



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I831759 B

(45) 公告日：中華民國 113 (2024) 年 02 月 11 日

(21) 申請案號：107142777

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 11 月 29 日

(51) Int. Cl. :

*C07K16/24 (2006.01)**C12N15/13 (2006.01)**C12N15/63 (2006.01)**C12P21/08 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30) 優先權：2017/12/01 美國

62/593,712

(71) 申請人：美商思進公司 (美國) SEAGEN INC. (US)

美國

(72) 發明人：佳黛 席拉 GARDAL, SHYRA (US)；利文格 馬修 LEVENGOOD, MATTHEW (US)；莊 友雲 TRANG, VIVIAN (US)；維思登朵芙 蘿莉 WESTENDORF, LORI (US)；卡洛西諾 克里斯多夫 CAROSINO, CHRISTOPHER (US)；菲爾德豪斯 邁可 FELDHAUS, MICHAEL (US)；羅 智良 LAW, CHE-LEUNG (US)

(74) 代理人：陳長文；張哲倫；張雅雯

(56) 參考文獻：

US 2013/0142786A1

US 2017/0002082A1

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：67 項 圖式數：47 共 269 頁

(54) 名稱

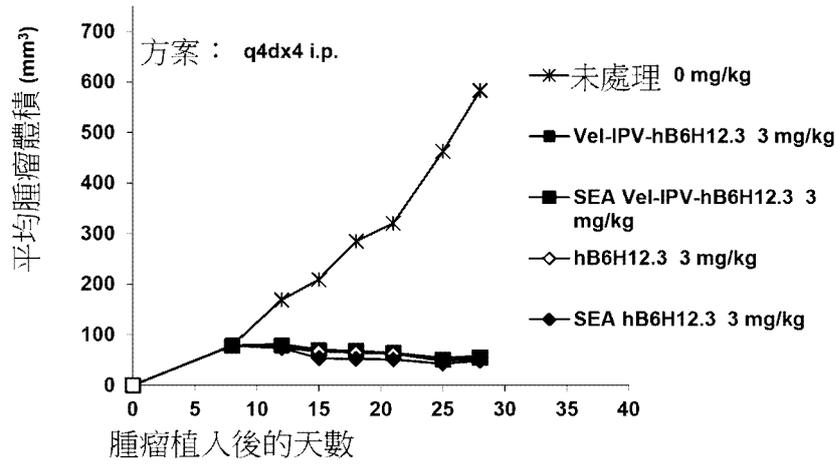
CD47 抗體及其用於治療癌症之用途

(57) 摘要

本發明提供人類化抗體，包括特異性結合至 CD47 之經掩蔽之抗體。提供使用抗-CD47 抗體(包括經掩蔽之抗體)以調節 CD47 表現細胞之活性(例如，抑制 CD47 表現細胞之增殖)之方法以及用於治療與 CD47 表現細胞有關的一或多種疾病或病症(例如癌症)之方法。

Humanized antibodies, including masked antibodies that specifically bind to CD47 are provided. Methods for using anti-CD47 antibodies, including masked antibodies, to modulate activity of (e.g., inhibit proliferation of) a CD47-expressing cell, as well as for the treatment of one or more diseases or disorders (e.g., cancer) associated with CD47-expressing cells, are provided.

指定代表圖：

Detroit562模型中SEA靶向
抗-CD47 mAb之抗腫瘤活性

【圖40A】



公告本

I831759

【發明摘要】

【中文發明名稱】

CD47抗體及其用於治療癌症之用途

【英文發明名稱】

CD47 ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING
CANCER

【中文】

本發明提供人類化抗體，包括特異性結合至CD47之經掩蔽之抗體。提供使用抗-CD47抗體(包括經掩蔽之抗體)以調節CD47表現細胞之活性(例如，抑制CD47表現細胞之增殖)之方法以及用於治療與CD47表現細胞有關的一或多種疾病或病症(例如癌症)之方法。

【英文】

Humanized antibodies, including masked antibodies that specifically bind to CD47 are provided. Methods for using anti-CD47 antibodies, including masked antibodies, to modulate activity of (e.g., inhibit proliferation of) a CD47-expressing cell, as well as for the treatment of one or more diseases or disorders (e.g., cancer) associated with CD47-expressing cells, are provided.

【指定代表圖】

圖40A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

CD47抗體及其用於治療癌症之用途

【英文發明名稱】

CD47 ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING
CANCER

【技術領域】

【0001】 本發明係關於基於抗體之癌症治療領域。特別是，本發明係關於可視需要與可移去之掩蔽劑締合之新穎的人類化抗-CD47抗體及其抗原結合片段或共軛物，及其在治療CD47表現癌症中之用途。

【先前技術】

【0002】 分化簇47(CD47)(亦稱為整合素相關蛋白(IAP))為屬於免疫球蛋白超家族蛋白之跨膜受體。CD47普遍表現於細胞上且充當自體識別之標誌物，藉由充當「不吃吾(don't eat me)」訊息防止吞噬作用。CD47經與幾種其他蛋白質(包括血小板反應蛋白(TSP)及訊息調節蛋白- α (SIRP α))相互作用而介導其效應。吞噬細胞上的SIRP α 與靶細胞上的CD47間的相互作用幫助確保靶細胞不被吞沒。

【0003】 某些癌症藉由增加癌細胞的細胞表面上的CD47之表現來選擇基於CD47之免疫逃避機制，藉此避免被免疫系統清除。然而，本技術中已知的療法靶向個體標靶(癌細胞及非癌細胞)中的CD47表現細胞，此在個體中會導致毒性，諸如周邊紅血球及血小板之耗竭。因此，需要選擇性靶向癌細胞中的CD47而不靶向非癌細胞之組合物及方法。

【發明內容】

【0004】 本發明係基於新穎的人類化抗-CD47抗體及其抗原結合片段之發現。在本發明之某些態樣中，提供人類化抗-CD47抗體或其抗原結合片段，其包含防止抗-CD47抗體或其抗原結合片段結合至CD47蛋白之可移去之掩蔽劑(例如，捲曲螺旋掩蔽劑)。在某些實施例中，掩蔽劑可被存在於癌細胞環境中的一或多個分子(例如，蛋白酶)移去(例如，裂解)。移去掩蔽劑可恢復抗-CD47抗體或其抗原結合片段結合CD47之能力，藉此在癌細胞情況中使得抗-CD47抗體或其抗原結合片段特異性靶向CD47蛋白。

【0005】 在一些實施例中，提供一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，其中該重鏈可變區包括選自SEQ ID NO:16、19、21及23之HCDR1；選自SEQ ID NO:17、20、22及24之HCDR2；及SEQ ID NO:18之HCDR3；其中該輕鏈可變區包括選自SEQ ID NO:31及34之LCDR1；選自SEQ ID NO:32及35之LCDR2；及選自SEQ ID NO:33及36之LCDR3；其中該重鏈可變區包括與選自SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7及8之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性之胺基酸序列；且其中該輕鏈可變區包括與選自SEQ ID NO:10、11、12、13、14及15之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性之胺基酸序列。

【0006】 在一些實施例中，提供一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，其中該重鏈可變區包括選自SEQ ID NO:16、19、21及23之

HCDR1；選自SEQ ID NO:17、20、22及24之HCDR2；及SEQ ID NO:18之HCDR3；其中該輕鏈可變區包括選自SEQ ID NO:31及34之LCDR1；選自SEQ ID NO:32及35之LCDR2；及選自SEQ ID NO:33及36之LCDR3；其中該重鏈可變區包括：

a) 以SEQ ID NO:88描述之人類IGHV3-23/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H44、H49、H82、H89、H91及H94為供體殘基；或

b) 以SEQ ID NO:89描述之人類IGHV3-48/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H49為供體殘基；或

c) 以SEQ ID NO:90描述之人類IGHV3-66/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H29、H49及H82為供體殘基；或

d) 以SEQ ID NO:91描述之人類IGHV3-74/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H49為供體殘基；及

其中該輕鏈可變區包括：

a) 以SEQ ID NO:92描述之人類IGKV6-21/KJ2框架，其中根據Kabat編號，框架位置L4、L21、L69及L85為供體殘基；或

b) 以SEQ ID NO:93描述之人類IGKV1-27/KJ2框架，其中根據Kabat編號，框架位置L21、L49及L69為供體殘基。

【0007】 在一些實施例中，該重鏈可變區包括選自如下的HCDR1、HCDR2及HCDR3：SEQ ID NO:16、17及18；SEQ ID NO:19、20及18；SEQ ID NO:21、22及18；SEQ ID NO:16、20及18；及SEQ ID NO:23、24及18。在一些實施例中，該輕鏈可變區包括選自如下的LCDR1、LCDR2及LCDR3：SEQ ID NO:31、32及33；SEQ ID NO:31、32及36；及SEQ ID NO:34、35及33。在一些實施例中，該抗體或其抗原

結合片段包括選自如下之HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3：SEQ ID NO:16、17、18、31、32及33；SEQ ID NO:16、17、18、34、35及33；SEQ ID NO:19、20、18、31、32及33；SEQ ID NO:19、20、18、34、35及33；SEQ ID NO:21、22、18、31、32及33；SEQ ID NO:21、22、18、34、35及33；SEQ ID NO:16、20、18、31、32及33；SEQ ID NO:16、20、18、34、35及33；SEQ ID NO:23、24、18、31、32及33；SEQ ID NO:23、24、18、34、35及33；SEQ ID NO:16、17、18、31、32及36；SEQ ID NO:19、20、18、31、32及36；SEQ ID NO:21、22、18、31、32及36；16、20、18、31、32及36；及SEQ ID NO:23、24、18、31、32及36。

【0008】 在一些實施例中，提供一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，其中該重鏈可變區包括選自SEQ ID NO:25、28及29之HCDR1；選自SEQ ID NO:26及30之HCDR2；及SEQ ID NO:27之HCDR3；且其中該輕鏈可變區包括選自SEQ ID NO:37及40之LCDR1；SEQ ID NO:38之LCDR2；及選自SEQ ID NO:39及41之LCDR3；其中該重鏈可變區包括與選自SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7及8之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性之胺基酸序列；且其中該輕鏈可變區包括與選自SEQ ID NO:10、11、12、13、14及15之胺基酸序列具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性之胺基酸序列。

【0009】 在一些實施例中，提供一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈

可變區，其中該重鏈可變區包括選自SEQ ID NO:25、28及29之HCDR1；選自SEQ ID NO:26及30之HCDR2；及SEQ ID NO:27之HCDR3；且其中該輕鏈可變區包括選自SEQ ID NO:37及40之LCDR1；SEQ ID NO:38之LCDR2；及選自SEQ ID NO:39及41之LCDR3；其中該重鏈可變區包括：

a) 以SEQ ID NO:88描述之人類IGHV3-23/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H44、H49、H82、H89、H91及H94為供體殘基；或

b) 以SEQ ID NO:89描述之人類IGHV3-48/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H49為供體殘基；或

c) 以SEQ ID NO:90描述之人類IGHV3-66/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H29、H49及H82為供體殘基；或

d) 以SEQ ID NO:91描述之人類IGHV3-74/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H49為供體殘基；及

其中該輕鏈可變區包括：

a) 以SEQ ID NO:92描述之人類IGKV6-21/KJ2框架，其中根據Kabat編號，框架位置L4、L21、L69及L85為供體殘基；或

b) 以SEQ ID NO:93描述之人類IGKV1-27/KJ2框架，其中根據Kabat編號，框架位置L21、L49及L69為供體殘基。

【0010】 在一些實施例中，該重鏈可變區包括選自如下之HCDR1、HCDR2及HCDR3：SEQ ID NO:25、26及27；SEQ ID NO:28、26及27；SEQ ID NO:29、30及27；及SEQ ID NO:29、26及27。在一些實施例中，該輕鏈可變區包括選自如下之LCDR1、LCDR2及LCDR3：SEQ ID NO:37、38及39；SEQ ID NO:40、38及39；及SEQ ID NO:37、38及

41。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段包括選自如下之HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3：SEQ ID NO:25、26、27、37、38及39；SEQ ID NO:25、26、27、40、38及39；SEQ ID NO:25、26、27、37、38及41；SEQ ID NO:28、26、27、37、38及39；SEQ ID NO:28、26、27、40、38及39；SEQ ID NO:28、26、27、37、38及41；SEQ ID NO:29、30、27、37、38及39；SEQ ID NO:29、30、27、40、38及39；SEQ ID NO:29、30、27、37、38及41；SEQ ID NO:29、26、27、37、38及39；SEQ ID NO:29、26、27、40、38及39；及SEQ ID NO:29、26、27、37、38及41。

【0011】 在一些實施例中，該重鏈可變區包括選自SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7及8之胺基酸序列。在一些實施例中，該輕鏈可變區包括選自SEQ ID NO:10、11、12、13、14及15之胺基酸序列。在一些實施例中，該重鏈可變區及輕鏈可變區包括SEQ ID NO:2及10；SEQ ID NO:3及11；SEQ ID NO:3及12；SEQ ID NO:3及13；SEQ ID NO:3及14；SEQ ID NO:4及11；SEQ ID NO:4及12；SEQ ID NO:4及13；SEQ ID NO:4及14；SEQ ID NO:5及11；SEQ ID NO:5及12；SEQ ID NO:5及13；SEQ ID NO:5及14；SEQ ID NO:6及11；SEQ ID NO:6及12；SEQ ID NO:6及13；SEQ ID NO:6及14；SEQ ID NO:7及11；SEQ ID NO:7及12；SEQ ID NO:7及13；SEQ ID NO:7及14；SEQ ID NO:8及11；SEQ ID NO:8及12；SEQ ID NO:8及13；SEQ ID NO:8及14；SEQ ID NO:3及15。

【0012】 在一些實施例中，提供一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，其中該重鏈可變區包括SEQ ID NO:16之HCDR1、SEQ ID

NO:17之HCDR2及SEQ ID NO:18之HCDR3；且其中該輕鏈可變區包括SEQ ID NO:31之LCDR1、SEQ ID NO:32之LCDR2及SEQ ID NO:33之LCDR3；且其中該重鏈可變區包括與SEQ ID NO:3具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性之胺基酸序列及該輕鏈可變區包括與SEQ ID NO:13具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性之胺基酸序列；且其中該相較於Ab47，該抗體具有減少的血球凝集。在一些實施例中，該重鏈可變區包括SEQ ID NO:3之胺基酸序列且該輕鏈可變區包括SEQ ID NO:13之胺基酸序列。

【0013】 在本文所提供的人類化抗體或其抗原結合片段之一些實施例中，該重鏈可變區包括：

a) 以SEQ ID NO:88描述之人類IGHV3-23/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H44、H49、H82、H89、H91及H94為供體殘基；或

b) 以SEQ ID NO:89描述之人類IGHV3-48/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H49為供體殘基；或

c) 以SEQ ID NO:90描述之人類IGHV3-66/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H29、H49及H82為供體殘基；或

d) 以SEQ ID NO:91描述之人類IGHV3-74/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H49為供體殘基。

在一些此等實施例中，根據Kabat編號，H29為F，H44為R或G，H49為A，H82為M或I，H89為I或V，H91為F或Y，且H94為R。

【0014】 在本文所提供的人類化抗體或其抗原結合片段之一些實施例中，該輕鏈可變區包括：

a) 以SEQ ID NO:92描述之人類IGKV6-21/KJ2框架，其中根據Kabat編號，框架位置L4、L21、L69及L85為供體殘基；或

b) 以SEQ ID NO:93描述之人類IGKV1-27/KJ2框架，其中根據Kabat編號，框架位置L21、L49及L69為供體殘基。

在一些此等實施例中，根據Kabat編號L4為M，L21為L，L49為K，L69為T或S，且L85為V或T。

【0015】 在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段係IgG1同型物。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段相較於其親本抗體具有增強的抗體依賴型細胞毒性(ADCC)。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段相較於其親本抗體具有增強的抗體依賴型細胞吞噬作用(ADCP)。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段相較於其親本抗體具有增強的補體依賴型細胞毒性(CDC)。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段為Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、雙功能抗體、單鏈抗體、scFv片段或scFv-Fc。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段在體外及/或體內誘導CD47表現細胞凋亡。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段相較於其親本抗體具有減少的核心岩藻糖基化。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段為經去岩藻糖基化。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段阻斷CD47與SIRP α 的相互作用。在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段相較於Ab47具有減少的血球凝集。

【0016】 在一些實施例中，提供編碼本文所提供的抗體或抗原結合片段之核酸序列。在一些實施例中，提供包括該核酸序列之表現載體。在一些實施例中，提供包括該核酸或該表現載體之宿主細胞。在一些實施例中，提供表現本文所提供的抗體或抗原結合片段之宿主細胞。在一些實施

例中，一種生產本文所提供的抗體或抗原結合片段的方法包括培養該宿主細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括分離該抗體或其抗原結合片段。

【0017】 在一些實施例中，提供治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括對個體投與治療有效量之本文所提供的抗-CD47抗體或其抗原結合片段。

【0018】 在一些實施例中，提供治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括：

a) 識別個體為具有CD47表現癌症；及

b) 對該個體投與本治療有效之文所提供的抗-CD47抗體或其抗原結合片段。

在一些此等實施例中，步驟a)包括：

i) 分離癌組織；及

ii) 檢測所分離癌組織中的CD47。

【0019】 在一些實施例中，提供用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括：

a) 識別個體為具有癌組織相對於非癌組織升高的巨噬細胞浸潤水平；及

b) 對該個體投與治療有效量之本文所提供的抗-CD47抗體或其抗原結合片段。

在一些此等實施例中，步驟a)包括：

i) 從該個體分離癌組織及周圍非癌組織；

ii) 檢測所分離癌組織及非癌組織中的巨噬細胞；及

iii) 比較癌組織相對於非癌組織中的染色量。在一些實施例中，巨噬細胞染色係利用抗-CD163抗體進行。

【0020】 在一些實施例中，治療癌症之方法包括識別個體為具有CD47表現癌症，及癌組織相對於非癌組織升高的巨噬細胞浸潤水平。

【0021】 在一些實施例中，提供一種誘導CD47表現細胞凋亡之方法，其包括使該細胞與本文所提供的抗體或其抗原結合片段接觸。在一些實施例中，該細胞係在體外。在一些實施例中，該細胞係在體內。

【0022】 在一些實施例中，提供一種經掩蔽之抗體，其包括特異性結合至人類CD47蛋白之抗體或其抗原結合片段及至少一個掩蔽域，其中至少一個掩蔽域包括選自SEQ ID NO:44-55、75-86、94及95之胺基酸序列。在一些實施例中，提供包括本文所提供的抗體或其抗原結合片段及至少一個掩蔽域之經掩蔽之抗體。在一些實施例中，至少一個掩蔽域包括選自SEQ ID NO:44-55、75-86、94及95之胺基酸序列。

【0023】 在一些實施例中，相較於無至少一個掩蔽域的抗體或其抗原結合片段，該至少一個掩蔽域減小該抗體或抗原結合片段對人類CD47蛋白之結合親和力。在一些實施例中，相較於無至少一個掩蔽域的抗體或其抗原結合片段，該結合親和力減小至少約100倍。在一些實施例中，相較於無至少一個掩蔽域的抗體或其抗原結合片段，該結合親和力減小約200倍至約1500倍。

【0024】 在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段包括重鏈及輕鏈，其中該重鏈係連接至第一掩蔽域；或其中該輕鏈係連接至第二掩蔽域；或其中該重鏈係連接至第一掩蔽域且該輕鏈係連接至第二掩蔽域。在一些實施例中，第一掩蔽域包括選自SEQ ID NO:44、46、48、50、52、

54、75、77、79、81、83、85及94之胺基酸序列；及第二掩蔽域包括選自SEQ ID NO:45、47、49、51、53、55、76、78、80、82、84、86及95之胺基酸序列。在一些實施例中，該第一掩蔽域及第二掩蔽域為選自如下之掩蔽域對：SEQ ID NO:44及45；SEQ ID NO:46及47；SEQ ID NO:48及49；SEQ ID NO:50及51；SEQ ID NO:52及53；SEQ ID NO:54及55；SEQ ID NO:75及76；SEQ ID NO:77及78；SEQ ID NO:79及80；SEQ ID NO:81及82；SEQ ID NO:83及84；SEQ ID NO:85及86；及SEQ ID NO:94及95。在一些實施例中，該第一掩蔽域係連接至重鏈的N端及該第二掩蔽域係連接至輕鏈的N端。

【0025】 在一些實施例中，各掩蔽域包括可蛋白酶裂解之連接子且係經由該可蛋白酶裂解之連接子連接至重鏈或輕鏈。在一些實施例中，該可蛋白酶裂解之連接子包括基質金屬蛋白酶(MMP)裂解位點。在一些實施例中，該MMP裂解位點係選自MMP2裂解位點、MMP7裂解位點、MMP9裂解位點及MMP13裂解位點。在一些實施例中，於被MMP裂解後，該抗體或其抗原結合片段之重鏈及/或輕鏈包括MMP裂解位點之短胺基酸殘基(stub amino acid remnant)。在一些實施例中，該短胺基酸殘基包括在抗體之N端的序列LRSG、SG或VR。

【0026】 在一些實施例中，該抗體或其抗原結合片段為本文所提供的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，經掩蔽之抗體包括連接至第一掩蔽域且具有SEQ ID NO:42之胺基酸序列之重鏈及連接至第二掩蔽域且具有SEQ ID NO:43之胺基酸序列之輕鏈。

【0027】 在一些實施例中，提供編碼本文所提供的經掩蔽之抗體之核酸序列。在一些實施例中，提供包括該核酸之表現載體。在一些實施例

中，提供表現本文所提供的經掩蔽之抗體之宿主細胞。在一些實施例中，一種生產本文所提供的經掩蔽之抗體之方法包括培養宿主細胞。在一些實施例中，該方法進一步包括分離經掩蔽之抗體。

【0028】 在一些實施例中，提供治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括對個體投與治療有效量之本文所提供的經掩蔽之抗體。

【0029】 在一些實施例中，提供用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括：

a) 識別個體為具有癌症相對於周圍非癌組織升高的MMP水平；及

b) 對該個體投與治療有效量之本文所提供的經掩蔽之抗體，其中經掩蔽之抗體之各掩蔽域包括可蛋白酶裂解之連接子且其中該可蛋白酶裂解之連接子包括基質金屬蛋白酶(MMP)裂解位點。在一些實施例中，該MMP裂解位點係選自MMP2裂解位點、MMP7裂解位點、MMP9裂解位點及MMP13裂解位點。在一些實施例中，該MMP係選自MMP2、MMP7、MMP9及MMP13。在一些實施例中，步驟a)包括：

i) 從該個體分離癌組織及非癌組織；

ii) 檢測所分離癌組織及非癌組織中的MMP；及

iii) 比較癌組織相對於非癌組織中的染色量。

【0030】 在一些實施例中，提供用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括：

a) 識別個體為具有CD47表現癌症；及

b) 對該個體投與治療有效量之本文所提供的經掩蔽之抗體。

在一些實施例中，步驟a)包括：

i) 分離癌組織；及

ii) 檢測所分離癌組織中的CD47。

【0031】 在一些實施例中，提供用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括：

a) 識別個體為具有癌組織相對於非癌組織升高的巨噬細胞浸潤水平；及

b) 對該個體投與治療有效量之本文所提供的經掩蔽之抗體。

在一些實施例中，步驟a)包括：

i) 從個體分離癌組織及周圍非癌組織；

ii) 檢測所分離癌組織及非癌組織中的巨噬細胞；及

iii) 比較癌組織相對於非癌組織中的染色量。在一些實施例中，巨噬細胞染色係利用抗-CD163抗體進行。

【0032】 在一些實施例中，提供用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括識別個體為具有(a)癌症相對於周圍非癌組織升高的MMP水平，及(b)具有CD47表現癌症。在一些實施例中，提供用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括識別個體為具有(a)癌症相對於周圍非癌組織升高的MMP水平，及(b)相對非癌組織，於癌組織中具有提高的巨噬細胞浸潤水平。在一些實施例中，提供用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括識別個體為具有(a)CD47表現癌症，及(b)相對非癌組織，於癌組織中具有提高的巨噬細胞浸潤水平。在一些實施例中，提供用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括識別個體為具有(a)癌症相對於周圍非癌組織升高的MMP水平，(b)具有CD47表現癌症，及(c)具有癌組織相對於非癌組織升高的巨噬細胞浸潤水平。

【0033】 在一些實施例中，該經掩蔽之抗體包括至少一個掩蔽域，

其包括可蛋白酶裂解之連接子，且其中該可蛋白酶裂解之連接子係在腫瘤微環境中裂解。在一些實施例中，於腫瘤微環境中裂解可蛋白酶裂解之連接子後，該掩蔽域自抗-CD47抗體或其抗原結合片段釋放。在一些實施例中，該可蛋白酶裂解之連接子包括胺基酸序列IPVSLRSG (SEQ ID NO:73)或GPLGVR (SEQ ID NO:57)。在一些實施例中，該可蛋白酶裂解之連接子包括MMP裂解位點。在一些實施例中，該MMP裂解位點係選自MMP2裂解位點、MMP7裂解位點、MMP9裂解位點及MMP13裂解位點。在一些實施例中，於釋放抗-CD47抗體或其抗原結合片段後，抗-CD47抗體或其抗原結合片段具有可蛋白酶裂解之連接子之短胺基酸殘基。在一些實施例中，該短胺基酸殘基包括在抗體之N端的LRSG、SG或VR序列。

【0034】 在各種實施例中，該CD47表現癌症為血液癌症或實體癌症。在一些實施例中，該CD47表現癌症係選自非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、B-淋巴母細胞性淋巴瘤；B-細胞慢性淋巴球性白血病/小淋巴球性淋巴瘤、李希特氏症候群(Richter's syndrome)、濾泡性淋巴瘤、多發性骨髓瘤、骨髓纖維化、真性紅血球增多症、皮膚T細胞淋巴瘤、未知臨床意義之單株球蛋白增多症(MGUS)、脊髓發育不良症候群(MDS)、免疫母細胞性大細胞淋巴瘤、前驅B淋巴母細胞性淋巴瘤、急性骨髓性白血病(AML)及退行性大細胞淋巴瘤。在一些實施例中，該CD47表現癌症係選自肺癌、胰臟癌、乳癌、肝癌、卵巢癌、睪丸癌、腎癌、膀胱癌、脊椎癌、腦癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、結腸直腸癌、肛門癌、子宮內膜癌、食管癌、膽囊癌、胃腸癌、胃癌(gastric cancer)、癌、頭頸癌、皮膚癌、黑色素瘤、前列腺癌、垂體癌、胃癌(stomach cancer)、子

宮癌、陰道癌及甲狀腺癌。在一些實施例中，該CD47表現癌症係選自肺癌、肉瘤、結腸直腸癌、頭頸癌、卵巢癌、胰臟癌、胃癌、黑色素瘤及乳癌。

【0035】 在一些實施例中，該抗-CD47抗體或其抗原結合片段或經掩蔽之抗體係與選自如下中的一或多者之免疫檢查點分子之抑制劑組合投與：程式化細胞死亡蛋白1 (PD-1)、程式化死亡配體1 (PD-L1)、PD-L2、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA-4)、T細胞免疫球蛋白及黏蛋白域3 (TIM-3)、淋巴細胞活化基因3 (LAG-3)、癌胚抗原相關細胞黏附分子1 (CEACAM-1)、CEACAM-5、T細胞活化之V域Ig抑制因子 (VISTA)、B及T淋巴細胞衰減因子(BTLA)、具有Ig及ITIM域之T細胞免疫受體(TIGIT)、白血球相關免疫球蛋白樣受體1 (LAIR1)、CD160、2B4或TGFR。在一些實施例中，該抗-CD47抗體或其抗原結合片段或經掩蔽之抗體係與激動抗-CD40抗體組合投與。在一些實施例中，該激動抗-CD40抗體具有低的岩藻糖基化水平或係去岩藻糖基化。在一些實施例中，該抗-CD47抗體或其抗原結合片段或經掩蔽之抗體係與抗體藥物共軛物(ADC)組合投與，其中該ADC之抗體特異性結合至表現於癌細胞之細胞外表面上之蛋白質且該抗體係與包含細胞毒性劑之藥物-連接子共軛。在一些實施例中，該細胞毒性劑為奧瑞司他汀(auristatin)。在一些實施例中，ADC之抗體係與選自vcMMAE及mcMMAF之藥物-連接子共軛。

【0036】 在一些實施例中，該抗-CD47抗體或其抗原結合片段或該經掩蔽之抗體之抗-CD47抗體或其抗原結合片段相較於其親本抗-CD47抗體於體外展現減少的血球凝集。在一些實施例中，該親本抗體為Ab47。在一些實施例中，抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體之投與並不誘導個體的血

球凝集。在一些實施例中，該抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體於體外及/或體內誘導CD47表現細胞凋亡。在一些實施例中，該抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體在體內誘導CD47表現細胞凋亡。在一些實施例中，該等CD47表現細胞係癌細胞。

【0037】 在一個態樣中，提供一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，該重鏈可變區包括以SEQ ID NO:16 (GYGMS)、17 (TITSGGTYTYYPDSVKG)及18 (SLAGNAMDY)描述之CDR及以SEQ ID NO:88[圖1A]描述之人類IGHV3-23/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H44、H49、H82、H89、H91及H94為供體殘基。

【0038】 在另一個態樣中，提供一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，該重鏈可變區包括以SEQ ID NO:16 (GYGMS)、17 (TITSGGTYTYYPDSVKG)及18 (SLAGNAMDY)描述之CDR及以SEQ ID NO:89 [圖1B]描述之人類IGHV3-48/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H49為供體殘基。

【0039】 在又另一個態樣中，提供一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，該重鏈可變區包括以SEQ ID NO:16 (GYGMS)、17 (TITSGGTYTYYPDSVKG)及18 (SLAGNAMDY)描述之CDR及以SEQ ID NO:90 [圖1C]描述之人類IGHV3-66/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H29、H49及H82為供體殘基。

【0040】 在又另一個態樣中，提供一種特異性結合人類CD47之人

類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，該重鏈可變區包括以SEQ ID NO:16 (GYGMS)、17 (TITSGGTYTYYPDSVKG)及18 (SLAGNAMDY)描述之CDR及以SEQ ID NO:91 [圖1D]描述之人類IGHV3-74/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H49為供體殘基。

【0041】在又另一個態樣中，提供一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，該重鏈可變區包括以SEQ ID NO:31 (RASQTISDYLH)、32 (FASQSIG)及33 (QNGHGFPRT)描述之CDR；及以SEQ ID NO:92 [圖1G]描述之人類IGKV6-21/KJ2框架，其中根據Kabat編號，框架位置L4、L21、L69及L85為供體殘基。

【0042】在又另一個實施例中，提供一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，該重鏈可變區包括以SEQ ID NO:31 (RASQTISDYLH)、32 (FASQSIG)及33 (QNGHGFPRT)描述之CDR；及以SEQ ID NO:93 [圖1H]描述之人類IGKV1-27/KJ2框架，其中根據Kabat編號，框架位置L21、L49及L69為供體殘基。

【0043】在一個實施例中，根據Kabat編號，框架位置L4被M所佔據，L21被L所佔據，L49被K所佔據，L69被T或S所佔據，及L85被V或T所佔據。

【0044】在一個實施例中，該抗體或抗原結合片段包括與SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7及8中之任一者具有至少90%的序列同一性之重鏈可變區(HCVR)及與SEQ ID NO:10、11、12、13、14及15中之任一者具

有至少90%的序列同一性之輕鏈可變區(LCVR)。

【0045】 在一個實施例中，該抗體或抗原結合片段進一步包括LCDR3中的G91A突變(根據Kabat編號)。

【0046】 在一個實施例中，該抗體或抗原結合片段係IgG1同型物。

【0047】 在一個實施例中，該抗體或抗原結合片段相較於其親本抗體具有增強的抗體依賴型細胞毒性(ADCC)。

【0048】 在一個實施例中，該抗體或抗原結合片段相較於其親本抗體具有增強的抗體依賴型細胞吞噬作用(ADCP)。

【0049】 在一個實施例中，該抗體或抗原結合片段相較於其親本抗體具有減少的核心岩藻糖基化。

【0050】 在一個實施例中，該抗體或抗原結合片段阻斷CD47與SIRP α 間的相互作用。

【0051】 在一個實施例中，該抗體或抗原結合片段相較於其親本抗體具有減少的血球凝集。

【0052】 在一個態樣中，提供編碼特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段之核酸序列。

【0053】 在一個實施例中，該抗原結合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、雙功能抗體、單鏈抗體、scFv片段或scFv-Fc。

【0054】 在一個態樣中，提供一種用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括對個體投與治療有效量之包括掩蔽劑(亦稱為「掩蔽域」)之抗-CD47抗體或其抗原結合片段，其中該掩蔽劑包括一或多個捲曲螺旋肽，相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該一或多個捲曲螺旋肽減小該抗體或抗原結合片段對人類CD47的結合親和力。

【0055】 在一個實施例中，可蛋白酶裂解之連接子係將掩蔽劑連接至抗體或其抗原結合片段。

【0056】 在一個實施例中，可蛋白酶裂解之連接子具有包括IPVSLRSG (SEQ ID NO:73)或GPLGVR (SEQ ID NO:57)之胺基酸序列。

【0057】 在一個實施例中，可蛋白酶裂解之連接子包括基質金屬蛋白酶(MMP)裂解位點。

【0058】 在一個實施例中，該MMP裂解位點係選自MMP2裂解位點、MMP7裂解位點、MMP9裂解位點及MMP13裂解位點。

【0059】 在一個實施例中，該掩蔽劑係於腫瘤微環境中MMP裂解MMP裂解位點之後，自抗-CD47抗體或其抗原結合片段釋放。

【0060】 在一個實施例中，經裂解之抗-CD47抗體具有MMP裂解位點之短胺基酸殘基。

【0061】 在一個實施例中，該短胺基酸殘基包括在抗體之N端的LRSG、SG或VR序列。

【0062】 在一個實施例中，一或多個捲曲螺旋肽包括選自SEQ ID NO:44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54及55之一或多個序列。在一個實施例中，一或多個捲曲螺旋肽包括選自SEQ ID NO:75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85及86之一或多個序列。在一個實施例中，一或多個捲曲螺旋肽包括選自SEQ ID NO:94及95之一或多個序列。

【0063】 在一個實施例中，相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，結合至CD47之抗體或抗原結合片段減少至少約100倍。

【0064】 在一個實施例中，相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，結合至CD47之抗體或抗原結合片段減少約200倍至約1500倍。

【0065】 在一個實施例中，CD47表現癌症為引起實體癌症之血液癌症。

【0066】 在一個實施例中，該血液癌症係選自非霍奇金淋巴瘤、B-淋巴母細胞性淋巴瘤；B-細胞慢性淋巴球性白血病/小淋巴球性淋巴瘤、李希特氏症候群、濾泡性淋巴瘤、多發性骨髓瘤、骨髓纖維化、真性紅血球增多症、皮膚T細胞淋巴瘤、未知臨床意義之單株球蛋白增多症(MGUS)、脊髓發育不良症候群(MDS)、免疫母細胞性大細胞淋巴瘤、前驅B淋巴母細胞性淋巴瘤、急性骨髓性白血病(AML)及退行性大細胞淋巴瘤。

【0067】 在一個實施例中，該CD47表現癌症為實體腫瘤。

【0068】 在一個實施例中，該實體腫瘤係選自肺癌、胰臟癌、乳癌、肝癌、卵巢癌、睪丸癌、腎癌、膀胱癌、脊椎癌、腦癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、結腸直腸癌、肛門癌、子宮內膜癌、食管癌、膽囊癌、胃腸癌、胃癌、肉瘤、頭頸癌、黑色素瘤、皮膚癌、前列腺癌、垂體癌、胃癌、子宮癌、陰道癌及甲狀腺癌。

【0069】 在一個實施例中，該實體腫瘤係選自肺癌、肉瘤、卵巢癌、胰臟癌、胃癌、黑色素瘤、結腸直腸癌、頭頸癌、及乳癌。

【0070】 在一個實施例中，該個體為罹患實體癌症之人類。

【0071】 在一個實施例中，該抗-CD47抗體係與選自如下中的一或多者之免疫檢查點分子之抑制劑組合投與：程式化細胞死亡蛋白1 (PD-1)、程式化死亡配體1 (PD-L1)、PD-L2、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4

(CTLA-4)、T細胞免疫球蛋白及黏蛋白域3 (TIM-3)、淋巴細胞活化基因3 (LAG-3)、癌胚抗原相關細胞黏附分子1 (CEACAM-1)、CEACAM-5、T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)、B及T淋巴細胞衰減因子(BTLA)、具有Ig及ITIM域之T細胞免疫受體(TIGIT)、白血球相關免疫球蛋白樣受體1 (LAIR1)、CD160、2B4或TGFR。

【0072】 在一個態樣中，提供特異性結合至人類CD47蛋白之包括掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，其中該掩蔽劑包括包括SEQ ID NO:95 (QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGS) 及 / 或 SEQ ID NO:94 (QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGs) 之一或多個捲曲螺旋肽，且其中相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該一或多個捲曲螺旋肽減小該抗體或抗原結合片段對人類CD47蛋白之結合親和力。

【0073】 在一個實施例中，該抗體或抗原結合片段包括與SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7及8中之任一者具有至少90%的序列同一性之重鏈可變區(HCVR)及與SEQ ID NO:10、11、12、13、14及15中之任一者具有至少90%的序列同一性之輕鏈可變區(LCVR)。

【0074】 在一個實施例中，該掩蔽劑係經由可蛋白酶裂解之連接子連接至抗體或其抗原結合片段。

【0075】 在一個實施例中，該可蛋白酶裂解之連接子具有包括IPVSLRSG (SEQ ID NO:73)或GPLGVR (SEQ ID NO:57)之胺基酸序列。

【0076】 在一個實施例中，該可蛋白酶裂解之連接子包括基質金屬

蛋白酶(MMP)裂解位點。

【0077】 在一個實施例中，該MMP裂解位點係選自MMP2裂解位點、MMP7裂解位點、MMP9裂解位點及MMP13裂解位點。

【0078】 在一個實施例中，於MMP裂解位點被MMP裂解後自抗-CD47抗體移去該掩蔽劑。

【0079】 在一個實施例中，於MMP裂解位點被MMP裂解後，該抗-CD47抗體具有MMP裂解位點之短胺基酸殘基。

【0080】 在一個實施例中，該短胺基酸殘基包括在抗體之N端的LRSG、SG或VR序列。

【0081】 在一個實施例中，相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該結合減小至少約100倍。

【0082】 在一個實施例中，相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該結合減小約200倍與約1500倍。

【0083】 在一個實施例中，抗體或抗原結合片段包括SEQ ID NO:42之重鏈序列及SEQ ID NO:43之輕鏈序列。

【0084】 在一個實施例中，該抗體或抗原結合片段包括賦予選自ADCC及/或CDC活性之增強的效應功能之可變Fc區。

【0085】 在一個實施例中，該抗體或抗原結合片段係去岩藻糖基化。

【0086】 在一個態樣中，提供特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為IgG1同型物。

【0087】 在一個實施例中，該抗體包括增強的ADCC、增強的ADCP及/或增強的CDC活性。

【0088】 在一個態樣中，提供一種用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括如下之步驟：

【0089】 a)識別個體為具有癌症相對於周圍非癌組織升高的MMP水平；及

【0090】 b)對個體投與治療有效量之包括掩蔽劑之抗-CD47抗體或其抗原結合片段，其中該掩蔽劑包括捲曲螺旋肽，若個體具有癌症相對於周圍非癌組織升高的MMP水平，相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該等捲曲螺旋肽減小抗體或抗原結合片段對人類CD47之結合親和力。

【0091】 在一個實施例中，該MMP係選自由如下組成之群：MMP2、MMP7、MMP9及MMP13。

【0092】 在一個實施例中，步驟a)包括：

【0093】 i)從個體分離癌組織及非癌組織；

【0094】 ii)檢測所分離癌組織及非癌組織中的MMP；及

【0095】 iii)比較癌組織相對於非癌組織中的染色量。

【0096】 在一個態樣中，提供一種用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括如下之步驟：

【0097】 a)識別個體為具有癌症相對於周圍非癌組織升高的CD47水平；及

【0098】 b)對個體投與治療有效量之包括掩蔽劑之抗-CD47抗體或其抗原結合片段，其中該掩蔽劑包括捲曲螺旋肽，若個體具有癌症相對於周圍非癌組織升高的CD47水平，相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該等捲曲螺旋肽減小抗體或抗原結合片段對人類CD47之結合親和

力。

【0099】 在一個實施例中，步驟a)包括：

【0100】 i) 從個體分離癌組織及周圍非癌組織；

【0101】 ii) 檢測所分離癌組織及周圍非癌組織中的CD47；及

【0102】 iii) 比較癌組織中的CD47染色量相對於非癌組織中的CD47染色量。

【0103】 在一個態樣中，提供一種用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括如下之步驟：

【0104】 a) 識別個體為具有癌組織相對於非癌組織升高的巨噬細胞浸潤水平；及

【0105】 b) 對個體投與治療有效量之包括掩蔽劑之抗-CD47抗體或其抗原結合片段，其中該掩蔽劑包括一或多個捲曲螺旋肽，若個體具有癌症相對於非癌組織升高的巨噬細胞浸潤水平，相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該一或多個捲曲螺旋肽減小抗體或抗原結合片段對人類CD47之結合親和力。

【0106】 在一個實施例中，步驟a)包括：

【0107】 i) 從個體分離癌組織及周圍非癌組織；

【0108】 ii) 檢測所分離癌組織及非癌組織中的巨噬細胞；及

【0109】 iii) 比較癌組織相對於非癌組織中的染色量。

【0110】 在一個實施例中，巨噬細胞染色係利用抗-CD163抗體進行。

【0111】 在一個實施例中，提供特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，其包括與SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7及8中之

任何一者具有至少90%的序列同一性之重鏈可變區(HCVR)及與SEQ ID NO:10、11、12、13、14及15中之任何一者具有至少90%的序列同一性之輕鏈可變區(LCVR)，其中該抗體進一步包括在HCVR及/或LCVR之N端的序列LRSG、SG或VR。

【0112】 在一個態樣中，提供一種藉由投與本發明之經掩蔽之CD47抗體與激動CD40抗體之組合來治療癌症之方法。

【0113】 在一個實施例中，該激動CD40抗體具有低的岩藻糖基化水平，例如SEA-CD40抗體。

【0114】 在一個態樣中，提供一種藉由投與如技術方案37之經掩蔽之CD47抗體與抗體藥物共軛物(ADC)之組合來治療癌症之方法，其中該ADC之抗體特異性結合至表現於癌細胞之胞外表面上之蛋白且該抗體係與包括細胞毒性劑之藥物-連接子共軛。

【0115】 在一個實施例中，細胞毒性劑為奧瑞司他汀。

【0116】 在一個實施例中，該ADC之抗體係與選自vcMMAE及mcMMAF之藥物連接子共軛。

【0117】 上文所述之發明內容係非限制性的，且自下列圖式說明、實施方式、實例及申請專利範圍，所揭示抗體及製造及使用其之方法之其他特徵及優點將顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0118】 圖1A-圖1J描繪抗體序列比對。圖1A顯示具有人類VH供體序列HV3-23/HJ4之hB6H12重鏈變體之序列比對。圖1B顯示具有人類VH供體序列HV3-48/HJ4之hB6H12重鏈變體之序列比對。圖1C顯示具有人類VH供體序列HV3-66/HJ4之hB6H12重鏈變體之序列比對。圖1D顯示具

有人類VH供體序列HV3-74/HJ4之hB6H12重鏈變體之序列比對。圖1E顯示hB6H12重鏈變體之序列比對。圖1F顯示hB6H12.3重鏈(hvH1)與mB6H12及Ab47間的序列比對。圖1G顯示具有人類VH供體序列KV1-3/KJ2之hB6H12輕鏈變體之序列比對。圖1H顯示具有人類VH供體序列KV1-27/KJ2之hB6H12輕鏈變體之序列比對。圖1I顯示hB6H12輕鏈變體之序列比對。圖1J顯示hB6H12.3輕鏈(hvK3)與mB6H12及Ab47間的序列比對。

【0119】圖2A-2C描繪抗體結合親和力及動力學。圖2A顯示示例性抗-CD47抗體之CD47飽和細胞FACS。圖2B顯示示例性抗-CD47抗體之CD47飽和ELISA。圖2C顯示CD47示例性抗-CD47抗體之結合親和力。

【0120】圖3A-3B描繪抗體介導之吞噬作用。圖3A及圖3B顯示示例性抗-CD47抗體之CD47+人類紅血球(RBC)之抗體介導之吞噬作用。

【0121】圖4A-4B描繪抗體介導之血球凝集。圖4A顯示經分散之非沉澱RBC之形成之影像擷取。圖4B顯示具有抗-CD47抗體Ab47及hB6H12.3之RBC之血球凝集百分比。

【0122】圖5A-5B描繪抗體介導之Fc γ 受體活化。自經Fc γ RI (圖5A)或高親和力Fc γ RIIIa-H (圖5B)轉染且暴露至經漸增濃度的小鼠B6H12、Ab47或hB6H12.3中任一者塗覆之WIL2S細胞之Jurkat細胞測定NFAT螢光素酶受體活性。

【0123】圖6A-6B描繪NK細胞介導之ADCC及Fc γ RIIIa活化。將經mB6H12、Ab47或hB6H12.3塗覆之負載鉻之WIL2S細胞暴露至Jurkat細胞，其安定地表現Fc γ RIIIa之高親和力V/V變體且受體活化評定為NFAT驅動之螢光素酶活性。比較mB6H12、Ab47及hB6H12.3間的ADCC (圖

6A)及FcγRIIIa活化(圖6B)。

【0124】 圖7A-7D描繪抗-CD47抗體之抑制功能。具有腫瘤相關巨噬細胞(TAM)表現型之分化單核細胞在暴露至抗-CD47抗體時顯示增加的巨噬細胞活化標記物CD86 (圖7A)及MHCII (圖7B)水平。TCR介導之T細胞活化係藉由檢測T細胞中之MHCII(圖7C)及IFN γ 分泌(圖7D)之上調來評定。

【0125】 圖8A-8D描繪hB6H12.3與抗-CD47抗體5F9間的比較。在NFAT螢光素酶受體Jurkat細胞中檢測FcγRI活化(圖8A)。在NFAT螢光素酶受體Jurkat細胞中評定FcγRII活化(圖8B)。確定由NK介導之ADCC活性(圖8C)。評定T細胞IFN γ 分泌(圖8D)。

【0126】 圖9A-9B描繪MMP2再活化之經掩蔽之抗體之質譜資料。於利用重組人類MMP2裂解之前(圖9A)及之後(圖9B)之Vel-IPV-hB6H12.3之解迴旋輕鏈質量。完整輕鏈之預期m/z為28681 (觀測值：28680.8)。經MMP2裂解之抗體(LRSG-hB6H12.3)之預期m/z為23969 (觀測值：23968.4)。

【0127】 圖10描繪抗-CD47抗體對SW780人類膀胱癌細胞之飽和結合。測試Vel-IPV掩蔽之hB6H12抗體以及MMP2預活化之比較物。經裂解之Vel-IPV-抗體在抗體N端具有殘餘LRSG序列。

【0128】 圖11描繪抗-CD47抗體對SW780人類膀胱癌細胞之飽和結合。測試Vel-IPV掩蔽之hB6H12抗體以及MMP2預活化之比較物。經裂解之Vel-IPV及短-IPV抗體在抗體N端具有殘餘LRSG序列。該經裂解之抗體係藉由用MMP2裂解產生，而該短-IPV抗體係重組產生的。

【0129】 圖12描繪抗-CD47抗體對人類紅色球之飽和結合。測試

Vel-IPV掩蔽之hB6H12抗體以及再活化之比較物(stub IPV-hB6H12.3或經MMP2裂解之Vel-IPV-hB6H12.3)。經裂解之Vel-IPV抗體及經裂解之短-IPV抗體在抗體N端具有殘餘LRSG序列。經裂解之抗體係經用MMP2裂解產生，而短-IPV抗體係重組產生的。

【0130】 圖13描繪抗-CD47抗體對rhCD47之飽和結合，依ELISA檢測。Vel-IPV-hB6H12.3呈現顯著受損之結合。結合可於經rhMMP2裂解後恢復。

【0131】 圖14描繪抗-CD47抗體對rhCD47之飽和結合，依ELISA檢測。hB6H12.3及hB6H12.3 G91A均比Ab47呈現更高的 B_{max} 。

【0132】 圖15描繪抗-CD47抗體對SW780人類膀胱癌細胞之飽和結合。將Ab47及hB6H12.3之結合與在CDR-L3中具有G91A突變之變體進行比較。

【0133】 圖16描繪抗-CD47抗體對人類紅血球之飽和結合。將Ab47及hB6H12.3之結合與在CDR-L3中具有G91A突變之變體進行比較。

【0134】 圖17A-17B描繪於NSG小鼠於L428異種移植腫瘤模型中抗-CD47抗體之活性。抗體係以1 mg/kg或10 mg/kg每四天經腹膜內(i.p.)投與四個劑量(q4dx4)(圖17A)。使用抗-F4/80巨噬細胞標記物之腫瘤組織分析顯示L428異種移植腫瘤模型中鼠類巨噬細胞之百分比(圖17B)。

【0135】 圖18A-18D描繪抗-CD47抗體在NSG小鼠的L428異種移植腫瘤模型中之活性。抗體係以1 mg/kg或10 mg/kg i.p.投與，q4dx4 (圖18A)。使用抗-F4/80巨噬細胞標記物分析腫瘤組織顯示Detroit 562異種移植腫瘤模型中存在鼠類巨噬細胞(圖18B)。亦分析抗-CD47抗體在NSG小鼠的SUDHL8異種移植腫瘤模型中之活性(圖18C)。抗體係以1 mg/kg或10

mg/kg i.p.投與，q4dx4。使用抗-F4/80巨噬細胞標記物分析腫瘤組織顯示SUDHL8異種移植腫瘤模型中存在鼠類巨噬細胞(圖18D)。

【0136】圖19A-19D描繪抗-CD47抗體在具有低固有巨噬細胞含量的腫瘤模型中之活性。描繪HT1080纖維肉瘤癌模型(圖19A及圖19B)及HepG2肝細胞癌模型(圖19C及圖19D)。抗體係以10 mg/kg i.p.投與，q4dx4。使用抗-F4/80巨噬細胞標記物分析腫瘤組織顯示HT1080纖維肉瘤癌模型(圖19B)及HepG2肝細胞癌模型(圖19D)中均存在鼠類巨噬細胞。

【0137】圖20描繪抗-CD47抗體在具有低固有巨噬細胞含量之腫瘤模型中之活性，當與單甲基奧瑞司他汀E (MMAE)抗體-藥物共軛物(ADC)(已知其驅動巨噬細胞浸潤)組合時，巨噬細胞含量可被擴增。抗-CD47抗體係以5 mg/kg i.p.投與，q4dx4，而MMAE ADC以1 mg/kg一次性給予。

【0138】圖21A-21B描繪小鼠反應性抗-CD47抗體mIAP301可使用用於人類hB6H12.3抗體之相同VEL及IPV序列掩蔽(圖21A)。以此等構築體掩蔽阻斷抗體結合至鼠類CD47陽性腫瘤(圖21B)，且妨礙功能性，依RBC吞噬作用測定。在具有低固有巨噬細胞含量的腫瘤模型中，抗-CD47抗體係以5 mg/kg i.p.投與，q4dx4，而MMAE ADC以1 mg/kg一次性給予。

【0139】圖22A-22B描繪投與BALB/c小鼠之經³H標記之親本抗體及經掩蔽之抗體。藉由閃爍計數法監測抗體。顯示小鼠血小板計數(圖22A)及鼠類抗體藥物動力學(圖22B)。在圖22B中，分析mIAP301抗體的時間點為最後一次給予抗體後24小時。

【0140】圖23A-23D：抗小鼠CD47抗體mIAP301於A20淋巴瘤模型

中驅動抗腫瘤活性，但同時引起伴隨的RBC耗竭(圖23A)。經掩蔽之Vel-IPV-mIAP301抗體賦予相似的活性，但消除於RBC耗竭的效應(圖23B)。Vel-IPV-mIAP301避免RBC抗原下沉(sink)，但維持腫瘤結合(圖23C及圖23D)。

【0141】 圖24描繪抗小鼠CD47抗體mIAP301於MC38結腸癌模型中之驅動抗腫瘤活性，已知MC38結腸癌模型對免疫腫瘤學(I/O)試劑具有反應性。此模型中經掩蔽之mIAP301抗體之活性顯示優異的效力，如展現完全反應之動物所指示。此動物之再攻毒導致腫瘤之完全排斥，證實誘導長期記憶T細胞反應。

【0142】 圖25A-25B：親本抗體及經掩蔽之抗-鼠類CD47抗體mIAP301與抗-PD-1替代抗體之組合驅動增加的抗腫瘤活性，此導致4/6動物展現完全反應(CR)(圖25A)。親本抗體及經掩蔽之抗-鼠類CD47抗體mIAP301與巨噬細胞活化CD40靶向的SEA增強之替代抗體1C10之組合驅動增加的抗腫瘤活性(圖25B)。

【0143】 圖26描繪各種捲曲螺旋、人類化B6H12變體於BALB/c小鼠中於給藥後三天之安定性。安定性係於藉由減小之SDS-PAGE分離經掩蔽及未經掩蔽之重鏈後，藉由西方墨點密度測定儀(Western blot densitometry)來評定安定。

【0144】 圖27A-27B：檢測於單次IV推注劑量為0.1、1、10或30 mg/kg之人類化IgG1 hB6H12 「Ab47」後的紅血球水平(圖27A)。大於1 mg/kg之劑量不耐受，且動物於所有劑量下均展現由血球溶解性及用測試品處理所造成的臨床徵兆。顯示於單次IV推注劑量為0.1、1或10 mg/kg之替代性地掩蔽人類化IgG1 hB6H12 「Ab47」之Vel-IPV後的紅血球水

平，此證實在所測試的最大劑量下耐受性增加約10倍(圖27B)。所有劑量之Vel-IPV-Ab47係耐受的，且在任何劑量下均未檢測到臨床徵兆。

【0145】圖28描繪於單次IV推注劑量為1 mg/kg之Ab47及Vel-IPV-Ab47後的循環抗體水平。雖然1 mg/kg劑量之Ab47係低於研究第3天的Generic Tab (總抗體)檢定之檢測限值，但於整個研究過程(結束於研究第15天)中，1 mg/kg Vel-IPV-Ab47係可檢測的。

【0146】圖29描繪於單次IV單次推注劑量為1 mg/kg之Ab47、hB6H12.3或對照後的紅血球水平。Ab47及hB6H12.3二者均證實紅血球之耗竭。

【0147】圖30描繪於單次IV推注劑量為1 mg/kg之Ab47、hB6H12.3或對照後的血小板水平。Ab47證實給藥前血小板水平降低60%，然而，hB6H12.3之血小板減少不超過20%，對照組亦觀測到此點。Ab47及hB6H12.3導致從第7天到研究結束(第15天)血小板增加。

【0148】圖31描繪於單次IV推注劑量為10或20 mg/kg之Vel-IPV-hB6H12.3後的紅血球水平，此顯示相比1 mg/kg下之未經掩蔽之hB6H12.3耐受性增加約20倍。除了藉由血液學參數增強耐受性外，在經掩蔽之抗體處理組中未觀測到臨床徵兆，然而，未經掩蔽之hB6H12.3於1 mg/kg下觀測到其等。

【0149】圖32描繪於單次IV推注劑量為20 mg/kg之Vel-IPV-hB6H12.3、20 mg/kg SEA-Vel-IPV-hB6H12.3、1 mg/kg hB6H12.3及參考對照後的紅血球水平。不管在抗體改造中增強效應功能性，經SEA及未經SEA掩蔽之hB6H12.3抗體之耐受性相似。

【0150】圖33描繪使用抗-CD163抗體經由免疫組織化學在乳癌及

正常乳房組織樣品中之巨噬細胞檢測。

【0151】 圖34描繪M11、M15及Vel捲曲螺旋序列。亦顯示MMP2裂解序列。

【0152】 圖35A-35B：所選鼠類及人類癌症中的腫瘤MMP水平相對彼等存在於細胞培養系統中的腫瘤MMP水平。

【0153】 圖36A-36B描繪在針對Liv1A ADC之乳癌異種移植模型MCSF7及針對CD30 ADC之L428淋巴瘤模型中與抗-CD47抗體組合之所選的含MMAE之奧瑞司他汀(LIV1A及CD30)。

【0154】 圖37A-37F描繪血漿(圖37A及圖37B)、脾臟(圖37C及圖37D)及腫瘤(圖37E及圖37F)中mIAP301及經掩蔽之Vel-IPV-mIAP301及Vel-M2-mIAP301之濃度。

【0155】 圖38A-38B描繪血漿、肝臟及腫瘤(圖38A)中經裂解之抗體之百分比。使收穫自經Ab47或Vel-IPV-Ab47處理4天或7天之小鼠之HT1080腫瘤經受流動式細胞測量術來確定抗體能夠結合至腫瘤表現CD47並飽和之程度(圖38B)。

【0156】 圖39A-39C：藉由測定循環血漿細胞介素單核細胞化學誘導蛋白-1(MCP-1)來確定經掩蔽之Ab47 (圖39A)或經掩蔽之hB6H12.3 (圖39B)之耐受性。於經掩蔽及未經掩蔽之hB6H12.3進行使用Generic TAb ELISA之藥物動力學分析(圖39C)。

