛之抗人類IgG二次抗體偵測。結合之2A1及B6H12使用FITC共軛之抗小鼠IgG二次抗體偵測。明顯親和性藉由於各種抗體濃度中間螢光強度之非線性擬合(Prism Graphpad Software)確定(表2, 如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))。2A1-xi抗體具有對細胞表面

C D 4 7 的與鼠類 2 A 1 相似之結合親和性，說明已適當識別 V H 及 V L 序列。

實例 8

抗體人源化

【0251】 當投予人類患者時，鼠類 2 A 1 C D 4 7 抗體經人源化以減少免疫原性之可能。在 I M G T 資料庫中 2 A 1 之 V H 及 V L 區之序列與人類抗體序列相比。隨後，使用在蛋白質資料庫 (P r o t e i n D a t a B a n k ; P D B) 中最緊密相關之人源化及人類抗體的已知結構產生 2 A 1 V H 及 V L 區之結構模型。3 個互補決定區 (C D R) 在 2 A 1 抗體之重鏈及輕鏈二者中固定並且利用數個具有維持 C D R 適當取向之最高可能性的人類架構替代鼠類架構。對應於各個人源化 2 A 1 變異構建體藉由基因合成產生並同框選殖為含有適當分泌序列及人類 I g G 1 和 I g κ 恆定區的受體。人源化重鏈及輕鏈之各種組合共同轉染至 2 9 3 F r e e s t y l e 細胞 (生命技術) 中，並且所得抗體藉由蛋白質 A 層析法從細胞培養上澄液純化。

【0252】 藉由流式細胞儀測試人源化抗體結合 R a j i 細胞之能力 (第 7 圖，如揭示於美國專利申請案系列號第 1 3 / 9 6 0 , 1 3 6 號 (公開案第 U S 2 0 1 4 0 1 4 0 9 8 9 號)) 。在大部分此等分析中 2 A 1 - x i 抗體用作對照以設定用於結合親和性之基準。人源化抗體經進一步優化以增強表現並減少包括可能異構化及脫醯胺位點的有問題之位點。源自鼠類 2 A 1 抗體之經優化之人源化抗體的實例指示為

AB6.12 抗體，其呈現與 2A1-xi 抗體非常相似之結合親和性（第 7H 圖；表 3，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 US20140140989 號））。明顯親和性藉由於各抗體濃度下中間螢光強度之非線性擬合 (Prism Graphpad Software) 來確定。

【0253】 AB6.12 抗體隨後藉由替代重鏈之恆定域從 IgG1 轉化為其他人類 IgG 同型。如第 7I 圖所示，將 IgG 同型改變為 IgG4 之鉸鏈穩定版本 (IgG4P:S228P) 及鉸鏈穩定 IgG4 之減少 Fc 受體結合變異 (IgG4PE:S228P/L235E) 不改變人源化抗體對細胞表面 CD47 之結合親和性（第 7I 圖；表 4，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 US20140140989 號））。明顯親和性藉由於各抗體濃度中間螢光強度之非線性擬合 (Prism Graphpad Software) 來確定。

【0254】 在整個人源化過程中，測試 CD47 抗體以確保 SIRP α 阻斷功能係完整的。如第 7J 圖所示，人源化抗體之多個 IgG 同型 (AB6.12) 使用上文在實例 3 中所描述之基於流式細胞儀的方法阻斷 SIRP α :CD47 相互作用。例示性 CD47 抗體及其對應 VH 區及 VL 區包括表 1 中提供之彼等，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 US20140140989 號）。

【0255】 在人源化過程期間，決定在一些實施例中，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案

第 US 20140140989 號) ， 於 VH CDR3 (SEQ ID NO:52 或 SEQ ID NO:77 開始處之胺基酸序列基元「NA」對結合本文所述之 CD47 抗體而言係重要的。在一些實施例中，在於 VH CDR3 (SEQ ID NO:52 或 SEQ ID NO:77，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號 (公開案第 US 20140140989 號)) 開始處缺乏胺基酸殘基「NA」時，本文所揭示之 CD47 抗體不結合其靶或與在存在胺基酸殘基「NA」時相比以較低親和性結合至其靶。例如，當「NA」基元變為更標準基元 (canonical motif)「AR」或「AT」時，結合大體上減少 (亦即，大於十倍)。在其他實施例中，在於 VH CDR3 (SEQ ID NO:52 或 SEQ ID NO:77，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號 (公開案第 US 20140140989 號)) 開始處缺乏胺基酸殘基「NA」時，本文所揭示之 CD 抗體與在存在胺基酸殘基「NA」時結合相比以相等親和性結合至其靶。