【0157】 圖 40A-40B 描繪於高 (Detroit562)(圖 40A) 及低 (HT1080)(圖40B)巨噬細胞模型中，藉由測定Vel-IPV-hB6H12.3及SEA-Vel-IPV-hB6H12.3以及岩藻糖基化及非岩藻糖基化SEA hB6H12.3之異種移植模型中之平均腫瘤體積所得之相對抗腫瘤活性。

【0158】圖 41A-41B 描繪以 Vel-IPV-hB6H12.3 及 SEA-Vel-IPV-hB6H12.3 抗體測定循環 MCP-1 細胞介素水平(圖 41A)。於 SEA 及無-SEA Vel-IPV-hB6H12.3 抗體之間進行使用 Generic TAb ELISA 之藥物動力學分析(圖 41B)。

【0159】圖 42 描繪於用 hB6H12.3(「抗-CD47」)、Vel-IPV-hB6H12.3(「經掩蔽之抗-CD47」)、經 MMP 裂解之 Vel-IPV-hB6H12.3(「經MMP活化之經掩蔽之抗-CD47」)或無抗體(「未經處理」)培養後 CD47 陽性人類紅血球之吞噬作用之測定。

【0160】圖 43 描繪於用 Vel-IPV-Ab47(「經掩蔽之 Ab47」)、經 MMP 裂解之 Vel-IPV-Ab47(「經MMP裂解之經掩蔽之 Ab47」)或無抗體(「未經處理」)培養後圓底板中之人類紅血球。

【0161】圖 44 描繪於用 hB6H12.3、5F9 或 IgG1 同型對照培養後膜聯蛋白 V 陽性細胞之測定。

【0162】圖 45A-45C 描繪 Vel-IPV-hB6H12.3-FITC 及 hB6H12.3-FITC 結合至代表 17 個患者樣品中的 16 者(圖 45A)或一個離群樣品(圖 45B)之全血樣品之測定；及利用 ELISA 於用重組 CD47 及 hB6H12.3(「外加之供體 1-hB6H12.3」)或 Vel-IPV-hB6H12.3(肉瘤 Pt1-10)培養血漿後得到的 EC₅₀ 值(圖 45C)。

【0163】圖 46A-46B 描繪藉由培養在 37°C 下經 hB6H12.3 或 Vel-IPV-hB6H12.3 培養 20 小時之癌症患者全血樣品誘導之代表性細胞介素產生。圖 46A 顯示 IP-10 之產生及圖 46B 顯示 IL-1RA 之產生。

【0164】圖 47 顯示來自投與 hB6H12.3、Vel-IPV-hB6H12.3 或 hIgG1 同型對照(「h00 同型物」)之 HT1080 異種移植模型小鼠之 HT1080 腫瘤細

胞之膜聯蛋白V染色。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0165】本申請案主張2017年12月1日申請之美國臨時申請案第62/593,712號之優先權，該案出於任何目的以其全文引用的方式併入本文中。

【0166】本技術中在歸檔之時已知的抗-CD47 IgG3抗體展現毒性，諸如周邊紅血球耗竭及血小板耗竭，此降低其作為針對CD47相關疾病(諸如(例如) CD47表現癌症)之有效治療劑的適用性。申請人已驚人地發現可藉由在腫瘤微環境的情況中不掩蔽來活化新穎的抗-CD47 IgG1抗體及其抗原結合片段，以使本發明之抗體及其抗原結合片段有效地特異性靶向至CD47表現實體腫瘤。本文所述之人類化抗-CD47抗體及其抗原結合片段(經掩蔽或未經掩蔽)係可用於治療CD47相關疾病，例如(諸如) CD47表現癌症。

【0167】在某些示例性實施例中，提供抗體及其抗原結合片段，其包括阻斷抗體或其抗原結合片段結合至其靶抗原之可移去之掩模(例如捲曲螺旋掩模)。在某些實施例中，可移去之掩模係經由可基質金屬蛋白酶(MMP)裂解之連接子序列連接至抗體或其抗原結合片段之重鏈及/或輕鏈中之一者或多者的N端。

【0168】在腫瘤微環境中，經改變之蛋白水解導致不受調節之腫瘤生長、組織再塑、浸潤、發炎、組織入侵及轉移(Kessenbrock (2011) Cell 141:52)。MMP代表與腫瘤發生有關之最主要的蛋白酶家族，且MMP於腫瘤進展期間介導微環境中的許多變化(同上)。於將本發明之抗

體或其抗原結合片段暴露至MMP後，裂解MMP連接子序列，因此允許移去捲曲螺旋掩模且使得抗體或其抗原結合片段以腫瘤微環境特定方式結合其靶抗原。

【0169】 本發明之新穎的抗-CD47 IgG1抗體及其抗原結合片段(經掩蔽及未經掩蔽)有利地證實相較於本技術中在歸檔之時已知的抗-CD47 IgG3抗體增加的藥物動力學及減少的脫靶效應。本文所述之新穎的人類化抗-CD47抗體有利地展示如下中之一者或多者：1)相對參考抗體(例如鼠類親本抗體)增強之抗原結合；2)相對參考抗體(例如鼠類親本抗體)增強之抗體依賴型細胞毒性(ADCC)；3)相對參考抗體(例如鼠類親本抗體)增強之吞噬作用(例如，增強之抗體依賴型細胞吞噬作用(ADCP))；4)相對參考抗體(例如鼠類親本抗體)減少之血球凝集(HA)；5)結合至相同三維(即非線性) CD47抗原決定基。

【0170】 因此，可更容易地理解本發明，下文明確地定義某些技術及科學術語。除非本文件中另外明確定義，否則本文所使用的所有其他技術及科學術語具有本發明所屬領域之一般技術者習知之意義。

I. 定義

【0171】 如本文(包括隨附申請專利範圍)所使用，除非本文清楚地另作指明，否則詞語的單數形式(諸如「一個」、「一種」及「該」)包括其對應之參考物複數形式。

【0172】 「抗體-藥物共軛物」係指與細胞毒性劑或細胞生長抑制劑共軛之抗體。通常，抗體-藥物共軛物結合至細胞表面上的靶抗原(例如CD47)，接著使抗體-藥物共軛物內部化至細胞中且於隨後釋放藥物於細胞中。

【0173】 「多肽」或「多肽鏈」為經肽鍵連接之胺基酸殘基之聚合物(無論是天然產生還是以合成方式產生的)。通常，小於約10個胺基酸殘基的多肽稱為「肽」。

【0174】 「蛋白質」為包括一或多個多肽鏈之大分子。蛋白質亦可包括非肽組分，諸如碳水化合物組。碳水化合物及其他非肽取代基可藉由產生蛋白質的細胞添加至該蛋白質，且將根據細胞類型改變。本文依其胺基酸主鏈結構定義蛋白質。取代基(諸如碳水化合物基團)係一般不指定的，但可能存在。

【0175】 術語「胺基端」及「羧基端」表示多肽中的位置。在本文允許的情況下，此等術語係與參考多肽之特定序列或部分使用以表示附近或相對位置。例如，多肽中定位至參考序列羧基端之特定序列位於參考序列的羧基端的附近，但不一定是在完整多肽的羧基端。

【0176】 為歸類胺基酸取代為保守性或非保守性的目的，以下胺基酸取代視作保守性取代：蘇胺酸、丙胺酸或天冬醯胺酸取代絲胺酸；脯胺酸或絲胺酸取代蘇胺酸；天冬胺酸、組胺酸或絲胺酸取代天冬醯胺酸；麩胺酸或天冬醯胺酸取代天冬胺酸；麩醯胺酸、離胺酸或天冬胺酸取代麩胺酸；精胺酸、離胺酸或麩胺酸取代麩醯胺酸；酪胺酸或天冬醯胺酸取代組胺酸；離胺酸或麩醯胺酸取代精胺酸；異白胺酸、白胺酸或纈胺酸取代甲硫胺酸；白胺酸、纈胺酸或甲硫胺酸取代異白胺酸；纈胺酸、異白胺酸或甲硫胺酸取代白胺酸；酪胺酸或色胺酸取代苯丙胺酸；色胺酸、組胺酸或苯丙胺酸取代酪胺酸；蘇胺酸取代脯胺酸；絲胺酸取代丙胺酸；麩胺酸、麩醯胺酸或精胺酸取代離胺酸；甲硫胺酸、異白胺酸或白胺酸取代纈胺酸；及苯丙胺酸或酪胺酸取代色胺酸。保守性取代亦可意指相同類別中胺

基酸間的取代。類別如下：組I (疏水性側鏈)：met、ala、val、leu、ile；組II (中性親水性側鏈)：cys、ser、thr；組III (酸性側鏈)：asp、glu；組IV (鹼性側鏈)：asn、gin、his、lys、arg；組V (影響鏈方向之殘基)：gly、pro；及組VI (芳族側鏈)：trp、tyr、phe。

【0177】若兩個胺基酸序列之胺基酸殘基在比對最大一致性時相同，則該等兩個胺基酸序列具有「100%胺基酸序列同一性」。序列比較可使用標準軟體程式(諸如彼等由DNASTAR (Madison, Wisconsin)生產的LASERGENE生物資訊計算套件中所包括的標準軟體程式)進行。熟習此項技術者熟知藉由確定最佳比對比較兩個核苷酸或胺基酸序列之其他方法。(參見，例如，Peruski及Peruski，*The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997)；Wu等人(編)，「*Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins*」，*Methods in Gene Biotechnology* 123-151 (CRC Press, Inc. 1997)；Bishop(編)，*Guide to Human Genome Computing* (第2版，Academic Press, Inc. 1998))。若兩個序列相對彼此具有至少約80%、至少約85%、至少約90%或至少約95%的序列同一性，則該等兩個胺基酸序列被視作具有「實質序列同一性」。

【0178】依Kabat編號慣例最大化比對抗體序列來確定序列同源性百分比。於比對後，若比較標的抗體區域(例如，重鏈或輕鏈之整個可變域)與參考抗體之相同區域，標的抗體區域與參考抗體區域間的序列同一性百分比為標的抗體區域及參考抗體區域中被相同胺基酸所佔據的位置的數量除以兩個區域比對位置的總數(空位不計)，乘以100以換算成百分比。

【0179】 「包括」一或多個所列舉元件之組合物或方法可包括未專門列舉的其他元件。例如，包含抗體之組合物可單獨地或以與其他成分組合的方式包含抗體。

【0180】 值範圍之表示方法包括於該範圍內或界定該範圍之所有整數。

【0181】 在本文所述之抗體或其他蛋白質中，提及之對應於彼等由 SEQ ID NO 指示者之胺基酸殘基包括此等殘基之轉譯後修飾。

【0182】 術語「抗體」表示由身體因應抗原之存在所產生且結合至抗原的免疫球蛋白，以及其抗原結合片段及改造變體。因此，術語「抗體」包括(例如)完整單株抗體(例如，利用融合瘤技術產生的抗體)及抗原結合抗體片段，諸如F(ab')₂、Fv片段、雙功能抗體、單鏈抗體、scFv片段或scFv-Fc。亦包括基因改造完整抗體及片段，諸如嵌合抗體、人類化抗體、單鏈Fv片段、單鏈抗體、雙功能抗體、微型抗體(minibodies)、線性抗體、多價或多特異性(例如雙特異性)雜交抗體及類似物。因此，術語「抗體」廣泛用於包括包含抗體之抗原結合位點且能夠特異性結合至其抗原之任何蛋白質。

【0183】 術語抗體或其抗原結合片段包括未結合(即共價或非共價結合)至本發明之掩蔽化合物之「裸」抗體或其抗原結合片段。術語抗體亦涵蓋共價或非共價結合至如本文進一步描述之一或多種掩蔽化合物(諸如(例如)捲曲螺旋肽)之「經掩蔽之」抗體或其抗原結合片段。術語抗體或其抗原結合片段包括「共軛」抗體或其抗原結合片段或「抗體-藥物共軛物(ADC)」，其中抗體或其抗原結合片段係共價或非共價結合至藥劑(例如，結合至細胞生長抑制藥物或細胞毒性藥物)。在某些實施例中，抗體

或其抗原結合片段為視需要與藥劑共軛(例如，與細胞生長抑制藥物或細胞毒性藥物共軛)之裸抗體或抗原結合片段。在其他實施例中，抗體或其抗原結合片段為視需要與藥劑共軛(例如，與細胞生長抑制藥物或細胞毒性藥物共軛)之經掩蔽之抗體或抗原結合片段。

【0184】 術語「基因改造抗體」係指胺基酸序列已自天然抗體或親本抗體之胺基酸序列改變之抗體。可能的變體有許多，且範圍在改變僅一個或幾個胺基酸到完全再設計(例如)可變區或恒定區。一般而言，對恒定區做改變以改良或改變特性，諸如(例如)補體結合或其他效應功能。通常，對可變區做改變以改良抗原結合特性，改良可變區安定性，及/或降低免疫原性風險。

【0185】 術語「嵌合抗體」係指重鏈及/或輕鏈之一部分與衍生自特定物種(例如人類)或屬於特定抗體類型或亞類之抗體中之對應序列相同或同源，而該(等)鏈之剩餘部分與衍生自另一物種(例如小鼠)或屬於另一抗體類別或亞類之抗體中之對應序列相同或同源的抗體、及此等抗體之片段，只要其等展示所需生物活性即可。

【0186】 「抗體之抗原結合位點」為抗體之足以結合至其抗原之部分。通常，最小的此區為可變域或其基因改造變體。單域結合位點可產自駱駝抗體(參見Muyltermans及Lauwereys，*Mol. Recog.* 12:131-140，1999；Nguyen等人，*EMBO J.* 19:921-930，2000)或其他物種之VH域以產生單域抗體(「dAbs」，參見Ward等人，*Nature* 341 :544-546，1989；Winter等人的美國專利第6,248,516號)。通常，抗體之抗原結合位點包括結合至共同抗原決定基之重鏈可變(VH)域及輕鏈可變(VL)域二者。在本發明內文中，抗體亦可包括除了抗原結合位點外的一或多個組分，諸如

(例如)抗體之第二抗原結合位點(其可結合至相同或不同抗原決定基或結合至相同或不同抗原)、肽連接子、免疫球蛋白恒定區、免疫球蛋白鉸鏈、兩性螺旋(參見Pack及Pluckthun, *Biochem.* 31:1579-1584, 1992)、非肽連接子、寡核苷酸(參見Chaudri等人, *FEBS Letters* 450:23-26, 1999)、細胞生長抑制藥物或細胞毒性藥物及類似物, 且可為單體或多聚體蛋白。包括抗體之抗原結合位點之分子之實例係本技術中已知且包括(例如) Fv、單鏈Fv (scFv)、Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)_c、雙功能抗體、微型抗體、奈米抗體、Fab-scFv融合體、雙特異性(scFv) 4-IgG及雙特異性(scFv) 2-Fab。(參見, 例如, Hu等人, *Cancer Res.* 56:3055-3061, 1996; Atwell等人, *Molecular Immunology* 33:1301-1312, 1996; Carter及Merchant, *Curr. Op. Biotechnol.* 8:449-454, 1997; Zuo等人, *Protein Engineering* 13:361-367, 2000; 及 Lu 等人, *J. Immunol. Methods* 267:213-226, 2002。)

【0187】術語「免疫球蛋白」係指由實質上由免疫球蛋白基因編碼之一或多個多肽組成之蛋白。免疫球蛋白之一種形式構成脊椎動物中天然(即, 天然或親本)抗體之基本結構單元。此形式為四聚體且由兩對相同的免疫球蛋白鏈組成, 每對具有一個輕鏈及一個重鏈。於每對中, 輕鏈及重鏈可變區(VL及VH)共同主要負責結合至抗原, 及恒定區主要負責抗體效應功能。已在高等脊椎動物中識別出免疫球蛋白之五個類別(IgG、IgA、IgM、IgD及IgE)。IgG組成主要類別, 且其通常呈在血漿中發現的第二大量的蛋白存在。於人類中, IgG由四個亞類組成, 命名為IgG1、IgG2、IgG3及IgG4。每一免疫球蛋白重鏈具有由就物種中所給亞類而言基本上不變之恒定區蛋白域(CH1、鉸鏈、CH2及CH3; IgG3亦包含CH4域)組成

之恒定區。

【0188】本技術中已知編碼人類及非人類免疫球蛋白鏈之DNA序列。(參見，例如，Ellison等人，DNA 1: 11-18，1981；Ellison等人，Nucleic Acids Res. 10:4071-4079，1982；Kenten等人，Proc. Natl. Acad. Set USA 79：6661-6665，1982；Seno等人，Nucl. Acids Res. 11 :719-726，1983；Riechmann等人，Nature 332:323-327，1988；Amster等人，Nucl. Acids Res. 8:2055-2065，1980；Rusconi及Kohler，Nature 314：330-334，1985；Boss等人，Nucl. Acids Res. 12:3791-3806，1984；Bothwell等人，Nature 298:380-382，1982；van der Loo等人，Immunogenetics 42:333-341，1995；Karlin等人，J. Mol. Evol. 22:195-208，1985；Kindsvogel等人，DNA 1 :335-343，1982；Breiner等人，Gene 18:165-174，1982；Kondo等人，Eur. J. Immunol. 23:245-249，1993；及GenBank Accession No. J00228。)對於回顧免疫球蛋白結構及功能，請參見Putnam，The Plasma Proteins，第V卷，Academic Press, Inc.，49-140，1987；及Padlan，Mol. Immunol. 31:169-217，1994。本文中術語「免疫球蛋白」用於指其共同含義，表示完整抗體、其組分鏈或鏈之片段，視內文而定。

【0189】全長免疫球蛋白「長鏈」(約25 kDa或214個胺基酸)係經胺基端的可變區基因(編碼約110個胺基酸)及羧基端的 κ 或 λ 恒定區基因編碼。全長免疫球蛋白「重鏈」(約50 kDa或446個胺基酸)係由可變區基因(編碼約116個胺基酸)及 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 恒定區基因(編碼約330個胺基酸)編碼，該 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 恒定區基因分別定義抗體同型物為IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。於輕鏈及重鏈中，可變區及恒定區係經約12個或更多個

胺基酸的「J」區連接，且該重鏈亦包括多約10個胺基酸的「D」區。(參見generally Fundamental Immunology(Paul編，Raven Press，N.Y.，第2版 1989)，Ch. 7)。

【0190】 免疫球蛋白輕鏈或重鏈可變區(本文中亦分別稱為「輕鏈可變域」(「VL域」)或「重鏈可變域」(「VH域」))由間隔三個「互補決定區」或「CDR」之「框架」區組成。該等框架區用於比對特異性結合至抗原之抗原決定基之CDR。因此，術語「CDR」係指抗體之主要負責抗原結合之胺基酸殘基。從胺基端至羧基端，VL及VH域均包括如下框架(FR)區及CDR區：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

【0191】 胺基酸於每一可變區域中之分配係依照Kabat，Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health，Bethesda，MD，1987及1991)定義。Kabat亦提供於不同重鏈可變區之間或於不同輕鏈可變區之間的對應殘基被分配相同編號之廣泛使用的編號慣例(Kabat編號)。本文中VL域之CDR 1、2及3亦分別稱為CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3。本文中VH域之CDR 1、2及3亦分別稱為CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3。若如此指定，則CDR之分配可依照IMGT®(Lefranc等人，Developmental & Comparative Immunology 27:55-77；2003)，代替Kabat。

【0192】 重鏈恒定區之編號係依如以Kabat (Kabat，Sequences of Proteins of Immunological Interest，National Institutes of Health，Bethesda，MD，1987及1991)描述之EU指數。

【0193】 除非本文另作指明，否則術語「單株抗體」不受限於藉由融合瘤技術產生的抗體。術語「單株抗體」可包括衍生自單一純系(包括

任何真核、原核或噬菌體純系)之抗體。在特定實施例中，本文所述之抗體為單株抗體。

【0194】 術語「人類化VH域」或「人類化VL域」係指包括完全或實質上來自非人類供體免疫球蛋白(例如小鼠或大鼠)之一些或全部CDR及完全或實質上來自人類免疫球蛋白序列之可變域框架序列之免疫球蛋白VH或VL域。提供CDR之非人類免疫球蛋白稱為「供體」及提供框架之人類免疫球蛋白稱為「受體」。在一些情況中，人類化抗體將在人類可變域框架區中保留一些非人類殘基以增強適當的結合特性(例如，可需要框架中之突變以在抗體經人類化時維持結合親和性)。

【0195】 「人類化抗體」為包括人類化VH域及人類化VL域中之一者或二者之抗體。免疫球蛋白恒定區無需存在，但若其等存在，則其等係完全或實質上來自人類免疫球蛋白恒定區。

【0196】 人類化抗體為基因改造抗體，其中來自非人類「供體」抗體之CDR接枝至人類「受體」抗體序列中(參見，例如，Queen，US 5,530,101 及 5,585,089；Winter，US 5,225,539；Carter，US 6,407,213；Adair，US 5,859,205；及Foote，US 6,881,557)。受體抗體序列可為(例如)成熟人類抗體序列、此等序列之複合物、人類抗體序列之一致序列或生殖區序列。人類受體序列可經選擇以使可變區框架與供體序列具有高程度序列同一性，以匹配受體CDR與供體CDR間之典型形式及其他標準。因此，人類化抗體為CDR完全或實質上來自供體抗體及可變區框架序列及恒定區(若存在)完全或實質上來自人類抗體序列之抗體。類似地，人類化重鏈通常具有所有三個CDR完全或實質上來自供體抗體重鏈及重鏈可變區框架序列及重鏈恒定區(若存在)實質上來自人類重鏈可變區框

架及恒定區序列。類似地，人類化輕鏈通常具有所有三個CDR完全或實質上來自供體抗體輕鏈及輕鏈可變區框架序列及輕鏈恒定區(若存在)實質上來自人類輕鏈可變區框架及恒定區序列。當各別CDR間對應之殘基(如依Kabat編號定義)之至少約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%或約99%相同時或其中對應之殘基(如依Kabat編號定義)之約100%相同，人類化抗體中之CDR係實質上來自非人類抗體中之對應之CDR。當對應之殘基(可變區依Kabat編號及恒定區依EU編號定義)之至少約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%或約99%相同或對應之殘基(可變區依Kabat編號及恒定區依EU編號定義)之約100%相同，抗體鏈之可變區框架序列或抗體鏈之恒定區分別係實質上來自人類可變區框架序列或人類恒定區。

【0197】 雖然人類化抗體通常併有來自小鼠抗體之所有六個CDR(較佳如依Kabat或IMGT®定義)，但其等亦可由來自小鼠抗體之少於所有六個(例如，至少3個、4個或5個) CDR組成(例如，Pascalis等人，*J. Immunol.* 169:3076，2002；Vajdos等人，*Journal of Molecular Biology*，320:415-428，2002；Iwahashi等人，*Mol. Immunol.* 36:1079-1091，1999；Tamura等人，*Journal of Immunology*，164:1432-1441，2000)。

【0198】 當各別CDR間對應之殘基(如依Kabat(或IMGT)定義)之至少60%、至少85%、至少90%、至少95%或100%相同，人類化抗體中之

CDR係「實質上來自」非人類抗體中之對應之CDR。在CDR係實質上來自非人類免疫球蛋白之人類化VH或VL域之特定變化中，人類化VH或VL域之CDR相對對應之非人類VH或VL CDR跨所有三個CDR具有不多於六個(例如，不多於五個、不多於四個、不多於三個、不多於兩個或不多於一個)胺基酸取代(較佳保守性取代)。當對應之殘基(可變區依Kabat編號定義及恒定區依EU編號定義)之至少約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%或約99%相同或對應之殘基(可變區依Kabat編號定義及恒定區依EU編號定義)之約100%相同，抗體VH或VL域之可變區框架序列或免疫球蛋白恒定區之序列(若存在)係分別「實質上來自」人類VH或VL框架序列或人類恒定區。因此，通常，人類化抗體之所有部分(除了CDR之外)係完全或實質上來自天然人類免疫球蛋白序列之對應部分。

【0199】 通常，抗體以經分離形式提供。此意指抗體通常為至少約50% w/w純的從其產生或純化中產生的干擾蛋白及其他污染物，但不排除抗體與過量的醫藥可接受之載劑或意圖促進其使用之其他媒劑組合的可能性。有時，抗體為至少約60%、約70%、約80%、約90%、約95%或約99% w/w純的從產生或純化中產生的干擾蛋白及污染物。抗體(包括經分離抗體)可與細胞毒性劑共軛且呈抗體藥物共軛物提供及/或(例如)經相關之捲曲螺旋掩蔽。

【0200】 抗體特異性結合至其靶抗原通常係指至少約 10^6 、約 10^7 、約 10^8 、約 10^9 或約 10^{10} M^{-1} 之親和力。特異性結合可檢測更高量級且可與對至少一個非特異性標靶發生的非特異性結合區別開。特異性結合可為於

特定官能基間形成鍵或特定空間裝配(例如，鎖匙式(lock and key type))的結果，而非特異性結合通常係凡得瓦力(van der Waals forces)的結果。

【0201】術語「抗原決定基」係指抗體所結合的抗原之位點。抗原決定基可由連續胺基酸或藉由一或多種蛋白三級摺疊並列的非連續胺基酸形成。由連續胺基酸形成的抗原決定基於暴露至變性劑(例如溶劑)後通常會保留，而由三級摺疊形成之抗原決定基於用變性劑(例如溶劑)處理後通常會消失。抗原決定基通常包括呈獨特空間構形之至少約3個、且更通常至少約5個、至少約6個、至少約7個或約8-10個胺基酸。確定抗原決定基之空間構形之方法包括(例如) x射線結晶學及二維核磁共振。參見，例如，Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, 第66卷，Glenn E. Morris編(1996)。

【0202】識別相同或重疊抗原決定基之抗體可以簡單免疫分析法(顯示一種抗體與另一抗體競爭結合至靶抗原之能力)確定。抗體之抗原決定基亦可藉由抗體結合至其抗原之X射線結晶學以確定接觸殘基來確定。

【0203】或者，若降低或消除一種抗體之結合之抗原中的所有胺基酸突變降低或消除另一抗體之結合(限制條件為此等突變不產生抗原結構之全局變化)，則兩種抗體具有相同抗原決定基。若降低或消除一種抗體之結合的一些胺基酸突變降低或消除另一抗體之結合，則兩種抗體具有重疊抗原決定基。

【0204】抗體間的競爭可藉由其中測試抗體抑制參考抗體特異性結合至共同抗原之檢定來確定(參見，例如，Junghans等人，Cancer Res. 50:1495, 1990)。若過量的測試抗體抑制參考抗體之結合，則測試抗體與參考抗體競爭。

【0205】藉由競爭檢定識別出的抗體(競爭抗體)包括與參考抗體結合至相同抗原決定基之抗體及結合至足夠接近參考抗體所結合的抗原決定基之相鄰抗原決定基以產生立體位阻之抗體。藉由競爭檢定識別的抗體亦包括藉由引起靶蛋白構形改變藉此防止參考抗體結合至與測試抗體所結合的抗原決定基不同的抗原決定基而與參考抗體間接競爭之抗體。

【0206】抗體效應功能係指由Ig之Fc區貢獻的功能。此等功能可為(例如)抗體依賴型細胞毒性(ADCC)、抗體依賴型細胞吞噬作用(ADCP)或補體依賴型細胞毒性(CDC)。此類功能可藉由(例如)使Fc區結合至具有吞噬或溶解活性之免疫細胞上之Fc受體或藉由使Fc區結合至補體系統之組分實現。通常，由Fc結合細胞或補體組分介導之該(等)效應導致CD47靶向細胞之抑制及/或耗竭。抗體之Fc區可募集Fc受體(FcR)表現細胞且將其等與塗覆抗體之靶細胞並列。表現用於IgG之表面FcR (包括FcγRIII (CD16)、FcγRII (CD32)及FcγRIII (CD64))之細胞可充當用於破壞塗覆IgG之細胞之效應細胞。此等效應細胞包括單核細胞、巨噬細胞、天然殺手(NK)細胞、嗜中性粒細胞及嗜酸性粒細胞。IgG與FcγR接合會活化ADCC或ADCP。ADCC係由CD16+效應細胞經分泌膜孔形成蛋白及蛋白酶介導，而吞噬作用係由CD32+及CD64+效應細胞介導(參見Fundamental Immunology，第4版，Paul編，Lippincott-Raven，N.Y.，1997，第3、17及30章；Uchida等人，J. Exp. Med. 199:1659-69，2004；Akewanlop等人，Cancer Res. 61:4061-65，2001；Watanabe等人，Breast Cancer Res. Treat. 53:199-207，1999)。

【0207】除了ADCC及ADCP外，細胞結合之抗體之Fc區亦可活化補體傳統路徑以引起CDC。在抗體與抗原複合時，補體系統之C1q結合至

抗體之Fc區。C1q結合至細胞結合之抗體可引發與C4及C2蛋白水解活化以產生C3轉化酶有關的一連串事件。C3經C3轉化酶裂解為C3b可活化末端補體組分，包括C5b、C6、C7、C8及C9。此等蛋白共同地於塗覆抗體之細胞上形成膜攻擊(membrane-attack)複雜孔。此等孔破壞細胞膜完整性，殺死靶細胞(參見Immunobiology，第6版，Janeway等人，Garland Science，N. Y.，2005，第2章)。

【0208】 術語「抗體依賴型細胞毒性」或「ADCC」係指用於引起細胞死亡之機制，其取決於塗覆抗體之靶細胞與具有溶解活性之免疫細胞(亦稱為效應細胞)相互作用。此等效應細胞包括天然殺手細胞、單核細胞/巨噬細胞及嗜中性粒細胞。該等效應細胞經由其抗原組合位點連接至Ig之結合至靶細胞之Fc區。塗覆抗體之靶細胞之死亡因效應細胞活性而發生。在某些示例性實施例中，本發明之抗-CD47 IgG1抗體介導相對親本抗體及/或相對抗-CD47 IgG3抗體相當或增加之ADCC。

【0209】 術語「抗體依賴型細胞吞噬作用」或「ADCP」係指塗覆抗體之細胞藉由結合至Ig之Fc區之吞噬免疫細胞(例如，藉由巨噬細胞、嗜中性粒細胞及/或樹突細胞)完全或部分地內部化之過程。在某些示例性實施例中，本發明之抗-CD47 IgG1抗體介導相對親本抗體及/或相對抗-CD47 IgG3抗體相當或增加之ADCP。

【0210】 術語「補體依賴型細胞毒性」或「CDC」係指用於引起細胞死亡之機制，其中標靶結合之抗體之Fc區活化一系列酶反應，使靶細胞膜中之孔之形成達到最佳。

【0211】 通常，抗原-抗體複合物(諸如彼等於塗覆抗體之靶細胞上者)結合並活化補體組分C1q，此繼而活化補體級聯從而導致靶細胞死

亡。補體之活化亦可導致補體組分於靶細胞表面上之沉積，此藉由結合白血球上之補體受體(例如CR3)促進ADCC。

【0212】 「細胞毒性效應」係指靶細胞之耗竭、消除及/或殺死。「細胞毒性劑」係指於細胞具有細胞毒性效應，藉此介導靶細胞之耗竭、消除及/或殺死之化合物。在某些實施例中，細胞毒性劑係與抗體共軛或係以與抗體組合方式投與。本文進一步描述適宜之細胞毒性劑。

【0213】 「細胞生長抑制效應」係指細胞增殖之抑制作用。「細胞生長抑制劑」係指於細胞具有細胞生長抑制效應，藉此介導特定細胞類型及/或細胞亞類之生長及/或增殖之抑制作用之化合物。本文進一步描述適宜之細胞生長抑制劑。

【0214】 本文中術語「表現單元」及「表現序列盒」可互換使用且表示編碼所述多肽之核酸片段且於宿主細胞中能夠表現該核酸片段。表現單元通常包括轉錄啟動子、編碼所述多肽之開放閱讀框架及可以操作方式連接之轉錄終止子。除了轉錄啟動子及終止子外，表現單元可進一步包括其他核酸片段，諸如(例如)增強子或聚腺苷酸化訊息。

【0215】 術語「表現載體」係指包括一或多個表現單元之直鏈或圓形核酸分子。除了一或多個表現單元外，表現載體亦可包括額外核酸片段，諸如(例如)一或多個複製源或一或多個可選擇標記物。

【0216】 表現載體一般係衍生自血漿或病毒DNA，或可包含二者之成員。

【0217】 術語「患者」或「個體」包括接受預防性或治療性治療中任一者之人類及其他哺乳動物個體，諸如非人類的靈長類動物、兔、大鼠、小鼠及類似物及其轉基因物種。在某些示例性實施例中，個體為罹患

或處在發展癌症(例如實體腫瘤)風險中的人類患者，癌症視情況分泌能夠裂解本文所述抗-CD47抗體之掩蔽域(例如捲曲螺旋掩蔽域)之一或多種蛋白酶。

【0218】 在藉由投與如本文所述之抗-CD47抗體治療CD47表現疾病的內文中，術語「有效量」係指此抗體足以抑制CD47相關疾病(例如CD47表現癌症)之一或多種症狀發生或改善該一或多種症狀的量。抗體之有效量係以「有效療法」方式投與。術語「有效療法」係指足夠達成疾病之預防性或治療性治療(例如CD47表現癌症之預防性或治療性治療)之所投與抗體的量及給藥頻率之組合。

【0219】 術語「醫藥上可接受」意指由聯邦或州政府之管理機構或可由聯邦或州政府之管理機構核准或在美國藥典或用於動物中且更特定言之用於人類中之其他基本上認可之藥典中列出者。術語「醫藥上相容之成分」係指調配抗-CD47抗體的醫藥上可接受之稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑。

【0220】 片語「醫藥上可接受之鹽」係指醫藥上可接受之有機或無機鹽。示例性鹽包括硫酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸式磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、單寧酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、馬來酸鹽、龍膽酸鹽、富馬酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡萄糖醛酸鹽、蔗糖鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽及雙羥萘酸鹽(即1,1'-亞甲基雙-(2-羥基-3-萘酸鹽)。醫藥上可接受之鹽可進一步包含另一分子，諸如(例如)乙酸根離子、琥珀酸根離子或其他抗衡離子。抗衡離子

可為安定親本化合物上的電荷之任何有機或無機部分。另外，醫藥上可接受之鹽於其結構中可具有超過一個帶電原子。多個帶電原子為醫藥上可接受之鹽之部分的實例可具有多個抗衡離子。因此，醫藥上可接受之鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個抗衡離子。

【0221】 除非於內文中另外顯示，否則當值以「約」X或「近似」X表示時，所述X值應理解為精確至 $\pm 10\%$ 。

【0222】 於本發明內文中之溶劑合物為本發明化合物之經與溶劑分子配位形成固態或液態之複合物之其等形式。水合物為溶劑合物之一種特定形式，其中該配位係利用水進行。在某些示例性實施例中，在本發明之內文中，溶劑合物為溶劑合物。

【0223】 術語「血球凝集」係指紅血球聚集在一起的過程。血球凝集係本技術中抗-CD47抗體之已知的非所欲的副作用。本發明之人類化抗-CD47抗體視需要介導相對鼠類親本抗-CD47抗體及/或相對本技術中已知的一或多種抗-CD47抗體減少的血球凝集。

II. 抗-CD47抗體及抗原結合片段

【0224】 本發明提供經分離之重組及/或合成抗-CD47人類、靈長類、嚙齒動物、哺乳動物、嵌合、人類化及/或CDR接枝型抗體及其抗原結合片段、以及包括編碼一個抗-CD47抗體分子之至少一部分的至少一種多核苷酸之組合物及核酸分子。本發明進一步包括(但不限於)製備及使用此等核酸及抗體之方法，包括診斷性及治療性組合物、方法及裝置。在某些示例性實施例中，提供人類化抗-CD47 IgG1抗體。在其他示例性實施例中，提供經掩蔽之人類化抗-CD47 IgG1抗體。又於其他示例性實施例中，提供包含短胺基酸殘基之人類化抗-CD47 IgG1抗體。

【0225】 在本發明之特定實施例中，提供人類化抗-CD47抗體，其具有如下活性中之一或多者：1)相對參考抗體(例如鼠類親本抗體)增強之抗原結合；2)相對參考抗體(例如鼠類親本抗體)增強之抗體依賴型細胞毒性(ADCC)；3)相對參考抗體(例如鼠類親本抗體)增強之吞噬作用(例如抗體依賴型細胞吞噬作用(ADCP))；4)相對參考抗體(例如鼠類親本抗體)減少之血球凝集(HA)；5)結合至三維(即非線性) CD47抗原決定基。

【0226】 本發明之示例性抗-CD47抗體及其抗原結合片段包含如下CD47抗體重鏈/輕鏈對：hB6H12.1 – hvH1 / hvK1；hB6H12.2 – hvH1 / hvK2；hB6H12.3 – hvH1 / hvK3；hB6H12.4 – hvH1 / hvK4；hB6H12.5 – hvH2 / hvK1；hB6H12.6 – hvH2 / hvK2；hB6H12.7 – hvH2 / hvK3；hB6H12.8 – hvH2 / hvK4；hB6H12.9 – hvH3 / hvK1；hB6H12.10 – hvH3 / hvK2；hB6H12.11 – hvH3 / hvK3；hB6H12.12 – hvH3 / hvK4；hB6H12.13 – hvH4 / hvK1；hB6H12.14 – hvH4 / hvK2；hB6H12.15 – hvH4 / hvK3；hB6H12.16 – hvH4 / hvK4；hB6H12.17 – hvH5 / hvK1；hB6H12.18 – hvH5 / hvK2；hB6H12.19 – hvH5 / hvK3；hB6H12.20 – hvH5 / hvK4；hB6H12.21 – hvH6 / hvK1；hB6H12.22 – hvH6 / hvK2；hB6H12.23 – hvH6 / hvK3；hB6H12.24 – hvH6 / hvK4；hB6H12.3 (脫醯胺突變體) – hvH1 / hvK3 G91A；Ab47 – HV3-7/HJ4 / KV3D-11/KJ1；及mB6H12 – vH1 / vL。示例性抗-CD47抗體重鏈可變區序列、輕鏈可變區、重鏈CDR及輕鏈CDR可參見表1-表6。示例性人類化抗-CD47抗體之重鏈及輕鏈之胺基酸序列可參見表7。

表1.衍生自鼠類B6H12抗體之重鏈可變序列。Kabat CDR為加底線，及IMGT CDR為粗體。

變體	序列
mB6h12 vH	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSSWVRQTPDKRLEWVA <u>TIT</u> <u>SGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQIDSLKSEDTAIYFCARSLAGNAM</u> <u>DYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO:1)</u>
Ab47vH (HV3-7/HJ4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSSWVRQAPGKGLEWVA <u>TIT</u> <u>SGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLAGNA</u> <u>MDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO:2)</u>
hvH1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSSWVRQAPGKRLEWVA <u>TIT</u> <u>SGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAIYFCARSLAGNA</u> <u>MDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO:3)</u>
hvH2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSSWVRQAPGKGLEWVA <u>TITS</u> <u>GGTYTYYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARSLAGNAM</u> <u>DYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO:4)</u>
hvH3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSSWVRQAPGKGLEWVA <u>TITS</u> <u>GGTYTYYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQINSLRAEDTAVYFCARSLAGNAM</u> <u>DYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO:5)</u>
hvH4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMNSWVRQAPGKGLEWVA <u>TIT</u> <u>SGGTYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLAGNA</u> <u>MDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO:6)</u>
hvH5	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSSWVRQAPGKGLEWVA <u>TIT</u> <u>SGGTYTYYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQINSLRAEDTAVYYCARSLAGNA</u> <u>MDYWGQGTSLVTVSS (SEQ ID NO:7)</u>
hvH6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWSWVRQAPGKGLVWVA <u>TIT</u>

<u>SGGTYTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSLAGNA</u> <u>MDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:8)</u>

表2.衍生自鼠類B6H12抗體之輕鏈可變序列。Kabat CDR為加底線，及IMGT CDR為粗體。

變體	序列
mB6h12 vL	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCR <u>ASQTISDYLHWY</u> QQKSHESPRLLIK <u>FASQSI</u> <u>SGIPSRFSGSGSGSDFTL</u> SINSVEPEDVGVYYC <u>QNGHGFPRT</u> FGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:9)
Ab47vL (KV3D- 11/KJ1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR <u>ASQTISDYLHWY</u> QQKPGQAPRLLIK <u>FASQSI</u> GIPARFSGSGSGTDFTLTISLPEPDAVYYC <u>QNGHGFPRT</u> FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:10)
hvK1	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLT <u>CRASQTISDYLHWY</u> QQKPDQSPKLLIK <u>FASQS</u> <u>ISGVPSRFSGSGSGTDFTL</u> TINSLEAEDAAYYYC <u>QNGHGFPRT</u> FGQGTKLEIK(R) (SEQ ID NO:11)
hvK2	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLT <u>CRASQTISDYLHWY</u> QQKPDQSPKLLIK <u>FASQS</u> <u>ISGVPSRFSGSGSGTDFTL</u> TINSLEAEDAATYYC <u>QNGHGFPRT</u> FGQGTKLEIK(R) (SEQ ID NO:12)
hvK3	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLT <u>CRASQTISDYLHWY</u> QQKPDQSPKLLIK <u>FASQS</u> <u>ISGVPSRFSGSGSGSDFTL</u> TINSLEAEDAATYYC <u>QNGHGFPRT</u> FGQGTKLEIK(R) (SEQ ID NO:13)
hvK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTLT <u>CRASQTISNYLA</u> WYQQKPGKVPKLLIK <u>FASL</u> <u>QSGVPSRFSGSGSGSDFTL</u> TISSLOPEDVATYYC <u>QNGHGFPRT</u> FGQGTKLEIK(R) (SEQ ID NO:14)

hvK3 (G91A)	EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLT <u>CRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQS</u> <u>ISGVPSRFSGSGSGSDFLTINSLEAEDAATYYCQNAHGFPR</u> TFGQGTKLEIKR (SEQ ID NO:15)
-------------	--

表3.變體抗體之重鏈CDR序列(Kabat)。

CDR	序列
hvH1 & hvH5 HCDR1 (Kabat)	GYGMS (SEQ ID NO:16)
hvH1 HCDR2 (Kabat)	TITSGGTYTYYPDSVKG (SEQ ID NO:17)
hvH1- hvH6 HCDR3 (Kabat)	SLAGNAMDY (SEQ ID NO:18)
hvH2 & hvH3 HCDR1 (Kabat)	SYAMS (SEQ ID NO:19)
hvH2、hvH3及hvH5 HCDR2(Kabat)	TITSGGTYTYADSVKG (SEQ ID NO:20)
hvH4 HCDR1 (Kabat)	SYGMN (SEQ ID NO:21)
hvH4 HCDR2 (Kabat)	TITSGGTYIYADSVKG (SEQ ID NO:22)
hvH6 HCDR1 (Kabat)	SYGMH (SEQ ID NO:23)
hvH6 HCDR2 (Kabat)	TITSGGTYTSYADSVKG (SEQ ID NO:24)

表4.變體抗體之重鏈CDR序列(IMG T)。

CDR	序列
hvH1 & hvH5 HCDR1 (IMG T)	GFTFSGYG (SEQ ID NO:25)
hvH1-hvH3、hvH5-hvH6 HCDR2 (IMG T)	ITSGGTYT (SEQ ID NO:26)
hvH1- hvH6 HCDR3 (IMG T)	ARSLAGNAMDY (SEQ ID NO:27)
hvH2 & hvH3 HCDR1 (IMG T)	GFTFSSYA (SEQ ID NO:28)
hvH4 & hvH6 HCDR1 (IMG T)	GFTFSSYG (SEQ ID NO:29)
hvH4 HCDR2 (IMG T)	ITSGGTYI (SEQ ID NO:30)

表5.變體抗體之輕鏈CDR序列(Kabat)。

CDR	序列
hvK1-hvK3 LCDR1 (Kabat)	RASQTISDY LH (SEQ ID NO:31)
hvK1-hvK3 LCDR2 (Kabat)	FASQ SIS (SEQ ID NO:32)
hvK1- hvK4 LCDR3 (Kabat)	QNGHGFPRT (SEQ ID NO:33)
hvK4 LCDR1 (Kabat)	RASQTISNYLA (SEQ ID NO:34)
hvK4 LCDR2 (Kabat)	FASTLQS (SEQ ID NO:35)
hvK3 (G91A) LCDR3 (Kabat)	QNAHGFPRT (SEQ ID NO:36)

表6.變體抗體之輕鏈CDR序列(IMGT)。

CDR	序列
hvK1-hvK3 LCDR1 (IMGT)	QTISDY (SEQ ID NO:37)
hvK1-hvK4 LCDR2 (IMGT)	FAS (SEQ ID NO:38)
hvK1- hvK4 LCDR3 (IMGT)	QNGHGFPRT (SEQ ID NO:39)
hvK4 LCDR1 (IMGT)	QTISNY (SEQ ID NO:40)
hvK3 (G91A) LCDR3 (IMGT)	QNAHGFPRT (SEQ ID NO:41)

表7.根據本發明之一個較佳實施例之經掩蔽之抗-CD47抗體之完整重鏈及輕鏈序列。重鏈及輕鏈序列為純文字(分別係SEQ ID NO:42及43)，掩蔽序列為粗體文字，及蛋白酶裂解序列為加底線。

抗體鏈	序列
重鏈	<p>QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLG<u>SIPVSLRS</u>GEVQLLE</p> <p>SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMSWVRQAPGKRLEWVATITSGGTYTYYPD</p> <p>SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIFYCARSLAGNAMDYWGQGLVTVSS</p> <p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL</p> <p>QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA</p>

	<p>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK (SEQ ID NO:42)</p>
重鏈掩蔽 序列	<p>QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLG (SEQ ID NO:94)</p>
輕鏈	<p>QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGS<u>IPVSLRSGEIV</u>MTQ SPDFQSVTPKEKVTLTCSRASQTISDYLHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSISGVPSRFSG SGSGSDFTLTINSLEAEDAATYYCQNGHGFPRTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:43)</p>
輕鏈掩蔽 序列	<p>QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGS (SEQ ID NO:95)</p>

hB6H12.1

【0227】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:3描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:11描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:16、17及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:25、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:11。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:3具有至少約80%的同源

性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:11具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.2

【0228】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:3描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:12描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:16、17及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:25、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:12。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:3具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:12具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.3

【0229】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:3描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:13描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:16、17及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之

輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:25、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:13。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:3具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:13具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.4

【0230】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:3描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:14描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:16、17及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:34、35及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:25、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:40、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:14。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:3具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:14具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.5

【0231】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:4描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:11描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:19、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:28、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:4/SEQ ID NO:11。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:4具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:11具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.6

【0232】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:4描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:12描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:19、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:28、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:4/SEQ ID NO:12。在其他實施例中，抗-

CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:4具有至少約80%的同源性或同一性(例如, 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:12具有至少約80%的同源性或同一性(例如, 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.7

【0233】 在某些示例性實施例中, 抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括以SEQ ID NO:4描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:13描述之LCVR之CDR。在其他實施例中, 抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:19、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中, 抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:28、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中, 抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:4/SEQ ID NO:13。在其他實施例中, 抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:4具有至少約80%的同源性或同一性(例如, 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:13具有至少約80%的同源性或同一性(例如, 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.8

【0234】 在某些示例性實施例中, 抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:4描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:14描述之LCVR之CDR。在其他實施例中, 抗-CD47抗體或其抗原結合片段

包括SEQ ID NO:19、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:34、35及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:28、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:40、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:4/SEQ ID NO:14。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:4具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:14具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.9

【0235】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:5描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:11描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:19、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:28、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:5/SEQ ID NO:11。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:5具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:11具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.10

【0236】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:5描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:12描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:19、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:28、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:5/SEQ ID NO:12。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:5具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:12具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.11

【0237】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:5描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:13描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:19、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:28、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括

HCVR/LCVR對SEQ ID NO:5/SEQ ID NO:13。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:5具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:13具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.12

【0238】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:5描述之HCVR之CDR及/或以SEQ ID NO:14描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:19、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:34、35及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:28、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:40、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:5/SEQ ID NO:14。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:5具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:14具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.13

【0239】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:6描述之CDR及/或來自以SEQ ID NO:11描述之

LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:21、22及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:29、30及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:6/SEQ ID NO:11。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:6具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:11具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.14

【0240】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:6描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:12描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:21、22及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:29、30及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:6/SEQ ID NO:12。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:6具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:12具有至少約

80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.15

【0241】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:6描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:13描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:21、22及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:29、30及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:6/SEQ ID NO:13。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:6具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:13具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.16

【0242】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:6描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:14描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:21、22及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:34、35及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:29、30及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:40、38及39之輕鏈

CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:6/SEQ ID NO:14。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:6具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:14具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.17

【0243】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:7描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:11描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:16、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:25、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:11。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:7具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:11具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.18

【0244】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段

包括來自以SEQ ID NO:7描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:12描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:16、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:25、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:12。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:7具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:12具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.19

【0245】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:7描述之HCVR之CDR及/或以SEQ ID NO:13描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:16、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:25、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:13。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:7具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或

99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:13具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.20

【0246】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:7描述之HCVR之CDR及/或以SEQ ID NO:14描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:16、20及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:34、35及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:25、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:40、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:14。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:7具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:14具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.21

【0247】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:8描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:11描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:23、24及18之重鏈CDR及/SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID

NO:29、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:11。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:8具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:11具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.22

【0248】在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:8描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:12描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:23、24及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:29、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:12。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:8具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:12具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.23

【0249】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:8描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:13描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:23、24及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:29、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:13。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:8具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:13具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.24

【0250】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:8描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:14描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:23、24及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:34、35及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:29、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:40、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:8/SEQ ID NO:14。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:8具有至少約80%的同源

性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:14具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

hB6H12.3 G91A

【0251】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:3描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:15描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:16、17及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:34、35及36之輕鏈CDR；在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:25、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:40、38及41之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:15。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:3具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:15具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

Ab47

【0252】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:2描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:10描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:16、17及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之

輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:25、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:2/SEQ ID NO:10。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:2具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:10具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

mB6H12

【0253】 在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括來自以SEQ ID NO:1描述之HCVR之CDR及/或來自以SEQ ID NO:9描述之LCVR之CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:16、17及18之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:31、32及33之輕鏈CDR。在一些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括SEQ ID NO:25、26及27之重鏈CDR及/或SEQ ID NO:37、38及39之輕鏈CDR。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括HCVR/LCVR對SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:9。在其他實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段包括與SEQ ID NO:1具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之HCVR及/或包括與SEQ ID NO:9具有至少約80%的同源性或同一性(例如，80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)之LCVR。

【0254】 本文所述之抗-CD47抗體及其抗原結合片段可以修飾形式表現。例如，可將額外胺基酸(特別是帶電胺基酸)區域添加至抗-CD47抗體或其抗原結合片段的N端以改良在宿主細胞中於純化期間或於隨後的處理及儲存期間之安定性及持續性。此外，可將肽部分添加至本發明之抗-CD47抗體或其抗原結合片段以增進純化。此等區域可於最後製備抗體分子或其至少一個片段之前移去。此類方法描述在許多標準實驗室手冊，諸如Sambrook，同前述；Ausubel等人編，*Current Protocols In Molecular Biology*，John Wiley & Sons, Inc.，NY，N.Y.(1987-2001)中。

【0255】 本文所述之抗-CD47抗體或其抗原結合片段通常以 ≤ 1 μM ，例如， ≤ 100 nM，較佳 ≤ 10 nM，且更佳 ≤ 1 nM之平衡結合常數結合CD47，如使用標準結合檢定(例如Biacore結合檢定)測得。

【0256】 本發明之抗體分子可相對於參考抗-CD47抗體(例如，B6H12、2D3、MABL、CC2C6或BRIC126)表徵分析。抗體B6H12描述在(例如)美國專利第5,057,604號及第9,017,675號中，係購自Abcam，PLC，Santa Cruz Biotechnology, Inc.及eBioscience, Inc。

糖基化變體

【0257】 抗-CD47抗體及其抗原結合片段可在其恒定區中的保守位置糖基化(Jefferis及Lund，(1997) *Chem.Immunol.*65:111-128；Wright及Morrison，(1997) *TibTECH* 15:26-32)。免疫球蛋白之寡醣側鏈影響蛋白功能(Boyd等人，(1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318；Wittwe及Howard，(1990) *Biochem.* 29:4175-4180)及醣蛋白之部分間之分子間相互作用，該相互作用可影響醣蛋白之構形且呈現醣蛋白之三維表面(Jefferis及Lund，同前述；Wyss及Wagner，(1996) *Current Op. Biotech.*

7:409-416)。寡醣亦可用於根據特定識別結構將所給醣蛋白靶向特定分子。例如，已報告在非半乳糖基化IgG中，寡醣部分從間-CH₂空間中「翻」出來且末端N-乙醯胺基葡萄糖殘基變得可結合甘露糖結合蛋白(Malhotra等人，(1995) *Nature Med.* 1:237-243)。自產生於中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中之CAMPATH-1H (識別人類淋巴細胞之CDw52抗原之重組人類化鼠類單株IgG1抗體)移除寡醣之糖肽酶導致補體介導之溶解之完全減少(CMCL)(Boyd等人，(1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318)，然而，使用神經胺糖酸酶選擇性移除唾液酸殘基未導致DMCL損失。已報告抗體之糖基化會影響抗體依賴型細胞毒性(ADCC)。特定言之，報告由四環素調節 $\alpha(1,4)$ -N-乙醯葡萄糖胺基轉移酶III (GnTIII)(一種催化平分型GlcNAc之形成之醣基轉移酶)之表現之CHO細胞具有改良之ADCC活性(Umana等人，(1999) *Mature Biotech.* 17:176-180)。

【0258】 抗體之糖基化通常係N-連接或O-連接。N-連接係指將碳水化合物部分附接於天冬醯胺酸殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-蘇胺酸(其中X為任何胺基酸，脯胺酸除外)係碳水化合物部分與天冬醯胺酸側鏈進行酶附接之識別序列。因此，此等三肽序列中任一者於多肽中之存在皆創造潛在糖基化位點。O-連接糖基化係指將糖N-乙醯胺基半乳糖、半乳糖或木糖之一者附接於羥胺基酸，最常見為絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥脯胺酸或5-羥離胺酸。

【0259】 抗體之糖基化變體為抗體之糖基化模式改變之變體。改變意指刪除於抗體中發現的一或多個碳水化合物部分，添加一或多個碳水化合物部分至抗體，改變糖基化之組成(糖基化模式)、糖基化之程度等。

【0260】 糖基化位點於抗-CD47抗體或其抗原結合片段之添加可藉

由改變胺基酸序列使其包含上述三肽序列(提供N-連接糖基化位點)之一或多者來達成。該改變亦可藉由在原始抗體序列上添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基或被該等取代(提供O-連接糖基化位點)來實現。類似地，糖基化位點之移除可藉由於抗體之天然糖基化位點內之胺基酸改變來達成。

【0261】 胺基酸序列係通常藉由改變基本核酸序列而改變。此等方法包括分離自天然來源(在天然生成胺基酸序列變體之情況中)，或藉由對初期製備的抗體之變體或非變體形式進行寡核苷酸介導之(或定位)突變作用、PCR突變作用及序列盒突變作用而製備。

【0262】 亦可改變抗體之糖基化(包括糖基化模式)而不改變胺基酸序列或基本核苷酸序列。糖基化主要取決於用於表現抗體之宿主細胞。由於用於表現重組醣蛋白(例如抗體，作為潛在療法)之細胞類型很少為天然細胞，故可預期抗體之糖基化模式顯著改變。參見，例如，Hse等人，(1997) *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070。除了宿主細胞之選擇外，於重組產生抗體期間影響糖基化之因素包括生長模式、培養基調配、培養密度、氧合、pH、純化方案及類似因素。已提出多種方法以改變在特定宿主生物體中達成的糖基化模式，包括引入或過度表現與寡醣之產生有關的特定酵素(美國專利第5047335號；第5510261號；第5278299號)。糖基化或特定類型之糖基化可自醣蛋白(例如)使用醣苷內切酶H (Endo H)酶促移除。此外，重組宿主細胞可基因改造，例如，造成在處理某些類型之多醣中有缺陷。本技術中熟知此等及類似之技術。

【0263】 抗體之糖基化結構可藉由使用高pH陰離子交換層析基於電荷分離寡醣之習知碳水化合物分析技術(包括凝集素層析、NMR、質譜法、HPLC、GPC、單醣組成分析、連續酶消化及HPAEC-PAD)輕易地分

非還原端側具有高甘露糖N-糖苷-連接糖鏈及複合物N-糖苷-連接糖鏈之兩個分支。D

【0267】 在一些實施例中，「複合物N-糖苷-連接糖鏈」包括複合物類型，其中核心結構之非還原端側具有半乳糖-N-乙醯胺基葡萄糖(亦稱為「gal-GlcNAc」)之零、一或多個分支及Gal-GlcNAc之非還原端側視情況進一步具有諸如唾液酸、平分型N-乙醯胺基葡萄糖或類似之結構。

【0268】 根據本發明方法，人類化或嵌合抗體之複合物N-糖苷-連接糖鏈中通常僅併入少量的岩藻糖。例如，在各種實施例中，抗體之分子之小於約60%、小於約50%、小於約40%、小於約30%、小於約20%、小於約15%、小於約10%、小於約5%或小於約3%具有由岩藻糖所致之核心岩藻糖基化。在一些實施例中，抗體之分子之約2%具有由岩藻糖所致之核心岩藻糖基化。

【0269】 在某些實施例中，複合物N-糖苷-連接糖鏈中僅併入少量的岩藻糖類似物(或岩藻糖類似物之代謝產物或產物)。例如，在各種實施例中，人類化或嵌合抗體之小於約60%、小於約50%、小於約40%、小於約30%、小於約20%、小於約15%、小於約10%、小於約5%或小於約3%具有由岩藻糖類似物或岩藻糖類似物之代謝產物或產物所致之核心岩藻糖基化。在一些實施例中，人類化或嵌合抗體之約2%具有由岩藻糖類似物或岩藻糖類似物之代謝產物或產物所致之核心岩藻糖基化。