【0256】 熟習該項技術者應認識到可能決定 (無需過多實驗) 在本文所揭示之 CD47 抗體之序列中胺基酸取代是否產生具有大體上相同功能之抗體，例如，具有阻斷 SIRP α 並且不導致顯著程度之血球凝集及 / 或血小板耗盡之能力的 CD47 抗體。

【0257】 來自經由 superdex 200 管柱使用 AKTA FPLC 的粒徑排阻層析法之軌跡影像在第 8A 圖中圖示。圖示 AB6.12 抗體之 IgG1、IgG4P、及 IgGPE 變異。全

部三種變異係超過98%單體的。如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號），第8B圖係在還原(reducing; R)及非還原(non-reducing; NR)條件下2A1之數個人源化變異的考馬斯藍染色之SDS-PAGE凝膠的照片。

實例9

CD47抗體促進腫瘤細胞系之吞噬作用

【0258】 CD47係細胞表面受體，其在腫瘤細胞上上調並且亦被認為經由其與其天然配體SIRP α 之相互作用有助於免疫逃避。在巨噬細胞上CD47與SIRP α 之結合導致降低之吞噬活性。如下文詳細描述，確定在存在人類巨噬細胞時2A1抗體及其變異之CD47結合及SIRP α 阻斷活性是否促進腫瘤細胞吞噬作用。

【0259】 PBMC從人類血液中分離，並且單核細胞藉由在AIM-V培養基（Life Technologies）中培育其等7天而分化為巨噬細胞。此等單核細胞衍生之巨噬細胞(monocyte derived macrophage; MDM)變得黏著的以允許洗掉其他細胞。MDM經刮取並且重新鋪在12孔盤中並且允許黏附24小時。人類腫瘤細胞系CCRF-CEM經選擇為靶細胞類型，由於其高CD47表現。CCRF-CEM細胞利用0.3 μ M CFSE於37 $^{\circ}$ C標記15分鐘，隨後經洗滌並以每巨噬細胞之腫瘤細胞(tumor cells per phagocyte)為4:1之比例添加至MDM，並且CD47抗體於各濃度添加。允許吞噬靶細胞3小時。隨

後，利用PBS洗滌掉未吞噬之靶細胞。剩餘吞噬細胞刮掉，利用抗體染色為共軛至DyLight 649 (Biolegend)的巨噬細胞標記物CD14，並且藉由流式細胞儀分析。吞噬作用藉由門控為FL4陽性(CD14+)的活細胞來量測，並且隨後評估FL1(CFSE+)陽性細胞之百分數。

【0260】如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)，第9圖圖示CD47抗體2A1及其人源化變異說明在MDM吞噬腫瘤細胞時的劑量依賴增加。抗體2A1及人源化變異AB2.05在其於66.7 pM誘導吞噬腫瘤細胞的能力方面係獨特的，而B6H12於彼濃度不具有活性，(第9A圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))。如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)，第9B圖圖示了2A1及人源化變異體AB2.05、AB6.12-IgG1、AB6.12-IgG4P、及AB6.12-IgG4PE如何於0.3 µg/ml或2 nM全部誘發最大吞噬作用，而B6H12需要較高濃度。此資料說明CD47抗體，2A1(及源自該抗體之人源化變異)誘發巨噬細胞介導之吞噬CD47陽性腫瘤細胞。在此實例中，CCFR-CEM細胞用作CD47陽性靶細胞。

實例10

CD47抗體之抗腫瘤活性

【0261】 鼠類CD47抗體之抗腫瘤活性在淋巴瘤之Raji模型中評估。Raji細胞皮下植入NOD/SCID小鼠中，並且隨機分為5組（10只小鼠每組，第0天）。第1組：媒劑（僅緩衝液）；第2組：B6H12（陽性對照）；第3組：1B4；第4組：2A1；以及第5組：9E4。當腫瘤係可觸的（ 50 mm^3 ，第13天）開始利用各個抗體或媒劑（僅緩衝液）之處理並且當其腫瘤體積達到 $\sim 1500\text{ mm}^3$ 時對小鼠實施安樂死。腫瘤體積每週量測3次。靜脈內（intravenously; IV）給藥抗體， $200\text{ }\mu\text{g}$ ，每週3次，持續3週（每隻小鼠共9次給藥）。處理在第13天開始並在第32天結束，

【0262】 如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號），如第10A圖所示，本文所揭示之CD47抗體，特定言之2A1抗體，說明在此淋巴瘤動物模型中的抗腫瘤活性。為達到 1500 mm^3 之腫瘤體積，第1組（僅媒劑）需要 ~ 25 天；第2組（B6H12.2）需要 ~ 45 天；第3組（1B4）需要 ~ 37 天；第4組（2A1）需要 ~ 85 天；以及第5組（9E4）需要 ~ 40 天以達到腫瘤體積 $\sim 1500\text{ mm}^3$ 。此等資料指示與包括B6H12的測試之全部CD47結合抗體相比，抗體2A1顯著更為有效，已知B6H12結合CD47，阻斷CD47與SIRP α 相互作用，並且在人類癌症小鼠模型中抑制腫瘤形成。出乎意料的是，此等CD47抗體之腫瘤抑制活性與

其等結合CD47或阻斷CD47與SIRP α 之相互作用的功效不相關，正如基於公開之資料所預期。

【0263】如實例2及實例3所描述，2A1、1B4、及9E4具有對CD47之相似親和性及阻斷CD47與SIRP α 相互作用之相似功效。此外，2A1之增強功效不可由所述抗體之Fc結構域的差異解釋，由於在此研究中使用之全部抗體係由一致小鼠IgG1結構域構成。因此，除物質之獨特組成之外，該2A1抗體具有出乎意料及獨特之特性，包括不能誘發在CD47表現細胞（例如，紅血球）之間的同型相互作用及不可由增強之結合至CD47或增強之阻斷CD47與SIRP α 之相互作用的能力解釋的增強之腫瘤抑制活性。

【0264】為確認人源化2A1抗體維持其抗腫瘤活性，進行相似Raji腫瘤研究。該研究設計係與上文所述者相同。Raji細胞在NOD/SCID小鼠中皮下植入並隨機分為5組（10隻小鼠每組，第0天）。在此研究中，抗體腹膜內(intraperitoneal; IP)給藥200 μ g，每週3次，持續3週（每隻小鼠共9次給藥），並且每週量測腫瘤體積3次。然而，針對此研究，小鼠IgG1 2A1抗體（第2組）與人源化衍生物AB6.12相比。針對此研究，將AB6.12（如在實例8中描述）構建至人類IgG1（第3組）、人類IgG4P（第4組）及人類IgG4PE（第4組）中。因此，此實驗經設計以解決2A1人源化對其腫瘤抑制活性之影響及Fc結構域效應子功能的可能原理，該效應子功能在

本領域中已知有助於眾多抗體之抗腫瘤活性。已經充分記載與人類IgG4P相比，人類IgG1具有顯著更多之效應子功能。IgG4PE經研發以進一步減少效應子功能。如可參看第10B圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號），2A1之人源化不降低2A1之抗腫瘤活性，並且實際上可增強該抗腫瘤活性。AB6.12-hIgG1、AB6.12-hIgG4P、及AB6.12-hIgG4PE全部顯示呈現顯著高於小鼠2A1(2A1mIgG)的相似抗腫瘤活性。此結果係出乎意料的，由於2A1mIgG1、AB6.12-hIgG1、AB6.12-hIgG4P及AB6.12-hIgG4PE具有相似CD47結合及SIRP α 阻斷活性。此外，由於AB6.12-hIgG1、AB6.12-hIgG4P及AB6.12-hIgG4PE具有相似抗腫瘤活性，顯然效應子功能具有在人源化之2A1抗體AB6.12之功效方面重要作用。