【0270】 藉由用岩藻糖類似物培養產生抗體之細胞製備非岩藻糖基化抗體之方法述於(例如)WO2009/135181中。簡言之，在岩藻糖類似物或岩藻糖類似物之細胞內代謝產物或產物的存在下培養已經過改造以表現人

類化或嵌合抗體之細胞。細胞內代謝產物可為(例如) GDP-修飾之類似物或完全或部分去酯化之類似物。產物可為(例如)完全或部分去酯化之類似物。在一些實施例中，在岩藻糖補救路徑中岩藻糖類似物可抑制酵素。例如，岩藻糖類似物(或岩藻糖類似物之細胞內代謝產物或產物)可抑制岩藻糖激酶或GDP-岩藻糖-焦磷酸化酶之活性。在一些實施例中，岩藻糖類似物(岩藻糖類似物之或細胞內代謝產物或產物)抑制岩藻糖轉移酶(較佳係1,6-岩藻糖轉移酶，例如，FUT8蛋白)。在一些實施例中，岩藻糖類似物(或岩藻糖類似物之細胞內代謝產物或產物)可抑制岩藻糖重新合成途徑中酵素之活性。例如，岩藻糖類似物(或岩藻糖類似物之細胞內代謝產物或產物)可抑制GDP-甘露糖4,6-去水酶及/或GDP-岩藻糖合成酶之活性。在一些實施例中，岩藻糖類似物(或岩藻糖之細胞內代謝產物或產物)可抑制岩藻糖轉運體(例如，GDP-岩藻糖轉運體)。

【0271】 在一個實施例中，該岩藻糖類似物為2-氟岩藻糖。例如在WO/2009/135181中揭示將岩藻糖類似物用於生長培養基及其他岩藻糖類似物中之方法，該案件係以引用的方式併入本文中。

【0272】 用於改造細胞系以減少核心岩藻糖基化之其他方法包括基因剔除、基因敲入及RNA相互作用(RNAi)。在基因剔除中，編碼FUT8(α 1,6-岩藻糖轉移酶酵素)之基因失活。FUT8催化岩藻糖基殘基自GDP-岩藻糖轉移至N-聚糖之Asn-連接(N-連接) GlcNac之位置6。報告FUT8為負責將岩藻糖添加至Asn297之N-連接雙觸碳水化合物化合物的唯一酵素。基因敲入添加編碼酵素諸如GNTIII或Golgi α 甘露糖苷酶II之基因。細胞中此等酵素之含量之增加產生來自岩藻糖基化路徑(導致減少的核心岩藻糖基化)且具有增加量之平分型N-乙醯胺基葡萄糖之單株抗體。RNAi通常亦靶

向FUT8基因表現，導致降低的mRNA轉錄本水平或完全剔除基因表現。此等方法中任一方法可用於生成能夠產生非岩藻糖基化抗體(例如，人類化或嵌合抗體)之細胞系。

【0273】許多方法可用於確定抗體上岩藻糖基化的量。方法包括(例如)藉由PLRP-S層析及電噴霧電離四極TOF MS之LC-MS。

捲曲螺旋掩蔽劑

【0274】在本發明之某些實施例中，抗-CD47抗體或其抗原結合片段與防止抗-CD47抗體或其抗原結合片段結合至CD47之捲曲螺旋掩蔽劑(亦稱為「捲曲螺旋掩蔽域」或「掩蔽域」)有關。在各種實施例中，與掩蔽域有關的抗-CD47抗體或其抗原結合片段稱為「經掩蔽之抗體」。

【0275】捲曲螺旋為蛋白質及肽中的結構組元，其中兩個或更多個 α -螺旋線彼此纏繞形成超螺旋。一個捲曲螺旋束中有兩個、三個或四個螺旋且該等螺旋可以相同(平行)方向或以相反(反平行)方向運行。

【0276】捲曲螺旋通常包括三個及四個殘基之序列元件，其疏水性模式及殘基組成物與兩性 α -螺旋線之結構相容。交替的三個及四個殘基序列元件構成七聯體重複序列，其中該等胺基酸命名為「a」、「b」、「c」、「d」、「e」、「f」及「g」。於位置「a」及「d」中的殘基一般係疏水性且形成旋鈕及孔之鋸齒形模式(a zig-zag pattern of knobs and holes)，旋鈕及孔與另一股上的類似模式互鎖形成緊定疏水性核心。在剩餘的殘基中，「b」、「c」及「f」易於帶電。因此，七聯體重複序列之形成取決於特定位置之處所需的疏水性及電荷物理性質，而非特定胺基酸。在某些示例性實施例中，本發明之捲曲螺旋係由兩個捲曲螺旋形成肽形成。

【0277】捲曲螺旋形成肽中之七聯體重複序列之共識式子之實例由

W02011034605提供，該案件出於所有目的以其全文引用的方式併入本文中。

【0278】 下文描述根據特定實施例之示例性共識式子：

式1： $(X1、X2、X3、X4、X5、X6、X7)_n$ ，其中：

X1為疏水性胺基酸或天冬醯胺酸；

X2、X3及X6為任何胺基酸；

X4為疏水性胺基酸；

X5及X7各為帶電胺基酸殘基；及

n為正整數。

式2： $(X1'、X2'、X3'、X4'、X5、X6、X7)_n$ ，其中：

X1'為疏水性胺基酸或天冬醯胺酸；

X2'、X'3及X'6各為任何胺基酸殘基；

X4'為疏水性胺基酸；

X5'及X7'各為帶電胺基酸殘基；

其中式1及2中之n大於或等於2；及

n為正整數。

【0279】 在其中式1及式2之肽形成捲曲螺旋之某些實施例中，式1之X5與式2之X'7帶電相反，且式1之X7與式2之X'5帶電相反。按照式1及/或2，捲曲螺旋形成肽中之七聯體重複序列可彼此相同或不同。

【0280】 捲曲螺旋可為同源二聚或異源二聚。可形成根據某些示例性實施例之捲曲螺旋之肽之實例顯示於表8中。肽序列可單獨使用，或其組分可以其他組合方式使用。例如，Vel捲曲螺旋形成肽可與其他連接子序列一起使用。輕鏈之所顯示序列亦可與重鏈一起使用且反之亦然。

【0281】 在某些示例性實施例中，提供包括兩個輕鏈及重鏈對之二價抗體，其中輕鏈及/或重鏈中一者或多者之N端經由包括蛋白酶裂解位點之連接子連接至捲曲螺旋形成肽，其締合形成捲曲螺旋，降低輕鏈及重鏈對對標靶之結合親和力。視情況，該等肽締合，未形成雙硫鍵。

【0282】 視情況，兩個輕鏈及重鏈對係相同的。視情況，兩個輕鏈及重鏈對係不同的。視情況，輕鏈包括輕鏈可變區及輕鏈恒定區及重鏈包括重鏈可變區及重鏈恒定區。視情況，重鏈區包括CH1區、鉸鏈區、CH2區及CH3區。視情況，兩個輕鏈連接至第一異源肽及兩個重鏈連接至第二異源肽。

【0283】 視情況，蛋白酶裂解位點為MMP1或MMP2裂解位點。

【0284】 視情況，標靶為CD47。

【0285】 視情況，藉由掩蔽劑(例如，捲曲螺旋掩蔽劑)之存在降低抗原結合至少100倍。視情況，藉由掩蔽劑(例如，捲曲螺旋掩蔽劑)之存在降低抗原結合200-1500倍。視情況，藉由掩蔽劑(例如，捲曲螺旋掩蔽劑)之存在減小共軛物之細胞毒性至少100倍。視情況，藉由掩蔽劑(例如，捲曲螺旋掩蔽劑)之存在減小共軛物之細胞毒性至少200-1500倍。

【0286】 視情況，捲曲螺旋形成肽以相同定向連接至重鏈及輕鏈之N端。視情況，捲曲螺旋形成肽以相反定向連接至重鏈及輕鏈之N端。視情況，捲曲螺旋形成肽之多個複本以串接方式連接至重鏈及輕鏈之N端。

【0287】 根據本發明某些實施例之示例性的捲曲螺旋形成肽連接子及蛋白酶位點顯示於圖34中。

【0288】 根據某些示例性實施例，使用包括SEQ ID NO:51 (於表8中之Vel LC)或由其組成之肽以提供包括蛋白酶裂解位點及連接至輕鏈N

端之捲曲螺旋形成肽之連接子，及使用序列SEQ ID NO:50 (於表8中之Vel HC)以提供包括蛋白酶裂解位點及連接至重鏈N端之捲曲螺旋形成肽之連接子，或反之亦然。包括此等序列之肽可連接至本文所揭示抗體中之任一者。

【0289】 在某些示例性實施例中，形成捲曲螺旋之變體肽中之胺基酸取代為保守性取代。在其他示例性實施例中，重複七聯體模式保留在變體肽中，藉此捲曲螺旋形成肽可細分為連續的七聯體片段，其遵循藉由胺基酸類型將式子(諸如式1及/或式2)中胺基酸佔據位置分類的該式子。在某些實施例中，每七聯體胺基酸中不存在超過1個或2個取代，且任何此等取代係保守的。在其他實施例中，變體與本文所述的捲曲螺旋形成肽可具有至少約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性，且能夠形成捲曲螺旋。

【0290】 形成捲曲螺旋之示例性肽述於表8A及表8B中。

表8A根據某些示例性實施例之掩蔽域序列。裂解序列為加底線。

掩蔽肽	序列
A2B1 HC	GASTSVDELQAEVDQLQDENYALKTKVAQLRKKVEKLSEGGGGG <u>PLGVRGGGG</u> S (SEQ ID NO:44)
A2B1 LC	GASTTVAQLRERVKTLRAQNYELESEVQRLREQVAQLASGGGGG <u>PLGVRGGGG</u> (SEQ ID NO:45)
M11 HC	LEIEAAFLERENTALETRVAELRQRVQRARNRVSQYRTRYGGGGG <u>PLGVRGGGG</u> (SEQ ID NO:46)
M11 LC	LEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLENEVSQYETRYGGGGG <u>PLGVRGGGG</u>

	(SEQ ID NO:47)
M15 HC	LEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQRVQRLRNIVSQYETRYGGGGGG <u>PLGVRGGGG</u> S (SEQ ID NO:48)
M15 LC	LEIEAAFLEQENTALETEVAELEQEVQRLENIVSQYETRYGGGGGG <u>PLGVRGGGG</u> S (SEQ ID NO:49)
Vel HC	GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLG <u>SIPVSLRSG</u> (SEQ ID NO:50)
Vel LC	GASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLG <u>SIPVSLRSG</u> (SEQ ID NO:51)
Fos-Jun HC	GALDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEFILAAHGGGGG <u>PLGVRGGG</u> GS (SEQ ID NO:52)
Fos-Jun LC	GARIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNYGGGGG <u>PLGVRG</u> GGGS (SEQ ID NO:53)
A4B4 HC	GKIAALKQKIAALKYKNAALKKKIAALKQGGGGG <u>PLGVRGGGGS</u> (SEQ ID NO:54)
A4B4 LC	GEIAALEQEIAALEKENAALEWEIAALEQGGGGG <u>PLGVRGGGGS</u> (SEQ ID NO:55)

表8B.根據特定示例性實施例之掩蔽域序列。裂解序列為加底線。包括EAC殘基。

掩蔽肽	序列
CA2B1 HC	EACGASTSVDELQAEVDQLQDENYALKTKVAQLRKKVEKLSEGGGGG <u>PLGVRG</u> GGGS (SEQ ID NO:75)
CA2B1 LC	EACGASTTVAQLRERVKTLRAQNYELESEVQRLREQVAQLASGGGGG <u>PLGVRGG</u> GGGS (SEQ ID NO:76)

CM11 HC	EACLEIEAAFLERENTALET RVAELRQRVQRARNRVSQYRTRYGGGGG <u>PLGVRGG</u> GGG (SEQ ID NO:77)
CM11 LC	EACLEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVQRLENEVSQYETRYGGGGG <u>PLGVRGG</u> GGG (SEQ ID NO:78)
CM15 HC	EACLEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQRVQRLRNIVSQYETRYGGGGG <u>PLGVRG</u> GGG (SEQ ID NO:79)
CM15 LC	EACLEIEAAFLEQENTALETEVAELEQEVQRLENIVSQYETRYGGGGG <u>PLGVRG</u> GGG (SEQ ID NO:80)
CVel HC	EACGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLG <u>SIPVSLRSG</u> (SEQ ID NO:81)
CVel LC	EACGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQAQLG <u>SIPVSLRSG</u> (SEQ ID NO:82)
CFos-Jun HC	EACGALDTLQAETDQLEDKKSALQTEIANLLKEKEKLEFILAAHGGGGG <u>PLGVR</u> GGGG (SEQ ID NO:83)
CFos-Jun LC	EACGARIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMNYGGGGG <u>PLG</u> <u>VRGGGG</u> (SEQ ID NO:84)
CA4B4 HC	EACGKIAALKQKIAALKYKNAALKKKIAALKQGGGGG <u>PLGVRGGGG</u> (SEQ ID NO:85)
CA4B4 LC	EACGEIAALEQEIAALEKENAALEWEIAALEQGGGGG <u>PLGVRGGGG</u> (SEQ ID NO:86)

連接子及裂解位點

【0291】 在本發明之某些實施例中，使用連接子以將捲曲螺旋掩蔽劑結合至抗-CD47抗體或其抗原結合片段。連接子可為習知上用作用於接

合肽域之連接子之胺基酸之任何片段。適宜之連接子之長度可改變，諸如1-20個、2-15個、3-12個、4-10個、5個、6個、7個、8個、9個或10個。一些此等連接子包括聚甘胺酸之片段。一些此等連接子包括一或多個絲胺酸殘基，通常在甘胺酸殘基兩側之位置。其他連接子包括一或多個丙胺酸殘基。甘胺酸及甘胺酸-絲胺酸聚合物係相對非結構化的，且因此可充當組件間之中性繫鏈。甘胺酸相比甚至丙胺酸進入顯著更多的phi-psi空間，且相比具有更長側鏈之殘基受限小得多(參見 Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992))。一些示例性連接子係呈形式S(G)_nS，其中n為5-20。其他示例性連接子為(G)_n、甘胺酸-絲胺酸聚合物(包括(例如)(GS)_n、(GSGGS)_n [(GSGGS)為SEQ ID NO:59)及(GGGS)_n，[(GGGS)為SEQ ID NO:60)，其中n為至少一的整數)、甘胺酸-丙胺酸聚合物、丙胺酸-絲胺酸聚合物及本技術中已知的其他可撓性連接子。連接子之一些實例為Ser-(Gly)₁₀-Ser (SEQ ID NO:61)、Gly-Gly-Ala-Ala (SEQ ID NO:62)、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:63)、Leu-Ala-Ala-Ala (SEQ ID NO:64)、Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO:65)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO:66)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO:67)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:68)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO:69)、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO:70)及類似物。

【0292】 蛋白酶位點較佳經識別且藉由細胞外表現之蛋白酶裂解，因此其接觸經掩蔽之抗體，釋放經掩蔽之抗體且允許其接觸其抗原，諸如受體細胞外域或可溶性配體。若干基質金屬蛋白酶位點(MMP1-28)係適宜的。MMP在組織再塑中發揮作用且與腫瘤性過程(諸如形態發生、血管生

成及轉移)相關。一些示例性蛋白酶位點為PLG-XXX (SEQ ID NO:71)(MMP之熟知內源性序列)、PLG-VR (SEQ ID NO:72)(W02014193973)及IPVSLRSG (SEQ ID NO:73)(Turk等人, Nat. Biotechnol., 2001, 19, 661-667)、LSGRSDNY (SEQ ID NO:74)(Cytomyx)及GPLGVR(SEQ ID NO:57)(Chang等人, Clin. Cancer Res.2012年1月1日; 18(1):238-47)。MMP之其他實例提供於US 2013/0309230、WO 2009/025846、WO 2010/081173、WO 2014/107599、WO 2015/048329、US 20160160263及Ratnikov等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111:E4148-E4155 (2014)中。

表9.蛋白酶裂解序列。MMP裂解位點由*表示,而uPA/間質蛋白酶/豆蛋白酶裂解位點由**表示。

裂解位點名稱	序列
M2	GPLG*VR** (SEQ ID NO:57)
IPV	IPVS*LR**SG (SEQ ID NO:58)

將捲曲螺旋掩蔽劑連接至抗-CD47抗體

【0293】捲曲螺旋形成肽係經包括蛋白酶位點之連接子連接至抗體可變區的N端。典型抗體包括重鏈及輕鏈可變區,在此情況中,將捲曲螺旋形成肽係連接至各者的N端。二價抗體具有兩個結合位點,其可相同或不同。在正常單特異性抗體中,結合位點係相同且該抗體具有兩個相同的輕鏈及重鏈對。在此情況中,將各重鏈係連接至相同的捲曲螺旋形成肽及各輕鏈連接至相同的捲曲螺旋形成肽(其可與連接至重鏈之肽相同或不同)。在雙特異性抗體中,結合位點係不同且由兩個不同的重鏈及輕鏈對形成。在該情況中,一個結合位點之重鏈及輕鏈可變區分別連接至捲曲螺

旋形成肽，另一結合位點之重鏈及輕鏈可變區亦如此。通常，兩個重鏈可變區係連接至相同類型之捲曲螺旋形成肽，輕鏈可變區亦如此。

【0294】 捲曲螺旋形成肽可經包括蛋白酶位點之連接子連接至抗體可變區。通常，具有相同蛋白酶裂解位點之相同連接子係此用於將抗體之各重鏈或輕鏈可變區連接至捲曲螺旋肽。蛋白酶裂解位點應為適於藉由細胞外存於所欲靶組織或病理(諸如癌症)中之蛋白酶裂解之位點，因此，連接子之裂解自捲曲螺旋釋放抗體從而掩蔽其活性，使得抗體結合至其所欲標靶，諸如細胞表面抗原或可溶性配體。

【0295】 和可變區一樣，經掩蔽之抗體通常包括恒定區之全部或部分，其可包括輕鏈恒定區、CH1區、鉸鏈區、CH2區及CH3區中之任一者或全部。如同其他抗體，一或多個C端殘基可經蛋白質水解處理或衍生化。

【0296】 捲曲螺旋可由形成同源二聚物之相同肽或形成異源二聚物之兩個相同肽形成。就形成同源二聚物而言，抗體輕鏈及重鏈係連接至相同捲曲螺旋形成肽。為形成異源二聚物，抗體輕鏈及重鏈係連接至不同捲曲螺旋肽。為達成幾對的捲曲螺旋形成肽，較佳將該對中之一者連接至抗體之重鏈且將另一者連接至抗體之輕鏈，然而，亦可為相反定向。

【0297】 各抗體鏈可連接至單一的捲曲螺旋形成肽或串接的多個此等肽(例如，兩個、三個、四個或五個肽複本)。若為後者，則串接連接的該等肽通常係相同。此外若採用串接連接，則輕鏈及重鏈通常係連接至相同數量的肽。

【0298】 抗體鏈連接至捲曲螺旋形成肽相對無此連接或在此連接被裂解後之相同抗體可降低抗體之結合親和力至少約10倍、約50倍、約100

倍、約200倍、約500倍、約1000倍或約1500倍。在一些此等抗體中，結合親和力降低約50-1500倍、約100-1500倍、約200-1500倍、約500-1500倍、約50-1000倍、約100-1000倍、約200-1000倍、約500-1000倍、約50-500倍或約100-500倍。因連接至抗體藥物共軛物中藥物所致之抗體之效應功能(諸如ADCC、吞噬作用及CDC或細胞毒性)可減小相同倍數或範圍。於蛋白質水解裂解去掩蔽抗體或以其他方式自抗體移除掩模後，通常，恢復的抗體相較於從未經掩蔽的其他相同對照抗體具有於2、1.5倍內或在實驗誤差內較佳不變之親和力或效應功能。

抗體-藥物共軛物

【0299】 在某些實施例中，本發明之抗-CD47抗體可與抗體藥物共軛物(ADC)組合。特定ADC可包括細胞毒性劑(例如化療劑)、前藥轉化酶、放射性同位素或化合物、或毒素(此等部分統稱為治療劑)。例如，ADC可共軛至細胞毒性劑(諸如化療劑)或毒素(例如，細胞生長抑制劑或殺細胞劑，諸如(例如)相思豆毒素、蓖麻毒素A、假單胞菌外毒素或白喉毒素)。有用的細胞毒性劑類別的實例包括(例如) DNA小溝結合劑、DNA烷基化劑及微管蛋白抑制劑。示例性細胞毒性劑包括(例如)奧瑞司他汀、喜樹鹼 (camptothecin)、卡奇黴素 (calicheamicin)、多卡米星 (duocarmycin)、依託泊苷(etoposide)、類美登素(maytansinoids)(例如，DM1、DM2、DM3、DM4)、紫杉烷類 (taxanes)、苯并二氮吡 (benzodiazepine)(例如，吡咯并[1,4]苯并二氮吡、吲哚啉并苯并二氮吡及噁唑啉并苯并二氮吡，包括吡咯并[1,4]苯并二氮吡二聚物、吲哚啉并苯并二氮吡二聚物及噁唑啉并苯并二氮吡二聚物)及長春花生物鹼。

【0300】 ADC可共軛至前藥轉化酶。前藥轉化酶可重組融合至抗體

或採用已知方法化學與其共軛。示例性前藥轉化酶為羧基肽酶G2、 β -葡萄糖苷酸酶、青黴素-V-醯胺酶、青黴素-G-醯胺酶、 β -內醯胺酶、 β -葡萄糖苷酶、硝基還原酶及羧基肽酶A。

【0301】 熟知用於使治療劑與蛋白質共軛且特定言之與抗體共軛之技術。(參見，例如，Alley等人，*Current Opinion in Chemical Biology* 2010 14:1-9；Senter，*Cancer J.*，2008，14(3):154-169)。治療劑可以降低其活性的方式共軛，除非其從抗體裂解(例如，藉由水解、藉由蛋白質水解降解或藉由裂解劑)。在一些態樣中，治療劑係經對CD47表現癌細胞之胞內環境中的裂解敏感但對胞外環境實質上不敏感之可裂解之連接子連接至抗體，使得共軛物在其藉由CD47表現癌細胞(例如，在內小體中，或例如，在溶酶體環境中或在穴樣內陷(caveolar)環境中，藉助於pH敏感性或蛋白酶敏感性)內部化時自抗體裂解之。在一些實施例中，治療劑亦可以不可裂解之連接子連接至抗體。

【0302】 在某些示例性實施例中，ADC可包括介於細胞毒性劑或細胞生長抑制劑與抗體之間的連接子區。如上所提及，通常，連接子可於胞內條件下裂解，因此連接子之裂解自抗體釋放治療劑於胞內環境(例如，於溶酶體或內體或胞膜窖中)。連接子可為(例如)藉由胞內肽酶或蛋白酶(包括溶酶體或內小體蛋白酶)裂解之肽基連接子。裂解劑可包括組織蛋白酶B及D及胞漿素(參見，例如，Dubowchik及Walker，*Pharm. Therapeutics* 83:67-123，1999)。最典型的是可藉由存在於CD47表現細胞中之酵素裂解之肽基連接子。例如，可使用可藉由高度存在於癌組織中之硫醇依賴型蛋白酶組織蛋白酶-B裂解之肽基連接子(例如，包含Phe-Leu或Val-Cit肽之連接子)。

【0303】可裂解之連接子可為pH敏感的，即，於特定pH值下對水解敏感。通常，pH敏感連接子可於酸性條件下水解。例如，可使用可在溶酶體中水解之酸不安定連接子(例如，脞、半卡脞(semicarbazone)、硫半卡脞(thiosemicarbazone)、順-烏頭酸醯胺(aconitic amide)、原酸酯、縮醛、縮酮或類似物)。(參見，例如，美國專利第5,122,368號；第5,824,805號；第5,622,929號；Dubowchik及Walker，*Pharm. Therapeutics* 83:67-123，1999；Neville等人，*Biol. Chem.* 264:14653-14661，1989)。此等連接子於中性pH條件下(諸如於血液中)相對安定，但在低於pH 5.5或5.0(約溶酶體pH)下係不安定的。

【0304】其他連接子係可於還原條件下裂解(例如，二硫連接子)。二硫連接子包括彼等可使用SATA (N-琥珀醯亞胺基-S-乙醯基硫基乙酸酯)、SPDP (N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)、SPDB (N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯)及SMPT (N-琥珀醯亞胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基二硫基)甲苯)、SPDB及SMPT形成者。(參見，例如，Thorpe等人，*Cancer Res.* 47:5924-5931，1987；Wawrzynczak等人，*Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel編，Oxford U. Press，1987。亦可參見美國專利第4,880,935號。)

【0305】連接子亦可為丙二酸酯連接子(Johnson等人，*Anticancer Res.*15:1387-93，1995)、馬來醯亞胺基苯甲醯基連接子(Lau等人，*Bioorg-Med-Chem.*3:1299-1304，1995)或3'-N-醯胺類似物(Lau等人，*Bioorg-Med-Chem.* 3:1305-12，1995)。

【0306】連接子亦可為不可裂解之連接子，諸如直接連接至治療劑

且藉由蛋白質水解降解抗體釋放之馬來醯亞胺基-伸烷基或馬來醯亞胺-芳基連接子。

【0307】 通常，連接子對胞外環境實質上不敏感，意指當ADC存在於胞外環境中(例如，存在於血漿中)時ADC之樣品中連接子之不大於約20%，通常不大於約15%，更通常不大於約10%，且甚至更通常不大於約5%，不大於約3%，或不大於約1%裂解。連接子對胞外環境是否實質上不敏感可例如藉由用血漿獨立地培養(a) ADC (「ADC樣品」)及(b)等莫耳量之未共軛之抗體或治療劑(「對照樣品」)一段預定的時間(例如，2、4、8、16或24小時)且然後將存在於ADC樣品中之未共軛之抗體或治療劑的量與存在於對照樣品中者的量(如(例如)藉由高效液相層析測定)進行比較來確定。

【0308】 連接子亦可促進細胞內部化。連接子在與治療劑共軛時(即，在如本文所述之ADC或ADC衍生物之連接子-治療劑部分的環境中)可促進細胞內部化。或者，連接子在與治療劑及抗體共軛時(即，在如本文所述之ADC的環境中)可促進細胞內部化。

【0309】 抗體可經由抗體之雜原子與連接子共軛。此等雜原子可以其自然狀態存在於抗體上或可引入至抗體中。在一些態樣中，抗體經由離胺酸殘基之氮原子與連接子共軛。在其他態樣中，抗體經由半胱胺酸殘基之硫原子與連接子共軛。本技術中已知將連接子及藥物-連接子與抗體共軛之方法。

【0310】 示例性抗體-藥物共軛物包括基於奧瑞司他汀之抗體-藥物共軛物，意指藥物組分為奧瑞司他汀藥物。奧瑞司他汀與微管蛋白結合，已顯示會干擾微管動力學及核及細胞分裂，且具有抗癌活性。通常，基於

奧瑞司他汀之抗體-藥物共軛物包含介於奧瑞司他汀藥物與抗-CD47抗體之間的連接子。連接子可為(例如)可裂解之連接子(例如，肽基連接子)或不可裂解之連接子(例如，藉由抗體降解釋放之連接子)。奧瑞司他汀包括MMAF及MMAE。示例性奧瑞司他汀之合成及結構述於美國公開案第7,659,241號、第7,498,298號、第2009-0111756號、第2009-0018086號及第7,968,687號中，各案出於所有目的以其全文引用方式併入本文中。

【0311】 其他示例性抗體-藥物共軛物包括類美登素抗體-藥物共軛物(意指藥物組分為類美登素藥物)及苯并二氮呋抗體藥物共軛物(意指藥物組分為苯并二氮呋(例如，吡咯并[1,4]苯并二氮呋二聚物、吡啶并苯并二氮呋二聚物及噁唑啉并苯并二氮呋二聚物))。

【0312】 在某些實施例中，本發明之抗-CD47抗體可與對不同標靶具有結合特異性之ADC組合。可與抗-CD47抗體組合之示例性ADC包括布妥昔單抗(brentuximab vedotin) (抗-CD30 ADC)、浮圖單抗(enfortumab vedotin) (抗-黏連蛋白-4 ADC)、迪拉圖珠單抗(ladiratumumab vedotin) (抗-LIV-1 ADC)、地泥土珠單抗(denintuzumab mafodotin) (抗-CD19 ADC)、格萊莫單抗(glembatumumab vedotin) (抗-GPNMB ADC)、抗-TIM-1 ADC、泊拉圖珠單抗(polatumumab vedotin) (抗-CD79b ADC)、抗-MUC16 ADC、地帕西珠單抗(depatuxizumab mafodotin)、特里圖珠單抗(telisotuzumab vedotin)、抗-PSMA ADC、抗-C4.4a ADC、抗-BCMA ADC、抗-AXL ADC、特索圖單抗(tisotumab vedotin) (抗組織因子ADC)。

抗體分子表現

【0313】 本發明之核酸可於宿主細胞中表現，本發明之核酸含有編

碼本發明之抗體或經掩蔽之抗體之內源性DNA。本技術中熟知此類方法，例如，如美國專利第5,580,734號、第5,641,670號、第5,733,746號及第5,733,761號中所述。亦參見(例如) Sambrook等人，同前述，及 Ausubel等人，同前述。一般此項技術者知曉可用於表現編碼本發明蛋白質之核酸之許多表現系統。可用於產生抗體、經掩蔽之抗體、其特定部分或變體之細胞培養物之示例為哺乳動物細胞。哺乳動物細胞系統通常呈細胞單層形式，然而，亦可使用哺乳動物細胞懸浮液或生物反應器。本技術中已開發能夠表現完整糖基化蛋白質之許多適宜宿主細胞系，且包括COS-1 (例如，ATCC CRL 1650)、COS-7 (例如，ATCC CRL-1651)、HEK293、BHK21 (例如，ATCC CRL-10)、CHO (例如，ATCC CRL 1610)及BSC-1 (例如，ATCC CRL-26)細胞系、hep G2細胞、P3X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、HeLa細胞及類似物，其等可從例如美國模式培養物保藏所(American Type Culture Collection)，Manassas，VA輕易獲得。酵母及細菌宿主細胞亦可使用且係為熟習此項技術者所熟知的。用於產生本發明之核酸或蛋白質之其他細胞係已知及/或可例如從美國模式培養物保藏所細胞系及融合瘤目錄(American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and hybridomas)或其他已知或商業來源獲得。

【0314】 表現載體可包括隨後表現控制序列中之一者或多者，諸如(但不限於)複製源；啟動子(例如，晚期或早期SV40啟動子、CMV啟動子(美國專利第5,168,062號；第5,385,839號)、HSV tk啟動子、pgk (磷酸甘油酸激酶)啟動子、EF-1 α 啟動子(美國專利第5,266,491號)、至少一個人類免疫球蛋白啟動子；增強子、及/或處理信息位點，諸如核糖體結合位

點、RNA拼接位點、聚腺苷酸化位點(例如，SV40大 T Ag poly A添加位點)、及轉錄終止子序列)。參見，例如，Ausubel等人，同前述；Sambrook等人，同前述。

【0315】 表現載體視需要包含至少一種可選標記物。此類標記物包括(但不限於)(例如)甲胺喋呤(MTX)、二氫葉酸還原酶(DHFR，美國專利第4,399,216號；第4,634,665號；第4,656,134號；第4,956,288號；第5,149,636號；第5,179,017號)、胺苄西林(ampicillin)、新黴素(G418)、麥考酚酸(mycophenolic acid)或抗真核細胞培養物之麩醯胺酸合成酶(GS，美國專利第5,122,464號；第5,770,359號；及第5,827,739號)、及用於培養大腸桿菌及其他細菌或原核生物之抗四環素或胺苄西林之基因。本技術中已知用於上述宿主細胞之適宜培養基及條件。熟習此項技術者輕易地明瞭適宜之載體。引入載體構築體於宿主細胞中可能會受磷酸鈣轉染、DEAE-聚葡萄糖介導之轉染、陽離子脂質介導之轉染、電穿孔、轉導、感染或其他已知方法影響。本技術中描述此類方法，諸如Sambrook，同前述；Ausubel，同前述。

【0316】 核酸插入應以操作方式連接至適宜啟動子。表現構築體將進一步包含用於轉錄起始、終止之位點及(在轉錄區中)用於轉譯之核糖體結合位點。藉由構築體表現之成熟轉錄本之編碼部分將較佳包括起始於開始時的轉譯及適宜地位於待轉譯mRNA末端之終止密碼子(例如，UAA、UGA或UAG)，其中哺乳動物或真核細胞表現以UAA及UAG為較佳。

【0317】 核酸插入物係視需要與捲曲螺旋序列及/或MMP裂解序列同框，例如在一或多個重鏈及/或輕鏈序列的N端。或者，捲曲螺旋序列及/或MMP裂解序列可(例如)經由二硫鍵或類似物轉譯後添加至抗體或其抗

原結合片段。

【0318】 當採用真核宿主細胞時，將聚腺苷酸化或轉錄終止序列係通常併入至載體中。終止序列之一個實例為源自牛生長激素基因之聚腺苷酸化序列。亦可包括用於準確剪接轉錄本之序列。剪接序列之一個實例為源自SV40之VP1內含子(Sprague等人 (1983) *J. Virol.* 45:773-781)。或者，如本技術中所知，可將控制宿主細胞中複製之基因序列併入至載體中。

抗體分離及純化

【0319】 本文所述之抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體可自重組細胞培養物藉由熟知的方法(包括(但不限於)蛋白質A純化、硫酸銨或乙醇純化、酸萃取、陰離子或陽離子交換層析、磷酸纖維素層析、疏水作用層析、親和層析、羧磷灰石層析及凝集素層析)回收並純化。高效液相層析(HPLC)亦可用於純化。參見，例如，Colligan，*Current Protocols in Immunology*、或*Current Protocols in Protein Science*，John Wiley & Sons，New York，N.Y.，(1997-2001)。

【0320】 本文所述之抗體及經掩蔽之抗體可包括純化產物、化學合成程序之產物及藉由重組技術自真核寄主(包括(例如)酵母、高等植物、昆蟲及哺乳動物細胞)產生的產物。取決於重組產生程序中所使用的寄主，本發明之抗體或經掩蔽之抗體可經糖基化或可未經糖基化，以糖基化為較佳。此類方法述於許多標準實驗室手冊中，諸如Sambrook，同前述；Ausubel，同前述，Colligan，*Protein Science*，同前述。

核酸分子

【0321】 本發明之核酸分子可呈RNA形式(諸如mRNA、hnRNA、

tRNA或任何其他形式)或呈DNA形式(包括(但不限於) cDNA及藉由選殖獲得或合成產生之基因組DNA)或其任何組合。DNA可為三股、雙股或單股或其任何組合。DNA或RNA之至少一個股之任何部分可為編碼股(亦稱為反義股)或其可為非編碼股(亦稱為反義股)。

【0322】 本發明之經分離核酸分子可包括包含視需要具有一或多個內含子，例如(但不限於)至少一個CDR(諸如至少一個重鏈或輕鏈之CDR1、CDR2及/或CDR3)之至少一個特定部分之開放閱讀框架(ORF)之核酸分子；包含抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體或抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體可變區之編碼序列之核酸分子；及包含核苷酸序列實質上不同於彼等上述者但由於遺傳密碼簡併性仍編碼如本文所述及/或如本技術中已知的至少一種抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體之核酸分子。由於本技術熟知遺傳密碼，熟習此項技術者的例行做法是產生編碼本發明之特異性抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體之此類退化核酸變體。

【0323】 如本文所示，包括編碼抗-CD47抗體分子之核酸之本發明之核酸分子可包括(但不限於)彼等獨立地編碼抗體片段之胺基酸序列者；整個抗體或其部分之編碼序列；抗體、片段或部分之編碼序列、及其他序列，諸如掩蔽劑(例如，捲曲螺旋掩蔽劑)及/或MMP裂解序列中之一者或二者、或諸如具有或不具有上述其他編碼序列(諸如至少一個內含子)之至少一個訊息前導子或融合肽之編碼序列、及其他非編碼序列，包括(但不限於)非編碼5'及3'序列，諸如在轉錄、mRNA處理(包括剪接及聚腺苷酸化訊息(例如—mRNA之核糖體結合及安定性))中發揮作用之轉錄、非轉錄序列；編碼其他胺基酸(諸如彼等提供其他功能者)之另外編碼序列。在一些實施例中，可將編碼抗體之序列融合至標記序列(諸如編碼有利於純化

包括抗體片段或部分之融合抗體之肽之序列)。

核酸之構築

【0324】本發明之經分離核酸可使用(a)重組方法、(b)合成技術、(c)純化技術或其組合來製造，如本技術中所熟知。核酸可簡便地亦包括除了本發明之多核苷酸外的序列。例如，可將包含一或多個核酸內切酶限制位點之多選殖位點插入至核酸中以幫助分離多核苷酸。此外，可插入可轉譯序列以幫助分離本發明之經轉譯多核苷酸。例如，六聯組胺酸標記序列提供純化本發明之蛋白質之簡便方法。本發明之核酸—編碼序列除外—視需要係用於本發明之多核苷酸之選殖及/或表現之載體、轉接子或連接子。可添加其他序列至此等選殖及/或表現序列以將其在選殖及/或表現中之功能最佳化，以幫助分離多核苷酸或改良多核苷酸引入於細胞中。本技術中熟知選殖載體、表現載體、轉接子及連接子之用途。(參見，例如，Ausubel，同前述；或Sambrook，同前述)。

【0325】本發明之經分離核酸組合物(諸如RNA、cDNA、基因組DNA或其任何組合)可自生物來源使用熟習此項技術者已知的任何多種選殖方法來獲得。在一些實施例中，使用寡核苷酸探針，其在嚴苛條件下與本發明之多核苷酸選擇性雜交以識別cDNA或基因組DNA庫中之所需序列。熟習此項技術者熟知RNA之分離及cDNA及基因組庫之構築。(參見，例如，Ausubel，同前述；或Sambrook，同前述)。

III. 治療應用

【0326】本發明提供治療與表現CD47之細胞有關的疾病(例如癌症)之方法。該等細胞可表現或可不表現相對與所述疾病無關之細胞提高之CD47水平。因此，本發明提供一種使用本文所述之抗-CD47抗體或經掩

蔽之抗體治療個體(例如罹患癌症之個體)之方法。該方法包括對有此需要的個體投與有效量之抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體或包含抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體之組合物。

【0327】 如本文所使用，術語「個體」及「患者」係指意欲藉由本發明方法治療的生物體。此類生物體較佳包括(但不限於)哺乳動物(例如，鼠類、猿猴、鳥類、牛、豬、犬類、貓類及類似物)，且更佳包括人類。如本文所使用，術語「治療」包括(例如)降低、減輕、調節、改善或消除導致病況、疾病、病症等，或改善其症狀(諸如(例如)癌細胞數減少、腫瘤尺寸減小、癌細胞浸潤至周邊器官中之速率減小或腫瘤轉移或腫瘤生長速率減小)之任何效應。

【0328】 癌症中之正治療效應可以多種方法加以測定(參見，W. A. Weber, J. Null. *Med.* 50:1S-10S (2009); Eisenhauer等人，同前述)。在一些較佳實施例中，對抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體之反應係使用RECIST 1.1標準評定。在一些實施例中，藉由治療有效量達成之治療為部分反應(PR)、完全反應(CR)、無進展存活期(PFS)、無疾病存活期(DFS)、客觀反應(OR)或總存活期(OS)中之任一者。可有效治療原發性或繼發性肝癌患者之本文所述療法之給藥方案可根據諸如患者的疾病狀態、年齡及體重、及療法引起個體抗癌反應之能力之因素而改變。雖然本發明之治療方法、藥劑及用途之實施例亦可能未有效達成每一個體之正治療效應，但應在統計上相當數目之個體中達成正治療效應，如藉由本技術中已知的任何統計檢驗，諸如學生t檢驗、chi²檢驗、根據Mann及Whitney之U檢驗、Kruskal-Wallis檢驗(H檢驗)、Jonckheere-Terpstra檢驗及Wilcoxon檢驗測定。

【0329】如本文所使用，「RECIST 1.1 反應標準」意指述於 Eisenhauer等人，E. A.等人，Eur.J Cancer 45:228-247 (2009)中之針對標靶病灶或非標靶病灶之定義(若適宜，基於測定反義之情形)。

【0330】「腫瘤」在其應用於診斷罹患或疑似罹患原發性或繼發性肝癌之個體時係指惡性或潛在惡性腫瘤或任何尺寸之組織團塊。實體腫瘤為異常生長或通常不包含囊腫或液體區域之組織團塊。不同類型之實體腫瘤係針對於形成其等之細胞類型命名的。實體腫瘤之實例為肉瘤、癌及淋巴瘤。白血病(血液癌症)一般不形成實體腫瘤(國家癌症研究所(National Cancer Institute)，癌症術語詞典(Dictionary of Cancer Terms))。非限制性示例性肉瘤包括軟組織肉瘤及骨肉瘤。

【0331】「腫瘤負擔」(亦稱為「腫瘤負荷」)係指分佈於全身之腫瘤物質總量。腫瘤負擔係指全身(包括淋巴結及骨髓)之癌細胞總數或腫瘤總尺寸。腫瘤負擔可藉由本技術中已知的多種方法，諸如(例如)藉由測定於自個體移去後之腫瘤尺寸，例如，使用游標卡尺，或在體內時，使用成像技術，例如，超音波、骨骼掃描、電腦斷層攝影術(CT)或磁共振成像(MRI)掃描來確定。

【0332】術語「腫瘤尺寸」係指可測定為腫瘤長度及寬度之腫瘤總尺寸。腫瘤尺寸可藉由本技術中已知的多種方法，諸如(例如)藉由測定於自個體移去後之腫瘤尺寸，例如，使用游標卡尺，或在體內時，使用成像技術，例如，骨骼掃描、超音波、CT或MRI掃描來確定。

【0333】如本文所使用，術語「有效量」係指足夠實現有益或所需結果之化合物(例如，抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體)的量。有效量可以一或多次投藥、施用或給藥投與且無意受限於特定調配物或投藥途徑。一般

而言，治療有效量之活性組分係在0.1 mg/kg至100 mg/kg (例如，1 mg/kg至100 mg/kg、1 mg/kg至10 mg/kg)範圍內。所投與的劑量可取決於諸如以下之因素而改變：特定藥劑之藥效動力學特徵及其投藥模式及途徑；接受者之年齡、健康狀況及體重；意欲治療之疾病或適應症之類型及程度、症狀之性質及程度、合併治療類型、治療頻率及所期望的效應。初始劑量可增加超過上限水平以快速地達成所需血液水平或組織水平。或者，初始劑量可小於最佳者，且日劑量可於治療過程中逐漸增加。人類劑量可(例如)在設計為從0.5 mg/kg至20 mg/kg進行之習知I期劑量遞增研究中最佳化。給藥頻率可取決於諸如投藥途徑、劑量、抗體之血清半衰期及所治療的疾病之因素而改變。示例性給藥頻率係每天一次、每週一次及每兩週一次。基於單株抗體之藥物之調配物係落在本領域一般技術範圍內。在一些實施例中，單株抗體係經凍乾，且然後於投與之時在緩衝鹽水中復水。

【0334】 在某些示例性實施例中，本發明提供一種用於治療細胞、組織、器官、動物或患者中癌症之方法。在特定實施例中，本發明提供一種用於治療人類實體癌症之方法。示例性癌症為彼等於具有癌症(即「CD47表現癌症」)之細胞中具有CD47表現者。癌症之實例包括(但不限於)實體腫瘤、軟組織腫瘤、產生實體腫瘤之血液系統腫瘤(hematopoietic tumor)及轉移性病灶。具有產生實體腫瘤潛力之血液系統腫瘤之實例包括(但不限於)瀰漫性大B-細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤、脊髓發育不良症候群(MDS)、淋巴瘤、霍奇金病、惡性淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、伯奇氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、多發性骨髓瘤、李希特氏症候群(李希特氏轉化)等。實體腫瘤之實例包括(但不限於)惡性腫瘤，例如，各種器

官系統之肉瘤(包括軟組織肉瘤及骨肉瘤)、腺癌及癌，諸如，彼等影響如下者：頭部及頸部(包括咽)、甲狀腺、肺(小細胞或非小細胞肺癌(NSCLC))、乳腺、淋巴、胃腸道(例如，口腔、食道、胃、肝、胰臟、小腸、結腸及直腸、及肛管)、生殖器及泌尿生殖道(例如，腎、尿路上皮、膀胱、卵巢、子宮、子宮頸、子宮內膜、前列腺、睪丸)、中樞神經系統(例如，神經或神經膠質細胞，例如，神經母細胞瘤或膠質瘤)、皮膚(例如，黑色素瘤)等。在某些實施例中，該實體腫瘤為NMDA受體陽性畸胎瘤。在其他實施例中，該癌症係選自乳癌、結腸癌、胰臟癌(例如，胰臟神經內分泌腫瘤(PNET)或胰臟導管腺癌(PDAC))、胃癌、子宮癌及卵巢癌。

【0335】 在某些實施例中，該癌症係選自(但不限於)白血病，諸如急性淋巴母細胞性白血病(ALL)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、髮樣細胞白血病(HCL)、T細胞前淋巴球性白血病(T-PLL)、大顆粒淋巴細胞白血病、成人T細胞白血病及急性單核細胞白血病(AMoL)。

【0336】 在一個實施例中，該癌症為與腹水有關的實體腫瘤。腹水係許多類型之癌症之症狀且亦可由許多病況(諸如晚期肝病)引起。可能引起腹水之癌症之類型包括(但不限於)乳癌、肺癌、大腸癌(結腸癌)、胃癌、胰臟癌、卵巢癌、子宮癌(子宮內膜癌)、腹膜癌等。在一些實施例中，與腹水有關的實體腫瘤係選自乳癌、結腸癌、胰臟癌、胃癌、子宮癌及卵巢癌。在一些實施例中，該癌症與胸膜積液有關，例如，肺癌。

【0337】 引起實體腫瘤之其他血液系統癌症包括(但不限於)非霍奇金淋巴瘤(例如，瀰漫性大B細胞淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、B淋巴母細胞淋

巴瘤、周邊T細胞淋巴瘤及伯奇氏淋巴瘤)、B-淋巴母細胞淋巴瘤；B細胞慢性淋巴球性白血病/小淋巴球性淋巴瘤；淋巴漿細胞淋巴瘤；脾邊緣區B-細胞淋巴瘤(±絨毛淋巴細胞)；血漿細胞骨髓瘤/漿細胞瘤；MALT類型之結節外邊緣區B細胞淋巴瘤；結節邊緣區B細胞淋巴瘤(±單核細胞樣B細胞)；濾泡性淋巴瘤；瀰漫性大B細胞淋巴瘤；伯奇氏淋巴瘤；前驅T淋巴母細胞淋巴瘤；T成人T細胞淋巴瘤(HTLV 1-陽性)；結節外NK/T細胞淋巴瘤，鼻型；腸病型T細胞淋巴瘤；肝脾 γ - δ T細胞淋巴瘤；皮膚脂膜炎樣T細胞淋巴瘤；蕈樣黴菌病/賽紮賚(sezary)症候群；退行性大細胞淋巴瘤、T細胞/裸細胞，原發性皮膚類型；退行性大細胞淋巴瘤、T細胞/裸細胞，原發性全身類型；周邊T細胞淋巴瘤，未以其他方式表徵分析；血管免疫母細胞T細胞淋巴瘤、多發性骨髓瘤、真性紅血球增多症或骨髓纖維化、皮膚T細胞淋巴瘤、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、邊緣區淋巴瘤、CNS淋巴瘤、免疫母細胞性大細胞淋巴瘤、前驅B淋巴母細胞淋巴瘤等。

【0338】 在特定實施例中，該癌症為肉瘤、結腸直腸癌、頭頸癌、肺癌、卵巢癌、胰臟癌、胃癌、黑色素瘤及/或乳癌。

【0339】 如本文所述之抗-CD47抗體及經掩蔽之抗體亦可用於治療與癌症有關的疾病(例如，癌症引起之腦病變)。

【0340】 本發明之方法及組合物可與其他治療劑及/或療法組合使用。如本文所使用，術語「以組合方式」投與應理解為意指在個體遭受病症折磨過程中將兩種(或更多種)不同治療遞送至個體，使得該等治療對患者之效應在一個時間點疊加。在某些實施例中，一種治療之遞送在第二治療之遞送開始之時仍舊進行，因此，就投與而言存在重疊。此在本文中有時稱為「同時」或「同時遞送」。在其他實施例中，一種治療之遞送結束

於另一治療之遞送開始之前結束。在任一情況之一些實施例中，治療因為組合投與而係更有效的。例如，第二治療係更有效的，例如，在較少的第二治療中看到等效效應，或相比在第二治療係在不存在第一治療下投與之情況將看到的，第二治療減輕症狀至更大的程度，或在第一治療中看到類似情形。在一些實施例中，遞送係使得症狀減輕或與疾病有關的其他參數相比於不存在另一治療下遞送一種治療所觀測到更大。兩種治療之效應可為部分相加，完全相加，或大於相加(即，協同反應)。遞送可為使得所傳遞的第一治療之效應在遞送第二治療時仍可檢測到。

【0341】 在一個實施例中，本發明之方法包括對個體投與如本文所述之抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體(例如，組合物或製劑)與一或多種其他療法(例如，手術、放射療法或投與另一治療性製劑)之組合。在一個實施例中，另一療法可包括化療，例如，細胞毒性劑。在一個實施例中，另一療法可包括靶向療法，例如，酪胺酸激酶抑制劑、蛋白酶體抑制劑或蛋白酶抑制劑。在一個實施例中，該另一療法可包括消炎、抗血管生成、抗肝纖維化或抗增生化合物，例如，類固醇、生物免疫調節劑，諸如免疫檢查點分子之抑制劑、單株抗體、抗體片段、適體、siRNA、反義分子、融合蛋白、細胞介素、細胞介素受體、支氣管擴張劑、他汀(statin)、消炎劑(例如甲胺喋呤)或NSAID。在另一個實施例中，該另一療法可包括組合不同類型之治療劑。抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體製劑及另一療法可同時或依序投與。

【0342】 如本文所使用，「免疫檢查點分子」係指免疫系統中之打開訊息(刺激分子)或關閉訊息(抑制分子)之分子。許多癌症藉由抑制T細胞訊息傳導來避開免疫系統。

【0343】 示例性免疫檢查點分子包括(但不限於)程式化細胞死亡蛋白1 (PD-1)、程式化死亡配體1 (PD-L1)、PD-L2、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA-4)、T細胞免疫球蛋白及黏蛋白域3 (TIM-3)、淋巴細胞活化基因3 (LAG-3)、癌胚抗原相關細胞黏附分子1 (CEACAM-1)、CEACAM-5、T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)、B及T淋巴細胞衰減因子(BTLA)、具有Ig及ITIM域之T細胞免疫受體(TIGIT)、白血球相關免疫球蛋白樣受體1 (LAIR1)、CD160、TGFR、腺苷2A受體(A2AR)、B7-H3(亦稱為CD276)、B7-H4(亦稱為VTCN1)、吲哚胺2,3-雙加氧酶(IDO)、2B4、殺手細胞免疫球蛋白樣受體(KIR)及類似物。

【0344】 如本文所使用，「免疫檢查點抑制劑」係指抑制及/或阻斷一或多個抑制檢查點分子之分子(例如，小分子、單株抗體、抗體片段等)。

【0345】 示例性免疫檢查點抑制劑包括(但不限於)如下單株抗體：PD-1抑制劑，諸如帕姆單抗(pembrolizumab)(Keytruda，Merck)及納武單抗(nivolumab)(Opdivo，Bristol-Myers Squibb)；PD-L1抑制劑，諸如阿特珠單抗(atezolizumab)(Tecentriq，Genentech)、阿維單抗(avelumab)(Bavencio，Pfizer)、度伐魯單抗(durvalumab)(Imfinzi，AstraZeneca)；及CTLA-1抑制劑，諸如易普利單抗(ipilimumab)(Yervoy，Bristol-Myers Squibb)。

【0346】 示例性細胞毒性劑包括抗微管劑、拓樸異構酶抑制劑、抗代謝物、蛋白質合成及降解抑制劑、有絲分裂抑制劑、烷基化劑、鉑化劑(platinating agent)、核酸合成之抑制劑、組蛋白脫乙酰酶抑制劑(HDAC抑制劑，例如，伏立諾他(vorinostat)(SAHA，MK0683)、恩替司他

(entinostat)(MS-275)、帕比司他(panobinostat)(LBH589)、曲古抑菌素A (trichostatin A)(TSA)、莫赛替诺司他(mocetinostat)(MGCD0103)、貝林司他(belinostat)(PXD101)、羅咪酯肽(romidepsin)(FK228, 縮肽))、DNA甲基轉移酶抑制劑、氮芥、亞硝基脲、伸乙亞胺、磺酸烷酯、三氮烯、葉酸鹽類似物、核苷類似物、核糖核苷酸還原酶抑制劑、長春花生物鹼(vinca alkaloids)、紫杉烷類(taxanes)、埃坡黴素(epothilones)、嵌入劑(intercalating agent)、能夠干擾訊息傳導路徑之藥劑、增進細胞凋亡及輻射之藥劑、或結合表面蛋白以遞送毒性劑之抗體分子共軛物。在一個實施例中，可與本文所述之製劑一起投與的細胞毒性劑為鉑劑(諸如順鉑)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、達卡巴嗪(dacarbazine)、甲胺喋呤、氟尿嘧啶、吉西他濱(gemcitabine)、卡培他濱(capecitabine)、羥基脲、拓撲替康(topotecan)、伊立諾替康(irinotecan)、氮雜胞苷(azacytidine)、伏立諾他(vorinostat)、伊沙匹隆(ixabepilone)、硼替佐米(bortezomib)、紫杉烷類(taxanes)(例如，太平洋紫杉醇(paclitaxel)或多烯紫杉醇(docetaxel))、細胞鬆弛素B(cytochalasin B)、短桿菌肽D (gramicidin D)、溴化乙錠(ethidium bromide)、依米丁(emetine)、絲裂黴素、依託泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春花鹼(vinblastine)、長春瑞濱(vinorelbine)、秋水仙鹼(colchicin)、蒽環黴素(anthracyclines)(例如，多柔比星(doxorubicin)或表柔比星(epirubicin))、道諾黴素(daunorubicin)、二羥基炭疽菌素二酮、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神黴素(mithramycin)、放線菌素D (actinomycin D)、阿黴素(adriamycin)、1-去氫辜固酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮質激素(glucocorticoids)、普魯卡因(procaine)、地卡因(tetracaine)、利多卡因

(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)、嘌呤黴素(puromycin)、蓖麻毒素(ricin)或類美登素(maytansinoid)。

【0347】本發明之方法及組合物可用於治療罹患CD47陽性癌症之個體。在一個實施例中，CD47陽性癌症表現一或多種基質金屬蛋白酶(MMP)。示例性MMP包括(但不限於)MMP1至MMP28。特定示例性MMP包括MMP2及MMP9。在一個實施例中，CD47陽性癌症為其中存在浸潤性巨噬細胞之腫瘤。

【0348】本發明之方法及組合物可用於治療罹患表現一或多種MMP且包含浸潤性巨噬細胞之CD47陽性癌症的個體。

【0349】本技術中已知確定CD47陽性癌症之存在、MMP表現、及腫瘤浸潤性巨噬細胞之存在之方法。

【0350】個體中CD47陽性癌症之評定可藉由包括免疫組織化學分析(IHC)、西方墨點轉漬法、流動式細胞測量術或RNA定序方法之習知方法來確定。IHC、西方墨點轉漬法及流動式細胞測量術可用本技術中已知的任何抗-CD47抗體及本文所揭示之抗-CD47抗體進行分析。

【0351】組織中巨噬細胞浸潤之評定可藉由包括免疫組織化學分析(IHC)、西方墨點轉漬法、流動式細胞測量術或RNA定序方法之習知方法監測巨噬細胞之表面標記物(包括小鼠巨噬細胞之F4/80、或CD163、CD68或CD11b)來進行。

【0352】組織中蛋白酶之評定可使用多種技術(包括彼等監測蛋白酶活性者以及彼等可檢測蛋白質水解活性者)來監測。可檢測組織中蛋白酶(其可包括蛋白酶之兩種非活性及活性形式)之存在之習知方法包括IHC、RNA定序、西方墨點轉漬法或基於ELISA之方法。可使用其他技術以檢

測組織中之蛋白酶活性，包括酶譜法(zymography)、藉由螢光顯微術之原位酶譜法或螢光蛋白質水解受質之使用。此外，可將螢光蛋白質水解受質之使用與特定蛋白酶之免疫捕捉組合。另外，針對蛋白酶之活性位點之抗體可藉由多種技術(包括IHC、螢光顯微術、西方墨點轉漬法、ELISA或流動式細胞測量術)使用(參見，Sela-Passwell等人 *Nature Medicine*.18:143-147. 2012；LeBeau等人 *Cancer Research*. 75:1225-1235. 2015；Sun等人 *Biochemistry*. 42:892-900. 2003；Shiryaev等人 2:e80. 2013)。

【0353】 在通篇描述中，在組合物及套組描述作具有、包括或包含特定組分之處，或在製程及方法描述作具有、包括或包含特定步驟之處，預期另外涵蓋存在基本上由或由所列舉組分組成之本發明之組合物及套組，及存在基本上由或由所列舉製程及方法步驟組成之根據本發明之製程及方法。