實例 11

CD47抗體與CD47之共同結晶

【0265】 CD47係具有於6位點高度醮化之單個細胞外IgV（免疫球蛋白類可變型）結構域的5通跨膜蛋白（5 pass transmembrane protein）。CD47-IgV結構域之結構已經與其天然配體SIRP α 之IgV結構域複合地分辨（蛋白質資料庫(PDB)參考號2JJS；Hatherley等人，2008 Mol Cell, 25；31(2): 266-77 (FIG.

11A))。該結構顯示在包括CD47之N末端焦麩胺酸的頂端抗原決定基上SIRP α -IgV結合至CD47-IgV。此結構充分解釋了細胞表面跨膜蛋白質可如何在頭部至頭部取向中有效地與相鄰細胞相互作用。在與B6H12 Fab複合之CD47-IgV之X射線結晶結構在第11B圖中存在，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)。出於簡明目的，Fab之恆定區(CH1及CL)在圖中省略，並且僅存在Fv(VH及VL)。此揭示了將此抗體置於極度遠離細胞膜之表面上的頂端結合位點(第11B圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))。由B6H12阻斷SIRP α 之機制從此結構顯而易見。細胞膜之取向目的相對位置在第11圖中描繪為虛線，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號)。

【0266】為決定本文所揭示之抗體之靶抗原決定基，決定CD47-IgV結構域與2A1-xi之Fab(具有人類CH1及CL結構域之嵌合抗體)的共同複合物之X射線結晶結構(第11C圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第US20140140989號))。出於簡明目的，Fab之恆定區(CH1及CL)在圖中省略，並且僅存在Fv(VH及VL)。不似先前在頭部至頭部取向中確定之結合SIRP α 之CD47結構(第11A圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號(公開案第

US 20140140989 號))，並且該 B6H12 抗體遠離膜頂端放置（第 11B 圖，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 US 20140140989 號）），與 D47 複合之 2A1 之結構揭示了抗體以出乎意料及獨特頭部至側面取向在膜附近結合至 CD47（第 11C 圖，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 US 20140140989 號））。在 CD47 上之 2A1 抗原決定基係不連續的，並且當根據 SEQ ID NO:147（亦即，SEQ ID NO:48，不包括信號序列（胺基酸 1-18））編號時，包括 CD47 之殘基 Y37、K39、K41、KGRD（SEQ ID NO:56）迴圈（殘基 43-46）、D51、H90、N93、E97、T99、E104、及 E106。結合至 CD47 之 2A1 結構亦揭示了 VH 主要涉及結合至 CD47 之 KGRD（SEQ ID NO:56）迴圈，而 VK 結構域與包括 Y37、T102、及 E104 之頂端殘基相互作用，其涉及 SIRP α 結合 - 全部 SEQ ID 參考係如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號（公開案第 US 20140140989 號）。由此，主要係 VK 結構域實體上避免 SIRP α 結合至 CD47。此等結構研究建議 2A1 結合之獨特抗原決定基係在 CD47 之側面上。與在本領域中已知之 CD47 抗體相反，在膜近軸位置中 2A1 VH 區之取向係此抗體之關鍵特徵，其藉由限制抗體使得其不能橋接至在相鄰細胞上之 CD47 抗體來防止顯著程度之紅血球血球凝集。

實例 12

同型及同型突變對血小板耗盡之影響

【0267】 用於靶細胞消除的抗體（例如，CD47抗體）之主要Fc依賴功能係藉由將C1q結合至Fc區引發之互補依賴細胞毒性(CDC)；藉由Fc區與Fc γ 受體(Fc γ R)（在免疫效應子細胞（例如，NK細胞及嗜中性粒細胞）上之主要為Fc γ RIIIa）相互作用介導之抗體依賴細胞毒性(ADCC)；以及經由Fc γ RI識別調節之靶細胞而由巨噬細胞進行的抗體依賴細胞吞噬作用(ADCP)。抗體亞型在其調節Fc依賴效應子活性之能力方面具有差異。在人類中，IgG1及IgG3亞型具有針對CDC之高功效，歸因於結合C1q。此外，IgG1亞型具有針對Fc γ Rs之最高親和性，並且藉以就ADCC及Fc依賴之ADCP而言係最為有效的。IgG4亞型沒有C1q結合能力並且具有大幅度降低之Fc γ R結合親和性並且藉以具有顯著減少之效應子功能。

【0268】 研究結合CD47之抗體對血小板耗盡之影響。與當投予媒劑時不顯著血小板耗盡相比（第12A圖至第12B圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第US20140140989號）），利用單一劑量之結合至CD47的IgG1亞型抗體處理石蟹獼猴於全部測試劑量（10、30、100 mg/kg）導致顯著血小板耗盡（第12C圖至第12D圖，如揭示於美國專利申請案系列號第13/960,136號（公開案第

US 20140140989 號))。因此，結合 CD47 之 IgG1 亞型之抗體可以 Fc 依賴方式導致血小板耗盡。

【0269】 為確定不同亞型抗體是否亦導致血小板耗盡，利用 IgG4 亞型之 CD47 抗體重複該實驗。結合 CD47 之抗體之 IgG4 亞型 (IgG4P，具有突變體 S228P 以穩定抗體之鉸鏈區) 亦於全部測試濃度導致血小板耗盡，儘管相對於 IgG1 亞型版本處於較低程度 (第 12E 圖至第 12F 圖，如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號 (公開案第 US 20140140989 號))。接著，針對血小板耗盡測試抗-CD47 抗體之 IgG4 亞型之突變體形式 (IgG4PE，具有 S228P 突變體以及 L235E 突變體以減少 Fc γ R 結合) (如揭示於美國專利申請案系列號第 13/960,136 號 (公開案第 US 20140140989 號))。令人驚訝地，IgG4PE 抗體不導致血小板耗盡，甚至於非常高 (100 mg/kg) 劑量。因此，具有嚴重減少之 Fc γ R 結合及效應子功能的 CD47 結合抗體不導致血小板耗盡。

實例 13

CD47 抗體之紅血球 (RBC) 耗盡活性

【0270】 Weiskopf 等人發現當結合小鼠 CD47 之 CD47 抗體或涉及親和性之 SIRP α -Fc 融合蛋白經投予小鼠及/或石蟹獼猴時，觀察到紅血球損失及經閉。參看 Weiskopf 等人，Engineered SIRP α Variants as Immunotherapeutic Adjuvants to Anticancer Antibodies; Science 2013; 341:88)。在本文所提

及之發明之前，阻斷SIRP α 並且含有Fc結構域的全部已知CD47結合分子（例如，CD47抗體及重組SIRP α -Fc融合蛋白）亦誘發RBC耗盡。

【0271】 進行實驗以確定本文所揭示之SIRP α 阻斷未血球凝集之CD47抗體對體內紅血球耗盡之影響。令人驚訝地，在投藥之後，本文所揭示之未血球凝集之CD47抗體不導致顯著紅血球耗盡。特別地，經由靜脈注射將劑量10、30、及100 mg/kg的AB06.12抗體之IgG4-P及IgG4-PE變異給予石蟹獼猴。針對各個抗體每種劑量組使用三隻猴子。隨時間推移監控紅血球計數並且與經媒劑處理之猴子相比。第13圖描繪了來自經抗體治療之猴子的平均RBC計數，該計數經標準化為經媒劑處理之猴子的平均RBC計數。與經媒劑處理之動物相比，觀察到在經抗體處理之猴子中無顯著RBC耗盡，說明未血球凝集之CD47可於高劑量投予並且在受試者中不誘發經閉。

實例 14

CD47與TSP-1競爭研究

【0272】 進行實驗以表徵測試CD47抗體結合之特異性。CD47除其他蛋白質外可與SIRP α 和TSP-1反相互作用並且此等實驗程式確定測試抗體是否可干擾CD47與一或兩個配體之結合。使用稱為表面電將共振(Biacore)之生物化學平臺，評估重組CD47及TSP-1蛋白質之結合動力學。首先，建立在CD47細胞外結構域(extracellular domain; ECD)與TSP-1之間的結