IV. 醫藥組合物及調配物

【0354】 就治療用途而言，較佳將抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體與醫藥上可接受之載劑組合。如本文所使用，「醫藥上可接受之載劑」意指適用於與人類及動物之組織接觸而無過度毒性、刺激、過敏性反應或其他問題或併發症且符合合理的效益/風險比之緩衝劑、載劑及賦形劑。該(等)載劑應在與調配物之其他成分相容的意義上是「可接受」的且對接受者不會造成傷害。醫藥上可接受之載劑包括與醫藥投與相容之緩衝劑、溶劑、分散介質、包衣、等滲劑及吸收延遲基及類似物。此項技術中已知此類介質及試劑於醫藥活性物質之用途。

【0355】 因此，本發明之抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體組合物可包

含任何適宜賦形劑中之至少一者，諸如(但不限於)稀釋劑、黏合劑、安定劑、緩衝劑、鹽、親脂性溶劑、防腐劑、佐劑或類似物。以醫藥上可接受之賦形劑為較佳。本技術中熟知製備此類無菌溶液之非限制性實例及方法，諸如(但不限於)彼等述於Gennaro編，Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Publishing Co. (Easton, Pa.)1990中者。可例行地選擇適於如本技術中所熟知或如本文所述之抗體分子、片段或變體組合物之投藥模式、溶解性及/或安定性之醫藥上可接受之載劑。

【0356】 可用於本發明組合物中之醫藥賦形劑及添加劑包括(但不限於)蛋白質、肽、胺基酸、脂質及碳水化合物(例如，糖，包括單醣、二醣、三醣、四醣及寡醣；衍生糖，諸如醛醇、醛糖酸、酯化糖及類似物；及多醣或糖聚合物)，其可單獨地或以組合方式(包括單獨地或以1-99.99% (以重量或體積計)組合方式)存在。示例性蛋白賦形劑包括血清白蛋白，諸如人類血清白蛋白(HSA)、重組人類白蛋白(rHA)、明膠、酪蛋白及類似物。亦可在緩衝能力上起作用之代表性胺基酸/抗體分子組分包括丙胺酸、甘胺酸、精胺酸、甜菜鹼、組胺酸、麩胺酸、天冬胺酸、半胱胺酸、離胺酸、白胺酸、異白胺酸、纈胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、阿斯巴甜(aspartame)及類似物。

【0357】 適用於本發明中之碳水化合物賦形劑包括(例如)單醣，諸如果糖、麥芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖及類似物；二醣，諸如乳糖、蔗糖、海藻糖、纖維二糖及類似物；多醣，諸如棉子糖、龍膽三糖(melezitose)、麥芽糊精、葡聚糖、澱粉及類似物；及醛醇，諸如甘露醇、木糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇(葡萄糖醇)、肌醇及類似物。用於本發明中之較佳碳水化合物賦形劑為甘露醇、海藻糖及棉

子糖。

【0358】 抗體分子組合物亦可包括緩衝劑或pH調整劑；通常，該緩衝劑為由有機酸或鹼製備的鹽。代表性緩衝劑包括有機酸鹽，諸如檸檬酸鹽、乙酸鹽、抗壞血酸鹽、葡萄糖酸、碳酸鹽、酒石酸鹽、琥珀酸鹽或苯二甲酸鹽；Tris (緩血酸胺鹽酸鹽)或磷酸鹽緩衝液。

【0359】 另外，本發明之抗體分子組合物可包括聚合賦形劑/添加劑，諸如聚乙烯吡咯啉酮、菲科爾(ficolls)(聚合蔗糖)、葡萄糖結合劑(dextrates)(例如，環糊精，諸如2-羥基丙基-β-環糊精)、聚乙二醇、矯味劑、抗微生物劑、甜味劑、抗氧化劑、抗靜電劑、表面活性劑(例如，聚山梨醇酯，諸如「吐溫20」及「吐溫80」)、脂質(例如，磷脂、脂肪酸)、類固醇(例如，膽固醇)及螯合劑(例如，EDTA)。

【0360】 本技術中已知適用於本發明之抗體分子組合物之此等及其他已知醫藥賦形劑及/或添加劑，例如，如「Remington:The Science & Practice of Pharmacy」，第19版，Williams & Williams，(1995)及「Physician's Desk Reference」，第52版，Medical Economics，Montvale，N.J.(1998)中所列出。較佳之載劑或賦形劑物質為碳水化合物(例如，醣及醛醇)及緩衝劑(例如，檸檬酸鹽)或聚合劑。

【0361】 本發明提供於醫藥上可接受之調配物中包含至少一種抗-CD47抗體分子之安定組合物。所保存的調配物包含至少一種已知防腐劑或視需要選自至少一種苯酚、間甲酚、對甲酚、鄰甲酚、氯甲酚、苜醇、亞硝酸苯汞、苯氧基乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化鎂(例如，六水合物)、對羥基苯甲酸烷酯(對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯、對羥基苯甲酸丁酯及類似物)、氯化苜二甲胺、氯化苜乙氧胺、

去水乙酸钠及硫柳汞(thimerosal)或其於水性稀釋劑中之混合物。任何適宜濃度或混合物可依本技術中所知進行使用，諸如0.001-5%或任何範圍或其中的值，諸如(但不限於) 0.001、0.003、0.005、0.009、0.01、0.02、0.03、0.05、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.3、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9或任何範圍或其中的值。非限制性實例包括(無防腐劑) 0.1-2%間甲酚(例如，0.2、0.3、0.4、0.5、0.9或1.0%)、0.1-3%苧醇(例如，0.5、0.9、1.1、1.5、1.9、2.0或2.5%)、0.001-0.5%硫柳汞(例如，0.005或0.01%)、0.001-2.0%苯酚(例如，0.05、0.25、0.28、0.5、0.9或1.0%)、0.0005-1.0%對羥基苯甲酸烷酯(例如，0.00075、0.0009、0.001、0.002、0.005、0.0075、0.009、0.01、0.02、0.05、0.075、0.09、0.1、0.2、0.3、0.5、0.75、0.9或1.0%)及類似物。

【0362】 包含如本文所揭示之抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體之醫藥組合物可呈單位劑型存在或可藉由任何適宜方法製備。醫藥組合物應調配成與其所欲投藥途徑相容。投藥途徑之實例為靜脈內(IV)、皮內、吸入、經皮、局部、經黏膜及直腸投與。單株抗體之較佳投藥途徑係IV輸注。有用的調配物可藉由醫藥技術中已知的方法來製備。例如，參見Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 同前述。適於非經腸投與之調配組分包括無菌稀釋劑，諸如注射用水、鹽水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶劑；抗菌劑，諸如苧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EDTA；緩衝

劑，諸如乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽；及用於調整滲透性之試劑，諸如氯化鈉或右旋糖。

【0363】就靜脈內投與而言，適宜之載劑包括生理鹽水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, N.J.)或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)。該載劑於製造及儲存條件下應係安定的，且應抗微生物保存。載劑可為包含(例如)水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇及液體聚乙二醇)及其適宜混合物之溶劑或分散液介質。

【0364】醫藥調配物較佳係無菌的。滅菌可藉由任何適宜方法(例如，濾過無菌過濾膜)來達成。在組合物經凍乾之情況下，過濾器滅菌可在凍乾及復水之前或之後進行。

【0365】本發明之組合物可呈多種形式。此等包括(例如)液體、半固體及固體劑型，諸如液體溶液(例如，可注射及可輸注之溶液)、分散液或懸浮液及脂質體。較佳之形式取決於所欲投藥模式及治療應用。典型較佳組合物係呈可注射或可輸注溶液形式。較佳之投藥模式為非經腸(例如，靜脈內、皮下、眼內、腹膜內、肌肉內)。在一個較佳實施例中，製劑係靜脈內輸注或注射投與。在另一個較佳實施例中，該製劑係藉由肌肉內或皮下注射投與。

【0366】如本文所使用，片語「非經腸投與」及「經非經腸方式投與」意指除了經腸及局部投與之投與方式，通常係藉由注射，且包括但不限於經靜脈內、經肌肉內、經皮下、經動脈內、經鞘內、經莖膜內、經眼窩內、經玻璃體內、經心臟內、經皮內、經腹膜內、經氣管、經吸入、經皮下、經表皮下、經關節內、經莖膜內、經蛛網膜下、經脊柱內、經硬膜外及經胸骨內注射及輸注。

【0367】 本發明提供一種套組，其包括包裝材料及包含至少一種抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體與規定緩衝劑及/或防腐劑視需要於水性稀釋劑中之溶液之至少一個小瓶。該水性稀釋劑視需要進一步包含醫藥上可接受之防腐劑。防腐劑包括選自苯酚、間甲酚、對甲酚、鄰甲酚、氯甲酚、苧醇、對羥基苯甲酸烷酯(對羥基苯甲酸甲酯、對羥基苯甲酸乙酯、對羥基苯甲酸丙酯、對羥基苯甲酸丁酯及類似物)、氯化苧二甲胺、氯化苧乙氧胺、去水乙酸鈉及硫柳汞或其混合物之彼等。用於調配物中之防腐劑之濃度為足以產生抗微生物效應之濃度。此等濃度取決於所選防腐劑且係由熟習此項技術者輕易地確定。

【0368】 可視需要且較佳地將其他賦形劑例如等滲劑、緩衝劑、抗氧化劑、防腐增強劑添加至稀釋劑。等滲劑(諸如甘油)係通常以已知濃度使用。較佳添加生理上耐受之緩衝劑以改良pH控制。該等調配物可涵蓋寬廣範圍之pH，諸如約pH 4.0至約pH 10.0、約pH 5.0至約pH 9.0、或約pH 6.0至約pH 8.0。

【0369】 可視需要將其他添加劑諸如醫藥上可接受之增溶劑，例如吐溫20 (聚環氧乙烷(20)山梨糖醇酐單月桂酸酯)、吐溫40 (聚環氧乙烷(20)山梨糖醇酐單棕櫚油酸酯)、吐溫80 (聚環氧乙烷(20)山梨糖醇酐單油酸酯)、Pluronic F68 (聚環氧乙烷聚環氧丙烷嵌段共聚物)及PEG(聚乙二醇)或非離子表面活性劑(諸如聚山梨醇酯20或80或泊洛沙姆(poloxamer) 184或188)、Pluronic® polylys、其他嵌段共聚物及螯合劑(諸如EDTA及EGTA)添加至該等調配物或組合物以減少聚集。此等添加劑在使用泵或塑料容器以投與調配物的情況下尤其有用。醫藥上可接受之表面活性劑之存在減少蛋白質聚集之傾向。

【0370】 可使用各種遞送系統以投與抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體至個體。在某些示例性實施例中，抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體之投與係藉由靜脈內輸注。在一些實施例中，投與係藉由兩小時靜脈內輸注。

【0371】 上文所述之任何調配物可呈液體或冷凍形式儲存且可視需要經過防腐處理。在一些實施例中，上文所述之調配物係凍乾的，即，其等係經過凍乾。在一些實施例中，上文所述之調配物係經過防腐處理，例如，凍乾，且於隨後利用適宜液體(例如水)復水。凍乾意指組合物已在真空下經冷凍乾燥。凍乾通常係藉由冷凍特定調配物使溶質與溶劑分離來達成。溶劑然後藉由昇華(即，初級乾燥)且接著藉由解吸附(即，二級乾燥)來移除。

【0372】 本發明之調配物可與本文所述方法一起或與其他方法一起用於治療疾病。抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體調配物可進一步在投與個體前進行稀釋。在一些實施例中，該等調配物用鹽水稀釋且於投與個體前保存在IV袋或針筒中。因此，在一個實施例中，用於治療個體CD47表現癌症之方法包括對有此需要的個體投與週劑量之包含抗-CD47抗體或經掩蔽之抗體之醫藥組合物。

【0373】 熟習此項技術者輕易地明瞭可在不偏離本文所述實施例之範疇下使用適宜等效物進行本文所述方法之其他適宜修改及調適。現已詳細地描述某些實施例，參考以下實例將更清楚地瞭解該等實施例，該等實施例係經包括僅係出於說明之目的且無意於具限制性。本文所述之所有專利案、專利公開案及參考文獻係出於所有目的以其全文引用的方式併入本文中。

實例

實例1：抗體之生成

【0374】 生成鼠類B6H12抗-CD47抗體之人類化變體。就DNA及載體生成而言，使用非模板PCR合成抗體可變域序列。簡言之，使用ATUM專用軟體套件將虛擬基因序列轉化成寡核苷酸序列。寡核苷酸係經合成、組併及使用PCR擴增。使用SapI位點將來自PCR反應之全長擴增子選殖至載體中，轉形至大腸桿菌中及分離獨特的純系。使純系在液體培養基中生長過夜並分離血漿DNA，純化(Machery-Nagel Midi Prep套組)並利用Sanger定序驗證序列。將輕鏈可變域選殖至Kappa-Hs載體中及將重鏈域選殖至IgG1.01-Fc-Hs載體中。就抗體表現而言，用PolyPlus FectoPro轉染試劑將1:1比率之抗體重鏈及輕鏈載體稀釋於LifeTech Optimem培養基中。然後，將DNA/轉染試劑添加至於LifeTech ExpiExpression培養基中之Atum-特異性HEK293細胞並培養5天。藉由離心及0.2 um過濾收穫培養物。就抗體純化而言，所選GE mAb的確用於IgG之純化。於洗脫之前，用於PBS中之10CV 1M NaCl、及10 CV PBS洗樹脂。使用20 mM NaCitrate pH3.2緩衝液洗脫IgG。使用Pierce Zeba管柱使樣品緩衝液交換至PBS中。然後，無菌過濾該樣品，接著於採集樣品以用於表徵分析。表徵分析包括A280濃度及使用具有p200 Tapescreen之Agilent P200 Tape Station 2200之還原及非還原電泳。

【0375】 親本B6H12抗體之特定突變述於表10-13中，如下文所述。

表10.hB6H12重鏈變體中之人類化突變

vH變體	IGHV外顯子受體序列	鼠科供體框架殘基	人類受體CDR殘基
hvH1	IGHV3-23/HJ4	H44、H49、H89、	無

		H91、H94	
hvH2	IGHV3-23/HJ4	H49、H91、H94	H31、H33、H60
hvH3	IGHV3-23/HJ4	H49、H82、H91、H94	H31、H33、H60
hvH4	IGHV3-48/HJ4	H49	H31、H60
hvH5	IGHV3-66/HJ4	H29、H49、H82	H60
hvH6	IGHV3-74/HJ4	H49	H31、H58、H60

表11.hB6H12 Kappa輕鏈變體中之人類化突變

vK變體	IGKV外顯子受體序列	鼠科供體框架殘基	人類受體CDR殘基
hvK1	IGKV6-21/KJ2	L4、L21、L85	無
hvK2	IGKV6-21/KJ2	L4、L21	無
hvK3	IGKV6-21 /KJ2	L4、L21、L69	無
hvK4	IGKV1-27 /KJ2	L21、L49、L69	L31、L34、L53、 L54、L55

表12.hB6H12重鏈變體中之特定鼠類框架突變

變體	29	44	49	82	89	91	94	人類%
hvH1	F	R*	A*	M	I*	F*	R*	87.8
hvH2	F	G	A*	M	V	F*	R*	92.9
hvH3	F	G	A*	I*	V	F*	R*	91.8
hvH4	F	G	A*	M	V	Y	R	92.9
hvH5	F*	G	A*	I*	V	Y	R	89.8
hvH6	F	G	A*	M	V	Y	R	92.9

* 鼠類殘基。

表13.hB6H12 Kappa輕鏈變體中之特定鼠類框架突變

變體	4	21	49	69	85	人類%
hvK1	M*	L*	K	T	V*	85.3
hvK2	M*	L*	K	T	T	86.3
hvK3	M*	L*	K	S*	T	85.3
hvK4	M	L*	K*	S*	T	89.5

* 鼠類殘基。

實例2：人類化抗-CD47抗體

抗體之產生

【0376】 抗體係經由瞬時轉染Expi HEK或Expi CHO細胞或安定轉染CHO-DG44而表現且使用MabSelect SuRe管柱(GE Healthcare)純化。使用Superdex管柱(GE Healthcare)對小於90%單體之經掩蔽之抗體進行其他製備型尺寸排除層析純化。

藉由流動式細胞測量術及ELISA評定飽和結合

【0377】 藉由飽和ELISA或細胞FACS分析中任一種分析及EC₅₀或K_d計算值來評定具有不同重鏈及輕鏈序列之人類化抗-CD47 B6H12抗體對人類CD47之結合親和力。只有包含重鏈1序列(hvH1)(bin A；抗體1-4)或重鏈5序列(hvH5)(bin B，抗體17-20)之抗體可結合至CD47。來自此等bin之抗體以與鼠類抗體mB6H12及替代人類化抗體Ab47相似的K_d (圖2A)及EC₅₀(圖2B)親和力結合。

【0378】 就細胞FACS分析而言，用漸增濃度之人類化B6H12抗體處理L450cy癌淋巴細胞，發現該等人類化B6H12抗體仍結合至CD47且確定K_d值。替代人類化架構保留與鼠類親本及替代人類化抗體Ab47 (圖2A)相似的結合K_d。

【0379】除了細胞結合評定，藉由Elisa確定人類化B6H12抗體對CD47之親和力。用漸增濃度之人類化B6H12抗體處理經人類CD47塗覆之板，發現該等人類化B6H12抗體仍結合至CD47且確定EC₅₀值。替代人類化架構保留與鼠類親本及替代人類化抗體Ab47 (圖2B)相似的結合K_d。

【0380】除了於ELISA檢定中評定結合EC₅₀外，亦評定結合動力學。出人意料的是，Bin A中之抗體(hB6H12.3及hB6H12.4)顯示比親本抗體mB6H12、Bin B中之抗體(hB6h12.19及hB6H12.20)或替代人類化抗體Ab47顯著更高的最大結合(BMax)(圖2C)。

流動式細胞測量術評定飽和結合

【0381】將 2×10^5 個指定細胞(SW780或人類紅血球)與指定抗體於染色緩衝液(PBS、5% FBS、0.2% NaN₃)中之連續稀釋液組合。樣品於冰上培養1小時且用冰冷染色緩衝液洗兩次。於冰上用抗人類IgG-AF647 (JacksonImmunoResearch，於染色緩衝液中之1:200稀釋液)再懸浮細胞1小時。細胞用冰冷染色緩衝液洗兩次且再懸浮於染色緩衝液中。藉由流動式細胞測量術於門控排除非活細胞之Invitrogen Attune NxT流動式細胞計數器上檢查經標記之細胞且使用FlowJo 10軟體分析。使用GraphPad Prism 6利用非線性回歸計算得K_d。

藉由ELISA評定飽和結合

【0382】將可溶性重組人類CD47-Fc (R&D Systems)於50 mM碳酸鹽緩衝液(pH 9.6)中稀釋至適宜之濃度。添加100 μL可溶性抗原至96孔Maxisorb ELISA板的各孔。密封該板且儲存於4 °C下過夜。然後該板用PBS-T緩衝液(PBS、pH 7.4 + 0.05%吐溫-20)洗3-5次。於室溫下使用300 μL/孔之含BSA之PBS-T緩衝液阻斷該等孔1小時，然後用PBS-T洗3-5

次。在阻斷緩衝液中製備抗體之稀釋液且以100 μ L體積添加至各孔。於室溫下培養抗體1小時，且然後用PBS-T洗3-5次。接著添加HRP共軛二級抗體(抗人類Fc或抗人類 κ 輕鏈中之任一者)且在室溫下培養1小時。該板用PBS-T洗3-5次。藉由添加100 μ L TMB溶液且在室溫下培養3-15分鐘使ELISA顯影。為阻止反應，添加100 μ L 1 N硫酸至各孔。使用Spectramax 190板式讀取器(Molecular Biosciences)確定在450 nm下之吸光度且使用GraphPad Prism 6繪製資料。

B6H12介導之吞噬作用

【0383】 進行人類化B6H12抗體之功能表徵分析，包括人類紅血球之人類吞噬作用及血球凝集。用漸增濃度之源自bin A及B之人類化B6H12抗體調理經螢光紅色PKH染料標記之人類紅血球30分鐘。洗RBC且以10:1比率饋至單核細胞巨噬細胞2小時。用允許溶解並移除未消化紅血球之ACK低滲溶解緩衝液洗樣品3次。使樣品經受流動式細胞測量術分析且評定吞噬作用。源自Bin A及B之抗體展現介導人類紅血球吞噬作用之類似能力。令人意外的是，源自bin A之抗體hB6H12.3介導比鼠類親本抗體更好及與替代人類化抗體Ab47相當之吞噬作用。

【0384】 源自抗體bins A及B之人類化B6H12抗體類似地介導CD47陽性人類紅血球之吞噬作用。hB6H12.3於1 μ g/ml下刺激相較於鼠類mB6H12優異之促吞噬活性及相較於Ab47類似之促吞噬活性(圖3A及圖3B)。

B6H12介導之血球凝集

【0385】 B6H12之印記特徵係促進人類紅血球之血球凝集之能力。血球凝集為在用CD47抗體處理時允許兩種CD47表現細胞聚集或結塊之同

型相互作用之實例。凝集的晶格以懸浮分佈方式維持RBC，此可藉由影像分析或藉由聚集程度(藉由流動式細胞測量術監測)目測量化。將懸浮於PBS中且接種於圓底96孔板中之人類紅血球暴露以增加抗-CD47抗體之濃度。於37°C下30分鐘後，藉由RBC密度改變且藉由流動式細胞測量術光學監測血球凝集為細胞聚集之增加。於Bin A中之抗體(特定言之hB6H12.3)顯示相較於親本抗體mB6H12及替代人類化抗體Ab47減少的血球凝集(圖4A)。

【0386】 為評定血球凝集，進行標準影像捕捉且評定經分散之非沉澱RBC之形成。此外，使用GE In Cell分析儀掃描板且評定細胞中視光點的直徑。為試圖評定適於臨床監測之檢定中之血球凝集，使用流動式細胞測量術且評定血球凝集為表觀RBC SSC/FSC之總體增加，此係監測聚集之方法。此方法係用於評定由人類化抗-CD47抗體hB6H12.3及Ab47(圖4A及圖4B)引起之血球凝集。

B6H12介導之Fcγ受體活化

【0387】 於活體內，單核細胞、巨噬細胞、嗜中性粒細胞及樹突細胞可經由FcγRIIa、FcγRI及FcγRIIIa介導ADCP。雖然所有三種受體均可參與ADCP，但咸信FcγRIIa為參與此過程之主要Fcγ受體。將經人類FcγRI安定轉染之Jurkat細胞或連接至NFAT-螢光素酶受體構築體之高親和力FcγRIIa-H暴露至經漸增濃度之小鼠B6H12、Ab47或hB6H12.3中任一者塗覆之WIL2S細胞。藉由螢光素酶產生來監測FcγR活化。結果顯示於圖5A及5B中。塗覆Ab47及hB6H12.3之細胞劑量依賴型地活化FcγRI受體，然而，僅hB6H12.3能夠驅動FcγRIIa-H(最親密地連接以直接介導ADCP活性之受體)之活化。

【0388】 與抗體介導之細胞吞噬作用有關的抗體介導之Fc γ 受體活化係使用安定地表現Fc γ RI或Fc γ RIIa-H (高親和力H131變體)之改造Jurkat細胞及驅動螢火蟲螢光素酶之表現之NFAT反應元件作為效應細胞加以評定。藉由由於NFAT路徑活化產生的螢光素酶量化抗體生物活性；藉由發光讀取值量化效應細胞中之螢光素酶活性(圖5A及圖5B)。

NK細胞介導之ADCC活性

【0389】 檢查由NK細胞介導之抗體依賴型細胞毒性(ADCC)及mB6H12、Ab47及hB6H12.3對Fc γ RIIIa之活化。將經漸增濃度之抗體塗覆之載鉻Wils-2細胞暴露至初級人類自然殺手(NK)細胞4小時且藉由釋放放射性鉻進入至組織培養基中來評定特異性溶解。或者，將經漸增濃度之mB6H12、Ab47或hB6H12.3塗覆之Wils-2細胞暴露至安定地表現Fc γ RIIIa之高親和力V/V變體之Jurkat細胞且受體活化評定為NFAT驅動之螢光素酶活性。hB6H12.3展現相較於Ab47或鼠類B6H12親本抗體優異之ADCC及Fc γ RIIIa活化。結果顯示於圖6A及6B中。hB6H12.3之IgG1主鏈介導ADCC活性並驅動Fc γ RIII訊息傳導(一種係為目前IgG4臨床抗體所不存在的功能性)。

【0390】 為進行ADCC檢定，將負面選自Astarte Biologics之經純化之人類NK細胞解凍並以 7.2×10^5 個CD16⁺細胞/MI(使得70 μ L包含約 5×10^4 個效應細胞)之濃度再懸浮於RPMI/1% FBS中。收集 5×10^6 個靶細胞(WIL2S細胞)，離心，且再懸浮於100 μ L FBS中。將100 μ L (約100 μ Ci) Cr-51添加至該等細胞並輕輕地混合。將該等細胞置於37 $^{\circ}$ C CO₂-增濕培養箱中以標記1小時。偶爾輕拍該等細胞以維持懸浮。用RPMI/1% FBS洗該等細胞三次，小心地將放射性上清液丟棄於適宜廢物容器中。然後將該等

細胞再懸浮於10 mL RPMI/1% FBS中並計數。移去 7.2×10^5 個細胞且懸浮於總體積為10 mL之檢定培養基，使得70 μ L等效於約 5×10^3 個靶細胞。

【0391】 就抗體稀釋及板總成而言，於檢定培養基(*prep @ 3X*)中稀釋該等抗體。將該等抗體添加至板，緊接著添加經Cr標記之靶細胞。將70 μ L及140 μ L檢定培養基代替抗體添加至對照孔。此等孔分別代表總體及自發釋放對照。將該等靶細胞混合且將70 μ L添加至96孔板之各測試孔及對照孔。在37°C培養箱中培養標靶與抗體30分鐘。將70 μ L (5×10^4 個)效應細胞添加至各測試孔。將70 μ L 3% triton X-100添加至全部的釋放孔且上下吸移三次而混合。將該等板恢復至37°C、CO₂-增濕培養箱中維持4小時。

【0392】 總之，資料證實本發明之新穎人類化抗-CD47抗體具有超過鼠類親本抗體之優異且意想不到之性質。人類化抗-CD47抗體呈現優異之吞噬作用/ADCP能力，如由RBC吞噬作用(圖3B)及Fc γ RII訊息傳導(圖5B)證實。人類化抗-CD47抗體呈現優異之細胞溶解/ADCC，如由NK細胞介導之細胞溶解(圖6A)及Fc γ RIII訊息傳導(圖6B)證實。人類化抗-CD47抗體呈現優異之Fc γ RI訊息傳導(圖5A)。最後，人類化抗-CD47抗體亦呈現優異之毒性，如減少之血球凝集證實，如在血球凝集檢定(圖4A及圖4B)中證實。發現人類化抗-CD47抗體hB6H12.3特別有效。

抗-CD47抗體之抑制功能

【0393】 除了阻斷吞噬活性外，CD47與SIRP α 之相互作用亦藉由SHP1之活化及下游訊息(諸如Vav)之失活減少發炎細胞介素之產生。人類單核細胞經LPS處理以驅動於存在或不存在親本及各種人類化抗-CD47抗體下產生細胞介素。用所有的CD47靶抗體處理可顯著地增強LPS驅動之

細胞介素。較佳細胞介素產生及固有細胞活化之一種結果係驅動二級T細胞反應之能力。已知腫瘤相關巨噬細胞展現無法抑制且可主動抑制二級T細胞活化之抑制表現型。人類單核細胞經分化且利用IL10及MSCF偏極化以將其等驅向免疫抑制TAM樣表現型。此等經分化之單核細胞可抑制CD3/CD28驅動之自體T細胞增殖。在此範例中添加抗-CD47處理可活化TAM且將其等移向更多M0/M1表現型(CD86/MHCII增加)。參見，例如，圖7A、7B及7C。TAM樣表現型之此變化與抑制CD3/CD28介導之T細胞增殖及活化之能力有關。參見，例如，圖7D。

【0394】 抑制因子檢定係利用以IL-10分化成腫瘤樣巨噬細胞之人類單核細胞與自體T細胞共培養且評定支持T細胞受體介導之活化的能力。將CD47添加至培養物且發現引起巨噬細胞之活化標記物上調，如藉由CD86及MHCII之上調測得。此外，TCR介導之T細胞活化之支持係藉由T細胞上之MHCII之上調及IFN γ 之分泌加以評定(圖7A-圖7D)。

與其他抗-CD47抗體之比較

【0395】 比較hB6H12.3與其他已知的CD47抗體5F9及CC-9002 (參見，WO2011/143624)。於比較中，於如前面所述之相同NFAT-螢光素酶Jurkat細胞檢定中測定Fc γ RI及Fc γ RII活性。hB6H12.3呈現相對5F9及CC-90002 IgG4抗體(圖8A及圖8B)優異之活化Fc γ RI及Fc γ RII的能力。

【0396】 此外，如上文所述測定NK介導之ADCC及IFN γ 分泌。再次地，hB6H12.3呈現相對5F9及CC-90002 (圖8C及圖8D)優異之介導ADCC及刺激IFN γ 分泌的能力。

實例3：具有掩模之人類化抗-CD47抗體

使用重組人類MMP裂解經掩蔽之抗體以用於結合及功能研究

【0397】藉由於37°C下用1.25 mM 4-胺基苯基乙酸汞(APMA)培養重組MMP 1-2小時而使重組MMP全部活化。通常，添加1-2 µg經活化之rhMMP2至0.25-0.5 mg經掩蔽之抗體且於37°C下培養4-16小時。採用減少之抗體反相LC-MS使用配備PLRP-MS 3 µm管柱(Agilent)之Waters Acquity/Xevo UPLC來評定抗體裂解之程度。使用UNIFI軟體(Waters)分析資料。與MMP反應導致於所欲裂解位點之掩模定點裂解。於經掩蔽之抗體完全再活化後，使用MabSelect SuRe蛋白A樹脂純化裂解產物，接著用於結合檢定。

【0398】生成MMP2再活化之經掩蔽之抗體之質譜資料。解迴旋於重組人類MMP2裂解前(圖9A)及裂解後(圖9B)Vel-IPV-hB6H12.3之輕鏈團。完整輕鏈之預期m/z為28681 (觀測值：28680.8)。MMP2裂解抗體(LRSG-hB6H12.3)之預期m/z為23969(觀測值：23968.4)。

【0399】亦藉由瞬時於Expi-HEK或Expi-CHO細胞中表現產生於N端具有「短」序列之將維持蛋白水解之抗-CD47抗體。例如，就採用IPVS-LRSG MMP裂解序列之經掩蔽之抗體而言，LRSG序列於MMP活化後仍舊保留。

基於MMP之裂解序列之蛋白酶特異性之評定

【0400】藉由於37°C下用1.25 mM 4-胺基苯基乙酸汞(APMA)培養MMP 1小時及長達24小時而使MMP活化。藉由於37°C下在50 mM乙酸鈉、100 mM NaCl (pH 4.0)中進行2小時培養來活化豆蛋白酶。

【0401】為評定裂解序列之裂解情況，於37°C下用400 pmol/min標準化蛋白酶培養抗體(10 µg)過夜，以製造商報告值指示。使用減少之抗體反相LC-MS使用配備PLRP-MS 3 µm管柱(Agilent)之Waters

Acquity/Xevo UPLC來評定抗體裂解之程度。使用UNIFI軟體(Waters)分析資料。

【0402】針對於一組腫瘤相關蛋白酶(諸如人類及鼠類/大鼠MMP、ADAM家族、uPA、間質蛋白酶及豆蛋白酶)測試兩個蛋白酶裂解位點(IPV及M2)之蛋白酶裂解概況。另外，亦測試該等序列之藉由胞外蛋白酶tPA及因子Xa之裂解。在此等三個蛋白酶裂解位點之蛋白酶裂解概況顯示於表14中。

【0403】於37°C下用400 pmol/min標準化蛋白酶培養肽(N端融合至hBU12抗體主鏈)過夜且評定裂解。M2位點被大多數MMP以及uPA及間質蛋白酶裂解。IPV位點被除了MMP13外的幾乎所有MMP裂解且不受其他蛋白酶類別影響。

表14.在兩個不同蛋白酶裂解位點之蛋白酶裂解概況。

酵素	裂解序列：	
	M2	IPV
	GPLG*VR**	IPVS*LR**SG
人類MMP2	完全	完全
人類MMP7	完全	完全
人類MMP9	完全	完全
人類MMP13	完全	最小化
鼠類MMP2	完全	部分
鼠類MMP7	部分	完全
大鼠MMP9	部分	完全
uPA	部分	無
間質蛋白酶	完全	最小化
豆蛋白酶	無	最小化

tPA	--	無
因子Xa	最小化	無
ADAM (hu、mu)	無	無

MMP裂解位點由*表示，而uPA/間質蛋白酶/豆蛋白酶裂解位點由**表示。任一位點之裂解係足以恢復抗體結合

經掩蔽之抗-CD47抗體之飽和結合

【0404】 進行抗-CD47抗體與SW780人類膀胱癌細胞之飽和結合。測試Vel-IPV-掩蔽之hB6H12抗體以及MMP2預活化之比較物。經裂解之Vel-IPV-抗體在抗體N-端具有重組-LRSG序列(圖10及表15)。

表15.藉由飽和結合獲得之對SW780細胞之結合親和力(Kd)之確定(圖10)。

抗體	Kd (nM)
經裂解之Vel-IPV-hB6H12.3	11.4
經裂解之Vel-IPV-hB6H12.4	9.2
經裂解之Vel-IPV-hB6H12.19	26.6
經裂解之Vel-IPV-hB6H12.20	30.2
Vel-IPV-hB6H12.3	> 2000
Vel-IPV-hB6H12.4	> 2000
Vel-IPV-hB6H12.19	> 2000
Vel-IPV-hB6H12.20	> 2000

【0405】 測試Vel-IPV-掩蔽之hB6H12抗體以及MMP2預活化之比較物。經裂解之Vel-IPV-及短-IPV抗體在抗體N端具有殘基-LRSG序列。經裂解之抗體經用MMP2裂解產生，而短-IPV抗體係重組產生(圖11及表16)。如本文所使用，「短」、「短抗體」或「短抗原結合片段」係指於藉由重組產生(即，無捲曲螺旋域地產生且因此不進行裂解)之MMP或抗體或

抗原結合片段裂解後的抗體或抗原結合片段。MMP裂解得到短的胺基酸序列殘基。就IPV裂解位點而言，殘基(或短)序列應為LRSG或SG。就M2裂解位點而言，殘基(或短)序列應為VR。

表16.藉由飽和結合獲得之對SW780細胞之結合親和力(Kd)之確定(圖11)。

抗體	Kd (nM)
hB6H12.3	19.2
Ab47	8.0
Vel-IPV-hB6H12.3	> 2000
短IPV-hB6H12.3	18.1
經裂解之Vel-IPV-hB6H12.3	14.2

【0406】 進行抗-CD47抗體與人類紅血球之飽和結合。測試Vel-IPV-掩蔽之hB6H12抗體以及再活化之比較物(短IPV-hB6H12.3或經MMP2裂解之Vel-IPV-hB6H12.3)。經裂解之Vel-IPV-及短-IPV抗體在抗體N端具有殘基-LRSG序列。經裂解之抗體經用MMP2裂解產生，而短IPV抗體係重組產生(圖12及表17)。

表17.藉由飽和結合獲得之對人類紅血球之結合親和力(Kd)之確定(圖12)。

抗體	Kd (nM)
hB6H12.3	58.2
Ab47	26.5
Vel-IPV-hB6H12.3	> 2000
短IPV-hB6H12.3	46.8
經裂解之Vel-IPV-hB6H12.3	41.7

【0407】 藉由ELISA進行抗-CD47抗體對rhCD47之飽和結合。Vel-

IPV-hB6H12.3呈現顯著受損之結合。該結合可於藉由rhMMP2裂解後恢復(圖13及表18)。

表18.藉由ELISA確定對rhCD47之結合親和力(Kd)(圖13)。

抗體	Kd (nM)
hB6H12.3	1.7
Vel-IPV-hB6H12.3	1.7
經裂解之Vel-IPV-hB6H12.3	> 250

【0408】藉由ELISA，用hB6H12.3 G91A (於LCDR3中具有G91A點突變)進行抗-CD47抗體對rhCD47之飽和結合。hB6H12.3及hB6H12.3 G91A均呈現比Ab47高的B_{max}(圖14及表19)。

表19.藉由ELISA確定對rhCD47之結合親和力(Kd)之確定(圖14)。

抗體	Kd (nM)
Ab47	1.0
hB6H12.3	1.4
hB6H12.3 G91A	2.7

【0409】進行抗-CD47抗體與SW780人類膀胱癌細胞之飽和結合。比較Ab47及hB6H12.3之結合與LCDR3中具有G91A突變之變體之結合(圖15及表20)。

表20.藉由飽和結合獲得之對SW780人類膀胱癌細胞之結合親和力(Kd)之確定(圖15)。

抗體	Kd (nM)
Ab47	6.8
Ab47 G91A	19.8

hB6H12.3	20.5
hB6H12.3 G91A	62.3

【0410】 進行抗-CD47抗體與人類紅血球之飽和結合。比較Ab47及hB6H12.3之結合與LCDR3中具有G91A突變之變體之結合(圖16及表21)。

表21. 藉由飽和結合獲得之對紅血球之結合親和力(Kd)之確定(圖16)。

抗體	Kd (nM)
Ab47	12.1
Ab47 G91A	100.3
hB6H12.3	68.9
hB6H12.3 G91A	> 150

實例4：體內實驗

【0411】 組織中巨噬細胞浸潤之評定可藉由包括免疫組織化學分析(IHC)、西方墨點轉漬法、流動式細胞測量術或RNA定序方法之習知方法監測巨噬細胞之表面標記物(包括小鼠巨噬細胞之F4/80、或CD163、CD68或CD11b)來進行。

【0412】 組織中蛋白酶之評定可使用多種技術(包括彼等監測蛋白酶活性者以及彼等可檢測蛋白質水解活性者)來監測。可檢測組織中蛋白酶(其可包括蛋白酶之兩種非活性及活性形式)之存在之習知方法包括IHC、RNA定序、西方墨點轉漬法或基於ELISA之方法。可使用其他技術以檢測組織中之蛋白酶活性，其包括酶譜法、藉由螢光顯微術之原位酶譜法或螢光蛋白質水解受質之使用。此外，可將螢光蛋白質水解受質之使用與特定蛋白酶之免疫捕捉組合。另外，針對蛋白酶活性位點之抗體可藉由多種

技術(包括IHC、螢光顯微術、西方墨點轉漬法、ELISA或流動式細胞測量術)使用(參見, Sela-Passwell等人 *Nature Medicine*. 18:143-147. 2012; LeBeau等人 *Cancer Research*. 75:1225-1235. 2015; Sun等人 *Biochemistry*. 42:892-900. 2003; Shiryaev等人 2:e80. 2013)。

【0413】 確定抗-CD47抗體於NSG小鼠之L428淋巴瘤異種移植腫瘤模型中之活性。此異種移植模型具有高度巨噬細胞浸潤, 如藉由小鼠F4/80經IHC穩健染色獲得證實。參見, 例如, 圖17B。抗體以1或10 mg/kg中任一劑量i.p.投與, q4dx4。在整個研究中經掩蔽之抗體Vel-IPV-hB6H12.3及未經掩蔽之抗體Ab47及hB6H12.3於10 mg/kg之劑量下均有效地減小腫瘤體積。在1 mg/kg之劑量下, Vel-IPV-hB6H12.3及未經掩蔽之hB6H12.3二者均使得腫瘤生長延遲。在此劑量下, 經掩蔽之抗體Vel-IPV-hB6H12.3之活性比未經掩蔽之hB6H12.3略小。(圖17A)。

【0414】 確定抗-CD47抗體於NSG小鼠之Detroit 562異種移植頭頸腫瘤模型中之活性。此異種移植模型具有高度巨噬細胞浸潤, 如藉由小鼠F4/80經IHC穩健染色獲得證實。參見, 圖18B。q4dx4, 於5 mg/kg下。在整個研究持續期間抗體Ab47、hB6H12.3及Vel-IPV-hB6H12.3有效地減小腫瘤體積(圖18A)。

【0415】 確定抗-CD47抗體於NSG小鼠之HT1080異種移植纖維肉瘤腫瘤模型(圖19A及19B)及HEPG2異種移植肝細胞腫瘤模型(圖19C及19D)中之活性。此等異種移植模型具有低度巨噬細胞浸潤, 如藉由小鼠F4/80經IHC (q4dx4, 於10 mg/kg下)有限的染色獲得證實。在整個研究持續時間期間抗體Ab47、hB6H12.3及Vel-IPV-hB6H12.3有效地減小及/或減慢腫瘤體積。

【0416】除了評定抗腫瘤活性及其與巨噬細胞浸潤的關係外，已評定此等腫瘤中MMP之水平以及未經掩蔽之抗體之評定。收穫來自異種移植及同基因腫瘤模型之腫瘤且經過蛋白質及RNA序列評定以監測此等腫瘤中MMP之水平及理解TME中RNA及蛋白質水平之間的關係。使用Luminex多重平臺之蛋白質分析顯示用於研究Vel-IPV-hB6H12.3之抗腫瘤活性之腫瘤均包含穩健水平之MMP2及9二者(表22)。另外，當吾人在比較腫瘤MMP水平與彼等存在於細胞培養分析中者時，吾人發現在腫瘤位點之MMP水平顯著增加，遠超過僅在活體外組織培養條件中所觀測到的水平(圖35A及35B)。

表22.所選腫瘤中之MMP2及MMP9水平(pg/ml)。

		腫瘤		
異種移植模型	MMP	HT1080	HEPG2	L428
	MMP2	7506	787	204
	MMP9	2020	771	47
同基因模型	MMP	HT1080	HEPG2	L428
	MMP2	8453	27765	47899
	MMP9	28137	20845	22661

【0417】抗-CD47抗體於具有低固有巨噬細胞含量之腫瘤模型中之活性可在與已知可驅動巨噬細胞浸潤之MMAE奧瑞司他汀ADC組合時得到擴增。此於NSG小鼠之HepG2異種移植腫瘤模型中獲得證實。抗-CD47抗體係於5 mg/kg下i.p.投與(q4dx4)，而MMAE ADC係於1 mg/kg下一次性投與。抗體之組合比單獨的任一種抗體可更有效地減小腫瘤體積(圖20)。利用包含奧瑞司他汀(LIV1A及CD30)之其他MMAE之其他實驗已證

實與針對Liv1A ADC之乳癌異種移植模型MCSF7及針對CD30 ADC之L428淋巴瘤模型(圖36A及36B)中抗-CD47抗體相似之可組合性。

【0418】 可使用用於人類hB6H12.3抗體之相同VEL及IPV序列掩蔽小鼠反應性抗-CD47抗體mIAP301 (Oldenborg 等人, J. Exp. Med. 193:855-861, 2001)。利用此等構築體之掩蔽阻斷抗體結合至鼠類CD47陽性腫瘤(圖21A)且防止功能性, 如藉由RBC吞噬作用測得(圖21B)。

【0419】 抗小鼠CD47抗體mIAP301在以10 mg/kg之單次IV劑量投與時會驅動BALB/c小鼠中血小板之耗竭。相比之下, 此耗竭在投與小鼠10 mg/kg IV之劑量之經掩蔽之Vel-IPV-mIAP301及Vel-M2-mIAP301抗體時未被觀測到(圖22A)。

【0420】 經掩蔽之Vel-IPV-mIAP301抗體相較於未經掩蔽之mIAP301具有於BALB/c小鼠之血漿中大大地改良之藥物動力學, 證實經掩蔽之抗體能夠避免典型抗-CD47抗體所遭遇到的標靶介導之藥物處置。Vel-IPV-mIAP301及mIAP301抗體經離胺酸共軛經³H-丙酸鹽標記且以1 mg/kg之IV劑量投與BALB/c小鼠。抗體濃度係藉由於不同時間點抽取的血漿之閃爍計數確定(圖22B)。mIAP301於血漿中之濃度於15分鐘內係低於可檢測量, 而可測定Vel-IPV-mIAP301濃度直至給藥後7天。

【0421】 在載A20 BALB/c小鼠中使用1及10 mg/kg之劑量之³H-標記抗體測試經掩蔽之Vel-IPV-mIAP301、及Vel-M2-mIAP301及未經掩蔽之mIAP301之生物分佈。於腫瘤已達到250 mm³後立刻投與抗體。在指定的時間點, 將小鼠殺死且藉由閃爍計數確定抗體於血漿、血液、腫瘤、脾臟及肝臟中之濃度。如圖37A及37B中所顯示, mIAP301於血漿中之濃度在投與後一小時內可忽略不計。然而, 當相較於未經掩蔽之mIAP301抗體

時，顯著更少的經掩蔽之抗體存於脾臟中(圖37C及37D)。在肝臟中看到類似結果。(數據未顯示)。相比之下，藉由避免正常組織中CD47之標靶介導之處置，經掩蔽之Vel-IPV-mIAP301及Vel-M2-mIAP301抗體證實相較於mIAP301，於腫瘤中增加之水平(圖37E及37F)。

【0422】 抗小鼠CD47抗體mIAP301驅動A20淋巴瘤模型中之抗腫瘤活性，但引起伴隨的RBC耗竭(圖23A及圖23B)。經掩蔽之Vel-IPV-mIAP301抗體賦予類似活性，但消除於RBC耗竭之效應。Vel-IPV-mIAP301抗體避免RBC抗原下沉，但亦維持腫瘤結合(圖23C及圖23D)。A20淋巴瘤模型更詳細地述於Donnou等人(Advances in Hematology, Article ID 701704, 2012)及Liu等人(Nature Medicine, 21:1209-1215, 2015)中。

【0423】 抗小鼠CD47抗體mIAP301驅動MC38結腸癌模型中之抗腫瘤活性，已知MC38結腸癌模型對免疫腫瘤學藥劑具有反應性。此模型中經掩蔽之mIAP301抗體之活性顯示優異之效力，如展現完全反應之動物表示(圖24)。此動物之再攻毒導致腫瘤之完全排斥，證實誘導長期記憶T細胞反應(數據未顯示)。MC38結腸癌模型更詳細地述於Liu等人(同前述)中。

【0424】 除了測試人類抗-CD47抗體與ADC針對Liv1a或CD30之組合活性外，吾人亦評定與其他免疫調節劑之組合活性。為達成此點，進入到免疫完全小鼠系統且使用鼠類靶向抗-CD47替代抗體mIAP。使用A20模型，吾人證實經掩蔽之抗-CD47抗體與抗-PD-1替代抗體及抗-SEA-CD40抗體SEA-1C10協同。此等資料提供免疫系統之先天及適應性部分與經掩蔽之CD47靶向劑接合可組合驅動穩健抗腫瘤反應的證據。

【0425】 親本及經掩蔽之抗鼠類CD47抗體mIAP301與抗-PD-1替代

抗體之組合驅動增加之抗腫瘤活性，此導致4/6動物展現CR反應(參見，Dahan等人 *Cancer Cell*. 28:285-295. 2015，參考PD-1抗體，純系RMP1-14)(圖25A)。親本抗鼠類CD47抗體mIAP301與巨噬細胞活化CD40靶向SEA增強替代抗體1C10之組合驅動增加之抗腫瘤活性(參見，WO2016/069919，參考1C10抗體；參見，Lindberg等人 *J. Biol. Chem.* 269:1567-1570. 1994，參考mIAP301抗體)(圖25B)。

【0426】 顯示抗-CD47與抗-PD-1或抗-CD40之組合之資料指示抗-CD47療法可增強增強T細胞活性之藥劑之活性，如在檢查點抑制劑抗體(抗-PD-1抗體)及增強先天性細胞活性之彼等藥劑(抗-CD40抗體或其他CD40抑制劑)情形中。此支持抗-CD47抗體可與診所中之多種免疫調節劑配對以支持抗腫瘤反應之適應性及先天部分的觀點。

實例5：經捲曲螺旋域掩蔽之抗體

【0427】 利用靜脈內投與至BALB/c小鼠來評定具有不同捲曲螺旋域之經掩蔽之人類化B6H12抗體之安定性。抗體係以5 mg/kg投與。在所給定的時間點(3天)，從經給藥之小鼠收集血漿。使用IgSelect樹脂自血漿中純化人類抗體。藉由SDS-PAGE還原並分離所捕捉的抗體，然後藉由西方墨點轉漬法使用HRP共軛抗人類Fc抗體進行探測。藉由對應於尺寸差異在約5 kDa之經掩蔽及未經掩蔽之重鏈之帶之密度測定法來評定經裂解之抗體百分比(圖26)。

【0428】 表23顯示具有不同捲曲螺旋形成肽對併入至包含重鏈(SEQ ID NO:2)及輕鏈(SEQ ID NO:10)之人類化B6H12抗體中之掩蔽效應且於不同細胞系上測試。於該等實例中，該抗體亦稱為Ab47。顯示各抗體之Kd (nM)，Kd (nM)係由各個細胞系上之飽和結合得到。各結合實驗使用

2000 nM之高濃度。如表23中所顯示，甚至當於大於2微莫耳之濃度下測試時，多種捲曲螺旋域可抑制Ab47結合至表現於細胞表面上之CD47，然而未經掩蔽之Ab47抗體呈現3.3-21 nM之IC₅₀。

【0429】 於具有人類HT1080纖維肉瘤異種移植之裸小鼠中評定具有Vel-IPV捲曲螺旋及裂解序列之經掩蔽之人類B6H12抗體之安定性及活化。抗體係以5 mg/kg IP投與。在所給定的時間點(1天、3天、4天)，將小鼠殺死且收集組織及血漿。將組織均質化且使用IgSelect樹脂自生物樣品純化人類抗體。藉由SDS-PAGE還原並分離所捕捉的抗體，然後藉由西方墨點轉漬法使用HRP共軛抗人類Fc抗體進行探測。藉由對應於尺寸差異在約5 kDa之經掩蔽及未經掩蔽之重鏈之帶之密度測定法來評定經裂解之抗體百分比(圖38A及38B)。在所測試的任何時間點於血漿或肝臟中檢測到極少的未經掩蔽之抗體(<5%)。同時，於腫瘤中檢測到20-30%以上的裂解，且最大裂解量出現在給藥後3-4天。另外，自經Ab47或Vel-IPV-Ab47處理4或7天的小鼠收穫之HT1080腫瘤經過流動式細胞測量術測定以確定可結合至腫瘤表現CD47並飽和之抗體之程度(圖38B)。

表23. 具有不同抗體掩蔽域之人類化B6H12抗體(Ab47)之親和力(nM)(藉由飽和結合流動式細胞測量術來獲得)。

捲曲螺旋	HT1080	SW780	HCT116	Raji
Ab47	21	9.6	7.8	3.3
A2B1	> 2000	> 2000	1775	
CA2B1	> 2000	> 2000	> 2000	
Vel	> 2000	> 2000	> 2000	
CVel	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000

M11	> 2000	> 2000	> 2000	
CM11	> 2000	> 2000	> 2000	
M15	> 2000	> 2000	> 2000	
CM15	> 2000	> 2000	> 2000	
Fos-Jun	> 2000	> 2000	> 2000	
CFos-Jun	> 2000	> 2000	> 2000	
A4B4	1181	1684	1116	466
鉸鏈	> 2000	476	118	104

人類化抗-CD47抗體之活性及藥物動力學及經由掩蔽改良於石蟹獼猴中之耐受性之證實

【0430】 為測試掩蔽於改良抗-CD47 IgG1抗體變體之藥物動力學及耐受性的能力，於石蟹獼猴中實施一系列IV單劑量研究。所測試的抗-CD47 IgG1抗體與跨此等物種之表現及序列高度保守之人類及石蟹獼猴CD47具有交叉反應性。一組石蟹獼猴及人類組織中之藉由原位凝膠酶譜法測定之蛋白酶活性之評定指示蛋白酶活性水平跨此等物種亦高度保守。此外，石蟹獼猴具有高度相似的FcγR與IgG1抗體相互作用，且被認為人類IgG1抗體之效應功能相關效應之毒物學預測，使其等成為評估IgG1抗-CD47抗體之效應之適宜模型(Warncke等人 J. Immunol. 188:4405-4411. 2012)。總之，石蟹獼猴代表用於評估單獨抗-CD47抗體之不同活性之相關物種及此外此種活性如何藉由掩蔽及經修飾效應子功能來改變。

替代人類化B6H12、Ab47

【0431】 為確定B6H12於替代人類化IgG1構築體之耐受性及PK及進一步證實Vel-IPV掩模及裂解序列改變耐受性及藥物動力學之能力概念

論證，對未經處理之食蟹獼猴靜脈內投與0.1、1、10及30 mg/kg替代人類化IgG1 B6H12抗-CD47抗體Ab47。相較於人類化IgG4平臺之mB6H12抗體之公開資料(Liu, 2015)，人類化IgG1基Ab47證實活性增加，藉由血液學分析證實為紅細胞質量損失。然而，除了阻斷與CD47相互作用外缺乏實現高ADCC、ADCP及CDC活性之效應功能之IgG4 B6H12證實石蟹獼猴中高達30 mg/kg之劑量之耐受性(Liu, 2015)，於大於1 mg/kg之劑量下Ab47不具耐受性(圖27A)。

Ab47對Vel-IPV-Ab47

【0432】 為證實Vel-IPV掩模減小Ab47之活性的能力，以0.1、1及10 mg/kg之劑量投與食蟹獼猴。尤其地，高大約10倍的劑量比未經掩蔽之Ab47耐受性更好，如藉由從經1.0 mg/kg Ab47及10 mg/kg Vel-IPV-Ab47處理之動物中經收集用於血液學分析之血液樣品中之相似紅細胞質量損失水平證實(圖27B)。經Ab47處理之動物證實與血球溶解性及耐受性之缺失有關的一致臨床徵兆(紅色泌尿生殖器排洩物、經血球溶解之樣品、嘔吐及活動過少)，而於經掩蔽之抗體處理之動物中觀測到完全沒有不良臨床徵兆。經掩蔽之Ab47之耐受性的此增加亦證實掩蔽以減小循環血漿細胞介素(諸如單核細胞趨化蛋白-1 (MCP-1))之增加之能力。Vel-IPV-Ab47之最高測試劑量(10 mg/kg)證實類似於Ab47之對照及最低測試劑量(0.1 mg/kg)之水平(圖39A)。另外，掩蔽顯著地改良分子之PK。在研究第3天Ab47之1 mg/kg的劑量低於Generic TAb (總抗體)檢定之檢測限值的情況下，於整個研究過程、研究第15天，1 mg/kg Vel-IPV-Ab47係可檢測的(圖28)。Generic TAb ELISA使用經結合至Ab47及Vel-IPV-Ab47之人類輕鏈 κ 之抗人類輕鏈 κ mAb塗覆之96孔微量滴定板。其不與食蟹獼猴

輕鏈 κ 交叉反應。用未處理之組併食蟹獼猴 K_2 EDTA血漿將研究樣品稀釋至動力學檢定範圍，對於Ab47(10(LLOQ)，稀釋至1280 ng/mL(ULOQ))，或對於Vel-IPV-Ab47(20(LLOQ)，稀釋至2560 ng/mL(ULOQ))。經稀釋之樣品及QC及校準器經過分析緩衝液之1:20所需最小稀釋(MRD)，接著於添加至經阻斷且經洗之板。於RT下培養1小時後，洗該等板且用生物素化抗人類輕鏈 κ mAb (與捕捉劑相同之純系)檢測經結合之分析物(Ab47或Vel-IPV-Ab47)，接著添加與鏈黴親和素共軛之聚合物辣根過氧化物酶(聚-HRP-SA)。於培養及洗後，將HRP受質3,3',5,5'-四甲基-聯苯胺(TMB)添加至該等板且顯色10分鐘。藉由1N HCl停止反應且在Spectromax M5板式讀取器上於450 nm–630 nm下讀取該等板。將淨吸光度值輸入Watson LIMS v. 7.4.2中且進行5-PL非線性回歸以將吸光度換算成於樣品中存在之ng/mL總抗體。

Ab47對hB6H12.3

【0433】將人類化B6H12.3 (其特徵係差示 K_d 、增加之 B_{max} 及減少之紅血球聚集)以1 mg/kg之劑量單次IV快速注射投與食蟹獼猴以測試差示活體內活性。雖然於1 mg/kg之hB6H12.3及Ab47皆導致類似的紅血球耗竭水平(圖29)，但Ab47亦證實於1 mg/kg下耗竭至給藥前血小板水平之約40%，而hB6H12.3具有僅20%耗竭，類似於極有可能由於採樣偏差造成之對照水平(圖30)。於用兩種抗體處理後，於研究第7天開始血小板出現增加，極有可能係由於大體上刺激骨髓造成。

hB6H12.3對Vel-IPV-hB6H12

【0434】為證實Vel-IPV掩模減小hB6H12.3之活性的能力，對食蟹獼猴投與10及20 mg/kg抗體之劑量。20 mg/kg (最高測試劑量)之血液學

測試證實紅細胞質量損失降低，與用1 mg/kg hB6H12.3所觀測到類似，然而，於低20倍的劑量下比未經掩蔽之hB6H12.3增加之耐受性(圖31)。類似地，hB6H12.3之掩蔽亦證實循環細胞介素(包括MCP-1)減少，需要20倍的經掩蔽之hB6H12.3的劑量以產生與彼等藉由未經掩蔽之hB6H12.3所達成反應類似之反應(圖39B)。經投與Vel-IPV-hB6H12.3之動物未出現與治療有關的臨床症狀，而藉由於1 mg/kg下之未經掩蔽之hB6H12.3觀測到與血球溶解性有關的臨床症狀。使用Generic TAb ELISA之藥物動力學分析證實相較於未經掩蔽之hB6H12.3而言改良之藥物動力學概況(圖39C)。