合；隨後，引入測試抗以評估其破壞CD47-TSP-1相互作用之能力。結果說明測試抗體不阻斷CD47-ECDC結合至TSP1。

【0273】亦進行進一步細胞實驗以藉由詢問TSP-1是否與測試抗體針對結合至CD47競爭來評估測試抗體相互作用之特異性。用於此研究之材料包括：

- CCRF-CEM 腫瘤細胞系
- 抗CD47測試抗體：0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 抗CD47-1A2抗體IgG2，小鼠骨架：0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$
(LifeSpan Bioscience # LS-C188327)
- 抗CD47-2D3抗體IgG1，小鼠骨架：0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$
(eBioscience # 140479)
- 抗CD47-B6H12抗體IgG1，小鼠骨架：0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$
(eBioscience # 140478)
- 重組TSP-1：TSP-1：0.01、0.03、0.1、0.3、1，
3、10、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (R&D # 3074-TH-50)
- IgG同型對照(Eureka)
- 山羊抗人類IgG(H+L)二次抗體，Alexa Fluor®
647共軛物(Lifetechnologies # A-21445)

【0274】細胞在完全RPMI1640+10% FBS中培養，收集細胞並利用冷1×PBS洗滌。將其等於 2×10^6 細胞/ mL 重新懸浮在FACS緩衝液(1% BSA，1×PBS)中，並將50 μL (100K細胞/孔)添加至U型底板之各個孔。將TSP-1稀釋在FACS緩衝液中，在冰上與CCRF-CEM

一起培育1小時。添加CD47抗體並在冰上培育細胞又一小時，接著數次冷 $1\times$ PBS洗滌。將 $100\text{ }\mu\text{L}$ /孔二次Ab($10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$)添加至適當孔中並在黑暗中於冰上培育30分鐘。細胞經洗滌，重新懸浮在FACS緩衝液中並藉由FACS分析(10,000次事件)。

【0275】 於1:600之Ab:TSP-1比評估CD47抗體、測試抗體、CD47-1A4、及CD47-B6H12，其中該抗體於 0.02 或 $0.05\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在並且TSP-1於 0.01 、 0.03 、 0.1 、 0.3 、 1 、 3 、 10 、 $30\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加。結果(參看在本文中上文所揭示之第1A圖至第1B圖)揭示了TSP-1不與結合至CD47的測試抗體競爭，儘管其與結合至CD47的其他CD47抗體競爭，B6H12($\sim 80\%$)、2D3($\sim 40\%$)及1A2($\sim 50\%$)。

實例 15

癌症幹細胞CD47表現及抗CD47功效

【0276】 使用MCF7乳腺癌細胞系進行實驗以檢查在癌症幹細胞(cancer stem cell; CSC)與CD47之間的關係，特定言之解決更多類幹細胞群體是否表現較高水平之CD47及經抗CD47抗體處理是否優先賦予癌症幹細胞存活率。該研究採用ER+/PR+/Her-2+MCF7乳腺癌細胞系，作為單層並且在3D培養物中培養以誘發形成壓實緊密結合之乳腺球，進而可能誘發更多類幹細胞特性。針對單層培養，實驗方案涉及於 37°C ， $5\%\text{ CO}_2$ 培育，其中在培養基(EMEM， 10% 胎牛血清， 1% 非必需胺基酸)

中於 $20,000$ 個細胞 / cm^2 之接種密度持續 4 天，允許細胞黏附至 6 孔板之表面。針對乳腺球培養基，細胞在完全 *Mammocult* 培養基中於 $40,000$ 個細胞 / 孔之接種密度在超低黏著性之 6 孔板上生長 7 天。

【0277】 根據以下方案處理細胞並且各處理進行四次。以下處理組在單層及乳腺球培養物二者中評估：對照 - 無抗體；抗 CD47 抗體 B6H12， $-2.5 \mu\text{g/ml}$ 在培養物的第 1 天及第 3 天；抗 CD47 測試抗體， $-2.5 \mu\text{g/ml}$ ，在培養物的第 1 天及第 3 天。評估乳腺球計數及細胞存活率（僅乳腺球培養基）、細胞 *titerglo* 細胞生長及存活率、如由從完整孔提取之 *mRNA* 所決定的 CD47 基因表現；JAG1 之幹細胞標記物基因表現分析，以及如由針對存在 ALDH 及細胞而染色之細胞所決定的幹細胞流動標記物。

【0278】 此研究揭示了與在單層培養基中之細胞相比，針對表現顯著較高水平之 JAG1 之 CSC、幹細胞標記物、及 CD47 而言，在乳腺球培養基中富集 MCF-7 乳腺癌細胞，建議 CD47 可在癌症幹細胞中上調。腫瘤細胞生長在乳腺球培養基中稍微由 B6H12 抑制並且在經測試 CD47 抗體處理之乳腺球培養基中非常適度地抑制。CD47 表現在單層中及在經 B6H12 或測試 CD47 抗體處理之乳腺球培養基中下調。JAG1（幹細胞標記物基因）之表現亦在經測試 CD47 抗體處理之培養基中下調。總而言之，來自此研究之發現（參看上文第 2A 圖至第 2D 圖）建議 CD47 可在癌症幹細胞群體中上調並且阻斷 CD47

可導致減慢生長及維持 CSC。抑制 CD47 可用於研發對具有基本癌症幹細胞群體的乳腺及其他癌症之治療。其他細胞系及主要細胞樣本之進一步研究將揭示此發現是否延伸出乳腺癌外至其他固態腫瘤或血液科惡性疾病。

【符號說明】

【 0 2 7 9 】

無

【生物材料寄存】

【 0 2 8 0 】 國內寄存資訊 (請依寄存機構、日期、號碼順序註記)

無

【 0 2 8 1 】 國外寄存資訊 (請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記)

無



201741340

申請日: 106/05/09

【發明摘要】

IPC分類: **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【中文發明名稱】CD47抗體及使用其之方法

【英文發明名稱】CD47 ANTIBODIES AND METHODS OF USE THEREOF

【中文】

本發明提供了特異性抑制在CD47與CD47-信號調節蛋白 α (SIRP α)之間的相互作用而不抑制在CD47與血小板反應素-1 (TSP-1)之間的相互作用的CD47抗體，以及使用此等單株抗體作為治療劑之方法。

【英文】

CD47 antibodies that specifically inhibit the interaction between CD47 and the CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP α) but not the interaction between CD47 and thrombospondin-1 (TSP-1), and methods of using these monoclonal antibodies as therapeutics are provided.

【指定代表圖】第(1A)圖。

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明申請專利範圍】

- 【第1項】 一種結合至 CD47 之分離的單株抗體或其免疫學活性片段，其中該抗體抑制在 CD47 與 SIRP α 之間的相互作用但不抑制在 CD47 與 TSP-1 之間的相互作用。
- 【第2項】 一種緩解癌症或其他腫瘤病之症狀的方法，該方法包括以下步驟：以足以降低有需要的受試者之 JAG1 表現的量向該受試者投予如請求項 1 所述之抗體或其免疫學活性片段。
- 【第3項】 如請求項 2 所述之方法，其中該受試者係人類。
- 【第4項】 如請求項 2 所述之方法，其中該抗體係嵌合、人源化、或全人源的。
- 【第5項】 如請求項 2 所述之方法，其中該 CD47 係人類 CD47。
- 【第6項】 如請求項 2 所述之方法，其中該抗體或其免疫學活性片段係選自由 IgG1 同型、IgG2 同型、IgG3 同型、及 IgG4 同型組成之群組的 IgG 同型。
- 【第7項】 如請求項 2 所述之方法，其中該抗體或其免疫學活性片段係選自 IgG4P 及 IgG4PE 的 IgG 同型。
- 【第8項】 如請求項 2 所述之方法，其中該癌症係乳腺

癌。

【第9項】如請求項2所述之方法，其中該癌症係急性骨髓白血病。