Vel-IPV-hB6H12.3對SEA-Vel-IPV-hB6H12.3

【0435】為進一步增強經IgG1掩蔽之抗-CD47抗體Vel-IPV-hB6H12.3之活性，該抗體係採用產生糖改造抗體、SEA、具有增強效應功能之非岩藻糖基化抗體之Seattle Genetics專屬技術(US 8,163,551)來產生。在高(Detroit562)及低(HT1080)巨噬細胞模型中評定Vel-IPV-hB6H12.3及SEA-Vel-IPV-hB6H12.3以及岩藻糖基化及非岩藻糖基化SEA hB6H12.3之異種移植模型中之相對抗腫瘤活性。去除核心岩藻糖基化及所得的SEA-hB6H12.3及SEA-Vel-IPV-hB6H12.3在任一模型中均未提供有益於抗腫瘤活性之證據(圖40A及40B)。因為此等模型係在免疫不完全小鼠中運行的，其等可能無法充分利用藉由SEA主鏈賦予之增強之效應功能，故鼠類替代抗體mIAP301亦係非岩藻糖基化的，且於高活性A20同基因淋巴瘤模型以及較低活性CT26同基因模型中測試岩藻糖基化及非岩藻糖基化vel-IPV-mIAP301之抗腫瘤活性。去除核心岩藻糖以產生SEA抗體似乎並不賦予額外的抗腫瘤效益。

【0436】 雖然利用其他抗體之SEA技術已導致增加之活性，然而，當掩蔽抗體時，SEA及非-SEA兩種模式均良好耐受，在血液學分析中具有類似紅細胞質量損失，達到相同最大測試劑量20 mg/kg (圖32)。在用任一種抗體處理期間未觀測到不良臨床徵兆，然而，就SEA抗體而言，循環MCP-1細胞介素水平增加(圖41A)。使用Generic TAb ELISA之藥物動力學分析證實SEA與無-SEA Vel-IPV-hB6H12.3抗體之間之藥物動力學概況大體上相似，且相較於未經掩蔽之hB6H12.3均改良(圖41B)。

實例6：以所選生物標記治療個體的腫瘤

【0437】 本發明進一步設想用本發明之抗-CD47抗體基於罹患腫瘤之個體內的所選生物標記治療該等個體。用本發明之抗-CD47抗體治療之個體的選擇將基於1)腫瘤組織相對於周圍非腫瘤組織升高的MMP水平及活性；2)腫瘤組織相對於周圍非腫瘤組織升高的CD47表現水平；及3)腫瘤組織相對於周圍非腫瘤組織升高的巨噬細胞浸潤水平。

【0438】 確定所選生物標記之水平及活性之方法包括免疫組織化學及酶學分析。例如，巨噬細胞浸潤水平可藉由免疫組織化學分析使用抗-CD163抗體作為標記物來確定。

【0439】 為證實檢測腫瘤與非腫瘤組織樣品中腫瘤浸潤巨噬細胞的能力，使用乳癌核心樣品及正常乳腺組織樣品。使用抗-CD163抗體進行免疫組織化學分析。結果證實相對於非腫瘤樣品，可輕易地於腫瘤樣品中檢測到腫瘤浸潤巨噬細胞(圖33)。

實例7：Vel-IPV-hB6H12.3對CD47-陽性細胞之吞噬作用及血球凝集

【0440】 監測CD47陽性RBC之吞噬作用以評估掩蔽對抗體功能性

之影響。人類紅血球用螢光紅色PKH染料標記且用1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未經掩蔽之hB6H12.3、經掩蔽之Vel-IPV-hB6H12.3或MMP活化之Vel-IPV-hB6H12.3調理30分鐘。洗紅血球，然後用單核細胞巨噬細胞以10:1比率培養兩小時。然後用ACK低滲溶解緩衝液洗該等樣品三次。藉由經流動式細胞測量術監測人類巨噬細胞對經螢光標記之人類RBC之吸收來評估吞噬作用之程度。

【0441】如圖42中所顯示，經掩蔽之Vel-IPV-hB6H12.3並未展示吞噬作用增加超過未處理之RBC之背景水平，而hB6H12.3及MMP活化之Vel-IPV-hB6H12.3顯示類似之RBC吞噬作用之程度。

【0442】如實例2中所述測試經掩蔽之Ab47抗體對人類RBC之血球凝集之促進。於37 $^{\circ}\text{C}$ 下將人類RBC暴露至漸增濃度之經掩蔽之Vel-IPV-Ab47或MMP-裂解之Vel-IPV-Ab47三十分鐘。藉由光學評定各孔中視光點之直徑來監測血球凝集。

【0443】如圖43中所顯示，當Ab47經掩蔽時血球凝集受抑制，及當藉由MMP移除掩模時血球凝集恢復。

實例8：hB6H12.3直接誘導細胞凋亡

【0444】細胞表面CD47接合可引起細胞凋亡。已報告抗-CD47 mAb純系B6H12僅在固定至表面時可引起細胞凋亡；然而，hB6H12.3於未結合至表面下證實細胞凋亡活性。將八種不同的細胞系(A431、HEK293、Hela、HepG2、HPAF11、I540Cy、MCF7及THP1)各以每孔50,000個細胞接種24小時。用濃度為5至0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之hB6H12.3、5F9或IgG1同型對照處理該等細胞18小時。然後收集細胞，洗兩次，用細胞凋亡標記物膜聯蛋白V染色，及使用流動式細胞測量術分析量化細胞凋亡。

【0445】如圖44中所顯示，在所有八種細胞類型中，經hB6H12.3處理之細胞比經5F9或IgG1同型對照處理之相同類型細胞展現更大細胞凋亡水平，如藉由膜聯蛋白染色之相對水平確定。

實例9：全血及血漿中之hB6H12.3安定性

【0446】自BioIVT獲得從罹患各種類型癌症的17位患者(10位肉瘤、3位NSCLC、3位結腸癌及1位黑色素瘤)新得到的全血樣品(4%檸檬酸鈉)。用螢光異硫氰酸酯(FITC)直接標記hB6H12.3及經掩蔽之Vel-IPV-hB6H12.3抗體。於37°C下用漸增濃度(最大濃度20 µg/ml)之經FITC標記之hB6H12.3或經FITC標記之經掩蔽之Vel-IPV-hB6H12.3培養新鮮全血樣品20小時。藉由流動式細胞測量術表徵分析抗體與血液細胞之結合。

【0447】使用各肉瘤全血樣品之一部分以提取血漿，且將20 µg/mL重組CD47添加至血漿樣品。然後於37°C下用20 µg/mL hB6H12.3或經掩蔽之Vel-IPV-hB6H12.3培養包含重組CD47之血漿樣品四天。如實例2中所述，使用CD47結合ELISA評定Vel-IPV掩模之裂解程度。Vel-IPV-hB6H12.3於加入血漿中之濃度(20 µg/mL)下不結合至重組CD47；因此，於經Vel-IPV-hB6H12.3培養之血漿中所檢測到的任何抗體-CD47結合係歸因於經裂解之Vel-IPV-hB6H12.3與CD47之結合。

【0448】於所測試的17個血液樣品中，經掩蔽之Vel-IPV-hB6H12.3顯示於最高濃度下時僅與一個離群樣品結合超過10%(肉瘤，參見圖45B)。於任一其他16個樣品中均未檢測到被經掩蔽之Vel-IPV-hB6H12.3結合(代表性資料顯示於圖45A中)。如圖45C中所顯示，於罹患肉瘤之患者之十個血漿樣品任一樣品中，經掩蔽之Vel-IPV-hB6H12.3裂解不大於2%。

實例10：因應hB6H12.3之細胞介素產生

【0449】於37°C下用漸增濃度(最大濃度，20 µg/ml)之經FITC標記之hB6H12.3或經FITC標記之Vel-IPV-hB6H12.3或用0.1 µg/mL LPS培養來自癌症患者(10位肉瘤、3位NSCLC、3位結腸癌及1位黑色素瘤)之新鮮全血樣品20小時。使用38-plex細胞介素及趨化細胞素磁珠試劑盒(magnetic bead panel)評定細胞介素水平。

【0450】在大多數所測試患者樣品中，藉由hB6H12.3誘導產生適量的細胞介素，但藉由Vel-IPV-hB6H12.3誘導產生最少的細胞介素。細胞介素IP-10、IL1-Ra、MIP-1 α 及MIP-1 β 最常由hB6H12.3誘導。於所測試hB6H12.3之最大濃度下，IL1-Ra (圖46B)、MIP-1 α 及MIP-1 β 之水平低於200 pg/mL，而IP-10水平達到4000-5000 ng/mL(圖46A)。於所有情形中，藉由Vel-IPV-hB6H12.3產生的細胞介素水平低於藉由hB6H12.3產生之細胞介素水平，且通常低100-1000倍。

實例11：hB6H12.3在體內誘導細胞凋亡

【0451】對帶人類HT1080纖維肉瘤異種移植之裸小鼠在腫瘤達到200 mm³時投與5 mg/kg IP劑量之hB6H12.3、Vel-IPV-hB6H12.3或hIgG1同型對照。於所給定的時間點(24及96小時)，將小鼠殺死且收集腫瘤。將腫瘤均質化且將人類HT1080異種移植纖維肉瘤腫瘤細胞以1百萬個細胞/ml再懸浮於1X 膜聯蛋白V染色緩衝液(包含50 mM HEPES、700 mM NaCl、12.5 mM CaCl₂ (pH7.4) 1:10稀釋於水中之10x染色緩衝液)中。將細胞轉移至圓底96孔板(100 µl/孔)中且將5 µl FITC膜聯蛋白V染色試劑及1 µl 100 µg/ml紫外線活/死染色緩衝液添加至各孔。於室溫下染色細胞30分鐘。樣品於1550 g下離心5分鐘，移去上清液，並用1X冰冷膜聯蛋白V

染色緩衝液洗3X細胞。將細胞再懸浮於100 µl 1X 膜聯蛋白V染色緩衝液中。細胞凋亡係於LSRII細胞計數器上藉由流動式細胞測量術評定為對於膜聯蛋白V結合至表面磷脂醯絲胺酸而言呈陽性之細胞的百分比。用活/死染色劑陽性染色之細胞排除在分析之外。

【0452】如圖47所顯示，經hB6H12.3及Vel-IPV-hB6H12.3處理之腫瘤相較於未處理之腫瘤樣品及經同型對照處理之腫瘤樣品於處理後96小時顯示增加之膜聯蛋白V+凋亡細胞。

某些非限制性實施例

實施例1. 一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，該重鏈可變區包括：

以SEQ ID NO:16 (GYGMS)、17 (TITSGGTYTYYPDSVKG)及18 (SLAGNAMDY)描述之CDR；及

以SEQ ID NO:88描述之人類IGHV3-23/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H44、H49、H82、H89、H91及H94為供體殘基。

實施例2. 一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，該重鏈可變區包括：

以SEQ ID NO:16 (GYGMS)、17 (TITSGGTYTYYPDSVKG)及18 (SLAGNAMDY)描述之CDR；及

以SEQ ID NO:89描述之人類IGHV3-48/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H49為供體殘基。

實施例3. 一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片

段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，該重鏈可變區包括：

以SEQ ID NO:16 (GYGMS)、17 (TITSGGTYTYYPDSVKG)及18 (SLAGNAMDY)描述之CDR；及

以SEQ ID NO:90描述之人類IGHV3-66/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H29、H49及H82為供體殘基。

實施例4. 一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區，該重鏈可變區包括：

以SEQ ID NO:16 (GYGMS)、17 (TITSGGTYTYYPDSVKG)及18 (SLAGNAMDY)描述之CDR；及

以SEQ ID NO:91描述之人類IGHV3-74/HJ4框架，其中根據Kabat編號，框架位置H49為供體殘基。

實施例5. 如實施例1至4中任一項之人類化抗體或其抗原結合片段，其中該輕鏈可變區包括：

以 SEQ ID NO:31 (RASQTISDYLH)、32 (FASQSIG) 及 33 (QNGHGFRT)描述之CDR；及

以SEQ ID NO:92描述之人類IGKV6-21/KJ2框架，其中根據Kabat編號，框架位置L4、L21、L69及L85為供體殘基。

實施例6. 如實施例1至4中任一項之人類抗體或抗原結合片段，其中該輕鏈可變區包括：

以 SEQ ID NO:31 (RASQTISDYLH)、32 (FASQSIG) 及 33 (QNGHGFRT)描述之CDR；及

以SEQ ID NO:93描述之人類IGKV1-27/KJ2框架，其中根據Kabat編號，框架位置L21、L49及L69為供體殘基。

實施例7. 如實施例1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中根據Kabat編號，H29被F佔用，H44被R或G佔用，H49被A佔用，H82被M或I佔用，H89被I或V佔用，H91被F或Y佔用，及H94被R佔用。

實施例8. 如實施例5之抗體或抗原結合片段，其中根據Kabat編號，L4被M佔用，L21被L佔用，L49被K佔用，L69被T或S佔用，L85被V或T佔用。

實施例9. 如實施例1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其包括與SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7及8中之任一者具有至少90%的序列同一性之重鏈可變區(HCVR)及與SEQ ID NO:10、11、12、13、14及15中之任一者具有至少90%的序列同一性之輕鏈可變區(LCVR)。

實施例10. 如實施例5之抗體或抗原結合片段，其進一步包括LCDR3中之G91A突變(根據Kabat編號)。

實施例11. 如實施例1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段為IgG1同型物。

實施例12. 如實施例1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段相較於其親本抗體具有增強之抗體依賴型細胞毒性(ADCC)。

實施例13. 如實施例1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段相較於其親本抗體具有增強之抗體依賴型細胞吞噬作用(ADCP)。

實施例14. 如實施例1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其相較於

其親本抗體具有減少之核心岩藻糖基化。

實施例15. 如實施例1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段阻斷CD47與SIRP α 間相互作用。

實施例16. 如實施例1至4中任一項之抗體或抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段相較於其親本抗體具有減少之血球凝集。

實施例17. 一種核酸序列，其編碼如實施例1至4中任一項之抗體或抗原結合片段。

實施例18. 如實施例1之抗原結合片段，其包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、雙功能抗體、單鏈抗體、scFv片段或scFv-Fc。

實施例19. 一種用於治療個體CD47表現癌症之方法，其包括對該個體投與治療有效量之包括掩蔽劑之抗-CD47抗體或其抗原結合片段，其中該掩蔽劑包括一或多個捲曲螺旋肽，該一或多個捲曲螺旋肽相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段減小該抗體或抗原結合片段對人類CD47之結合親和力。

實施例20. 如實施例19之方法，其中可蛋白酶裂解之連接子將該掩蔽劑連接至該抗體或其抗原結合片段。

實施例21. 如實施例20之方法，其中該可蛋白酶裂解之連接子具有包括IPVSLRSG (SEQ ID NO:73)或GPLGVR (SEQ ID NO:57)之胺基酸序列。

實施例22. 如實施例20之方法，其中該可蛋白酶裂解之連接子包括基質金屬蛋白酶(MMP)裂解位點。

實施例23. 如實施例22之方法，其中該MMP裂解位點係選自由MMP2裂解位點、MMP7裂解位點、MMP9裂解位點及MMP13裂解位點

組成之群。

實施例24. 如實施例22之方法，其中該掩蔽劑係於腫瘤微環境中MMP裂解MMP裂解位點之後，自抗-CD47抗體或其抗原結合片段釋放。

實施例25. 如實施例24之方法，其中經裂解之抗-CD47抗體具有MMP裂解位點之短胺基酸殘基。

實施例26. 如實施例25之方法，其中該短胺基酸包括在該抗體之N端的LRSG、SG或VR序列。

實施例27. 如實施例19之方法，其中該一或多個捲曲螺旋肽包括選自由SEQ ID NO:44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55及56組成之群之一或多個序列。

實施例28. 如實施例19之方法，其中相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段與CD47之結合減小至少約100倍。

實施例29. 如實施例19之方法，其中相較於無掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該抗體或抗原結合片段與CD47之結合減小約200倍至約1500倍。

實施例30. 如實施例19之方法，其中該CD47表現癌症為引起實體癌症之血液癌症。

實施例31. 如實施例30之方法，其中該血液癌症係選自由非霍奇金淋巴瘤、B-淋巴母細胞性淋巴瘤；B-細胞慢性淋巴球性白血病/小淋巴球性淋巴瘤、李希特氏症候群、濾泡性淋巴瘤、多發性骨髓瘤、骨髓纖維化、真性紅血球增多症、皮膚T細胞淋巴瘤、未知臨床意義之單株球蛋白增多症(MGUS)、脊髓發育不良症候群(MDS)、免疫母細胞性大細胞淋巴瘤、前驅B淋巴母細胞性淋巴瘤、急性骨髓性白血病(AML)及退行性大細胞淋

巴瘤組成之群。

實施例32. 如實施例19之方法，其中該CD47表現癌症為實體腫瘤。

實施例33. 如實施例32之方法，其中該實體腫瘤係選自由肺癌、胰臟癌、乳癌、肝癌、卵巢癌、睪丸癌、腎癌、膀胱癌、脊椎癌、腦癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、結腸/直腸癌、肛門癌、子宮內膜癌、食管癌、膽囊癌、胃腸癌、皮膚癌、前列腺癌、垂體癌、胃癌、子宮癌、陰道癌及甲狀腺癌組成之群。

實施例34. 如實施例32之方法，其中該實體腫瘤係選自由肺癌、軟組織肉瘤、結腸直腸癌、頭頸癌及乳癌組成之群。

實施例35. 如實施例19之方法，其中該個體為罹患實體癌症之人類。

實施例36. 如實施例19之方法，其中該抗-CD47抗體係與選自如下中的一或多者之免疫檢查點分子之抑制劑組合投與：程式化細胞死亡蛋白1 (PD-1)、程式化死亡配體1 (PD-L1)、PD-L2、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4(CTLA-4)、T細胞免疫球蛋白及黏蛋白域3 (TIM-3)、淋巴細胞活化基因3 (LAG-3)、癌胚抗原相關細胞黏附分子1 (CEACAM-1)、CEACAM-5、T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)、B及T淋巴細胞衰減因子(BTLA)、具有Ig及ITIM域之T細胞免疫受體(TIGIT)、白血球相關免疫球蛋白樣受體1 (LAIR1)、CD160、2B4或TGFR。

實施例37. 一種特異性結合至人類CD47蛋白質之包括掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，其中該掩蔽劑包括一或多個捲曲螺旋肽，該一或多個捲曲螺旋包括 SEQ ID NO:95 (QGASTTVAQLEEKVKTLRAENYELKSEVQRLEEQVAQLGS) 及 / 或 SEQ ID NO:94

(QGASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLG) 之序列，且其中相較於無該掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該一或多個捲曲螺旋肽減小該抗體或抗原結合片段對人類CD47蛋白質之結合親和力。

實施例38. 如實施例37之抗體或抗原結合片段，其包括與SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7及8中之任一者具有至少90%的序列同一性之重鏈可變區(HCVR)及與SEQ ID NO:10、11、12、13、14及15中之任一者具有至少90%的序列同一性之輕鏈可變區(LCVR)。

實施例39. 如實施例37之抗體或抗原結合片段，其中該掩蔽劑係經由可蛋白酶裂解之連接子連接至該抗體或其抗原結合片段。

實施例40. 如實施例39之抗體或抗原結合片段，其中該可蛋白酶裂解之連接子具有包括IPVSLRSG (SEQ ID NO:73)或GPLGVR (SEQ ID NO:57)之胺基酸序列。

實施例41. 如實施例39之抗體或抗原結合片段，其中該可蛋白酶裂解之連接子包括基質金屬蛋白酶(MMP)裂解位點。

實施例42. 如實施例41之抗體或抗原結合片段，其中該MMP裂解位點係選自由MMP2裂解位點、MMP7裂解位點、MMP9裂解位點及MMP13裂解位點組成之群。

實施例43. 如實施例37之抗體，其中該掩蔽劑係在MMP裂解MMP裂解位點之後自抗-CD47抗體移去。

實施例44. 如實施例43之抗體，其中抗-CD47抗體於MMP裂解MMP裂解位點之後具有MMP裂解位點之短胺基酸殘基。

實施例45. 如實施例44之抗體，其中該短胺基酸殘基包括在抗體之N端的LRSG、SG或VR序列。

實施例46. 如實施例37之抗體或抗原結合片段，其中相較於無該掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，結合減小至少約100倍。

實施例47. 如實施例37之抗體或抗原結合片段，其中相較於無該掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該結合減小約200倍至約1500倍。

實施例48. 如實施例37之抗體或抗原結合片段，其包括SEQ ID NO:42之重鏈序列及SEQ ID NO:43之輕鏈序列。

實施例49. 如實施例37至48中任一項之抗體或抗原結合片段，其包括變體Fc區，該變體Fc區賦予選自ADCC及/或CDC活性之增強之效應功能。

實施例50. 如實施例49之抗體或抗原結合片段，其係經去岩藻糖基化。

實施例51. 一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，其中該抗體為IgG1同型物。

實施例52. 如實施例51之抗體，其包括增強之ADCC、增強之ADCP及/或增強之CDC活性。

實施例53. 一種用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括如下步驟：

a) 識別個體為具有癌症相對於周圍非癌組織升高的MMP水平；及

b) 對該個體投與治療有效量之包括掩蔽劑之抗-CD47抗體或其抗原結合片段，其中該掩蔽劑包括捲曲螺旋肽，若該個體具有癌症相對於周圍非癌組織升高的MMP水平，相較於無該掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該等捲曲螺旋肽減小該抗體或抗原結合片段對人類CD47之結合親和力。

實施例54. 如實施例53之方法，其中該MMP係選自由如下組成之

群：MMP2、MMP7、MMP9及MMP13。

實施例55. 如實施例53之方法，其中步驟a)包括：

- i)從該個體分離癌組織及非癌組織；
- ii)檢測所分離癌組織及非癌組織中的MMP；及
- iii)比較癌組織相對於非癌組織中的染色量。

實施例56. 一種用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括如下步驟：

- a)識別該個體為具有癌症相對於周圍非癌組織升高的CD47水平；及
- b)對該個體投與治療有效量之包括掩蔽劑之抗-CD47抗體或其抗原結合片段，其中該掩蔽劑包括捲曲螺旋肽，若個體具有癌症相對於周圍非癌組織升高的CD47水平，相較於無該掩蔽劑之抗體或其抗原結合片段，該等捲曲螺旋肽減小該抗體或抗原結合片段對人類CD47之結合親和力。

實施例57. 如實施例56之方法，其中步驟a)包括：

- i)從該個體分離癌組織及周圍非癌組織；
- ii)檢測所分離癌組織及周圍非癌組織中的CD47；及
- iii)比較癌組織中的CD47染色量相對於非癌組織中的CD47染色量。

實施例58. 一種用於治療個體的CD47表現癌症之方法，其包括如下步驟：

- a)識別該個體為具有癌組織相對於非癌組織升高的巨噬細胞浸潤水平；及
- b)對該個體投與治療有效量之包括掩蔽劑之抗-CD47抗體或其抗原結合片段，其中該掩蔽劑包括一或多個捲曲螺旋肽，若個體具有癌症相對於非癌組織升高的巨噬細胞浸潤水平，相較於無該掩蔽劑之抗體或其抗原結

合片段，該一或多個捲曲螺旋肽減小該抗體或抗原結合片段對人類CD47之結合親和力。

實施例59. 如實施例58之方法，其中步驟a)包括：

- i)從該個體分離癌組織及周圍非癌組織；
- ii)檢測所分離癌組織及非癌組織中的巨噬細胞；及
- iii)比較癌組織相對於非癌組織中的染色量。

實施例60. 如實施例58之方法，其中該巨噬細胞染色係利用抗-CD163抗體進行。

實施例61. 一種特異性結合人類CD47之人類化抗體或其抗原結合片段，其包括與SEQ ID NO:2、3、4、5、6、7及8中之任一者具有至少90%的序列同一性之重鏈可變區(HCVR)及與SEQ ID NO:10、11、12、13、14及15中之任一者具有至少90%的序列同一性之輕鏈可變區(LCVR)，其中該抗體進一步包括在HCVR及/或LCVR之N端的序列LRSG、SG或VR。

實施例62. 一種藉由投與如實施例37之經掩蔽之CD47抗體與激動CD40抗體之組合來治療癌症之方法。

實施例63. 如實施例62之方法，其中該激動CD40抗體具有低的岩藻糖基化水平，例如，SEA-CD40抗體。

實施例64. 一種藉由投與如實施例37之經掩蔽之CD47抗體與抗體藥物共軛物(ADC)之組合來治療癌症之方法，其中該ADC之抗體特異性結合至表現於癌細胞之細胞外表面上之蛋白質且該抗體係與包含細胞毒性劑之藥物-連接子共軛。

實施例65. 如實施例64之方法，其中該細胞毒性劑為奧瑞司他汀。

實施例 66. 如實施例 64 之方法，其中該 ADC 之抗體係與選自由 vcMMAE 及 mcMMAF 組成之群的藥物連接子共軛。

【序列表】

<110> 美商思進公司(SEAGEN INC.)

<120> CD47抗體及其用於治療癌症之用途

<130> 01218-0002-00PCT

<140> TW107142777

<141> 2018-11-29

<150> US 62/593,712

<151> 2017-12-01

<160> 95

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<223> 鼠類

<400> 1

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Ile Asp Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys

85

90

95

Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化重鏈可變區

<400> 2

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化重鏈可變區

<400> 3

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化重鏈可變區

<400> 4

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化重鏈可變區

<400> 5

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化重鏈可變區

<400> 6

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

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

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

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化重鏈可變區

<400> 7

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化重鏈可變區

<400> 8

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

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

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

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<223> 鼠類

<400> 9

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

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

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

Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg
85 90 95

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

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化輕鏈可變區

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
 20 25 30

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

Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化輕鏈可變區

<400> 11

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化輕鏈可變區

<400> 12

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg

85

90

95

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

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化輕鏈可變區

<400> 13

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化輕鏈可變區

<400> 14

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

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Lys Phe Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人類化輕鏈可變區

<400> 15

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Ala His Gly Phe Pro Arg
 85 90 95

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

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 重鏈CDR序列

<400> 16

Gly Tyr Gly Met Ser
 1 5

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

<220>
 <223> 重鏈CDR序列

<400> 17

Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR序列

<400> 18

Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR序列

<400> 19

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR序列

<400> 20

Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 21

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR序列

<400> 21

Ser Tyr Gly Met Asn
1 5

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR序列

<400> 22

Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR序列

<400> 23

Ser Tyr Gly Met His
1 5

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

<220>

<223> 重鏈CDR序列

<400> 24

Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈CDR序列

<400> 25

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly
1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈CDR序列

<400> 26

Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr
1 5

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 重鏈CDR序列

<400> 27

Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR序列

<400> 28

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR序列

<400> 29

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重鏈CDR序列

<400> 30

Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Ile
1 5

<210> 31
<211> 11
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR序列

<400> 31

Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr Leu His
1 5 10

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR序列

<400> 32

Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR序列

<400> 33

Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg Thr
1 5

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR序列

<400> 34

Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asn Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR序列

<400> 35

Phe Ala Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR序列

<400> 36

Gln Asn Ala His Gly Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR序列

<400> 37

Gln Thr Ile Ser Asp Tyr

1 5

<210> 38

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR序列

<400> 38

Phe Ala Ser

1

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR序列

<400> 39

Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR序列

<400> 40

Gln Thr Ile Ser Asn Tyr

1 5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 輕鏈CDR序列

<400> 41

Gln Asn Ala His Gly Phe Pro Arg Thr

1 5

<210> 42
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 經掩蔽之重鏈

<400> 42

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

Leu Glu Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln Leu Arg
 20 25 30

Lys Lys Val Glu Lys Leu Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly
 35 40 45

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 50 55 60

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 65 70 75 80

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 85 90 95

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 100 105 110

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 115 120 125

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
 130 135 140

Ala Arg Ser Leu Ala Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 145 150 155 160

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 165 170 175

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 180 185 190

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 195 200 205

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 210 215 220

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 225 230 235 240

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 245 250 255

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 260 265 270

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 325 330 335

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

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

355

360

365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 385 390 395 400

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 405 410 415

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 450 455 460

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 485

<210> 43

<211> 262

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 經掩蔽之輕鏈

<400> 43

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

Leu Arg Ala Glu Asn Tyr Glu Leu Lys Ser Glu Val Gln Arg Leu Glu

20

25

30

Glu Gln Val Ala Gln Leu Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly
 35 40 45

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 50 55 60

Glu Lys Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Asp Tyr
 65 70 75 80

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 85 90 95

Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 100 105 110

Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 115 120 125

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Gly Phe Pro Arg
 130 135 140

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 145 150 155 160

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 165 170 175

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 180 185 190

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 195 200 205

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 210 215 220

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 225 230 235 240

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 245 250 255

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 260

<210> 44
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 掩蔽域序列

<400> 44

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

Gln Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln Leu Arg Lys
 20 25 30

Lys Val Glu Lys Leu Ser Glu Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Val
 35 40 45

Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50

<210> 45
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 掩蔽域序列

<400> 45

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

1 5 10 15

Arg Ala Gln Asn Tyr Glu Leu Glu Ser Glu Val Gln Arg Leu Arg Glu
 20 25 30

Gln Val Ala Gln Leu Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Val
 35 40 45

Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50

<210> 46
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 掩蔽域序列

<400> 46

Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Glu Asn Thr Ala Leu Glu
 1 5 10 15

Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg Ala Arg Asn Arg
 20 25 30

Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly
 35 40 45

Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 47
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 掩蔽域序列

<400> 47

Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Gln Arg Asn Thr Ala Leu Arg
 1 5 10 15

Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg Leu Glu Asn Glu
 20 25 30

Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly
 35 40 45

Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 48

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 48

Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Arg Arg Asn Thr Ala Leu Arg
 1 5 10 15

Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg Leu Arg Asn Ile
 20 25 30

Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu
 35 40 45

Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 49

<211> 56

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 49

Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Gln Glu Asn Thr Ala Leu Glu
 1 5 10 15

Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg Leu Glu Asn Ile
 20 25 30

Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu
 35 40 45

Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 50

<211> 47

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 50

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

Glu Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln Leu Arg Lys
 20 25 30

Lys Val Glu Lys Leu Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly
 35 40 45

<210> 51

<211> 47

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 51

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

Arg Ala Glu Asn Tyr Glu Leu Lys Ser Glu Val Gln Arg Leu Glu Glu
 20 25 30

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

<210> 52

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 52

Gly Ala Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp
 1 5 10 15

Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys
 20 25 30

Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala His Gly Gly Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 53

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 53

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

1 5 10 15

Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val
 20 25 30

Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 54

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 54

Gly Lys Ile Ala Ala Leu Lys Gln Lys Ile Ala Ala Leu Lys Tyr Lys
 1 5 10 15

Asn Ala Ala Leu Lys Lys Lys Ile Ala Ala Leu Lys Gln Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40

<210> 55

<211> 44

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 55

Gly Glu Ile Ala Ala Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Leu Glu Lys Glu
 1 5 10 15

Asn Ala Ala Leu Glu Trp Glu Ile Ala Ala Leu Glu Gln Gly Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 56

<400> 56
000

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 蛋白酶裂解序列

<400> 57

Gly Pro Leu Gly Val Arg
1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 蛋白酶裂解序列

<400> 58

Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly
1 5

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性连接子

<400> 59

Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 60

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性連接子

<400> 60

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性連接子

<400> 61

Ser Gly Ser
1 5 10

<210> 62

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性連接子

<400> 62

Gly Gly Ala Ala
1

<210> 63

<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性連接子

<400> 63

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性連接子

<400> 64

Leu Ala Ala Ala Ala
1 5

<210> 65
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性連接子

<400> 65

Gly Gly Ser Gly
1

<210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 示例性連接子

<400> 66

Gly Gly Ser Gly Gly
1 5

<210> 67

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性連接子

<400> 67

Gly Ser Gly Ser Gly
1 5

<210> 68

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性連接子

<400> 68

Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性連接子

<400> 69

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性連接子

<400> 70

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性蛋白酶位點

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(6)

<223> Xaa可為任何天然生成之胺基酸

<400> 71

Pro Leu Gly Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性蛋白酶位點

<400> 72

Pro Leu Gly Val Arg

1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性蛋白酶位點

<400> 73

Ile Pro Val Ser Leu Arg Ser Gly
1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性蛋白酶位點

<400> 74

Leu Ser Gly Arg Ser Asp Asn Tyr
1 5

<210> 75

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 75

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

Asp Gln Leu Gln Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln
20 25 30

Leu Arg Lys Lys Val Glu Lys Leu Ser Glu Gly Gly Gly Gly Pro
35 40 45

Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
50 55

<210> 76

<211> 57

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 76

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

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

Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Ala Ser Gly Gly Gly Gly Gly Pro
 35 40 45

Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 77

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 77

Glu Ala Cys Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Arg Glu Asn Thr
 1 5 10 15

Ala Leu Glu Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg Ala
 20 25 30

Arg Asn Arg Val Ser Gln Tyr Arg Thr Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 78
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 掩蔽域序列

<400> 78

Glu Ala Cys Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Gln Arg Asn Thr
 1 5 10 15

Ala Leu Arg Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg Leu
 20 25 30

Glu Asn Glu Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 79
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 掩蔽域序列

<400> 79

Glu Ala Cys Leu Glu Ile Arg Ala Ala Phe Leu Arg Arg Arg Asn Thr
 1 5 10 15

Ala Leu Arg Thr Arg Val Ala Glu Leu Arg Gln Arg Val Gln Arg Leu
 20 25 30

Arg Asn Ile Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 80
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 掩蔽域序列

<400> 80

Glu Ala Cys Leu Glu Ile Glu Ala Ala Phe Leu Glu Gln Glu Asn Thr
 1 5 10 15

Ala Leu Glu Thr Glu Val Ala Glu Leu Glu Gln Glu Val Gln Arg Leu
 20 25 30

Glu Asn Ile Val Ser Gln Tyr Glu Thr Arg Tyr Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55

<210> 81
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 掩蔽域序列

<400> 81

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

Asp Gln Leu Glu Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln
 20 25 30

Leu Arg Lys Lys Val Glu Lys Leu Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg
 35 40 45

Ser Gly
50

<210> 82
<211> 50
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 掩蔽域序列

<400> 82

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

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

Leu Glu Glu Gln Val Ala Gln Leu Gly Ser Ile Pro Val Ser Leu Arg
35 40 45

Ser Gly
50

<210> 83
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 掩蔽域序列

<400> 83

Glu Ala Cys Gly Ala Leu Thr Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln
1 5 10 15

Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu
20 25 30

Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala His Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55 60

<210> 84

<211> 60

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 84

Glu Ala Cys Gly Ala Arg Ile Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr
 1 5 10 15

Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg
 20 25 30

Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 50 55 60

<210> 85

<211> 47

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 掩蔽域序列

<400> 85

Glu Ala Cys Gly Lys Ile Ala Ala Leu Lys Gln Lys Ile Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Lys Tyr Lys Asn Ala Ala Leu Lys Lys Lys Ile Ala Ala Leu Lys Gln
 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

<210> 86
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 掩蔽域序列

<400> 86

Glu Ala Cys Gly Glu Ile Ala Ala Leu Glu Gln Glu Ile Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Glu Lys Glu Asn Ala Ala Leu Glu Trp Glu Ile Ala Ala Leu Glu Gln
 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Val Arg Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

<210> 87

<400> 87
 000

<210> 88
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 88

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 89
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 89

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

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

Ser

<210> 90
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 90

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn
 20 25 30

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

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

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

<210> 91
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 現代人

<400> 91

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

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

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

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

Ser

<210> 92
<211> 107
<212> PRT
<213> 現代人

<400> 92

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

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

<210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> 現代人

<400> 93

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

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

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 94
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 掩蔽域序列

<400> 94

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

Leu Glu Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Lys Thr Lys Val Ala Gln Leu Arg
 20 25 30

Lys Lys Val Glu Lys Leu Gly Ser
 35 40

<210> 95
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 掩蔽域序列

<400> 95

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

Leu Arg Ala Glu Asn Tyr Glu Leu Lys Ser Glu Val Gln Arg Leu Glu
 20 25 30

Glu Gln Val Ala Gln Leu Gly Ser
 35 40

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種特異性結合人類CD47之人類化抗-CD47抗體或其抗原結合片段，其包含輕鏈可變區及重鏈可變區，其中該重鏈可變區包括SEQ ID NO:3之胺基酸序列且該輕鏈可變區包括SEQ ID NO:13之胺基酸序列。

【第2項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段係IgG1同型物。

【第3項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段相較於其親本抗體具有(i)增強的抗體依賴型細胞毒性(ADCC)及/或(ii)增強的抗體依賴型細胞吞噬作用(ADCP)及/或(iii)增強的補體依賴型細胞毒性(CDC)。

【第4項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段為Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、雙功能抗體、單鏈抗體、scFv片段或scFv-Fc。

【第5項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段在體外及/或體內誘導表現CD47之細胞凋亡。

【第6項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其相較於其親本抗體具有減少之核心岩藻糖基化，或其係經去岩藻糖基化。

【第7項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段阻斷CD47與SIRP α 間相互作用。

【第8項】

如請求項1之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段相較於Ab47具有減少的紅血球細胞之血球凝集。

【第9項】

一種核酸序列，其編碼如請求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段。

【第10項】

一種表現載體，其包括如請求項9之核酸。

【第11項】

一種宿主細胞，其包括如請求項9之核酸。

【第12項】

一種宿主細胞，其表現如請求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段。

【第13項】

一種生產抗體或其抗原結合片段的方法，其包括培養如請求項11或12之宿主細胞。

【第14項】

如請求項13之方法，其進一步包括分離該抗體或其抗原結合片段。

【第15項】

一種體外誘導表現CD47之細胞凋亡之方法，其包括使該細胞與如請

求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段接觸。

【第16項】

一種如請求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製備誘導表現CD47之細胞凋亡之藥物。

【第17項】

一種經掩蔽之抗體，其包括如請求項1至8中任一項之抗體或其抗原結合片段及至少一個掩蔽域。

【第18項】

如請求項17之經掩蔽之抗體，其中該至少一個掩蔽域包括選自SEQ ID NO:44-55、75-86、94及95之胺基酸序列。

【第19項】

如請求項18之經掩蔽之抗體，其中相較於無該至少一個掩蔽域的抗體或其抗原結合片段，該至少一個掩蔽域減小該抗體或其抗原結合片段對人類CD47蛋白之結合親和力。

【第20項】

如請求項19之經掩蔽之抗體，其中相較於無該至少一個掩蔽域的抗體或其抗原結合片段，該結合親和力減小至少約100倍或約200倍與約1500倍之間。

【第21項】

如請求項17至20中任一項之經掩蔽之抗體，其中該抗體或其抗原結合片段包括重鏈及輕鏈，其中該重鏈係連接至第一掩蔽域；或其中該輕鏈係連接至第二掩蔽域；或其中該重鏈係連接至第一掩蔽域及該輕鏈係連接至第二掩蔽域。

【第22項】

如請求項21之經掩蔽之抗體，其中該第一掩蔽域包括選自SEQ ID NO:44、46、48、50、52、54、75、77、79、81、83、85及94之胺基酸序列；及該第二掩蔽域包括選自SEQ ID NO:45、47、49、51、53、55、76、78、80、82、84、86及95之胺基酸序列。

【第23項】

如請求項22之經掩蔽之抗體，其中該第一掩蔽域及該第二掩蔽域為選自如下之掩蔽域對：SEQ ID NO:44及45；SEQ ID NO:46及47；SEQ ID NO:48及49；SEQ ID NO:50及51；SEQ ID NO:52及53；SEQ ID NO:54及55；SEQ ID NO:75及76；SEQ ID NO:77及78；SEQ ID NO:79及80；SEQ ID NO:81及82；SEQ ID NO:83及84；SEQ ID NO:85及86；及SEQ ID NO:94及95。

【第24項】

如請求項21之經掩蔽之抗體，其中該第一掩蔽域係連接至該重鏈的N端及該第二掩蔽域係連接至該輕鏈的N端。

【第25項】

如請求項17至20中任一項之經掩蔽之抗體，其中各掩蔽域包括可蛋白酶裂解之連接子且係經由該可蛋白酶裂解之連接子連接至該重鏈或輕鏈。

【第26項】

如請求項25之經掩蔽之抗體，其中該可蛋白酶裂解之連接子包括基質金屬蛋白酶(MMP)裂解位點。

【第27項】

如請求項26之經掩蔽之抗體，其中該MMP裂解位點係選自MMP2裂解位點、MMP7裂解位點、MMP9裂解位點及MMP13裂解位點。

【第28項】

如請求項26之經掩蔽之抗體，其中於被MMP裂解後，該抗體或其抗原結合片段之重鏈及/或輕鏈包括MMP裂解位點之短胺基酸殘基(stub amino acid remnant)。

【第29項】

如請求項28之經掩蔽之抗體，其中該短胺基酸殘基包括在該抗體之N端的序列LRSG、SG或VR。

【第30項】

如請求項17至20中任一項之經掩蔽之抗體，其包括連接至第一掩蔽域且具有SEQ ID NO:42之胺基酸序列之重鏈及連接至第二掩蔽域且具有SEQ ID NO:43之胺基酸序列之輕鏈。

【第31項】

一種核酸序列，其編碼如請求項17至30中任一項之經掩蔽之抗體。

【第32項】

一種表現載體，其包括如請求項31之核酸。

【第33項】

一種宿主細胞，其包括如請求項31之核酸。

【第34項】

一種宿主細胞，其表現如請求項17至30中任一項之經掩蔽之抗體。

【第35項】

一種生產經掩蔽之抗體之方法，其包括培養如請求項33或34之宿主

細胞。

【第36項】

如請求項35之方法，其進一步包括分離該經掩蔽之抗體。

【第37項】

一種如請求項1至8中任一項之特異性結合人類CD47之人類化抗-CD47抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製備用於治療個體的表現CD47之癌症之藥物。

【第38項】

一種如請求項17至30中任一項之經掩蔽之抗體之用途，其係用於製備用於治療個體的表現CD47之癌症之藥物，其中該治療包括如下的步驟：

a) 識別個體為具有癌症相對於周圍非癌組織升高的MMP水平；及

b) 對該個體投與治療有效量之該藥物，其中該經掩蔽之抗體之各掩蔽域包括可蛋白酶裂解之連接子且其中該可蛋白酶裂解之連接子包括基質金屬蛋白酶(MMP)裂解位點。

【第39項】

如請求項38之用途，其中該MMP係選自MMP2、MMP7、MMP9及MMP13。

【第40項】

如請求項38之用途，其中該MMP裂解位點係選自MMP2裂解位點、MMP7裂解位點、MMP9裂解位點及MMP13裂解位點。

【第41項】

如請求項38之用途，其中步驟a)包括：

- i)從該個體分離癌組織及非癌組織；
- ii)檢測所分離癌組織及非癌組織中的MMP；及
- iii)比較癌組織相對於非癌組織中的染色量。

【第42項】

一種如請求項1至8中任一項之特異性結合人類CD47之人類化抗-CD47抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製備用於治療個體的表現CD47之癌症之藥物，其中該治療包括：

- a)識別個體為罹患表現CD47之癌症；及
- b)對該個體投與治療有效量之該藥物。

【第43項】

如請求項42之用途，其中步驟a)包括：

- i)分離癌組織；及
- ii)檢測所分離癌組織中的CD47。

【第44項】

一種如請求項1至8中任一項之特異性結合人類CD47之人類化抗-CD47抗體或其抗原結合片段之用途，其係用於製備用於治療個體的表現CD47之癌症之藥物，其中該治療包括：

- a)識別個體為具有癌組織相對於非癌組織升高的巨噬細胞浸潤水平；
- 及
- b)對該個體投與治療有效量之該藥物。

【第45項】

如請求項44之用途，其中步驟a)包括：

- i)從該個體分離癌組織及周圍非癌組織；

- ii) 檢測所分離癌組織及非癌組織中的巨噬細胞；及
- iii) 比較癌組織相對於非癌組織中的染色量。

【第46項】

如請求項45之用途，其中該巨噬細胞染色係利用抗-CD163抗體進行。

【第47項】

如請求項38至46中任一項之用途，其中該表現CD47之癌症為血液癌症或實體癌症。

【第48項】

如請求項38至46中任一項之用途，其中該表現CD47之癌症係選自非霍奇金淋巴瘤、B-淋巴母細胞性淋巴瘤；B-細胞慢性淋巴球性白血病/小淋巴球性淋巴瘤、李希特氏症候群、濾泡性淋巴瘤、多發性骨髓瘤、骨髓纖維化、真性紅血球增多症、皮膚T細胞淋巴瘤、未知臨床意義之單株球蛋白增多症(MGUS)、骨髓發育不良症候群(MDS)、免疫母細胞性大細胞淋巴瘤、前驅B淋巴母細胞性淋巴瘤、急性骨髓性白血病(AML)及退行性大細胞淋巴瘤。

【第49項】

如請求項38至46中任一項之用途，其中該表現CD47之癌症係選自肺癌、胰臟癌、乳癌、肝癌、卵巢癌、睪丸癌、腎癌、膀胱癌、脊椎癌、腦癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、結腸直腸癌、肛門癌、子宮內膜癌、食管癌、膽囊癌、胃腸癌、胃癌(gastric cancer)、肉瘤、頭頸癌、黑色素瘤、皮膚癌、前列腺癌、垂體癌、胃癌(stomach cancer)、子宮癌、陰道癌及甲狀腺癌。

【第50項】

如請求項49之用途，其中該表現CD47之癌症係選自肺癌、肉瘤、結腸直腸癌、頭頸癌、卵巢癌、胰臟癌、胃癌、黑色素瘤及乳癌。

【第51項】

如請求項38至46中任一項之用途，其中該抗-CD47抗體或其抗原結合片段係與選自如下中的一或多者之免疫檢查點分子之抑制劑組合投與：程式化細胞死亡蛋白1 (PD-1)、程式化死亡配體1 (PD-L1)、PD-L2、細胞毒性T淋巴細胞相關蛋白4 (CTLA-4)、T細胞免疫球蛋白及黏蛋白域3 (TIM-3)、淋巴細胞活化基因3 (LAG-3)、癌胚抗原相關細胞黏附分子1 (CEACAM-1)、CEACAM-5、T細胞活化之V域Ig抑制因子(VISTA)、B及T淋巴細胞衰減因子(BTLA)、具有Ig及ITIM域之T細胞免疫受體(TIGIT)、白血球相關免疫球蛋白樣受體1 (LAIR1)、CD160、2B4或TGFR。

【第52項】

如請求項38至46中任一項之用途，其中該抗-CD47抗體或其抗原結合片段係與激動抗-CD40抗體組合投與。

【第53項】

如請求項52之用途，其中該激動抗-CD40抗體具有低的岩藻糖基化水平或係經去岩藻糖基化。

【第54項】

如請求項38至46中任一項之用途，其中該抗-CD47抗體或其抗原結合片段係與抗體藥物共軛物(ADC)組合投與，其中該ADC之抗體特異性結合至表現於癌細胞之細胞外表面上之蛋白質且該抗體係與包含細胞毒性劑

之藥物-連接子共軛。

【第55項】

如請求項54之用途，其中該細胞毒性劑為奧瑞司他汀。

【第56項】

如請求項55之用途，其中該ADC之抗體係與選自由vcMMAE及mcMMAF組成之群的藥物-連接子共軛。

【第57項】

如請求項38至41中任一項之用途，其中該經掩蔽之抗體包括包含可蛋白酶裂解之連接子之至少一個掩蔽域，且其中該可蛋白酶裂解之連接子係在腫瘤微環境中裂解。

【第58項】

如請求項57之用途，其中該可蛋白酶裂解之連接子於腫瘤微環境中裂解後，該掩蔽域自該抗-CD47抗體或其抗原結合片段釋放。

【第59項】

如請求項57之用途，其中該可蛋白酶裂解之連接子包括胺基酸序列IPVSLRSG (SEQ ID NO:73)或GPLGVR (SEQ ID NO:57)。

【第60項】

如請求項57之用途，其中該可蛋白酶裂解之連接子包括MMP裂解位點。

【第61項】

如請求項60之用途，其中該MMP裂解位點係選自由MMP2裂解位點、MMP7裂解位點、MMP9裂解位點及MMP13裂解位點組成之群。

【第62項】

如請求項57之用途，其中於腫瘤微環境中裂解後，所釋放的抗-CD47抗體或其抗原結合片段以比該經掩蔽之抗體對CD47的親和力強至少約100倍或200倍至1500倍的親和力結合至CD47。

【第63項】

如請求項57之用途，其中相較於其親本抗-CD47抗體，該抗-CD47抗體或其抗原結合片段或該經掩蔽之抗體之抗-CD47抗體或其抗原結合片段展示減少的體外血球凝集。

【第64項】

如請求項63之用途，其中該親本抗體為Ab47。

【第65項】

如請求項38至46中任一項之用途，其中該抗-CD47抗體或其抗原結合片段或經掩蔽之抗體之投與並不誘導個體的血球凝集。

【第66項】

如請求項38至46中任一項之用途，其中該抗-CD47抗體或其抗原結合片段或經掩蔽之抗體在體外及/或體內誘導表現CD47之細胞凋亡。

【第67項】

如請求項66之用途，其中該等表現CD47之細胞為癌細胞。

【發明圖式】

```

      10      20      30      40      50      60
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Mu B6H12 vH EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVAITISGGTYIYPPDSVKGRFTI
Hu IGHV3-23/HJ4 EVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWWSAISGSGSTIYADSVKGRFTI
hvH1 EVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTFSGYGMSWVRQAPGKRLWVAITISGGTYIYPPDSVKGRFTI
hvH2 EVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVAITISGGTYIYADSVKGRFTI
hvH3 EVQLLESVGGGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVAITISGGTYIYADSVKGRFTI
      *****
      Kabat CDRs
      IMGT CDRs
      ++++++++
      ++++++++

```

```

      70      80      90      100      110
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Mu B6H12 vH SRDIAKNTLYLQIDSLKSEDTAIFCARSLAGNAMYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 1)
Hu IGHV3-23/HJ4 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYICAK----YFDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 88)
hvH1 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYICAK----YFDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 3)
hvH2 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYICAK----YFDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 4)
hvH3 SRDIAKNTLYLQINLSRAEDTAVYICAKSLAGNAMYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 5)
      *****
      Kabat CDRs
      IMGT CDRs
      ++++++++

```

【圖1A】

```

      10      20      30      40      50      60
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Mu B6H12 vH EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVAITISGGTYIYPPDSVKGRFTI
Hu IGHV3-48/HJ4 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTFSSYEMNVRQAPGKLEWWSAISGSGSTIYADSVKGRFTI
hvH4 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTFSSYGMNVRQAPGKLEWVAITISGGTYIYADSVKGRFTI
      *****
      Kabat CDRs
      IMGT CDRs
      ++++++++

```

```

      70      80      90      100      110
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Mu B6H12 vH SRDIAKNTLYLQIDSLKSEDTAIFCARSLAGNAMYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 1)
Hu IGHV3-48/HJ4 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYICAK----YFDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 89)
hvH4 SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYICAKSLAGNAMYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 6)
      *****
      Kabat CDRs
      IMGT CDRs
      ++++++++

```

【圖1B】

```

      10      20      30      40      50      60
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Mu B6H12 vH  EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVAITISGGTYIYPDSVKGRFTI
Hu IGHV3-66/HJ4  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTVSNYMSWVRQAPGKLEWVSIYSGGS-TYADSVKGRFTI
hvH5          EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTFSGYGMSWVRQAPGKLEWVAITISGGTYIYADSVKGRFTI
Kabat CDRs   *****
IMGT CDRs   ++++++++

```

```

      70      80      90     100     110
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Mu B6H12 vH  SRDIAKNTLYLQIDSLKSEDTAIFCARSLAGNAMYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 1)
Hu IGHV3-66/HJ4  SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYICAR----YFDYWGQGLTIVTVSS (SEQ ID NO: 90)
hvH5          SRDIAKNTLYLQINSLRAEDTAVYICARSLAGNAMYWGQGLTIVTVSS (SEQ ID NO: 7)
Kabat CDRs   *****
IMGT CDRs   ++++++++

```

【圖1C】

```

      10      20      30      40      50      60
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Mu B6H12 vH  EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRLEWVAITISGGTYIYPDSVKGRFTI
Hu IGHV3-74/HJ4  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTFSYIMHWVRQAPGKLVWVSRINSDGSSISYADSVKGRFTI
hvH6          EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLAAAGFTFSYIGMHWVRQAPGKLVWVAITISGGTYIYADSVKGRFTI
Kabat CDRs   *****
IMGT CDRs   ++++++++

```

```

      70      80      90     100     110
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Mu B6H12 vH  SRDIAKNTLYLQIDSLKSEDTAIFCARSLAGNAMYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 1)
Hu IGHV3-74/HJ4  SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYICAR----YFDYWGQGLTIVTVSS (SEQ ID NO: 91)
hvH6          SRDIAKNTLYLQMNLSRAEDTAVYICARSLAGNAMYWGQGLTIVTVSS (SEQ ID NO: 8)
Kabat CDRs   *****
IMGT CDRs   ++++++++

```

【圖1D】

```

10 20 30 40 50 60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMSSWVRQAPGKRLLEWVAITISGGTYIYYPDSVKGRFTI
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVAITISGGTYIYYPDSVKGRFTI
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKLEWVAITISGGTYIYYPDSVKGRFTI
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMNWRQAPGKLEWVAITISGGTYIYYPDSVKGRFTI
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMSSWVRQAPGKLEWVAITISGGTYIYYPDSVKGRFTI
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWRQAPGKLVVVAITISGGTYIYYPDSVKGRFTI
Kabat CDRs
*****
IMGT CDRs
+++++++

```

```

70 80 90 100 110
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
SRDMSKNTLYIQMNSLRAEDTAVYFCARSLAGNAMYWGQGLIVTVSS (SEQ ID NO: 3)
SRDMSKNTLYIQMNSLRAEDTAVYFCARSLAGNAMYWGQGLIVTVSS (SEQ ID NO: 4)
SRDMSKNTLYIQINSLRAEDTAVYFCARSLAGNAMYWGQGLIVTVSS (SEQ ID NO: 5)
SRDMSKNTLYIQMNSLRAEDTAVYFCARSLAGNAMYWGQGLIVTVSS (SEQ ID NO: 6)
SRDMSKNTLYIQINSLRAEDTAVYFCARSLAGNAMYWGQGLIVTVSS (SEQ ID NO: 7)
SRDMSKNTLYIQMNSLRAEDTAVYFCARSLAGNAMYWGQGLIVTVSS (SEQ ID NO: 8)
Kabat CDRs
*****
IMGT CDRs
+++++++

```

【圖1E】

```

10 20 30 40 50 60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
hB6H12.3 vH (hvH1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMSSWVRQAPGKRLLEWVAITISGGTYIYYPDSVKGRFTI
Mu B6H12 vH EVQLVESGGDLVQPKGGSLKLSCAASGFTFSYGMSSWVRQAPDKRLEWVAITISGGTYIYYPDSVKGRFTI
Ab47 vH EVQLVESGGGLVQPKGGSLRLSCAASGFTFSYGMSSWVRQAPGKLEWVAITISGGTYIYYPDSVKGRFTI
Kabat CDRs
*****
IMGT CDRs
+++++++

```

```

70 80 90 100 110
|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
hB6H12.3 vH (hvH1) SRDMSKNTLYIQMNSLRAEDTAVYFCARSLAGNAMYWGQGLIVTVSS (SEQ ID NO: 3)
Mu B6H12 vH SRDMSKNTLYIQIDSLSKEDTAVYFCARSLAGNAMYWGQGLIVTVSS (SEQ ID NO: 1)
Ab47 vH SRDMSKNTLYIQMNSLRAEDTAVYFCARSLAGNAMYWGQGLIVTVSS (SEQ ID NO: 2)
Kabat CDRs
*****
IMGT CDRs
+++++++

```

【圖1F】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mu B6H12 vK  DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQTI...LHWYQQKSHESPRLLIKFASQSI...GIPSRFSGSGGSD
Hu IGKV6-21/KJ2  EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQIS...LHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSI...GVPSPRFSGSGGSD
hvK1           EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQTI...LHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSI...GVPSPRFSGSGGSD
hvK2           EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQTI...LHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSI...GVPSPRFSGSGGSD
hvK3           EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQTI...LHWYQQKPDQSPKLLIKFASQSI...GVPSPRFSGSGGSD
Kabat CDRs     *****
IMGT CDRs     ++++++
                +++

```

```

      80      90      100
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mu B6H12 vK  FTLINSVEPEVDGVYQCQNGHGHPRTFGG...
Hu IGKV6-21/KJ2  FTLLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP-TFG... (SEQ ID NO: 9)
hvK1           FTLLTINSLEAEDAATYYCQNGHGHPRTFG... (SEQ ID NO: 92)
hvK2           FTLLTINSLEAEDAATYYCQNGHGHPRTFG... (SEQ ID NO: 11)
hvK3           FTLLTINSLEAEDAATYYCQNGHGHPRTFG... (SEQ ID NO: 12)
Kabat CDRs     *****
IMGT CDRs     ++++++
                +++

```

【圖1G】

```

      10      20      30      40      50      60      70
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mu B6H12 vK  DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQTI...LHWYQQKSHESPRLLIKFASQSI...GIPSRFSGSGGSD
Hu IGKV1-27/KJ2  DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGI...SNYLAWYQKPKGKVPKLLIYAAS...TLQSGVPSRFSGSGGSD
hvK4           DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQTI...SNYLAWYQKPKGKVPKLLIKFAS...TLQSGVPSRFSGSGGSD
Kabat CDRs     *****
IMGT CDRs     ++++++
                +++

```

```

      80      90      100
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Mu B6H12 vK  FTLINSVEPEVDGVYQCQNGHGHPRTFGG...
Hu IGKV1-27/KJ2  FTLLTSSLPEDVATYYCQKYNAP-TFGQ... (SEQ ID NO: 9)
hvK4           FTLLTSSLPEDVATYYCQNGHGHPRTFGQ... (SEQ ID NO: 93)
Kabat CDRs     *****
IMGT CDRs     ++++++
                +++

```

【圖1H】

```

10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLLTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSFKLLIKFASQISGVPSRFSGSGSGTD
hvK1
EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLLTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSFKLLIKFASQISGVPSRFSGSGSGTD
hvK2
EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLLTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSFKLLIKFASQISGVPSRFSGSGSGTD
hvK3
EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLLTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSFKLLIKFASQISGVPSRFSGSGSGTD
hvK4
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVLLTCRASQTISNYLAWYQQKPKVPLLIKFASTLQSGVPSRFSGSGSGSD
Kabat CDRs
*****
IMGT CDRs
+++++++
+++

```

```

80      90      100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
FTLTINSLEAEDAAYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 11)
hvK1
FTLTINSLEAEDAAYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 12)
hvK2
FTLTINSLEAEDAAYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 13)
hvK3
FTLTINSLEAEDAAYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 14)
hvK4
Kabat CDRs
*****
IMGT CDRs
+++++++
+++

```

【圖11】

```

10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EIVMTQSPDFQSVTPKEKVTLLTCRASQTISDYLHWYQQKPDQSFKLLIKFASQISGVPSRFSGSGSD
hB6H12.3 vK (hvK3)
DIVMTQSPATLSVTFGDRVLSLRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLIKFASQISGIFSRFSGSGSGSD
Mu B6H12 vK
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQTISDYLHWYQQKPKGQAPRLLIKFASQISGIPARFSGSGSGTD
Ab47 vK
*****
Kabat CDRs
*****
IMGT CDRs
+++++++
+++

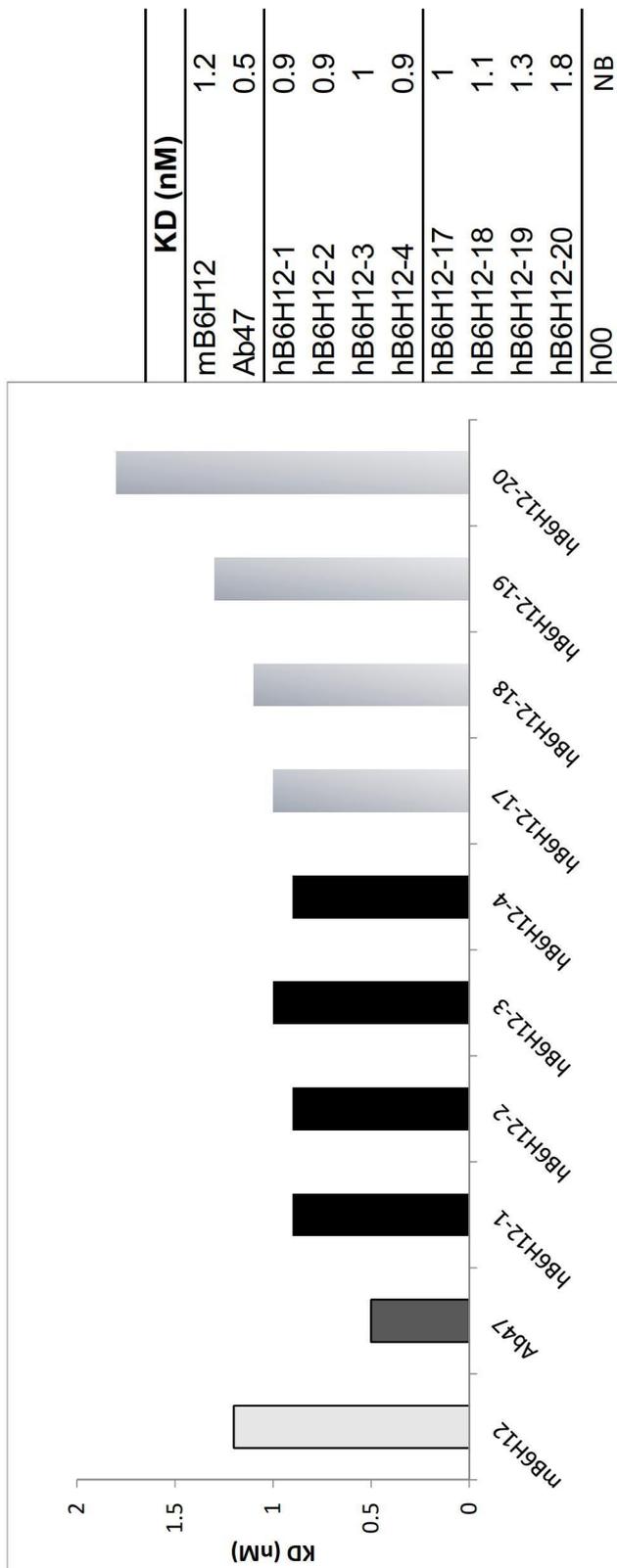
```

```

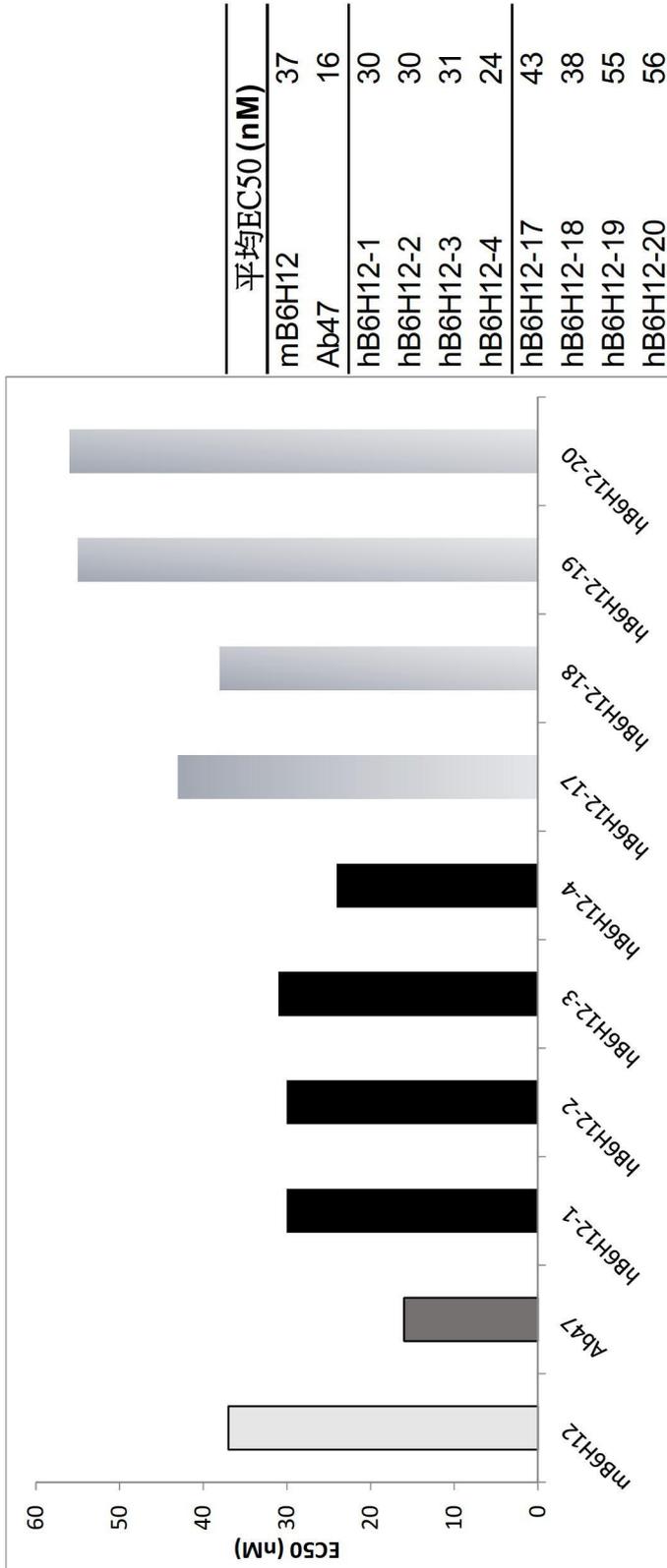
80      90      100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
FTLTINSLEAEDAAYYCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 13)
hB6H12.3 vK (hvK3)
FTLSINSEPEDEVGYVCQNGHGFPRTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 9)
Mu B6H12 vK
FTLTISSELEPEDFAVYVCQNGHGFPRTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 10)
Ab47 vK
*****
Kabat CDRs
*****
IMGT CDRs
+++++++
+++

```

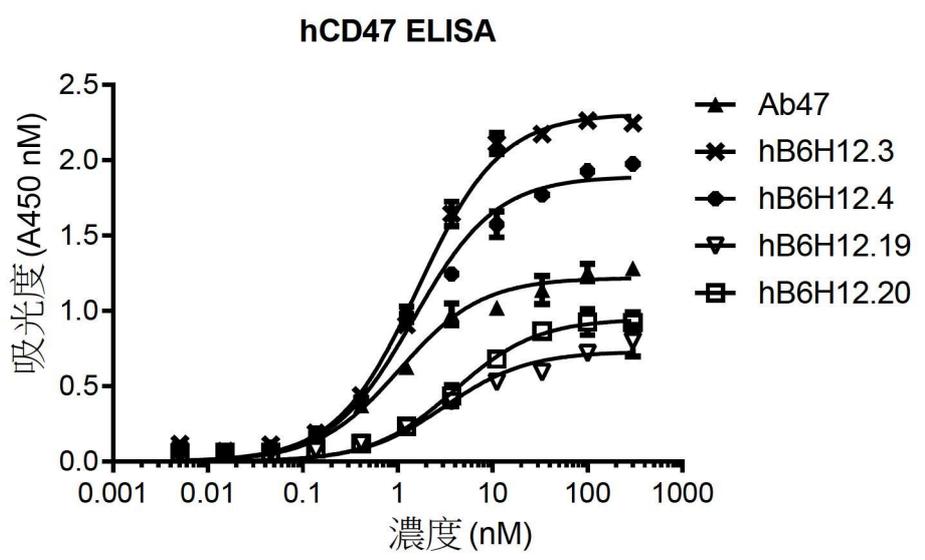
【圖12】



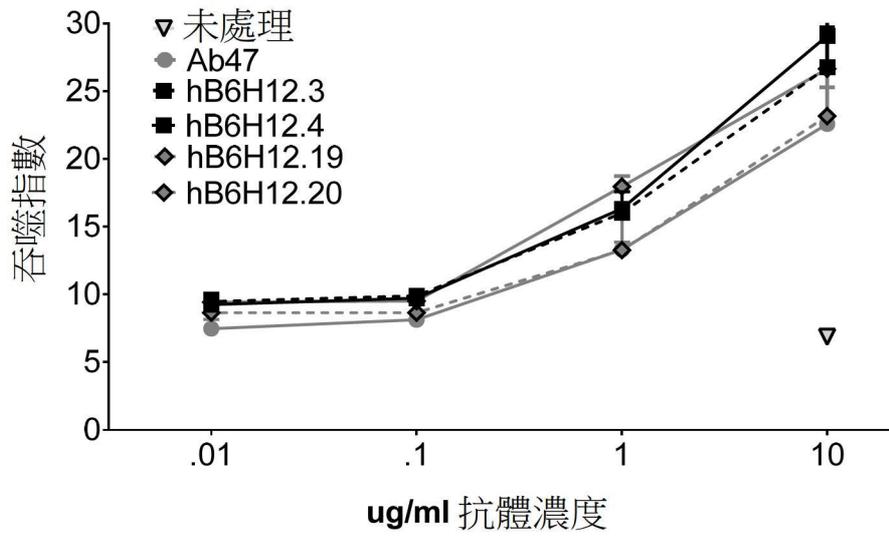
【圖2A】



【圖2B】

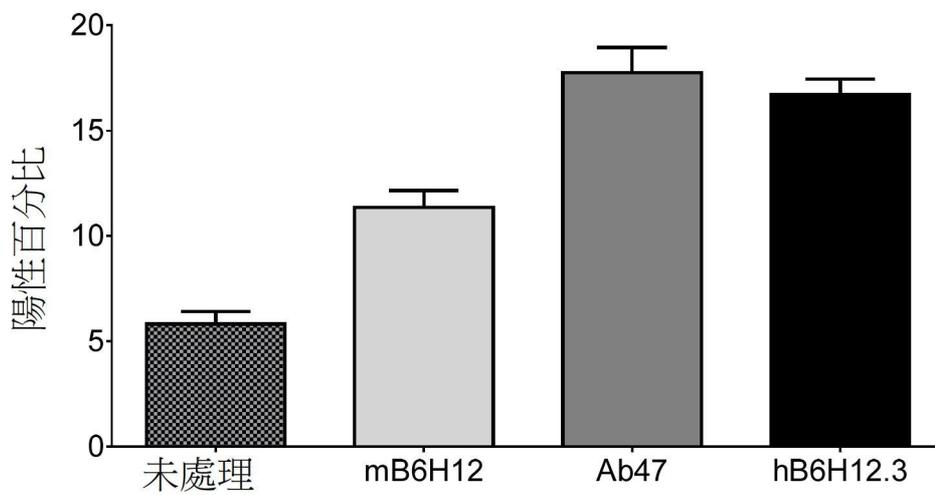


【圖2C】

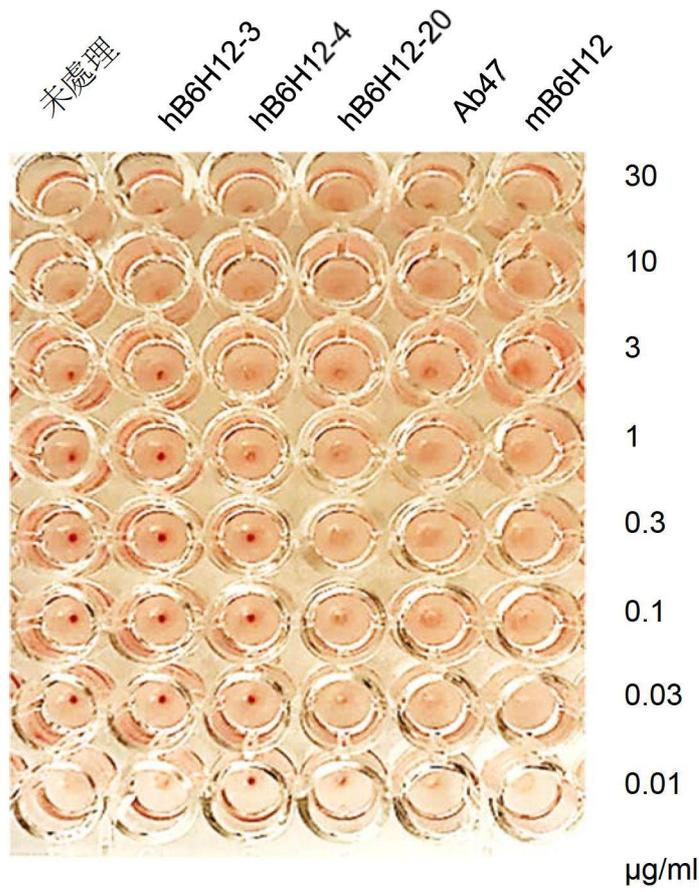


【圖3A】

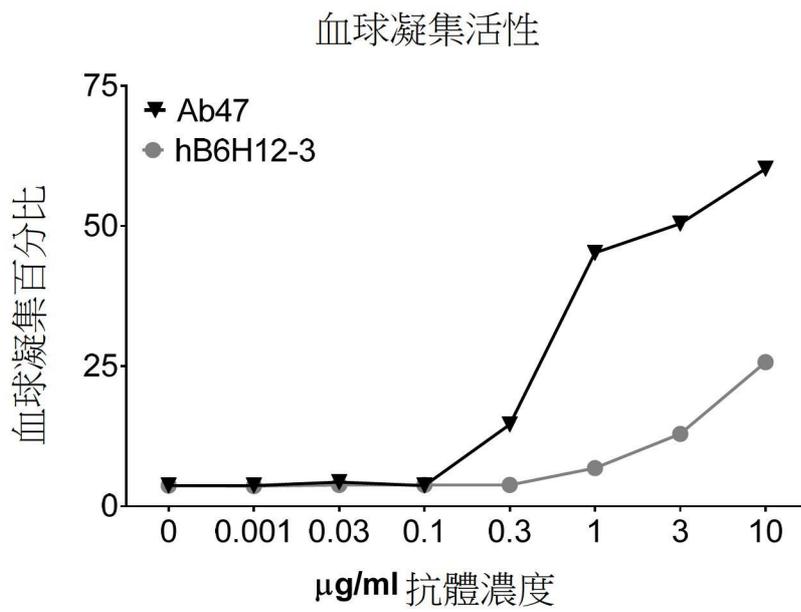
紅血球吞噬作用



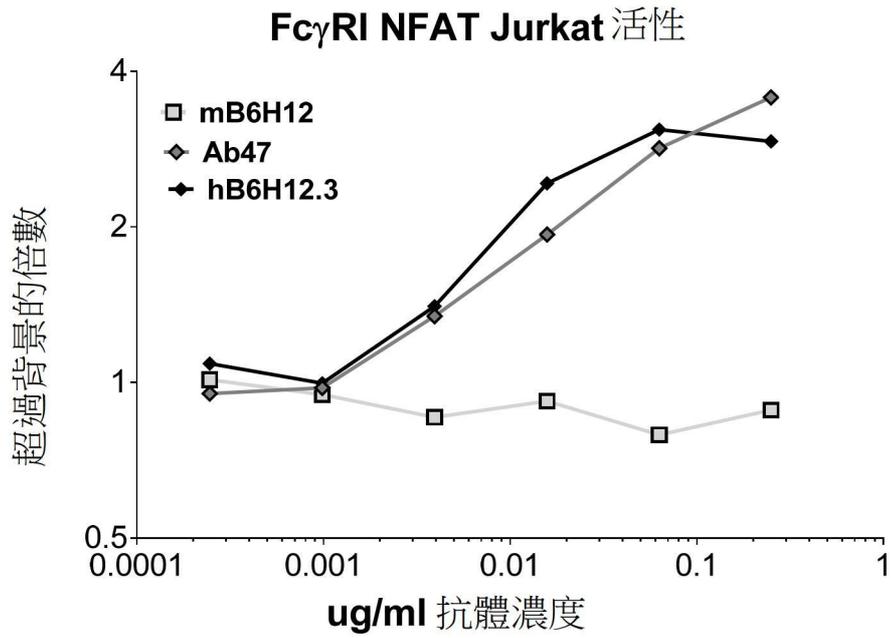
【圖3B】



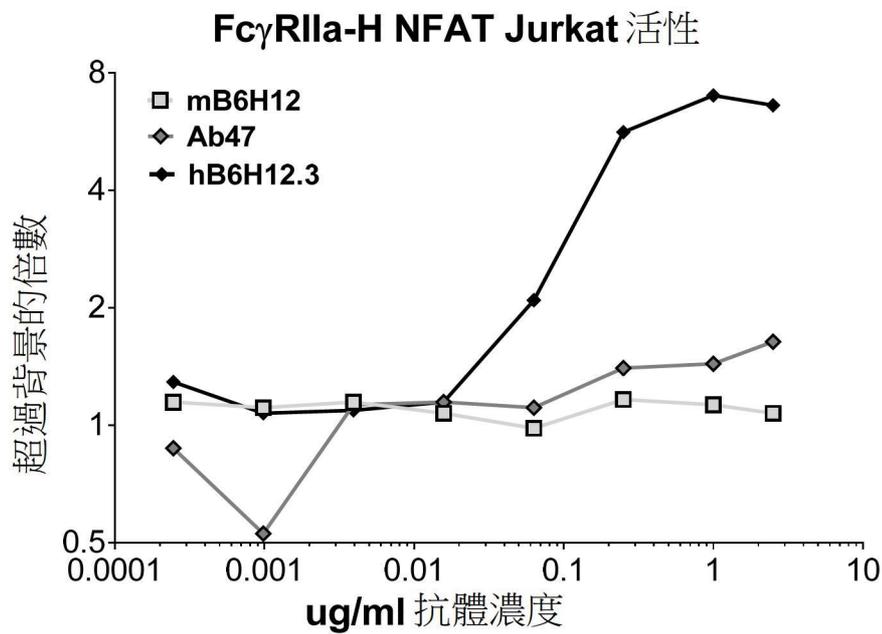
【圖4A】



【圖4B】

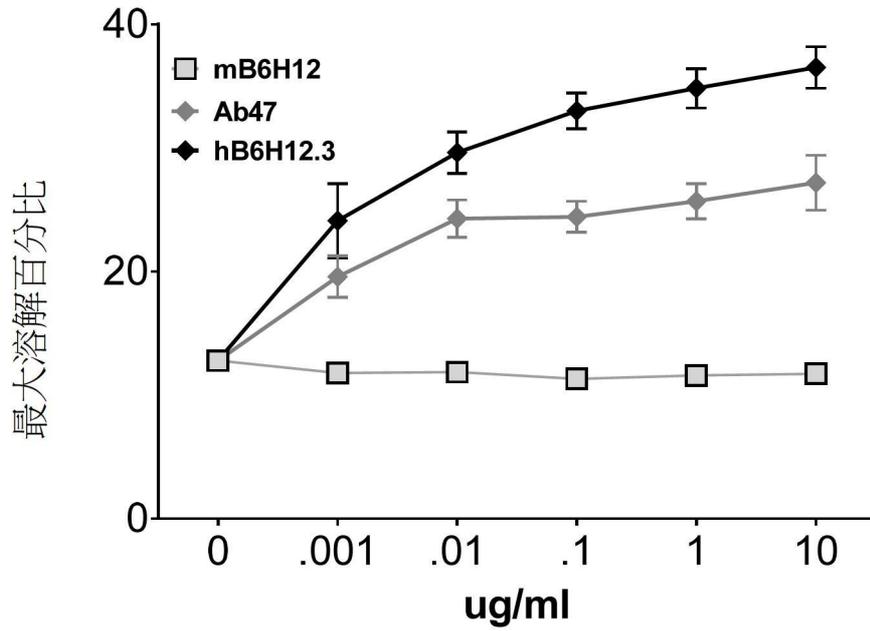


【圖5A】



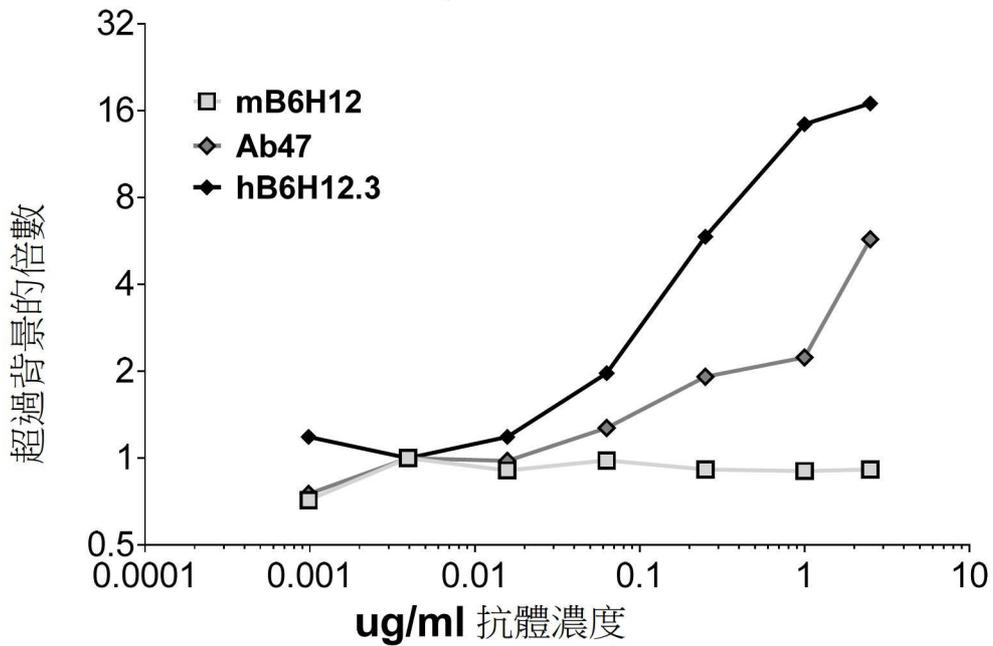
【圖5B】

NK介導之ADCC活性

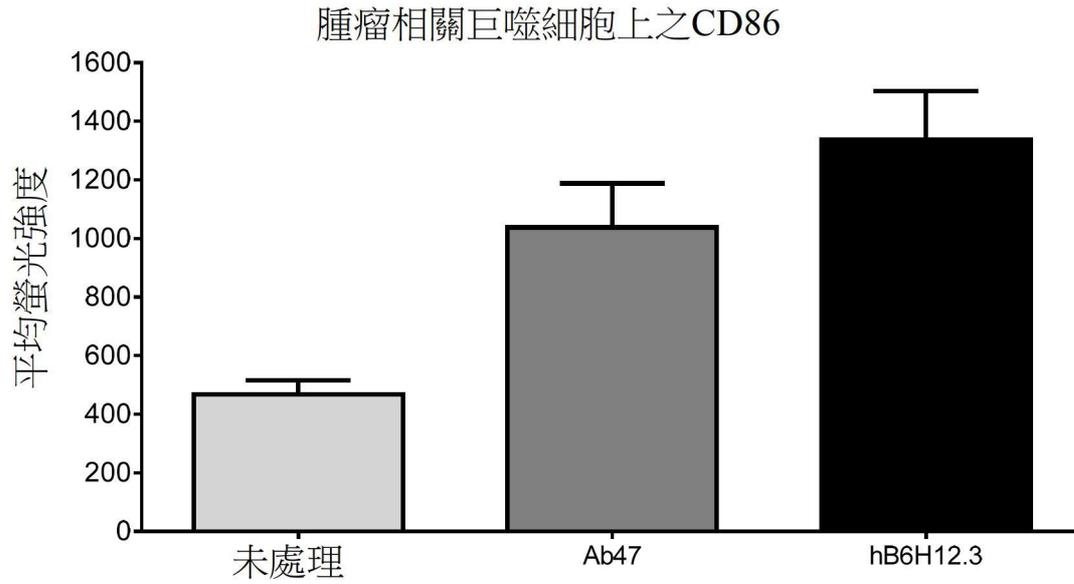


【圖6A】

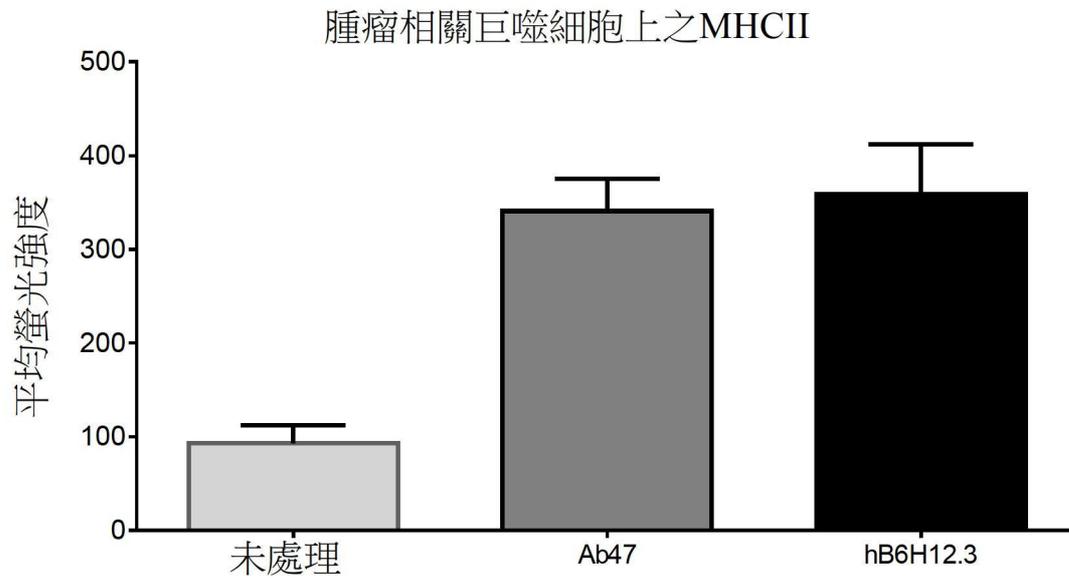
FcγRIII 訊息傳導



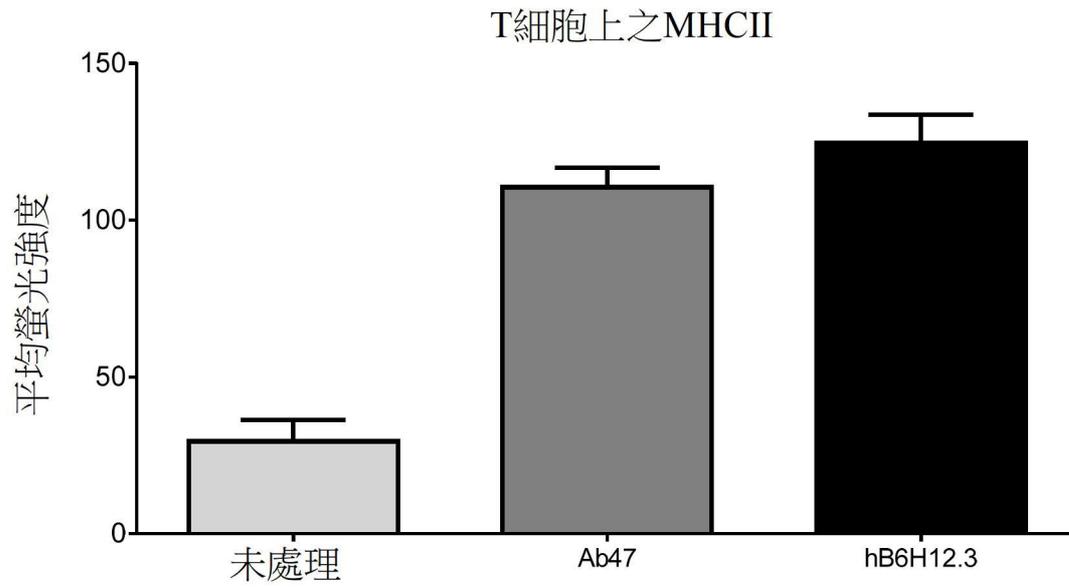
【圖6B】



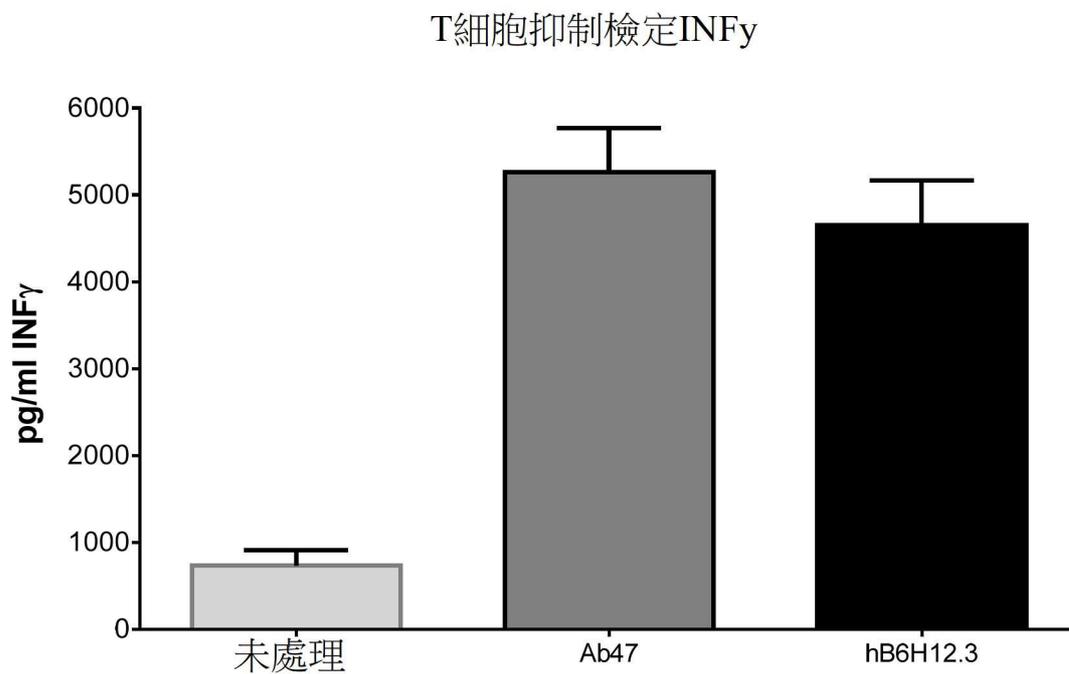
【圖7A】



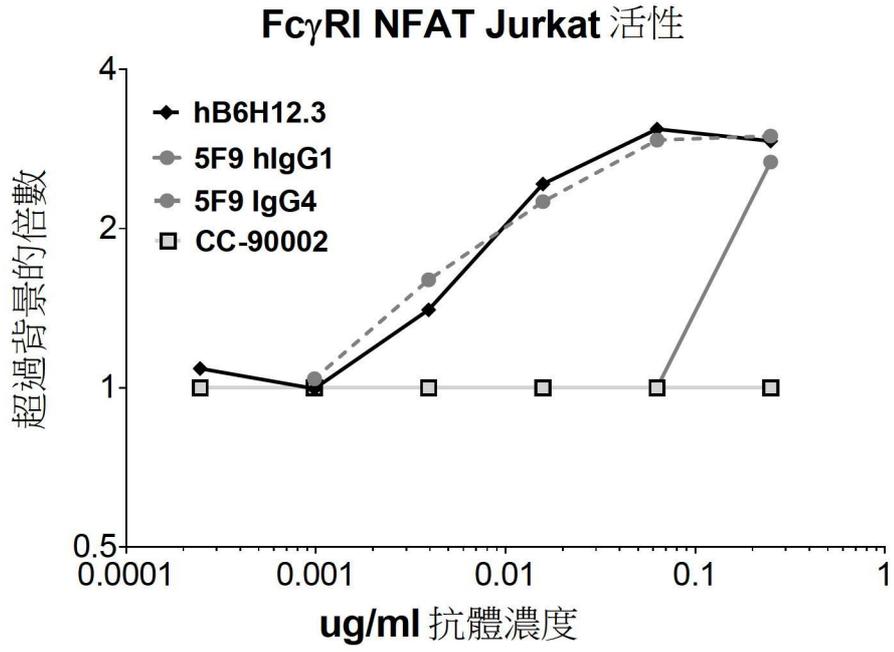
【圖7B】



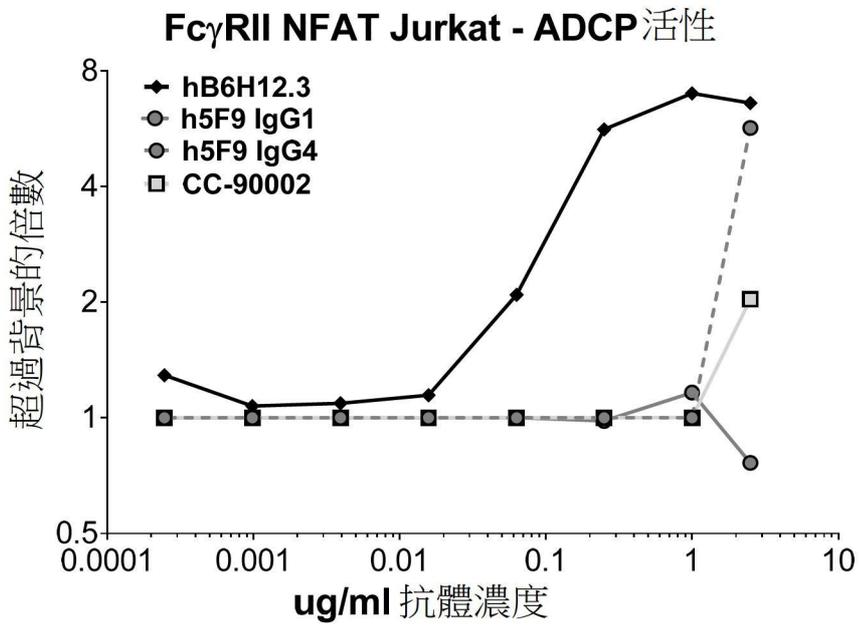
【圖7C】



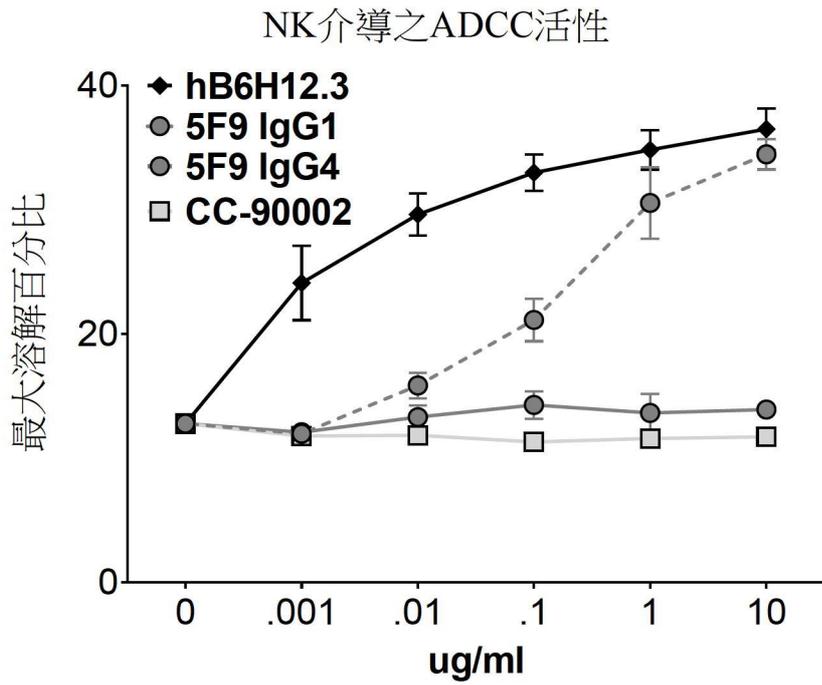
【圖7D】



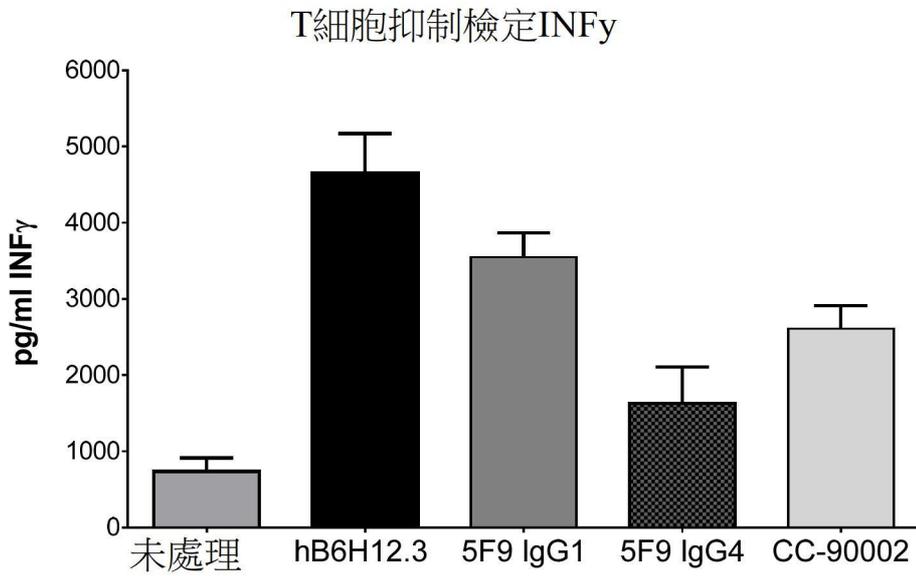
【圖8A】



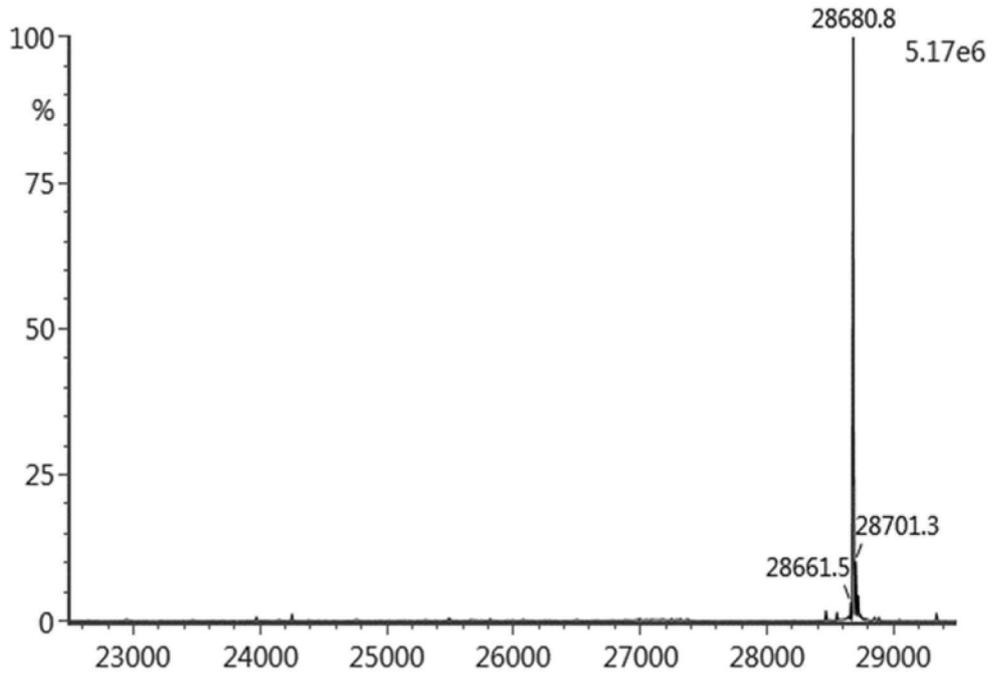
【圖8B】



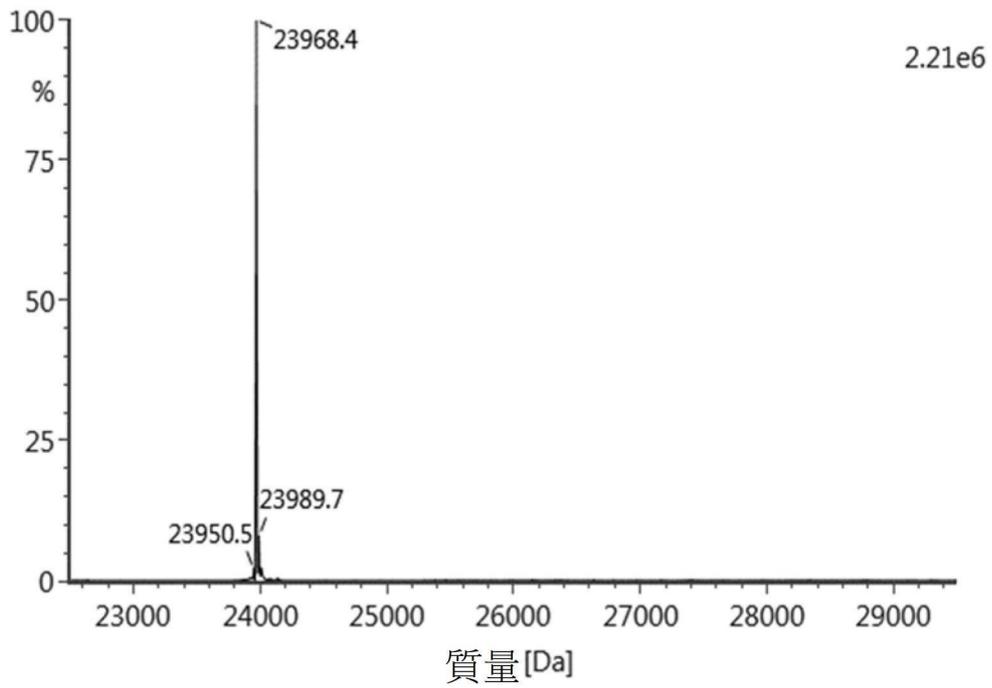
【圖8C】



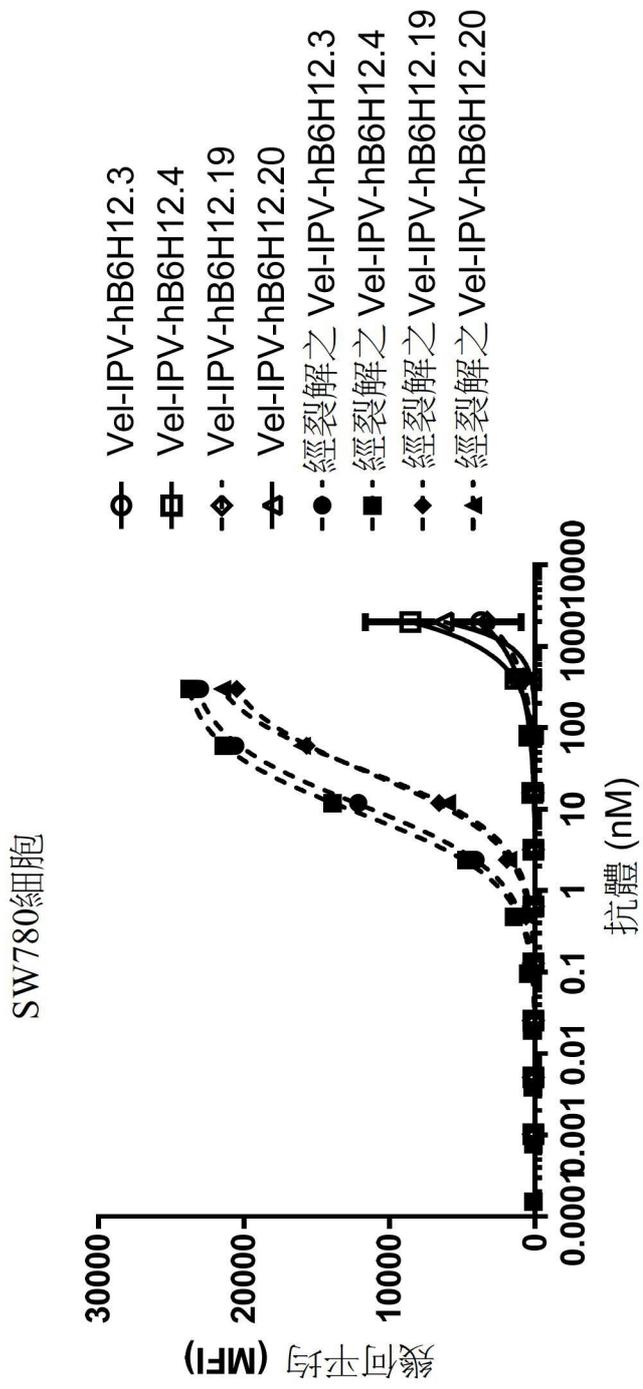
【圖8D】



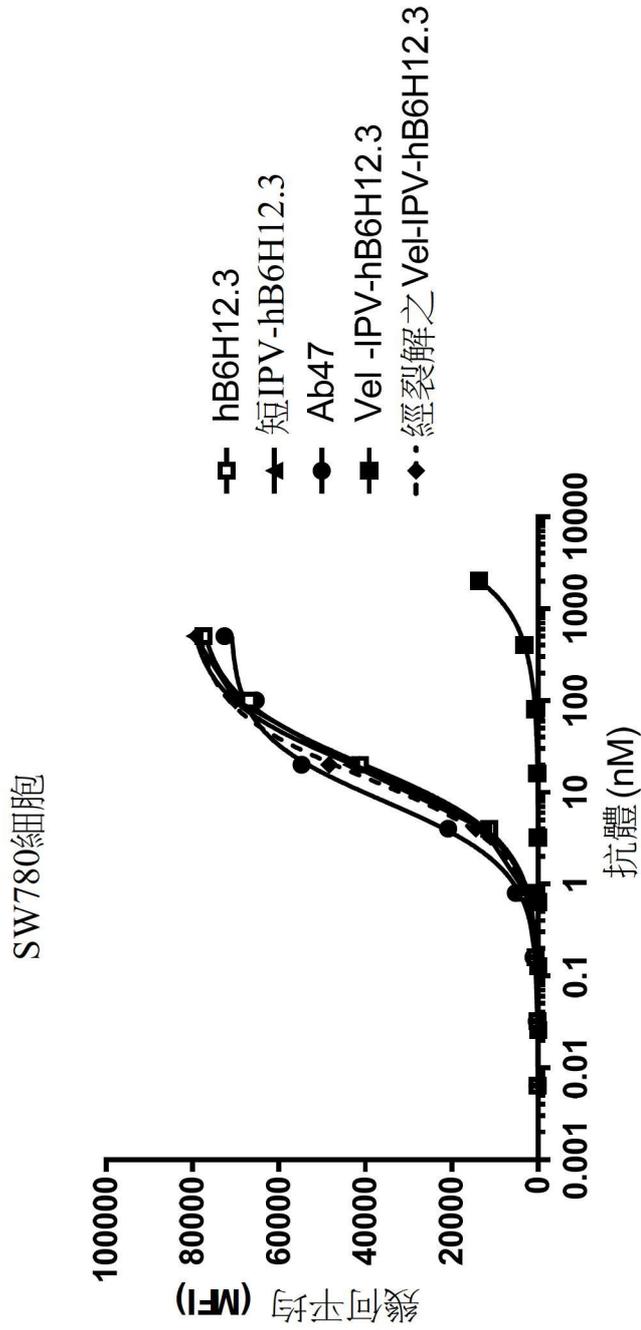
【圖9A】



【圖9B】

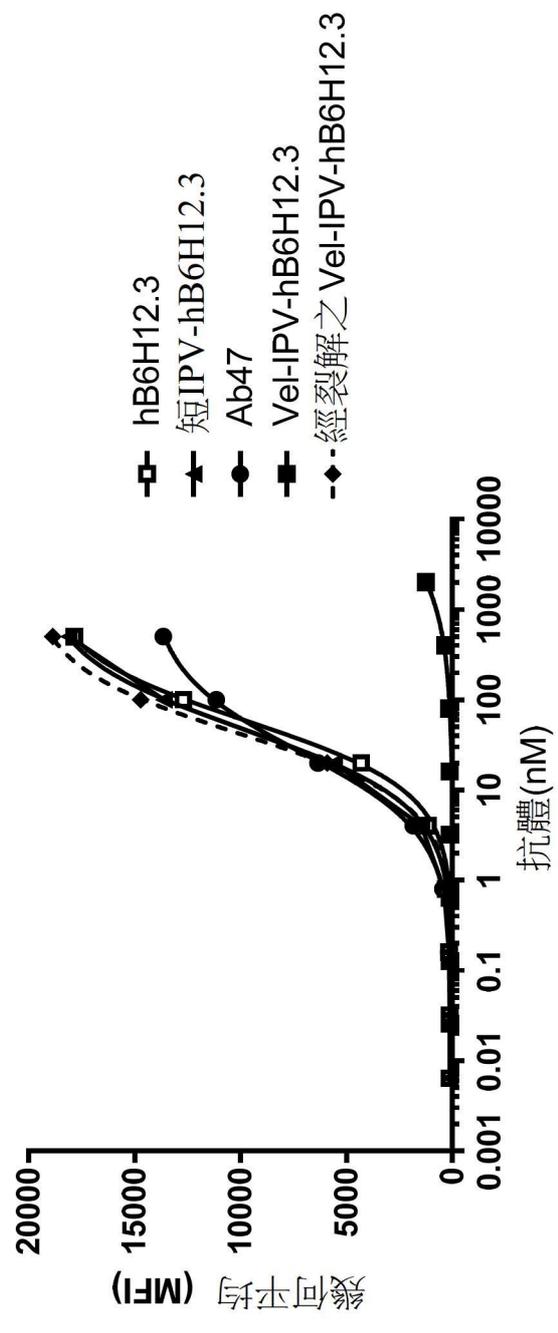


【圖10】

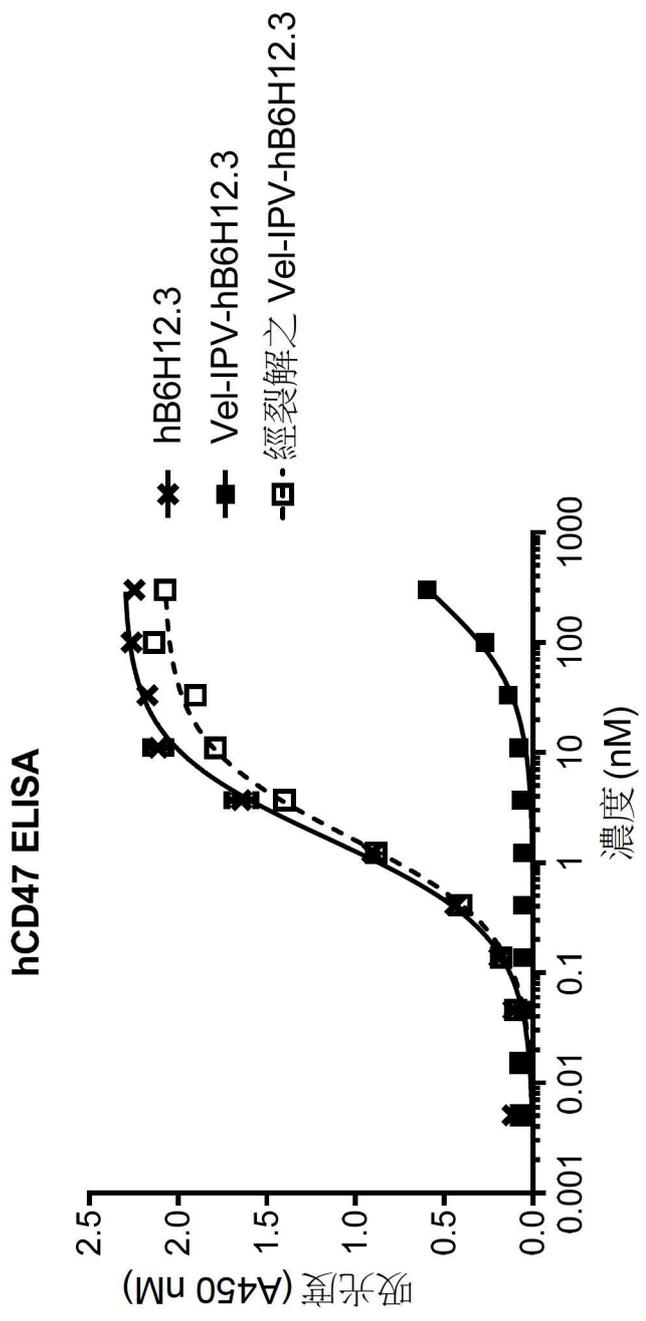


【圖11】

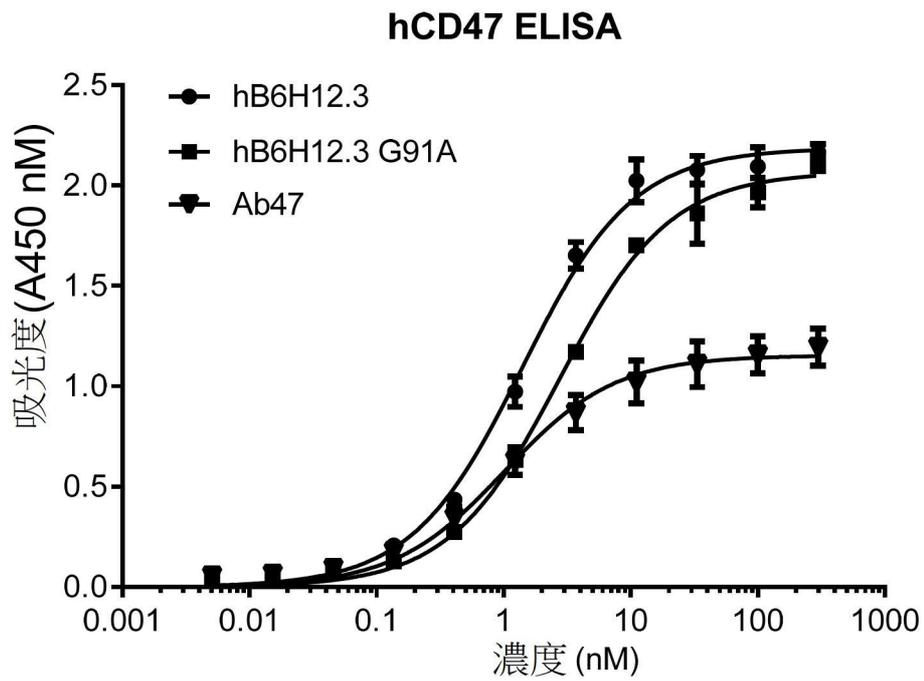
人類RBC



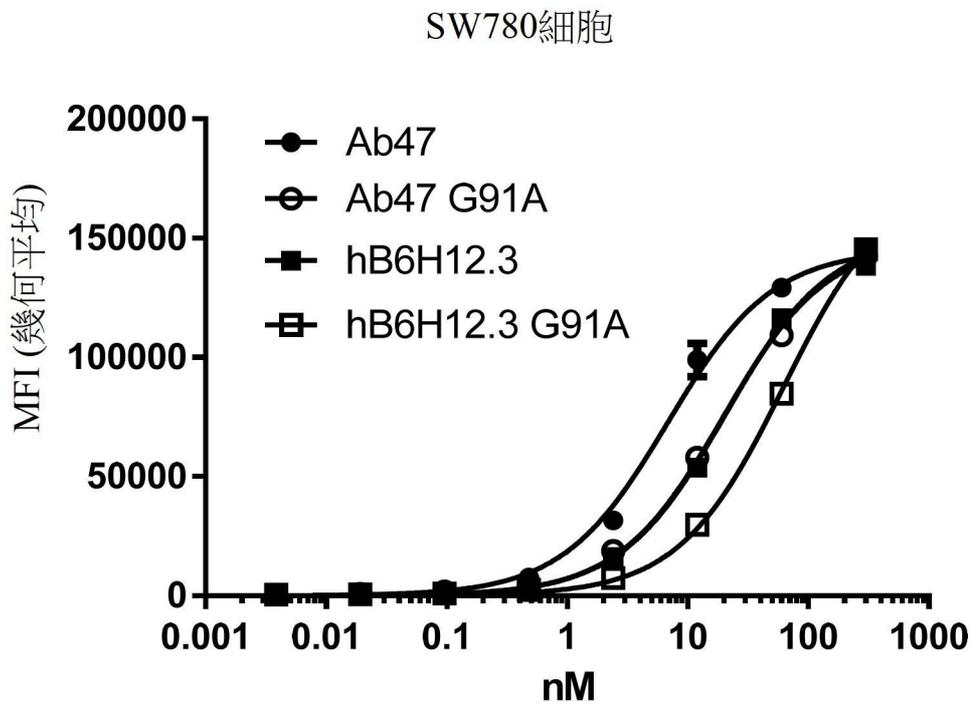
【圖12】



【圖13】

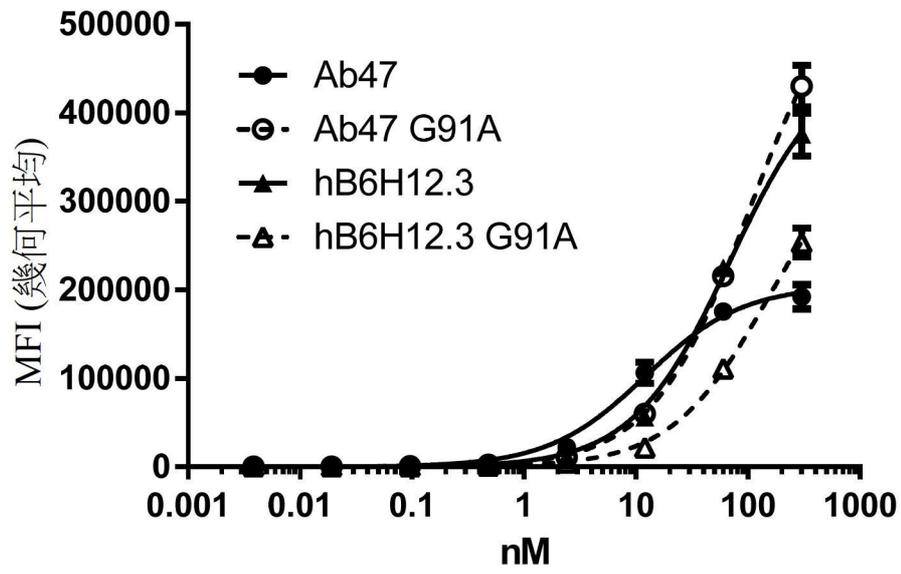


【圖14】



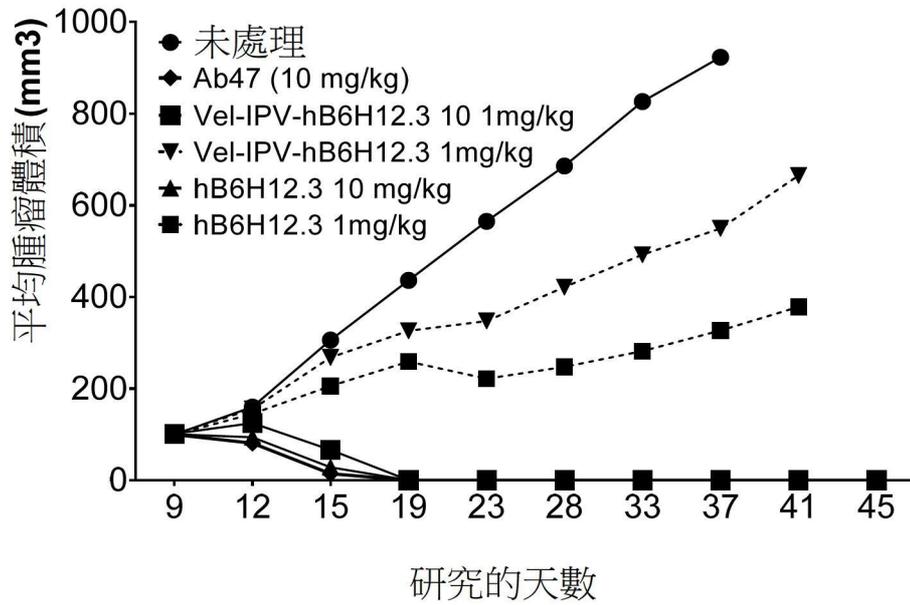
【圖15】

RBC細胞



【圖16】

L428淋巴瘤癌症模型



【圖17A】

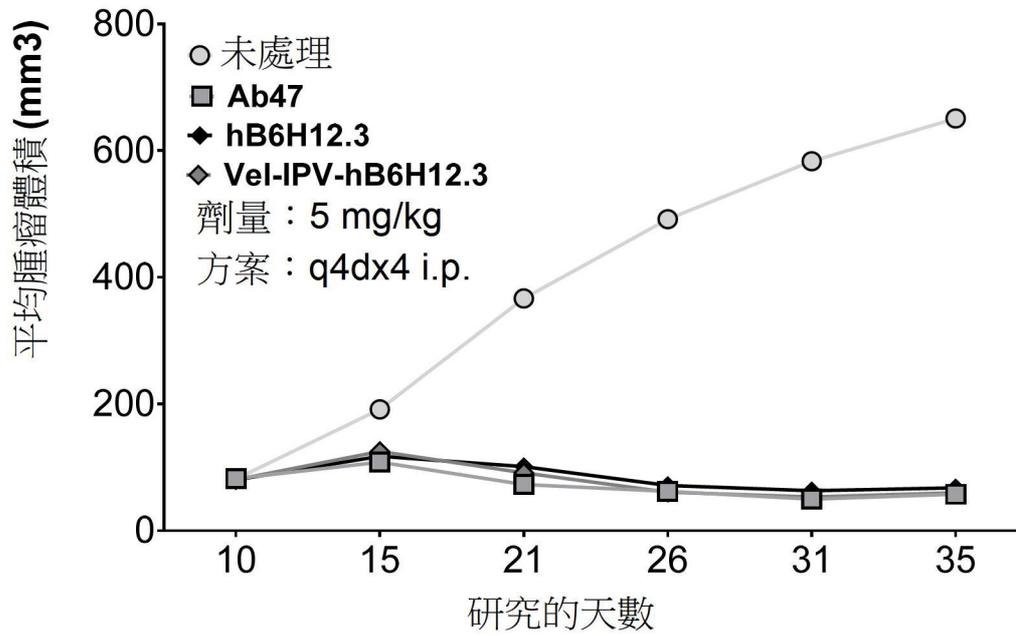
L-428



F4/80小鼠巨噬細胞

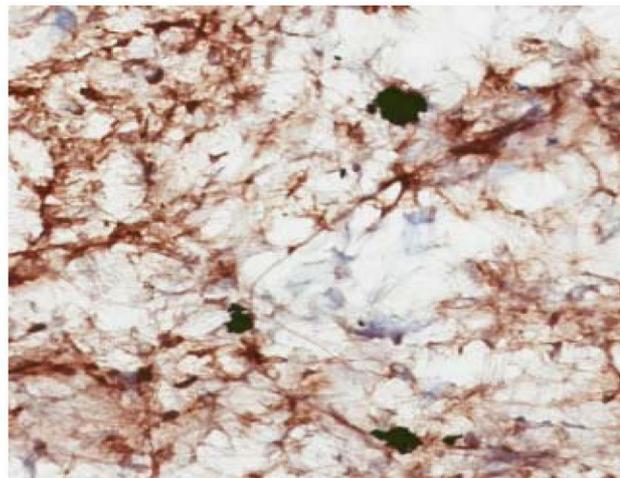
【圖17B】

Detroit562 (異種移植頭頸癌模型)



【圖18A】

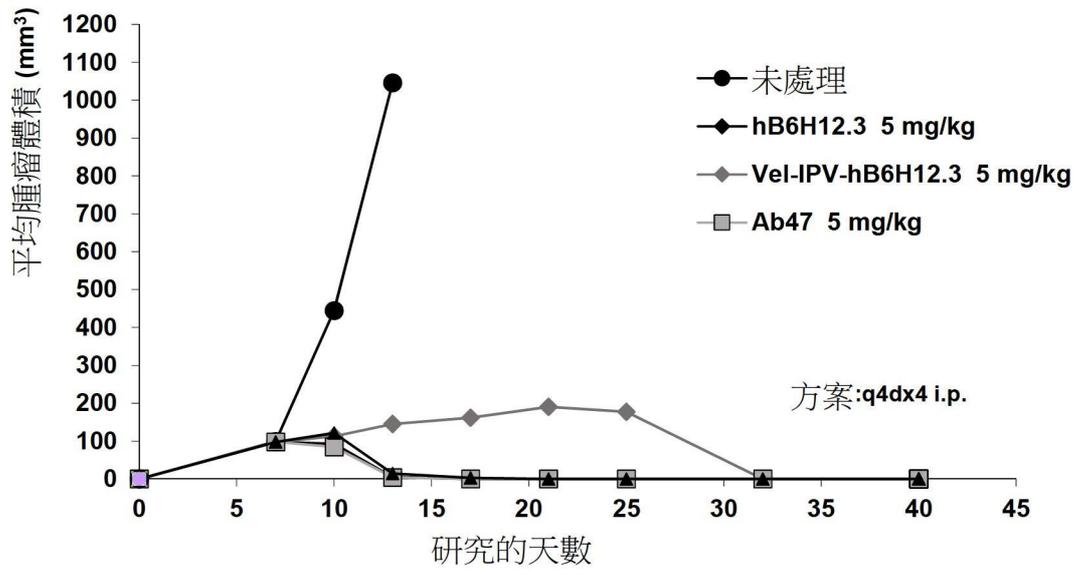
Detroit 562



F4/80小鼠巨噬細胞

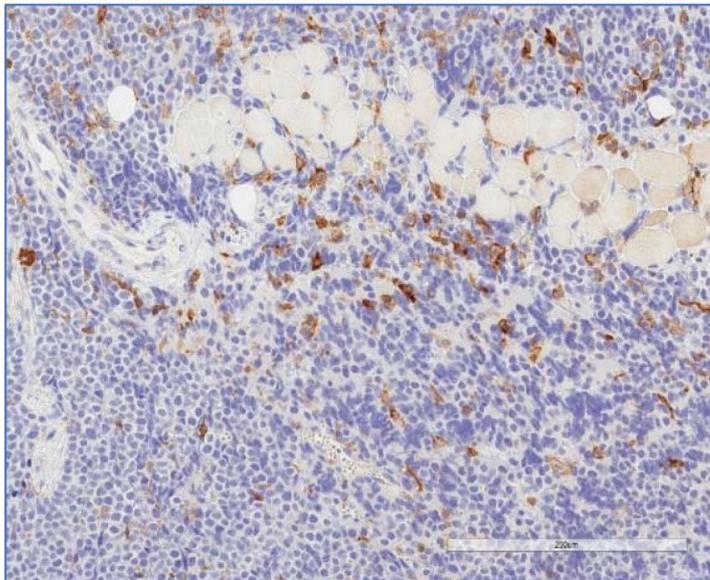
【圖18B】

SUDHL8 (異種移植淋巴瘤模型)



【圖18C】

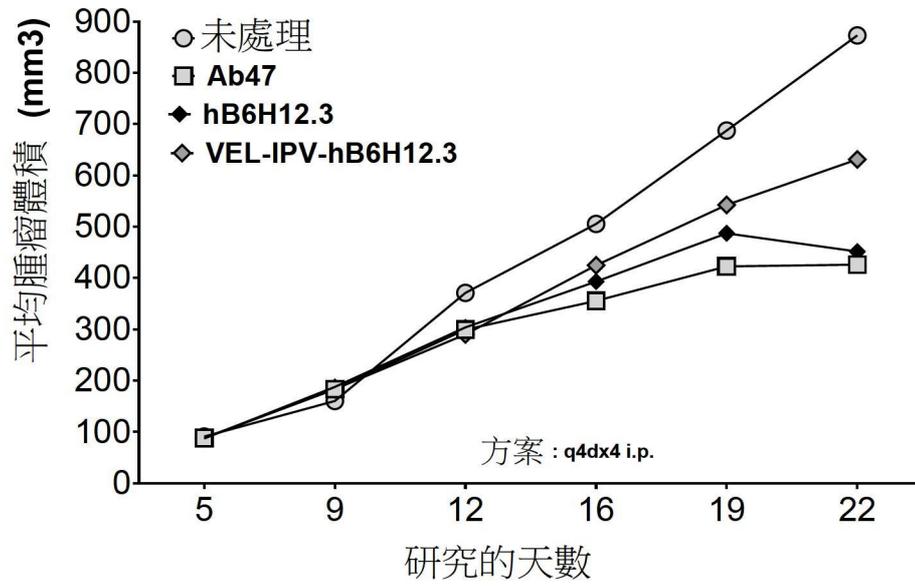
SUDHL8



F4/80小鼠巨噬細胞

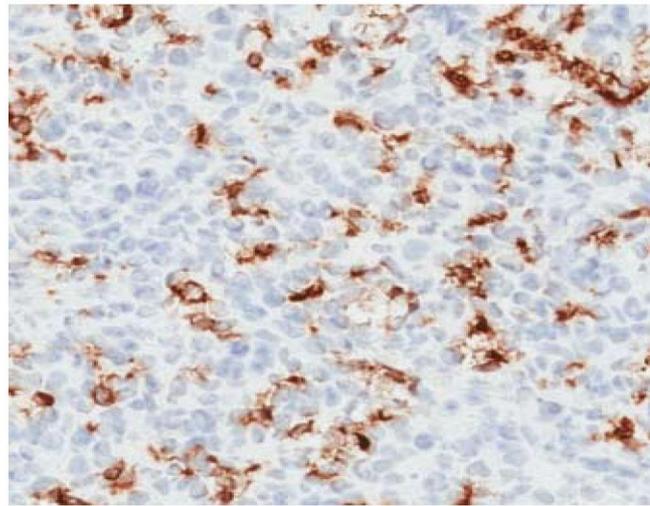
【圖18D】

HT1080 (異種移植纖維肉瘤癌模型)



【圖19A】

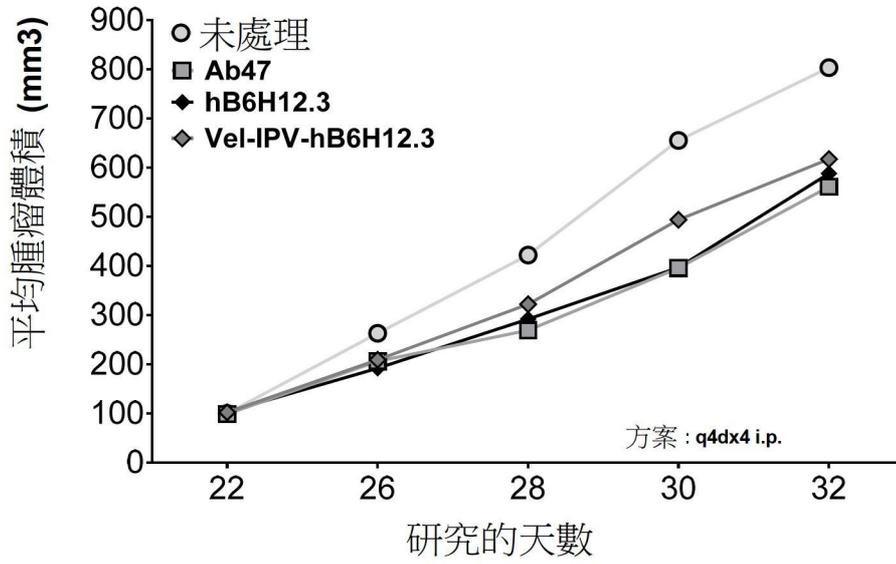
HT1080



F4/80小鼠巨噬細胞

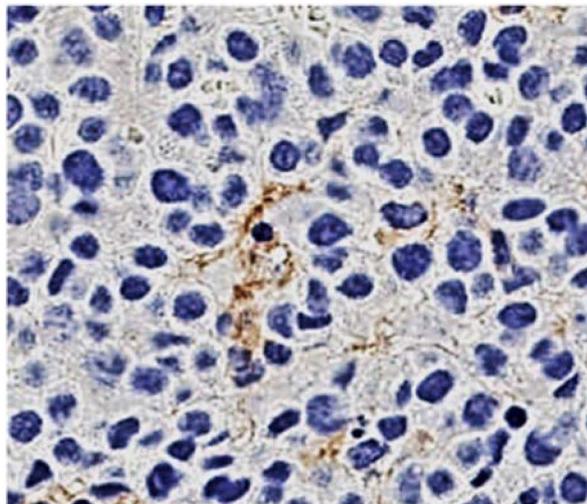
【圖19B】

HEPG2(異種移植肝細胞癌模型)



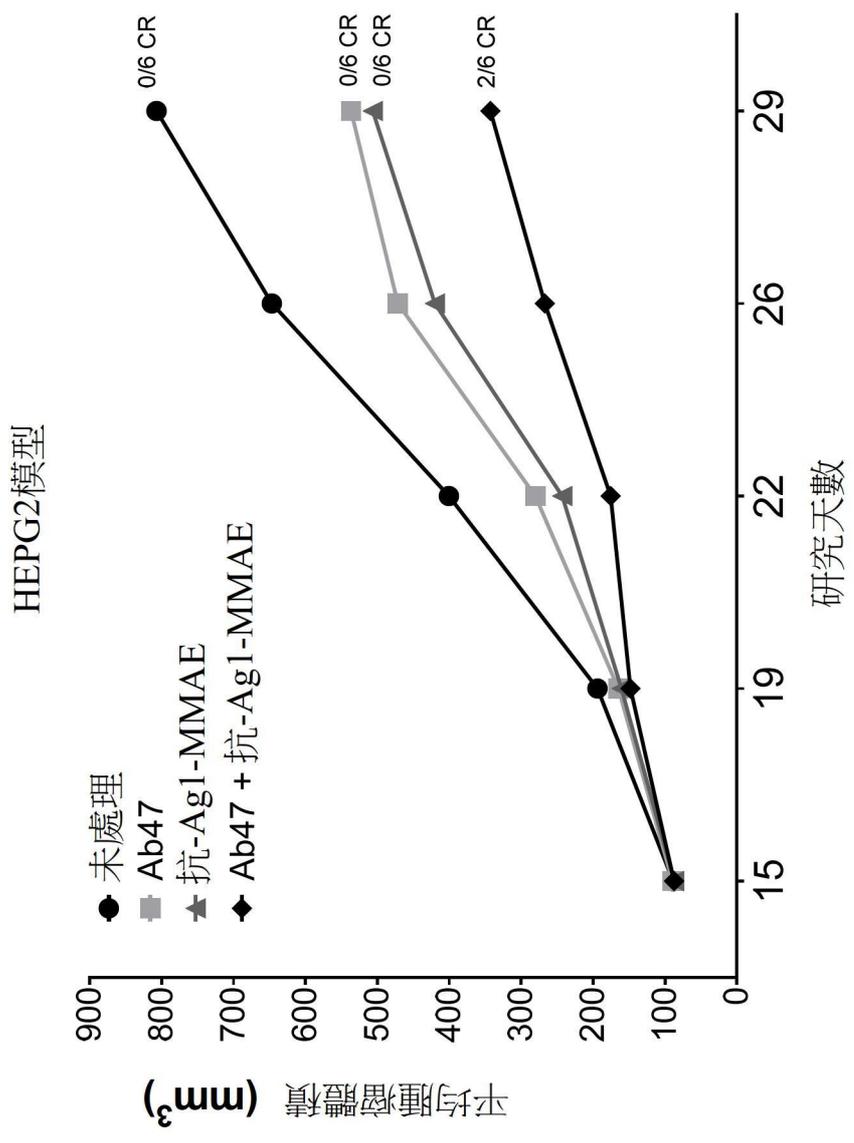
【圖19C】

HepG2

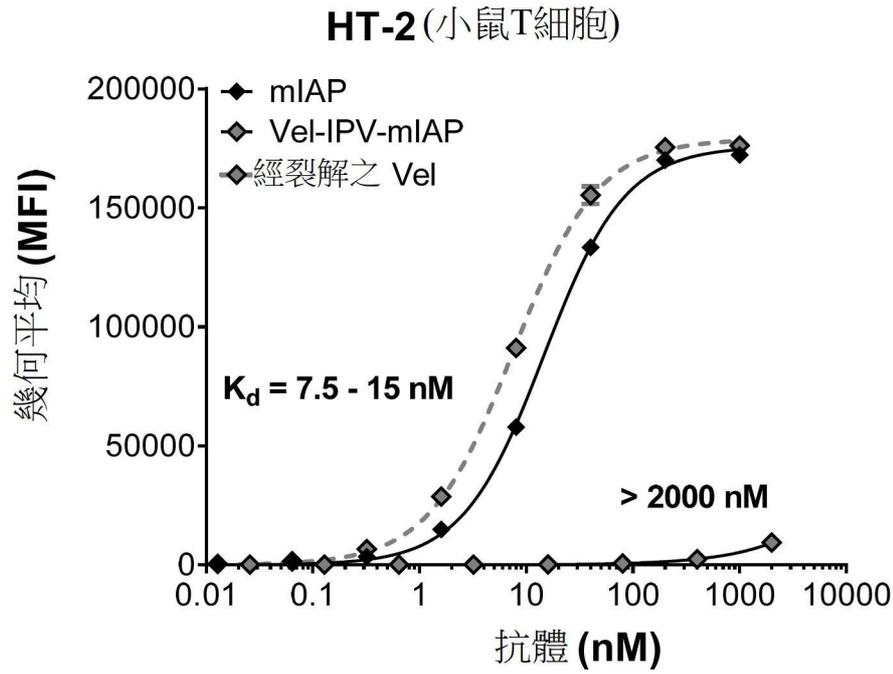


F4/80小鼠巨噬細胞

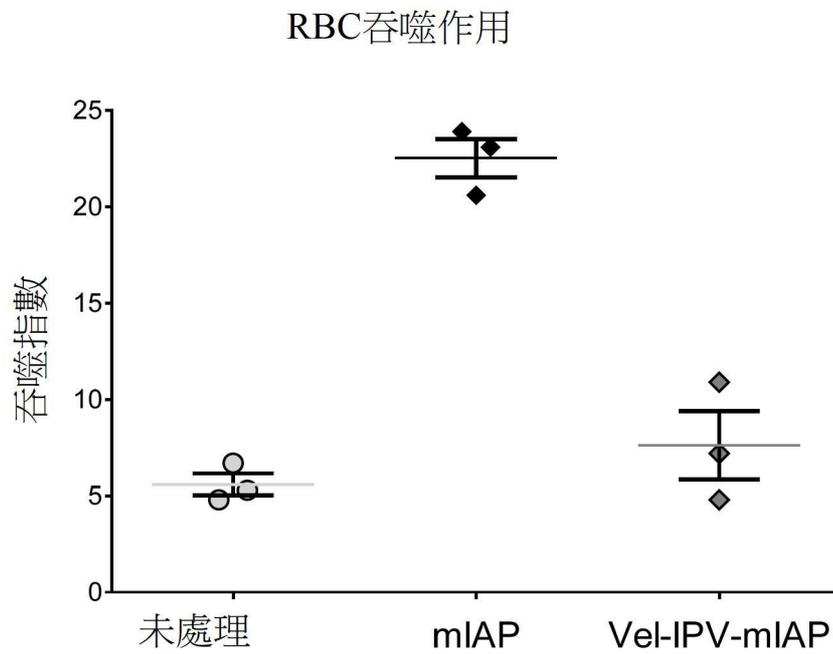
【圖19D】



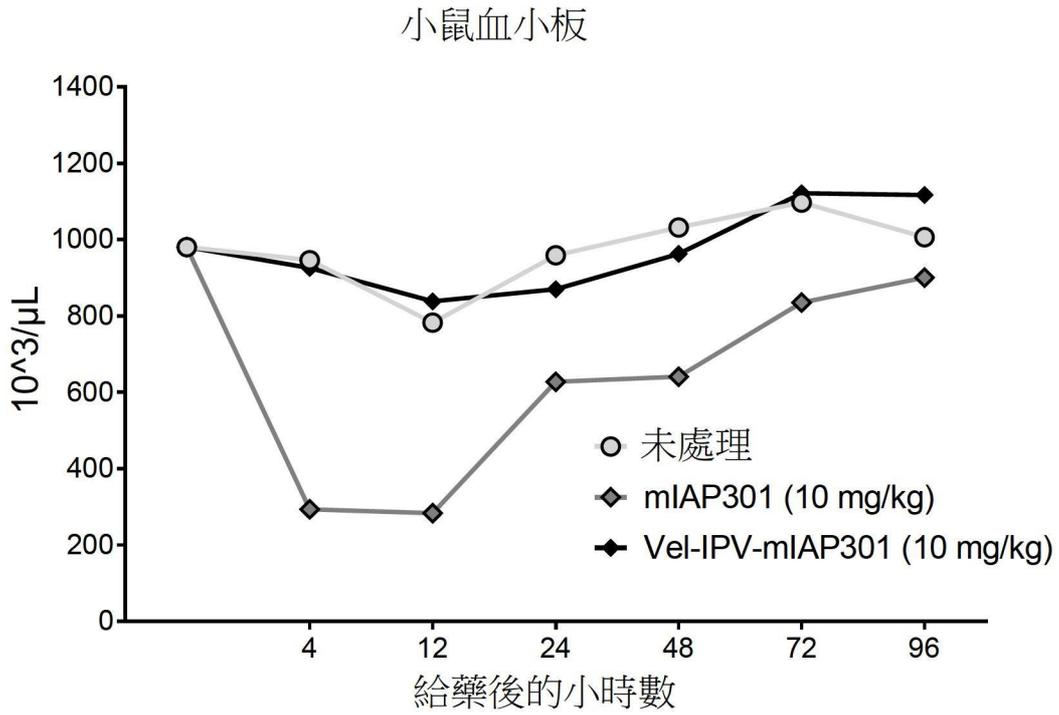
【圖20】



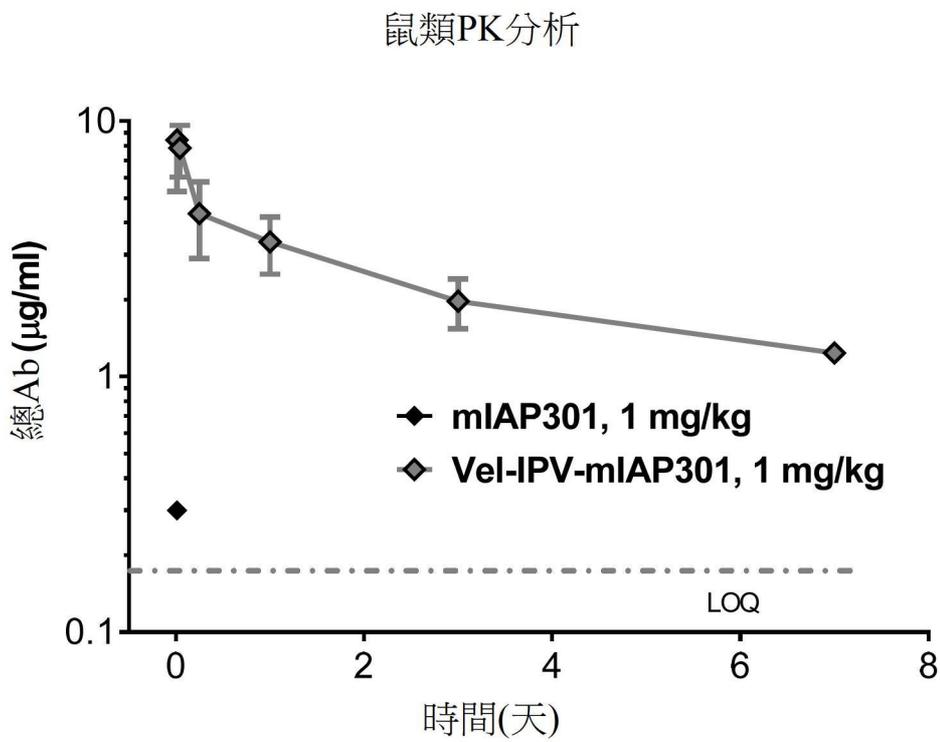
【圖21A】



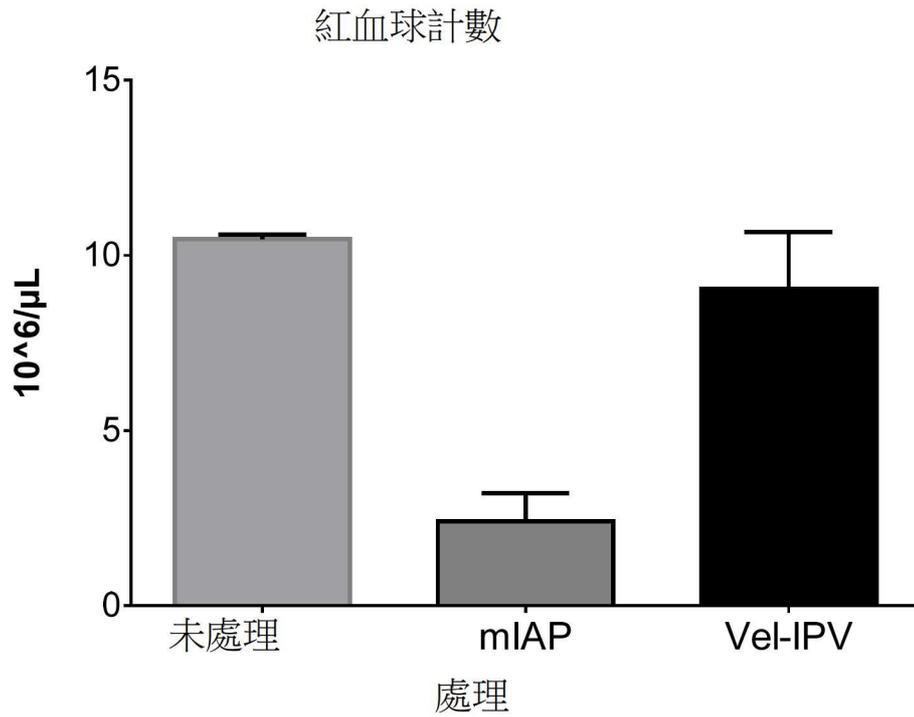
【圖21B】



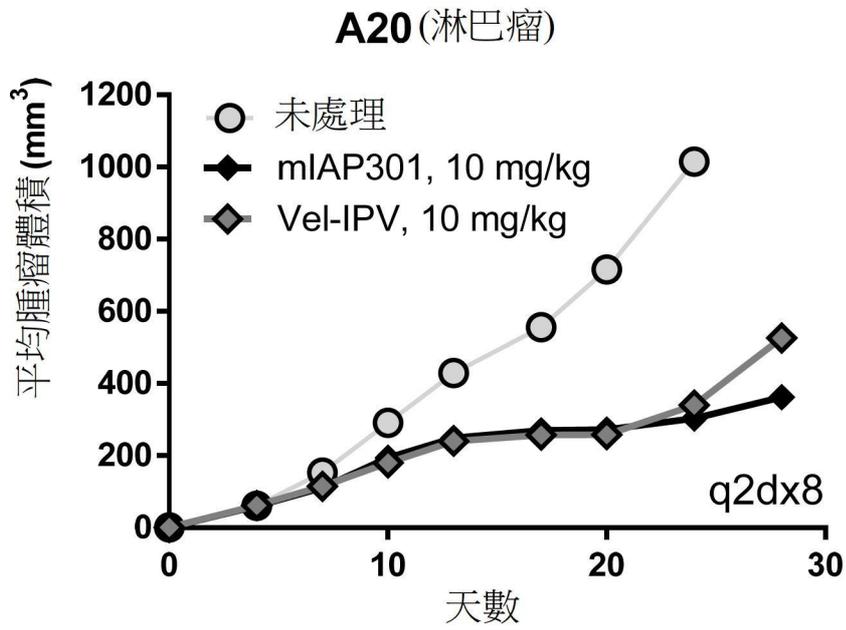
【圖22A】



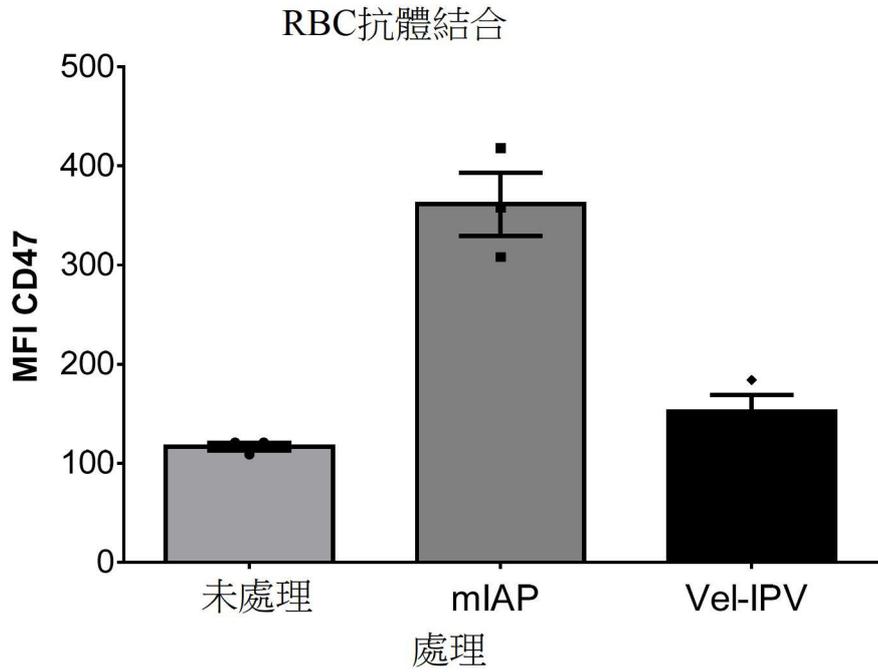
【圖22B】



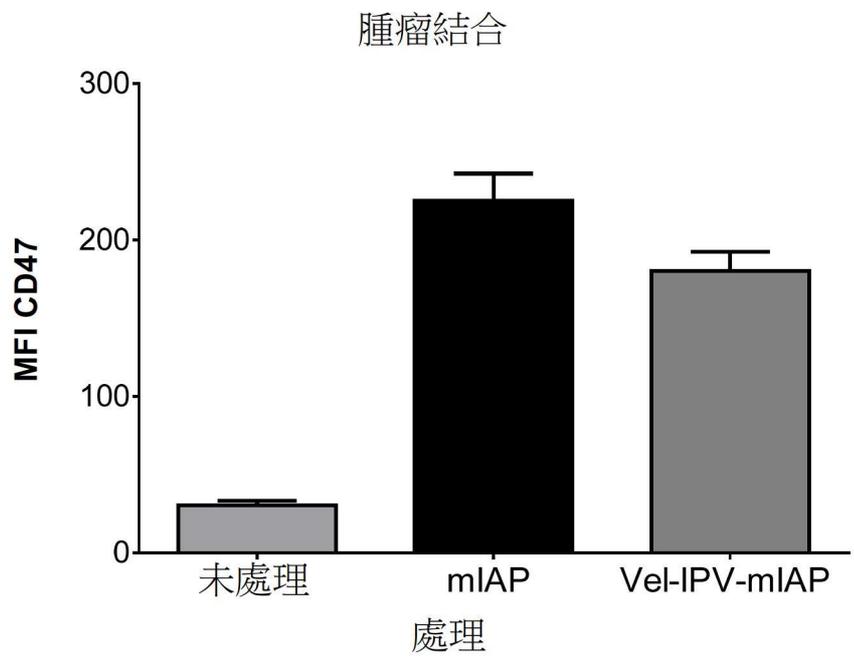
【圖23A】



【圖23B】

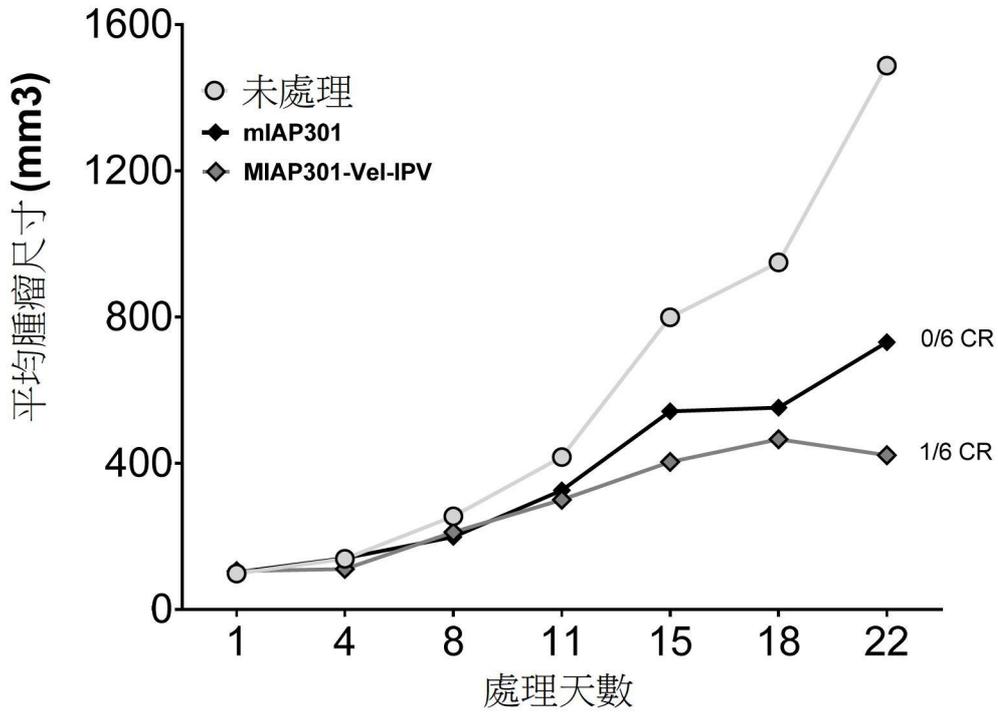


【圖23C】



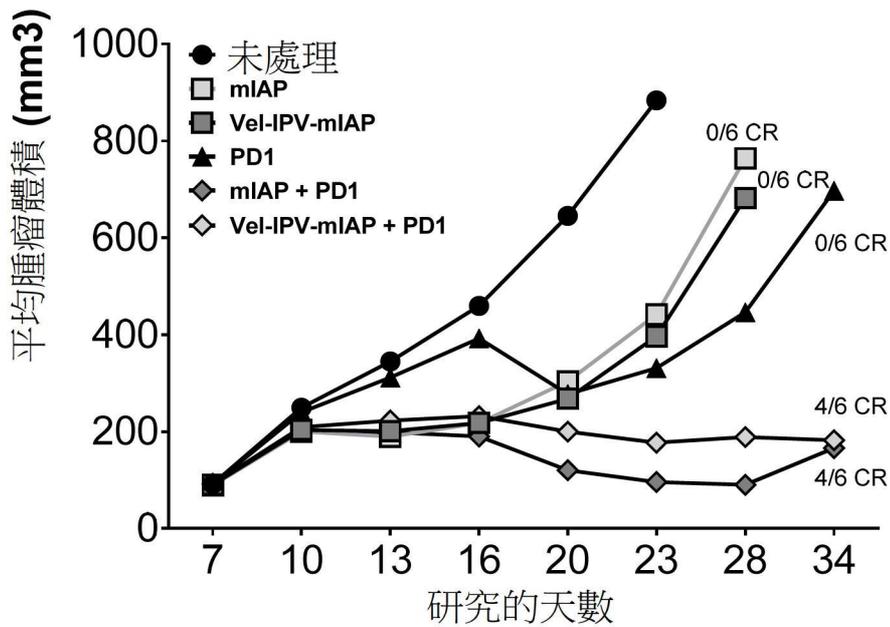
【圖23D】

MC38 (同基因結腸癌模型)

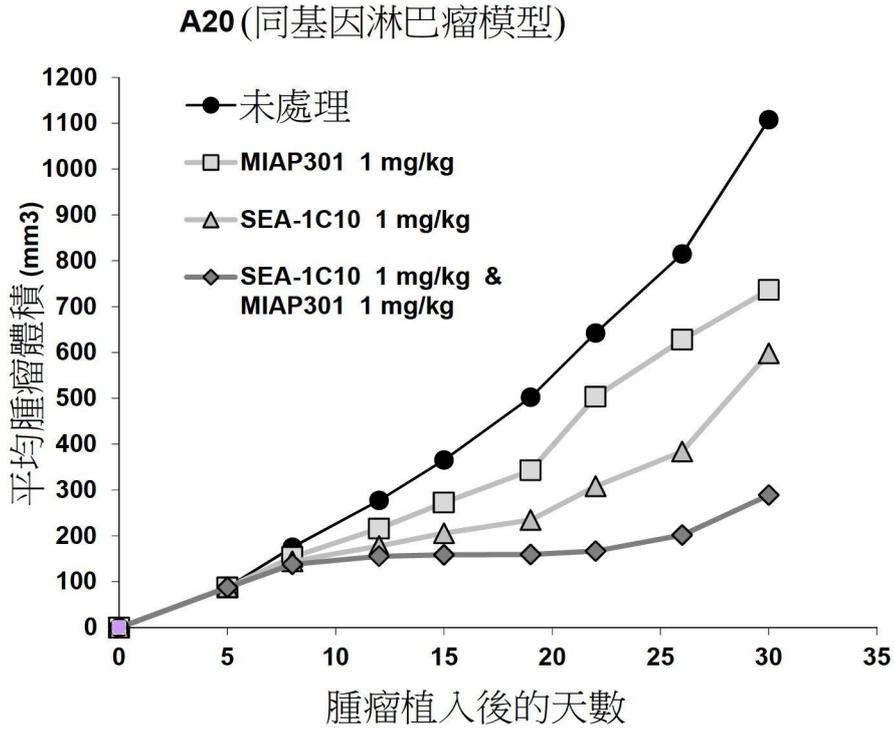


【圖24】

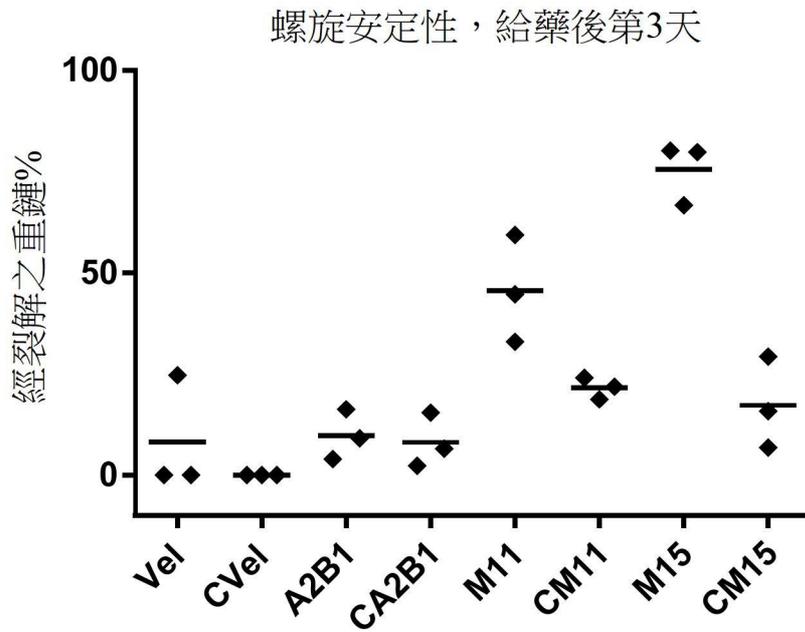
A20 (同基因淋巴瘤模型)



【圖25A】

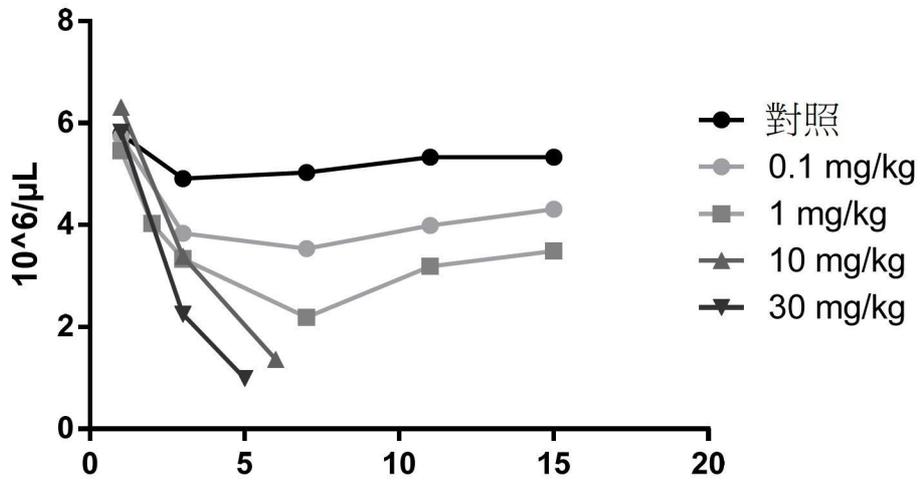


【圖25B】



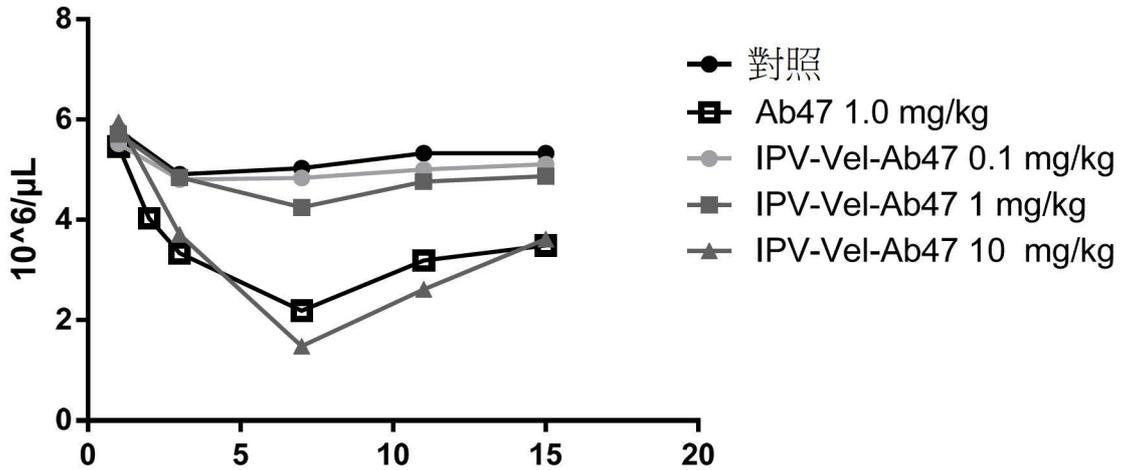
【圖26】

RBC
Ab47

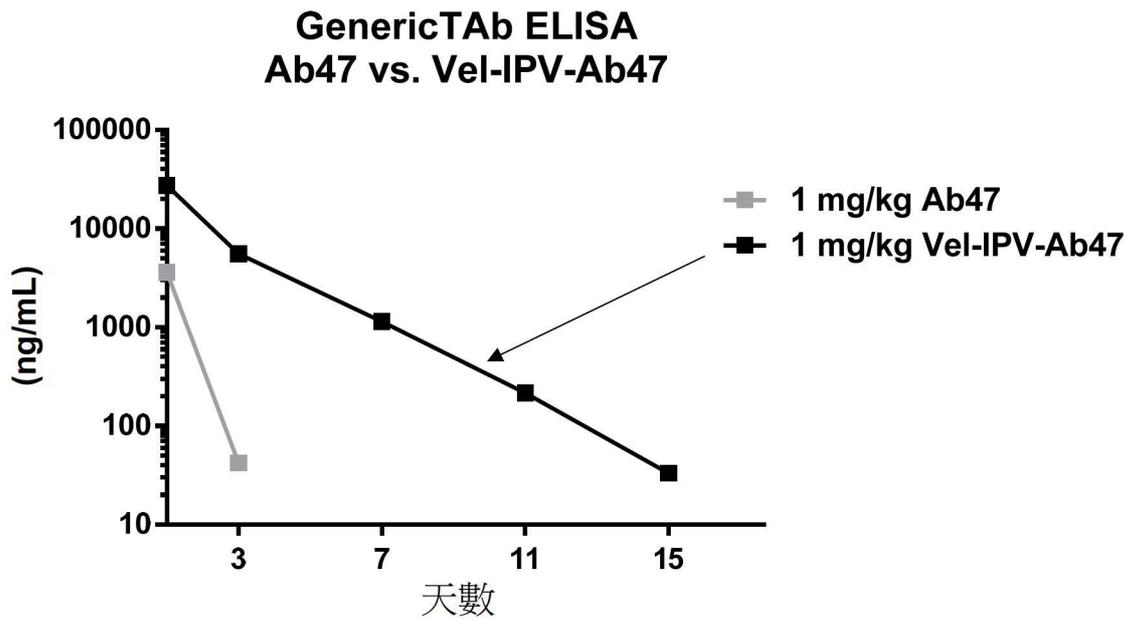


【圖27A】

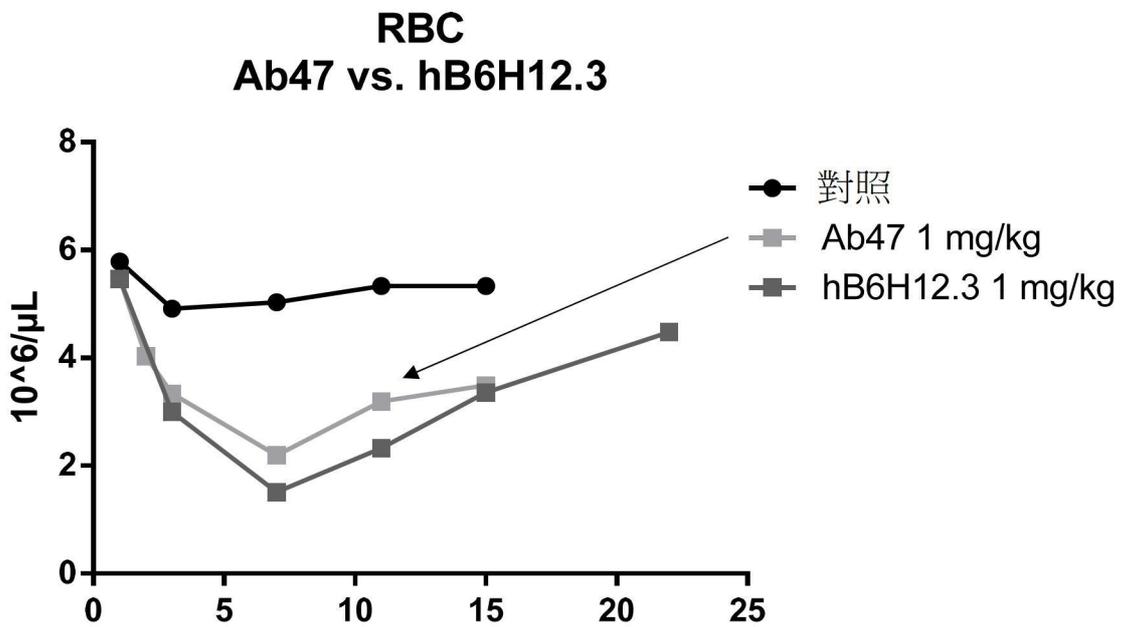
RBC
Ab47 vs. Vel-IPV-Ab47



【圖27B】

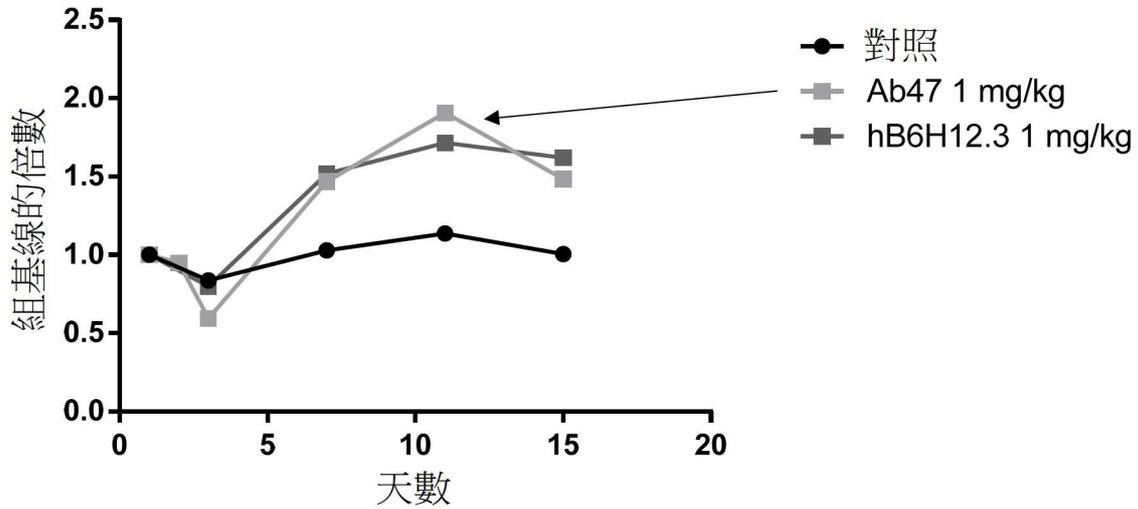


【圖28】



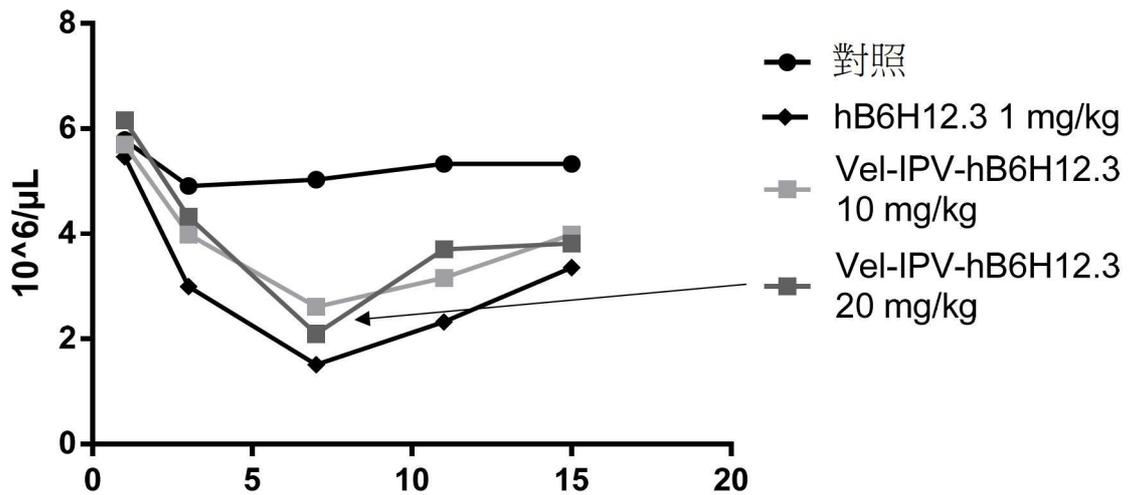
【圖29】

血小板(基線倍數)
Ab47 vs. hB6H12.3



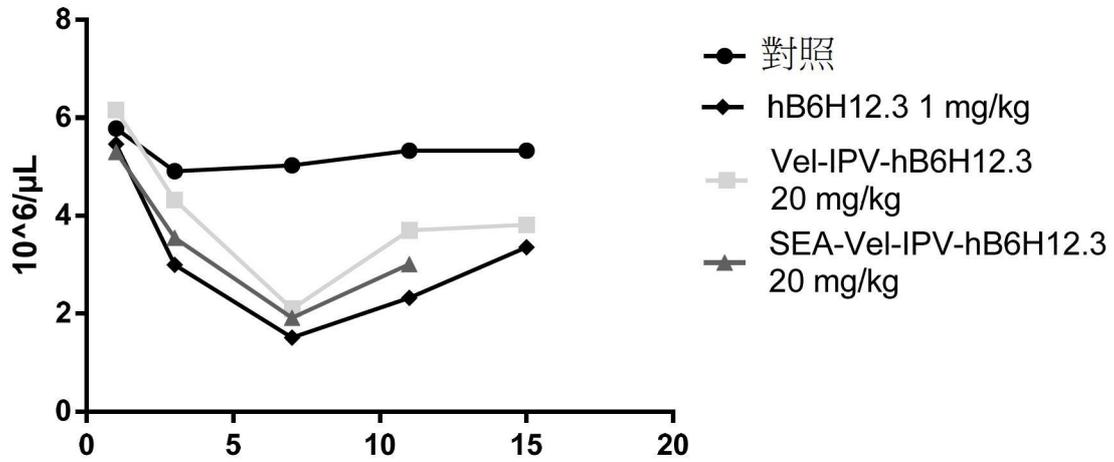
【圖30】

RBC
hB6H12.3 vs. Vel-IPV-hB6H12.3



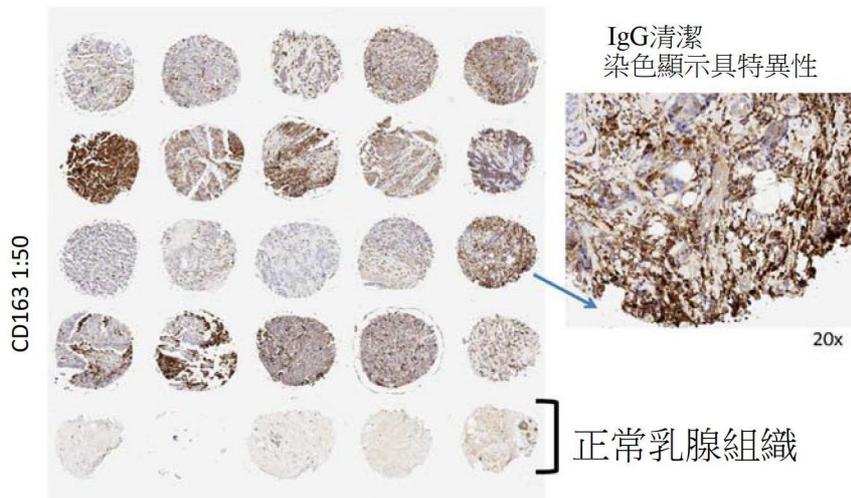
【圖31】

RBC
Vel-IPV-hB6H12.3 vs. SEA-Vel-IPV-hB6H12.3



【圖32】

CD163表現於20/20乳癌核中



藉由腫瘤組織微陣列之IHC分析，吾人證實100%該等樣品存在顯著量的CD163+巨噬細胞。

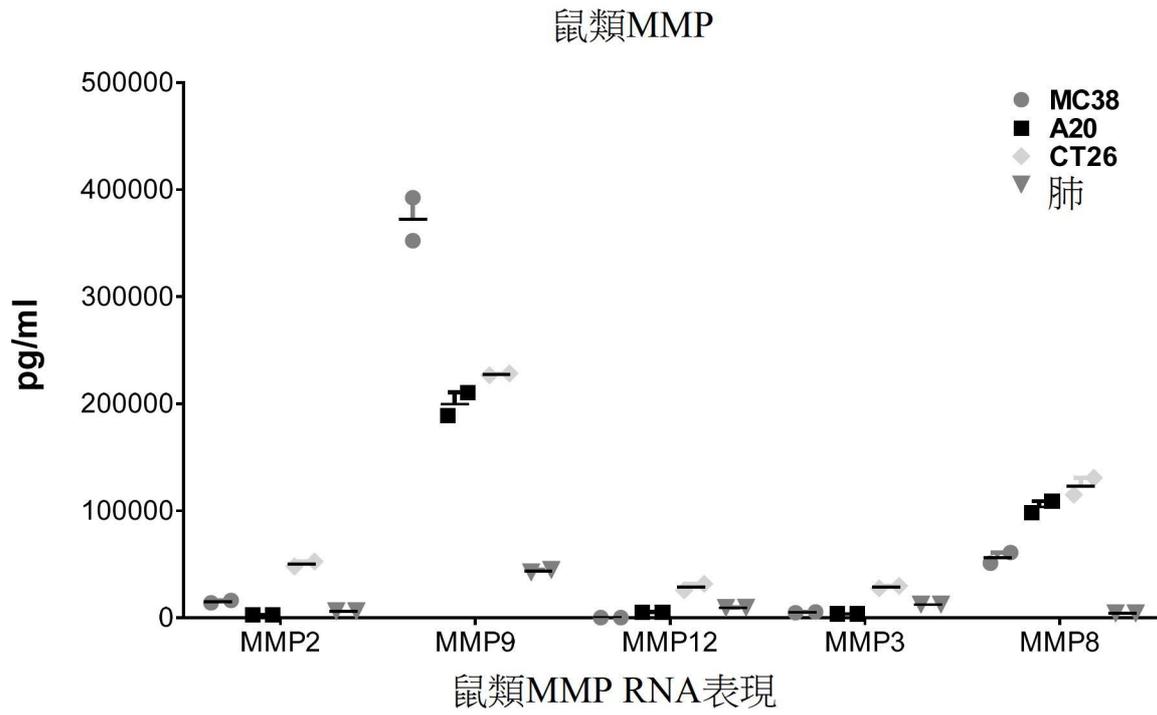
於正常組織中之表現遠遠小於癌症對應體

純系：10D6，1:50稀釋，2X mag，DAB_45FP，利用DAB精細套組

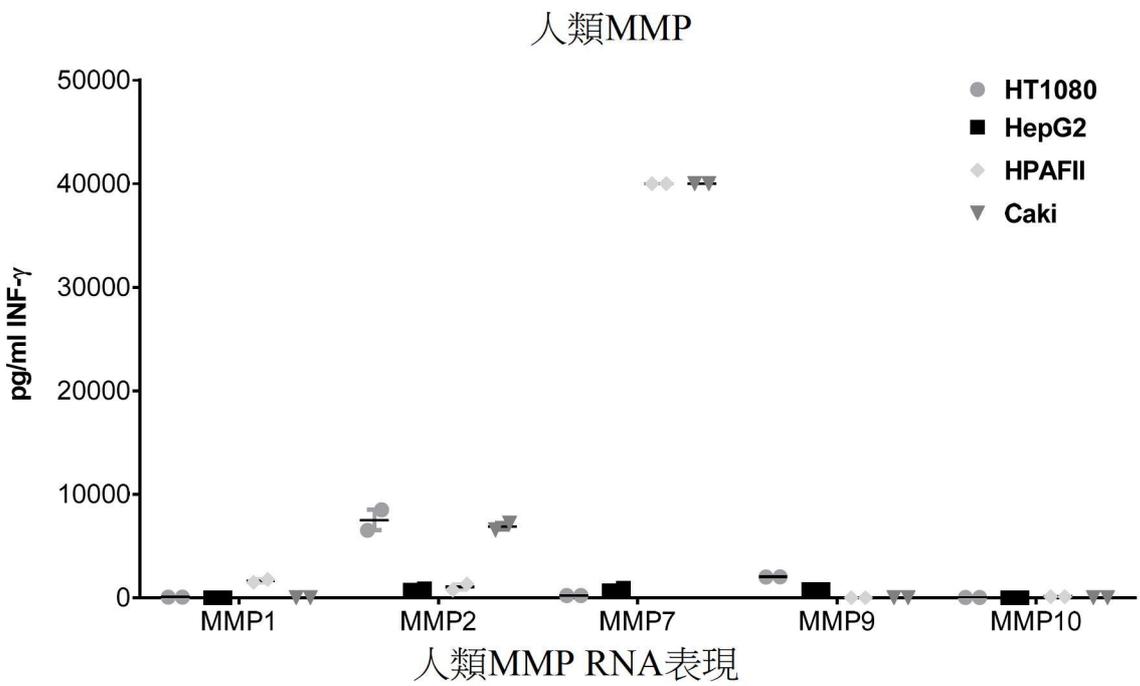
【圖33】

M11 CC	<p style="text-align: center;">MMP2 序列</p> <hr/> <p>輕鏈 -LEIRAAFLRQRNTALRTEVAELEQEVEQRLENEVSQYETRYSGGGGGLG*VRGGGGS (SEQ ID NO: 47) 重鏈 -LEIEAAFLEARENTALETRVAELRQRVQRARNRVSQYRTRYSGGGGGLG*VRGGGGS (SEQ ID NO: 46)</p>
M15 CC	<p style="text-align: center;">MMP2 序列</p> <hr/> <p>輕鏈 -LEIEAAFLEQENTALETEVAELEQEVEQRLENIQSQYETRYSGGGGGLG*VRGGGGS (SEQ ID NO: 49) 重鏈 -LEIRAAFLRRRNTALRTRVAELRQRVQRRLRNIVSQYETRYSGGGGGLG*VRGGGGS (SEQ ID NO: 48)</p>
Vel CC	<p style="text-align: center;">MMP2 序列(IPV)</p> <hr/> <p>輕鏈 -GASTTVAQLEEKVKTLLRAENYELKSEVQRLEEQAQLGSIPIVS*LRSG (SEQ ID NO: 51) 重鏈 -GASTSVDELQAEVDQLEDENYALKTKVAQLRKKVEKLGSIPIVS*LRSG (SEQ ID NO: 50)</p>

【圖34】

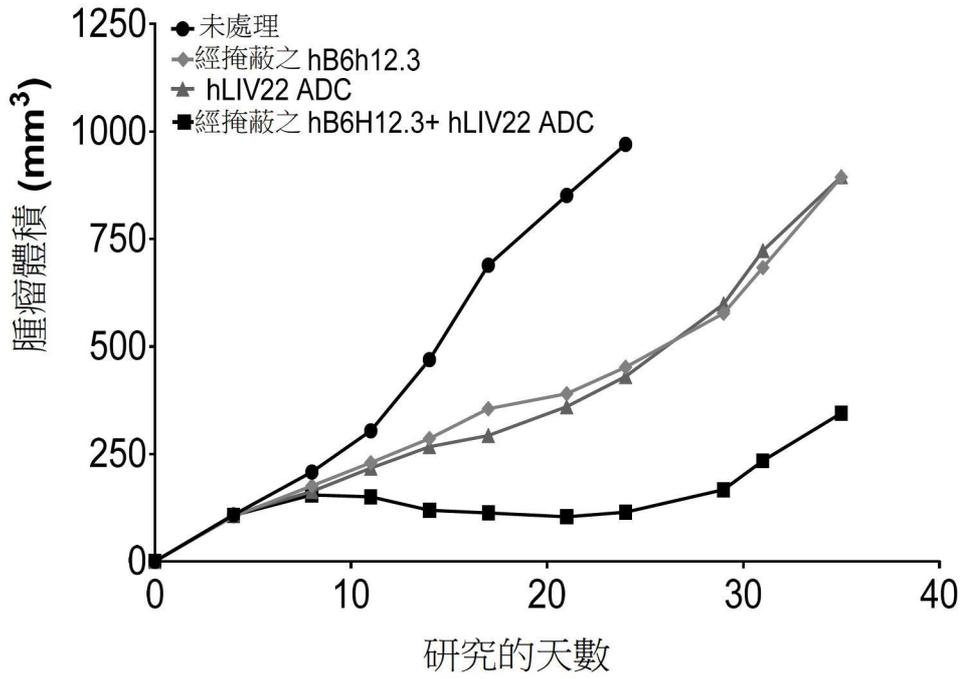


【圖35A】



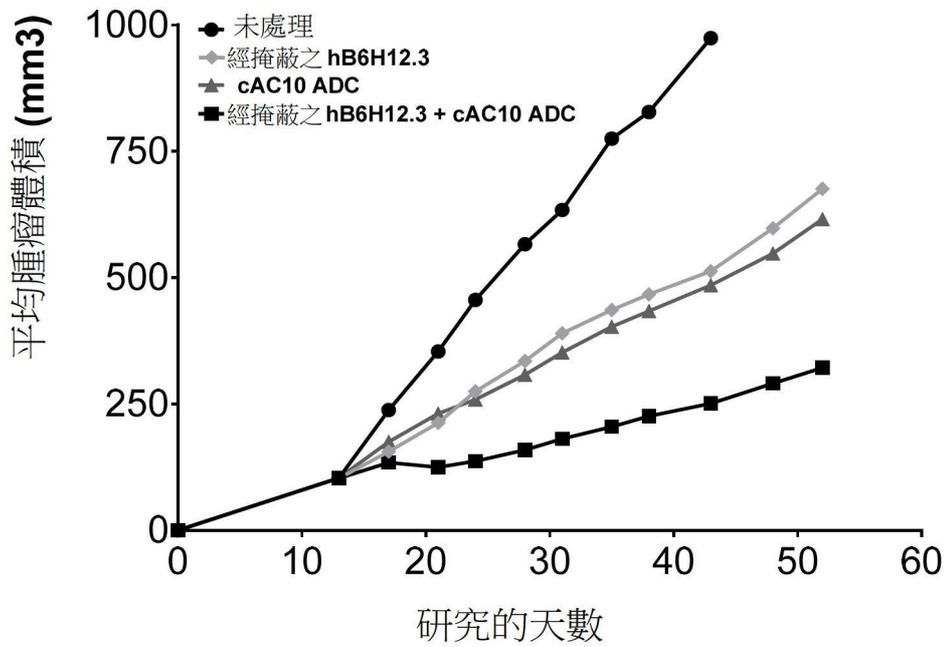
【圖35B】

MCSF7 (異種移植乳癌模型)



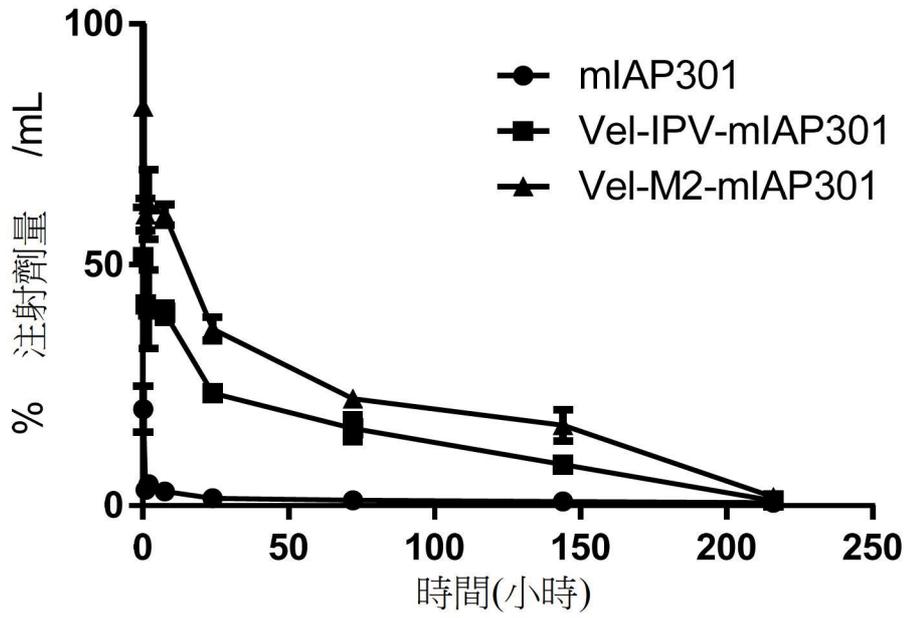
【圖36A】

L428 (異種移植淋巴瘤模型)



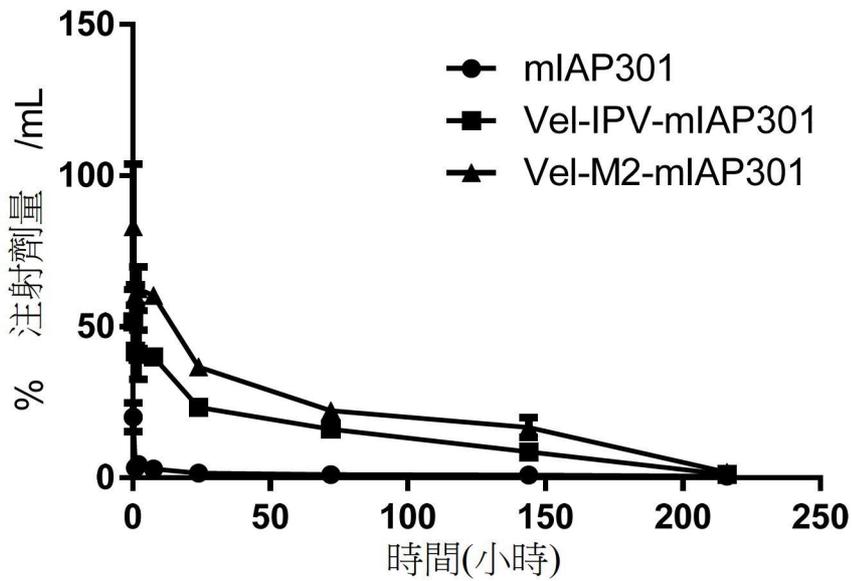
【圖36B】

血漿, 1 mg/kg



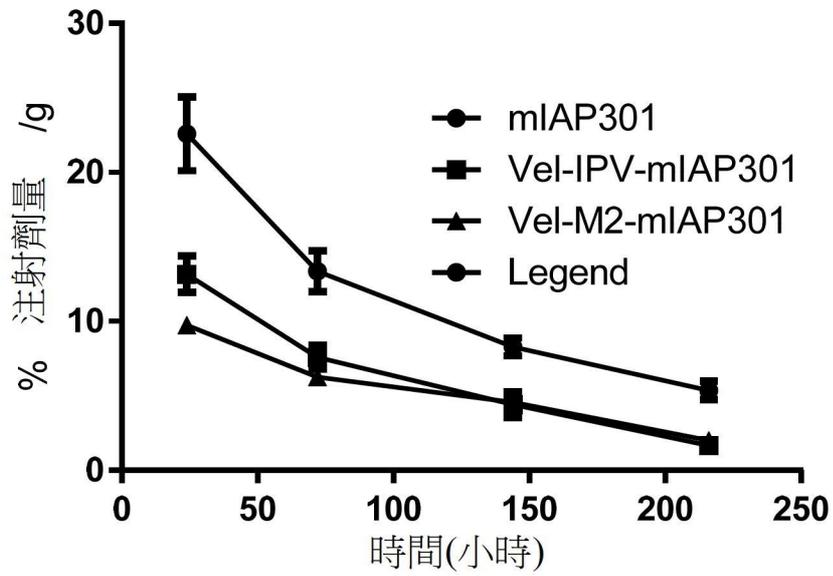
【圖37A】

血漿, 10 mg/kg



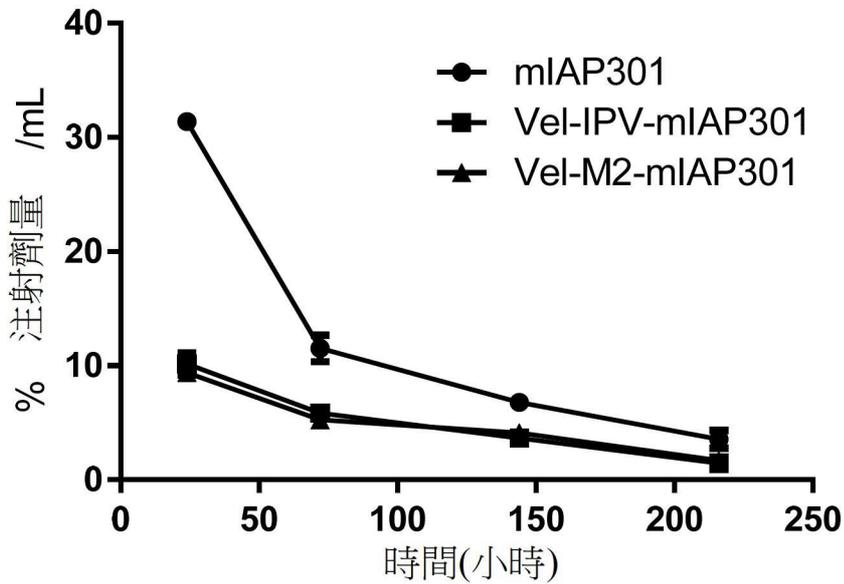
【圖37B】

脾, 1 mg/kg

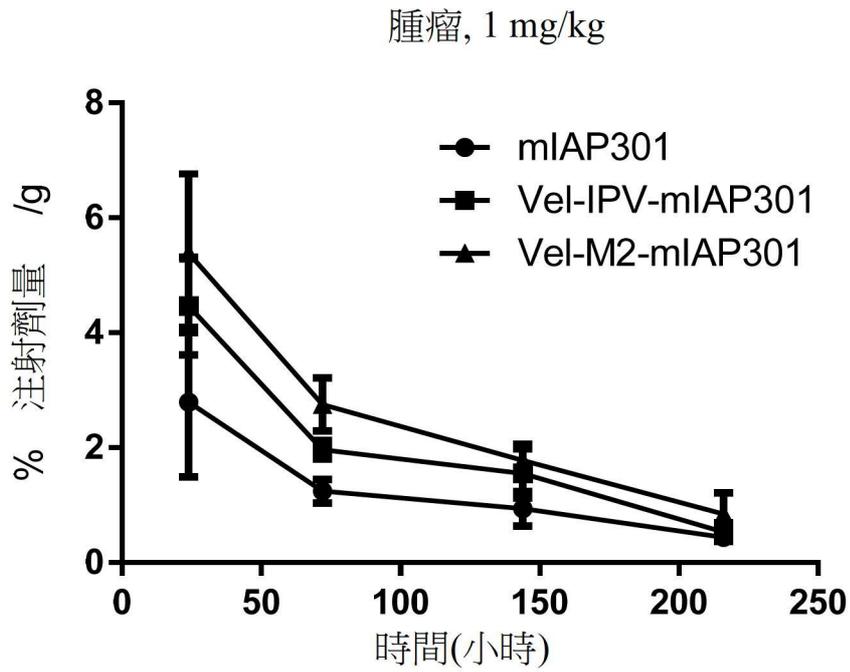


【圖37C】

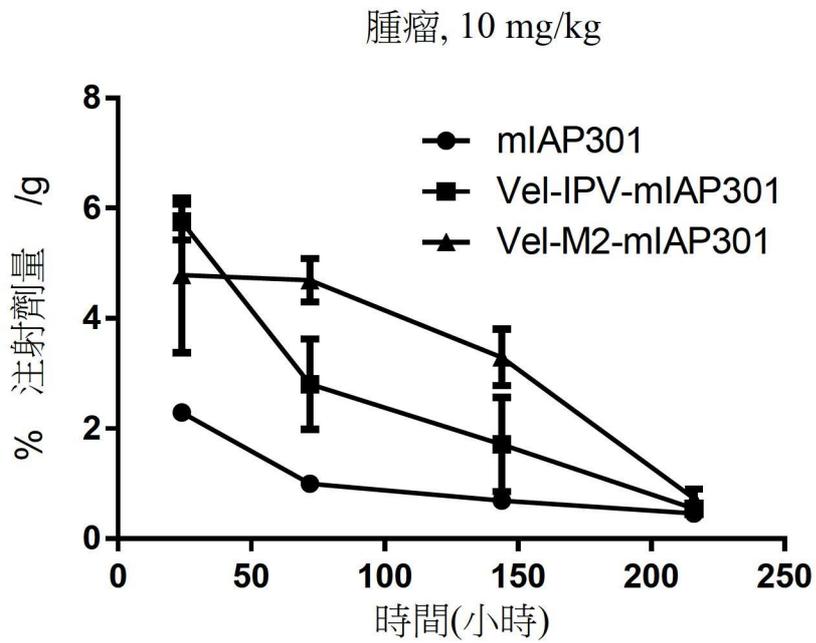
脾, 10 mg/kg



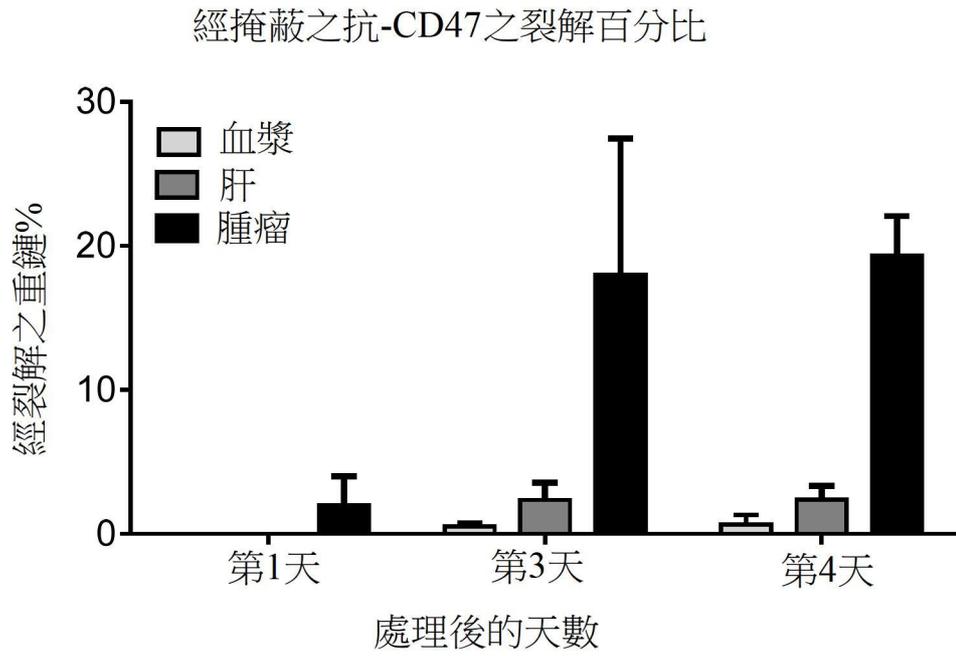
【圖37D】



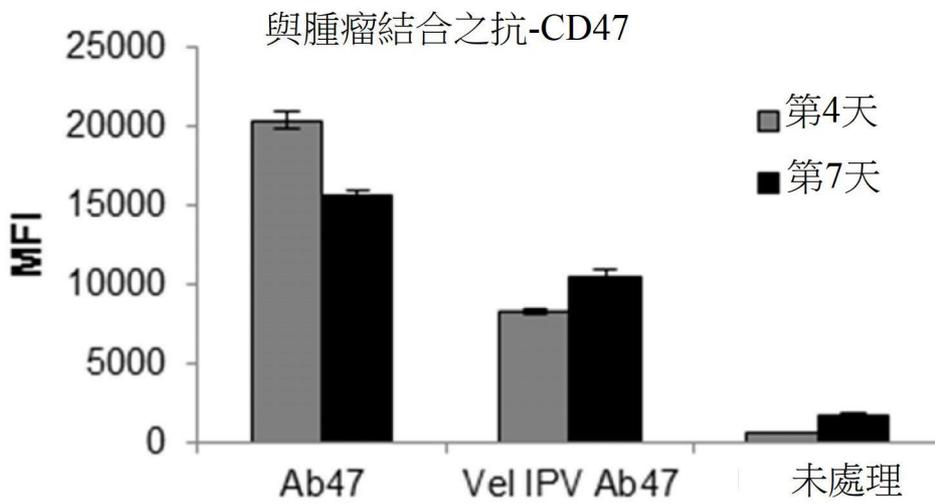
【圖37E】



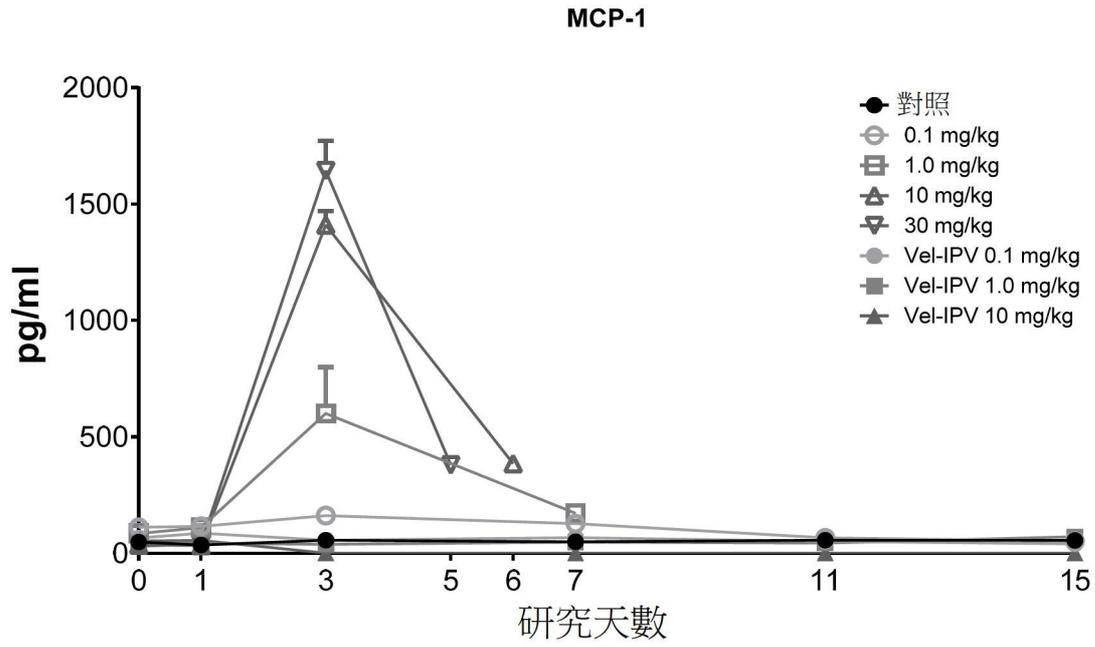
【圖37F】



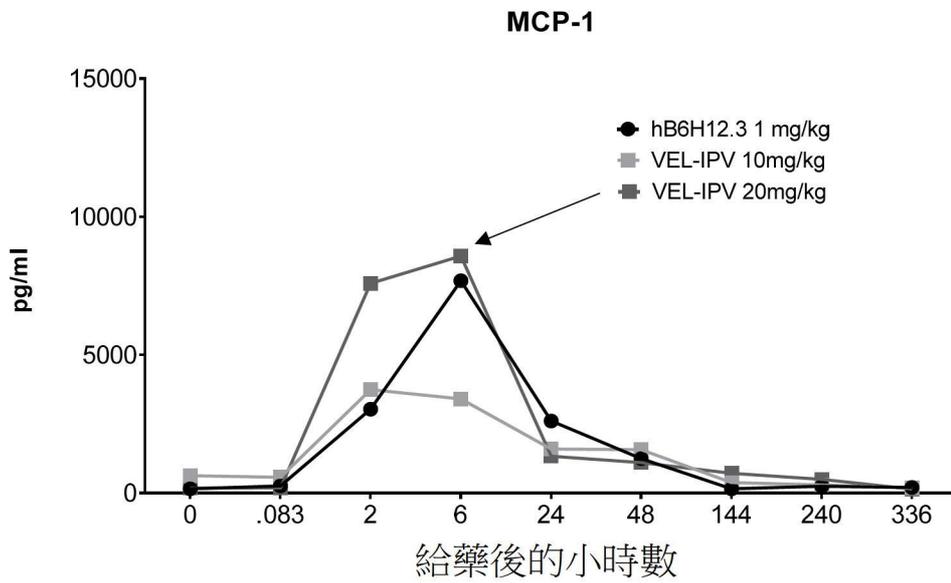
【圖38A】



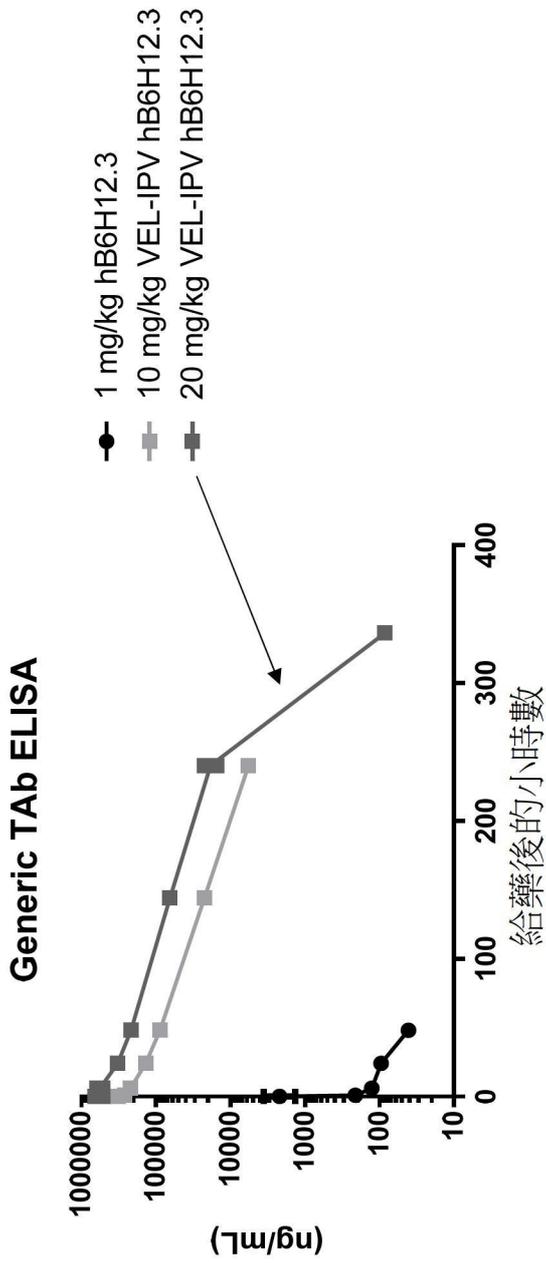
【圖38B】



【圖39A】

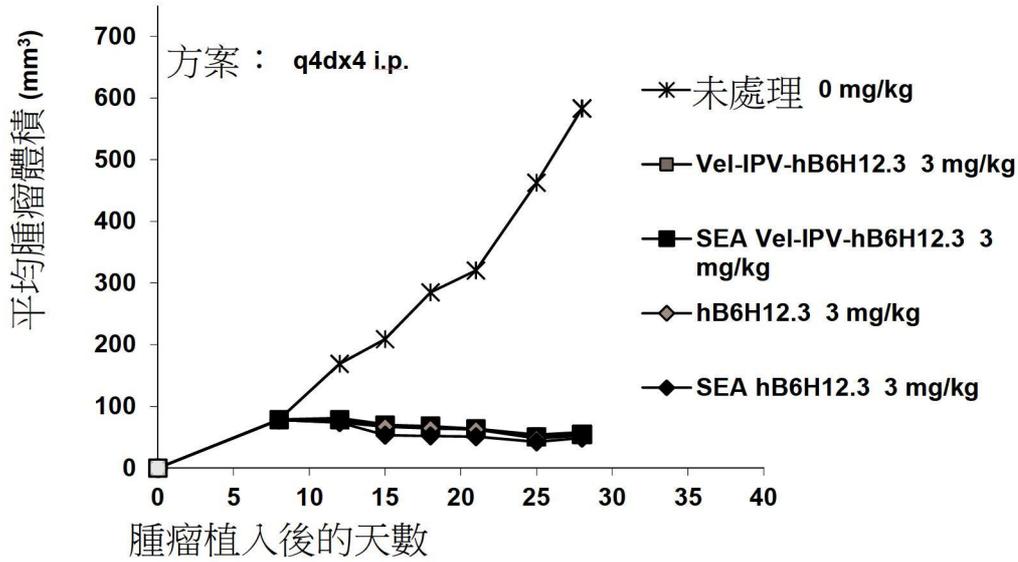


【圖39B】



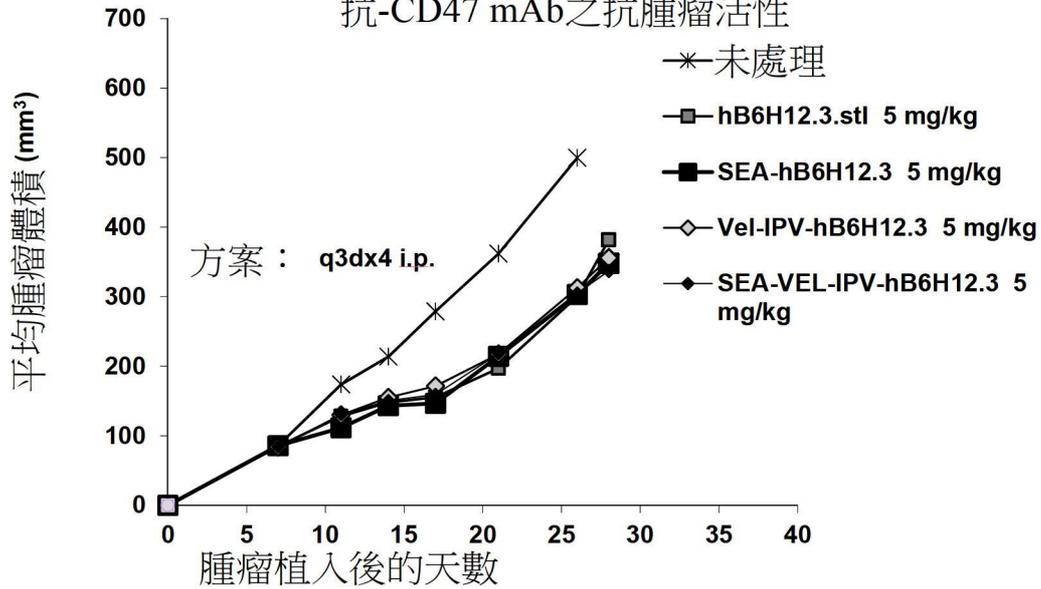
【圖39C】

Detroit562模型中SEA靶向
抗-CD47 mAb之抗腫瘤活性

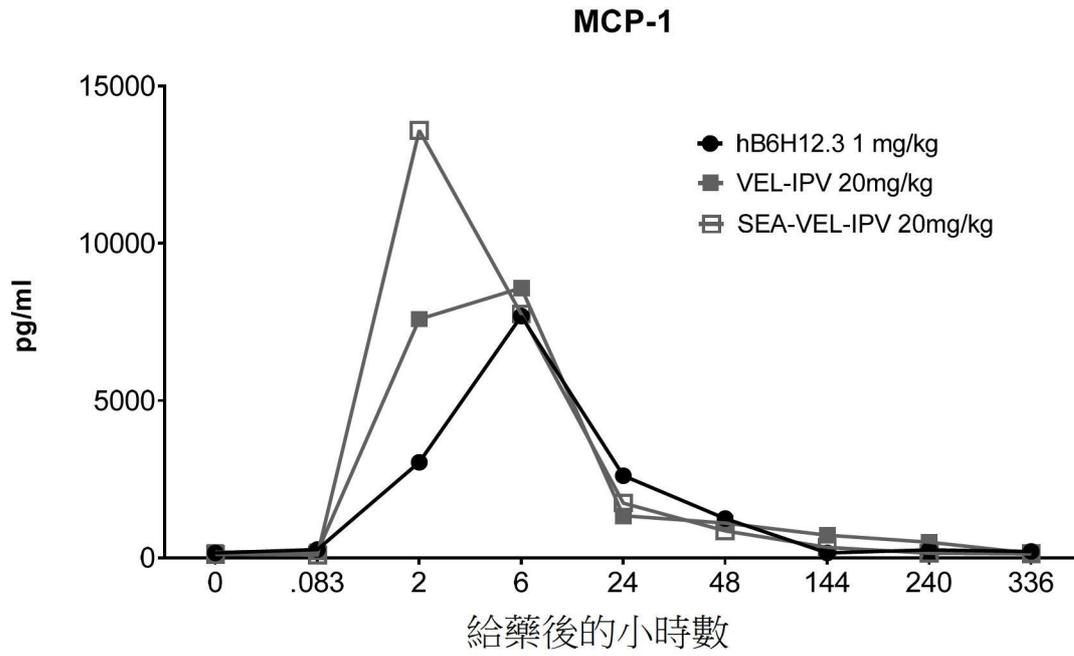


【圖40A】

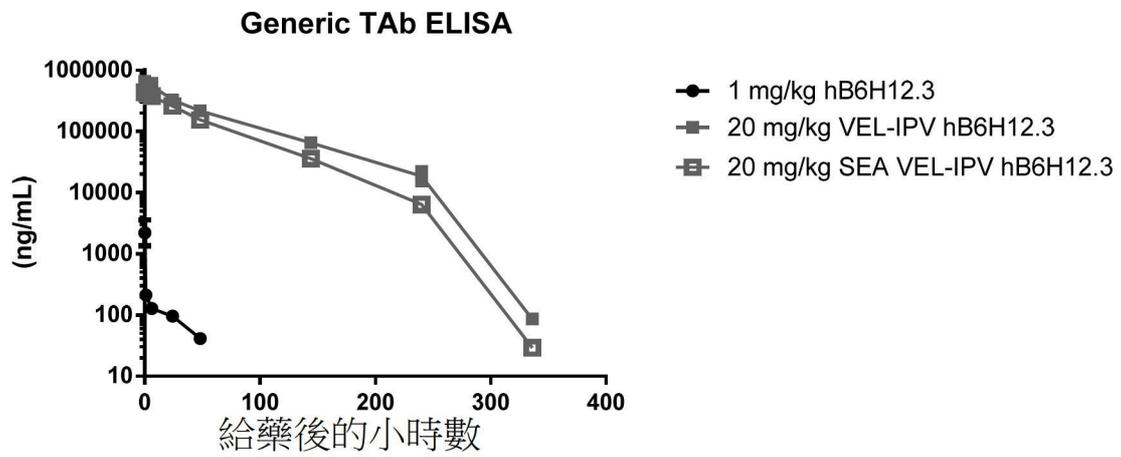
HT1080-10模型中SEA靶向
抗-CD47 mAb之抗腫瘤活性



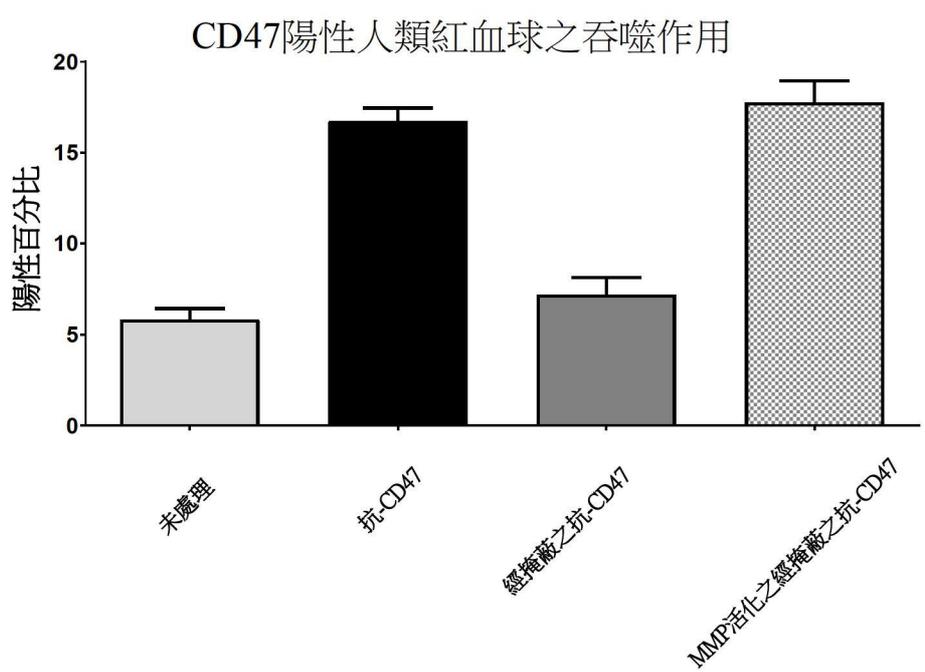
【圖40B】



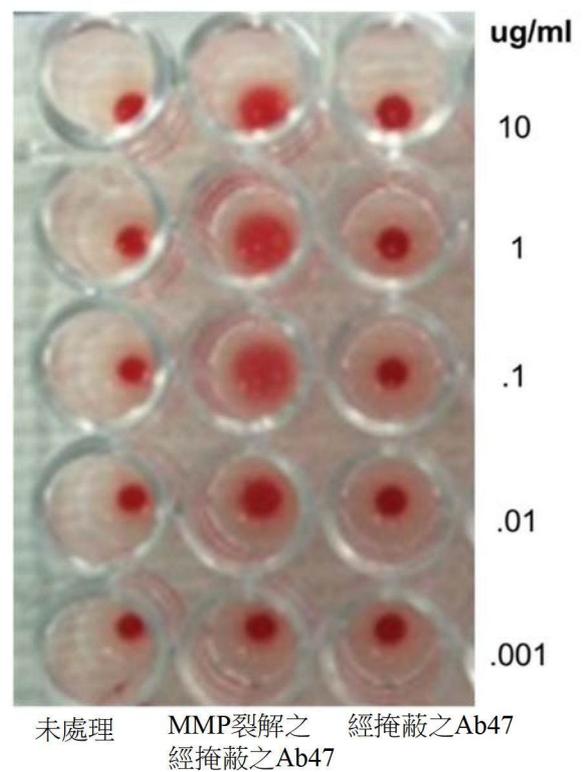
【圖41A】



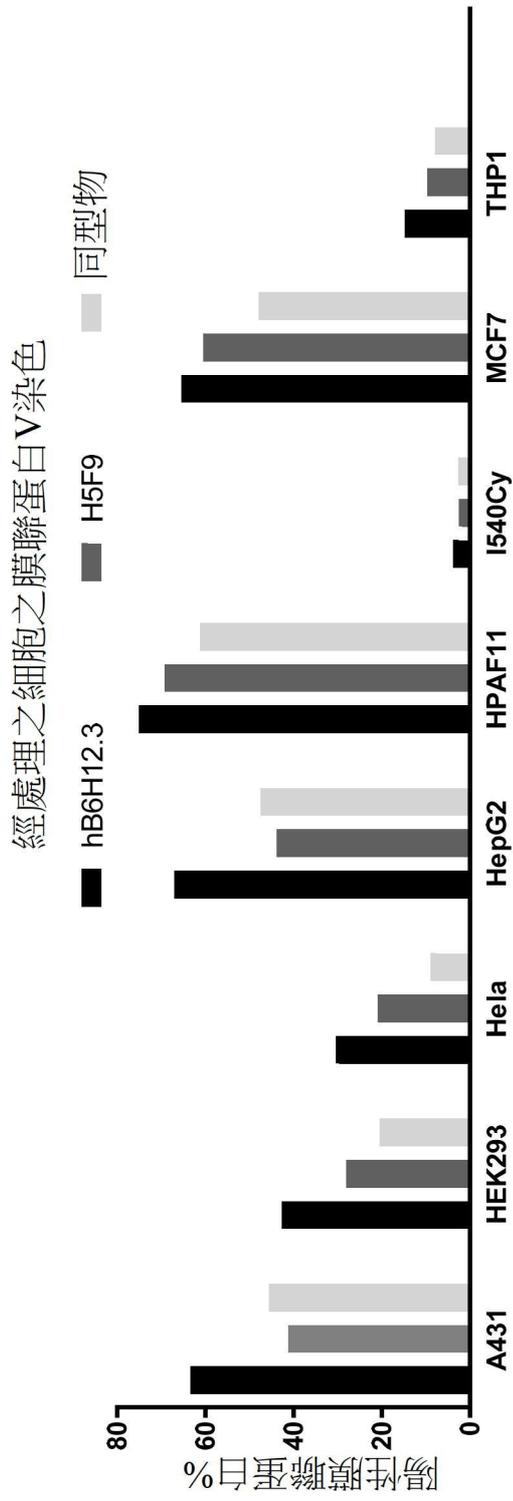
【圖41B】



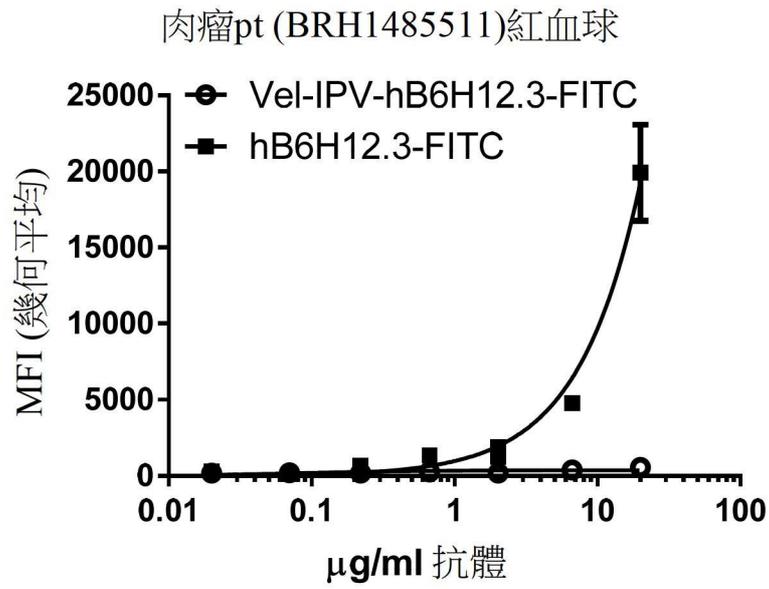
【圖42】



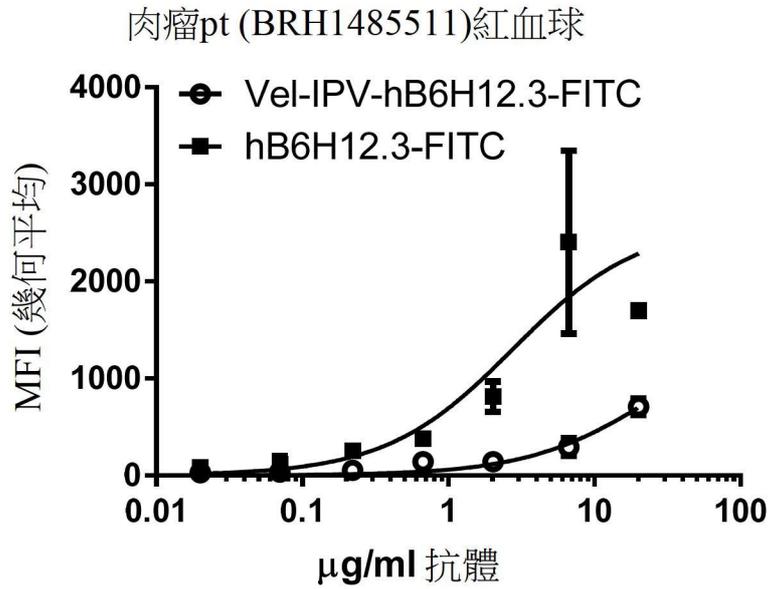
【圖43】



【圖44】

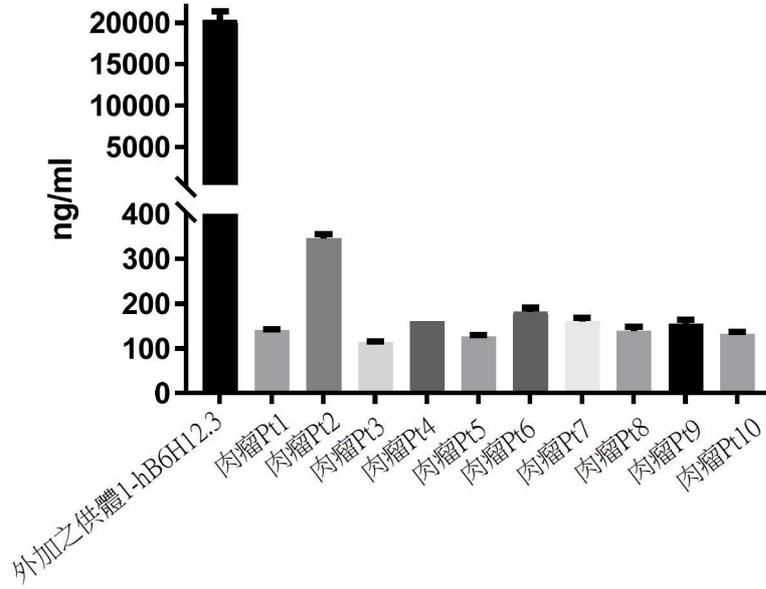


【圖45A】

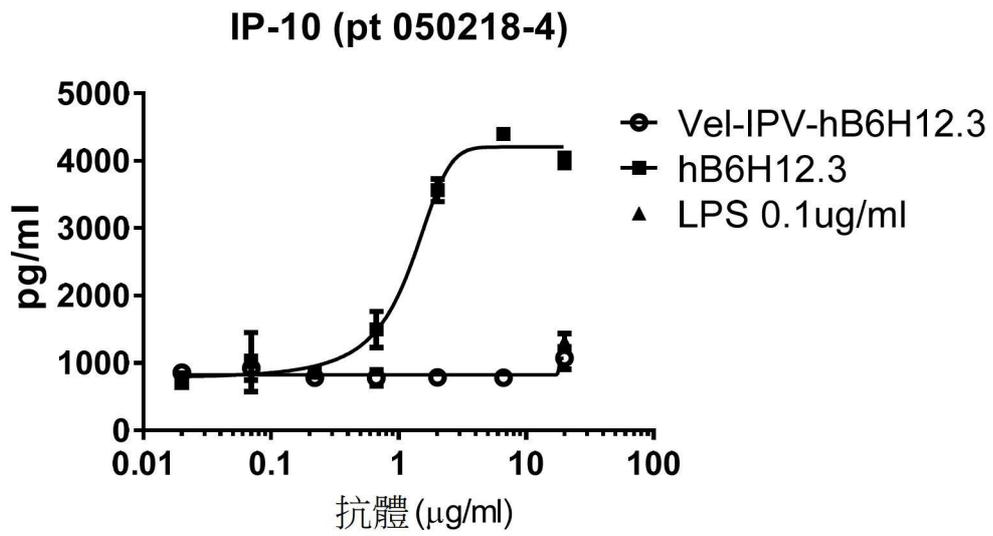


【圖45B】

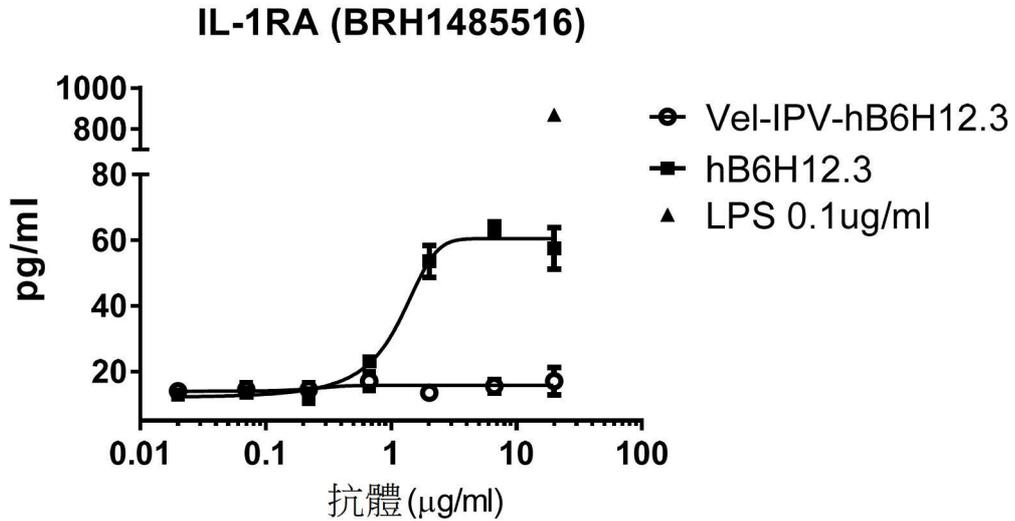
經裂解之Ab (4天, 37°C)
外加於患者血漿中之20 µg/ml Vel-IPV-HB6H12.3



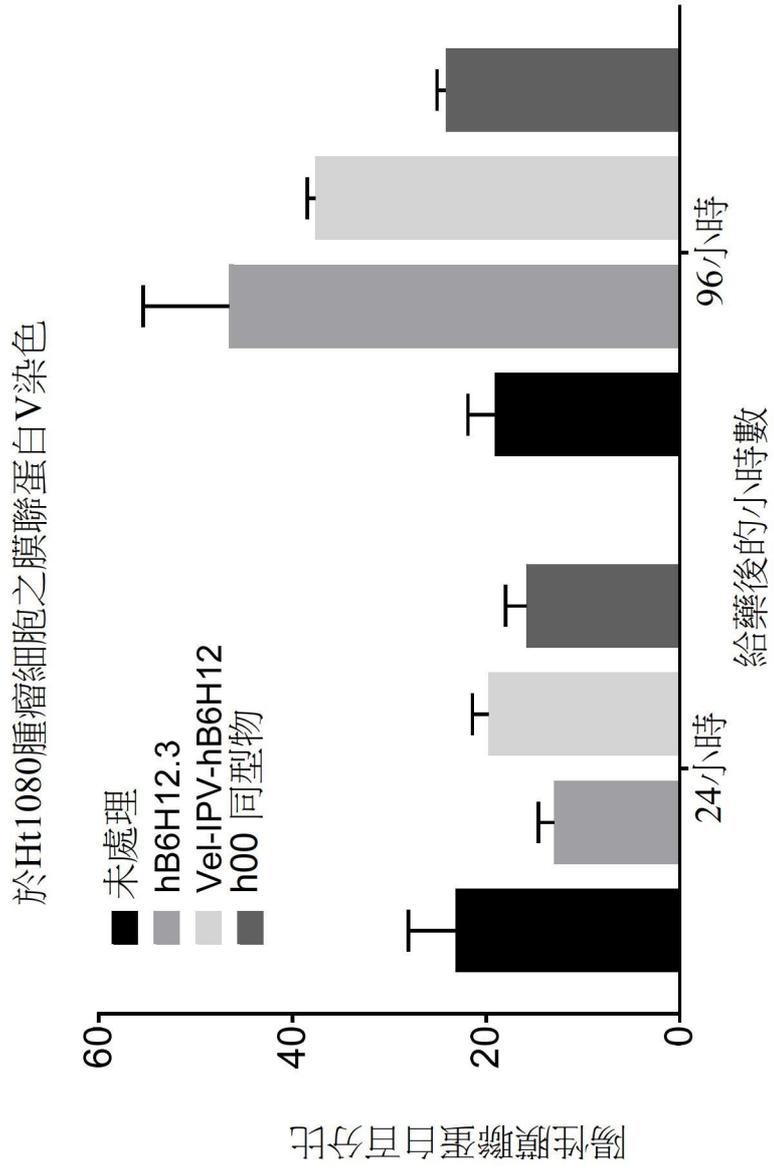
【圖45C】



【圖46A】



【圖46B】



【圖47】